



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

RITA SANTANA DOS REIS

**AVALIAÇÃO DAS GLÂNDULAS PARÓTIDAS DE RATOS *Wistar* INDUZIDOS A  
DIABÉTES MELLITUS 1 E TRATADOS COM EXTRATO METANÓLICO DE  
*Allium cepa* L. E S-METIL-CISTEÍNA**

Recife

2019

RIITA SANTANA DOS REIS

**AVALIAÇÃO DAS GLÂNDULAS PARÓTIDAS DE RATOS *Wistar*  
INDUZIDOS A DIABETES MELLITUS 1 E TRATADOS COM EXTRATO  
METANÓLICO DE *Allium cepa* L. E S-METIL-CISTEÍNA**

Dissertação ou Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

**Área de concentração:** Morfologia e Métodos Clássicos e Avançados.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Pinto de Medeiros.

**Coorientadoras:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Naisandra Bezerra da Silva.

Prf<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Peixoto Magalhães.

Recife

2019

Catálogo na fonte  
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Reis, Rita Santana dos

Avaliação das glândulas parótidas de ratos *Wistar* induzidos a diabetes mellitus 1 e tratados com extrato metanólico de *Allium cepa* L. e S-metil-cisteína / Rita Santana dos Reis -2019.

46 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Juliana Pinto de Medeiros

Coorientadoras: Naisandra Bezerra da Silva e Carolina Peixoto Magalhães

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia. Recife, 2019.

Inclui referências e anexo

1. Diabetes *mellitus* 2. Glandula salivar 3. Tratamento I. Medeiros, Juliana Pinto de (orient.) II. Silva, Naisandra Bezerra da (coorient.) III. Magalhães, Carolina Peixoto (coorient.) IV. Título

616.462

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-193

RITA SANTANA DOS REIS

**AVALIAÇÃO DAS GLÂNDULAS PARÓTIDAS DE RATOS *Wistar*  
INDUZIDOS A DIABETES MELLITUS 1 E TRATADOS COM EXTRATO  
METANÓLICO DE *Allium cepa* L. E S-METIL-CISTEÍNA**

Dissertação ou Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em morfotecnologia.

Aprovada em: 21/02/2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Juliana Pinto de Medeiros (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Maria Silva de Seixas Maia (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho aos meus pais, Lindalva e Joaquim.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a vida e ser minha força nos momentos em que eu não a tive.

A meus pais, Joaquim e Lindalva, pelo amor e dedicação que recebi durante toda minha vida. Por investirem em mim e concederem todas as oportunidades que não tiveram e por apoiarem cada uma de minhas escolhas, mesmo sem entendê-las.

Aos meus irmãos, André, Joelma e Josélia, por sempre me apoiarem e serem os melhores amigos que eu poderia ter.

A minha família, cunhados e sobrinhos, por me distraírem dos estresses encontrados ao longo do percurso e deixarem minha vida mais alegre.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Pinto, pela oportunidade de orientação que me proporcionou dois anos de muito aprendizado e novas experiências.

Ao programa de Pós-graduação em Morfoecologia, ao qual faço parte.

A Capes pelo incentivo a ciência brasileira.

As minhas co-orientadoras, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Peixoto e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Naisandra Bezerra, por todo apoio prestado no decorrer desses dois anos, principalmente para a aquisição e tratamento das amostras.

Ao prof. Dr. Francisco Amanajás, por todo apoio durante o desenvolvimento da pesquisa, especialmente, durante a metodologia histológica e estatística. Por sempre sanar minhas dúvidas e pela paciência, mesmo sem ter qualquer responsabilidade com minha pesquisa.

Ao Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – DEMOR/UFRN, nas pessoas da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Naisandra Bezerra, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Medeiros e Lycianne Lemos, por disponibilizarem os animais utilizados nessa pesquisa e pela forte parceria realizada entre as duas universidades.

Aos laboratórios de Biotecnologia e Fármacos, Anatomia Humana e Genética do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco – CAV/UFPE, por cederem o espaço e os equipamentos necessários para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao técnico André Pukey, pelo apoio e por sempre tentar encontrar uma forma de melhorar e adiantar o trabalho.

Aos amigos de sempre, Rosana, Fernanda, Rafaela e Sílvio, por serem um grande apoio, mesmo que não possamos estar tão próximos ultimamente.

As melhores parcerias para diversão, Raquel, Rosana, Pedro, Lucas e Sabrina, por garantirem os melhores momentos de risos.

As minhas amigas, Táfnes, Carla e Elizandra, por serem as melhores companhias para se dividir casa e me aguentarem em dias de estresse.

Aos companheiros de turma de mestrado, pelos momentos e sufocos compartilhados.

A todos aqueles que foram ou são estudantes meus e que me transformam em uma profissional cada vez melhor.

A todos e todas que me apoiaram para a realização desse trabalho.

Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer (MAHATMA GANDHI).

## RESUMO

A diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) é uma doença metabólica, caracterizada pela destruição das células beta pancreáticas, levando a baixa produção de insulina e conseqüentemente, hiperglicemia crônica. Nas glândulas salivares, leva a malformação, danos teciduais e prejuízo na produção de saliva. *Allium cepa L.*, popularmente conhecida como cebola comum, é uma planta de forte potencial medicinal. Sua importância está no fato de que contém vários compostos com princípio ativo, um deles é a S-Metil-Cisteína. Assim, o presente estudo objetivou avaliar através de histomorfometria o efeito de um tratamento com o extrato de *Allium cepa L.* e S-Metil-Cisteína nas glândulas parótidas de ratos *Wistar* frente a diabetes mellitus tipo 1. Foram utilizados 35 ratos *Wistar* machos foram divididos em quatro grupos: Grupo controle (GC; n = 8), grupo diabético sem tratamento (GDST, n = 9), grupo diabético tratado com S-Metil-Cisteína (GDTS, n = 9) e grupo diabético tratado com extrato de *Allium cepa L.* (GDTE, n = 9). Os animais passaram por indução a diabetes mellitus tipo 1 por aplicação de streptozotocina, em dosagem única de 60 mg/kg de peso do animal. Os animais GDTE e GDTS foram tratados durante 30 dias com o extrato de *Allium cepa L.* na dosagem de 400 mg/kg e S-Metil-Cisteína na dosagem de 100 mg/kg, respectivamente. Finalizado o experimento, foram anestesiados e eutanasiados e as glândulas parótidas foram removidas para análise morfológica e histomorfométrica. Os resultados foram analisados estatisticamente, considerando-se  $p \leq 0,05$ . A análise histomorfométrica e de correlação mostrou que os grupos diabéticos tratados e não tratados sofrem com os efeitos degradantes gerados pela diabetes, tanto nos ácinos quanto nos ductos. Porém, os tratamentos demonstram resposta a esses efeitos e ação protetora para as células acinares e ductais. O tratamento com a substância S-Metil-Cisteína e o extrato metanólico de *Allium cepa L.* mostram-se eficazes na diminuição dos efeitos progressivos da doença. Destes, o que possui maior atividade é o extrato. Porém, a substância isolada também demonstra importância na proteção celular.

Palavras-chave: Glândula salivar. Diabetes mellitus. Tratamento.

## ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus (DMT1) is a metabolic disease, characterized by the destruction of pancreatic beta cells, leading to low insulin production and consequently chronic hyperglycemia. In the salivary glands, leads to malformation, tissue damage and injury in the production of saliva. *Allium cepa* L., popularly known as common onion, is a plant with strong medicinal potential. Its importance is in the fact that it contains several compounds with active principle, one of them is the S-Methyl-Cisteína. Thus, the present study aimed to evaluate through histomorphometry the effect of treatment with the extract of *Allium cepa* L. and S-Methyl-Cysteine in the parotid glands of Wistar rats against type 1 diabetes mellitus. Were used 35 male Wistar rats were divided (GDST, n = 9), the diabetic group treated with S-Methyl-Cysteine (GDTS, n = 9) and the diabetic group treated with *Allium* extract strain L. (GDTE, n = 9). The animals underwent induction to type 1 diabetes mellitus by application of streptozotocin, in a single dosage of 60 mg/kg of animal weight. The GDTE and GDTS animals were treated for 30 days with *Allium cepa* L. extract at the dosage of 400 mg/kg and S-Methyl Cysteine at the dose of 100 mg/kg, respectively. After the experiment, they were anesthetized and euthanized, and the parotid glands were removed for morphological and histomorphometric analysis. The results were analyzed statistically, considering  $p \leq 0.05$ . Histomorphometric and correlation analysis showed that treated and untreated diabetic groups suffer from the degrading effects generated by diabetes, both in the acini and in the ducts. However, the treatments demonstrate a response to these effects and protective action for acinar and ductal cells. Treatment with the substance S-Methyl Cysteine and the methanolic extract of *Allium cepa* L. are shown to be effective in reducing the progressive effects of the disease. Of these, the most active is the extract. However, the isolated substance also shows importance in cell protection.

Keywords: Salivary gland. Diabetes mellitus. Treatment.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
IDF	International Diabetes Federation
GC	Grupo controle
GDST	Grupo diabético sem tratamento
GDTE	Grupo diabético tratado com extrato de <i>Allium cepa L.</i>
GDTS	Grupo diabético tratado com S-Metil-Cisteína
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
DEMOR	Departamento de Morfologia
CEUA	Comissão de Ética em Uso dos animais

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>14</b>
2.1 Diabetes Mellitus .....	14
2.1.1 Tipos de Diabetes Mellitus .....	15
2.1.2 Diabetes Mellitus Tipo 1 .....	16
2.2 Glândulas Salivares .....	17
2.2.1 Glândulas Parótidas .....	17
2.2.2 Glândulas Parótidas e a Diabetes Mellitus tipo 1 .....	18
2.3 Allium cepa L. ....	19
2.4 S-Metil-Cisteína.....	20
2.5 Objetivos .....	22
2.5.1 Objetivo Geral .....	22
2.5.2 Objetivos específicos.....	22
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>23</b>
3.1 Obtenção dos animais.....	23
3.2 Manutenção biológica dos animais .....	23
3.3 Modelo experimental .....	23
3.4 Análise Histomorfométrica.....	24
3.5 Análise de Correlações .....	25
3.6 Análise Estatística .....	26
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
4.1 Histomorfometria glandular .....	27
4.2 Correlações entre os dados histomorfométricos e o peso animal e glandular.....	30
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
5.1 Histomorfometria glandular .....	34
5.2 Correlações entre os dados histomorfométricos e o peso animal e glandular.....	35
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>
<b>ANEXO A</b> .....	<b>45</b>
<b>ANEXO B</b> .....	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) é uma doença metabólica extremamente preocupante. Essa doença é marcada pela disfunção das células Beta pancreáticas, em razão autoimune ou genética, que resulta em baixa produção de insulina e conseqüentemente em hiperglicemia crônica. É considerada presente quando o indivíduo em jejum apresenta um nível de 126 mg/dl de glicose plasmática (APPERLEY; MAY, 2019; STEWART et al., 2016; JA, 2012). Afeta predominantemente crianças e adolescentes, porém, também pode aparecer na vida adulta. Os sintomas utilizados para o diagnóstico da doença além da hiperglicemia incluem, polifagia, poliúria e polidipsia (MICHELS, 2015).

