CÍNTIA YUKI FUKUOKA

**Efeitos da irradiação com laser de baixa potência nas glândulas salivares
submandibulares de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina**

São Paulo
2016

CÍNTIA YUKI FUKUOKA

**Efeitos da irradiação com laser de baixa potência nas glândulas salivares
submandibulares de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Biomateriais e Biologia oral) para obter o título de Doutora em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Alyne Simões
Gonçalves

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Fukuoka, Cíntia Yuki.

Efeitos da irradiação com laser de baixa potência nas glândulas salivares submandibulares de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina / Cíntia Yuki Fukuoka ; orientadora Alyne Simões Gonçalves. -- São Paulo, 2016.

123 p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Biomateriais e Biologia Oral. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Glândula submandibular. 2. Diabetes mellitus. 3. Laser de baixa potência. I. Gonçalves, Alyne Simões. II. Título.

Fukuoka CY. Efeitos da irradiação com laser de baixa potência nas glândulas salivares submandibulares de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obter o título de Doutora em Ciências.

Aprovado em: / /2016

Banca Examinadora

Prof(a).

Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).

Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).

Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).

Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).

Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho a...

Deus, pela sua grande misericórdia na minha vida, não tinha condição, nem capacidade, nem inteligência para chegar até aqui sozinha,

A minha família, que nunca mediu esforços para que meus sonhos se realizassem

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à Profa. Alyne Simões Gonçalves, minha orientadora, por ter me concedido esta grande oportunidade, pela orientação, amizade e exemplo profissional. Muito obrigada por me apoiar, mesmo quando eu estava distante (no Japão), por acreditar que tudo daria certo, por sonhar grande, voar alto, enfrentar gigantes e viver fortes emoções. Muito obrigada por ser flexível, por aceitar novas ideias e por manter a mente aberta. Muito obrigada por tudo!!!! Foi um imenso prazer e uma honra fazer parte da sua equipe!!!

Ao Professor Yoshimitsu Abiko, meu co-orientador no Japão, muito obrigada pelos seus ensinamentos, por me dar a oportunidade de aprender técnicas novas, por compartilhar sua visão de pesquisa e sua experiência de vida, que mudou a maneira como eu pensava e enxergava todas as coisas.

Ao Professor José Nicolau, muito obrigada por compartilhar seu conhecimento e suas ideias neste projeto, e pelas suas palavras de incentivo, meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Victor Elias Arana-Chavez, por compartilhar seu conhecimento desde a minha graduação, por me incentivar a fazer este doutorado, pelos conselhos, pela paciência e por acompanhar de perto todas as minhas imuno-histoquímicas. Muito obrigada pela sua atenção, preocupação e pelas suas dicas. Espero continuar aprendendo muito com o senhor.

Ao Professor Fernando Neves Nogueira, pela sua amizade e conhecimento, por tornar o ambiente de laboratório mais leve, pelos conselhos, pelo apoio e pelos brigadeiros, que me fizeram esquecer até os momentos mais tristes, quando todos meus experimentos deram errado. Muito obrigada por me fazer seguir em frente, por me fazer acreditar que tudo vai dar certo.

Ao Professor Rafael Balaester, coordenador do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral, pelo conhecimento compartilhado desde a graduação e pela ajuda com softwares.

Ao Professor Ujjal Kumar Bhawal, por me receber no Japão, por me ensinar a trabalhar em laboratório, por mudar a minha filosofia de aprendizado, por me incluir nos seus projetos e na sua equipe, e por ampliar a minha visão de pesquisa. Muito obrigada.

A todos os Professores do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral, que acreditam no meu trabalho e torcem pelo meu sucesso, muito obrigada!

A Luana Campos, pelos ensinamentos sobre laser e pacientes oncológicos, por compartilhar seus conhecimentos de laboratório, pelo bom-humor, pelas risadas, pelo apoio nos momentos difíceis, por me ensinar a usar o photoshop, por me ajudar a fazer as pranchas e por dar aquele BRILHO nas figuras desta tese.

A Juliana de Castro, por me receber nos primeiros dias de LBO. A alegria e o gosto, com que você trabalha, despertou em mim o interesse e o desejo de trabalhar em laboratório.

A Cláudia Carrara Cotomácio, pela sua amizade, apoio e sua grande ajuda para finalizar esta tese. Muito obrigada mesmo.

Ao Douglas Nesadal, técnico do Laboratório de Biomateriais e Biologia Oral, por me ensinar tudo o que eu aprendi sobre cuidados de animais de laboratório e bioquímica. Muito obrigada por me incentivar nos momentos difíceis e pelo pensamento positivo que me empurrou para frente quando tudo parecia dar errado.

A minha querida amiga Elis, técnica do Laboratório de Biologia Oral, pela amizade, pelo carinho, pelos conselhos, por ouvir os meus choros, pelo ombro amigo e por todas as dicas de laboratório.

A Gabriella Torres Schröter, aluna de iniciação científica da Profa. Alyne, por ser meu braço direito, pelo carinho com os animais desta pesquisa, pelo compromisso e responsabilidade. Foi muito gratificante te acompanhar desde os seus primeiros dias no laboratório e ver a sua evolução durante sua iniciação. Acredito que você tem talento e todas as qualidades para ser bem-sucedida aonde quer que você vá.

Aos grandes amigos que fiz no laboratório, Ana Carolina Romero, Simone Peixe, Flávia Ibuki, Jun Ueda, Gabriela Magliano, Filipe, Érika de Paula, Mariana e Tais, muito obrigada pela sua amizade, pelas risadas, e por tornar nossos momentos mais alegres e divertidos.

Ao Hugo, aluno de treinamento técnico da Profa. Alyne, pelo companheirismo, bom-humor e pela força que você sempre deu nos experimentos.

A Flávia Rosin, pós-doutoranda da Patologia, por me ensinar os segredos do Western blotting, pelo companheirismo e incentivo.

A Karen Sunahara, doutora pela Faculdade de Medicina, muito obrigada pela sua amizade, por compartilhar seus projetos e conhecimento. Pelo apoio nas horas mais difíceis, por me tirar do buraco nos momentos de desespero, pelo pensamento positivo e pelas ideias. Muito obrigada mesmo!!

A Lília Rocha, pós-doutoranda da Patologia, por me ensinar os fundamentos do PCR, por abrir as portas do laboratório para que eu aprendesse mais sobre o assunto. Muito obrigada.

As alunas co-orientadas da Professora Alyne, Samanta e Paula Ragusa, de mestrado, e Nayara, de iniciação científica, foi uma experiência muito interessante participar dos seus projetos, aprendi muito com todas vocês.

Aos meus amigos de doutorado no Japão, Yuu Fujita, Manabu Ishikawa, Hitoe Okada, Moey e Belamin, pelo companheirismo, pelo apoio e pelas risadas.

Aos meus queridos amigos, Anna Luísa Pacheco, Bárbara Lourenço, Denis Merino, Fernanda Amorim, Giovanna de Castro, Luciana Coimbra, Miriam Matsui, Monique Mori, Patricia Sakumi, Paula Ortiz e Priscila Alegria, muito obrigada pelo incentivo e pelo apoio. Muito obrigada por me oferecerem ajuda no momento em que eu mais precisava, isso significou muito para mim. Muito obrigada mesmo!!

A Rosinha, Elidamar e Antônio, muito obrigado por toda ajuda.

Aos vendedores, Sara Matta (Biorad), Rafaela e Amanda Milan (Labresearch), Marcos Parmesan (Biogen), Marco (SPlab), Bianca (Sanbio) e Henrique, pela agilidade nas cotações e entregas de materiais.

A Liliane, Ana Maria e Elaine pelo carinho e profissionalismo na organização dos atendimentos na LELO.

Agradeço aos animais que participaram da minha pesquisa, sem eles nada teria sido realizado.

Agradeço à CAPES pelo auxílio financeiro, pela bolsa de doutorado sanduíche no Japão, o qual foi muito importante para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à FAPESP pelo auxílio financeiro 2014/21214-1 que permitiu que este projeto se tornasse realidade.

A Universidade de São Paulo, por permitir a realização deste estudo.

A todos aqueles que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste sonho, muito obrigada.

*“E, tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo o coração, como ao Senhor e não aos
homens.”*

Colossences 3: 23

RESUMO

Fukuoka CY. Efeitos da irradiação com laser de baixa potência nas glândulas submandibulares de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Original.

O diabetes mellitus (DM) pode levar à disfunção das glândulas salivares. A ativação do receptor de produtos finais de glicosilação avançada e de seus ligantes tem sido reportado em várias doenças crônicas, entre estas, a diabetes e suas complicações. Este estudo analisou a expressão do RAGE, proteína do grupo de alta mobilidade B1 (HMGB1) e de produtos de glicosilação avançada (AGE), bem como os efeitos da irradiação com laser de baixa potência (ILBP) em glândulas salivares submandibulares (GSMs) de ratas diabéticas. Ratas Wistar com 12 semanas de vida foram divididas em 3 grupos: controle (C), diabético (D) e diabético com laser (DL). A indução de DM nos grupos D e DL foi realizada com injeção intraperitoneal de estreptozotocina 60 mg/kg de peso corporal, no 1º dia experimental. No 29º dia, os animais do grupo DL receberam a ILBP (660 nm, 70 mW, 20 J/cm² e 0,56 J por ponto), aplicado no total de quarenta pontos cobrindo a área correspondente as GSMs, e os seus efeitos foram avaliados 24 h após a irradiação (eutanásia). As análises de parâmetros metabólicos, histológicos e de marcadores de inflamação, apoptose e proliferação foram realizadas. Nossos achados mostram que a ILBP diminuiu a glicemia das ratas diabéticas irradiadas, melhorando a resistência à insulina (HOMA-IR), sensibilidade à insulina (HOMA-IS) e função de células beta (HOMA-β). Em GSM, o DM parece aumentar a expressão do eixo HMGB1/AGE/RAGE, possivelmente associado à ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NFκB). A ILBP reduziu os marcadores de inflamação, HMGB1 e TNF-α em GSM de ratas diabéticas, e parece regular a expressão de proteínas relacionadas à proliferação e à apoptose, pela via do AMP cíclico, parcialmente mediado por proteína kinase regulada por sinais extracelulares. No entanto, mais estudos são necessários para melhor entender os efeitos do laser neste tecido.

Palavras-chave: Glândula submandibular. Diabetes. Laser de baixa potência.

ABSTRACT

Fukuoka CY. Low-power laser irradiation effects in submandibular glands of streptozotocin-induced diabetic rats [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Original.

Diabetes (DM) can lead to dysfunction of the secretory capacity in salivary glands. Since the activation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and its ligands has been suggested to participate in chronic disorders, such as diabetes and its complications. This study analyzed the expression of RAGE, high mobility group box protein B1 (HMGB1) and advanced glycation end-products (AGEs) were evaluated, as well as the effects of low-power laser irradiation (ILBP), in diabetic submandibular glands (GSM). Wistar rats 12 weeks-old were divided in three groups: control (C), diabetic (D) and diabetic with laser (DL). The D and DL rats were intraperitoneally injected with streptozotocin 60 mg/kg, in the 1st experimental day. On the 29^o day, the DL rats received the ILBP (660 nm, 70 mW, 20 J/cm² e 0,56J per point), with a total of forty points covering the GSMs area, its effects were evaluated 24h after irradiation (euthanasia). Metabolic parameters, histology and the inflammatory, apoptosis and proliferation markers were evaluated. Our findings show that ILBP reduced the blood glucose levels of the irradiated diabetic rats, improving their insulin resistance (HOMA-IR), insulin sensitivity (HOMA-IS) e beta cell function (HOMA- β). In GSM, DM seems to upregulate the expression of HMGB1/AGE/RAGE axis, possibly associated with the activation of the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF κ B). The ILBP reduced the inflammatory markers HMGB1 and TNF- α in diabetic GSM, and seems to regulate the expression of proteins related to proliferation and apoptosis, by cyclic AMP pathway, partially mediated by extracellular signal-regulated kinase. However, more studies are necessary to better understand the laser effects on this tissue.

Keywords: Submandibular glands. Diabetes. Low-power laser.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Desenho experimental. No primeiro dia, o DM foi induzido nos animais do grupo D e DL. Setenta e duas horas após a indução, aferimos a glicemia em jejum com glicosímetro. No 29º dia, os animais do grupo DL receberam a irradiação com laser. No 30º dia, a glicemia em jejum foi aferida com glicosímetro, foi realizada a coleta de sangue e todos os animais foram sacrificados.....42
- Figura 4.2 - As amostras foram removidas do *RNA later* e congeladas em nitrogênio líquido. Em seguida trituradas com martelo e colocadas em tubos individuais. Cada tubo recebeu em seu interior uma bala de inox e posteriormente, todo o conjunto foi mergulhado em nitrogênio líquido dentro de um suporte metálico (A). Este suporte foi colocado dentro de um suporte plástico e com movimentos verticais a amostra foi triturada a pó sob refrigeração (B). Fotos do site <http://www.tokken.jp/products/breaker/skmill.html>.....47
- Figura 5.1 - A, B e C: Morfologia da GSM do grupo controle (C), diabético (D) e diabético tratado com laser (DL). Em B, o tamanho dos ácinos, no grupo D, aparenta estar diminuído em relação aos dos grupos C e DL. D, E e F: Análise imuno-histoquímica para HMGB1 nos grupos C, D e DL (n=1). Em D, marcação menos intensa, em alguns núcleos de células do ducto excretor e estriado no grupo controle. Em E, a localização de HMGB1 foi observada em coloração marrom intensa em núcleos de células do ducto estriado no grupo diabético (setas). Em F, marcação em núcleo de células do ducto excretor (DE), estriado (DS) e células endoteliais no grupo diabético irradiado. DI, ducto intercalar; DE, ducto excretor; DS, ducto estriado; DG, ducto granuloso; VS, vaso sanguíneo. Barra com 50 µm.....60
- Figura 5.2 - Expressão relativa de mRNA via qRT-PCR (n=1). Duas análises independentes foram realizadas com triplicata amostral e, a média e a expressão relativa dos genes foram calculadas em relação à expressão de β -actina para cada amostra.....61
- Figura 5.3 - ELISA de HMGB1 (n=1) indica um aumento dos níveis de HMGB1 no grupo D em relação ao controle, com redução desta expressão no grupo DL.....61

Figura 5.4 - Análise imuno-histoquímica de AGE (A-C) e RAGE (D-F). Em A, ausência de marcação no grupo controle (C). Em B, marcação intensa no citoplasma de células do ducto estriado (setas) e excretor. Em C, marcação menos intensa em células do ducto excretor. Em D, ausência de marcação para RAGE no grupo controle. Em E, marcação intensa em citoplasma de células do ducto estriado e intercalar (setas). Em F, marcação menos intensa em células do ducto excretor. DI, ducto intercalar; DE, ducto excretor; DS, ducto estriado. Escala de 50 μ m.....62

Figura 5.5 - A-C: Imuno-histoquímica para NFkB fosforilado para os grupos C, D e DL (n=1). Em A, ausência de marcação. Em B, marcação em cor acastanhada em células do ducto estriado (seta). Em C, ausência de marcação. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado. Escala de 50 μ m. D: Análise de Western blotting para marcadores de inflamação, HMGB1, AGE, RAGE e NFkB fosforilado, e marcadores de apoptose, bax, p53 fosforilado na Ser 15, p53, e caspase-3. O peso molecular das proteínas estudadas foi avaliado com um marcador padrão, sendo: HMGB1 (25 kDa), AGE (não-especificado), RAGE (46 kDa), NFkB fosforilado (65 kDa), bax (21 kDa), p53 fosforilado (53 kDa), p53 (53 kDa), caspase-3 clivada (17-19 kDa) e β -actina (42 kDa).....63

Figura 5.6 - Imuno-histoquímica para TNF- α (A-C) e bad (D-F) nas GSMs (n=1). Em A, ausência de marcação no grupo C. Em B, marcação em marrom acastanhado no citoplasma de células do ducto estriado (seta), no grupo D. Em C, marcação menos intensa em apenas algumas células do ducto estriado, no grupo DL. Em D, ausência de marcação para bad no grupo C. Em E, observou-se a localização de bad no citoplasma de células do ducto estriado (seta). Em F, ausência de marcação no grupo DL. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado. Escala com 50 μ m.....65

Figura 5.7 - Imunomarcação para bax e caspase-3 clivada (n=1). Em A, ausência de marcação para bax no grupo controle. Em B, espécime do grupo diabético, mostrando marcação positiva no citoplasma de células do ducto estriado (seta). Em C, espécime do grupo diabético irradiado, com ausência de marcação. Em D, ausência de marcação para caspase-3 clivada no grupo controle. Em E, presença de marcação para caspase-3 clivada no citoplasma de células do ducto estriado, no grupo diabético (seta). Em F, marcação leve em algumas células do ducto excretor e estriado. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado. Barra com escala de 50 μ m.....66

Figura 5.8 - Análise de TUNEL (n=1). Em A e C, ausência de corpos apoptóticos. Em B, em coloração marrom, há presença de células apoptóticas (seta). DE, ducto excretor; DS, ducto estriado. Barra com escala de 50µm.....67

Figura 5.9 - Co-localização de bax e HMGB1 por dupla imunofluorescência (n=1). Bax em coloração verde. HMGB1 em coloração vermelha. Em A e D, presença de dupla marcação leve em ductos, estriado e excretor, bem como em células endoteliais. Em B e E, observamos a dupla marcação positiva intensa em células endoteliais e dos ductos, estriado e excretor. Em C e F, esta expressão foi atenuada pela irradiação com laser. DE, ducto excretor. DS, ducto estriado. EN, células endoteliais. Aumento original de 20X69

Figura 5.10- Análise imuno-histoquímica para cAMP, CREB fosforilado (n=1). Em A, espécime do grupo controle, ausência de marcação para cAMP. Em B, espécime do grupo diabético, marcação leve no citoplasma de algumas células do ducto estriado. Em C, espécime do grupo diabético irradiado, marcação em citoplasma de células do ducto estriado (seta). Em D, marcação leve de CREB fosforilado em alguns núcleos de células do ducto estriado, no grupo controle. Em E, presença de CREB fosforilado em alguns núcleos do ducto estriado e excretor, no grupo diabético. Em F, marcação abundante em núcleo de células acinares e dos ductos estriados (seta), no grupo diabético irradiado. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado. Barra com escala de 50 µm.....71

Figura 5.11 - Análise de Western blotting para ciclina D1, ERK fosforilado e ERK total (n=1). Da esquerda para a direita: controle (C), diabético (D) e diabético com laser (DL). O tamanho das proteínas foi avaliado com marcador padrão, sendo: ciclina D1 (36 kDa), ERK fosforilado (42,44 kDa) e ERK total (42,44 kDa).....72

Figura 5.12 - Análise imuno-histoquímica para ERK fosforilado e ciclina D1 (n=1). Em A, espécime do grupo controle, ausência de marcação para ERK. Em B, espécime do grupo diabético, ausência de marcação. Em C, marcação positiva para ERK fosforilado, em coloração acastanhada, em núcleo de células do ducto estriado (seta). Em D, marcação leve para ciclina D1, em alguns núcleos de células do ducto excretor (seta), no grupo controle. Em E, marcação leve, em células do ducto estriado, no grupo diabético. Em F, marcação em núcleo de células do ducto estriado (seta), no grupo diabético irradiado. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado. Barra com escala de 50 µm.....73

Figura 5.13 - Dupla imunofluorescência para CREB e ERK (n=1). Em A e D, espécime do grupo controle, co-localização de CREB e ERK fosforilados em células do ducto estriado e excretor. Em B e E, espécime do grupo diabético, dupla marcação foi observada em células do ducto excretor, com pouca marcação em ducto estriado. Em C e F, espécime do grupo diabético irradiado, co-localização de ERK e CREB fosforilados em células do ducto estriado e excretor. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado. Aumento original de 20X.....74

Figura 5.14 - Mecanismo de ação proposto para a ILBP em GSM de ratas diabéticas. Diabetes resulta em aumento de marcadores de inflamação, como HMGB1 e AGE. A ILBP pode diminuir a expressão destes marcadores e consequentemente, sua interação com o receptor RAGE, diminuindo a fosforilação de NFκB e sua translocação para o núcleo, onde este fator regula a transcrição de marcadores inflamatórios tais como, TNF-α, HMGB1 e RAGE, alimentando de forma contínua o estado de inflamação. A ILBP pode diminuir a apoptose através da redução da expressão de TNF-α, bax e bad, consequentemente diminuindo a formação de caspase-3 clivada. Além disso, a ILBP pode aumentar a concentração de cAMP, estimulando a fosforilação de CREB na Ser 133, que juntamente com ERK, resultaria no acúmulo de ciclina D1 e favoreceria a proliferação celular.....75

Figura 5.15 - Glicemia em jejum (mg de glicose/dl de sangue), aferida com glicosímetro 72h após a indução do diabetes e no 30º dia. O DM resultou em aumento significativo da glicemia dos animais induzidos (D e DL) em relação ao grupo controle (C). A ILBP diminuiu significativamente a glicemia dos animais irradiados (DL). (*p < 0.05 vs. Grupo C; # p < 0.05 vs. Grupo D, dentro do mesmo tempo experimental e vs Grupo DL inicial). Grupo C n=10, grupo D n=7, e grupo DL n=8. Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão.....77

Figura 5.16 - Glicemia em jejum (mg/dl), aferida pelo método bioquímico da PGO no 30º dia (eutanásia). O DM resultou em aumento significativo da glicemia dos animais induzidos (D e DL) em relação ao grupo controle (C). A ILBP diminuiu significativamente a glicemia dos animais irradiados (DL). (*p < 0.05 vs. Grupo C; # p < 0.05 vs. Grupo D). Grupo C n=10, grupo D n=7, e grupo DL n=8. Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão.....78

Figura 5.17 - Peso corporal (g). Os animais foram pesados no dia 1º, 29º no 30º dia (eutanásia). O DM resultou em diminuição significativa do peso corporal dos animais induzidos (D e DL) em relação ao grupo controle (C) no 29º e 30º dias. Os animais diabéticos (D e DL) em seu 30º dia apresentaram redução de peso significativa em relação aos seus respectivos pesos iniciais. A irradiação com o laser de baixa potência não teve influência sobre o peso dos animais irradiados (DL). (*p < 0,05) vs. Grupo C no mesmo tempo experimental; # p < 0,05) vs. tempo inicial para o mesmo grupo). Grupo C n=10, grupo D n=7, e grupo DL n=8. Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão.....79

Figura 5.18 - Quantificação das proteínas totais presentes no plasma do grupo controle (C), diabético (D) e diabético irradiado (DL) em mg de proteína total/ ml de plasma sanguíneo. O DM resultou em diminuição significativa das proteínas totais no plasma dos animais induzidos com estreptozotocina (D e DL), em relação ao grupo controle (C). (*p < 0,05) vs. Grupo C). Grupo C n=10, grupo D n=7, e grupo DL n=8. Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão80

Figura 5.19 - Níveis de insulina medidos com ELISA, em ng/mg de proteína total presente no sangue. Não houve diferença significativa entre os níveis de insulina nos três grupos, controle (C), diabetes (D) e diabetes com laser (DL). Grupo C n=10, grupo D n=7, e grupo DL n=8. Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão.....81

Figura 5.20 - Níveis de HMGB1 medidos com ELISA, em ng/mg de proteína total presente no plasma. O DM levou ao aumento significativo dos níveis de HMGB1 no plasma dos animais induzidos (D e DL). A ILBP não alterou os níveis plasmáticos deste marcador inflamatório (DL). (*p < 0.05 vs. Grupo C). Grupo C n=10, grupo D n=7, e grupo DL n=8. Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão.....82

Figura 5.21 - HOMA-IR dos animais do grupo controle (C), diabético (D) e diabético com laser (DL). O DM levou ao aumento significativo do HOMA-IR no grupo não-irradiado (D). A ILBP nos animais diabéticos (DL) reduziu estes valores para níveis similares aos encontrados nos controles. (*p < 0,05 vs. Grupo C; # p < 0,05 vs. grupo D). Grupo C n=10, grupo D n=7, e grupo DL n=8. Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão.....83

Figura 5.22 - HOMA-IS dos animais do grupo controle (C), diabético (D) e diabético com laser (DL). O DM levou a uma diminuição significativa do HOMA-IS no grupo não-irradiado (D). A ILBP no grupo DL aumentou estes valores para níveis similares aos encontrados nos controles. (*p < 0.05 vs. Grupo C). Grupo C n=10, grupo D n=7, e grupo DL n=8. Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão.....84

Figura 5.23 - HOMA-β dos animais do grupo controle (C), diabético (D) e diabético com laser (DL). O DM levou a uma diminuição significativa do HOMA-β no grupo não-irradiado (D). A ILBP no grupo DL aumentou estes valores para níveis similares aos encontrados nos controles (DL). (*p < 0.05 vs. Grupo C). Grupo C n=10, grupo D n=7, e grupo DL n=8. Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão.....85

Figura 5.24 - A-C: Microscopia de luz com hematoxilina e eosina (n=3) mostra uma morfologia normal de GSM, sem diferenças entre os grupos controle (C), diabético (D) e diabético com laser (DL), não há presença de infiltrado inflamatório ou sinais de apoptose. D-F: Imunomarcacão para HMGB1 (n=3). Em D, espécime do grupo controle, marcação leve em núcleo de células dos ductos, estriado e excretor, com presença de HMGB1 também em tecido conjuntivo perivascular. Em E, espécime do grupo diabético, marcação intensa para HMGB1 em células endoteliais (seta) e no tecido conjuntivo adjacente, além de núcleos de células dos ductos excretor e estriado. Em F, espécime do grupo diabético irradiado, marcação em células do endotélio (seta) e do tecido conjuntivo perivascular, bem como núcleos dos ductos, estriado e excretor. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado; VS, vaso sanguíneo. Escala de 50 μm.....86

Figura 5.25 - ELISA de HMGB1 para quantificação desta proteína em GSM dos animais do grupo controle (C), diabético (D) e diabético com laser (DL). O DM levou ao aumento significativo dos níveis de HMGB1 em GSM no grupo não-irradiado (D). A ILBP reduziu esta alteração nos diabéticos irradiados (DL) para níveis similares aos encontrados nos controles (C). (*p < 0.05 vs. Grupo C). Grupo C n=4, grupo D n=5, e grupo DL n=5. Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão.....87

Figura 5.26 - ELISA de TNF-α para quantificação deste marcador inflamatório em GSM dos animais do grupo controle (C), diabético (D) e diabético com laser (DL). O DM levou ao aumento significativo dos níveis de TNF-α em GSM no grupo não-irradiado (D). A ILBP reduziu esta alteração para níveis similares aos encontrados nos controles (DL). (*p < 0.05 vs. Grupo C). Grupo C n=6, grupo D n=6, e grupo DL n=7. Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão.....88

Figura 5.27 - Imuno-histoquímica para RAGE e NFκB fosforilado (n=3). Em A, espécime do grupo controle, marcação leve para RAGE em núcleo de algumas células acinares, bem como do ducto excretor e estriado, além de tecido conjuntivo perivascular. Em B, marcação positiva intensa, em marrom, em núcleos de células acinares, citoplasma e núcleo de células dos ductos estriado e excretor, células endoteliais e em tecido conjuntivo. Em C, marcação positiva em células endoteliais e do tecido conjuntivo perivascular, bem como, em citoplasma e núcleo de células dos ductos, excretor e estriado, além de alguns núcleos de células acinares. Em D, marcação leve para NFκB fosforilado em núcleo de algumas células do ducto excretor e tecido conjuntivo perivascular. Em E, marcação intensa, em citoplasma e núcleo de células do endotélio, dos ductos excretor (seta), estriado e granuloso, bem como no tecido conjuntivo. Em F, marcação mais leve, em núcleo de células dos ductos, estriado e excretor, e tecido conjuntivo perivascular. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado; DG, ducto granuloso; VS, vaso sanguíneo. Escala de 50 μm.....89

Figura 5.28 - Imuno-histoquímica para TNF-α e bax (n=3). Em A, espécime do grupo controle, ausência de marcação para TNF-α. Em B, espécime do grupo diabético, marcação intensa em citoplasma de células do ducto estriado (seta) e excretor (seta), bem como em tecido conjuntivo. Em C, espécime do grupo diabético irradiado, marcação leve em citoplasma de células do ducto estriado e tecido conjuntivo perivascular. Em D, marcação leve em tecido conjuntivo perivascular. Em E, marcação intensa em citoplasma de células acinares, em ductos, excretor e estriado, além de endotélio e células do tecido conjuntivo perivascular. Em F, marcação leve em citoplasma de ácinos e ductos. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado; DG, ducto granuloso; VS, vaso sanguíneo. Escala de 50 μm.....90

Figura 5.29 - Imuno-histoquímica para ciclina D1 (n=3) e caspase-3 clivada (teste). Em A, espécime do grupo controle, marcação positiva em núcleo de células do ducto excretor (seta). Em B, marcação positiva em alguns núcleos de células do ducto excretor (seta). Em C, marcação em vários núcleos de células do ducto excretor (seta). Em D, ausência de marcação para caspase-3 clivada. Em E, ausência de marcação. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado; DG, ducto granuloso; VS, vaso sanguíneo. Escala de 50 μm.....91

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1 - Parâmetros de irradiação. Grupo controle (C) e grupo diabético (D) não foram irradiados. Grupo DL recebeu a ILBP com 70 mW, 20 J/cm², 8 s/ponto.....42
- Tabela 5.1 - Parâmetros metabólicos. Peso corporal e níveis de glicemia nos grupos C, D e DL (n=9), medidos 72 h após a indução do diabetes (inicial) e no dia da eutanásia (final). O DM resultou em aumento significativo da glicemia dos animais e em redução do peso corporal das ratas. A irradiação não alterou a glicemia dos animais irradiados. (*p < 0,05 vs. Grupo C; # p < 0,05 vs. tempo inicial para o mesmo grupo). Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão.....59

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

µl	microlitros
µm	Micrômetros
A	Área
ADP	Adenosine diphosphate
AGE	Advanced glycation end-product
ANOVA	Analysis of variance
ATP	Adenosine triphosphate
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-XL	B-cell lymphoma- extra large
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	Bovine serum albumine
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CBP	CREB-binding protein
cDNA	Complementary DNA
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
cm ²	Centímetros quadrados
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element-binding protein
DAB	Diaminobenzidina
DE	Densidade de energia
dl	Decilitro
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Desoxy-ribonucleic acid
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular signal- regulated kinase

ETZ	Estreptozotocina
EUA	Estados Unidos da América
FGF-2	Fibroblast growth factor 2
g	Gramas
g	Força g
GLUT2	Glucose transporter 2
GLUT4	Glucose transporter 4
GSM	Glândula salivar submandibular
h	Hora/horas
HGF	Hepatocyte growth factor
HMGB1	High mobility group box protein B1
HOMA	Homeostase model assessment
HOMA-IR	Homeostase model assessment for insulin resistance
HOMA-IS	Homeostase model assessment for insulin sensibility
HOMA- β	Homeostase model assessment for β cell function
HRP	Horseradish peroxidase
Hsp27	Heat shock protein 27
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IFN- γ	Interferon gamma
IGF	Insulin-like growth factor
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3
IgG	Imunoglobulina G
IL	Illinois
IL-10	Interleukin 10
IL-1 α	Interleukin 1 alpha
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
ILBP	Irradiação com laser de baixa potência

ILIB	Intravascular Laser Irradiation of Blood
IκB	Inhibitor of nuclear factor kappa B
IκK	Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
Kg	Kilograma
KGF	Keratinocyte growth factor
LPLT	Low-power laser therapy
M	Molar
Mcl-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
mg	Miligrama
mIU	Mili International Units
ml	Mililitros
mRNA	Messenger RNA
mW	miliwatts
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ng	Nanogramas
NGF	Nerve growth factor
nm	Nanômetros
P	Potência
pg	Picogramas
PGO	Peroxidase glucose oxidase
PKA	Protein kinase A
PVDF	Polyvinylidene fluoride
qRT-PCR	Quantitative real time polymerase chain reaction
RAGE	Receptor for advanced glycation end-products
RNA	Ribonucleic acid
RU	Reino Unido
s	Segundo/ segundos
S100A8	S100 calcium-binding protein A8
SCF	Stem cell factor

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Ser 133	Serina 133
Ser 15	Serina 15
T	Tempo
TBS-T	Tris buffered saline with Tween
TGF β	Transforming growth factor beta
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TNF- γ	Tumor necrosis factor gamma
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
W	Watts
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1	Glândulas Salivares	26
2.2	Diabetes Mellitus (DM)	27
2.2.1	Diabetes mellitus e inflamação	29
2.2.2	Diabetes mellitus e processos de proliferação e apoptose.....	30
2.2.3	Efeito do diabetes mellitus nas glândulas salivares.....	31
2.3	Terapia com laser de baixa potência	32
2.3.1	Efeito do laser em glândulas salivares	35
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo Geral	37
3.2	Objetivos Específicos	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	Fase 1	39
4.1.1	Animais.....	39
4.1.2	Grupos experimentais	39
4.1.3	Indução de Diabetes.....	40
4.1.4	Determinação da glicemia	40
4.1.5	Irradiação com laser de baixa potência (ILBP)	41
4.1.6	Obtenção das amostras	42
4.1.7	Processamento dos espécimes.....	43
4.1.8	Análises moleculares.....	43
4.1.9	Microscopia de luz.....	43
4.1.10	Imuno-histoquímica	44
4.1.11	Dupla-imunofluorescência	45

4.1.12	Análise de TUNEL (<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling</i>)	46
4.1.13	Extração de proteínas	47
4.1.14	ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>) de HMGB1	48
4.1.15	Western Blotting	48
4.1.16	Extração de RNA.....	49
4.1.17	PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	50
4.2	Fase 2	51
4.2.1	Animais.....	51
4.2.2	Determinação da glicemia	51
4.2.3	Obtenção das amostras	52
4.2.4	Análise da Glicemia pelo Método da PGO (<i>Peroxidase Glucose Oxidase</i> -PGO).....	52
4.2.5	ELISA de Insulina e de HMGB1 no plasma	53
4.2.6	Quantificação de proteína no plasma	53
4.2.7	Modelo de avaliação da homeostase (<i>HOMA-Homeostase Model Assessment</i>).....	54
4.2.8	Processamento dos espécimes.....	54
4.2.9	Microscopia de luz.....	54
4.2.10	Imuno-histoquímica	55
4.2.11	Extração de proteínas das GSMs.....	56
4.2.12	ELISA de TNF- α e HMGB1 em GSM	56
4.2.13	Análise Estatística	57
5	RESULTADOS	58
5.1	Fase 1	58
5.1.1	Análise dos parâmetros metabólicos.....	58
5.1.2	Análise das vias de sinalização de inflamação, proliferação e apoptose.....	59

5.2	Fase 2	76
5.2.1	Análise dos parâmetros metabólicos.....	76
5.2.2	Análise das vias de sinalização de inflamação, proliferação e apoptose.....	85
6	DISCUSSÃO	93
7	CONCLUSÃO	100
	REFERÊNCIAS	101
	ANEXO	121

1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica, caracterizada por um estado de hiperglicemia devido à absoluta deficiência na secreção de insulina (diabetes tipo 1) ou redução do efeito biológico deste hormônio (diabetes tipo 2) (1). Os sinais e sintomas do diabetes tipo 1 aparecem de forma rápida e inclui a tríade, polifagia, polidipsia e poliúria, bem como, perda de peso, irritabilidade, fadiga e sonolência. Já os sintomas do diabetes tipo 2 se desenvolvem de forma mais lenta e nem sempre associados à tríade, além disso, os pacientes com este tipo de diabetes podem ser obesos, apresentar vulvovaginite ou prurido, neuropatia periférica e visão embaçada (1).

O DM pode apresentar manifestações orais concomitantes, tais como xerostomia e hipossalivação, doença periodontal, candidíase e cárie. Trabalhos do nosso grupo sugerem que a laserterapia pode ser utilizada em casos de xerostomia e/ou hipossalivação (2), assim como em casos de hiperglicemia, para diminuição da glicose sanguínea e consequentemente diminuição das complicações tardias do diabetes (3). Além disso, sabe-se que a terapia com laser em baixa intensidade (*Low Power Laser Therapy* – LPLT) tem efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e de biomodulação, no entanto, o seu mecanismo de ação ainda não é completamente entendido (4).

Portanto, o objetivo do presente projeto é verificar as alterações, decorrentes da indução do diabetes, por estreptozotocina, em glândula salivar submandibular (GSM) de ratas diabéticas quando comparadas ao grupo controle. Além disso, o presente projeto tem como objetivo analisar o efeito da irradiação com laser de baixa potência (ILBP) nestas glândulas, correlacionando nossos dados com as funções moleculares e as possíveis vias de sinalização pelas quais estas alterações/efeitos ocorrem. Além do mais, visamos estudar as possíveis alterações sistêmicas causadas pela ILBP neste modelo experimental de diabetes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Glândulas Salivares

As glândulas salivares são órgãos importantes para a manutenção da saúde oral, pois produzem e secretam a saliva. As glândulas salivares podem ser classificadas de acordo com o tamanho, em dois tipos, maiores e menores. As glândulas salivares maiores são compostas pelas glândulas parótidas, sublinguais e GSMs. Em seres humanos, estas glândulas secretam cerca de 90% da produção de saliva no estado de repouso. Os outros 10% são secretados pelas glândulas salivares menores (5).

A saliva é um fluido aquoso que desempenha importantes funções fisiológicas na cavidade oral. Entre elas, podemos destacar sua capacidade tampão, que permite a neutralização de ácidos e possibilita a remineralização dos dentes, sua atividade antimicrobiana através da ação de lactoferrinas e lisozimas, proteção das células da mucosa oral com peroxidases e lubrificação da cavidade oral através das mucinas e do fluido presente na saliva. A saliva também tem um papel importante na digestão, pela presença de amilase salivar, bem como gustação (5).

A secreção salivar não-estimulada é feita principalmente pelas GSMs (6). Quando há hipofunção das glândulas salivares, a diminuição do fluxo salivar pode aumentar o risco de infecções e lesões na mucosa oral (5, 7), como por exemplo, em casos de pacientes que fizeram radioterapia de cabeça e pescoço, ou que apresentam síndrome de Sjögren ou DM (8, 9). Há na literatura várias propostas para o tratamento da xerostomia e hipossalivação, incluindo terapias com eletro-estimulação (10), lubrificantes e drogas sistêmicas, mas suas aplicações e seus benefícios são limitados (11).

As glândulas salivares são compostas por unidades secretoras terminais e ductos, sendo estes últimos subdivididos em ductos intercalares, estriados e excretores (12, 13). As unidades secretoras terminais, são constituídas por células epiteliais polarizadas, com núcleo no pólo basal e grânulos de secreção no pólo apical, voltados para o lúmen (13). Nas unidades secretoras terminais ocorrem a secreção da maior parte das proteínas da saliva, além de quase todo o fluido salivar,

sendo o conjunto, denominado de saliva primária, a qual é isotônica em relação à composição do plasma. Nos ductos, quase impermeáveis à água, esta saliva sofre alterações na sua composição, bem como reabsorção dos íons sódio e cloreto e secreção de íons potássio e bicarbonato, gerando a saliva final que é secretada na cavidade oral (6, 14). Nos ductos estão localizadas as células-tronco glandulares, necessárias para o processo de reparação após injúria do tecido (15, 16).

Há algumas diferenças entre glândulas salivares de roedores e de seres humanos, como o fato de que em ratos não existe a produção de saliva de forma espontânea, mas somente com estímulo (7). Além disso, as GSMs de ratos não apresentam células mucosas secretórias, sendo constituídas apenas por ácinos serosos e apresentam um segmento ductal adicional, que se origina do ducto estriado, denominado ducto granular, pois contém vários grânulos de secreção de proteínas, enzimas e fatores de crescimento, tais como, fator de crescimento epidérmico (*Epidermal growth factor*- EGF) e fator de crescimento neural (*Nerve growth factor*- NGF) (17). Nos machos, o ducto granuloso ocupa cerca de 50-65% da glândula, e em fêmeas esta porcentagem varia entre 19-36% (17). Da mesma forma, a concentração dos produtos de secreção deste ducto é dez vezes menor nas fêmeas quando comparada com a dos machos (17).

Estudos de análise na expressão gênica de GSMs de ratos mostram que embora os roedores apresentem expressão gênica característica para algumas proteínas que não estão presentes na saliva humana, tais como a mucina 19, há várias proteínas comuns entre as duas espécies (18, 19). Além disso, as glândulas salivares de ratos possuem similaridades com as humanas, principalmente no que concerne aos mecanismos de secreção de fluídos e proteínas. Portanto, as glândulas salivares e saliva de ratos têm sido grandemente estudadas, uma vez que estudos com humanos não são frequentemente possíveis (20, 21).

2.2 Diabetes Mellitus (DM)

A Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization* – WHO) define diabetes como uma desordem metabólica de etiologia múltipla, com distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas devido à deficiência na secreção

e/ou ação da insulina (22). Pacientes com diabetes tem maior risco de mortalidade e menor expectativa de vida em relação à pacientes saudáveis (23).

De acordo com a etiologia, há dois tipos principais de DM, tipo 1 e tipo 2. O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é também conhecido como insulino-dependente ou diabetes juvenil, resultado da destruição das células β da ilhota pancreática, devido a um processo autoimune em 85-90% dos casos, e idiopático em 5-10% dos casos (22). Os pacientes com DM1 são mais propensos a desenvolver cetoacidose e requerem terapia de reposição de insulina (22). O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é a forma mais prevalente de diabetes e, corresponde a 80-90% dos casos nos Estados Unidos da América (EUA) (22). Os pacientes são geralmente adultos e apresentam algum grau de obesidade (22). O DM2 é caracterizado pela resistência à insulina, e geralmente também há deficiência na produção deste hormônio (22). Nestes pacientes a hiperglicemia está frequentemente associada à hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensão (Síndrome Metabólica), que podem levar a doenças coronárias e infarto (24). Estima-se que a prevalência de diabetes deve aumentar conforme o aumento da expectativa de vida da população (25).

Hiperglicemia e outros distúrbios no metabolismo dos pacientes diabéticos podem levar ao desenvolvimento de alterações microvasculares e macrovasculares, as quais em longo prazo poderão resultar em danos irreversíveis aos olhos (retinopatia e catarata), rins (nefropatia), sistema nervoso (neuropatia e parestesias) e coração (aterosclerose acelerada), bem como, infecções recorrentes e problemas de cicatrização (1).

A insulina é produzida pelas células β do pâncreas, considerada o hormônio anabólico humano mais potente. Atua na síntese e estoque de glicogênio, lipídeos e proteínas. Concomitantemente, também inibe o catabolismo destas macromoléculas e a sua liberação na corrente sanguínea, associado com o metabolismo dos carboidratos, das proteínas e das gorduras (26, 27).