O maior problema decorrente da diabetes está no fato de que gera um excesso de glicose disperso na corrente sanguínea. A glicose disponível passa então a se juntar a radicais livres e por processos de reações químicas da origem aos produtos finais de glicação avançada, também conhecidos por AGEs. Estes possuem estrutura heterogênea e quando associados as células prejudicam os processos vitais, geram processos inflamatórios e aumentam o estresse oxidativo, causando prejuízo nos diversos órgãos e tecidos (MADHAVAN et al., 2018; MONTEIRO et al., 2016).

As glândulas salivares parótidas dizem respeito a um par de glândulas localizadas anteriormente aos primeiros molares superiores. Essas glândulas produzem uma secreção exócrina chamada de saliva, que é um componente importante da saúde oral. O fluido salivar previne contra infecções, favorece o paladar na identificação dos sabores, ajuda na digestão, deglutição de alimentos, protege a dentição e lubrifica a cavidade oral (AFZELIUS et al., 2014; CHOI et al., 2013; DELPORTE, 2014; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

A produção e liberação da saliva é comandada pelos sistemas nervosos parassimpático e simpático autônomo, utilizando um grande fluxo sanguíneo e gerando uma alta taxa metabólica (HAKAMI, 2017; JESUS; BEANES; RODRIGUEZ, 2015). O comando do sistema nervoso induz as células secretoras dos ácinos a produzirem um fluido rico em água, sódio (Na<sup>+</sup>), cloreto (Cl<sup>-</sup>), potássio (K<sup>+</sup>) e bicarbonato (HCO<sup>-3</sup>) (FONG et al., 2017).

A diabetes mellitus atinge as glândulas salivares, comprometendo a distribuição das células acinares, modificando os receptores de glicose e diminuindo a produção de saliva (ALJERF; ALHAFFAR, 2017; MACIEJCZYK et al., 2015; MONTEIRO et al., 2016). Ainda, estudos demonstram que indivíduos obesos com resistência à insulina ou pré-diabéticos apresentam maiores taxas de estresse oxidativo e diminuição da produção e liberação de saliva (ITTICHAICHAROEN; APAIJAI; TANAJAK, 2018). A xerostomia, caracterizada pela presença de boca seca, pode ser causada por modificações da composição ou do fluxo salivar e é um dos marcos da DMT1 (JA, 2012). Essa doença secundária gerada pela diabetes leva a secura da mucosa oral, prejudica a deglutição e fala, favorece a formação de processos inflamatórios e infecções orais (MILLER et al., 2009).

A diabetes mellitus gera ainda diminuição da área dos ductos granulares e modificações na deposição laminar das glândulas parótidas e submandibulares de ratos *Wistar*. As alterações morfológicas que ocorrem seguem correlatas ao avanço da doença nos animais (MONTEIRO et al., 2016).

*Allium cepa* L. (cebola comum) é uma das espécies de plantas pertencentes ao gênero *Allium* da Família de monocotiledôneas Liliacea. É uma planta de forte importância econômica, pois faz parte do consumo alimentar da maior parte da população humana, além de possuir forte potencial farmacológico. É rica em compostos organosulfurados, que lhes garantem o odor característico ao ser cortada, saponinas esteroides, flavonoides e compostos orgânicos de selênio, compostos associados a propriedades medicinais (SHARIFI-RAD; MNAYER; TABANELLI, 2016).

Os compostos ativos da cebola possuem características de agentes antioxidante, anti-asmático, anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo (SAJID et al., 2014). Um destes componentes encontrados na cebola é a S-Metil-Cisteína, um aminoácido que contém enxofre e tem atividade antilipidêmica, antioxidante e anti-hiperglicêmica (THOMAS, 2015; YOSHINARI; SHIOJIMA; IGARASHI, 2012). Tais fatores apontam que o uso dessa planta e dessa substância pode favorecer no controle da glicemia sanguínea e proteção contra danos em órgãos e tecidos (BEHROUJ et al., 2018; SAJID et al., 2014).

Doenças como a DMT1 geram grande impacto para a sociedade, pois os custos individuais e na saúde pública para manutenção de tratamentos são

altíssimos. Além disso, essa doença interfere no convívio social dos indivíduos portadores, afeta estruturas corporais, danifica órgãos e tecidos e estimula o surgimento de doenças secundárias, como é o caso da xerostomia. Desta forma, faz-se necessário a realização de estudos que tragam formas alternativas de tratamento, que sejam eficientes, de baixo custo de mercado, com menores taxas de toxicidade e menos efeitos colaterais que drogas sintéticas. Tendo em vista esses fatores, nosso estudo propôs-se a avaliar através de histomorfometria o efeito dos tratamentos a base do extrato metanólico de *Allium cepa L.* e da substância isolada S-Metil-Cisteína em glândulas parótidas de ratos *Wistar* induzidos a DMT1.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Diabetes Mellitus

A International Diabetes Federation (IDF) define a diabetes mellitus como uma doença metabólica crônica e não transmissível, causada pelo aumento excessivo da glicose disponível no sangue. A hiperglicemia que gera a diabetes está associada a insuficiência de insulina, utilização inadequada da insulina ou problemas na produção hormonal (UNNIKRISHNAN; ANJANA; MOHAN, 2016).

Ainda segundo a IDF, a diabetes em 2017 teve maior peso que doenças infecciosas, como a AIDS, e foi considerada mundialmente como a causa de morte de 10,7% dos indivíduos entre 20 e 79 anos de idade. A estimativa dessa doença ainda considerando a faixa etária entre 20 e 79 anos de idade, demonstra que aproximadamente 425 milhões de pessoas em todo mundo sofrem com a diabetes atualmente e que em 2045 aproximadamente 629 milhões de pessoas terão diabetes. Por causa disso a diabetes gera um gasto anual de US \$ 727 bilhões por pessoa.

A IDF também aponta que a maior tendência de propagação da doença se dará em países de baixa e média renda. Isso é comprovado pelo crescimento avançado do distúrbio metabólico na América do Sul. Só Brasil apresenta uma incidência de 12,5 milhões de pessoas diabéticas e ocupa o 5º lugar no ranking mundial de pessoas com intolerância à glicose diminuída, perdendo apenas para a China, os Estados Unidos da América, a Indonésia e a Índia.

A diabetes mellitus é responsável por danos e disfunções de órgãos e tecidos (ALAM et al., 2014). É um importante fator de risco para doenças cardiovasculares, mesmo quando os indivíduos que a possuem têm os fatores de predisposição controlados, como é o caso do IMC, idade, hipertensão e tabagismo (YAHAGI et al., 2018). Aumenta o risco de desenvolvimento e rompimento de placas arteriosclerosas, associando-se a eventos cardíacos fatais e não fatais, o que eleva também o risco de morte cardíaca súbita e não súbita (MORROW, 2019; YAHAGI et al., 2018).

A maior parte do avanço da diabetes se deve a formação dos produtos de glicação avançada (AGEs). Os AGEs são importantes causas para existência de várias modificações histológicas, como retinopatia, nefropatia, cardiomiopatia e neuropatia. Isso acontece devido ao fato dos AGEs aumentam

consideravelmente o estresse oxidativo, por estabelecerem ligações cruzadas com proteínas, se ligarem a receptores celulares e formarem radicais livres (GLYCA-, 2008; LADDHA; KULKARNI, 2018).

### **2.1.1 Tipos de Diabetes Mellitus**

De acordo com IDF a Diabetes mellitus pode ser dividida em subtipos baseados em sua etiologia, são eles: Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), diabetes mellitus gestacional, diabetes mellitus monogênico, que desencadeia outros tipos, como a diabetes mellitus neonatal e diabetes mellitus de início da maturidade dos jovens (MODY), e a diabetes mellitus secundária. Dentre esses tipos, os mais comuns e frequentes são os tipos DMT1, DMT2 e gestacional.

A DMT1 diz respeito a uma doença autoimune onde as células beta do pâncreas, responsáveis pela produção de insulina, são atacadas e destruídas pelo sistema imunológico, provocando uma diminuição dos níveis de insulina na corrente sanguínea (CHEON, 2018; HOWARD, 2018). O tipo 2 da diabetes mellitus é o tipo mais frequente da doença e geralmente aparece tardiamente. Caracteriza-se por sua origem multifatorial e pela diminuição da sensibilidade a insulina, que leva a resistência de órgãos-alvo (ALAM et al., 2014; CHOI; YIM, 2018; WANG et al., 2017; YU; YANG; RUI, 2019). Já a diabetes gestacional é atribuída a qualquer disfunção da tolerância de insulina ao longo do período gestacional (BENHALIMA; DEVLIEGER, 2015).

O diabetes monogênico é um tipo raro de diabetes. Resulta de mutações genéticas em proteínas e fatores de transcrição responsáveis por controlar a função e desenvolvimento do pâncreas (INTRODUCTION, 2016). Quando aparece antes dos seis meses de vida é considerado do tipo neonatal e quando aparece na adolescência ou em adultos jovens é tida como diabetes de início de maturidade (AN; ABAC, 2015; HATTERSLEY; PATEL, 2017). O diabetes secundário, segundo a IDF, é o resultado de complicações geradas por outras doenças, como distúrbios hormonais. Esse tipo de diabetes pode ser chamado de diabetes mellitus tipo 3 (EWALD; BRETZEL, 2013).

### **2.1.2 Diabetes Mellitus Tipo 1**

A DMT1 foi primariamente descrita como um distúrbio restrito a crianças e adolescentes, porém, atualmente sabe-se que ela não possui restrição de idade e pode aparecer também em adultos, mesmo que mais raramente. Sua origem é multifatorial, dependendo da interação de fatores genéticos e ambientais, e seus principais sintomas de diagnóstico incluem: hiperglicemia elevada, polifagia, polidipsia e poliúria (MICHELS, 2015; NEGRATO et al., 2017).

O DMT1 tem crescido consideravelmente em todo mundo. Cerca de 86.000 crianças são diagnosticadas com a doença anualmente (NEGRATO et al., 2017). A IDF estima que em países de alta renda a DMT1 tem uma incidência de 7% a 12% de todos os casos de diabetes mellitus descritos. Nos países de renda média ou baixa essa estimativa não é tão clara devido a falta de trabalhos padronizados.