Estreptozotocina (ETZ) tem sido bastante utilizada para induzir diabetes em modelos animais. Esta indução pode resultar tanto em diabetes dependente de insulina como em diabetes independente de insulina, dependendo da dose e da frequência de injeção (28). De uma maneira sucinta, a ETZ é captada pelas células do pâncreas pelo transportador de glicose tipo 2 (*Glucose transporter 2- GLUT 2*) (29). Dentro da célula, ocorre a produção de radicais livres e óxido nítrico, além de alquilação do DNA, o que contribui para a sua fragmentação (28). Esta injúria leva à

ativação da poli- ADP (*Adenosine diphosphate*- ADP) ribose polimerase, com consequente inibição da síntese e secreção de insulina, por depleção de trifosfato de adenosina (*Adenosine triphosphate*- ATP) (30).

2.2.1 Diabetes mellitus e inflamação

A hiperglicemia crônica, característica do DM, leva ao aumento da formação de produtos finais de glicosilação avançada (*Advanced glycation end-products*- AGEs) e ao acúmulo de proteína do grupo de alta mobilidade B1 (*high mobility group box protein B1* - HMGB1), que se ligam ao receptor para produtos finais de glicosilação avançada (*Receptor for advanced glycation end-products*- RAGE) e ativam células do sistema imunológico e do endotélio vascular (31, 32).

A HMGB1 é uma proteína ubíqua altamente conservada, que funciona como um fator de ligação à cromatina, promovendo sua replicação e transcrição (33, 34). Em adição ao seu papel intranuclear, HMGB1 também funciona como uma molécula de sinalização extracelular, um sinal de perigo, conhecido como alarmina (33, 34). HMGB1 é passivamente liberada a partir de células necróticas e é ativamente secretada por macrófagos e monócitos estimulados com citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α (*Tumor necrosis factor alpha*- TNF- α) e IL-1 β (*Interleukin 1 beta*- IL-1 β) , além de espécies reativas de oxigênio (35). HMGB1 extracelular atua como um sinal de perigo endógeno, que se liga com alta afinidade a vários receptores, entre eles, o RAGE, promovendo inflamação (36).

Os AGEs são um grupo heterogêneo de moléculas formadas a partir da reação de glicosilação não-enzimática ou glicoxidação de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (37). A formação exacerbada de AGE devido à hiperglicemia tem sido repetidamente relatada como um fator patogênico central no desenvolvimento das complicações microvasculares do diabetes (38).

RAGE é um membro único da superfamília de imunoglobulinas de proteínas do receptor de reconhecimento de padrões de superfície celular, que interage com uma variedade de ligantes, incluindo AGE e HMGB1, ativando a cascata de sinalização do fator nuclear de transcrição kappa B (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*- NFkB) (39). Como resultado desta ativação, NFkB induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β , IFN- γ

(*Interferon-gamma*- IFN- γ), e IL-6 (*Interleukin 6*- IL-6), promovendo o recrutamento de células do sistema imune que exacerbam e sustentam a inflamação (40, 41).

Estudos clínicos, mostraram a presença de altos níveis de HMGB1 circulantes na corrente sanguínea de pacientes com DM2, bem como expressão aumentada de seus receptores em monócitos, e maior atividade de NFkB, sustentando o estado de inflamação sistêmica observado nestes pacientes (42, 43).

2.2.2 Diabetes mellitus e processos de proliferação e apoptose

O DM altera o balanço entre os processos de proliferação e apoptose (44, 45). Estudos em reparação de feridas cutâneas de animais diabéticos mostram que o DM resulta em retardo no processo de re-epitelialização, com menor angiogênese e infiltração celular, além de formação desorganizada de colágeno, bem como, deficiência nos níveis de vários fatores de crescimento (46).

A presença exacerbada de mediadores inflamatórios e de AGEs no DM, pode levar à apoptose através da produção de espécies reativas de oxigênio, via ativação do receptor RAGE, resultando em vias de sinalização que culminam com a ativação de caspase-3 e a morte celular (47, 48).

Apoptose ou morte celular programada é responsável pela homeostase do tecido. Este mecanismo pode ocorrer através de duas vias principais, a via extrínseca e intrínseca. Na via extrínseca, a sinalização é recebida por receptores de morte Fas (CD25), na superfície externa da membrana celular, que transmitem este sinal para o interior da célula via caspase-8 (49). E via intrínseca, também denominada mitocondrial, que ocorre através da interação entre caspases e proteínas pró-apoptóticas, como bax e bad, com liberação do citocromo c do interior da mitocôndria. Ambas as vias culminam com a ativação da caspase-3 via clivagem e execução da morte celular (49).

Outro marcador inflamatório presente no DM, o TNF- α , também pode induzir apoptose pelas duas vias. Intrínseca, pela produção de espécies reativas de oxigênio e, extrínseca, via interação com o receptor de morte (50, 51).

Em condições de estresse metabólico, respostas adaptativas e sinais de apoptose intracelulares determinam a sobrevivência da célula. A autofagia pode ser considerada uma resposta adaptativa, que permite a degradação de organelas

danificadas e proteínas com defeito, dentro de vacúolos, gerando substratos glicolíticos (52). Neste contexto, sabe-se que a proteína HMGB1 interage com o fator de transcrição p53 e regula este processo de apoptose e autofagia. A proteína p53 é conhecida como um gene supressor de tumor, pois regula a parada do ciclo celular e apoptose, dependendo da sua localização celular (53). Quando localizado no citoplasma da célula, p53 inibe autofagia e induz apoptose através da interação com bax pela via mitocondrial, e quando localizado no núcleo da célula, atua como fator de transcrição, ativando vários genes que regulam ambos os processos, apoptose e autofagia (54). Em contraste, HMGB1 favorece o processo de autofagia, tanto na sua localização citoplasmática quanto nuclear. No citoplasma, HMGB1 forma um complexo com p53, inibindo sua função, favorecendo desta forma o processo de autofagia e sinalizando inflamação (54).

2.2.3 Efeito do diabetes mellitus nas glândulas salivares

Embora o processo secretório das glândulas, parótida e submandibular, esteja primariamente sob o controle de nervos, simpático e parassimpático, fatores dietéticos e hormonais influenciam as respostas ao estímulo farmacológico ou dos nervos diretamente. Numerosos estudos clínicos relataram maior incidência e severidade de moléstias orais em pacientes com diabetes, em comparação com grupos controles (9).

Na literatura há relatos de alterações nas glândulas salivares de animais diabéticos, como alterações no sistema antioxidante de ratas com diabetes induzida por ETZ (3, 55), assim como alterações no metabolismo de carboidratos (56), alteração da atividade enzimática da amilase salivar (57, 58) e redução da expressão de proteínas ricas em prolina e mucinas (59).

Observa-se também acúmulo lipídico no citoplasma das células secretoras, diminuição da resposta ao estímulo parassimpático/colinérgico, aumento de autofagia e atividade lisossomal, bem como endocitose de proteínas de secreção por células do ducto, fluxo salivar reduzido e diminuição da quantidade total de ácido siálico nos animais diabéticos, o que pode estar relacionado à xerostomia reportada por pacientes com diabetes (60-63).

Análises morfométricas demonstram diminuição no volume dos ácinos serosos na GSM de ratos, tanto de machos como de fêmeas, induzidos com ETZ (64, 65). Atrofia acinar e infiltrado inflamatório também foram relatados em camundongos diabéticos Nod (66). Além disso, outro estudo com modelo experimental de diabetes em ratos, induzidos com ETZ, mostrou acúmulo de grânulos de secreção no citoplasma das células, com fusão e liberação dos mesmos em GSM, na primeira e segunda semana. Na terceira semana, sinais de necrose e de degeneração das células secretórias e de células dos ductos eram evidentes, com substituição por tecido conjuntivo (61). De forma geral, a indução química ou auto-imune de DM em roedores, resultou em redução do tamanho da GSM e acúmulo de lipídios em ácinos e ductos intercalares (67, 68).

Em glândulas salivares humanas de pacientes com DM1, observou-se alteração da expressão de amilase e AMP cíclico (*cyclic AMP*- cAMP), com maior quantidade de proteína α -amilase em relação ao controle, aumento dos grânulos de secreção em ácinos, alteração da subestrutura dos grânulos e da distribuição da amilase nestes grânulos. Isto mostra que o DM também altera a expressão de proteínas de secreção em células e tecido de glândula salivar humana (69).

2.3 Terapia com laser de baixa potência

Laser é uma radiação eletromagnética estimulada, com características particulares como, monocromaticidade (fótons de mesmo comprimento de onda), maior coerência (ondas com fase sincronizadas entre si) e maior colimação (fótons se propagam em uma única direção, paralelos entre si). Há dois tipos de lasers, os de alta potência, ou em alta intensidade, os quais têm densidade de potência maior ou igual a 1 W/cm², cujo mecanismo de ação baseia-se no aumento de temperatura local do tecido. Os lasers de alta potência são utilizados, na odontologia, para cirurgias de tecidos moles e preparo de cavidades, por exemplo (70-72). E lasers de baixa potência, ou em baixa intensidade, que apresentam densidade de potência entre 1 e 500 mW/cm², cujos efeitos estão relacionados a eventos fotoquímicos, fotobiológicos e fotofísicos nos tecidos (73).

A terapia com laser de baixa potência (*Low- power laser therapy- LPLT*), é caracterizada pelo uso do laser na faixa do vermelho ou infravermelho próximo e, apresenta efeito anti-inflamatório, analgésico e de biomodulação (4, 74).

Esta resposta das células à irradiação é dada pela presença de um fotoreceptor, localizado na mitocôndria, citocromo c oxidase (75). Esta foto-excitação pode resultar em pelo menos cinco reações primárias. A primeira envolve a mudança do estado redox, com aceleração de transferência de elétrons na cadeia respiratória (76). Na segunda, ocorre a liberação de óxido nítrico do centro catalítico da citocromo c oxidase, o que favorece a atividade respiratória de células sob condições patológicas nas quais a presença de óxido nítrico é exacerbada (77). A terceira envolve a produção de superóxidos (78). A quarta, ocorre pela ação fotodinâmica, com produção de radicais livres de oxigênio que atuam como mensageiros celulares (79). E, por último, o aquecimento local transiente, pode alterar a estrutura conformacional de proteínas e a atividade enzimática (80).

Estas alterações resultam nas reações secundárias, tais como, aumento da síntese de ATP e ativação do cAMP, com consequente aumento no metabolismo celular (76, 81-84), favorecendo processos de reparação e proliferação (85-90).

Clinicamente, a LPLT tem sido usada em pacientes com síndrome de Sjögren, que apresentam hipossalivação, e resultados preliminares mostraram que as glândulas salivares reagem rapidamente ao tratamento (2). Em pacientes que estão sob tratamento radioterápico de cabeça e pescoço, a LPLT estimula a reparação das mucosites orais, diminuindo também a dor e o sintoma de xerostomia (91-93). Além disso, a LPLT pode também ser utilizada como coadjuvante no tratamento periodontal, diminuindo a inflamação gengival (94, 95).

Estudos moleculares, mostram que a LPLT modula a expressão gênica e a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, entre elas, IL-1 α (*Interleukin 1 alpha- IL-1 α*), IL-1 β , IL-6, IL-8 (*Interleukin 8- IL-8*), IL-10 (*Interleukin 10- IL-10*), TGF- β (*Transforming growth factor beta- TGF- β*), TNF- α e TNF- γ (*Tumor necrosis factor gamma- TNF- γ*), bem como a expressão de diversos fatores de crescimento, incluindo bFGF (*Basic fibroblast growth factor- bFGF*), IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1- IGF-1*), SCF (*Stem cell factor- SCF*), HGF (*Hepatocyte growth factor- HGF*), KGF (*Keratinocyte growth factor- KGF*) e IGF (*Insulin-like growth factor- IGF*), em culturas de células humanas e de animais, relacionados ao processo de cicatrização de feridas (96). Um estudo em camundongos confirmou

estes achados, mostrando que a LPLT pode diminuir a expressão de TNF- α e TNF- γ em células mononucleares do baço (97).

Um estudo que utilizou a técnica de *microarray*, em ratos com artrite reumatoide tratados com LPLT em 830 nm, 500 mW, 6,4 mW/cm², 20 min, 7,64 J/cm², mostrou o mecanismo de ação do laser na redução do processo inflamatório, possibilitando a identificação dos genes associados com desordens esqueléticas e musculares, e a relação dos mesmos com a via das quimiocinas (98).

Estudos *in vitro* indicam que a LPLT também pode estimular a proliferação e prevenir apoptose no tecido-alvo (99, 100). Há relatos de que a LPLT pode aumentar a proliferação de fibroblastos gengivais, através do aumento da secreção de bFGF, IGF-1 e IGFBP3 (*Insulin-like growth factor binding protein 3- IGFBP3*) (101).

Em cultura de células, LPLT modulou a expressão e liberação de fatores de crescimento, aumentando a expressão de FGF-2 (*Fibroblast growth factor 2 –FGF-2*), IGF, NGF e VEGF (*Vascular endothelial growth factor- VEGF*) em fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e do músculo liso, além de queratinócitos e adipócitos (96). O laser estimulou células com crescimento retardado no momento de sua irradiação. Células funcionais e bem nutridas apresentaram pouca resposta ao laser (76). Desta forma, apenas células sob condição de estresse por deficiência nutricional ou sob altas concentrações de glicose responderam à irradiação com laser, aumentando a expressão de fatores de crescimento (96).

Outro estudo com *microarray*, onde se avaliou a expressão gênica em fibroblastos humanos irradiados com laser em 628 nm, 0,88 J/cm², revelou 111 genes que tiveram sua expressão aumentada após irradiação. A maioria desses genes, foram relacionados com vias de proliferação celular e supressão de apoptose. Também foram encontrados vários genes relacionados ao sistema antioxidante e ao metabolismo energético mitocondrial, possibilitando um melhor entendimento dos mecanismos moleculares associados à cicatrização de feridas após LPLT (102).

Uma evidência recente mostra que o cAMP pode mediar os efeitos do laser, modulando a atividade de NF κ B (103). Sabe-se que a proteína de ligação ao elemento de resposta do cAMP (*cAMP response element binding protein- CREB*), é um fator de transcrição que regula diversas respostas celulares, incluindo a proliferação e sobrevivência da célula (104, 105). Estudos em proliferação celular indicam que este processo é favorecido pela LPLT através da ativação da proteína

kinase regulada por sinal extracelular (*Extracellular signal- regulated kinase- ERK*) (106). Em regeneração do fígado, após hepatectomia parcial, a LPLT ativou a via da ERK, melhorando a capacidade regenerativa do tecido (107). Esta ativação também foi observada em proliferação de células pulpares humanas em meio de cultura (108). O fator de transcrição CREB e ERK interagem neste processo de proliferação (109-111), e regulam a produção de ciclina D1 (112). Ciclina D1 é uma proteína importante na regulação do ciclo celular de células em proliferação ativa (113). Além de favorecer a proliferação, a LPLT pode influenciar na atividade de bax e na ativação de caspase-3, via mitocondrial, inibindo apoptose (114).

2.3.1 Efeito do laser em glândulas salivares

Poucos estudos foram realizados analisando o efeito da irradiação nas glândulas salivares. Takeda et al., ao irradiarem as GSMs de ratos com laser de baixa potência, relataram aumento de mitose em células epiteliais dos ductos, sem atipia, entre 1- 24 h após a irradiação (115). Estas mitoses ocorreram principalmente nos ductos granulares, mas também foram observadas em ductos estriados e intercalares (115). Plavnik et al., também observaram respostas celulares após irradiação de GSMs em roedores, com vasodilatação nas primeiras 2 h (116).

Alguns estudos mostraram os efeitos da LPLT no aumento do fluxo salivar, diminuindo a sensação de boca seca, em pacientes com xerostomia (93, 117, 118), síndrome de Sjögren (2) ou submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço (92), sugerindo não só um efeito estimulatório do laser sobre as glândulas salivares, mas também um potencial regenerativo.

Em glândulas parótidas de camundongos submetidos à radioterapia, análise morfológica e imuno-histoquímica para caspase-3 clivada, mostraram que a LPLT ajudou na preservação da estrutura dos ácinos e diminuiu a formação de vacúolos no interior das células, além de aumentar a vascularização neste tecido. Não houve diferenças significativas na detecção de caspase-3, embora sua porcentagem de expressão indique uma tendência de diminuição nos animais submetidos à radioterapia e tratados com LPLT, em relação aos que não receberam tratamento (119).

Simões et al., demonstraram que a LPLT pode aumentar o fluxo salivar de ratos irradiados, alterando também a composição da saliva, quanto aos níveis de

amilase, proteína total e atividade da peroxidase (120). Em ratas diabéticas, a ILBP, no comprimento de onda do vermelho, com doses de 5 e 20 J/cm², alterou a atividade da catalase (121, 122), bem como a atividade de superóxido dismutase, melhorando o sistema antioxidante em glândulas salivares (123). Outro estudo do nosso grupo também mostrou o efeito protetor do laser contra o estresse oxidativo em glândula salivar de hamsters, submetidos à quimioterapia com 5-FU (124).

Adicionalmente, o acúmulo de lipídios encontrado no citoplasma das glândulas parótidas foi menor em ratas diabéticas que receberam a irradiação, assim como a glicemia, que também se mostrou diminuída (3, 123, 125). Estes dados demonstram que a ILBP interfere no metabolismo proteico, lipídico e de carboidratos. No entanto, mais estudos são necessários para melhor compreender os mecanismos de ação do laser.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral analisar o efeito da ILBP nas vias de inflamação, apoptose e proliferação de GSM de ratas diabéticas, induzidas por ETZ, bem como seu efeito sistêmico na glicemia e níveis de insulina e HMGB1 plasmáticos.

3.2 Objetivos Específicos

Através das análises de parâmetros metabólicos, analisar os efeitos do diabetes e da ILBP, em:

- Glicemia dos animais: via glicosímetro e método bioquímico da glicose oxidase
- Peso dos animais
- Quantidade de proteína total no plasma
- Níveis de insulina no sangue
- Níveis de HMGB1 no plasma
- Resistência à insulina: HOMA-IR
- Sensibilidade à insulina: HOMA-IS
- Função da célula beta do pâncreas: HOMA- β

E estudar as possíveis alterações decorrentes do DM em GSM através de análises de microscopia de luz, imuno-histoquímica, dupla imunofluorescência,

TUNEL, Western blotting, qRT-PCR e ELISA, bem como os efeitos da ILBP nas vias de:

- Inflamação: TNF- α - HMGB1- AGE- RAGE- NF κ B
- Apoptose: p53, caspase-3 clivada
- Proliferação: cAMP- CREB- ERK- Ciclina D1

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em 2 fases. A fase 1 é caracterizada por um estudo piloto realizado, em parte, na Universidade de Nihon, Matsudo, Japão. A fase 2, foi realizada inteiramente na FOUSP.

4.1 Fase 1

4.1.1 Animais

A pesquisa foi conduzida de acordo com os princípios éticos de cuidados com animais de laboratório (86/609/CEE). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo- FOUSP Protocolo 118, fls.133 livro 2 (Anexo).

Foram utilizadas ratas da raça Wistar, com 12 semanas de vida, mantidas no Biotério da Faculdade de Odontologia de São Paulo (FOUSP), com peso corporal de 200 g-250 g. Durante o período experimental os animais foram colocados em gaiolas individuais com livre acesso à água e alimento.

4.1.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em diabéticos (D) e controles (C), sendo aleatoriamente divididos em 3 grupos (n=9), sendo: C (sem diabetes, 0 J/cm²), D (diabéticos, 0 J/cm²) e DL (diabéticos, 20 J/cm²).

No 29º dia experimental, as ratas foram anestesiadas com Ketamina/Xilazina e tricotomizadas nas áreas das GSM e glândulas parótidas (Figura 4.1). Os animais foram então irradiados de acordo com o seu grupo:

Grupo C e D: animais não diabéticos e diabéticos, respectivamente, nos quais foi realizada apenas a simulação da irradiação.

Grupo DL: animais diabéticos, os quais foram submetidos à irradiação de 20 J/cm² na área previamente demarcada.

4.1.3 Indução de Diabetes

Após um período de aproximadamente 15 h em jejum, foi aplicado intraperitonealmente, uma dose de estreptozotocina (60 mg/kg de peso corporal), dissolvido em tampão de citrato de sódio 0,1 M pH 4,5, para a indução de diabetes nos animais do grupo “D” e “DL”. Os animais não-diabéticos (grupo “C”) receberam somente a injeção do tampão (Figura 4.1).

4.1.4 Determinação da glicemia

A determinação da glicemia foi realizada com os animais em jejum de aproximadamente 12 h, 72 h após a administração da ETZ, para o diagnóstico de diabetes e no dia da eutanásia, através da coleta de sangue caudal, para análise comparativa com a glicemia de diagnóstico. A glicemia foi analisada através do glicosímetro (Accu-Chek Advantage- Roche). Foram considerados diabéticos, os animais que apresentaram glicemia superior a 250 mg de glicose/dl de sangue.

4.1.5 Irradiação com laser de baixa potência (ILBP)

O laser de diodo Photon Lase III (DMC Equipamentos LTDA), com comprimento de onda de 660 nm (vermelho), do Laboratório de Biologia Oral (LBO-FOUSP), foi utilizado para o estudo.

Após a tricotomia da região onde seria aplicado o laser, foi feita a demarcação da área das GSMs (as duas juntas), com um círculo de aproximadamente 1,13 cm², bem como na área de cada glândula parótida, correspondentes à área a ser irradiada.

A irradiação foi realizada de maneira pontual, no total de 40 pontos para cada área demarcada, padronizado para todas as sessões da terapia (122). Os cálculos realizados obedeceram às fórmulas:

$$DE=(PxT)/A \text{ e } E= P \times T$$

Onde T= tempo (s)

DE= densidade de energia (J/cm²)

A= Área (cm²)

P= Potência (W)

E= Energia (J)

Sendo a potência fixa em 70 mW, a densidade de energia aplicada de 20 J/cm² e a área do spot do laser 0,028 cm², tivemos:

Grupo DL: $T=(20 \times 0,028) \div 0,07 = 8$ segundos por ponto.