A existência da DMT1 faz com que os indivíduos portadores sofram com a resistência a insulina, aumento de processos pró-inflamatórios, má distribuição do tecido adiposo, alterações no volume ósseo, aumento da quantidade de lipídeos livre e distúrbios morfofuncionais em diversos órgãos como, pâncreas e fígado (CARVALHO et al., 2018). Além disso, o fato de que a maior parte dos portadores é composta por crianças e adolescentes, faz com que eles se tornem suscetíveis a problemas de crescimento e psicossociais, como o bullying. Crianças com DMT1 demonstram maior grau de vitimização e podem ser mais facilmente intimidadas, dada a necessidade de se adequar ao manejo da doença (JEFFERSON; ARAGÃO; ALVES, 2018).

Disfunções cocleares também podem ser associadas a esta doença. A DMT1 tem grande contribuição nos problemas microvasculares e quando isso acontece nos vasos ligados a cóclea pode levar a disfunção coclear, e conseqüentemente pode acarretar em problemas auditivos (FELÍCIO et al., 2018). Pacientes com DMT1 possuem uma autoimunidade cardíaca defeituosa, aumento da atividade inflamatória no coração e crescimento da quantidade e desenvolvimento de placas aterosclerosas (SOUSA et al., 2018).

## **2.2 Glândulas Salivares**

As glândulas salivares são glândulas exócrinas agrupadas em: glândulas salivares maiores e menores. As glândulas salivares maiores originam-se por volta da 6<sup>o</sup> a 8<sup>o</sup> semana de desenvolvimento, juntamente com outras estruturas da cabeça e pescoço. São pareadas e divididas em três tipos diferentes: parótidas, submandibulares e sublinguais (ATKINSON; III; HUANG, 2018). São compostas por células acinares, células ductais e canais transportadores. As 3 glândulas salivares maiores juntamente com as menores são responsáveis pela produção de saliva, que atua na digestão e na saúde oral, bem como, regulam respostas imunes e inflamatórias para a cavidade oral (ATKINSON; III; HUANG, 2018; KUSUDA et al., 2018; TERRIZZI et al., 2018).

A saliva produzida pelas glândulas salivares é um fluido misto composto de 99,5 % de água e 0,5 % de solutos, com secreção mediada pelo sistema nervoso autônomo (TORTORA; DERRICKSON, 2015). A liberação adequada dessa substância é de grande importância para a saúde oral, pois a saliva é a primeira barreira do corpo contra vírus e bactérias, auxilia na limpeza mecânica e lubrificação da cavidade oral e protege a mineralização dentária (KUSUDA et al., 2018; TERRIZZI et al., 2018).

A baixa de produção da saliva, hipossalivação, representa um prejuízo para a saúde oral, pois resulta em dor na mucosa oral, disfagia, estomatite, agravamento da cárie dentária e doença periodontal e dificuldade para utilizar próteses dentárias, o que dificulta a qualidade de vida dos indivíduos (KUSUDA et al., 2018; MIYAGI et al., 2019; TERRIZZI et al., 2018).

### **2.2.1 Glândulas Parótidas**

As glândulas parótidas são as maiores glândulas salivares do corpo, localizadas anteriormente ao meato acústico externo e estendendo-se até o arco zigomático e o ângulo da mandíbula. São encontradas aos pares e possuem ductos, os ductos parotídeos, que desembocam no vestíbulo oral, onde liberam sua secreção (FRITSCH; KÜHNEL, 2008). Essas glândulas iniciam seu desenvolvimento por volta da 6<sup>o</sup> e 8<sup>o</sup> semana de gestação a partir do revestimento ectodérmico oral dos ângulos do primeiro e segundo arcos branquiais (ATKINSON; III; HUANG, 2018)

As glândulas parótidas produzem cerca de 20% da saliva total (TERRIZZI et al., 2018). Como essas glândulas são unicamente serosas, sua produção consiste num fluido aquoso rico em amilase salivar (TORTORA; DERRICKSON, 2015). Caracteristicamente, a saliva produzida pelos ácinos das parótidas possui pouca ou nenhuma quantidade de mucina, o que as tornam muito fortemente coradas pela hematoxilina e eosina (PROCTOR, 2016).

A saliva secretada pelas parótidas depois de pronta é direcionada por seu sistema de ductos, que incluem os ductos estriados e coletores interlobulares. Estes por fim direcionam o fluido para o ducto parotídeo que levará o conteúdo até seu local de desembocadura. Para ajudar nesse processo, as células mioepiteliais que se localizam ao entorno dos ductos e dos ácinos funcionam como um suporte contrátil (PROCTOR, 2016).

### **2.2.2 Glândulas Parótidas e a Diabetes Mellitus tipo 1**

A DMT1 está relacionada a vários problemas de saúde oral. A ausência qualitativa ou quantitativa da saliva leva a infecções orais pelo acúmulo de bactérias, desenvolvimento de cárie dentária e mal hálito, mudança na percepção de sabores e sensação de boca seca. Além disso, a disfunção salivar leva ao desenvolvimento de xerostomia (STEWART et al., 2016).

Ainda segundo Stewart (2016), possivelmente a hipofunção salivar está conectada ao controle realizado pelo sistema nervoso autônomo. Pois este é responsável pela liberação de óxido nítrico que irá atuar nas células acinares para estimular a produção de saliva, porém durante a DMT1 um déficit na síntese de óxido nítrico leva a um aumento da permeabilidade da membrana basal, que compromete a excreção glandular (ENDOCRINOLOGY et al., 2018). A hiperglicemia gerada pela DMT1 também gera uma maior produção de ácido láctico, que reduz o PH e impede o tamponamento salivar (ENDOCRINOLOGY et al., 2018).

O aumento da glicose salivar é correlacionado ao aumento da glicose sanguínea e uma elevação dos níveis glicêmicos estimula diretamente o extravasamento pela membrana basal das glândulas, em uma maior parte nas glândulas parótidas (ALJERF; ALHAFFAR, 2017). O estresse oxidativo gerado pela diabetes provoca degeneração hidrópica das células acinares e ductais,

fazendo com que tecido adiposo passe a preencher o corpo glandular e haja uma dilatação ductal. Tais modificações comprometem o funcionamento ideal da glândula parótida (MACIEJCZYK et al., 2015).

Em parótidas de ratos *Wistar* a hiperglicemia, a curto e longo prazo, induz vacuolização das células acinares, gera diminuição da área dos ductos granulares e aumenta a deposição laminar no entorno do parênquima, dos ácinos, ductos e vasos sanguíneos. Essas alterações favorecem o espessamento da lâmina basal e permitem a progressão da doença (MONTEIRO et al., 2016). Além do estresse oxidativo, a formação de espécies reativas de oxigênio, apoptose celular e obesidade estimulam má formações glandulares. Estes fatores prejudicam a atividade mitocondrial e estimulam o surgimento de uma maior quantidade de marcadores inflamatórios e marcadores de apoptose (ITTICHAICHAROEN; APAIJAI; TANAJAK, 2018)

### **2.3 *Allium cepa* L.**

A espécie *Allium cepa* L. (cebola comum) está contida no gênero *Allium* que faz parte da família das monocotiledôneas Alliaceae e é o exemplar mais cultivado em todo o grupo. Apresenta textura e sabor especial que a torna amplamente utilizada na culinária. É utilizada em pratos mistos (em concentrações variadas) e em alimentos processados ou previamente preparados, sob a forma fresca ou desidratada (NICASTRO et al., 2016; PAN; ZHENG; HO, 2018; SHARIFI-RAD; MNAYER; TABANELLI, 2016).

É uma planta de maturidade bienal, com florescimento primaveril. Sua produção é de suma importância para o consumo humano, de forma que ocupa o terceiro lugar dos vegetais mais cultivados no mundo, perdendo apenas para o tomate e o repolho, e rendendo uma produção anual de 64 milhões de toneladas (LEE et al., 2013).

O gênero *Allium*, ao qual pertence, inclui cerca 850 espécies distribuídas em regiões temperadas, semi-áridas e áridas do hemisfério norte. Como característica do grupo, as plantas apresentam-se resistentes e com órgãos subterrâneos de armazenamento, os bulbos verdadeiros ou bulbos vestigiais. O gênero é de grande importância econômica, ornamental e medicinal, pois inclui espécies como, a cebola (*A. cepa*), o alho (*A. sativum*), cebolinha (*A.*

*schoenoprasum*), alho-porro (*A. ampeloprasum*) e a chalota (*A. ascalonicum*) (SHARIFI-RAD; MNAYER; TABANELLI, 2016).

É conhecido que plantas do gênero *Allium* são potenciais agentes antibacterianos. Esse potencial decorre de seus componentes químicos, como é o caso dos compostos organosulfurados (encontrados em maior quantidade e responsáveis pelo odor e sabor característicos), saponinas esteroides, flavonoides e compostos orgânicos de selênio (METABOLOMICS et al., 2017; SHARIFI-RAD; MNAYER; TABANELLI, 2016).

As propriedades químicas da *Allium cepa* L. demonstram potenciais importantes nos tratamentos de diversas doenças como, hipertensão, doença coronária, obesidade, catarata, distúrbios gastrointestinais, hipercolesterolemia e diabetes mellitus tipo 2 (METABOLOMICS et al., 2017). Os compostos fenólicos e flavonoides, principalmente a quercetina, dessa planta possuem atividade antioxidante, antiolesterol, anticancerígena, antimicrobiana, antiviral, anti-protozoário, antipasmódico, anti-aminésico, hepatoprotetor, anti-mutagênico, neuroprotetor e antiinflamatória (PAN; ZHENG; HO, 2018; PUTNIK et al., 2019).

#### **2.4 S-Metil-Cisteína**

A s-Metil-Cisteína (SMC) é um composto sintetizado naturalmente por plantas do grupo *Allium*, incluindo a cebola e o alho. Caracteriza-se por conter cisteína em sua formação e por possuir propriedades hidrofílicas (HSIA; YIN, 2015; LIU; HSIA; YIN, 2014).

É implicado para a SMC atividade na preservação de células do epitélio bronquial, redução da formação de espécies reativas de oxigênio, diminuição do estresse oxidativo em corpos estriados em camundongos, retardo da depleção de GSH e aumento da sobrevivência de células PC12 cultivadas sob condições de baixa de oxigênio, além de potencial regulamento de moléculas pró-apoptóticas e antiapoptóticas (HSIA; YIN, 2015). A ação antioxidante da SMC deve-se ao fato de que ela age nos órgãos elevando o nível e a ação de importantes enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e a glutatona peroxidase (YIN et al., 2007).

Adicionalmente, SMC é um agente anti-inflamatório e neuroprotetor, pois consegue ultrapassar a barreira hematoencefálica e estimular algumas moléculas a eliminarem os radicais livres e melhorar os estragos gerados pelo estresse oxidativo, isso acontece devido a ação restauradora da expressão de moléculas suprimidas durante o surto de estresse oxidativo (YIN et al., 2007). No fígado, reduz a quantidade de triglicerídeos e colesterol, ajudando a controlar o metabolismo lipídico e estimula a atividade da glutathione peroxidase (QUALITIES, 2006).

O fato de a SMC conseguir reduzir os níveis de colesterol diminui a chance de formação de coágulos sanguíneos e protege os órgãos do sistema cardiovascular da formação de doenças, como é o caso de ataques cardíacos. Nesse caso, a não oxidação dos lipídios mantém íntegro o revestimento endotelial das artérias (KUMARI; AUGUSTI, 2007).

Assim, os estudos realizados em humanos e animais demonstram o potencial da SMC como agente quimioprotetor e importante fator de contribuição para o não avanço de várias doenças, como a hepatocarcinogênese e o mal de Parkinson. E isto torna esse composto de grande importância por seus aspectos de atividades biológicas e farmacológicas (AMANO; KAZAMORI; ITOH, 2016).

## **2.5 OBJETIVOS**

### **2.5.1 Objetivo Geral**

Avaliar a resposta ao tratamento com o extrato metanólico de *Allium cepa* L. e a substância isolada S-Metil-Cisteína nas glândulas salivares parótidas de ratos *Wistar* com diabetes mellitus tipo 1 induzida por streptozotocina.

### **2.5.2 Objetivos específicos**

**2.5.2.1** Analisar o impacto da diabetes mellitus tipo 1 nas estruturas acinares e ductais das glândulas parótidas de ratos *Wistar*;

**2.5.2.2** Analisar histomorfometricamente diferenças existentes entre o número de ácinos, área dos ácinos, número e área das células acinares e número e área dos núcleos de células acinares entre grupos tratados e não tratados em relação ao grupo controle;

**2.5.2.3** Verificar por meio de histomorfometria possíveis diferenças entre a área total, área da luz e do epitélio de ductos estriados e intercalares das glândulas parótidas dos grupos tratados e não tratados em relação ao grupo controle;

**2.5.2.4** Traçar relações entre os resultados histomorfométricos com o peso animal total e glandular;

**2.5.2.5** Verificar a eficiência de tratamento entre o extrato metanólico de *Allium cepa* L. e a substância isolada S-Metil-Cisteína.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Obtenção dos animais

Os animais foram obtidos do biotério do Departamento de Morfologia – DEMOR da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN. Num total, foram utilizados 35 ratos machos pertencentes a linhagem *Wistar*, com peso variando entre 250 – 300g e idade de 30 dias. A utilização desses animais para o estudo realizado teve autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, segundo o protocolo N.012.018/2017.

#### 3.2 Manutenção biológica dos animais

Durante o período pré-experimental e experimental os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (com dimensões de 40cm x 50cm x 20cm), armazenadas em salas sob condições laboratoriais padronizadas de temperatura ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa do ar ( $45\% \pm 5\%$ ), sistema de exaustão com renovação de ar e luminosidade de 60 lux e ciclo circadiano de 12 horas em um período claro e 12 horas em período escuro. Ao decorrer de todo período de manutenção biológica os animais receberam alimentação, por meio da ração comercial Labina (Purina® do Brasil S/A), e água *ad libitum*.

#### 3.3 Modelo experimental

Passado o período de aclimatação e adaptação os animais foram separados em quatro grupos da seguinte forma:

- Grupo controle (GC) = 8;
- Grupo diabético sem tratamento (GDST) = 9;
- Grupo diabético tratados com extrato de *Allium cepa* L. (GDTE) = 9
- Grupo diabético tratado com S-Metil-Cisteína (GDTS) = 9

Para a indução a DMT1, os animais passaram previamente por jejum sólido de 12 horas antes de receber a dose de streptozotocina (Sigma Chemical Co., USA). A aplicação foi realizada por via intraperitoneal em dosagem única de 60 mg/kg de peso do animal. Passados cinco dias após a indução foi realizada a avaliação da glicemia, através do glicosímetro comercial OneTouch Ultra

(Johnson & Johnson®), onde foi retirada uma amostra de sangue da cauda de cada animal para a determinação da glicose. Para esta avaliação foram considerados diabéticos aqueles que obtiveram glicemia superior a 200mg/dL.

Após ter decorrido uma semana da indução a DMT1, os animais pertencentes aos grupos GDTE e GDTS passaram a receber um tratamento. Durante 30 dias eles foram submetidos a suplementação alimentar a base do extrato metanólico de *Allium cepa L.* e da substância isolada S-Metil-Cisteína. A dosagem disponibilizada foi de 400 mg/kg do extrato para o GDTE e 200 mg/kg de S-Metil-Cisteína para o GDTS (SAJID et al., 2014). A administração do tratamento foi realizada por via oral (gavagem), utilizando uma sonda endoesofágica, com o procedimento sendo realizado sempre no horário vespertino.

Ao longo do experimento, vieram a óbito um animal do GDST e dois do GDTE tornando o n = 8 e n = 7, respectivamente. Finalizado o experimento, os animais foram pesados e anestesiados com isoflurano, disponibilizado em algodão embebido dentro de uma caixa hermeticamente fechada. E posteriormente, eutanasiados por aprofundamento anestésico com isoflurano. Constatado o óbito dos animais, através de observação da ausência de reflexos corneais e batimentos cardíacos, as glândulas parótidas de cada rato foram então dissecadas para posterior análise morfológica e histomorfométrica.

### **3.4 Análise Histomorfométrica**

Após a coleta, as glândulas parótidas foram pesadas em balança analítica e fixadas em paraformaldeído tamponado a 10%. Posteriormente, as glândulas passaram por protocolo histológico de preparação, que incluiu:

- **Desidratação:** As amostras foram banhadas em álcool etílico em concentrações crescentes. Num total foram, 4 banhos com álcool a 70%, 1 banho com álcool 80%, 1 banho com álcool 90% e 2 banhos com álcool 100%. Cada banho com duração de 2 horas.
- **Diafanização:** Depois dos banhos com álcool as amostras receberam dois banhos de xilol, com 2 horas cada, para que houvesse a retirada completa do álcool e posterior impregnação da parafina.

- Impregnação em parafina: Após os banhos em xilol, as amostras foram mergulhadas em parafina, durante 2 horas e em dois banhos consecutivos, para que houvesse impregnação no tecido.

- Inclusão em blocos de parafina: Os tecidos impregnados foram aquecidos em placa aquecedora, numa temperatura de 40°C, colocados em moldes e mergulhados em parafina histológica, previamente aquecida no dispensador de parafina sob uma temperatura de 60°C, para que após o resfriamento se formassem blocos de parafina.

- Microtomia: Passados os procedimentos anteriores, os blocos foram então cortados de forma semi-seriada em micrótomo (Leica RM 2125) ajustado para uma medida de 4µm.

Os cortes de tecidos obtidos foram então fixados em lâminas histológicas, previamente untadas com albumina de MAYER e passaram por secagem em estufa regulada a uma temperatura de 37°C, durante 24 horas. Após a secagem, os fragmentos foram corados em Hematoxilina e Eosina (H&E) e as lâminas histológicas foram montadas.

Para a leitura dos resultados foi utilizado um microscópio óptico (NIKON Eclipse 80 i) acoplado a um sistema computadorizado de imagens (NTSis). De forma aleatória, foram escolhidos e fotomicrografados 20 campos em cada lâmina por animal, sob o aumento de 400X para houvesse a mensuração (em n e µm<sup>2</sup>) do: número de ácinos, a área dos ácinos, número de células acinares, área das células, número de núcleos e a área dos mesmos em e área total, área da luz e área do epitélio dos ductos estriados e intercalares com o auxílio do software ImageJ versão 1.44 (JESUS; BEANES; RODRIGUEZ, 2015; KRISHNAN et al., 2017).

### **3.5 Análise de Correlações**

Os dados sobre o peso corporal e o peso glandular dos animais foram analisados juntamente com os resultados da mensuração histomorfométrica da área e número de ácinos, área e número de células acinares e área e número de núcleos em cada grupo.

### **3.6 Análise Estatística**

Os dados histomorfométricos coletados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov e conferida sua distribuição anormal, foram submetidos ao teste de Mann-Whitney, Tendo como parâmetro de comparação o grupo controle. Por último, foi realizado o teste de correlações de Pearson em cada grupo para identificar possíveis correlações entre as variáveis observadas. O valor considerado significativo foi aquele de  $p \leq 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Histomorfometria glandular

O estudo realizado enfatiza o efeito degradante da DMT1 nas estruturas das glândulas salivares. Os ácinos e ductos, são fortemente agredidas pela doença, principalmente os ácinos. Todavia, as análises realizadas demonstram resposta aos tratamentos disponibilizados ao decorrer da experimentação e uma ação protetora dos efeitos gerados pela DMT1.

As comparações realizadas sobre as estruturas acinares demonstraram alterações significantes em relação ao GC (Tabela 1). Tendo área dos ácinos redução considerável entre os grupos de animais diabéticos (Figura 1). Porém, aqueles que receberam tratamento com a substância isolada ou o extrato obtiveram médias um pouco mais elevadas que o grupo que não recebeu nenhum tratamento.

O número de células acinares nos grupos diabéticos tratados e não tratados aumentaram em relação ao GC ( $p \leq 0,001$ , Tabela 1). Já a área das células apresentou-se reduzida entre os grupos diabéticos. Esses resultados demonstram uma possível relação entre as variáveis e leva-nos a entender que a diminuição da área corresponde ao aumento numérico das células acinares.

Quanto ao número de núcleos, estes demonstraram pouca variação em relação a sua quantidade e apenas o GDTE teve diferença estatisticamente significativa para o GC. Já no que diz respeito a área dos núcleos, as alterações foram presentes em todos os grupos ( $p \leq 0,001$ ). Contudo, quando se faz uma observação geral em relação aos ácinos (Tabela 1, Figura. 1) é possível notar que o grupo que mais se aproxima ao GC é o GDTE, o que permite-nos supor que o extrato metanólico de *Allium cepa L.* possui potencial de resposta aos efeitos da DMT1 sobre essas estruturas.