Cada círculo correspondente à área irradiada tem 1,1304 cm², portanto, para cobrirmos toda a área foram necessários 40 pontos ($1,1304 \div 0,028 = 40,37$ pontos). A energia aplicada por ponto foi de 0,56 J ($E= P \times T = 0,07 \times 8 = 0,56$ J) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Parâmetros de irradiação. Grupo controle (C) e grupo diabético (D) não foram irradiados. Grupo DL recebeu a ILBP com 70 mW, 20 J/cm², 8 s/ponto

Grupo	Condição	Potência (mW)	Densidade de Energia (J/cm ²)	Tempo de Irradiação por ponto (s)
C	Controle	0	0	0
D	Diabético	0	0	0
DL	Diabético	70	20	8

4.1.6 Obtenção das amostras

A eutanásia dos animais foi realizada 24 h após o tratamento com laser, por destroncamento medular, após anestesia dos animais com Ketamina/Xilasina (Figura 4.1). Os animais foram pesados no início e no final da fase experimental. As GSMs direitas foram imediatamente removidas e colocadas em RNA Later (Ambion Inc., Austin, TX, EUA), e armazenadas a 4°C, e enviadas ao Japão via *world courier* para posterior extração de RNA e proteínas. As GSM esquerdas foram imersas em solução fixadora constituída de formaldeído a 4% (preparado a partir do paraformaldeído), e deixados *overnight* a 4°C (126).

Figura 4.1 - Desenho experimental. No primeiro dia, o DM foi induzido nos animais do grupo D e DL. Setenta e duas horas após a indução, aferimos a glicemia em jejum com glicosímetro. No 29º dia, os animais do grupo DL receberam a irradiação com laser. No 30º dia, a glicemia em jejum foi aferida com glicosímetro, foi realizada a coleta de sangue e todos os animais foram sacrificados

4.1.7 Processamento dos espécimes

Após a fixação, os espécimes foram lavados em tampão fosfato a 0,05M, pH 7,2, desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol, infiltrados e incluídos em parafina, enviados ao Japão, para posterior análise histológica e imuno-histoquímica.

4.1.8 Análises moleculares

As GSMs de 3 animais de cada grupo foram utilizadas para o Western blotting de HMGB1 e β -actina. Desta análise, a melhor amostra de cada grupo foi escolhida para a realização do Western blotting, qRT-PCR e ELISA, para todos os genes, conforme os procedimentos descritos abaixo. Outras três GSM, de animais diferentes, uma de cada grupo, foram usadas para as análises de microscopia de luz, imuno-histoquímica, dupla-imunofluorescência e TUNEL.

4.1.9 Microscopia de luz

Os blocos de parafina foram cortados com espessura de 4 μ m no micrótomo Yamato RON 380 e posteriormente corados com hematoxilina e eosina. As imagens foram obtidas em um microscópio de luz Olympus DP-72 acoplado com o sistema de captura de imagens DP2-BSW (Olympus, Tokyo, Japão).

4.1.10 Imuno-histoquímica

Os cortes foram desparafinizados em três banhos de xilol, em temperatura ambiente, sendo os dois primeiros banhos de 5 minutos e o terceiro de 4 minutos. Em seguida os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de álcool, a partir de seis passagens em etanol absoluto, seguido por 3 banhos em etanol 95%, durante 1 minuto cada. Posteriormente, lavados em água corrente por 3 minutos. A recuperação de antígeno foi realizada com tampão citrato pH 6.0 (Abcam, Inc., Cambridge, MA, EUA) a 97°C por 20 minutos. Após 25 minutos, os cortes foram lavados em tampão fosfato em três banhos, 5 minutos cada. As amostras foram então, incubadas em solução de bloqueio de peroxidase (DAKO-S200389, North America Inc., Carpinteria, CA, EUA) por 10 minutos. Seguido de três lavagens em tampão fosfato, 5 minutos cada. O bloqueio de proteína foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, com solução de bloqueio da DAKO (X090930, North America Inc., Carpinteria, CA, EUA). Os anticorpos anti-HMGB1 monoclonal de coelho (1:250; Abcam, Inc., Cambridge, MA, EUA), anti-AGE monoclonal de camundongo (1:125; Transgenic, Inc., Kobe, Japão), anti-TNF- α polyclonal de coelho (IHC world, LLC, Woodstock, MD), anti-NF κ B fosforilado policlonal de coelho (1:100; Bioss, Inc., Woburn, MA, EUA), anti-CREB fosforilado (ser133) monoclonal de coelho (1:250; Abcam, Inc., Cambridge, MA, EUA), anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) fosforilado monoclonal de coelho (1:200; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, EUA), anti-AMP cíclico policlonal de coelho (1:100; EDM Millipore, Corp., Billerica, MA, EUA), anti-ciclina D1 monoclonal de coelho (1:100; Abcam, Inc., Cambridge, MA, EUA), anti-RAGE policlonal de coelho (1:20; GeneTex, Inc., Irvine, CA, EUA), anti-bax monoclonal de coelho (1:250; Abcam, Inc., Cambridge, MA, EUA), anti-bad monoclonal de coelho (1:100; Abcam, Inc., Cambridge, MA, EUA), anti-caspase-3 clivada policlonal de coelho (Asp175) (1:200; Cell Signaling), foram usados como anticorpos primários, incubados a 4°C *overnight*. Após incubação os cortes foram lavados em tampão fosfato, e incubados com anticorpo secundário Histofine Simple Stain Rat MAX-PO por 30 minutos (Nichirei Biosciences, Inc., Tokyo, Japão). Após lavagem em tampão fosfato, a revelação foi realizada com o cromógeno diaminobenzidina 0,025% (DAB, 3,3-diaminobenzidina K3468- DAKO,

North America Inc. Carpinteria, CA, EUA), segundo as orientações do fabricante. Após lavagem em água corrente por 3 minutos, seguido de um banho em água destilada por 1 minuto, os cortes foram contra-corados com hematoxilina, desidratados em concentrações crescentes de etanol e imersos em xilol. As lâminas foram montadas em Entellan (SEM, Hatfield, PA, EUA) e examinadas em um microscópio de luz modelo Olympus DP-72.

4.1.11 Dupla-imunofluorescência

Os cortes foram desparafinizados em três banhos de xilol, em temperatura ambiente, sendo os dois primeiros banhos de 5 minutos e o terceiro de 4 minutos. Em seguida os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de álcool, a partir de seis passagens em etanol absoluto, seguido por 3 banhos em etanol 95%, durante 1 minuto cada. Posteriormente, lavados em água corrente por 3 minutos. A recuperação de antígeno foi realizada com tampão citrato pH 6.0 (Abcam, Inc., Cambridge, MA, EUA) a 97°C por 20 minutos. Após 25 minutos, os cortes foram lavados em tampão fosfato em três banhos, 5 minutos cada. As amostras foram então, incubadas em solução de bloqueio de peroxidase (DAKO S200389, North America Inc., Carpinteria, CA, EUA) por 10 minutos. Seguido de três lavagens em tampão fosfato, 5 minutos cada. O bloqueio de proteína foi realizado durante 60 minutos com solução de bloqueio da DAKO (X090930, North America Inc., Carpinteria, CA, EUA). O anticorpo anti-bax monoclonal de coelho (1:150; Abcam, Inc., Cambridge, MA, EUA) foi incubado com *Zenon Alexa Fluor 594* (Thermo Fisher Scientific Inc., Paisley, PA, RU), de acordo com as instruções do fabricante. Seguido de lavagem em tampão fosfato e incubação com o anticorpo anti-HMGB1 monoclonal de coelho (1:150; Abcam, Inc., Cambridge, MA, EUA) com *Zenon Alexa Fluor 488* (Thermo Fisher Scientific Inc., Paisley, PA, RU). Os cortes foram contra-corados com *ProLong Gold Antifade Reagent com DAPI* (Thermo Fisher Scientific Inc., Paisley, PA, RU) por 12 h. Da mesma forma, a dupla-imunofluorescência foi realizada também com o anticorpo anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) fosforilado

monoclonal de coelho (1:150; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, EUA) com *Zenon Alexa Fluor 594* (Thermo Fisher Scientific Inc., Paisley, PA, RU), seguido de lavagem em tampão fosfato e incubação com o anticorpo anti-CREB fosforilado (ser133) monoclonal de coelho (1:150; Abcam, Inc., Cambridge, MA, EUA) com *Zenon Alexa Fluor 488* (Thermo Fisher Scientific Inc., Paisley, PA, RU).

As imagens foram obtidas em um microscópio BIOREVO BZ-9000 (Keyence Corporation, Itasca, IL).

4.1.12 Análise de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*)

Os cortes foram desparafinizados em três banhos de xilol, em temperatura ambiente, sendo os dois primeiros banhos de 5 minutos e o terceiro de 4 minutos. Em seguida os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de álcool, a partir de seis passagens em etanol absoluto, seguido por 3 banhos em etanol 95%, durante 1 minuto cada. Posteriormente, lavados em água corrente por 3 minutos, seguido de um banho em água destilada por um minuto. Para a análise de TUNEL foi utilizado o kit *TACS 2TdTDAB in situ Apoptosis Detection* (Trevigen 4810-30K, Gaithersburg, MD, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Os cortes foram lavados com tampão fosfato e incubados com proteinase K 1:100 por 15 minutos em temperatura ambiente. Seguido de duas lavagens em água destilada por 2 minutos. As amostras foram então, incubadas em solução de bloqueio de peroxidase (DAKO-S200389, North America Inc., Carpinteria, CA, EUA) por 5 minutos. Lavadas em tampão fosfato, incubadas em tampão de marcação *1xTdT* (Trevigen 4810-30K, Gaithersburg, MD, EUA) por 5 minutos em temperatura ambiente, seguido de mix de reação para marcação (Trevigen 4810-30K, Gaithersburg, MD, EUA) por mais 5 minutos a 37°C. O término da reação foi realizado com tampão de parada *1xTdT* (Trevigen 4810-30K, Gaithersburg, MD, EUA) por 5 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em água

destilada e incubados com solução de *Strep-HRP* (Trevigen 4810-30K, Gaithersburg, MD, EUA) por 10 minutos a 37°C. A revelação foi realizada com diaminobenzidina 0,025% (DAB, 3,3-diaminobenzidina K3468- DAKO, North America Inc. Carpinteria, CA, EUA), segundo as orientações do fabricante. Após lavagem em água destilada, os cortes foram contra-corados com verde de metil 1%, desidratados em concentrações crescentes de etanol e imersos em xilol. As lâminas foram montadas em *Entellan* (SEM, Hatfield, PA, EUA) e examinadas em um microscópio de luz modelo Olympus DP-72.

4.1.13 Extração de proteínas

As amostras foram divididas em 2 partes. Uma parte das amostras foi removida do *RNA later* (Ambion Inc., Austin, TX, EUA) e triturada em nitrogênio líquido até se reduzir a pó com o *SKMill SK-100* (Tokken, Japão). Em seguida as amostras foram lisadas e homogeneizadas em 250 µl de tampão de lise *RIPA* (Santa Cruz Biotechnology sc-24948). O lisado foi centrifugado a 21700 x g minutos a 4°C, e o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C (Figura 4.2).

Figura 4.2 - As amostras foram removidas do *RNA later* e congeladas em nitrogênio líquido. Em seguida trituradas com martelo e colocadas em tubos individuais. Cada tubo recebeu em seu interior uma bola de inox e posteriormente, todo o conjunto foi mergulhado em nitrogênio líquido dentro de um suporte metálico (A). Este suporte foi colocado dentro de um suporte plástico e com movimentos verticais a amostra foi triturada a pó sob refrigeração (B). Fotos do site <http://www.tokken.jp/products/breaker/skmill.html>

A concentração de proteína total das amostras foi determinada com o *BCA Protein assay Kit* (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA) de acordo com a metodologia recomendada pelo fabricante.

4.1.14 ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) de HMGB1

O teste de ELISA foi realizado para medir as concentrações de HMGB1 na proteína extraída das amostras de GSM. A análise foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (SHINO-TEST, Corporation, Kanagawa, Japão).

4.1.15 Western Blotting

Após quantificação das proteínas totais extraídas das amostras de GSM, foram feitas alíquotas do sobrenadante de 25 µg para o *western blotting* de anticorpos não fosforilados e de 40 µg para anticorpos fosforilados. As alíquotas foram misturadas com tampão de amostra para a concentração final de 1X (Wako Chemicals 191-13272, EUA). Em seguida as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e então submetidas a *SDS-PAGE* (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*- SDS-PAGE), sendo feita a eletroforese a 90V por aproximadamente 90 minutos, em gel de acrilamida 10% ou 15% *Wako SuperSep ACE* (Wako Chemicals, EUA), de acordo com o peso molecular da proteína a ser quantificada. O padrão de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope (Bio-rad Laboratories Inc., EUA).

A transferência das proteínas para a membrana de *PVDF* (Bio-rad Laboratories Inc., EUA) foi feita por eletrotransferência semi-seca no dispositivo *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-rad Laboratories Inc., EUA) por 30 minutos com tampão

de transferência 1X (Bio-rad Laboratories Inc., EUA). Após a transferência, a membrana foi submetida ao bloqueio com leite desnatado 5% (Wako Chemicals, EUA) ou albumina de soro bovino 5% (BSA 5%, Cell Signaling Technology), em *TBS-T* (*Tris buffered saline with Tween 1%*- TBS-T) por uma hora em temperatura ambiente, sob agitação, de acordo com as recomendações para cada anticorpo utilizado. Em seguida, as membranas foram lavadas em *TBS-T* e incubadas *overnight* com os anticorpos primários anti-HMGB1 monoclonal de coelho (1:800; Abcam, Inc., Cambridge, MA, EUA), anti-AGE monoclonal de camundongo (1:250; Transgenic, Inc., Kobe, Japão), anti-NFκB fosforilado policlonal de coelho (1:200; Bioss, Inc., Woburn, MA, EUA), anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) fosforilado monoclonal de coelho (1:1000; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, EUA), anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) total (1:1000; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, EUA), anti-ciclina D1 monoclonal de coelho (1:650; Abcam, Inc., Cambridge, MA, EUA), anti-RAGE policlonal de coelho (1:100; GeneTex, Inc., Irvine, CA, EUA), anti-bax monoclonal de coelho (1:1000; Abcam, Inc., Cambridge, MA, EUA), anti-p53 monoclonal de coelho (1:500; Abcam, Inc., Cambridge, MA, EUA), anti-p53 fosforilado Ser 15 monoclonal de coelho (1:900; Abcam, Inc., Cambridge, MA, EUA), anti-caspase-3 clivada policlonal de coelho (Asp175) (1:500; Cell Signaling) e anti-β-actina de coelho (1:100; Cell Signaling Technology). Após incubação, as membranas foram lavadas com *TBS-T* e incubadas com anticorpo secundário *IgG HRP* (horseradish peroxidase) anti-coelho ou anti-camundongo, diluído em solução de bloqueio, por 60 minutos, de acordo com o anticorpo utilizado. A imunoreatividade foi detectada por quimioluminescência com *ECL Plus Western Blotting Detection System* (Amersham, Uppsala, Suécia) e as imagens foram analisadas com o Luminescent Image Analyser (LAS-3000; Fuji Film Inc., Japão).

4.1.16 Extração de RNA

A segunda parte das amostras de GSM foi removida do *RNA later* (Ambion Inc., Austin, TX, EUA) e triturada em nitrogênio líquido até se reduzir a pó com o

SKMill SK-100 (Tokken, Japão). Em seguida as amostras foram lisadas em 750 µl de Qiazol (Qiagen, Chatsworth, CA, EUA).

O RNA total foi isolado com o *RNeasy plus Mini kit* (Qiagen, Chatsworth, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, foi realizado o tratamento com *Turbo DNase Free* (Life Technologies, EUA).

A concentração e pureza do RNA foram determinadas em *Nanodrop* (Thermo Fisher Scientific Inc., Paisley, PA, RU) com comprimento de onda de 260 e 280 nm e armazenado a -80°C até o momento de sua utilização.

4.1.17 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

De acordo com as instruções do fabricante, 1µg de RNAm foi misturado com T7-(dt)24 primer contendo a sequência promotora da T7 RNA polimerase. Foi realizada a transcrição reversa para cDNA e síntese da dupla fita de cDNA com *Super Script VILO Master Mix* (Life Technologies, EUA) na termocicladora Dice (TAKARA, Japão). Uma quantidade de 2µl de cDNA foi submetida ao *qRT-PCR* usando as sondas *TaqMan* (Life Technologies, EUA) para os genes: HMGB1 (Rn 02377062_g1), RAGE (Rn 015753_g1) e β-actina (Rn 01412977_g1), como controle interno. Utilizamos o *Roche Master Mix* e o equipamento *Corbett* (Qiagen, Chatsworth, CA, EUA). Duas análises independentes foram realizadas e, a média e a expressão relativa dos genes foram calculados em relação à expressão de β-actina para cada amostra.

4.2 Fase 2

4.2.1 Animais

A pesquisa foi conduzida de acordo com os princípios éticos de cuidados com animais de laboratório (86/609/CEE). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo- FOU SP Protocolo 011/2014, adendo nº 025/2015 (Anexo).

Foram utilizadas ratas da raça Wistar, com 12 semanas de vida, mantidas no Biotério da Faculdade de Odontologia de São Paulo (FOUSP), com peso corporal de 200g-250 g. Durante o período experimental os animais foram colocados em gaiolas individuais com livre acesso à água e alimento. Os animais foram divididos em diabéticos (D) e controles (C), sendo aleatoriamente subdivididos em 3 grupos, C (n=10), D (n=7) e DL (n=8), de acordo com a dose de irradiação a ser aplicada: C- D (0 J/cm²) e DL (20 J/cm²) (Tabela 4.1).

A indução de diabetes e a ILBP foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos na fase 1 (Figura 4.1).

4.2.2 Determinação da glicemia

A determinação da glicemia foi realizada com os animais em jejum de aproximadamente 12 h, 72 h após a administração da ETZ, para o diagnóstico de diabetes (através da coleta de sangue caudal) e no dia da eutanásia (através de punção cardíaca), para análise comparativa com a glicemia de diagnóstico. A glicemia foi analisada através do glicosímetro (Accu-Chek Advantage- Roche).

No momento da eutanásia, foram coletados 20 µl de sangue para análise de glicemia via método da PGO (*Peroxidase glucose oxidase*- PGO). Foram considerados diabéticos, os animais que apresentaram glicemia superior a 250 mg de glicose/dl de sangue na análise da PGO.

4.2.3 Obtenção das amostras

A eutanásia dos animais foi realizada 24 h após o tratamento com laser, por destroncamento medular, após anestesia dos animais com Ketamina/Xilasina. Os animais foram pesados no início, no 29º dia e no final da fase experimental. As GSMs direitas foram imediatamente removidas e colocadas em *RNA Later* (Ambion Inc., Austin, TX, EUA), e armazenadas a 4°C, para posterior extração de RNA e proteínas. As GSMs esquerdas foram imersas em solução fixadora constituída de formaldeído a 4% (preparado a partir do paraformaldeído), e deixados *overnight* a 4°C (126).

Também foi coletado sangue por punção cardíaca em tubos *Vacutainer K2* EDTA® para a análise de ELISA de insulina e de HMGB1 no plasma.

4.2.4 Análise da Glicemia pelo Método da PGO (*Peroxidase Glucose Oxidase* - PGO)

Os 20 µl de sangue coletados foram transferidos imediatamente para um tubo contendo 300 µl de água destilada. O método da Glicose Oxidase foi descrito por Bergmeyer (127), sendo que seu fundamento é:

δ – Gluconolactona é primeiramente formada, e espontaneamente hidrolisada a ácido D – Glucônico. O Peróxido de Hidrogênio é decomposto pela peroxidase e o

oxigênio liberado oxida o doador de hidrogênio DH2 (O-Dianisidina), dando o derivado corado D.

A intensidade de cor formada a partir de DH2 é uma medida de quantidade de glicose oxidada. O espectro de absorção da cor formada a partir de O-Dianisidina tem um pico máximo ao redor de 460nm, porém a reação pode ser monitorada na faixa de 425-475 nm.

4.2.5 ELISA de Insulina e de HMGB1 no plasma

O sangue coletado em tubos *Vacutainer K2 EDTA®*, foi imediatamente centrifugados a 0,750 x g, por 5 minutos a 4°C para extração do plasma. As amostras foram guardadas a -80°C e analisadas dentro de 15 dias. A determinação da concentração de insulina e de HMGB1 no plasma foram feitas através dos kits *Rat Insulin Elisa Kit* (ALPCO, Salem, EUA) e *HMGB1 Rat ELISA kit MBS 729203* (MyBioSource, Inc., San Diego, CA), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.2.6 Quantificação de proteína no plasma

A quantidade de proteína total presente no plasma foi medida com o *kit BCA Protein assay Kit* (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.7 Modelo de avaliação da homeostase (*HOMA- Homeostase Model Assessment*)

A resistência à insulina (HOMA-IR), sensibilidade à insulina (HOMA-IS) e função da célula beta (HOMA- β) foram calculados, utilizando-se os dados do ELISA de insulina e a glicemia obtida com a análise de PGO, de acordo com Hsing et al. (128) e Park et al. (129) obedecendo às equações abaixo, sendo insulina em jejum expressa em mIU/l, e glicemia em jejum em mg/dl:

$$\text{HOMA-IR} = (\text{insulina em jejum} \times \text{glicemia em jejum}) \div 405$$

$$\text{HOMA-IS} = 10000 \div (\text{insulina em jejum} \times \text{glicemia em jejum})$$

$$\text{HOMA-}\beta = (20 \times \text{insulina em jejum}) \div (\text{glicemia em jejum} - 3.5)$$

4.2.8 Processamento dos espécimes

Após a fixação, os espécimes foram lavados durante uma hora em tampão fosfato a 0,05 M, pH 7,2, desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol, infiltrados e incluídos em parafina, para posterior análise histológica e imuno-histoquímica.