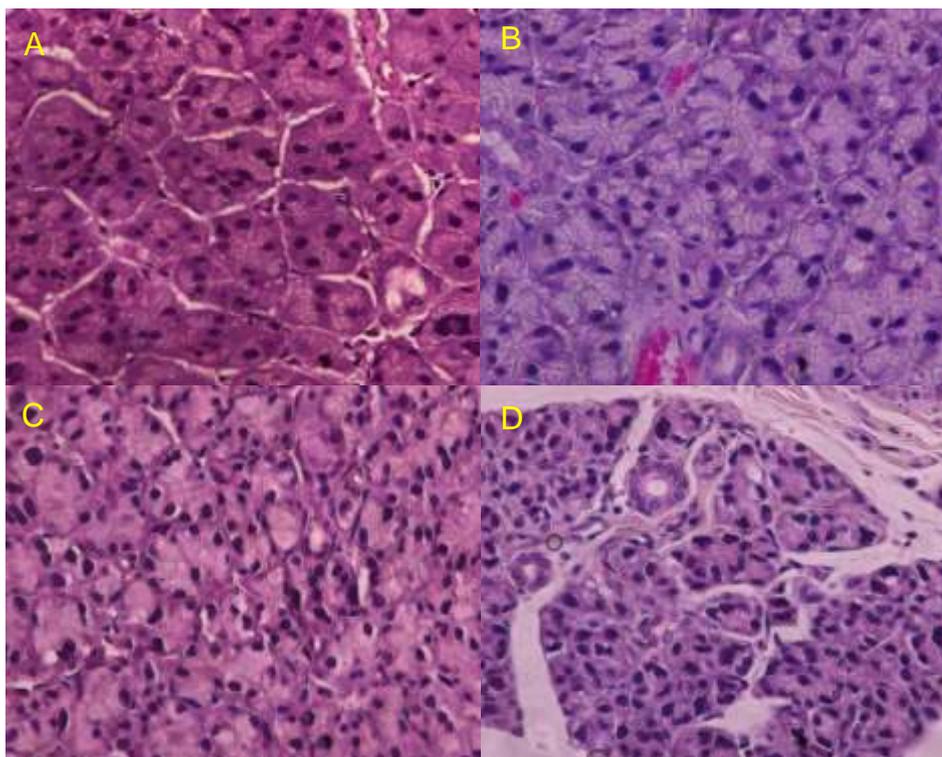


Figura 1. Diferença morfológica dos ácinos nos grupos estudados. (A) GC, (B) GDST, (C) GDTS-Metil e (D) GDTA. As amostras foram coradas com H&E (Aumento de 400 X).

Para os ductos estriados houve alterações no GDST e GDTE (Tabela 1). O GDST apresentou um aumento significativo de sua área total e epitélio ( $p \leq 0,001$ ), enquanto que, o GDTE mostrou diminuição de seu epitélio ( $p: 0,034$ ). Nos ductos intercalares as maiores diferenças foram encontradas no GDTE, onde a área total e o epitélio apresentaram-se reduzidos ( $p: 0,016$  e  $p: 0,019$ , respectivamente). Porém, o GDTS também mostrou redução da luz do ducto em relação ao GC.

Os ductos em relação aos ácinos demonstraram maior integridade, pois tiveram menos variáveis afetadas. Porém, os ductos estriados apontam alterações geradas pela presença da DMT1. Além disso, percebe-se que dos tratamentos disponibilizados o grupo que recebeu a substância isolada é o que demonstra melhor resposta, visto que, de todas as variáveis observadas nos dois ductos apenas a luz do ducto intercalares sofreu alteração com redução da medida.

Tabela 1.

Histomorfometria dos ácinos e ductos estriados e intercalares das glândulas parótidas.

Variáveis		Grupos			
		GC	GDST	GDTS	GDTE
		(Média ± Desvio-Padrão)	(Média ± Desvio-Padrão)	(Média ± Desvio-Padrão)	(Média ± Desvio-Padrão)
Ácino	Número de ácinos (n)	3,91 ± 1,68	4,07 ± 1,7	4,94 ± 3,8	4,07 ± 1,84
	Área total do ácino (μ²)	2149,2 ± 754,36	1632,28 ± 653,83 <sup>a</sup>	1288,001 ± 595,6 <sup>a</sup>	1232,95 ± 512,07 <sup>a</sup>
	Número de células (n)	4,23 ± 1,7	6,6 ± 2,1 <sup>a</sup>	6,4 ± 2,42 <sup>a</sup>	5,58 ± 2,1 <sup>a</sup>
	Área total da célula (μ²)	230,7 ± 64,6	189,7 ± 68,5 <sup>a</sup>	113,9 ± 71,6 <sup>a</sup>	159,6 ± 56,02 <sup>a</sup>
	Número de núcleos (n)	5,05 ± 1,82	6,58 ± 3,1	5,74 ± 2,51	7,3 ± 2,97 <sup>a</sup>
	Área dos núcleos (μ²)	34,98 ± 12,32	33,6 ± 14,1 <sup>a</sup>	23,43 ± 16,4 <sup>a</sup>	31,8 ± 14,5 <sup>a</sup>
Ducto Estriado	Área total (μ²)	533,49 ± 205,81	1275,54 ± 576,29 <sup>a</sup>	743,60 ± 552,76	368,11 ± 99,05
	Luz (μ²)	134,47 ± 87,56	273,96 ± 239,75	144,22 ± 113,95	76,98 ± 51,9
	Epitélio (μ²)	399,02 ± 132,10	1001,58 ± 457,10 <sup>a</sup>	599,38 ± 460,5	291,13 ± 56,96 <sup>b</sup>
Ducto Intercalar	Área total (μ²)	211,50 ± 75,59	301,75 ± 214,02	210,15 ± 137,88	166,82 ± 49,34 <sup>c</sup>
	Luz (μ²)	44,64 ± 28,39	38,83 ± 35,61	31,67 ± 22,36 <sup>d</sup>	31,64 ± 20,56
	Epitélio (μ²)	166,86 ± 53,24	262,92 ± 188,35	178,48 ± 120,16	135,17 ± 36,57 <sup>e</sup>

Comparações realizadas entre os grupos tratados e não tratados em relação ao GC. Valores representados por <sup>a</sup> representam significância semelhante na mesma linha ( $p \leq 0,001$ ). Valores representados por <sup>b</sup>, <sup>c</sup>, <sup>d</sup> e <sup>e</sup> representam os demais valores de significâncias encontrados ( $p$ : 0,034,  $p$ : 0,016,  $p$ : 0,041 e  $p$ : 0,019, respectivamente).

#### 4.2 Correlações entre os dados histomorfométricos e o peso animal e glandular.

As análises de correlações realizadas em cada grupo para avaliar relações entre o peso animal, o peso glandular e os resultados da histomorfometria dos ácinos mostraram que o GC não sofre interferência em nenhuma das variáveis observadas. Entretanto, demais grupos demonstram correlações entre algumas variáveis.

O GDST mostrou que um aumento da área nuclear também influencia positivamente a um aumento da área celular (Figura 2). Todavia, esse mesmo grupo apontou que o aumento do número de núcleos celulares influenciou a presença de uma quantidade reduzida de células acinares (Figura 3).

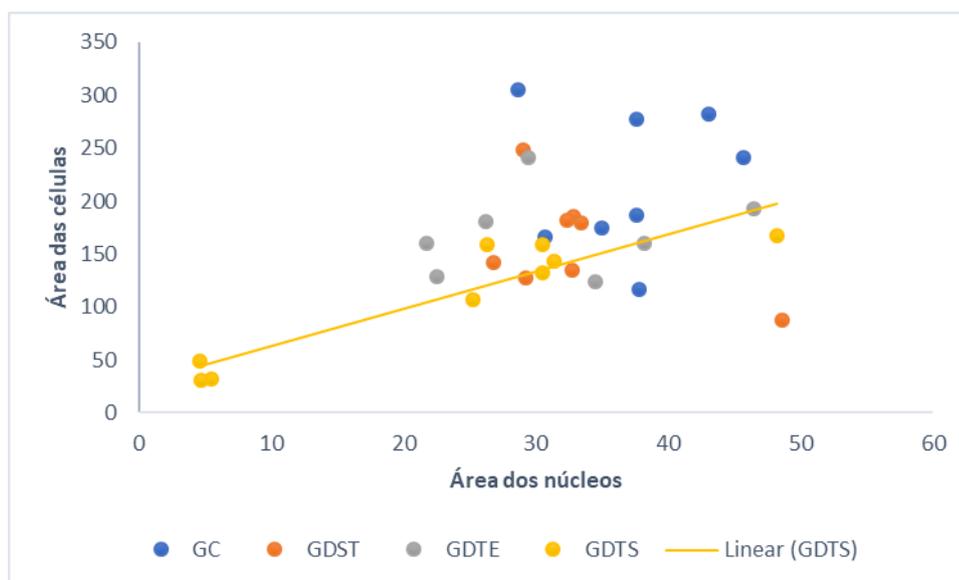


Figura 2. Correlação entre a área das células e a área dos núcleos dos grupos estudados. Nessa observação o GDTS apresentou aumento considerável a área celular em relação ao aumento da área dos núcleos ( $r: 0,930$ ,  $p: 0,000$ ) em relação aos GC ( $r: 0,081$ ,  $p: 0,949$ ) GDST ( $r: -0,549$ ,  $p: 0,159$ ) e GDTE ( $r: 0,186$ ,  $p: 0,689$ ). As cores mostradas na imagem demonstram a dispersão dos grupos em relação as escalas utilizadas.

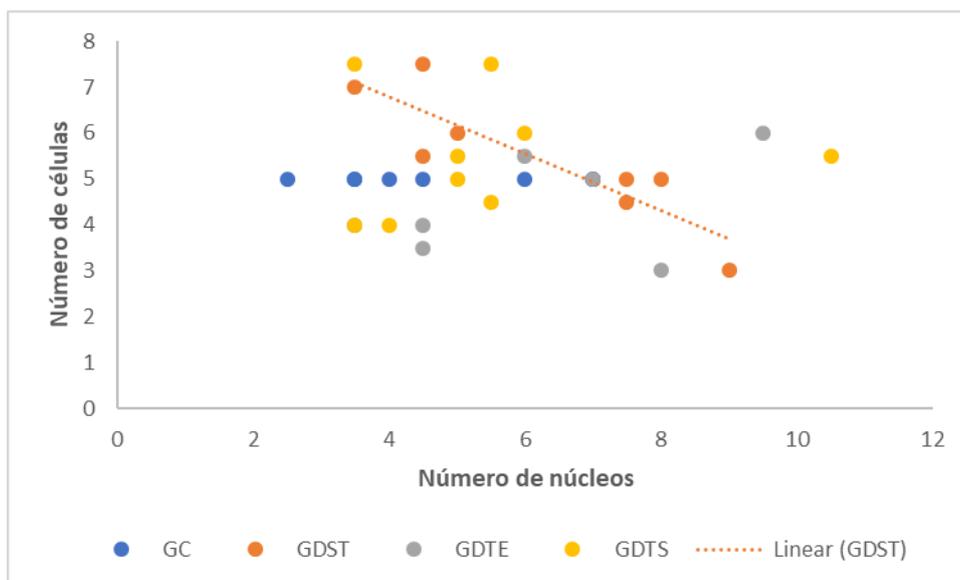


Figura 3. Correlação entre o número de células e o número de núcleos. Nessa observação o GDST apresentou uma diminuição do número de células em relação ao aumento do número de núcleos ( $r: -0,882$ ,  $p: 0,004$ ) em relação aos GC ( $r: -0,477$ ,  $p: 0,232$ ) GDTE ( $r: 0,446$ ,  $p: 0,316$ ) e GDTS ( $r: 0,078$ ,  $p: 0,842$ ). As cores mostradas na imagem demonstram a dispersão dos grupos em relação as escalas utilizadas.