4.2.9 Microscopia de luz

Os blocos de parafina foram cortados com espessura de 4 μm no micrótomo Microm HM 360 e posteriormente corados com hematoxilina e eosina. As imagens foram obtidas em um microscópio de luz Olympus BX-60 acoplado com o sistema de captura de imagens Cell F (Olympus, Tokyo, Japão).

4.2.10 Imuno-histoquímica

Os cortes foram desparafinizados em três banhos de xilol, em temperatura ambiente, sendo os dois primeiros banhos de 5 minutos e o terceiro de 4 minutos. Em seguida os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de álcool, a partir de seis passagens em etanol absoluto, seguido por 3 banhos em etanol 95%, durante 1 minuto cada. Posteriormente, lavados em água corrente por 3 minutos. Não foi realizada a recuperação de antígeno. As amostras foram incubadas em solução de bloqueio de peroxidase (DAKO-S200389, North America Inc., Carpinteria, CA, EUA) por 10 minutos. Seguido de três lavagens em tampão fosfato, 5 minutos cada. O bloqueio de proteína foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, com solução de bloqueio da DAKO (X090930, North America Inc., Carpinteria, CA, EUA). Os anticorpos anti-HMGB1 monoclonal de coelho (1:250; Abcam, Inc., Cambridge, MA, EUA), anti-TNF- α policlonal de coelho (IHC world, LLC, Woodstock, MD), anti-NF κ B p65 fosforilado policlonal de coelho (1:100; Bioss, Inc., Woburn, MA, EUA), anti-ciclina D1 monoclonal de coelho (1:100; Abcam, Inc., Cambridge, MA, EUA), anti-RAGE policlonal de coelho (1:20; GeneTex, Inc., Irvine, CA, EUA), anti-bax monoclonal de coelho (1:100; Abcam, Inc., Cambridge, MA, EUA), anti-caspase-3 clivada policlonal de coelho (Asp175) (1:200; Cell Signaling), foram usados como anticorpos primários, incubados a 4°C overnight. Após incubação os cortes foram lavados em tampão fosfato, e incubados com anticorpo secundário *Histofine Simple Stain Rat MAX-PO* por 30 minutos (Nichirei Biosciences, Inc., Tokyo, Japão). Após lavagem em tampão fosfato, a revelação foi realizada com o cromógeno diaminobenzidina 0,025% (DAB, 3,3-diaminobenzidina K3468- DAKO, North America Inc. Carpinteria, CA, EUA), segundo as orientações do fabricante. Após lavagem em água corrente por 3 minutos, seguido de um banho em água destilada por 1 minuto, os cortes foram contra-corados com hematoxilina, desidratados em concentrações crescentes de etanol e imersos em xilol. As lâminas foram montadas em *Entellan* (SEM, Hatfield, PA, EUA) e examinadas em um microscópio de luz modelo Olympus BX-60.

4.2.11 Extração de proteínas das GSMs

As amostras foram removidas do *RNA later* (Ambion Inc., Austin, TX, EUA) e trituradas em nitrogênio líquido até se reduzirem a pó com o *SKMill SK-100* (Tokken, Japão). Em seguida as amostras foram lisadas e homogeneizadas em 250 µl de tampão de lise *RIPA* (Santa Cruz Biotechnology sc-24948). O lisado foi centrifugado a 21700 x g 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C.

A concentração de proteína total das amostras foi determinada com o *BCA Protein assay Kit* (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA) de acordo com a metodologia recomendada pelo fabricante.

4.2.12 ELISA de TNF-α e HMGB1 em GSM

A partir da proteína extraída das amostras de GSM avaliamos as concentrações de HMGB1 e TNF-α, com os kits *HMGB1 Rat ELISA kit MBS 729203* (MyBioSource, Inc., San Diego, CA) e *Legend Max Rat TNF-α ELISA kit* (Biolegend, Inc., San Diego, CA), respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações destes marcadores de inflamação foram calculadas em relação à quantidade de proteína total presente em cada amostra, medida com o *kit BCA Protein Assay* (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

4.2.13 Análise Estatística

A análise estatística dos diferentes resultados foi realizada com análise de variância (ANOVA), com teste de Tuckey, utilizando-se o *software* Minitab 16. O nível de significância de 5% foi considerado para todas as comparações.

5 RESULTADOS

5.1 Fase 1

5.1.1 Análise dos parâmetros metabólicos

A observação fisiológica dos animais confirmou os sinais de diabetes nos animais que receberam a injeção de estreptozotocina. Polidipsia, poliúria e polifagia foram observadas em todos os animais diabéticos. A média de peso corporal dos ratos diabéticos diminuiu aproximadamente 8,6 % em relação ao peso inicial ($P < 0,05$) dos mesmos (Tabela 5.1). Trinta dias após a indução do diabetes, a glicemia em jejum dos animais diabéticos foi 3,28 vezes maior do que a dos controles ($P < 0,05$) (Tabela 5.1). A ILBP não alterou a glicemia dos animais irradiados.

Tabela 5.1 - Parâmetros metabólicos. Peso corporal e níveis de glicemia nos grupos C, D e DL (n=9), medidos 72 h após a indução do diabetes (inicial) e no dia da eutanásia (final). O DM resultou em aumento significativo da glicemia dos animais e em redução do peso corporal das ratas. A irradiação não alterou a glicemia dos animais irradiados. (*p < 0,05) vs. Grupo C; # p < 0,05) vs. tempo inicial para o mesmo grupo). Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão

Grupo	Peso corporal (g)		Glicemia (mg/dl)	
	Inicial	Final	Inicial	Final
C	200 ± 11	229 ± 27 #	130 ± 23	151 ± 29
D	210 ± 13	191 ± 23 *	474 ± 122 *	496 ± 95 *
DL	205 ± 12	188 ± 18 *	446 ± 126 *	375 ± 158 *

5.1.2 Análise das vias de sinalização de inflamação, proliferação e apoptose

A estrutura da glândula submandibular foi examinada com hematoxilina e eosina em microscopia de luz para avaliar possíveis alterações morfológicas. O grupo controle apresenta a típica característica das unidades secretoras terminais e ductos (Figura 5.1 A). No grupo diabético, o tamanho das unidades secretoras terminais parecem diminuídas, sugerindo uma atrofia acinar (Figura 5.1 B). A ILBP parece atenuar esta alteração morfológica (Figura 5.1 C)

No presente estudo, a presença da proteína HMGB1 pode ser observada em coloração marrom fortemente marcada em núcleo de células dos ductos, estriado e excretor, em GSM de animais diabéticos, além de células endoteliais (Figura 5.1 E e F). No grupo controle, a marcação é menos intensa, aparecendo apenas no núcleo de algumas células do ducto excretor (Figura 5.1 D). Adicionalmente, os níveis de mRNA de RAGE e HMGB1 sofreram tendência de aumento nos animais diabéticos (Figura 5.2). A ILBP parece reduzir a transcrição de HMGB1 e RAGE (Figura 5.2), e tende a diminuir o acúmulo de HMGB1 neste tecido (Figura 5.3).

Figura 5.1 - A, B e C: Morfologia da GSM do grupo controle (C), diabético (D) e diabético tratado com laser (DL). Em B, o tamanho dos ácinos, no grupo D, aparenta estar diminuído em relação aos dos grupos C e DL. D, E e F: Análise imuno-histoquímica para HMGB1 nos grupos C, D, DL (n=1). Em D, marcação menos intensa, em alguns núcleos de células do ducto excretor e estriado no grupo controle. Em E, a localização de HMGB1 foi observada em coloração marrom intensa em núcleos de células do ducto estriado no grupo diabético (setas). Em F, marcação em núcleo de células do ducto excretor (DE), estriado (DS) e células endoteliais no grupo diabético irradiado. DI, ducto intercalar; DE, ducto excretor; DS, ducto estriado; DG, ducto granuloso; VS, vaso sanguíneo. Barra com 50 μ m

Figura 5.2 - Expressão relativa de mRNA via qRT-PCR (n=1). Duas análises independentes foram realizadas com triplicata amostral e, a média e a expressão relativa dos genes foram calculadas em relação à expressão de β -actina para cada amostra

Figura 5.3 - ELISA de HMGB1 (n=1) indica um aumento dos níveis de HMGB1 no grupo D em relação ao controle, com redução desta expressão no grupo DL

Figura 5.4 - Análise imuno-histoquímica de AGE (A-C) e RAGE (D-F). Em A, ausência de marcação no grupo controle (C). Em B, marcação intensa no citoplasma de células do ducto estriado (setas) e excretor. Em C, marcação menos intensa em células do ducto excretor. Em D, ausência de marcação para RAGE no grupo controle. Em E, marcação intensa em citoplasma de células do ducto estriado e intercalar (setas). Em F, marcação menos intensa em células do ducto excretor. DI, ducto intercalar; DE, ducto excretor; DS, ducto estriado. Escala de 50 µm

Figura 5.5 - A-C: Imuno-histoquímica para NFκB fosforilado para os grupos C, D e DL (n=1). Em A, ausência de marcação. Em B, marcação em cor acastanhada em células do ducto estriado (seta). Em C, ausência de marcação. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado. Escala de 50 μm. D: Análise de Western blotting para marcadores de inflamação, HMGB1, AGE, RAGE e NFκB fosforilado e marcadores de apoptose bax, p53 fosforilado na Ser 15, p53, e caspase-3. O peso molecular das proteínas estudadas foi avaliado com um marcador padrão, sendo: HMGB1 (25 kDa), AGE (não-especificado), RAGE (46 kDa), NFκB fosforilado (65 kDa), bax (21 kDa), p53 fosforilado (53 kDa), p53 (53 kDa), caspase-3 clivada (17-19 kDa) e β-actina (42 kDa)

A análise imuno-histoquímica de AGE, RAGE (Figura 5.4) mostra a localização destes marcadores inflamatórios no citoplasma de ductos intercalares, estriados e excretorios nos animais diabéticos, com ausência de marcação nos controles. Da mesma forma, o fator de transcrição NFκB foi localizado em células do ducto estriado nos animais do grupo D, com ausência de marcação nos grupos C e DL (Figura 5.5).

Na análise de Western blotting para a via de sinalização de RAGE e de seus ligantes, observa-se que a ILBP diminuiu os marcadores inflamatórios HMGB1, AGE e RAGE nos animais diabéticos (grupo D), possivelmente regulando a ativação de NFκB (Figura 5.5 D). A expressão de proteínas pró-apoptóticas como bax, p53 fosforilado na Ser 15, uma etapa inicial na ativação da p53 intranuclear (130), e caspase-3 clivada também parece sofrer aumento na GSM de ratas diabéticas (grupo D) e tende a diminuir após a irradiação (grupo DL) (Figura 5.5).

A proteína inflamatória TNF-α e o marcador relacionado à apoptose via mitocondrial bad, foram localizados no citoplasma de ductos estriados nos animais diabéticos que não receberam a irradiação (grupo D), com ausência de marcação no grupo C, e pouca ou nenhuma marcação no grupo DL (Figura 5.6 C e F, respectivamente).

Figura 5.6 - Imuno-histoquímica para TNF- α (A-C) e bad (D-F) nas GSMs (n=1). Em A, ausência de marcação no grupo C. Em B, marcação em marrom acastanhado no citoplasma de células do ducto estriado (seta), no grupo D. Em C, marcação menos intensa em apenas algumas células do ducto estriado, no grupo DL. Em D, ausência de marcação para bad no grupo C. Em E, observou-se a localização de bad no citoplasma de células do ducto estriado (seta). Em F, ausência de marcação no grupo DL. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado. Escala com 50 μ m

Figura 5.7 - Imunomarcção para bax e caspase-3 clivada (n=1). Em A, ausência de marcação para bax no grupo controle. Em B, espécime do grupo diabético, mostrando marcação positiva no citoplasma de células do ducto estriado (seta). Em C, espécime do grupo diabético irradiado, com ausência de marcação. Em D, ausência de marcação para caspase-3 clivada no grupo controle. Em E, presença de marcação para caspase-3 clivada no citoplasma de células do ducto estriado, no grupo diabético (seta). Em F, marcação leve em algumas células do ducto excretor e estriado. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado. Barra com escala de 50 μ m

Figura 5.8 - Análise de TUNEL (n=1). Em A e C, ausência de corpos apoptóticos. Em B, em coloração marrom, há presença de células apoptóticas (seta). DE, ducto excretor; DS, ducto estriado. Barra com escala de 50 μ m

A figura 5.7 mostra a localização das proteínas pró-apoptóticas bax e caspase-3 clivada no citoplasma de algumas células dos ductos estriados da GSM do grupo diabético (D), com ausência de marcação positiva no grupo controle (C) e ausência de marcação para bax ou marcação leve para caspase-3 clivada em algumas células do ducto estriado e excretor no grupo diabético irradiado (DL). A análise de TUNEL indica a presença de células apoptóticas apenas nos animais diabéticos não-irradiados (D) (Figura 5.8).

A análise de dupla imunofluorescência para bax e HMGB1, mostra a co-localização destes marcadores em células endoteliais e em ductos, estriado e excretor, em GSM do grupo D. No grupo DL, esta marcação parece ter sido atenuada (Figura 5.9 C e F).

Figura 5.9 - Co-localização de bax e HMGB1 por dupla imunofluorescência (n=1). Bax em coloração verde. HMGB1 em coloração vermelha. Em A e D, presença de dupla marcação leve em ductos, estriado e excretor, bem como em células endoteliais. Em B e E, observamos a dupla marcação positiva intensa em células endoteliais e dos ductos, estriado e excretor. Em C e F, esta expressão foi atenuada pela irradiação com laser. DE, ducto excretor. DS, ducto estriado. EN, células endoteliais. Aumento original de 20X

A análise de imuno-histoquímica para cAMP e CREB, mostrou a localização do AMP cíclico no citoplasma de células do ducto estriado, principalmente no grupo DL (Figura 5.10 C). Da mesma forma, a proteína CREB fosforilada foi observada no núcleo de células dos ductos, no grupo controle e diabético, sendo adicionalmente expressa também em núcleo de células acinares, no espécime do grupo DL (Figura 5.10 F).

A análise de western blotting sugere uma diminuição de ciclina D1 e ERK fosforilado no grupo D, com aumento da expressão destas proteínas no grupo DL (Figura 5.11). A imunomarcação para ERK mostra sua presença apenas em células do ducto estriado no grupo DL (Figura 5.12 C). Já a localização de ciclina D1 pode ser observada em células dos ductos nos três grupos (Figura 5.12 D-F).

Figura 5.10 - Análise imuno-histoquímica para cAMP, CREB fosforilado (n=1). Em A, espécime do grupo controle, ausência de marcação para cAMP. Em B, espécime do grupo diabético, marcação leve no citoplasma de algumas células do ducto estriado. Em C, espécime do grupo diabético irradiado, marcação em citoplasma de células do ducto estriado (seta). Em D, marcação leve de CREB fosforilado em alguns núcleos de células do ducto estriado, no grupo controle. Em E, presença de CREB fosforilado em alguns núcleos do ducto estriado e excretor, no grupo diabético. Em F, marcação abundante em núcleo de células acinares e dos ductos estriados (seta), no grupo diabético irradiado. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado. Barra com escala de 50 μ m

Figura 5.11 - Análise de Western blotting para ciclina D1, ERK fosforilado e ERK total (n=1). Da esquerda para a direita: controle (C), diabético (D) e diabético com laser (DL). O tamanho das proteínas foi avaliado com marcador padrão, sendo: ciclina D1 (36 kDa), ERK fosforilado (42,44 kDa) e ERK total (42,44 kDa)

Na dupla imunofluorescência para ERK e CREB fosforilado observa-se dupla marcação positiva em células dos ductos, estriado e excretor, no espécime do grupo DL (Figura 5.13 C e F), enquanto pouca marcação foi observada nos ductos estriados no grupo D (Figura 5.13 B e E). Nossos resultados da fase 1 sugerem um mecanismo de ação para o laser ilustrado na Figura 5.14.

Figura 5.12 - Análise imuno-histoquímica para ERK fosforilado e ciclina D1 (n=1). Em A, espécime do grupo controle, ausência de marcação para ERK. Em B, espécime do grupo diabético, ausência de marcação. Em C, marcação positiva para ERK fosforilado, em coloração acastanhada, em núcleo de células do ducto estriado (seta). Em D, marcação leve para ciclina D1, em alguns núcleos de células do ducto excretor (seta), no grupo controle. Em E, marcação leve, em células do ducto estriado, no grupo diabético. Em F, marcação em núcleo de células do ducto estriado (seta), no grupo diabético irradiado. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado. Barra com escala de 50 μ m

Figura 5.13 - Dupla imunofluorescência para CREB e ERK (n=1). Em A e D, espécime do grupo controle, co-localização de CREB e ERK fosforilados em células do ducto estriado e excretor. Em B e E, espécime do grupo diabético, dupla marcação foi observada em células do ducto excretor, com pouca marcação em ducto estriado. Em C e F, espécime do grupo diabético irradiado, co-localização de ERK e CREB fosforilados em células do ducto estriado e excretor. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado. Aumento original de 20X

Figura 5.14 - Mecanismo de ação proposto para a ILBP em GSM de ratas diabéticas. Diabetes resulta em aumento de marcadores de inflamação, como HMGB1 e AGE. A ILBP pode diminuir a expressão destes marcadores e consequentemente, sua interação com o receptor RAGE, diminuindo a fosforilação de NF κ B e sua translocação para o núcleo, onde este fator regula a transcrição de marcadores inflamatórios tais como, TNF- α , HMGB1 e RAGE, alimentando de forma contínua o estado de inflamação. A ILBP pode diminuir a apoptose através da redução da expressão de TNF- α , bax e bad, consequentemente diminuindo a formação de caspase-3 clivada. Além disso, a ILBP pode aumentar a concentração de cAMP, estimulando a fosforilação de CREB na Ser 133, que juntamente com ERK, resultaria no acúmulo de ciclina D1 e favoreceria a proliferação celular

5.2 Fase 2

5.2.1 Análise dos parâmetros metabólicos

A análise da glicemia com glicosímetro (Figura 5.15) mostra que a glicemia dos controles apresentou uma média de 89 ± 4 mg de glicose/dl de sangue, aumentando cerca de 4,6 vezes nos animais diabéticos, para 412 ± 83 mg/dl, após 72 h de indução com estreptozotocina ($p < 0,05$). A ILBP, no entanto, reduziu a glicemia dos animais diabéticos irradiados (grupo DL) em 31,1% quando comparado aos diabéticos não-irradiados, atingindo uma média de 250 ± 76 mg/dl ($p < 0,05$). Esta redução foi de 27% quando comparamos os níveis de glicemia inicial e final do grupo DL ($p < 0,05$).

A análise da glicemia, no 30º dia experimental, através do método bioquímico da PGO (Figura 5.16), também mostrou uma redução da glicemia após ILBP nos animais diabéticos. Os animais diabéticos apresentaram média de glicemia de 306 ± 71 mg de glicose/dl de sangue, aproximadamente 2,3 vezes maior do que a média dos animais controles, a qual foi de 129 ± 13 mg de glicose/dl de sangue ($p < 0,05$). E, após a irradiação, a glicemia dos animais irradiados diminuiu 33,6% em relação aos diabéticos não-irradiados, resultando em uma média de 203 ± 71 mg de glicose/dl de sangue ($p < 0,05$).

Figura 5.15 - Glicemia em jejum (mg de glicose/dl de sangue), aferida com glicosímetro 72h após a indução do diabetes e no 30º dia. O DM resultou em aumento significativo da glicemia dos animais induzidos (D e DL) em relação ao grupo controle (C). A ILBP diminuiu significativamente a glicemia dos animais irradiados (DL). (*p < 0,05 vs. Grupo C; # p < 0,05 vs. Grupo D, dentro do mesmo tempo experimental e vs Grupo DL inicial). Grupo C n=10, grupo D n=7, e grupo DL n=8. Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão

Figura 5.16 - Glicemia em jejum (mg/dl), aferida pelo método bioquímico da PGO no 30º dia (eutanásia). O DM resultou em aumento significativo da glicemia dos animais induzidos (D e DL) em relação ao grupo controle (C). A ILBP diminuiu significativamente a glicemia dos animais irradiados (DL). (*p < 0,05 vs. Grupo C; # p < 0,05 vs. Grupo D). Grupo C n=10, grupo D n=7, e grupo DL n=8. Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão

Quanto ao peso corporal dos animais durante o período experimental (Figura 5.17), observamos que, no dia primeiro, os animais dos três grupos apresentavam valores de peso corporal semelhantes entre si, sendo controles (C) com 186 ± 5 g, diabético (D) 204 ± 11 g e diabético irradiado (DL) com 198 ± 8 g. No 29º dia, o peso corporal médio dos diabéticos (D e DL) diminuiu consideravelmente em relação ao dos controles (C), 25,1% menor no grupo D e 23,4% menor no grupo DL, 160 ± 22 g e 164 ± 24 g, respectivamente ($p < 0,05$). No 30º dia, após 12 h de jejum, todos os animais perderam em média 15 g, mas isto não foi estatisticamente significativo. Desta forma, no 30º dia, todos os diabéticos apresentaram redução do seu peso corporal em relação aos seus respectivos pesos iniciais, 141 ± 15 g no grupo D e 150 ± 35 g no grupo DL, correspondente a 69% e 75% da média de seu peso inicial, respectivamente ($p < 0,05$).