No GDTE a avaliação de correlações mostrou que o aumento do número de núcleos das células acinares foi proporcional a uma redução da área destas células (Figura 4,  $r: -0,811$ ,  $p: 0,027$ ), indicando uma maior formação de núcleos em células com áreas reduzidas ou que a divisão nuclear acontecia de forma mais rápida que a formação dos demais componentes celulares. Por sua vez, este mesmo grupo demonstra que o aumento da área nuclear é proporcional ao aumento do número de ácidos (Figura 5,  $r: 0,708$ ,  $p: 0,075$ ).

Por último, é perceptível para o GDTE que o aumento do número de células acinares influencia a um aumento considerável da área dos ácidos (Figura 6,  $r: 0,677$ ,  $p: 0,095$ ), o que pode ser associado a um fluxo de divisão celular mais elevado.

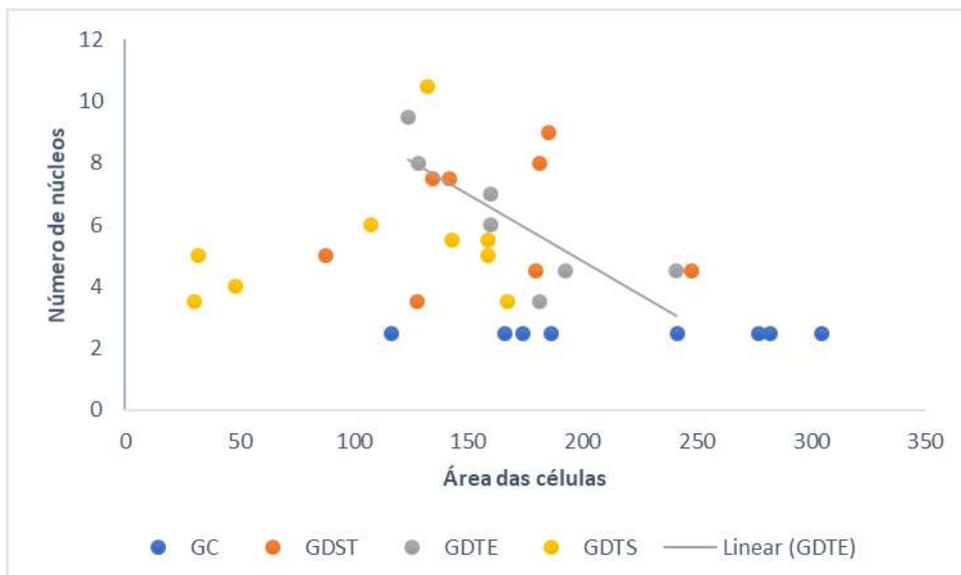


Figura 4. Correlação entre o número de núcleos e a área das células. Para estas variáveis o GDTE mostrou diminuição considerável da área das células de acordo com o aumento da quantidade de núcleos ( $r: -0,811$ ,  $p: 0,027$ ) em relação aos GC ( $r: -0,351$ ,  $p: 0,873$ ) GDST ( $r: 0,063$ ,  $p: 0,883$ ) e GDTS ( $r: 0,270$ ,  $p: 0,483$ ). As cores mostradas na imagem demonstram a dispersão dos grupos em relação as escalas utilizadas.

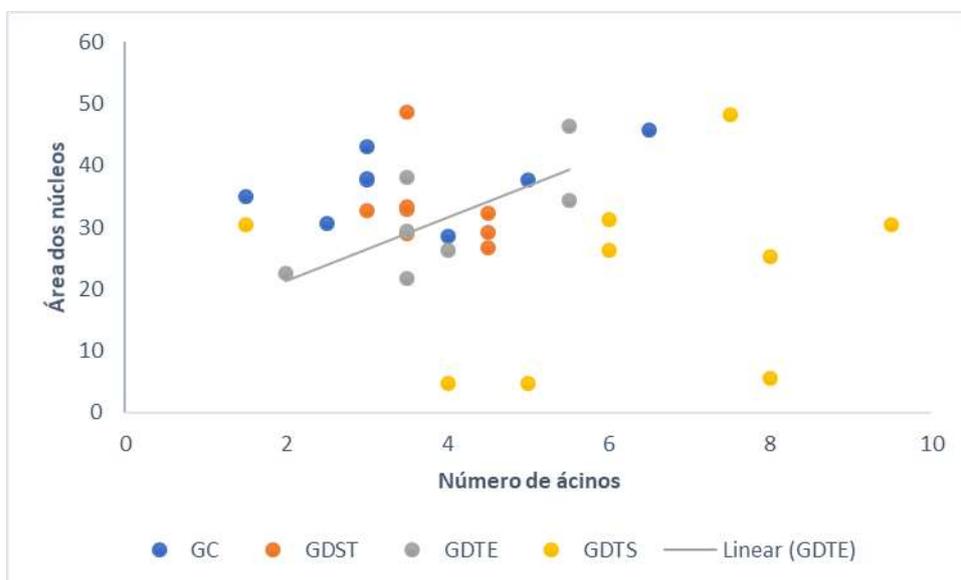


Figura 5. Correlação entre a área dos núcleos e o número de ácidos. Nessa observação o aumento da quantidade de ácidos foi de acordo com o aumento da área dos núcleos celulares no GDTE ( $r: 0,708$ ,  $p: 0,075$ ) em relação aos GC ( $r: 0,471$ ,  $p: 0,239$ ) GDST ( $r: -0,025$ ,  $p: 0,953$ ) e GDTS ( $r: -0,148$ ,  $p: 0,704$ ). As cores mostradas na imagem demonstram a dispersão dos grupos em relação as escalas utilizadas.



Figura 6. Correlação entre o número de células e a área dos ácidos dos grupos estudados. O GDTE demonstra para essas variáveis que o aumento do número de células influencia a um aumento da área dos ácidos ( $r: 0,677$ ,  $p: 0,095$ ) em relação aos GC ( $r: 0,607$ ,  $p: 0,110$ ) GDST ( $r: 0,280$ ,  $p: 0,502$ ) e GDTS ( $r: 0,320$ ,  $p: 0,402$ ). As cores mostradas na imagem demonstram a dispersão dos grupos em relação as escalas utilizadas.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Histomorfometria glandular

A diabetes mellitus gera forte impacto sobre a saúde dos indivíduos portadores da doença. Compromete a saúde oral e leva a malformações morfológicas das glândulas salivares como, degeneração e vacuolização das células acinares e ductais. Altera o metabolismo lipídico, eleva o estresse oxidativo e interfere diretamente na composição da saliva e no fluxo salivar, causando xerostomia (GARBOWSKA et al., 2017; JA, 2012; MILLER et al., 2009; MONTEIRO et al., 2016). E, mesmo quando os pacientes recebem tratamento com insulina há perda da qualidade de vida, pois há um impacto físico e emocional grande sobre os mesmos (FRIER; JENSEN; CHUBB, 2015). Esses achados vão de acordo com nosso estudo, onde encontramos uma diminuição acentuada das áreas e número de estruturas acinares (Tabela 1), que mostra o efeito degradante gerada pela DMT1.

Todavia, nosso estudo aponta um potencial de melhora dado pela utilização do extrato de *Allium cepa L.* e da substância isolada, já que os grupos que receberam esses tratamentos possuem maior aproximação dos resultados em relação ao GC (Tabela 1). Sendo dos grupos tratados o mais aproximado, o GDTE. A resposta existente ao extrato de *Allium cepa L.* na dosagem estudada pode ser associada aos compostos existentes em sua composição, fazendo-nos postular uma possível preservação das estruturas acinares nas glândulas parótidas. Pois, como visto em estudos anteriores, a utilização do extrato da cebola consegue diminuir o nível de glicose sanguínea, revertendo efeitos danosos gerados pelo excesso lipídico e diminuindo os níveis de estresse oxidativo, formação de AGES e espécies reativas de oxigênio, que são os principais agentes envolvidos na propagação da doença (PRADEEP; SRINIVASAN, 2018; SAJID et al., 2014; YOSHINARI; SHIOJIMA; IGARASHI, 2012).

Satoh, Narita e Matsuki-Fukushima (2013) mostram que animais diabéticos sofrem alteração glandular, aumentando a quantidade de ductos estriados em relação a animais saudáveis. Ainda, o epitélio pseudoestratificado dos ductos também sofre alterações frente a essa patologia e o volume de secreção salivar é diminuído (ANDERSON et al., 1993; ONEZAWA et al., 2009; SATOH; NARITA; MATSUKI-FUKUSHIMA, 2013). Nosso estudo também identifica alterações relacionadas aos

animais diabéticos, visto que o GDST sofre aumento considerável da área total e do epitélio de seus ductos. Além disso, a degradação acinar prejudica a formação de saliva e os ductos iriam auxiliar em sua composição. Porém, mesmo os ductos auxiliando na composição da saliva há perda, pois eles não liberam enzimas necessárias e auxiliam apenas no aumento da quantidade de água (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

Diversos autores destacam as propriedades hipoglicemiantes, hiperlipidêmicas e anti-inflamatórias da S-Metil-Cisteína e do extrato de *Allium cepa L.* (UANG; ORNG; IN, 2004; YIN et al., 2007). Nosso estudo ressalta essas ações a partir da diminuição de epitélio e luz dos ductos encontrados nos grupos GDTE e GDTS, pois, estes demonstram melhores respostas dos ácinos aos tratamentos nas dosagens testadas, levando-nos a postular que esta é a causa de os ductos sofrerem menos alterações em relação ao GDST. Além disso, ressaltamos a maior resposta dada pelo GDTE visto que, este além de conter a S-Metil-Cisteína possui outras substâncias, como a quercetina, que ajudam a manter as propriedades anteriormente descritas.

## **5.2 Correlações entre os dados histomorfométricos e o peso animal e glandular.**

Os pacientes DMT1 são tradicionalmente vistos como indivíduos insulino dependentes e de peso normal ou baixo, porém, essa visão tem sido modificada nos últimos anos. É reconhecido atualmente que aplicação rotineira de insulina pode fazer com que os pacientes sofram picos repentinos de hipoglicemia, bem como, sofram alterações no metabolismo corpóreo. As alterações metabólicas geradas pela insulino terapia é um fator de alta contribuição para o aumento de indivíduos DMT1 com sobrepeso ou obesidade, além de outras complicações que possam surgir, como doenças cardiovasculares (BENAIGES; MAR; MANE, 2014).

Todos os animais diabéticos deste estudo demonstraram correlações entre o ganho de peso e alterações histomorfométricas, porém, os grupos tratados com o extrato metanólico de *Allium cepa L.* e a substância S-Metil-Cisteína demonstraram faixas de pesos mais estáveis, o que pode ser a presença dos tratamentos disponibilizados. Pois, como visto por Sharifi-rad, Mnayer e Tabanelli (2016), *Allium cepa L.* é rica em compostos com propriedades medicinais, como saponinas esteroides, flavonoides, compostos orgânicos de selênio e compostos organosulfurados. Os compostos presentes na cebola, como a própria S-Metil-

Cisteína, exibem atividade antioxidante e antilipidêmica e podem ser considerados agentes antidiabéticos por serem contribuintes da hipoglicêmicos (SAJID et al., 2014). As características químicas do extrato metanólico da cebola também ajudam a explicar a diferença encontrada entre os grupos tratados, pois o extrato contém mais compostos ativos além da S-Metil-Cisteína, como é o caso da quercetina.

As alterações encontradas no GDST entre o número de núcleos e o número de células (Figura 3) demonstram o efeito degradante da DMT1 visto que, é perceptível que essas variáveis não estão na homeostase necessária para o corpo, o que pode ser considerado como resultado das desordens metabólicas geradas pela doença. E como se sabe, a característica predominante da diabetes mellitus é a presença de hiperglicemia crônica que desregula o metabolismo celular e aumenta o estresse oxidativo, gerando danos nos tecidos e órgãos (CARVALHO et al., 2018; HOWARD, 2018).

As demais comparações realizadas em relação ao GC (Figuras 2, 5 e 6) contribuem para a hipótese de que o tratamento realizado com S-Metil-Cisteína e com o extrato metanólico de *Allium cepa L.* conseguem minimizar os efeitos da DMT1 nas glândulas salivares. Visto que, essas substâncias tem ação na redução da formação de espécies reativas de oxigênio, diminuição do estresse oxidativo, que contribui para a preservação celular (HSIA; YIN, 2015; YIN et al., 2007). Porém, o extrato metanólico de *Allium cepa L.* não foi tão favorável para o desenvolvimento celular e nuclear (Figura 4). Tais fatos fazem-nos supor que a nível celular a substância isolada é mais eficaz que o extrato e este teria melhor ação na contenção dos fatores que influenciam o desenvolvimento da DMT1.

Assim, é de suma importância que existam mais estudos relacionados a esses tratamentos, de forma que seja avaliada posologias diferentes do que já encontramos na literatura, bem como, testes com avaliações a longo prazo e que avaliem o mecanismo preciso pelo qual esses tratamentos agem nas glândulas parótidas de animais diabéticos.

## 6 CONCLUSÕES

- A DMT tem forte impacto sobre a morfologia da glândula parótida, alterando as estruturas acinares e dos ductos estriados e intercalares.
- O tratamento à base da substância isolada S-Metil-Cisteína ou do extrato metanólico de *Allium cepa L.* mostram-se eficazes na diminuição dos efeitos da doença nas glândulas salivares.
- Neste estudo, a suplementação com o extrato metanólico de *Allium cepa L.* demonstra maiores respostas em relação ao tratamento com substância isolada S-Metil-Cisteína.
- A substância isolada demonstra grande importância na preservação celular, possivelmente por ser de ação mais direta.
- Este estudo também aponta a necessidade de novos estudos que trabalhem com novas dosagens do tratamento e com um período de observação maior.

## REFERÊNCIAS

- AFZELIUS, P. et al. Imaging of the major salivary glands. **Clin Physiol Funct Imaging**. p. 1–10, 2014.
- ALAM, U. et al. General aspects of diabetes mellitus. **Handbook of Clinical Neurology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V. 126, 2014.
- ALJERF, L.; ALHAFFAR, I. Salivary Distinctiveness and Modifications in Males with Diabetes and Behçet's Disease. **Biochemistry Research International**. v. 2017, 2017.
- AMANO, H.; KAZAMORI, D.; ITOH, K. Pharmacokinetics and N-acetylation metabolism of S-methyl-L-cysteine and trans-S-1-propenyl-L-cysteine in rats and dogs and trans - S -1-propenyl- L -cysteine in rats and dogs. **Xenobiotica**. v. 8254, n. May, 2016.
- AN, A.; ABAC, A. Review article Maturity-onset diabetes of the young ( MODY ): an update. **J Pediatr Endocr Met**. v. 28, n. 12, p. 251–263, 2015.
- ANDERSON, L. C. et al. Cell Tissue In vivo secretory responses of submandibular glands in streptozotocin-diabetic rats to sympathetic and parasympathetic nerve stimulation. **Cell & Tissue Research**. v. 274, p. 559–566, 1993.
- APPERLEY, L. J.; MAY, S. Diabetes & Metabolic Syndrome : Clinical Research & Reviews Increased insulin requirement may contribute to risk of obesity in children and young people with Type 1 Diabetes Mellitus. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 1, p. 492–495, 2019.
- ATKINSON, C.; III, J. F.; HUANG, B. Cross-sectional Imaging Techniques and Normal Anatomy of the Salivary Glands. **Neuroimaging Clinics of NA**. v. 18, p. 1052-5149, 2018.
- BEHROUJ, H. et al. Hypoglycemic and antioxidant effects of oral administration of garlic extract in the livers of type 1 diabetic rats. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**. p. 1–6, 2018.
- BENAIGES, D.; MAR, P. D. S.; MANE, L. Obesity and type 1 diabetes mellitus management. **Minerva Endocrinol**. v. 40, p. 53-60, November, 2014.
- BENHALIMA, K.; DEVLIEGER, R. Screening and management of gestacional

diabetes. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology Screening and management of gestational diabetes.** v. 29, p. 339-349, 2015.

CARVALHO, A. L. et al. Emerging Aspects of the Body Composition, Bone Marrow Adipose Tissue and Skeletal Phenotypes in Type 1 Diabetes Mellitus. **Journal of Clinical Densitometry.** v. 16, p. 30072-6, 2018.

CHEON, C. K. Understanding of type 1 diabetes mellitus : what we know and where we go. **Korean J Pediatr.** v. 61, n. 10, p. 307–314, 2018.

CHOI, H.; YIM, J. Plasma Adropin as a Potential Marker Predicting Obesity and Obesity-associated Cancer in Korean Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. **Journal of Oral Biology.** v. 23, n. 4, p. 191–196, 2018.

CHOI, J. et al. Analysis of age-related changes in the functional morphologies of salivary glands in mice. **Archives of Oral Biology,** v. 58, n. 11, p. 1635–1642, 2013.

DELPORTE, C. Biochimica et Biophysica Acta Aquaporins in salivary glands and pancreas ☆. **BBA - General Subjects,** v. 1840, n. 5, p. 1524–1532, 2014.

SAMPAIO, N.; MELLO, S.; ALVES, C. Dental caries-associated risk factors and type 1 diabetes mellitus. **Pediatric Endocrinology, Diabetes and Metabolism.** v. 17 n. 3, p. 152-157, June, 2018.

EWALD, N.; BRETZEL, R. G. European Journal of Internal Medicine Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases ( Type 3c ) — Are we neglecting an important disease ? **European Journal of Internal Medicine,** v. 24, n. 3, p. 203–206, 2013.

FELÍCIO, J. S. et al. Cochlear dysfunction and microvascular complications in patients with type 1 diabetes mellitus. **Diabetology & Metabolic Syndrome.** v. 10:81, p. 1–9, 2018.

FONG, X. S. et al. Computational modeling of epithelial fluid and ion transport in the parotid duct after transfection of human aquaporin-1. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** n. 31, p. 153–163, 2017.

FRIER, B. M.; JENSEN, M. M.; CHUBB, B. D. Research : Complications Hypoglycaemia in adults with insulin-treated diabetes in the UK: self-reported frequency and effects. **DIABETICMedicine.** p. 1125–1132, 2015.

GARBOWSKA, M. et al. Sphingolipids metabolism in the salivary glands of rats with

obesity and streptozotocin induced diabetes. **Journal of Cellular Physiology**. v. 232, n. February, p. 2766–2775, 2017.

BARBOSA, J.H.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L.T. O Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do Diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 52, n. 6, p. 940-950, 2008.

HAKAMI, Z. Distribution of nerve fibers during the development of palatine glands in rats. **Acta Histochemica**, n. September, p. 0–1, 2017.

HATTERSLEY, A. T.; PATEL, K. A. Precision diabetes: learning from monogenic diabetes. **Diabetologia**. v. 60, p. 769–777, 2017.

HOWARD, S. G. Developmental Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals and Type 1 Diabetes Mellitus. **Frontiers in Endocrinology**. v. 9, n. September, p. 1–6, 2018.

HSIA, T.; YIN, M. s -Ethyl Cysteine and s -Methyl Cysteine Protect Human Bronchial Epithelial Cells Against Hydrogen Peroxide Induced Injury. **Journal of Food Science**. v. 80, n. 9, p. 2094–2101, 2015.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva : Normal composition , flow , and function. **THE JOURNAL OF PROSTHETIC DENTISTRY**. v. 85, n. 2, p. 162-169, 2001.

INTRODUCTION, I. Monogenic Diabetes : What It Teaches Us on the Common Forms of Type 1 and Type 2 Diabetes. **Endocrine Reviews**. v. 37, n. June, p. 190–222, 2016.

ITTICHAICHAROEN, J.; APAIJAI, N.; TANAJAK, P. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor enhances restoration of salivary glands impaired by obese-insulin resistance. **Archives of Oral Biology**, v. 85, n. October 2017, p. 148–153, 2018.