Figura 5.17 - Peso corporal (g). Os animais foram pesados no dia 1º, 29º no 30º dia (eutanásia). O DM resultou em diminuição significativa do peso corporal dos animais induzidos (D e DL) em relação ao grupo controle (C) no 29º e 30º dias. Os animais diabéticos (D e DL) em seu 30º dia apresentaram redução de peso significativa em relação aos seus respectivos pesos iniciais. A irradiação com o laser de baixa potência não teve influência sobre o peso dos animais irradiados (DL). (* $p < 0,05$ vs. Grupo C no mesmo tempo experimental; # $p < 0,05$) vs. tempo inicial para o mesmo grupo). Grupo C $n=10$, grupo D $n=7$, e grupo DL $n=8$. Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão

A quantidade de proteína total no plasma medido com o kit de BCA, revelou que nos animais diabéticos (grupos D e DL) houve diminuição de 29,4% na quantidade de proteínas totais presentes no plasma em relação à encontrada nos controles (C) ($p < 0,05$), sendo $2,07 \pm 0,11$ mg/ml, $1,46 \pm 0,21$ mg/ml e $1,46 \pm 0,14$ mg/ml nos grupos C, D e DL, respectivamente (Figura 5.18).

Figura 5.18 - Quantificação das proteínas totais presentes no plasma do grupo controle (C), diabético (D) e diabético irradiado (DL) em mg de proteína total/ ml de plasma sanguíneo. O DM resultou em diminuição significativa das proteínas totais no plasma dos animais induzidos com estreptozotocina (D e DL), em relação ao grupo controle (C). (*p < 0,05) vs. Grupo C). Grupo C n=10, grupo D n=7, e grupo DL n=8. Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão

Visto que a ILBP teve uma forte influência na redução dos valores de glicemia nas ratas diabéticas irradiadas, investigamos as possíveis alterações nos níveis de insulina e de HMGB1 no sangue destes animais com o teste de ELISA. Nossos achados indicam que os níveis de insulina nos três grupos foram similares, sendo sua média de $0,21 \pm 0,05$ ng/mg de proteína total no grupo controle (C), $0,32 \pm 0,11$ ng/mg no grupo diabético (D) e $0,29 \pm 0,13$ ng/mg no grupo diabético irradiado (DL) (Figura 5.19). Em relação aos níveis de HMGB1 no plasma (Figura 5.20), o DM resultou em um aumento de 47,4% nos níveis de HMGB1, $12,8 \pm 1,3$ ng/mg de proteína total no grupo D, em relação ao controle com $8,6 \pm 0,94$ ng/mg ($p < 0,05$). A ILBP não alterou a quantidade de HMGB1 presente no plasma dos animais irradiados, $12,9 \pm 1,8$ ng/mg.

Figura 5.19 - Níveis de insulina medidos com ELISA, em ng/mg de proteína total presente no sangue. Não houve diferença significativa entre os níveis de insulina nos três grupos, controle (C), diabetes (D) e diabetes com laser (DL). Grupo C n=10, grupo D n=7, e grupo DL n=8. Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão

Figura 5.20 - Níveis de HMGB1 medidos com ELISA, em ng/mg de proteína total presente no plasma. O DM levou ao aumento significativo dos níveis de HMGB1 no plasma dos animais induzidos (D e DL). A ILBP não alterou os níveis plasmáticos deste marcador inflamatório (DL). (* $p < 0,05$ vs. Grupo C). Grupo C $n=10$, grupo D $n=7$, e grupo DL $n=8$. Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão

Relacionando nossos dados de glicemia, via método bioquímico da PGO, com os valores de insulina obtidos com o teste de ELISA, utilizamos o Modelo de avaliação da homeostase (25) para estimar a resistência à insulina (HOMA-IR), sensibilidade à insulina (HOMA-IS) e função das células beta (HOMA- β).

Os valor médio de HOMA-IR calculado para as ratas do grupo controle (C) foi de $4,19 \pm 1,4$, enquanto nos diabéticos (D) este valor foi 2,35 vezes maior, com média de $9,88 \pm 2,3$ ($p < 0,05$). A diminuição do HOMA-IR foi observado no grupo diabético que recebeu a irradiação com o laser (DL) ($p < 0,05$), com média de $6,23 \pm 3,1$, similar ao valor encontrado no grupo controle (Figura 5.21).

Figura 5.21 - HOMA-IR dos animais do grupo controle (C), diabético (D) e diabético com laser (DL). O DM levou ao aumento significativo do HOMA-IR no grupo não-irradiado (D). A ILBP nos animais diabéticos reduziu estes valores para níveis similares aos encontrados nos controles. (*p < 0,05 vs. Grupo C; # p < 0,05 vs. grupo D). Grupo C n=10, grupo D n=7, e grupo DL n=8. Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão

O HOMA-IS dos animais normais, grupo controle (C), teve média de $6,37 \pm 1,6$. O DM resultou em queda de 58,5% deste valor para $2,64 \pm 0,74$ no grupo D ($p < 0,05$). Após a ILBP, estes valores aumentaram nos animais diabéticos (DL), com média de $5,36 \pm 3,9$, similar à encontrada nos controles (Figura 5.22).

Figura 5.22 - HOMA-IS dos animais do grupo controle (C), diabético (D) e diabético com laser (DL). O DM levou a uma diminuição significativa do HOMA-IS no grupo não-irradiado (D). A ILBP no grupo DL aumentou estes valores para níveis similares aos encontrados nos controles. (* $p < 0,05$ vs. Grupo C). Grupo C $n=10$, grupo D $n=7$, e grupo DL $n=8$. Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão

A função de células beta (HOMA- β) de animais normais, grupo controle, teve média de $2,05 \pm 0,4$. A indução de diabetes com estreptozotocina resultou em queda deste valor para 53,65% em relação ao grupo controle, com média de $0,95 \pm 0,4$ no grupo D ($p < 0,05$). O laser aumentou o HOMA- β dos animais irradiados em 48,4%, com valor médio de $1,41 \pm 0,77$ no grupo DL, similar ao grupo controle (Figura 5.23).

Figura 5.23 - HOMA- β dos animais do grupo controle (C), diabético (D) e diabético com laser (DL). O DM levou a uma diminuição significativa do HOMA- β no grupo não-irradiado (D). A ILBP no grupo DL aumentou estes valores para níveis similares aos encontrados nos controles (DL). (*p < 0,05 vs. Grupo C). Grupo C n=10, grupo D n=7, e grupo DL n=8. Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão

5.2.2 Análise das vias de sinalização de inflamação, proliferação e apoptose

Em microscopia de luz, não observamos diferenças entre os três grupos, todos com características normais de GSM (Figura 5.24 A-C). Não há indícios de atrofia acinar, bem como aumento de tecido conjuntivo ao redor dos ácinos, infiltrado inflamatório ou presença de corpos apoptóticos.

Figura 5.24 - A-C: Microscopia de luz com hematoxilina e eosina (n=3) mostra uma morfologia normal de GSM, sem diferenças entre os grupos controle (C), diabético (D) e diabético com laser (DL), não há presença de infiltrado inflamatório ou sinais de apoptose. D-F: Imunomarcacão para HMGB1 (n=3). Em D, espécime do grupo controle, marcação leve em núcleo de células dos ductos, estriado e excretor, com presença de HMGB1 também em tecido conjuntivo perivascular. Em E, espécime do grupo diabético, marcação intensa para HMGB1 em células endoteliais (seta) e no tecido conjuntivo adjacente, além de núcleos de células dos ductos, excretor e estriado. Em F, espécime do grupo diabético irradiado, marcação em células do endotélio (seta) e do tecido conjuntivo perivascular, bem como núcleos dos ductos, estriado e excretor. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado; VS, vaso sanguíneo. Escala de 50 μ m

O HMGB1 foi localizado principalmente no núcleo de células endoteliais dos animais diabéticos, bem como em células do tecido conjuntivo perivascular adjacente (Figura 5.24 E e F). Observamos também a presença de marcação em núcleo de células do ducto excretor e estriado em todos os grupos (Figura 5.24 D-F)

Nossos achados mostram que o DM resultou em aumento deste marcador inflamatório no grupo D quando comparado com o grupo C, sendo os valores médios de $15,06 \pm 13,7$ ng/mg de proteína e $0,09 \pm 0,02$ ng/mg de proteína para o grupo D e C, respectivamente ($p < 0,05$). A ILBP reduziu estes níveis de HMGB1 nos animais diabéticos em 96,6%, para o valor médio de $0,5 \pm 0,24$ ng/mg de proteína no grupo DL, similar ao encontrado no grupo controle (C) (Figura 5.25).

Figura 5.25 - ELISA de HMGB1 para quantificação desta proteína em GSM dos animais do grupo controle (C), diabético (D) e diabético com laser (DL). O DM levou ao aumento significativo dos níveis de HMGB1 em GSM no grupo não-irradiado (D). A ILBP reduziu esta alteração nos diabéticos irradiados (DL) para níveis similares aos encontrados nos controles (C). (* $p < 0,05$ vs. Grupo C). Grupo C n=4, grupo D n=5, e grupo DL n=5. Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão

Da mesma forma, os níveis de TNF- α nos animais diabéticos (grupo D) atingiram uma média de $3,23 \pm 1,2$ pg/mg de proteína total, o que corresponde ao aumento de 2,5 vezes em relação ao grupo controle (C), $1,28 \pm 0,6$ pg/mg de proteína ($p < 0,05$). Após a ILBP, estes níveis reduziram 31,57% em relação aos do

grupo D, com média de $2,21 \pm 0,78$ pg/mg no grupo DL, similar ao valor médio do grupo controle (Figura 5.26).

Figura 5.26 - ELISA de TNF- α para quantificação deste marcador inflamatório em GSM dos animais do grupo controle (C), diabético (D) e diabético com laser (DL). O DM levou ao aumento significativo dos níveis de TNF- α em GSM no grupo não-irradiado (D). A ILBP reduziu esta alteração para níveis similares aos encontrados nos controles (DL). (*p < 0,05 vs. Grupo C). Grupo C n=6, grupo D n=6, e grupo DL n=7. Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão

A imunomarcagem para RAGE mostrou sua localização em células acinares, células dos ductos excretor, estriado e granuloso; bem como em células endoteliais e do tecido conjuntivo perivascular nos três grupos, sendo mais intenso nos animais diabéticos (Figura 5.27 A, B e C).

A análise imuno-histoquímica para NF κ B fosforilado indica sua presença em alguns núcleos e citoplasmas apenas de células do ducto excretor e no tecido conjuntivo perivascular no grupo C (Figura 5.27 D). Sendo visualizado, de forma mais intensa, também em núcleo e citoplasma de células dos ductos, estriado e granuloso, e tecido conjuntivo perivascular nos animais diabéticos, grupos D e DL (Figura 5.27 E e F).

Figura 5.27 - Imuno-histoquímica para RAGE e NFkB fosforilado (n=3). Em A, espécime do grupo controle, marcação leve para RAGE em núcleo de algumas células acinares, bem como do ducto excretor e estriado, além de tecido conjuntivo perivascular. Em B, marcação positiva intensa, em marrom, em núcleos de células acinares, citoplasma e núcleo de células dos ductos, estriado e excretor, células endoteliais e em tecido conjuntivo. Em C, marcação positiva em células endoteliais e do tecido conjuntivo perivascular, bem como, em citoplasma e núcleo de células dos ductos, excretor e estriado, além de alguns núcleos de células acinares. Em D, marcação leve para NFkB fosforilado em núcleo de algumas células do ducto excretor e tecido conjuntivo perivascular. Em E, marcação intensa, em citoplasma e núcleo de células do endotélio, dos ductos excretor (seta), estriado e granuloso, bem como no tecido conjuntivo. Em F, marcação mais leve, em núcleo de células dos ductos estriado e excretor, e tecido conjuntivo perivascular. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado; DG, ducto granuloso; VS, vaso sanguíneo. Escala de 50 μ m

Figura 5.28 - Imuno-histoquímica para TNF- α e bax (n=3). Em A, espécime do grupo controle, ausência de marcação para TNF- α . Em B, espécime do grupo diabético, marcação intensa em citoplasma de células do ducto estriado (seta) e excretor (seta), bem como em tecido conjuntivo. Em C, espécime do grupo diabético irradiado, marcação leve em citoplasma de células do ducto estriado e tecido conjuntivo perivascular. Em D, marcação leve em tecido conjuntivo perivascular. Em E, marcação intensa em citoplasma de células acinares, em ductos, excretor e estriado, além de endotélio e células do tecido conjuntivo perivascular. Em F, marcação leve em citoplasma de ácinos e ductos. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado; DG, ducto granuloso; VS, vaso sanguíneo. Escala de 50 μ m

Figura 5.29 - Imuno-histoquímica para ciclina D1 (n=3) e caspase-3 clivada (teste). Em A, espécime do grupo controle, marcação positiva em núcleo de células do ducto excretor (seta). Em B, marcação positiva em alguns núcleos de células do ducto excretor (seta). Em C, marcação em vários núcleos de células do ducto excretor (seta). Em D, ausência de marcação para caspase-3 clivada. Em E, ausência de marcação. DE, ducto excretor; DS, ducto estriado; DG, ducto granuloso; VS, vaso sanguíneo. Escala de 50 μ m

A imunomarcação para TNF- α não foi observada no grupo C (Figura 5.28 A), no entanto, houve marcação positiva em alguns núcleos e citoplasmas de células do ducto excretor e estriado, bem como no tecido conjuntivo dos animais do grupo D (Figura 5.28 B), e marcação leve em citoplasma de algumas células do ducto estriado e tecido conjuntivo no grupo DL (Figura 5.28 C).

A localização de bax apresentou-se com marcação leve no tecido conjuntivo ao redor dos vasos sanguíneos, no grupo C (figura 5.28 D), observada principalmente no citoplasma de células de ácinos e ductos, estriado e excretor, bem como no citoplasma de células do tecido conjuntivo perivascular e endotélio, nos grupos D e DL (Figura 5.28 E e F). Na imunomarcação para ciclina D1, verificamos sua presença em núcleo de células do ducto excretor, nos três grupos (Figura 5.29 A-C). Não houve marcação positiva para caspase-3 clivada nos grupos C e D (Figura 5.29 D e E), portanto, não realizamos esta análise para os outros espécimes.

6 DISCUSSÃO

Na fase 1 do nosso estudo, embora houve tendência de redução da glicemia dos animais diabéticos irradiados, esta redução não foi estatisticamente significativa. Uma medida adotada na fase 2, foi realizar o jejum dos animais trocando as gaiolas dos mesmos, para evitar que restos de ração caídos no interior da gaiola pudessem alterar estes valores. Nossos achados mostraram, na fase 2, que a ILBP pôde diminuir significativamente a glicemia das ratas diabéticas, aferida com glicosímetro e pelo método bioquímico da PGO. Este achado foi consistente com o relatado por Simões et al. (3) e Ibuki et al. (123), onde a irradiação com 20 J/cm² também resultou em diminuição da glicemia final em relação à inicial, aferida com glicosímetro. Da mesma forma, outro trabalho do nosso grupo relatou redução da glicemia com irradiação de 5 J/cm² (125).

No entanto, não houve alteração nos níveis de insulina no sangue, os quais foram semelhantes entre os animais controles e diabéticos. Isto pode ser devido ao fato de que, em roedores, as fêmeas são menos susceptíveis à indução de diabetes com ETZ do que os machos (131, 132), pois o hormônio estradiol nas fêmeas tem efeito protetor, sobre as células beta do pâncreas, contra à apoptose induzida por estresse oxidativo (133). Da mesma forma, a perda de peso corporal relacionada com a indução de DM é menor em fêmeas do que em machos (134). Portanto, dependendo da dose, espécie, idade, sexo, entre outros fatores, a ETZ pode induzir um estado de DM dependente de insulina, semelhante ao DM1, pela completa destruição de células beta pancreáticas, ou pode desenvolver uma resistência à insulina periférica e alterar a secreção de insulina no pâncreas, semelhante ao DM2, DM não-dependente de insulina (135).

A redução na glicemia pode estar correlacionada com a diminuição da resistência à insulina (HOMA-IR) e com a melhora da sensibilidade à insulina (HOMA-IS) e função de células beta (HOMA- β) nas ratas diabéticas irradiadas com o laser.

O modelo de análise da homeostase (25) é derivado de um cálculo matemático para acessar o balanço entre a produção de glicose hepática e a secreção de insulina através da avaliação dos níveis de glicose e de insulina em jejum (136), uma medida menos cara e invasiva, mas validada para seres humanos, quando

comparado ao “padrão-ouro”, que consiste no clamp euglicêmico hiperinsulinêmico e clamp hiperglicêmico (137, 138). Atualmente, não existem medidas padrões para estes valores em roedores, no entanto, muitos estudos utilizam este modelo para acessar a resistência à insulina e sensibilidade a este hormônio, com base em valores comparativos de um grupo controle, com animais considerados normais (139-141).

Sabe-se que RAGE e seus ligantes são modulados pelos níveis de glicose no sangue, e o controle da glicemia reduz esta via de sinalização (38, 142). Vários estudos mostraram uma relação entre glicemia e os níveis destes marcadores inflamatórios, bem como as complicações deles decorrentes (32, 48, 143). Um estudo com camundongos com deleção de HMGB1 sistêmico, observou morte de todos os recém-nascidos devido à hipoglicemia letal (144).

Curiosamente, nossos achados mostraram que após a ILBP houve redução significativa da glicemia, sem alteração dos níveis de HMGB1 no plasma. Ingels et al., também relataram que o controle glicêmico com insulina, em pacientes com doenças graves, internados ao longo de sete dias, não pôde reduzir os altos níveis de HMGB1 presentes no sangue destes pacientes (145). Indicando que, provavelmente, há outras moléculas que participam do mecanismo que regula a glicemia nos animais tratados com ILBP.

Sabe-se que o IGF-I, polipeptídio encontrado no plasma, é sintetizado e expresso em glândulas salivares de roedores (146, 147) e seres humanos (148). Além disso, sabe-se que ele pode desempenhar funções semelhantes à insulina, como estimulação da translocação dos transportadores de glicose 4 (*Glucose transporter 4* - GLUT4) para a membrana plasmática, com consequente transporte de glicose (149). No entanto, em jejum, seus níveis no sangue diminuem consideravelmente (150). Um estudo do nosso grupo mostrou que as alterações na glicemia das ratas após a ILBP, não teve relação com as concentrações de IGF-1 em glândulas salivares, parótidas e GSM (125).

Algumas das hipóteses que poderiam explicar as alterações na glicemia observada neste estudo têm como base o mecanismo de regulação da homeostase de glicose no sangue através do sistema nervoso central. O hormônio leptina, é conhecido por regular a glicemia, através de neurônios localizados no hipotálamo, que regulam a sensibilidade à insulina em tecidos periféricos (151). A atividade de alguns destes neurônios pode ser modulada, através de canais de potássio

sensíveis ao ATP, que atuam como um sensor nutricional que inibe a gluconeogênese hepática, diminuindo assim a glicemia (152). É possível que a ILBP na região das GSMs possa ter alterado a atividade de neurônios que passam nesta região. Um estudo mostrou que a ILBP pode ativar os canais de potássio sensíveis ao ATP em cultura de células embrionárias do rim (153). Além disso, há presença de leptina em ductos intralobulares de GSM e parótida em seres humanos, com presença deste hormônio também na saliva destes pacientes, o que pode indicar um mecanismo de secreção de leptina através das glândulas salivares (154). No entanto, sabe-se que este hormônio sofre redução no estado de jejum (155), e os efeitos da ILBP sobre a secreção ou presença de leptina nas glândulas salivares ainda são desconhecidos.

Atualmente, têm se propagado uma terapia chamada ILIB (*Intravascular Laser Irradiation of Blood* – ILIB), reportada primeiramente na Rússia, trata-se de uma terapia que propõe irradiar veias de pacientes com laser na faixa de comprimento de onda de 450-850 nm, via transcutânea ou intravenosa, para tratamentos de distúrbios sistêmicos (156). Um estudo recente com ILIB em pacientes diabéticos mostrou redução significativa da glicemia dos pacientes irradiados, alterando a presença de metabólitos no plasma, relacionados às vias de metabolismo de carboidratos (157). Esta terapia parece aumentar a oxigenação do sangue, melhorando o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial em células sanguíneas, possivelmente alterando as funções das mesmas (158).

O aumento de AGE é encontrado no plasma e em tecidos no processo de envelhecimento, com formação e deposição acelerada no estado de diabetes (159, 160). Quando intracelular, AGE pode resultar em estresse do retículo endoplasmático, alterando o metabolismo celular e ativando vias de sinalização pró-apoptóticas (161, 162). Fora da célula, AGE pode se ligar ao seu receptor RAGE, desencadeando uma cascata de sinalização para inflamação (163).

RAGE é um receptor expresso em células do endotélio, do músculo liso, de neurônios motores, corticais e periféricos, células mononucleares, miócitos cardíacos e pulmonares (164). A ativação de RAGE pela ligação com AGE pode induzir a expressão de VEGF e da molécula de adesão vascular 1 (*Vascular cell adhesion molecule 1*- VCAM 1), aumentando a permeabilidade vascular, angiogênese e inflamação (165). Nossos achados mostram a localização de RAGE em células dos ductos da SMG, além de marcação em células endoteliais.