JA, B. et al. Impact of clinical status and salivary conditions on xerostomia and oral health- related quality of life of adolescents with type 1 diabetes mellitus. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**. v. 40, n. 7, p. 62–69, 2012.

JEFFERSON, C.; ARAGÃO, C. DE; ALVES, D. Relationship between bullying and type 1 diabetes mellitus in children and adolescents : a systematic review &. **Jornal de Pediatria**, v. 136, p. 1-10, 2018.

JESUS, V. C. DE. et al. Influence of laser photobiomodulation ( GaAIAs ) on salivary

flow rate and histomorphometry of the submandibular glands of hypothyroid rats. **Lasers Med Sci.** n. February, p. 1-6, 2015.

KRISHNAN, M. et al. Acute Radiation-Induced Changes in Sprague-Dawley Rat Submandibular Glands : A Histomorphometric Analysis. **World Oncol.** v. 8, n. 2, p. 45–52, 2017.

KUMARI, K.; AUGUSTI, K. T. Lipid lowering effect of S -methyl cysteine sulfoxide from *Allium cepa* Linn in high cholesterol diet fed rats. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 109, p. 367–371, 2007.

KUSUDA, Y. et al. Long-term dexamethasone treatment diminishes store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in salivary acinar cells. **International Journal of Oral Science,** n. May, p. 1–8, 2018.

LADDHA, A. P.; KULKARNI, Y. A. Tannins and vascular complications of diabetes: Na update. **Phytomedicine.** v. 15, n. 56, p. 229-245, 2018.

LEE, R. et al. bulb formation and flowering. **Nature Communications,** v. 4, p. 1–9, 2013.

LIU, C.; HSIA, T.; YIN, M. Function growth factor differentiated PC12 cells under hypoxic conditions. **Food & Function,** v. 5, p. 1125–1133, 2014.

MACIEJCZYK, M. et al. Antioxidant profile, carbonyl and lipid oxidation markers in the parotid and submandibular glands of rats in different periods of streptozotocin induced diabetes. **Archives of oral biology.** v. 60, p. 1375-1386, 2015.

MADHAVAN, A. A. et al. Gold Nanoparticle-Based Detection of Low Molecular Weight AGEs from In Vitro Glycated Haemoglobin A0 Samples. **Nanoscale Research Letters,** v. 13, n. 390, p. 1-10, 2018.

MATSUI-INOHARA, H. et al. E2F-1-Deficient NOD / SCID Mice Developed Showing Decreased Saliva Production. **Exp. Bio. Med.** v. 234, n. 12, p. 1525–1536, 2009.

MICHELS, A. W. et al. Type 1 diabetes. **HHS Public Access.** v. 383, n. 9911, p. 69–82, 2015.

MILLER, E. C. S. et al. Impact of xerostomia on the quality of life of adolescents with type 1 diabetes mellitus. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology,** v. 108, n. 3, p. 376–382, 2009.

MIYAGI, Y. et al. Submandibular gland-specific inflammaging-induced hyposalivation in the male senescence-accelerated mouse prone -1 line ( SAM-P1 ). **Biogerontology**, v. 3, 2019.

MOHAMED, A.F. et al. Phytochemical Profiles and Antimicrobial Activities of *Allium cepa* Red cv. and *A. sativum* Subjected to Different Drying Methods: A Comparative MS-Based Metabolomics. **Molecules**. v. 22, n. 761, p. 1-18, 2017.

MONTEIRO, M. M. et al. Long- and short-term diabetes Mellitus type 1 modify young and elder rat salivary glands morphology. **Archives of Oral Biology**. v. 73, p. 40-47, 2016.

MORROW, J. P. Clinical Overview of Obesity and Diabetes Mellitus as Risk Factors for Atrial Fibrillation and Sudden Cardiac Death. **Frontiers in Physiology**. v. 9, n. January, p. 1–13, 2019.

NEGRATO, C. A. et al. Increasing incidence of type 1 diabetes between 1986 and 2015 in Bauru , Brazil. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v. 127, p. 198-204, 2017.

NICASTRO, H. L. et al. Garlic and onions : Their cancer prevention properties. **Cancer Prev Res**. v. 8, n. 3, p. 181–189, 2015.

PAN, Y.; ZHENG, Y. I. M. E. I.; HO, W. S. Effect of quercetin glucosides from *Allium* extracts on HepG2 , PC - 3 and HT - 29 cancer cell lines. **Oncology Letters**. v. 15, p. 4657–4661, 2018.

PRADEEP, S. R.; SRINIVASAN, K. Alleviation of oxidative stress-mediated nephropathy by dietary fenugreek ( *Trigonella foenum-graecum*) seeds and onion (*Allium cepa*) in streptozotocin-induced diabetic rats. **Food & Function**. v. 9, p. 134–148, 2018.

PUTNIK, P. et al. An overview of organosulfur compounds from *Allium* spp . : From processing and preservation to evaluation of their bioavailability , antimicrobial , and anti-inflammatory properties. **Food Chemistry**. v. 276, n. July 2018, p. 680–691, 2019.

SAJID, M. et al. Spice plant *Allium cepa* : Dietary supplement for treatment of type 2 diabetes mellitus. **Nutrition**, v. 30, n. 10, p. 1128–1137, 2014.

SATOH, K.; NARITA, T.; MATSUKI-FUKUSHIMA, M. E2f1-deficient NOD / SCID mice have dry mouth due to a change of acinar / duct structure and the down-regulation of

AQP5 in the salivary gland. **Molecular and Cellular Mechanisms of Disease**. v. 465, p. 271–281, 2013.

SHARIFI-RAD, J.; MNAYER, D.; TABANELLI, G. Plants of the genus *Allium* as antibacterial agents: From tradition to pharmacy. **Cellular and Molecular Biology**. v. 62, n. 9, p. 57-68, August, 2016.

SOUZA, G.R. et al. Glycemic control, cardiac autoimmunity, and long-term risk of cardiovascular disease in type 1 diabetes mellitus. **Circulation**, v.139, n. 6, p. 730-743, 2019.

STEWART, C.R. et al. The effects of diabetes on salivary gland protein expression of tetrahydrobiopterin and nitric oxide synthesis and function. **J Periodontol**. v. 87, n. 6, p. 735-741, 2016.

TERRIZZI, A. R. et al. The Process of Acclimation to Chronic Hypoxia Leads to Submandibular Gland and Periodontal Alterations: An Insight on the Role of Inflammatory Mediators. **Mediators of Inflammation**. v. 2018, 2018.

THOMAS, S. Effect of S-Methyl-L-Cysteine on Oxidative Stress , Inflammation and Insulin Resistance in Male Wistar Rats Fed with High Fructose Diet. **Iran J Med Sci**. v. 40, n. 1, p. 45-50, 2015.

UANG, C. H. I. N. G. H.; ORNG, J. O. E. U. H. H.; IN, M. E. I. H. I. N. Y. Antioxidative and Antiglycative Effects of Six Organosulfur Compounds in Low-Density Lipoprotein and Plasma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 3674–3678, 2004.

UNNIKRISHNAN, R.; ANJANA, R. M.; MOHAN, V. Diabetes mellitus and its complications in India. **Nat Ver Endocrinol**. v. 12, n. 6, p. 357-70, 2016.

WANG, B. et al. Evaluation of Parotid Salivary Glucose Level for Clinical Diagnosis and Monitoring Type 2 Diabetes Mellitus Patients. **BioMed Research Corporation**. v. 2017, 2017.

YAHAGI, K. et al. ATVB in Focus series on “Vascular Calcification in Diabetes”. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 37, n. 2, p. 191–204, 2018.

YAN, S.L.; YIN, M.C. Protective and Alleviative Effects from 4 Cysteine-Containing Compounds on Ethanol-Induced Acute Liver Injury through. **Journal of Food Science**. v. 72, n. 7, p. 511-515, 2006.

YIN, M. et al. Antiinflammatory and antifibrogenic effects of s -ethyl cysteine and s -methyl cysteine in the kidney of diabetic mice. **Mol. Nutr. Food Res.**v. 51, p. 572–579, 2007.

YOSHINARI, O.; SHIOJIMA, Y.; IGARASHI, K. Anti-Obesity Effects of Onion Extract in Zucker Diabetic Fatty Rats. **Nutrients**. v. 4, p. 1518–1526, 2012.

YU, C.; YANG, C.; RUI, Z. MicroRNA-125b-5p improves pancreatic  $\beta$ -cell function through inhibiting JNK signaling pathway by targeting DACT1 in mice with type 2 diabetes mellitus. **Life Sciences**, 2019.

## ANEXO A

## Aprovação da Comissão de Ética em Uso dos Animais



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA**  
 Av. Salgado Filho, S/N – CEP: 59072-970 – Natal / RN  
 Fone: (84) 9229-6491 / e-mail: [ceua@reitoria.ufrn.br](mailto:ceua@reitoria.ufrn.br)

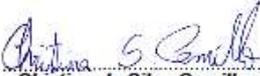
**CERTIFICADO**

Natal (RN), 15 de agosto 2018.

Certificamos que o ADENDO da proposta intitulada “**Avaliação dos efeitos do extrato *Allium cepa* L. e S-metilcisteína em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina**”, protocolo 018/2017, CERTIFICADO N. 012.018/2017, sob a responsabilidade de **Karina Carla de Paula Medeiros** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CEUA/UFRN.

<b>MOTIVO</b>	Retirada de órgãos não listados na proposta original Extensão de prazo
<b>Vigência do Projeto</b>	Dezembro 2018
<b>RELATÓRIO</b>	JANEIRO 2019

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13, do Regimento Interno desta CEUA, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a **elaboração de relatório** de acompanhamento que deverá ser entregue tão logo a pesquisa seja concluída. O **descumprimento desta norma poderá inviabilizar a submissão de projetos futuros.**

  
**Chistina da Silva Camillo**  
 Vice-Coordenadora da CEUA-UFRN

## ANEXO B

### E-mail de confirmação de submissão do artigo

10/02/2019

Email – Rita Reis – Outlook

Submission AOB\_2019\_127 received by Archives of Oral Biology

Archives of Oral Biology <EvisSupport@elsevier.com>

Sex, 08/02/2019 13:01

Para: rita.santanareis@hotmail.com <rita.santanareis@hotmail.com>

*This message was sent automatically. Please do not reply.*

Ref: AOB\_2019\_127

Title: Supplementation with methanolic extract of *Allium cepa* L. and S-Methyl Cysteine as treatment of type 1 diabetes mellitus in parotid glands of Wistars rats.

Journal: Archives of Oral Biology

Dear Dr. Reis,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Archives of Oral Biology. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: [http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=AOB](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=AOB) and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Archives of Oral Biology

**Have questions or need assistance?**

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

---

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.