Os níveis de HMGB1, outro ligante de RAGE, aumentaram no plasma das ratas diabéticas, esta proteína também foi observada em células endoteliais e em núcleo de ductos em SMG. Através de sua ligação com RAGE, HMGB1 pode ativar as células endoteliais, aumentando a expressão de moléculas para adesão de leucócitos, como ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1* - ICAM-1) e VCAM-1, secretando quimiocinas que atraem neutrófilos e monócitos, tais como IL-8 e MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein 1*- MCP-1), produzindo TNF- α , aumentando a expressão do próprio RAGE e secretando moléculas que regulam o processo de fibrinólise, rompendo a barreira de integridade do endotélio (166, 167). Enquanto a presença de HMGB1 extracelular tem efeito inflamatório, sua localização intracelular, favorece a sobrevivência da célula. No núcleo, HMGB1 regula a expressão de Hsp27 (*Heat shock protein 27*- Hsp 27), conhecida por regular o citoesqueleto e a dinâmica do processo de autofagia celular e mitocondrial (mitofagia), modulando a respiração mitocondrial através da remoção de macromoléculas ou organelas danificadas por estresse celular ou injúria (168).

Nosso estudo foi o primeiro a investigar a função de HMGB1/AGE/RAGE em glândulas salivares de ratas diabéticas, bem como possíveis vias que podem levar às complicações do DM neste tecido. Ao tratar nosso modelo experimental de diabetes com laser, também sugerimos algumas hipóteses das vias envolvidas nos efeitos da irradiação, as quais podem amenizar as alterações causadas pelo DM nestas glândulas.

O diabetes gerou um estado de hiperglicemia crônica, aumentando a expressão de RAGE e de seus ligantes, HMGB1 e AGE, ativando a cascata de sinalização do NF κ B na GSM. A hiperglicemia aumentou a expressão de RAGE, S100A8 (*S100 calcium-binding protein A8* – S100A8) e HMGB1 em células endoteliais da aorta tanto *in vitro* como *in vivo* (143). Yu *et al.* relataram que o acúmulo de AGE e maior expressão de RAGE, levou ao aumento de TNF- α e IL-1 β , favorecendo apoptose em células cardíacas de ratos diabéticos induzidos por ETZ (48). Alves *et al.* encontraram uma grande expressão de AGE, RAGE e NF κ B em glândulas lacrimais de ratos diabéticos em relação ao controle (169). Juntos, estes dados indicam que o DM aumenta a via de sinalização AGE/HMGB1/ RAGE, com ativação do fator de transcrição NF κ B, e que estes fatores estão relacionados às complicações do DM nestes órgãos.

Ao contrário da ativação momentânea do NFκB na fase aguda de inflamação (170, 171), em desordens crônicas, observa-se que esta ativação via RAGE, ocorre de forma auto-sustentada, resultando em expressão ininterrupta do fator de transcrição NFκB, amplificando o sinal de inflamação (41, 172, 173). Nosso estudo mostra o aumento de expressão de HMGB1 e de TNF-α, ambos alvos do fator de transcrição NFκB (40).

Curiosamente, nosso estudo piloto sugere que a ILBP diminui a transcrição de HMGB1 e RAGE, reduzindo a expressão de AGE, RAGE, HMGB1 e TNF- α, bem como a ativação do NFκB em GSM de ratas diabéticas. Desta forma, o laser teria um potente efeito anti-inflamatório. Isto é consistente com relatos de que a irradiação com o laser inibiu citocinas pró-inflamatórias, ciclo-oxigenase, IL-1β e IL-6, em células-tronco humanas derivadas de adipócitos, através da regulação da translocação do NFκB, diminuindo sua atividade como fator de transcrição, possivelmente pela via do cAMP (173). Ling Zhang et al., reportaram que a terapia pode diminuir a via de sinalização do NFκB na membrana sinovial em um modelo animal de artrite reumatoide (174). Em síndrome da angústia respiratória, a LPLT foi capaz de inibir a transcrição de TNF-α, aumentando os níveis de cAMP em macrófagos alveolares (175).

A molécula de cAMP pode regular a atividade de Iκκ (*Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase- Iκκ*) e a degradação de IκB (*Inhibitor of nuclear factor kappa B- IκB*), bem como a composição do NFκB, e portanto, consegue inibir sua atividade como fator de transcrição (176). Nossos dados sugerem um aumento de cAMP após a irradiação dos animais diabéticos, com maior fosforilação de CREB após a laser terapia no grupo diabético. CREB foi originalmente descrito como um alvo da via do cAMP (104). A localização de CREB é quase exclusivamente nuclear, quando ativado, pela fosforilação na serina 133 (Ser 133), CREB interage com sua proteína coativadora, proteína ligante de CREB (*CREB-binding protein- CBP*), ou p300 para iniciar sua atividade como fator de transcrição (177). A ativação de CREB tem sido proposta como um inibidor da atividade de NFκB através de competição pela quantidade limitada de CBP/p300 (178, 179), já que esta interação também é necessária para a atividade otimizada de NFκB em alguns genes-alvo (180, 181).

CREB se liga ao DNA em sequências-alvo denominadas elementos responsivos ao cAMP (*Cyclic AMP response element - CRE*), como dímero, regulando diversas respostas celulares, incluindo proliferação, sobrevivência e

diferenciação (182). O acúmulo de cAMP pode levar à fosforilação de CREB na Ser 133 via ativação da proteína quinase A (*Protein kinase A*- PKA) (183). A ativação de PKA também media a fosforilação de ERK1/2 (183, 184).

Nossa análise de dupla imunofluorescência indica a mesma localização de CREB e ERK em glândulas salivares de animais diabéticos irradiados com laser, principalmente em células do ducto estriado e excretor. Foi reportado que a ERK ativado pode se translocar para o núcleo e indiretamente fosforilar CREB na Ser 133 (104). Kwon et al. mostraram que ambos CREB e ERK são necessários para a proliferação de fibroblastos (112). A ligação do ERK fosforilado à sequência-alvo no DNA denominada SER juntamente com a ligação de CREB fosforilado ao sítio CRE são necessárias para a ativação máxima do promotor c-fos e acúmulo de ciclina D1 (112).

Em suporte ao papel da ILBP na proliferação, a expressão de ciclina D1 foi induzida em células dos ductos de SMG em ratas diabéticas, após a ILBP. Em células satélite da glia, a LPLT também induziu a expressão de ciclina D1, juntamente com ciclina E e ciclina A *in vitro* (185). Shefer et al., reportaram o aumento de ciclina D1 após LPLT, possivelmente mediado pela ativação de ERK, estimulando a proliferação celular *in vitro* (186, 187). Embora nossos achados não mostram sinais de proliferação celular, sabe-se que em glândulas salivares há indícios de que em adultos, as células maduras são capazes de se dividir para manter o equilíbrio e função glandular (188, 189). Adicionalmente a este processo, existe também a diferenciação de células-tronco glandulares localizadas no ducto intercalar (190, 191).

Diabetes também pode levar à apoptose de células de ductos da GSM em ratos induzidos com ETZ (61). A hiperglicemia exacerba a oxidação de glicose e a produção de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria, o que causa danos ao DNA nuclear e contribui para acelerar o processo de apoptose (142, 192, 193). Há indícios de que o DM pode aumentar a expressão de bax, bad e caspase-3 clivada, bem como, a fosforilação de p53 na Ser 15, proteínas pró-apoptóticas. A morte celular por apoptose é acelerada em cardiomiopatia diabética (48, 194) e reparação de feridas em diabéticos (195). AGE também pode induzir apoptose mediada por caspases via TNF- α e estresse oxidativo em células-tronco da medula óssea (196). Nosso piloto sugere que a ILBP pode prevenir estas alterações em animais diabéticos.

A via de sinalização do ERK modula a atividade de muitas proteínas envolvidas na apoptose, incluindo bad, bax, bim, Mcl-1 (*Induced myeloid leukemia cell differentiation protein* – Mcl-1), caspase-9 e survivina (197-199). ERK também pode fosforilar bad abolindo seu efeito apoptótico, já que este forma complexo com proteínas 14-3-3 e permanece localizado no citoplasma (197). Bad promove apoptose evitando a interação de Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2* – Bcl-2) ou Bcl-XL (*B-cell lymphoma-extra large* - Bcl-XL), proteínas anti-apoptóticas, com bax, bloqueando assim sua translocação para o interior da mitocôndria (200). ERK também inibe a caspase-9 via fosforilação de T125, inibindo a ativação de caspase-3 e apoptose (201).

Nossos resultados sugerem um mecanismo no qual o diabetes pode ativar a via do NFkB através do aumento da expressão de TNF- α e HMGB1 nas GSMs. Também demonstramos pela primeira vez, o efeito anti-inflamatório da ILBP, possivelmente pela via do cAMP, reduzindo a TNF- α e HMGB1. Embora, o DM tenha causado um aumento na expressão de proteínas pró-apoptóticas nas glândulas salivares, mais estudos são necessários para avaliar se este tecido realmente sofre apoptose, já que nossos resultados mostram que não há evidências de corpos apoptóticos ou indícios de redução do estroma glandular. Da mesma forma, o ILBP ativou várias proteínas envolvidas no processo de proliferação, mas devemos ser cautelosos, e mais análises devem ser realizadas no intuito de verificar se estas alterações realmente se traduzem em proliferação.

7 CONCLUSÃO

Nossos achados mostram que a ILBP diminuiu a glicemia das ratas diabéticas irradiadas, melhorando a resistência à insulina (HOMA-IR), sensibilidade à insulina (HOMA-IS) e função de células beta (HOMA- β). Em GSM, o DM parece aumentar a expressão do eixo HMGB1/AGE/RAGE, possivelmente associado à ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF κ B). A ILBP reduziu os marcadores de inflamação, HMGB1 e TNF- α em GSM de ratas diabéticas, e parece regular a expressão de proteínas relacionadas à proliferação e à apoptose, pela via do AMP cíclico, parcialmente mediado por proteína kinase regulada por sinais extracelulares. No entanto, mais estudos são necessários para melhor entender os efeitos do laser neste tecido.

REFERÊNCIAS¹

1. Ship JA. Diabetes and oral health: an overview. J Am Dent Assoc. 2003;134 Spec No:4S-10S.
2. Simoes A, Platero MD, Campos L, Aranha AC, Eduardo Cde P, Nicolau J. Laser as a therapy for dry mouth symptoms in a patient with Sjogren's syndrome: a case report. Spec Care Dentist. 2009;29(3):134-7.
3. Simoes A, de Oliveira E, Campos L, Nicolau J. Ionic and histological studies of salivary glands in rats with diabetes and their glycemic state after laser irradiation. Photomed Laser Surg. 2009;27(6):877-83.
4. Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. J Investig Med. 2000;48(5):312-26.
5. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. J Prosthet Dent. 2001;85(2):162-9.
6. Roussa E. Channels and transporters in salivary glands. Cell Tissue Res. 2011;343(2):263-87.
7. Nagler RM. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. Oral Dis. 2002;8(3):141-6.
8. Siqueira WL, Nicolau J. Stimulated whole saliva components in children with Down syndrome. Spec Care Dentist. 2002;22(6):226-30.
9. Al-Maskari AY, Al-Maskari MY, Al-Sudairy S. Oral Manifestations and Complications of Diabetes Mellitus: A review. Sultan Qaboos Univ Med J. 2011;11(2):179-86.
10. Lakshman AR, Babu GS, Rao S. Evaluation of effect of transcutaneous electrical nerve stimulation on salivary flow rate in radiation induced xerostomia patients: a pilot study. J Cancer Res Ther. 2015;11(1):229-33.
11. Solans R, Bosch JA, Selva A, Simeon CP, Fonollosa V, Vilardell M. [Usefulness of oral pilocarpin therapy in the treatment of xerostomia and

xerophthalmia in patients with primary Sjogren's syndrome]. *Med Clin (Barc)*. 2004;122(7):253-5.

12. Miletich I. Introduction to salivary glands: structure, function and embryonic development. *Front Oral Biol*. 2010;14:1-20.

13. Katchiburian E, Arana-Chavez VE. *Histologia e embriologia oral*. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.

14. Lee MG, Ohana E, Park HW, Yang D, Muallem S. Molecular mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HCO₃ secretion. *Physiol Rev*. 2012;92(1):39-74.

15. Karbanova J, Missol-Kolka E, Fonseca AV, Lorra C, Janich P, Hollerova H, et al. The stem cell marker CD133 (Prominin-1) is expressed in various human glandular epithelia. *J Histochem Cytochem*. 2008;56(11):977-93.

16. Lombaert IM, Brunsting JF, Wierenga PK, Faber H, Stokman MA, Kok T, et al. Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands. *PLoS One*. 2008;3(4):e2063.

17. Gresik EW. The granular convoluted tubule (GCT) cell of rodent submandibular glands. *Microsc Res Tech*. 1994;27(1):1-24.

18. Nashida T, Sato R, Imai A, Shimomura H. Gene expression profiles of the three major salivary glands in rats. *Biomed Res*. 2010;31(6):387-99.

19. Sun QF, Sun QH, Du J, Wang S. Differential gene expression profiles of normal human parotid and submandibular glands. *Oral Dis*. 2008;14(6):500-9.

20. Tandler B. Introduction to mammalian salivary glands. *Microsc Res Tech*. 1993;26(1):1-4.

21. Tandler B. Structure of the duct system in mammalian major salivary glands. *Microsc Res Tech*. 1993;26(1):57-74.

22. World Health Organization. Dept. of Noncommunicable Disease Surveillance. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications :

report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva: World Health Organization; 1999. 59 p. p.

23. Lin CC, Li CI, Liu CS, Lin WY, Fuh MM, Yang SY, et al. Impact of lifestyle-related factors on all-cause and cause-specific mortality in patients with type 2 diabetes: the Taichung Diabetes Study. *Diabetes Care*. 2012;35(1):105-12.

24. Palomo I, Contreras A, Alarcon LM, Leiva E, Guzman L, Mujica V, et al. Elevated concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in individuals with metabolic syndrome. *Nitric Oxide*. 2011;24(4):224-8.

25. Caspersen CJ, Thomas GD, Boseman LA, Beckles GL, Albright AL. Aging, diabetes, and the public health system in the United States. *Am J Public Health*. 2012;102(8):1482-97.

26. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev*. 1995;16(2):117-42.

27. Gastaldelli A. Role of beta-cell dysfunction, ectopic fat accumulation and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;93 Suppl 1:S60-5.

28. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50(6):537-46.

29. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*. 1994;43(11):1326-33.

30. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*. 1981;294(5838):284-6.

31. Zong H, Ward M, Madden A, Yong PH, Limb GA, Curtis TM, et al. Hyperglycaemia-induced pro-inflammatory responses by retinal Muller glia are regulated by the receptor for advanced glycation end-products (RAGE). *Diabetologia*. 2010;53(12):2656-66.

32. Yan XX, Lu L, Peng WH, Wang LJ, Zhang Q, Zhang RY, et al. Increased serum HMGB1 level is associated with coronary artery disease in nondiabetic and type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis*. 2009;205(2):544-8.
33. Muller S, Scaffidi P, Degryse B, Bonaldi T, Ronfani L, Agresti A, et al. New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J*. 2001;20(16):4337-40.
34. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(4):331-42.
35. Novel approaches to cancer prevention. Proceedings of a workshop. Lausanne, Switzerland, July 11-13, 1996. *Eur J Cancer Prev*. 1996;5 Suppl 2:1-105.
36. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002;418(6894):191-5.
37. Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest*. 1994;70(2):138-51.
38. Manigrasso MB, Juranek J, Ramasamy R, Schmidt AM. Unlocking the biology of RAGE in diabetic microvascular complications. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(1):15-22.
39. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest*. 2001;108(7):949-55.
40. Tanaka N, Yonekura H, Yamagishi S, Fujimori H, Yamamoto Y, Yamamoto H. The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17beta-estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000;275(33):25781-90.
41. Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, et al. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes*. 2001;50(12):2792-808.

42. Dasu MR, Devaraj S, Park S, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2010;33(4):861-8.
43. Wang H, Qu H, Deng H. Plasma HMGB-1 Levels in Subjects with Obesity and Type 2 Diabetes: A Cross-Sectional Study in China. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136564.
44. Desta T, Li J, Chino T, Graves DT. Altered fibroblast proliferation and apoptosis in diabetic gingival wounds. *J Dent Res*. 2010;89(6):609-14.
45. Lee SC, Pervaiz S. Apoptosis in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(3):497-504.
46. Peplow PV, Baxter GD. Gene expression and release of growth factors during delayed wound healing: a review of studies in diabetic animals and possible combined laser phototherapy and growth factor treatment to enhance healing. *Photomed Laser Surg*. 2012;30(11):617-36.
47. Alikhani M, Maclellan CM, Raptis M, Vora S, Trackman PC, Graves DT. Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases, and the FOXO1 transcription factor. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292(2):C850-6.
48. Yu W, Wu J, Cai F, Xiang J, Zha W, Fan D, et al. Curcumin alleviates diabetic cardiomyopathy in experimental diabetic rats. *PLoS One*. 2012;7(12):e52013.
49. Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell*. 2005;121(5):671-4.
50. Wang L, Du F, Wang X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*. 2008;133(4):693-703.
51. Kim JJ, Lee SB, Park JK, Yoo YD. TNF-alpha-induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-X(L). *Cell Death Differ*. 2010;17(9):1420-34.
52. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. 2011;469(7330):323-35.

53. O'Brate A, Giannakakou P. The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resist Updat*. 2003;6(6):313-22.
54. Livesey KM, Kang R, Vernon P, Buchser W, Loughran P, Watkins SC, et al. p53/HMGB1 complexes regulate autophagy and apoptosis. *Cancer Res*. 2012;72(8):1996-2005.
55. Nogueira FN, Carvalho AM, Yamaguti PM, Nicolau J. Antioxidant parameters and lipid peroxidation in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta*. 2005;353(1-2):133-9.
56. Nicolau J, de Matos JA, de Souza DN, Neves LB, Lopes AC. Altered glycogen metabolism in the submandibular and parotid salivary glands of rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Oral Sci*. 2005;47(2):111-6.
57. Anderson LC, Bevan CA. Effects of streptozotocin diabetes on amylase release and cAMP accumulation in rat parotid acinar cells. *Arch Oral Biol*. 1992;37(5):331-6.
58. Kurahashi M, Inomata K. Amylase secretion by parotid glands and pancreas of diabetic rats during feeding. *Am J Physiol*. 1988;254(6 Pt 1):G878-82.
59. Mednieks MI, Szczepanski A, Clark B, Hand AR. Protein expression in salivary glands of rats with streptozotocin diabetes. *Int J Exp Pathol*. 2009;90(4):412-22.
60. Romero AC, Ibuki FK, Nogueira FN. Sialic acid reduction in the saliva of streptozotocin induced diabetic rats. *Arch Oral Biol*. 2012;57(9):1189-93.
61. Cutler LS, Pinney HE, Christian C, Russotto SB. Ultrastructural studies of the rat submandibular gland in streptozotocin induced diabetes mellitus. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1979;382(3):301-11.
62. Hand AR, Weiss RE. Effects of streptozotocin-induced diabetes on the rat parotid gland. *Lab Invest*. 1984;51(4):429-40.
63. Szczepanski A, Mednieks MI, Hand AR. Expression and distribution of parotid secretory proteins in experimental diabetes. *Eur J Morphol*. 1998;36 Suppl:240-6.

64. Noorafshan A. Volume-weighted mean volume of the submandibular gland acini in male and female diabetic rats. *Micron*. 2006;37(7):613-6.
65. High AS, Sutton J, Hopper AH. A morphometric study of submandibular salivary gland changes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Oral Biol*. 1985;30(9):667-71.
66. Caldeira EJ, Camilli JA, Cagnon VH. Stereology and ultrastructure of the salivary glands of diabetic Nod mice submitted to long-term insulin treatment. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2005;286(2):930-7.
67. Hu Y, Nakagawa Y, Purushotham KR, Humphreys-Beher MG. Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. *Am J Physiol*. 1992;263(4 Pt 1):E607-14.
68. Anderson LC, Suleiman AH, Garrett JR. Morphological effects of diabetes on the granular ducts and acini of the rat submandibular gland. *Microsc Res Tech*. 1994;27(1):61-70.
69. Piras M, Hand AR, Mednieks MI, Piludu M. Amylase and cyclic amp receptor protein expression in human diabetic parotid glands. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(9):715-21.
70. Azevedo LH, Galletta VC, de Paula Eduardo C, de Sousa SO, Migliari DA. Treatment of oral verrucous carcinoma with carbon dioxide laser. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65(11):2361-6.
71. Gontijo I, Navarro RS, Haypek P, Ciamponi AL, Haddad AE. The applications of diode and Er:YAG lasers in labial frenectomy in infant patients. *J Dent Child (Chic)*. 2005;72(1):10-5.
72. Freitas PM, Navarro RS, Barros JA, de Paula Eduardo C. The use of Er:YAG laser for cavity preparation: an SEM evaluation. *Microsc Res Tech*. 2007;70(9):803-8.
73. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys*. 1989;56(5):691-704.
74. Midda M, Renton-Harper P. Lasers in dentistry. *Br Dent J*. 1991;170(9):343-6.

75. Karu TI. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem Photobiol.* 2008;84(5):1091-9.
76. Karu TI. [Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser irradiation]. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 1986;291(5):1245-9.
77. Brown GC. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1411(2-3):351-69.
78. Karu T, Andreichuk T, Ryabykh T. Changes in oxidative metabolism of murine spleen following laser and superluminous diode (660-950 nm) irradiation: effects of cellular composition and radiation parameters. *Lasers Surg Med.* 1993;13(4):453-62.
79. Grossman N, Schneid N, Reuveni H, Halevy S, Lubart R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med.* 1998;22(4):212-8.
80. Karu TI, Tiphlova OA, Matveyets Yu A, Yartsev AP, Letokhov VS. Comparison of the effects of visible femtosecond laser pulses and continuous wave laser radiation of low average intensity on the clonogenicity of *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol B.* 1991;10(4):339-44.
81. Wilden L, Karthein R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. *J Clin Laser Med Surg.* 1998;16(3):159-65.
82. Passarella S, Casamassima E, Molinari S, Pastore D, Quagliariello E, Catalano IM, et al. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *FEBS Lett.* 1984;175(1):95-9.
83. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B.* 1995;27(3):219-23.
84. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B.* 1999;49(1):1-17.
85. Anders JJ, Borke RC, Woolery SK, Van de Merwe WP. Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. *Lasers Surg Med.* 1993;13(1):72-82.

86. Bisht D, Gupta SC, Misra V, Mital VP, Sharma P. Effect of low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Indian J Med Res.* 1994;100:43-6.
87. Hawkins DH, Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2006;38(1):74-83.
88. Loevschall H, Arenholt-Bindslev D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med.* 1994;14(4):347-54.
89. Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2004;34(3):260-5.
90. Mester AF, Snow JB, Jr., Shaman P. Photochemical effects of laser irradiation on neuritic outgrowth of olfactory neuroepithelial explants. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1991;105(3):449-56.
91. Campos L, Simoes A, Sa PH, Eduardo Cde P. Improvement in quality of life of an oncological patient by laser phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(2):371-4.
92. Simoes A, de Campos L, de Souza DN, de Matos JA, Freitas PM, Nicolau J. Laser phototherapy as topical prophylaxis against radiation-induced xerostomia. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(3):357-63.
93. Loncar B, Stipetic MM, Baricevic M, Risovic D. The effect of low-level laser therapy on salivary glands in patients with xerostomia. *Photomed Laser Surg.* 2011;29(3):171-5.
94. Pejicic A, Kojovic D, Kesic L, Obradovic R. The effects of low level laser irradiation on gingival inflammation. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(1):69-74.
95. de Paula Eduardo C, de Freitas PM, Esteves-Oliveira M, Aranha AC, Ramalho KM, Simoes A, et al. Laser phototherapy in the treatment of periodontal disease. A review. *Lasers Med Sci.* 2010;25(6):781-92.
96. Peplow PV, Chung TY, Ryan B, Baxter GD. Laser photobiomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg.* 2011;29(5):285-304.

97. Fukuda TY, Tanji MM, Silva SR, Sato MN, Plapler H. Infrared low-level diode laser on inflammatory process modulation in mice: pro- and anti-inflammatory cytokines. *Lasers Med Sci.* 2013;28(5):1305-13.
98. Zhang L, Zhao J, Kuboyama N, Abiko Y. Low-level laser irradiation treatment reduces CCL2 expression in rat rheumatoid synovia via a chemokine signaling pathway. *Lasers Med Sci.* 2011;26(5):707-17.
99. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med.* 2005;36(1):8-12.
100. Pansani TN, Basso FG, Turirioni AP, Kurachi C, Hebling J, de Souza Costa CA. Effects of low-level laser therapy on the proliferation and apoptosis of gingival fibroblasts treated with zoledronic acid. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014;43(8):1030-4.
101. Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ural AU, Sencimen M, Kurtis B. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2008;23(2):211-5.
102. Zhang Y, Song S, Fong CC, Tsang CH, Yang Z, Yang M. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *J Invest Dermatol.* 2003;120(5):849-57.
103. Wu JY, Chen CH, Wang CZ, Ho ML, Yeh ML, Wang YH. Low-power laser irradiation suppresses inflammatory response of human adipose-derived stem cells by modulating intracellular cyclic AMP level and NF-kappaB activity. *PLoS One.* 2013;8(1):e54067.
104. Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:821-61.
105. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(8):599-609.
106. Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci.* 2009;16:4.

107. Araujo TG, de Oliveira AG, Tobar N, Saad MJ, Moreira LR, Reis ER, et al. Liver regeneration following partial hepatectomy is improved by enhancing the HGF/Met axis and Akt and Erk pathways after low-power laser irradiation in rats. *Lasers Med Sci.* 2013;28(6):1511-7.
108. Miyata H, Genma T, Ohshima M, Yamaguchi Y, Hayashi M, Takeichi O, et al. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation of cultured human dental pulp cells by low-power gallium-aluminium-arsenic laser irradiation. *Int Endod J.* 2006;39(3):238-44.
109. Chang F, Steelman LS, Shelton JG, Lee JT, Navolanic PM, Blalock WL, et al. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol.* 2003;22(3):469-80.
110. Cuevas P, Diaz-Gonzalez D, Carceller F, Dujovny M. Dual blockade of mitogen-activated protein kinases ERK-1 (p42) and ERK-2 (p44) and cyclic AMP response element binding protein (CREB) by neomycin inhibits glioma cell proliferation. *Neurol Res.* 2003;25(1):13-6.
111. Tian HP, Huang BS, Zhao J, Hu XH, Guo J, Li LX. Non-receptor tyrosine kinase Src is required for ischemia-stimulated neuronal cell proliferation via Raf/ERK/CREB activation in the dentate gyrus. *BMC Neurosci.* 2009;10:139.
112. Kwon YJ, Sun Y, Kim NH, Huh SO. Phosphorylation of CREB, a cyclic AMP responsive element binding protein, contributes partially to lysophosphatidic acid-induced fibroblast cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;380(3):655-9.
113. Stacey DW. Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15(2):158-63.
114. Zhang L, Zhang Y, Xing D. LPLI inhibits apoptosis upstream of Bax translocation via a GSK-3 β -inactivation mechanism. *J Cell Physiol.* 2010;224(1):218-28.
115. Takeda Y. Irradiation effect of low-energy laser on rat submandibular salivary gland. *J Oral Pathol.* 1988;17(2):91-4.
116. Plavnik LM, De Crosa ME, Malberti AI. Effect of low-power radiation (helium/neon) upon submandibular glands. *J Clin Laser Med Surg.* 2003;21(4):219-25.

117. Vidovic Juras D, Lukac J, Cekic-Arambasin A, Vidovic A, Canjuga I, Sikora M, et al. Effects of low-level laser treatment on mouth dryness. *Coll Antropol*. 2010;34(3):1039-43.
118. Pavlic V. [The effects of low-level laser therapy on xerostomia (mouth dryness)]. *Med Pregl*. 2012;65(5-6):247-50.
119. Acauan MD, Gomes AP, Braga-Filho A, de Figueiredo MA, Cherubini K, Salum FG. Effect of low-level laser therapy on irradiated parotid glands--study in mice. *J Biomed Opt*. 2015;20(10):108002.
120. Simoes A, Nicolau J, de Souza DN, Ferreira LS, de Paula Eduardo C, Apel C, et al. Effect of defocused infrared diode laser on salivary flow rate and some salivary parameters of rats. *Clin Oral Investig*. 2008;12(1):25-30.
121. Simoes A, Nogueira FN, de Paula Eduardo C, Nicolau J. Diode laser decreases the activity of catalase on submandibular glands of diabetic rats. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(1):91-5.
122. Simoes A, Ganzerla E, Yamaguti PM, de Paula Eduardo C, Nicolau J. Effect of diode laser on enzymatic activity of parotid glands of diabetic rats. *Lasers Med Sci*. 2009;24(4):591-6.
123. Ibuki FK, Simoes A, Nicolau J, Nogueira FN. Laser irradiation affects enzymatic antioxidant system of streptozotocin-induced diabetic rats. *Lasers Med Sci*. 2013;28(3):911-8.
124. Campos L, Nicolau J, Arana-Chavez VE, Simoes A. Effect of laser phototherapy on enzymatic activity of salivary glands of hamsters treated with 5-Fluorouracil. *Photochem Photobiol*. 2014;90(3):667-72.
125. De Carvalho D. Análise da glicemia e de IGF-1 após laserterapia nas glândulas salivares de ratas diabéticas [Dissertação (Mestrado)]. São Paulo: Faculdade de Odontologia; 2013.
126. Massa LF, Arana-Chavez VE. Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiation. *Eur J Oral Sci*. 2000;108(1):74-7.

127. Bergmeyer HU, Moellering H. [Acylphosphate: D-glucose-6-phosphotransferase]. *Biochem Z.* 1965;343(1):97-102.
128. Hsing AW, Gao YT, Chua S, Jr., Deng J, Stanczyk FZ. Insulin resistance and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(1):67-71.
129. Park JM, Bong HY, Jeong HI, Kim YK, Kim JY, Kwon O. Postprandial hypoglycemic effect of mulberry leaf in Goto-Kakizaki rats and counterpart control Wistar rats. *Nutr Res Pract.* 2009;3(4):272-8.
130. Levine AJ, Feng Z, Mak TW, You H, Jin S. Coordination and communication between the p53 and IGF-1-AKT-TOR signal transduction pathways. *Genes Dev.* 2006;20(3):267-75.
131. Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim.* 2011;45(3):131-40.
132. Mauvais-Jarvis F. Elucidating sex and gender differences in diabetes: a necessary step toward personalized medicine. *J Diabetes Complications.* 2015;29(2):162-3.
133. Le May C, Chu K, Hu M, Ortega CS, Simpson ER, Korach KS, et al. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(24):9232-7.
134. Bell RC, Khurana M, Ryan EA, Finegood DT. Gender differences in the metabolic response to graded numbers of transplanted islets of Langerhans. *Endocrinology.* 1994;135(6):2681-7.
135. Qinna NA, Badwan AA. Impact of streptozotocin on altering normal glucose homeostasis during insulin testing in diabetic rats compared to normoglycemic rats. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:2515-25.
136. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412-9.

137. Kang ES, Yun YS, Park SW, Kim HJ, Ahn CW, Song YD, et al. Limitation of the validity of the homeostasis model assessment as an index of insulin resistance in Korea. *Metabolism*. 2005;54(2):206-11.
138. Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care*. 2000;23(1):57-63.
139. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*. 2004;27(6):1487-95.
140. Yoke Yin C, So Ha T, Abdul Kadir K. Effects of Glycyrrhizic Acid on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARgamma), Lipoprotein Lipase (LPL), Serum Lipid and HOMA-IR in Rats. *PPAR Res*. 2010;2010:530265.
141. Aref AB, Ahmed OM, Ali LA, Semmler M. Maternal rat diabetes mellitus deleteriously affects insulin sensitivity and Beta-cell function in the offspring. *J Diabetes Res*. 2013;2013:429154.
142. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
143. Yao D, Brownlee M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes*. 2010;59(1):249-55.
144. Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, Voigtlander T, Ferrier P, Ferrari S, et al. The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet*. 1999;22(3):276-80.
145. Ingels C, Derese I, Wouters PJ, Van den Berghe G, Vanhorebeek I. Soluble RAGE and the RAGE ligands HMGB1 and S100A12 in critical illness: impact of glycemic control with insulin and relation with clinical outcome. *Shock*. 2015;43(2):109-16.
146. Kerr M, Lee A, Wang PL, Purushotham KR, Chegini N, Yamamoto H, et al. Detection of insulin and insulin-like growth factors I and II in saliva and potential synthesis in the salivary glands of mice. Effects of type 1 diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol*. 1995;49(10):1521-31.

147. Patel DG, Begum N, Smith PH. Insulin-like material in parotid and submaxillary salivary glands of normal and diabetic adult male mice. *Diabetes*. 1986;35(7):753-8.
148. Murakami K, Taniguchi H, Baba S. Presence of insulin-like immunoreactivity and its biosynthesis in rat and human parotid gland. *Diabetologia*. 1982;22(5):358-61.
149. Dimitriadis G, Parry-Billings M, Bevan S, Dunger D, Piva T, Krause U, et al. Effects of insulin-like growth factor I on the rates of glucose transport and utilization in rat skeletal muscle in vitro. *Biochem J*. 1992;285 (Pt 1):269-74.
150. Katz LE, DeLeon DD, Zhao H, Jawad AF. Free and total insulin-like growth factor (IGF)-I levels decline during fasting: relationships with insulin and IGF-binding protein-1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(6):2978-83.
151. German JP, Wisse BE, Thaler JP, Oh IS, Sarruf DA, Ogimoto K, et al. Leptin deficiency causes insulin resistance induced by uncontrolled diabetes. *Diabetes*. 2010;59(7):1626-34.
152. Pocai A, Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Schwartz GJ, Bryan J, et al. Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature*. 2005;434(7036):1026-31.
153. Zhong FY, L.; Mi, X. Photobiomodulation on KATP Channels of Kir6.2-Transfected HEK-293 Cells. *International Journal of Photoenergy*. 2014;2014(Article ID 898752):7.
154. De Matteis R, Puxeddu R, Riva A, Cinti S. Intralobular ducts of human major salivary glands contain leptin and its receptor. *J Anat*. 2002;201(5):363-70.
155. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 1996;382(6588):250-2.
156. Gamaleia NF, Stadnik V. [Intravascular laser irradiation of the blood]. *Vestn Khir Im I I Grek*. 1989;142(4):143-6.
157. Kazemi Khoo N, Iravani A, Arjmand M, Vahabi F, Lajevardi M, Akrami SM, et al. A metabolomic study on the effect of intravascular laser blood irradiation on type 2 diabetic patients. *Lasers Med Sci*. 2013;28(6):1527-32.

158. Huang SF, Tsai YA, Wu SB, Wei YH, Tsai PY, Chuang TY. Effects of intravascular laser irradiation of blood in mitochondria dysfunction and oxidative stress in adults with chronic spinal cord injury. *Photomed Laser Surg.* 2012;30(10):579-86.
159. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med.* 1988;318(20):1315-21.
160. Sell DR, Monnier VM. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem.* 1989;264(36):21597-602.
161. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2656-64.
162. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev.* 2013;93(1):137-88.
163. Kierdorf K, Fritz G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J Leukoc Biol.* 2013;94(1):55-68.
164. Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol.* 1993;143(6):1699-712.
165. Yamamoto Y, Yamamoto H. Receptor for advanced glycation end-products-mediated inflammation and diabetic vascular complications. *J Diabetes Investig.* 2011;2(3):155-7.
166. Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood.* 2003;101(7):2652-60.
167. Yang S, Xu L, Yang T, Wang F. High-mobility group box-1 and its role in angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 2014;95(4):563-74.
168. Tang D, Kang R, Livesey KM, Kroemer G, Billiar TR, Van Houten B, et al. High-mobility group box 1 is essential for mitochondrial quality control. *Cell Metab.* 2011;13(6):701-11.

169. Alves M, Calegari VC, Cunha DA, Saad MJ, Velloso LA, Rocha EM. Increased expression of advanced glycation end-products and their receptor, and activation of nuclear factor kappa-B in lacrimal glands of diabetic rats. *Diabetologia*. 2005;48(12):2675-81.
170. Pamukcu B, Lip GY, Shantsila E. The nuclear factor--kappa B pathway in atherosclerosis: a potential therapeutic target for atherothrombotic vascular disease. *Thromb Res*. 2011;128(2):117-23.
171. Li X, Stark GR. NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol*. 2002;30(4):285-96.
172. Hofmann MA, Schiekofer S, Kanitz M, Klevesath MS, Joswig M, Lee V, et al. Insufficient glycemic control increases nuclear factor-kappa B binding activity in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 1998;21(8):1310-6.
173. Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, Kanitz M, Henkels M, Joswig M, et al. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-kappaB. *Diabetologia*. 1999;42(2):222-32.
174. Kuboyama N, Abiko Y. Reduction of monocyte chemoattractant protein-1 expression in rheumatoid arthritis rat joints with light-emitting diode phototherapy. *Laser Ther*. 2012;21(3):177-81.
175. de Lima FM, Moreira LM, Villaverde AB, Albertini R, Castro-Faria-Neto HC, Aimbire F. Low-level laser therapy (LLLT) acts as cAMP-elevating agent in acute respiratory distress syndrome. *Lasers Med Sci*. 2011;26(3):389-400.
176. Gerlo S, Kooijman R, Beck IM, Kolmus K, Spooren A, Haegeman G. Cyclic AMP: a selective modulator of NF-kappaB action. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(23):3823-41.
177. Johannessen M, Delghandi MP, Moens U. What turns CREB on? *Cell Signal*. 2004;16(11):1211-27.
178. Ollivier V, Parry GC, Cobb RR, de Prost D, Mackman N. Elevated cyclic AMP inhibits NF-kappaB-mediated transcription in human monocytic cells and endothelial cells. *J Biol Chem*. 1996;271(34):20828-35.

179. Parry GC, Mackman N. Role of cyclic AMP response element-binding protein in cyclic AMP inhibition of NF-kappaB-mediated transcription. *J Immunol.* 1997;159(11):5450-6.
180. Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(11):837-48.
181. Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(10):692-703.
182. Dalle S, Quoyer J, Varin E, Costes S. Roles and regulation of the transcription factor CREB in pancreatic beta -cells. *Curr Mol Pharmacol.* 2011;4(3):187-95.
183. Briaud I, Lingohr MK, Dickson LM, Wrede CE, Rhodes CJ. Differential activation mechanisms of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 2003;52(4):974-83.
184. Costes S, Longuet C, Broca C, Faruque O, Hani EH, Bataille D, et al. Cooperative effects between protein kinase A and p44/p42 mitogen-activated protein kinase to promote cAMP-responsive element binding protein activation after beta cell stimulation by glucose and its alteration due to glucotoxicity. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1030:230-42.
185. Ben-Dov N, Shefer G, Irintchev A, Wernig A, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1448(3):372-80.
186. Shefer G, Oron U, Irintchev A, Wernig A, Halevy O. Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway. *J Cell Physiol.* 2001;187(1):73-80.
187. Shefer G, Barash I, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1593(2-3):131-9.
188. Dardick I, Byard RW, Carnegie JA. A review of the proliferative capacity of major salivary glands and the relationship to current concepts of neoplasia in salivary glands. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1990;69(1):53-67.

189. Denny PC, Denny PA. Dynamics of parenchymal cell division, differentiation, and apoptosis in the young adult female mouse submandibular gland. *Anat Rec.* 1999;254(3):408-17.
190. Kagami H, Wang S, Hai B. Restoring the function of salivary glands. *Oral Dis.* 2008;14(1):15-24.
191. Patel VN, Hoffman MP. Salivary gland development: a template for regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;25-26:52-60.
192. Wang J, Wang H, Hao P, Xue L, Wei S, Zhang Y, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase 2 by oxidative stress is associated with cardiac dysfunction in diabetic rats. *Mol Med.* 2011;17(3-4):172-9.
193. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;54(6):1615-25.
194. Ramirez E, Klett-Mingo M, Ares-Carrasco S, Picatoste B, Ferrarini A, Ruperez FJ, et al. Eplerenone attenuated cardiac steatosis, apoptosis and diastolic dysfunction in experimental type-II diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2013;12:172.
195. Bhan S, Mitra R, Arya AK, Pandey HP, Tripathi K. A study on evaluation of apoptosis and expression of bcl-2-related marker in wound healing of streptozotocin-induced diabetic rats. *ISRN Dermatol.* 2013;2013:739054.
196. Weinberg E, Maymon T, Weinreb M. AGEs induce caspase-mediated apoptosis of rat BMSCs via TNFalpha production and oxidative stress. *J Mol Endocrinol.* 2014;52(1):67-76.
197. Harada H, Quearry B, Ruiz-Vela A, Korsmeyer SJ. Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(43):15313-7.
198. Ley R, Balmanno K, Hadfield K, Weston C, Cook SJ. Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J Biol Chem.* 2003;278(21):18811-6.
199. Gelinas C, White E. BH3-only proteins in control: specificity regulates MCL-1 and BAK-mediated apoptosis. *Genes Dev.* 2005;19(11):1263-8.

200. She QB, Solit DB, Ye Q, O'Reilly KE, Lobo J, Rosen N. The BAD protein integrates survival signaling by EGFR/MAPK and PI3K/Akt kinase pathways in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell*. 2005;8(4):287-97.

201. McCubrey JA, Steelman LS, Franklin RA, Abrams SL, Chappell WH, Wong EW, et al. Targeting the RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT and p53 pathways in hematopoietic drug resistance. *Adv Enzyme Regul*. 2007;47:64-103.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **118** nas fls. **133** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Alyne Simões Gonçalves**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Análise das alterações na expressão gênica, metabolismo celular, acúmulo lipídico e fatores correlacionados na secreção salivar de ratas diabéticas e não diabéticas após laserterapia de alta e baixa intensidade e led terapia em glândulas salivares maiores"* do qual participam o(s) aluno(s), especialista em laboratório **Cintia Yuki Fukuoka** e o pesquisador **Victor Elias Arana-Chaves**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **08.10.2012, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 10 de outubro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Tel. (11) 3091 7887/7863

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **011/2014** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a). **Alyne Simões Gonçalves** Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Efeito da laserterapia em baixa intensidade em ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina**" do qual participa(am) o(s) pesquisador(es) **Cintia Yuki Fukuoka** e **Gabriela Schröter**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA) em **16/06/2014**, com validade de **03 (três)** anos.

São Paulo, 16 de junho de 2014.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEUA-FOUSP

Fundada em 1900

"Em constante busca da excelência"

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Tel. (11) 3091 7842
ceuafo@usp.br

Of. CEUA nº 025/2015

São Paulo, 04 de agosto de 2015.

Prezada Professora,

Em resposta à solicitação de adendo ao Protocolo CEUA 011/2014 aprovado em 16 de junho de 2014 pela CEUA/FOUSP, para coletar sangue das cobaias via punção cardíaca para análises bioquímicas de glicemia e insulina, devido à insuficiência na quantidade de sangue adquirido via caudal, bem como, a introdução de um novo grupo de animais com mais dias de irradiação com laser (n=15), informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da USP, aprovou sua solicitação em reunião ordinária realizada em 03 de agosto de 2015.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Coordenador da CEUA-FOUSP

Ilma. Senhora
Profa. Dra. Alyne Simões Gonçalves
Departamento de Biomateriais Biologia Oral da
Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo