ALYNE SIMÕES

**ESTUDO DO EFEITO DA IRRADIAÇÃO COM LASER EM BAIXA
INTENSIDADE NO METABOLISMO CELULAR DAS GLÂNDULAS
SALIVARES E NA GLICEMIA DE RATAS DIABÉTICAS INDUZIDAS
POR ESTREPTOZOTOCINA**

São Paulo

2008

Alyne Simões

**Estudo do efeito da irradiação com laser em baixa intensidade no
metabolismo celular das glândulas salivares e na glicemia de ratas
diabéticas induzidas por estreptozotocina**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Materiais Dentários

Orientador: Prof. Dr. José Nicolau

São Paulo

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Simões A. Estudo do efeito da irradiação com laser em baixa intensidade no metabolismo celular das glândulas salivares e glicemia de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

São Paulo, 15/05/2008

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A DEUS! Por tudo!

Aos meus amados pais, com eterna gratidão e amor! Graças a eles posso estudar na Universidade de São Paulo, da qual me orgulho!

Ao meu noivo, com admiração e amor, por sua terna compreensão, paciência, torcida, carinho e preocupação ao longo da elaboração desta tese.

Ao Professor Nicolau, meu eterno mestre! Por me formar uma pesquisadora, com ética, paixão e responsabilidade!

AGRADECIMENTOS

A Deus! Por ter me possibilitado nascer de pais tão dedicados, que lutaram para que eu estudasse na FOUSP, e conseqüentemente ter me dado a oportunidade de conhecer e trabalhar com todas as pessoas aqui presentes! Agradeço, por eu perceber que ELE está sempre no comando da minha vida!

Aos meus amados pais, pela dedicação e o incentivo dados em toda a minha vida! Obrigada por me fornecerem sempre uma base sólida, na honestidade e na dignidade, e uma vida repleta de amor!

Ao meu noivo amado, Nani, que com muita compreensão e amor, vibrou em todas as minhas vitórias e me consolou em todas as minhas tristezas e ansiedades!

As minhas irmãs, Andreza e Eloá, que sempre demonstraram apoio e amor. As minhas afilhadas, Gaby e Carol, que eu amo demais! Aos meus avós, tios, primos, madrinha e todos meus familiares! Em especial a minha prima Luana, que fez iniciação científica comigo, no laboratório, e que dedicou boa parte de sua vida acadêmica ao atendimento dos pacientes oncológicos. AMO VOCÊS!

A Else e aos familiares do Nani, que sempre demonstraram compreensão e carinho em toda esta fase de minha vida!

Ao meu mestre, Prof. Dr. José Nicolau, meu orientador, meu pai na Ciência!
Forneceu-me a base para minha vida de pesquisadora e docente, me ensinado a ter honestidade, dignidade e responsabilidade na minha vida profissional. Agradeço muito por toda sua dedicação e por acreditar no meu trabalho. Orgulho-me muito do Sr. e me espelho em sua vida de dedicação à Ciência. Nunca me esquecerei de estudar Bioquímica, Física, Matemática e Estatística!

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar de Almeida, meu primeiro orientador de Iniciação Científica, sem dúvida a pessoa que me fez pegar gosto pela Ciência!

Ao amigo Douglas, químico do laboratório, que me ensinou as técnicas do laboratório, sem as quais esta tese jamais teria sido finalizada!

À Profa. Dra. Rosa Helena, pela dedicação à Pós-Graduação, sempre nos ajudando e nos guiando! Ao chefe do departamento Prof. Dr. Leonardo Eloy Rodrigues Filho e a todos os professores do Departamento de Biomateriais e Bioquímica Oral, pelo carinho e por terem me dado a oportunidade de fazer minha tese no Centro de Pesquisa em Biologia Oral.

Ao Prof. Dr. Victor Arana e a Profa. Dra. Marinilce Fagundes, pela ajuda com o preparo e as análises das minhas lâminas, assim como pelo carinho com o qual sempre me receberam! Agradeço também à Emília, técnica do laboratório, que sempre me ensinou e ajudou com muita disposição e ternura!

Ao Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo que colocou a infra-estrutura e os equipamentos do LELO sempre à disposição para que eu realizasse minha tese, e para que outros trabalhos fossem também realizados. Agradeço a confiança.

Aos amigos Fernando e Fausto que sempre com muito bom humor, fizeram o ambiente do laboratório ser sempre agradável, além de sempre darem uma mãozinha nas análises estatísticas! Ao Walter, que me ajudou no início da minha jornada e que mantém a porta aberta para trabalharmos juntos.

À Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), por toda competência e pelo carisma que sempre demonstrou quando precisei tirar algumas dúvidas.

À Profa. Dra. Elisabeth de Oliveira, do Instituto de Química (IQ), que me recebeu de portas abertas para a realização das minhas análises no espectrofotômetro de emissão atômica.

Às amigas Emily, Mariana, Paulinha, Ana Paula, Flávias, Patrícia, Marcela, Helena, Adriana, Soraia, Ísis, Carina, etc. e ao amigo Jonas, alunos de IC e PG do Departamento de Biomateriais e Bioquímica Oral, durante o período da minha tese. Limpamos muitos biotérios, festejamos muitos aniversários e nos aproximamos muito nestes anos de convivência no laboratório e no departamento.

Às amigas Patrícia e Ana Cecília agradeço muito este tempo de convivência, as oportunidades dadas, as portas abertas e acima de tudo o carinho da amizade de vocês!

À Leila, minha dupla e amiga! Sempre pronta a me ajudar, em qualquer circunstância! Espero tê-la por perto para o resto de minha vida!

Aos amigos Marina, Juliana, Marcella, “Karens”, Daiane, Simone, Lilian, Vanessa, Anna, Amanda, Bruno, Lili, Jô, Gê, Haroldo, Felipe, etc. pela amizade e pelos ensinamentos!

À equipe “mucosite”: Aninha, Luana, Fê, Letícia, Márcio, Pedro e todos os pacientes, pela dedicação a uma causa nobre! Aprendi e cresci muito com vocês!

A Rosinha e a Mirtes que sempre me ajudaram com muita simpatia e prontidão! Agradeço o carinho!

À FAPESP e ao CNPq pela bolsa de estudo e reserva técnica concedida.

Ao Departamento de Biomateriais e Bioquímica Oral e ao Centro de Pesquisa em Biologia Oral, pelo apoio, material e infra-estrutura concedidos, os quais foram essenciais para o desenvolvimento desta tese.

*"Sabemos que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito!"
Amém!*

Romanos 8:28;

"Para conseguir grandes coisas, é necessário não apenas planejar, mas também acreditar, não apenas agir, mas também sonhar."

Anatole France

"As oportunidades normalmente se apresentam disfarçadas de trabalho árduo e é por isso que muitos não as reconhecem"

Ann Landers

"Deus disse: Haja luz; e houve luz. E viu Deus que a luz era boa;..."

Gênesis 1:3-4

Simões A. Estudo do efeito da irradiação com laser em baixa intensidade no metabolismo celular das glândulas salivares e na glicemia de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

RESUMO

Considerando que o diabetes experimental altera a morfologia e função das glândulas salivares de ratos, o objetivo deste estudo foi analisar o efeito da irradiação com laser em baixa intensidade no metabolismo das glândulas parótidas (GP) e submandibulares (GSM) de ratas diabéticas, assim como analisar a glicemia destes animais. Ratas Wistar com aproximadamente 195 g foram divididas em diabéticas (D) e controles (C), e subdivididas de acordo com a dose de irradiação recebida: **C-D0** (0 J/cm²), **C-D5** (5 J/cm²), **C-D10** (10 J/cm²), **C-D20** (20 J/cm²). O diabetes foi induzido por injeção de estreptozotocina 60 mg/kg p.c., e confirmado após 72 h, através da glicemia. Vinte e nove dias após a indução, as ratas receberam a irradiação de acordo com o grupo a qual pertenciam. O laser de diodo (Ecco Fibras®), 660nm, foi utilizado nas áreas correspondentes às GP e GSM. Após 24 h, as ratas foram eutanasiadas e as glândulas removidas para posterior análise iônica, histológica e bioquímica de concentração total de proteína, atividade das enzimas catalase, peroxidase e amilase. Além disso, análise glicêmica também foi realizada. Análise de variância e teste de Tukey revelaram diminuição da glicemia nos grupos D5 e D20 ($p < 0,05$), assim como diminuição na atividade da enzima catalase, nestas mesmas dosagens, nas GP e GSM para valores similares às ratas não-diabéticas ($p > 0,05$), sendo que para as GSM, a dose de 10 J/cm² também se mostrou efetiva. Análise histológica demonstrou acúmulo de lipídeos nas GP dos animais diabéticos, sendo que para os grupos que receberam irradiação, este acúmulo foi reduzido. Com base nos resultados, podemos concluir que a irradiação com laser vermelho nas GP e GSM altera a atividade enzimática da catalase, assim como altera a concentração de glicose sangüínea e o acúmulo de lipídeos. Com isto, mais estudos devem ser realizados objetivando continuar as análises de parâmetros antioxidantes,

assim como, análise glicêmica, uma vez que a hiperglicemia e alterações no sistema antioxidante são diretamente relacionadas às complicações do diabetes.

Palavras-Chave: Glândulas salivares, diabetes, laser, glicemia, análises bioquímicas

Simões A. Effect of laser irradiation on cellular metabolism of salivary glands and glycaemic state of diabetic-induced streptozotocin rats [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

ABSTRACT

Considering that experimental diabetes alters rat salivary gland morphology and function, the aim of this study was to evaluate the effect of laser irradiation (LI) on the glycaemic state and some biochemical parameters of the parotid glands (PG) and submandibular glands (SMG) in diabetic and non diabetic rats, which were divided into 8 groups: D0/5/10/20 and C0/5/10/20, respectively. Diabetes was induced by administration of streptozotocin (60 mg/kg) and confirmed later by the glycaemia results. Twenty-nine (29) days after the induction, the PG and SMG of groups D-C5, D-C10 and D-C20, were irradiated with 5, 10 and 20 J/cm² of laser diode (660nm/100mW) respectively. On the following day, the rats were euthanized and the blood glucose determined. The PG and SMG were removed and total protein concentration and amylase, peroxidase and catalase activities were performed, as well as, ionic and histological analysis. The analysis of the results (ANOVA and Tukey tests) revealed a decrease in the glycaemia level for groups D5 and D20 ($p<0.05$). In addition, diabetic rats showed higher catalase and peroxidase activities than non diabetic groups, without radiation. The doses of 5 and 20 J/cm² decreased catalase activity, of PG and SMG, of diabetic groups to non diabetic values ($p<0.05$). Moreover, the dose of 10 J/cm² also was effective to SMGs. Histological analysis showed accumulation of lipids droplets on parotid glands of diabetic animals. However, the lipid droplets quantity was lower in comparison with that observed to non irradiated diabetic animals. The results of the present study suggest that the classical organs which control glycaemia should also be analyzed after being irradiated with LI, once hyperglycaemia and alterations of the antioxidant system are the main causes of diabetes complications.

Keywords: Salivary gland, diabetes, laser, glycaemia, biochemical analysis

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Glândulas salivares e saliva	17
2.2 <i>Diabetes Mellitus</i>	20
2.3 Diabetes e glândulas salivares	25
2.4 Laser	28
2.5 Laser, glândulas salivares e diabetes	35
3 PROPOSIÇÃO	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Ética	39
4.2 Animais	39
4.3 Indução diabetes	40
4.4 Fase experimental	40
4.5 Irradiação com laser em baixa intensidade	41
4.6 Obtenção das amostras	44
4.7 Determinação da glicemia	45
4.8 Atividade enzimática da amilase	46
4.9 Atividade enzimática da peroxidase	46
4.10 Concentração total de proteínas	46
4.11 Atividade enzimática da catalase	47
4.12 Análise morfológica	47
4.13 Análises iônicas	48
4.14 Análise estatística	48
5 RESULTADOS	49
5.1 Glândulas Parótidas	50
5.2 Glândulas Submandibulares	50
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÕES	82

REFERÊNCIAS 83

ANEXO A 95

1 INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da “emissão estimulada” por Einstein, em 1917, e o desenvolvimento do primeiro laser por Maiman, em 1960, o uso da irradiação monocromática, coerente e colimada, em baixa intensidade, vem sendo utilizada nas áreas médicas como terapêutica coadjuvante onde se deseja efeito antiinflamatório, analgésico e de biomodulação tecidual. Maiman, já dizia que “laser é a solução procurando problemas”, e desde então, inúmeras aplicações para o uso do laser foram descobertas, as quais muitas vezes são responsáveis pela melhora na qualidade de vida do paciente, como por exemplo, em casos de pacientes que realizam radioterapia de cabeça e pescoço, e desenvolvem alterações nas glândulas salivares, acompanhadas de hipossalivação e xerostomia; e mucosites orais, acompanhadas de intensa dor. Diversos trabalhos na literatura comprovam a eficácia do laser para reparação e analgesia destas lesões ulcerativas, assim como, nosso grupo, tem demonstrado melhora na sintomatologia de boca seca destes tipos de pacientes.

Com relação à estimulação das glândulas salivares, Fructuoso, em 1985, demonstrou aumento de fluxo salivar e melhora na xerostomia de pacientes com síndrome de Sjögren, após irradiação com laser em baixa intensidade. Além disso, Cowen et.al. (1997), relataram melhora no fluxo salivar de pacientes oncológicos submetidos à quimio e radioterapia e que recebiam irradiações laser para tratamento da mucosite oral.

As glândulas salivares maiores, parótidas, submandibulares e sublinguais, são responsáveis por 90% da produção salivar. A saliva é um fluido que contém

constituintes orgânicos e inorgânicos importantes para saúde oral, devido as suas funções benéficas que são essenciais para o bem estar geral. Lubrificação, limpeza oral constante através do fluxo salivar, capacidade tampão, ação antimicrobiana, antioxidante, digestiva e proteção da dentição, são algumas importantes funções da saliva.

Nos casos de hipofunção das glândulas salivares, onde o fluxo salivar se apresenta diminuído, funções vitais como a fala, a mastigação e a deglutição podem estar comprometidas. Além disso, a hipossalivação pode ser responsável por conseqüências como cárie dental, problemas periodontais, etc. A hipossalivação, assim como a xerostomia (sintoma de boca seca) pode levar a uma diminuição na qualidade de vida do paciente. Com isto, terapias que estimulem as glândulas salivares a produzirem saliva ou a alterarem a composição salivar, no intuito de diminuir a sensação de boca seca, se fazem necessárias e oportunas para melhoria da qualidade de vida dos pacientes que apresentam alterações nas glândulas salivares.

Não somente pacientes submetidos à terapia antineoplásica ou que são portadores da síndrome de Sjögren, apresentam alterações relacionadas às glândulas salivares. Pacientes diabéticos do tipo 1 ou 2 podem apresentar sintoma de xerostomia, alterações na composição salivar, morfologia das glândulas salivares e no fluxo, assim como maior incidência e severidade de moléstias orais. Além disso, a hiperglicemia resulta em estresse oxidativo e conseqüentes alterações no sistema antioxidante das glândulas salivares, as quais estão associadas com aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e alterações na atividade de enzimas antioxidantes, como catalase, peroxidase e a superóxido dismutase. Os efeitos da falta parcial de insulina e do aumento da glicemia sobre a função das glândulas

salivares têm sido estudados pela indução química do diabetes em modelos de animais utilizando aloxana ou estreptozotocina.

Com isto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da irradiação com laser em baixa intensidade no metabolismo das glândulas parótidas e submandibulares de ratas diabéticas por estreptozotocina, através da análise de concentração total de proteína e atividade das enzimas catalase, peroxidase e amilase. Além disso, análise da concentração de glicose sangüínea foi também avaliada, uma vez que a hiperglicemia relaciona-se com as complicações do diabetes. Análises iônicas e histológicas foram também realizadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Glândulas salivares e saliva

As glândulas salivares são órgãos exócrinos importantes para manter a integridade dos tecidos orais, através da secreção salivar. As glândulas salivares maiores se encontram aos pares e incluem as glândulas parótidas (GP), submandibulares (GSM) e sublinguais (GSL), que são responsáveis por cerca de 90% da produção de saliva não estimulada, sendo os 10% restantes secretadas pelas glândulas salivares menores (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

A saliva é um fluido necessário para a saúde. Suas funções podem ser organizadas em 5 categorias, a saber: (a) lubrificação e proteção (b) capacidade tampão e de *clearance*, (c) manutenção da integridade dental, (d) atividade bacteriana, e (e) paladar e digestão. Essas funções são advindas dos componentes salivares que são muitas vezes secretados pelas glândulas salivares, como eletrólitos (sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfatos), imunoglobulinas, proteínas, enzimas (peroxidase, amilase, lisozima, catalase, superóxido dismutase, etc.), mucinas e produtos nitrogenados (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

A catalase de mamíferos, é uma proteína tetramérica com aproximadamente 60 kDa em cada subunidade, as quais possuem um grupo heme, ferroprotoporfirina IX, no sítio ativo, sendo internamente localizado, tornando seu acesso estreito, o que permite que apenas substratos de pequeno tamanho sejam alvos de sua ação

catalítica. A enzima também contém moléculas de NADPH (nicotinamina adenina dinucleotídeo-P) ligadas, a qual é essencial para prevenir a inativação da enzima. Além disso, a catalase é uma proteína reguladora, que libera NADP⁺ quando a célula está em estresse oxidativo, o que proporcionará maior remoção de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) pelo sistema glutathione redutase/peroxidase. Na presença da catalase, H₂O₂ é rapidamente convertido em H₂O (água) e O₂ (oxigênio), o que lhe confere potencial antioxidante (KIRKMAN; GAETANI, 2007).

A atividade da peroxidase é encontrada em secreções exócrinas, como lágrimas, leite e saliva. A peroxidase salivar é secretada pelas unidades secretoras das GP e GSM. Na presença de H₂O₂, a peroxidase oxida o SCN⁻ (tiocianato) em HOSCN/OSCN⁻ (ácido hipotiocianoso/hipotiocianato), o que lhe confere função antimicrobiana. Além disso, a peroxidase previne o acúmulo de H₂O₂, exercendo também papel antioxidante (IHALIN; LOIMARANTA; TENOVUO, 2006).

A α -amilase é a proteína mais abundante na saliva, é sintetizada principalmente pelas GP e exerce principalmente função digestiva, hidrolisando ligações glicosídicas. Está também associada com o *clearance* salivar, por possuir afinidade com várias espécies de streptococcus (OPPENHEIM et al., 2007).

A taxa de fluxo salivar é muito variável de indivíduo para indivíduo, e quando se apresenta baixo, aumenta o risco do paciente adquirir problemas bucais como alterações no paladar, na função mastigatória, deglutição e fala, além de diminuir a proteção da cavidade oral, alterar a microflora, resultar em uma mucosa ulcerada e dolorida e prejudicar o uso de próteses, o que prejudica a qualidade de vida do paciente. (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; NAGLER, 2002).

Aproximadamente 30% da população reportam algum grau de boca seca (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001). Drogas, terapia radioativa, doenças reumáticas

e imunológicas, como a síndrome de Sjögren, assim como algumas desordens genéticas, como síndrome de Down, podem causar a hipossalivação e/ou xerostomia (SIQUEIRA; NICOLAU, 2002; THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1994), aumentando o risco dos pacientes adquirirem cáries e outras infecções orais. Como tratamento paliativo da xerostomia inclui-se agentes lubrificantes ou substitutos salivares. Terapia para hipossalivação comporta sialogogos sistêmicos, os quais estimulam o fluxo salivar, no entanto causam efeitos colaterais (HARGITAL; SHERMAN; STROTHER, 2005; WISEMAN; FAULDS, 1995).

A principal função atribuída às glândulas salivares é a síntese de macromoléculas e sua secreção, juntamente com água e eletrólitos. A via do cAMP (adenosina monofosfato cíclico) parece ser a via reguladora intracelular preponderante que regula a exocitose (liberação das macromoléculas) das GP e GSM, porém a resposta exocitória pode também ser desencadeada pela ativação dos receptores colinérgico-muscarínicos, através da concentração de cálcio aumentada (BERRIDGE et al., 1984).

As glândulas salivares são compostas por unidades morfofuncionais denominadas adenômeros, que por sua vez são constituídos de unidades secretoras terminais que se abrem em ductos, os quais se reúnem com outros progressivamente mais calibrosos até desembocarem na cavidade oral (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). As unidades secretoras produzem uma saliva primária, isotônica em relação ao plasma. O sistema ductal funciona como regulador eletrolítico, dando à saliva uma característica hipotônica em relação ao plasma e será desta maneira que, este fluido será secretado ao meio bucal. Esta característica hipotônica, conseguida através da reabsorção de Na^+ (sódio) e Cl^-

(cloro), que ocorre quando a saliva passa pelo sistema ductal, facilita a sua função gustativa (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

As glândulas salivares de mamíferos possuem diversas similaridades, especialmente na organização da secreção dos produtos finais e no sistema de ductos. A GP é morfológicamente similar entre ratos e humanos, contendo células secretórias serosas e um sistema de ductos constituído de ductos intercalares, estriado e excretório. A GSM de roedores se diferencia dos humanos devido à falta de células mucosas secretórias (aproximadamente 10-20% das células secretórias em humanos) e devido à presença de um segmento ductal adicional, nomeado ducto granular, o qual secreta diversas enzimas e fatores de crescimento. Com isto, as glândulas salivares e a secreção salivar de ratos têm sido grandemente estudadas, uma vez que estudos com humanos não são frequentemente possíveis (NAGLER, 2002; TANDLER, 1993a,1993b).

2.2 Diabetes Mellitus

De acordo com o “Expert Committee on Diagnosis and Classification of *Diabetes Mellitus*”, *diabetes mellitus* (DM), consiste em um grupo de doenças metabólicas caracterizada por hiperglicemia, resultante de alterações na secreção da insulina, na ação da insulina, ou ambos (COMMITTEE, 2002). A Organização Mundial de Saúde (World Health Organization – WHO) estima que há atualmente no mundo, no mínimo 171 milhões de pessoas com diabetes. E para 2030 a tendência é que chegue a 366 milhões de pessoas.

Na condição de jejum, a homeostase de glicose depende do balanço entre a produção da glicose hepática e a utilização da glicose pelos tecidos dependente de insulina, como o fígado, músculo e tecido adiposo e os não dependentes de insulina, como cérebro e rins. Este balanço é regulado pelos hormônios pancreáticos (CHEATHAM; KAHN, 1995).

O pâncreas endócrino é o responsável pela origem da insulina, glucagon, somatostatina e do polipeptídeo pancreático e, conseqüentemente, disfunções no pâncreas endócrino ou resposta anormal dos tecidos alvos frente aos seus hormônios, resultam em sérios distúrbios na homeostase. No mínimo quatro tipos celulares (α , β , δ e F) têm sido identificados nas ilhotas de Langerhans, as quais constituem o pâncreas endócrino. As células β são as responsáveis pela produção da insulina, uma proteína constituída de 51 aminoácidos, a qual exerce funções no metabolismo protéico e lipídico, assim como na homeostase de glicose e na regulação do transporte de íons e aminoácidos (CHEATHAM; KAHN, 1995). Ela aumenta a permeabilidade celular através da estimulação da síntese de transportadores de glicose (GLUTs) e sua translocação para a membrana plasmática.

A ação da insulina nas células alvo se inicia com sua ligação em seus receptores da membrana plasmática (OLEFSKY, 1990). Estes receptores são glicoproteínas compostas de duas subunidades, sendo que a subunidade α reside extracelularmente e é o local de ligação com a molécula de insulina. A subunidade β atravessa a membrana e seu domínio citoplasmático, contém atividade de tirosina quinase, a qual inicia a via de sinalização intracelular, que apresenta dois objetivos: a via mitogênica, a qual media o efeito sobre o crescimento, e a via metabólica, a

qual regula o metabolismo dos nutrientes (CHEATHAM; KAHN, 1995; OLEFSKY, 1990).

No fígado, a insulina promove o anabolismo e inibe o catabolismo, através da síntese e estocagem de glicogênio e inibição da glicogenólise, aumenta a síntese de proteínas e triglicérides, inibe a gliconeogênese e a cetogênese, e promove a glicólise. No músculo, a insulina promove síntese de proteínas e de glicogênio, aumentando o transporte de glicose para dentro da célula, aumentando a atividade da glicogênio sintase e inibindo a atividade da glicogênio fosforilase. Muito embora o músculo estoque grande quantidade de glicogênio, o músculo não é fonte direta de glicose para o sangue, uma vez que não possui a enzima glicose-6-fosfatase, a qual está presente somente no fígado e nos rins, proporcionando a estes órgãos a função de contribuírem para o *pool* de glicose sistêmica. Gordura, em forma de triglicérides, é o meio mais eficiente de estocagem de energia. A insulina age no armazenamento de triglicérides nos adipócitos por diversos mecanismos: (1) Induz a produção de lipoproteína lipase no tecido adiposo, a qual leva à hidrólise de triglicérides das lipoproteínas circulantes, (2) Por aumentar o transporte de glicose para dentro das células de gordura, a insulina aumenta a disponibilidade de α -glicerol fosfato, substância usada na esterificação dos ácidos graxos livres em triglicérides, (3) A insulina inibe a lipólise intracelular de triglicérides estocados, por inibir a lipase intracelular. Com isto, a deficiência na secreção ou na sinalização da via da insulina, acarreta em diversas alterações no metabolismo protéico, dos carboidratos e gorduras. (GREENSPAN; GARDNER, 2004).

Alterações nos receptores de insulina, em concentração, afinidade ou ambos, afetarão a ação da insulina. No entanto, a resistência à insulina, resulta mais comumente, do defeito na via de sinalização intracelular pós-receptor. Além disso,

outro meio de não haver ação efetiva da via da insulina, é quando há comprometimento da sua produção, pelas células β do pâncreas.

Há dois tipos básicos de DM: (1) Tipo 1: pessoas que não produzem insulina; (2) Tipo 2: pessoas que não conseguem usar efetivamente a insulina produzida. A maioria das pessoas apresenta diabetes tipo 2. Existem ainda outros tipos de DM, como a gestacional, que se desenvolve durante a gravidez, porém desaparece em seguida (COMMITTEE, 2002). Alterações no metabolismo energético, como mutação no gene da glicoquinase ou no DNA mitocondrial, o qual afeta as subunidades dos complexos da cadeia respiratória, podem também levar ao DM (GERBITZ; GEMPEL; BRDICZKA, 1996). Diabetes tipo 1 ocorre devido à destruição das células β do pâncreas, ocasionada em 90-95% dos casos por um processo auto-imune. Na ausência de insulina, os três tecidos alvos principais da ação da insulina, fígado, músculo e tecido adiposo, falham na captação da glicose, ocasionando hiperglicemia. Além do mais, alterações no metabolismo das gorduras levam à produção e acumulação de cetonas. Com isto, os pacientes acometidos por este tipo de diabetes, são geralmente propensos à cetoacidose e requerem terapia de reposição insulínica (TRIPATHI; SRIVASTAVA, 2006).

A deficiência total de insulina resulta em acumulação de glicose e ácidos graxos circulantes, com conseqüente hiperosmolaridade e hipercetonemia. Poliúria, polidipsia, fraqueza, polifagia com perda de peso são características clínicas do paciente diabético tipo 1, em diagnóstico.

Diabetes tipo 2 afeta indivíduos que apresentam resistência insulínica, os quais geralmente possuem relativa deficiência de insulina. Estes são pacientes normalmente em idade adulta, com algum grau de obesidade, os quais não necessitam de insulina para sobreviver, muito embora a capacidade secretória de

insulina deteriore com o tempo, muitos necessitando de tratamento com insulina para obterem controle ótimo da concentração de glicose sangüínea (TRIPATHI; SRIVASTAVA, 2006). Cetose raramente ocorre espontaneamente, e se presente, ela é a conseqüência de estresse severo decorrente de trauma ou infecção. Quando os pacientes com DM tipo 2, predominantemente apresentam com resistência a insulina, o diabetes pode representar somente uma faceta da síndrome metabólica. Hiperglicemia, nestes pacientes, é freqüentemente associada com hiperinsulinemia dislipidemia e hipertensão. Indivíduos, não obesos, podem apresentar DM tipo 2. Neste caso, a deficiência na liberação da insulina pelas células β do pâncreas parece ser o maior defeito, no entanto, algum grau de resistência insulínica pode também contribuir (GREENSPAN; GARDNER, 2004; TRIPATHI; SRIVASTAVA, 2006).

As características clínicas dos pacientes com DM tipo 2 em diagnóstico são visão desfocada, vulvovaginite ou prurido e neuropatia periférica. Além disso, pode-se observar poliúria e fraqueza, no entanto não é tão característico como no diabetes tipo 1. Algumas vezes o paciente pode se apresentar assintomático (GREENSPAN; GARDNER, 2004).

Hiperglicemia crônica, no DM, está relacionada com danos a longo prazo, disfunções ou falência de vários órgãos, especialmente, olhos, rins e coração e alterações no sistema nervoso e vasos sangüíneos. Macro e microangiopatias e neuropatia estão dentre as principais complicações crônicas do DM (BROWNLEE; CERAMI, 1981). Nos tecidos, a hiperglicemia pode resultar em estresse oxidativo celular, através da super produção de espécies reativas de oxigênio (HUNT; DEAN; WOLFF, 1988; KOYA; KING, 1998; WILLIAMSON et al., 1993), o que acarreta em mudanças nos parâmetros antioxidantes (KAKKAR et al., 1995; OBERLEY, 1988),

implicações das funções celulares e contribuição para patofisiologia de diversas doenças (BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2000).

Vários mecanismos parecem estar envolvidos no desenvolvimento do estresse oxidativo na presença de elevada concentração de glicose sangüínea, como a autooxidação da glicose, glicação de proteínas, formações dos AGEs (advanced glycation endproducts) e a via do poliol (BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2000; TRIPATHI; SRIVASTAVA, 2006). Além disso, o aumento da glicose no sangue pode levar ao aumento na atividade e de mRNA das enzimas antioxidantes (Cu-Zn-superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) (CERIELLO et al., 1996). Esta super expressão das enzimas antioxidantes pode constituir uma resposta para o estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia.

Nos pacientes diabéticos, há também relatos de deficiências iônicas. A deficiência em magnésio é o distúrbio mais evidente do metabolismo dos metais no diabetes (DE VALK et al., 1999; SJOGREN; FLOREN; NILSSON, 1986). Além disso, a deficiência do zinco também tem sido comumente descritas nos pacientes com diabetes (SJOGREN; FLOREN; NILSSON, 1988).

2.3 Diabetes e glândulas salivares

Numerosos estudos clínicos relataram maior incidência e severidade de moléstias orais em pacientes com baixo controle do DM em comparação com grupos controles, sendo as complicações orais de xerostomia, hipossalivação, problemas periodontais, perda dental, disgeusia, sialose, abscessos odontogênicos e lesões de

tecido mole, língua e mucosa oral, as mais associadas com o DM (CIANCIOLA et al., 1982; MANFREDI et al., 2004; MOORE et al., 2001). No entanto, alguns autores também descrevem alterações na função das glândulas salivares de pacientes diabéticos bem-controlados (MATA et al., 2004), sendo que o DM tipo 2, muito embora altere qualitativamente a função salivar, comparado com o tipo 1, apresenta alterações quantitativamente menos severas (MATA et al., 2004).

Alterações iônicas na secreção salivar de pacientes diabéticos tipo 1 e 2 também foram descritas na literatura. Aumento de Ca^{2+} (cálcio), Mg^{2+} (magnésio) e K^+ (potássio), e diminuição de Zn^{2+} (zinco) foram relatados e relacionados com alterações na cavidade oral destes pacientes, como aumento de cálculo e conseqüentemente doença periodontal, assim como alterações nas atividades das enzimas salivares (MATA et al., 2004; YAGO et al., 2002).

Considerando-se que as glândulas salivares respondem aos estímulos simpáticos e parassimpáticos, alguns estudos avaliaram a influência do diabetes na síntese e secreção de neurotransmissores, assim como na sensibilidade dos receptores. Um modelo de rato diabético do tipo 2 apresentou uma diminuição na síntese e secreção de noradrenalina em parótida e submandibular, além disso, o fluxo salivar em resposta a estimulação de receptores adrenérgicos também sofreu redução, quando comparada com o grupo controle, o que sugere um comprometimento da transmissão simpática em glândulas salivares (VATTA et al., 2002). Outros autores relataram que a redução no fluxo salivar pode estar associada à diminuição da sensibilidade de receptores muscarínicos em decorrência do diabetes (WATANABE; YAMAGISHI-WANG; KAWAGUCHI, 2001). Além de neuropatias, alterações vasculares também são relatadas como causas de

complicações orais do paciente diabético (ANDERSON; GARRETT, 2004), assim como o uso de medicações (MANFREDI et al., 2004).

As alterações na composição das glândulas salivares decorrentes da falta de insulina e conseqüente hiperglicemia são estudadas através da indução do DM por estreptozotocina (STZ) ou aloxana. A indução do DM em ratos utilizando estas drogas diabetogênicas, que destroem seletivamente as células β do pâncreas, é eficaz e fácil de usar.

Na literatura há relatos dos efeitos da condição diabética quimicamente induzida, nas glândulas salivares de ratos, no entanto, os resultados muitas vezes se mostram conflitantes. Alguns autores demonstraram diminuição na concentração total de proteínas em ratos diabéticos induzidos por aloxana ou STZ (ANDERSON, 1983) e outros não demonstram diferenças (KIM et al., 1990; ZEBROWSKI; BRIMMER, 1978). Assim como no pâncreas, a atividade e expressão da amilase em GP apresentam-se diminuída em animais diabéticos (ANDERSON, 1983; ANDERSON; BEVAN, 1992; ANDERSON; JOHNSON, 1981; KIM et al., 1990), no entanto com a introdução de insulina, a atividade e a expressão da amilase aumenta (ANDERSON, 1983; ANDERSON; BEVAN, 1992; KIM et al., 1990). Com relação à atividade da peroxidase, há relatos de aumento com 14, 21 e 28 dias de diabetes (ANDERSON, 1983). A concentração de ácido siálico mostrou-se inalterada em GP e GSM (ZEBROWSKI; BRIMMER, 1978), no entanto aumento da sua concentração em GSM já foi também descrita (NICOLAU; ROSA; FAVA-DE-MORAES, 1969). Com relação à catalase, alguns autores demonstram alterações em sua atividade nas GP e GSM (NOGUEIRA et al., 2005). Além disso, embora o DM comprometa o armazenamento de glicogênio hepático e muscular, em glândulas salivares, um

aumento da concentração de glicogênio e da atividade da glicogênio sintase, bem como uma redução da glicogênio fosforilase foi observado (NICOLAU et al., 2005).

Análises histológicas demonstram diminuição no número de grânulos de secreção salivar e grande quantidade de vacúolos, com lipídeos em seu interior, no citoplasma das células serosas e mucosas das glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais dos animais diabéticos (ANDERSON; JOHNSON, 1981; HAND; WEISS, 1984; MAHAY et al., 2004). Este acúmulo é rápido, iniciando-se em torno de 24 horas após indução do diabetes e nas GP e GSM pode ocorrer nos ácinos e no ducto intercalar (HAND; WEISS, 1984). As células serosas das GP apresentam maior quantidade destes grânulos quando comparadas com as células seromucosas das GSM (ANDERSON; GARRETT, 1986). Além disso, quanto maior a quantidade de glicose sangüínea, maior a porcentagem lipídica no interior das células glandulares (ANDERSON; GARRETT, 1986). A causa deste acúmulo lipídico nas células das glândulas salivares de ratos diabéticos, segundo alguns autores, pode ocorrer devido ao aumento da captação de triglicérides para ser usado como fonte de energia, ou pelo uso diminuído destes triglicérides (ANDERSON; GARRETT, 1986).

2.4 Laser

Laser é um acrônimo de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*. Desde o desenvolvimento do primeiro laser por Maiman em 1960, a utilização de lasers na medicina assim como na odontologia vêm crescendo a cada

dia. Oftalmologia, dermatologia, periodontia, semiologia e dentística são algumas especialidades que se utilizam desta nova tecnologia.

Muitas investigações das possíveis aplicações médicas dos lasers estão sendo realizadas. Os lasers são divididos na literatura em duas classes, de acordo com o efeito proporcionado aos tecidos biológicos. Os lasers de alta potência trabalham com o efeito térmico no tecido que absorve a luz, sendo usados para incisionar ou vaporizar tecido mole (AZEVEDO et al., 2007; GONTIJO et al., 2005) , ablacionar ou causar fusão e resolidificação em tecido duro (FREITAS et al., 2007; GOUW-SOARES et al., 2001; SIMOES et al., 2006), coagular e descontaminar o tecido alvo (GOUW-SOARES et al., 2001) . Já os lasers de baixa potência estão relacionados a efeitos fotoquímicos, fotobiológicos e fotofísicos nos tecidos (BAXTER, 1997; KARU, 1989; TUNER, 2007). No entanto, lasers de alta potência podem trabalhar em baixa intensidade, como os lasers de baixa potência, quando usados de maneira desfocada em relação ao tecido alvo (POURZARANDIAN et al., 2005; TUNER, 2007).

Os efeitos terapêuticos dos lasers de baixa potência de diferentes comprimentos de onda e doses são conhecidos, no entanto o mecanismo de ação da irradiação laser nas células vivas não é ainda completamente entendido (KUJAWA et al., 2004). A fototerapia com laser em baixa intensidade (FLBI) demonstra efeitos básicos: antiinflamatório, analgésico e de biomodulação (MIDDA; RENTON-HARPER, 1991; SCHINDL et al., 2000), sendo utilizada como coadjuvante em quase todos os procedimentos clínicos odontológicos.

A FLBI é caracterizada quando se faz uso do laser, na região do vermelho ou infravermelho próximo, em baixa intensidade, onde qualquer efeito biológico observado é atribuído a evento não térmico (GAVISH et al., 2004). Quando há a

interação da matéria com a luz laser, certas funções celulares poderão ser estimuladas (RIBEIRO, 2000), sendo este efeito mais acentuado sobre órgãos ou tecidos enfraquecidos, tais como em pacientes que sofrem algum tipo de desordem funcional ou de injúria ao tecido (KARU, 1989; TUNER, 2007; TUNER; HODE, 1998).

A região do espectro terapeuticamente mais efetiva é a compreendida no visível (vermelho) e infravermelho próximo (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004), correspondendo esta região com características energéticas e níveis de absorção relevantes para a cadeia respiratória (KARU, 1986; WILDEN; KARTHEIN, 1998). Basicamente, dois tipos de reações ocorrem na fotobiologia: (1) as reações primárias, que ocorrem na presença da luz e (2) as reações secundárias que ocorrem sem a presença da luz, podendo ser horas ou até dias após a irradiação.

As reações fotoquímicas e fotofísicas primárias relacionam-se com (1) absorção da luz pelas enzimas mitocondriais resulta em aquecimento local seguido por liberação de cálcio mitocondrial para o citoplasma (OLSON; SCHIMMERLING; TOBIAS, 1981), (2) alterações no transporte de elétrons da cadeia respiratória (KARU, 1988; VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004), (3) alteração dos canais de cálcio da membrana plasmática (SMITH, 1991), (4) produção de radicais livres (GROSSMAN et al., 1998; JORI, 1996), (5) Fotoreativação da Cu-Zn Superóxido Dismutase (SOD) (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004) (6) Foto-desligamento do óxido nítrico dos carreadores de elétrons (KARU; PYATIBRAT; AFANASYEVA, 2005; VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004).

Após a absorção da energia luminosa uma cascata de reações bioquímicas é iniciada, caracterizando as reações secundárias (Figura 2.1), as quais são importantes para sinalizarem ao núcleo o estímulo ocorrido. Segundo Karu, após a

absorção do laser em baixa intensidade pelos componentes celulares da cadeia respiratória nas mitocôndrias, ocorrem diversas reações bioquímicas em toda célula que traduzem o estímulo sofrido e sinalizam ao núcleo propiciando a resposta biológica (KARU, 1989,1999)

A ativação da cadeia respiratória pela FLBI resulta em um maior bombeamento de prótons (H^+) para o espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria (espaço intermembrana). Devido à maior concentração de H^+ fora da matriz mitocondrial, há a formação de gradiente eletroquímico de H^+ , que o impulsiona a entrar novamente para matriz mitocondrial (força próton-motriz) promovendo a síntese de ATP (adenosina trifosfato). Como consequência do aumento de H^+ ocorre queda no pH no espaço intermembrana e no citosol, além disso é observado também o aumento do potencial de membrana ($\Delta\Psi$) (Figura 2.1).

O aumento intracelular de H^+ estimula a entrada de Na^+ e saída de H^+ na célula, promovendo a alcalinização citoplasmática. Com a entrada de Na^+ , há ativação da bomba Na^+/K^+ ATPase, aumentando a concentração de K^+ intracelular e diminuição do Na^+ , restabelecendo o equilíbrio osmótico celular. A variação destes parâmetros intracelulares é um componente necessário no controle da atividade proliferativa da célula. As alterações na cadeia respiratória, também influenciam no fluxo de Ca^{+2} e cAMP, que são sinalizadores nucleares. Com isto, o núcleo é capaz de aumentar a síntese de DNA (ácido desoxirribonucléico) e RNA (ácido ribonucléico), aumentando a proliferação celular e a síntese de proteínas (Figura 2.1).

Por outro lado, altos níveis de Ca^{+2} intracelular também podem levar à inibição do metabolismo celular (FRIEDMANN et al., 1991). Recentemente, tem sido claramente mostrado que tanto a estimulação quanto a inibição da entrada de Ca^{+2}

nas células de mamíferos podem ser induzidos por luz vermelha monocromática dependendo da dosagem aplicada.

Alguns dos efeitos secundários da fototerapia relatados na literatura são: aumento no metabolismo celular, aumento da síntese de DNA e RNA no núcleo celular, com conseqüente proliferação celular e síntese de proteína, como as fibras colágenas produzidas pelos fibroblastos, diferenciação celular (fibroblastos em miofibroblastos); alteração no potencial de ação de células nervosas; efeitos sobre o sistema imunológico (ativação de linfócitos); estimulação da microcirculação e formação de capilares, estimulada pela liberação de fatores de crescimento e aumento na atividade de leucócitos (ANDERS et al., 1993; BISHT et al., 1994; EFENDIEV et al., 1992; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006; LOEVSCALL; ARENHOLT-BINDSLEV, 1994; MARQUES et al., 2004; MESTER; SNOW; SHAMAN, 1991; YU; NAIM; LANZAFAME, 1994).

Reações secundárias:

Citoplasma: $\uparrow$ mudança redox, $\uparrow$ ATP, $\downarrow$ pH, ativação/inibição enzimática

Membrana Celular: Na⁺/H⁺ antiporter, Na⁺/K⁺ ATPase

Citoplasma: $\uparrow$ pH, [Ca⁺⁺], cAMP

Sinalização para o núcleo

Núcleo: $\uparrow$ síntese DNA, RNA

Proliferação Celular / Síntese Proteína

MACRO EFEITOS

- Modulação Inflamação
- Analgesia
- Reparação tecidual

Figura 2.1- Teoria de mecanismo de ação dos lasers em baixa intensidade (KARU, 1988; KARU, 1986). Figura de célula extraída de primeirobhp.vilabol.uol.com.br/celulas.htm

A FLBI pode tanto estimular como inibir os processos celulares (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006). Os principais responsáveis por estes efeitos estimulatórios e inibitórios são os fotorreceptores primários (KARU, 1987). Em altas doses de energia, os fotorreceptores são danificados e os efeitos diminuídos. Doses ainda maiores, estes fotorreceptores são destruídos e ocorre inibição no crescimento e letalidade das culturas quando estas são irradiadas (FRIEDMANN et al., 1991; MESTER; MESTER; MESTER, 1985; SCHINDL et al., 2000).

Estudos celulares indicam que além do aumento na produção de ATP (KARU; PYATIBRAT; KALEND, 1995), a FLBI também causa mudanças estruturais e bioquímicas nas mitocôndrias. Em 1989, Karu (KARU, 1989) constatou mudanças também na concentração de cAMP em cultura de células irradiadas com luz em 632 e 404 nm, fornecendo evidências de que a ação da luz visível sobre as células pode ser relacionada também com a regulação do metabolismo celular via cAMP. Também foi constatado pela autora que a interação entre a luz visível monocromática com a mitocôndria, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio. No entanto, Parlato et al. (1983), não constatou diferença na atividade da enzima superóxido dismutase na pele de ratos irradiados com laser de He-Ne (Hélio-Neônio - 632 nm) e os do grupo controle.

O efeito da FLBI pode ser avaliado pela atividade de algumas enzimas, dentre outras análises bioquímicas. Pourzarandian et al, (2005), demonstraram que a irradiação em baixa intensidade do laser Er:YAG (Érbio – 2.940nm) em dose de 5 J/cm² aumentou os níveis da lactado desidrogenase, enzima marcadora de morte celular, em cultura de células de fibroblastos gengivais. Onac, Pop e Onac (1999) mostrou aumento no nível de colinesterase, de proteínas e da glicemia no soro de cobaias após irradiação com laser com comprimento de onda de 632 nm (ONAC;

POP; ONAC, 1999). Lombard (1999), observaram aumento na atividade da enzima isocitrato desidrogenase de coração de porco, após irradiação com laser de He-Ne. Artyukhov et al. (2000), mostraram aumento da atividade da enzima catalase de fígado de boi, *in vitro*, depois da exposição à luz laser vermelha. Hubacek e Matouskova (1987), analisaram o efeito *In vivo* da irradiação com laser de He-Ne na lisozima salivar, onde os pacientes irradiados mostraram na maioria, o nível desta enzima aumentado (HUBACEK; MATOUSKOVA, 1987).

Além de haver poucos trabalhos na literatura que analisam o efeito da irradiação laser em parâmetros bioquímicos dos tecidos irradiados, estes estudos, muitas vezes não apresentam todos os parâmetros da irradiação, assim como apresentam diferentes protocolos, no que diz respeito, dentre outras coisas, à dose e ao modo de aplicação.

2.5 Laser, glândulas e diabetes

Poucos estudos foram realizados analisando o efeito da irradiação nas glândulas salivares. Takeda (1988) analisou o efeito da irradiação com laser de baixa potência GaAs, 904 nm, em GSM de ratos e constatou aumento do número de mitoses, principalmente, nas células epiteliais do ducto granular e após 24 h da irradiação, do grupo irradiado com 760 Hz (TAKEDA, 1988). Plavnik e colaboradores, em 2003, relataram que a irradiação com laser de He-Ne, com 11,2 J/cm² de total de energia aplicada por área, altera a síntese protéica e a secreção das glândulas salivares de cobaias, além de produzir modificações estruturais

relacionadas com a inflamação em 0-12 h após a irradiação, quando houve necrose das células do parênquima glandular (PLAVNIK; DE CROSA; MALBERTI, 2003). Ambos os trabalhos descritos acima, expuseram as glândulas submandibulares para irradiação. Alterações de fluxo salivar e da composição das glândulas salivares foram previamente demonstradas por nosso grupo, quando as GP e GSM de ratos foram irradiadas transcutaneamente com laser infravermelho em doses de 4 e 8 J/cm² (SIMOES et al., 2008a; SIMOES et al., 2008b).

Clinicamente, a FLBI tem sido inicialmente usada em pacientes com síndrome de Sjögren, que apresentam hipossalivação, e resultados preliminares mostraram que as glândulas salivares reagem rapidamente ao tratamento (TUNÉR; HODE, 1999). Além disso, Cowen et al. (1997), mostraram uma melhora na produção salivar, assim como na habilidade de deglutição nos pacientes submetidos à quimioterapia e que foram irradiados, na cavidade oral, com laser de He-Ne por cinco dias consecutivos.

O DM interfere com a cicatrização normal do tecido, principalmente devido às alterações circulatórias e as alterações na deposição de colágeno (BLAKYTN; JUDE, 2006; CHRISTOPHERSON, 2003). Em pacientes com DM, o uso da FLBI ocorre principalmente visando o efeito de biomodulação, com o objetivo de reparar ulcerações crônicas que levam muitas vezes à amputação, principalmente dos membros inferiores, dos pacientes que apresentam esta doença (KAWALEC et al., 2004; YU; NAIM; LANZAFAME, 1997). A FLBI estimula proliferação celular e a produção de proteínas, modula o processo inflamatório e conseqüentemente diminui o tempo de reparação tecidual nos ratos diabéticos irradiados (BYRNES et al., 2004; REDDY, 2003; YU; NAIM; LANZAFAME, 1997).

Uma revisão na literatura revela que faltam dados a respeito do efeito dos lasers de baixa potência no metabolismo das glândulas salivares e que em glândulas de ratos diabéticos não existem estudos preliminares.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste trabalho foi analisar o efeito da irradiação com laser em baixa intensidade no metabolismo das GP e GSM de ratas diabéticas induzidas com estreptozotocina. Além disso, análise da glicemia também foi realizada, uma vez que a hiperglicemia se relaciona com as complicações crônicas do diabetes.

Os objetivos específicos foram realizar as seguintes análises:

- Concentrações totais de proteína nas GP e GSM;
- Atividade das enzimas peroxidase, catalase e amilase nas GP e GSM;
- Concentração de sódio, zinco, magnésio, fósforo, potássio e cálcio nas GP e GSM;
- Análise histológica das GP e GSM;
- Análise glicêmica com os animais em jejum, no dia de diagnóstico e no dia do sacrifício,
- Análise glicêmica com os animais alimentados, imediatamente antes e após a irradiação laser,
- Análise de peso, ingestão de água e consumo de alimento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética

O presente trabalho foi aprovado pela Subdivisão de Estudos com Animais do Comitê em Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), com o protocolo número: 17/05 (Anexo A).

4.2 Animais

Foram utilizadas 120 ratas da raça Wistar do Biotério do Centro de Pesquisa em Biologia Oral da FOUSP, pesando aproximadamente 195 g. Durante o período experimental os animais foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso à água e alimento. Os animais foram divididos em diabéticos (D) e controles (C), sendo aleatoriamente subdivididos em 8 grupos (n=15), de acordo com a dose de irradiação laser recebida: **C-D0** (0J/cm²), **C-D5** (5J/cm²), **C-D10** (10J/cm²), **C-D20** (20J/cm²) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 Parâmetros de irradiação do laser propostos para os diferentes grupos

Grupo	Condição	Potência (W)	Fluência (J/cm ²)	Tempo Irradiação por ponto (s)
D0	Diabético	0,10	0,0	0,0
D5	Diabético	0,10	5,0	1,0
D10	Diabético	0,10	10,0	2,0
D20	Diabético	0,10	20,0	4,0
C0	Não Diabético	0,10	0,0	0,0
C5	Não Diabético	0,10	5,0	1,0
C10	Não Diabético	0,10	10,0	2,0
C20	Não Diabético	0,10	20,0	4,0

4.3 Indução do diabetes

Após um período de aproximadamente 15 horas em jejum, foi aplicado, intraperitonealmente, uma dose de 60 mg/kg de peso corporal (p.c.) de estreptozotocina (STZ), dissolvida em tampão de citrato de sódio 0,1 M, pH 4,5, para a indução do diabetes nos animais dos grupos “D”. Nos animais não diabéticos (grupos “C”), foi injetado apenas o tampão. Para a confirmação da condição diabética, foi realizada glicemia 72 horas após a indução do diabetes (ver item 4.7).

4.4 Fase experimental

Após 29 dias da injeção de STZ/tampão, os animais foram anestesiados com Hidrato de Cloral (400 mg/kg p.c.) e Barbital Sódico (50 mg/kg p.c.) e a tricotomia foi realizada nas áreas das GP e GSM. Os animais foram então irradiados ou não como se segue (Tabela 4.1):

Grupos D-C0: animais diabéticos e não diabéticos, respectivamente, onde somente a simulação da irradiação foi realizada;

Grupos D-C5: animais diabéticos e não diabéticos respectivamente, irradiados com 5 J/cm²;

Grupos D-C10: animais diabéticos e não diabéticos respectivamente, irradiados com 10 J/cm²;

Grupos D-C20: animais diabéticos e não diabéticos respectivamente, irradiados com 20 J/cm²;

Após 24 horas da irradiação, os animais foram eutanasiados, por destroncamento medular após anestesia com Hidrato de Cloral (400 mg/kg p.c.) e Barbital Sódico (50 mg/kg p.c.), e as PG e SMG foram removidas, prensadas em placa de alumínio previamente congelada e estocadas a – 80°C até o momento das análises bioquímicas. Para as análises histológicas, no momento da remoção das glândulas, estas foram lavadas em tampão PBS e fixadas em Methacarn (veja no item 4.12).

4.5 Irradiação com laser em baixa intensidade

O laser de diodo Quantum (Ecco Fibras® - Figura 4.1), com comprimento de onda de 660 nm (vermelho), do Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO-FOUSP), foi utilizado para o estudo.

Figura 4.1- Laser de diodo Quantum (Ecco Fibras®) e a ponteira usada no estudo

As áreas das GP (direita e esquerda) e GSM (as duas juntas) foram previamente demarcadas com um círculo de aproximadamente $1,13 \text{ cm}^2$, o que resultou em três áreas a serem irradiadas (Figura 4.2a). Tricotomia para remoção dos pêlos dos animais foi realizada nestas regiões (Figura 4.2a).

Figura 4.2- Demarcações das glândulas parótidas e submandibulares, prévias à irradiação (a) e irradiação pontual na região da glândula parótida esquerda (b)

A irradiação foi realizada de maneira pontual (Figura 4.2b), e um número de 64 pontos, em cada uma das três áreas, foi padronizado (Figura 4.3). A variação entre os grupos ocorreu na dose e no tempo de aplicação. A potência foi fixa em 100 mW (Tabela 4.1). Os cálculos realizados obedeceram à fórmula:

$$T = \frac{DE \times A}{P} \quad (1)$$

(1) T= tempo (s); DE= densidade de energia (J/cm²); A= Área (cm²) e P= Potência (W)

Levando-se em consideração uma perda de 10% do aparelho e tentando-se obter números inteiros no tempo (em segundos), as doses dos grupos foram ajustadas, como se segue:

$$\text{Grupo D-C5: } 1 = \frac{X \times 0,0177}{0,1} \rightarrow X = 5,65 - 10\% = 5,08 \text{ J / cm}^2;$$

$$\text{Grupo D-C10: } 2 = \frac{X \times 0,0177}{0,1} \rightarrow X = 11,30 - 10\% = 10,17 \text{ J / cm}^2;$$

$$\text{Grupo D-C20: } 4 = \frac{X \times 0,0177}{0,1} \rightarrow X = 22,60 - 10\% = 20,34 \text{ J / cm}^2;$$

Sendo a área irradiada de 1,1304 cm² e a área do spot do laser 0,0177 cm², foram necessários 64 pontos para que toda a área das glândulas fosse coberta (1,1304 ÷ 0,01766 = 64,01 *pontos*). Estes pontos foram distribuídos da seguinte forma:

Figura 4.3- Distribuição dos pontos de irradiação

4.6 Obtenção das amostras

Para as análises bioquímicas, após o sacrifício dos animais, as glândulas salivares foram imediatamente removidas, limpas de tecidos aderentes e prensadas entre placas de alumínio, previamente mantidas em gelo seco. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C .

No momento das análises da atividade da amilase, peroxidase, catalase e da concentração de proteína total as amostras foram descongeladas, homogeneizadas a 10% (100 mg/ml) em tampão fosfato de sódio pH 6,0 e centrifugadas a $1540 \times g$ por 10 minutos.

Análise dos íons Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} , Mg^{2+} , P^{3-} , Zn^{2+} também foram realizadas nas GP e GSM (Item 4.13).

Para as análises histológicas as glândulas foram também removidas imediatamente após o sacrifício dos animais, foram mergulhadas em tampão PBS, fixadas e levadas ao Laboratório de Histofisiologia, no Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP, onde foram processadas. As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia dos Tecidos Mineralizados, também no ICB.

4.7 Determinação da glicemia

A determinação da glicemia foi realizada com os animais em jejum de aproximadamente 15 h, 72 h após a administração da STZ, para o diagnóstico do diabetes (através da coleta de sangue caudal) e no dia do sacrifício (através da coleta de sangue do coração), para análise comparativa com a glicemia de diagnóstico. Além disso, a concentração da glicose no sangue foi também aferida antes e após a simulação ou irradiação do laser (através da coleta de sangue caudal), para se observar o efeito imediato da irradiação na glicemia. Nesta ocasião, os animais não foram privados da alimentação. As glicemias foram analisadas através de um glicosímetro (Accu-Chek - Roche® - Figura 4.4).

Figura 4.4- Glicosímetro (Accu-Chek - Roche®)

4.8 Atividade enzimática da amilase

A atividade enzimática da amilase foi determinada pelo método descrito por Fisher e Stein (FISHER; STEIN, 1961) e modificado por Bellavia et al. (BELLAVIA et al., 1979). As amostras foram incubadas com solução de amido 1% em tampão fosfato de sódio por cinco minutos a 37°C. A reação foi interrompida com 0,4 ml de uma solução alcalina de ácido dinitrossalicílico, em seguida os tubos foram mantidos em água fervente por também 5 minutos e a absorbância foi medida a 530 nm. Foi utilizada como padrão uma solução de maltose.

4.9 Atividade enzimática da peroxidase

A determinação da peroxidase foi realizada pelo método de Chandra (CHANDRA; DAS; DATTA, 1977), modificado por Anderson (ANDERSON, 1986). Este método consiste na medida da variação da absorbância 460 nm, pelo espectrofotômetro, do homogenado das glândulas, de tampão fosfato 10 mM, o-dianisidina 10 mM e H₂O₂ 2,1 mM. Foi utilizada como padrão a solução de lactoperoxidase.

4.10 Concentração total de proteínas

A determinação de proteína foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), usando-se como padrão a albumina de soro bovino. Neste método, as proteínas em meio alcalino reagem com o cobre, formando um complexo. Este complexo reduz o reativo de folin-ciocalteu, resultando numa coloração azulada, que foi lida em espectrofotômetro a 660 nm.

4.11 Atividade enzimática da catalase

A atividade da enzima catalase seguiu o método postulado por Aebi, o qual se baseia no acompanhamento da decomposição do H_2O_2 , determinada espectrofotometricamente a 240 nm durante 5 minutos (AEBI, 1984).

4.12 Análise morfológica

As glândulas foram fixadas em solução de Methacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10 % ácido acético) em 4°C durante 3 horas, desidratadas e embebidas em Paraplast®. Secções de 5 µm de espessura, foram colocadas em lâminas com Poly-y-lisine® e coradas com hematoxilina e eosina. Os cortes foram observados por Microscópio Óptico (Aristoplan – Leitz).

4.13 Análises iônicas

A concentração dos íons sódio, potássio, magnésio, cálcio, fósforo e zinco foi medida através de espectrofotômetro de emissão atômica com fonte de excitação de argônio induzido, usando um espectrofotômetro seqüencial (Spectroflame Spectro Co). Os padrões contendo os vários elementos estudados foram preparados a partir de solução de sal espectrograficamente puro em ácido acético. As amostras das GP e GSM foram solubilizadas através de aquecimento em chapa elétrica das glândulas previamente colocadas em solução de ácido nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio 30%. O filtrado foi completado com água até o volume de 10 ml e armazenado a 4°C até o momento das análises.

4.14 Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo teste estatístico de análise de variância (ANOVA) e o teste de contraste de Tukey, aceitando-se uma significância de 5%.

5 RESULTADOS

Os animais selecionados para o presente estudo apresentaram média de peso de aproximadamente 195 g. No final de 30 dias do experimento, os animais diabéticos apresentaram estabilidade de peso. No entanto, os animais não diabéticos apresentaram ganho de peso corporal de 15-19% em todos os grupos (Tabela 5.1), muito embora o consumo de água e a ingestão de alimento tenham sido significativamente maiores nos grupos de animais diabéticos (Tabela 5.2).

A concentração limite de glicose no sangue utilizada para o diagnóstico do diabetes foi de 250 mg de glicose/dl sangue e foi aferida através de um glicosímetro, 72 h após a injeção de STZ, com os animais em jejum de aproximadamente 15 h. Todos os grupos diabéticos apresentaram média da glicemia de diagnóstico superior a 300 mg/dl de sangue e os animais não diabéticos abaixo de 100 mg/dl de sangue (Figura 5.1).

No dia do sacrifício (30 dias após a injeção de STZ/tampão), a glicemia também foi analisada e observou-se um aumento significativo para todos os grupos de animais sadios, quando comparada com a glicemia de diagnóstico. Estes aumentos foram de 79, 95, 82 e 97% para os grupos C0, C5, C10 e C20, respectivamente. De maneira contrária, a glicemia de sacrifício para os animais diabéticos, se mostrou diminuída com relação à concentração de glicose sangüínea observada no diagnóstico do diabetes. Esta diminuição foi somente significativa, estatisticamente, para os grupos D5 e D20 (23 e 56%, respectivamente), os quais receberam doses de 5 e 20 J/cm² (Figura 5.1).

Imediatamente antes e após a irradiação de laser ou simulação (no caso dos grupos D-C0) a glicemia foi aferida. Como mostrado na figura 5.2, nos grupos dos animais diabéticos, houve pequena tendência de diminuição da glicemia, sendo só significativa para o grupo D10, que mostrou valores iniciais de $527,91 \pm 76,44$ mg/dl e finais de $456,82 \pm 58,86$ mg/dl. No entanto, para os animais não diabéticos, a tendência foi de aumento e a significância aconteceu para o grupo C20, com valores iniciais de $106,83 \pm 19,89$ mg/dl e finais de $141,25 \pm 36,48$ mg de glicose/dl de sangue.

5.1 Glândulas parótidas

Com relação às GP, comparando-se os animais diabéticos não irradiados (D0), com os não diabéticos sem irradiação (C0), observamos aumento na atividade das enzimas peroxidase e catalase (Figuras 5.3 e 5.4). Com a aplicação do laser, a atividade da peroxidase, nos animais diabéticos (D5-20), não foi revertida para os valores do grupo não diabético. Inversamente, no grupo C5 (5 J/cm^2), um aumento da atividade desta enzima foi observado nos animais sadios, equivalendo-se aos animais diabéticos. Com relação à atividade da catalase, esta apresentou diminuição de sua atividade, nos animais diabéticos que receberam 5 e 20 J/cm^2 , para valores iguais aos não-diabéticos (Figura 5.3) ($p > 0,05$). Nos animais sadios, muito embora um aumento de sua atividade nos animais que receberam 10 J/cm^2 , foi observado, este aumento não foi estatisticamente significativo.

A concentração total de proteína não se alterou com a aplicação do laser em nenhum grupo estudado (Figura 5.5). A amilase, por sua vez, mostrou aumento de sua atividade no grupo D5, em relação à D0. No entanto, para os animais não-

diabéticos, as doses de 10 J/cm² e 20 J/cm² foram às responsáveis pelo aumento na atividade da enzima (Figura 5.6).

Com relação à concentração iônica, com irradiação de 5 J/cm², a concentração de Na⁺ foi maior nos animais diabéticos, em comparação com os não-diabéticos ($p<0,05$). Para o Ca²⁺, foi maior nos animais não-diabéticos irradiados com 10 J/cm², quando comparados com os animais diabéticos de mesma dose. No entanto, quando há a comparação dentro dos animais diabéticos, com doses diferentes de irradiação, observa-se que as doses de 5 e 20 J/cm² mostraram valores de Ca²⁺ aumentados, sendo este aumento significativo somente para o D20 ($p<0,05$) (Tabela 5.3).

As análises histológicas mostraram acúmulo de lipídeos no citoplasma das células acinares das glândulas parótidas. Com a irradiação laser, em todas as doses, ocorreu uma diminuição deste acúmulo lipídico (Figuras 5.7 e 5.8).

5.2 Resultados glândulas submandibulares

Com relação às GSM, comparando-se D0 com C0, observa-se aumento na atividade das enzimas peroxidase e catalase (Figuras 5.9 e 5.10) ($p<0,05$), da mesma maneira que o ocorrido com as GP. Com a aplicação do laser, a atividade da catalase, em todas as doses irradiadas (5, 10 e 20 J/cm²), apresentou valores similares aos animais não diabéticos ($p>0,05$) (Figura 5.9). Nos animais sadios, não houve efeito do laser na atividade da catalase. Para a peroxidase, o laser diminuiu sua atividade a valores similares aos animais não-diabéticos, no grupo D5 ($p>0,05$).

Com a dose de 10 J/cm^2 , não houve ação do laser nos animais diabéticos, no entanto, para os animais não-diabéticos, a atividade da peroxidase aumentou com relação aos animais não diabéticos que não receberam laser ($p < 0,05$), estes valores se aproximaram das médias obtidas para os animais diabéticos ($p > 0,05$) (Figura 5.10).

A concentração total de proteína foi significativamente diminuída para o grupo D0 em relação ao grupo C0. No entanto, com a dose de 5 J/cm^2 , a concentração total de proteína aumentou, para valores similares aos não diabéticos ($p > 0,05$). Ao contrário, com a dose de 10 J/cm^2 , o laser diminuiu a concentração total de proteína dos animais não-diabéticos, que não apresentaram, portanto, diferença com os animais diabéticos. Não houve nenhuma alteração com a dose de 20 J/cm^2 , com relação aos grupos não irradiados (Figura 5.11).

A atividade da amilase, embora numericamente, tenha demonstrado alterações entre os animais diabéticos e não-diabéticos, sem irradiação, estas diferenças não foram estatisticamente significantes. Entretanto, nos animais não-diabéticos, a irradiação de 10 J/cm^2 , foi responsável por um aumento na atividade enzimática da amilase (Figura 5.12).

Com relação à concentração iônica, nenhuma alteração foi observada para os íons cálcio, fósforo, potássio, magnésio, sódio e zinco (Tabela 5.4). Da mesma maneira, nenhuma alteração morfológica nas glândulas submandibulares dos animais diabéticos e não-diabéticos, foi observada (Figuras 5.8 e 5.13).

Tabela 5.1- Média e desvio padrão do peso (g) inicial e final para os diferentes grupos estudados

GRUPOS/DOSE		PESO (g)	
		Inicial	Final
Não diabéticos	C0	197,17±11,98 (12)	228,17±12,98 ^{*a} (12)
	C5	207,50±20,83 (12)	246,00±25,31 ^{*a} (12)
	C10	193,30±23,44 (10)	231,00±22,71 ^{*a} (10)
	C20	193,33±14,85 (12)	222,75±12,79 ^{*a} (12)
Diabéticos	D0	190,83±14,43 (12)	182,42±20,58 ^b (12)
	D5	198,86±22,99 (12)	194,58±28,45 ^b (12)
	D10	193,30±23,44 (12)	192,08±25,99 ^b (12)
	D20	193,33±14,85 (10)	181,50±20,06 ^b (10)

* significa diferença estatística significante entre colunas (peso inicial X final) no mesmo grupo (p<0,05)

Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre linhas (grupo diabético e não diabético, p<0,05)

Tabela 5.2- Média e desvio padrão da ingestão de comida (g/dia) e consumo de água (ml/dia) para os animais diabéticos e não diabéticos

Análises	ANIMAIS	
	Diabéticos	Não Diabéticos
Ingestão alimento (g/dia)	32,51±4,61* n=40	13,61±3,37 n=35
Consumo de água (ml/dia)	171,68±21,88* n=40	29,23±6,20 n=35

* Diferença estatisticamente significante entre colunas para $p < 0,05$

Figura 5.1- Glicemia (em jejum de 15h) e diagnóstico e de sacrifício para os diferentes grupos. * significa diferença estatística entre o valor de glicemia de diagnóstico e de sacrifício do mesmo grupo ($p < 0,05$) ($10 < n < 12$)

Figura 5.2- Glicemia (alimentado) imediatamente antes e após a irradiação/simulação laser (IL) nos diferentes grupos. * significa diferença estatística entre o valor de glicemia antes e após IL no respectivo grupo ($10 < n < 12$)

Figura 5.3- Atividade específica da enzima catalase das glândulas parótidas, dos animais diabéticos e não diabéticos, frente a diferentes dosagens de irradiação laser (0, 5, 10 e 20 J/cm²). * significa valores diferentes da atividade da catalase para os grupos diabéticos e não diabéticos irradiados com a mesma dose ($p < 0,05$) ($10 < n < 12$)

Figura 5.4- Atividade específica da enzima peroxidase nas glândulas parótidas dos animais diabéticos e não diabéticos, frente a diferentes dosagens de irradiação laser (0, 5, 10 e 20 J/cm^2). * significa valores estatisticamente diferentes da atividade da peroxidase para os grupos diabéticos e não diabéticos irradiados com a mesma dose ($p < 0,05$). Letras diferentes significam diferenças estatísticas dentro dos grupos não-diabéticos, que sofreram diferentes doses de irradiação. ($9 \leq n \leq 12$)

Figura 5.5 Concentração total de proteína (mg/mg tec) das glândulas parótidas para os animais diabéticos e não diabéticos que receberam diferentes doses de irradiação (n=12)

Figura 5.6- Atividade específica da enzima amilase nas glândulas parótidas dos animais diabéticos e não diabéticos, que receberam diferentes doses de irradiação laser. * significa diferença estatística entre os grupos de animais diabéticos e não diabéticos que receberam a mesma dose de irradiação ($p < 0,05$) ($9 \leq n \leq 12$). Letras diferentes significam diferenças estatísticas dos grupos diabéticos ou controles com doses diferentes de irradiação

Figura 5.7- Morfologia das glândulas parótidas dos animais controles e diabéticos irradiados com 0 (superiores, respectivamente), 5 (medianas) e 10 J/cm² (inferiores). Setas mostram gotículas de gordura. Aumento de 200x

Figura 5.8- Morfologia das glândulas SM e P dos animais diabéticos (superiores) e controles (inferiores) irradiadas com 20 J/cm², com aumento de 200x. Na região mediana, observam-se glândulas parótidas de animais diabéticos irradiados com 10 J/cm² em maior aumento (400x). Setas mostram gotículas de gordura

Figura 5.9- Atividade específica da enzima catalase nas glândulas submandibulares dos animais diabéticos e não diabéticos, frente a diferentes dosagens de radiação laser (0, 5, 10 e 20 J/cm²). * significa valores estatisticamente diferentes, da atividade da catalase, para os grupos diabéticos e não diabéticos irradiados com a mesma dose ($p < 0,05$) ($11 < n < 12$)

Figura 5.10- Atividade da enzima peroxidase das glândulas submandibulares dos animais diabéticos e não diabéticos, frente a diferentes dosagens de irradiação laser (0, 5, 10 e 20 J/cm²) (10≤n≤12). * significa diferença estatisticamente significativa entre os grupos diabéticos e não-diabéticos com a mesma dose de irradiação (p<0,05). Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa dentro dos grupos não-diabéticos, com diferentes doses de irradiação. Dentre os animais diabéticos não houve diferença

Figura 5.11- Concentração total de proteína (mg/mg tec) das glândulas submandibulares para os animais diabéticos e não diabéticos que receberam diferentes doses de irradiação (n=12). * significa diferença estatística entre os animais diabéticos e não-diabéticos, que receberam a mesma dose de irradiação ($p < 0,05$)

Figura 5.12- Atividade específica da enzima amilase nas glândulas submandibulares dos animais diabéticos e não diabéticos, que receberam diferentes doses de irradiação laser ($8 \leq n \leq 12$). Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significante entre os animais não-diabéticos irradiados com doses diferentes (0 e 10 J/cm²), $p < 0,05$

Tabela 5.4- Concentração iônica (mEqg/mg tec) das glândulas submandibulares dos diferentes grupos estudados (n=12)

	<i>D0</i>	<i>D5</i>	<i>D10</i>	<i>D20</i>	<i>C0</i>	<i>C5</i>	<i>C10</i>	<i>C20</i>
Na	2,9±0,8 (n=10)	3,8±0,9 (n=12)	3,2±0,7 (n=11)	2,9±0,8 (n=12)	2,4±0,3 (n=12)	3,0±0,8 (n=11)	2,4±0,8 (n=12)	2,6±0,5 (n=12)
Mg	2,2±0,7 (n=10)	2,3±0,4 (n=12)	2,1±0,4 (n=11)	2,0±0,6 (n=12)	1,9±0,3 (n=12)	2,3±0,4 (n=11)	2,3±0,6 (n=12)	2,3±0,3 (n=12)
P	20,9±4,7 (n=10)	20,7±4,1 (n=12)	22,3±2,8 (n=11)	17,9±5,4 (n=12)	17,0±2,7 (n=12)	19,3±3,3 (n=11)	18,0±5,0 (n=12)	18,5±2,0 (n=12)
K	4,3±1,1 (n=10)	4,2±0,7 (n=10)	4,5±0,7 (n=11)	3,9±1,0 (n=12)	4,6±0,4 (n=12)	4,6±0,8 (n=11)	4,5±1,0 (n=12)	4,6±0,5 (n=12)
Ca	4,1±1,3 (n=10)	4,3±1,3 (n=12)	4,0±1,7 (n=11)	3,6±1,4 (n=11)	3,5±0,4 (n=12)	4,0±1,7 (n=11)	4,5±1,9 (n=12)	4,3±1,0 (n=12)
Zn	0,1±0,0 (n=10)	0,2±0,1 (n=12)	0,2±0,0 (n=9)	0,1±0,1 (n=10)	0,2±0,0 (n=12)	0,1±0,0 (n=10)	0,2±0,1 (n=12)	0,1±0,0 (n=12)

Figura 5.13- Morfologia das glândulas submandibulares (SM) dos animais controles e diabéticos irradiados com 0 (superiores, respectivamente), 5 (medianas) e 10 J/cm² (inferiores). Aumento de 200x

6 DISCUSSÃO

Os dados do presente trabalho demonstraram a ação da irradiação com laser em baixa intensidade em alguns parâmetros bioquímicos das GSM e GP e na glicemia de ratas diabéticas, induzidas por estreptozotocina.

A indução química do diabetes através da injeção de STZ, mimetiza a condição do DM tipo 1, onde a destruição das células β ocorre. Os sinais de polifagia, polidipsia, poliúria, diminuição de peso corporal e aumento da glicemia, são sinais e sintomas característicos dos pacientes que apresentam esta alteração metabólica. No presente trabalho, o valor elevado da glicemia de diagnóstico, acima de 300 mg/dl sangue (Figura 5.1) após 72 h da aplicação de STZ, acompanhado de maior consumo de alimento (aproximadamente duas vezes e meia), assim como maior ingestão de água (aproximadamente 6 vezes) (Tabela 5.2) em comparação com os animais que receberam injeção de tampão, caracterizando polifagia, polidipsia e conseqüente poliúria, confirmaram a condição diabética dos animais.

Muito embora, os animais diabéticos tenham consumido mais alimento e ingerido mais água, eles não apresentaram ganho de peso, como aconteceu nos animais não diabéticos (Tabela 5.1). Estes resultados estão em concordância com a literatura (ANDERSON; BEVAN, 1992; ANDERSON; JOHNSON, 1981; KIM et al., 1990; KURAHASHI; INOMATA, 1988; NOGUEIRA et al., 2005). Isto se deve à destruição das células β do pâncreas, que sintetizam insulina, pela STZ, o que acarreta em alterações no metabolismo dos carboidratos e lipídeos. A principal ação da insulina é promover a estocagem de nutrientes. Com a falta deste hormônio, haverá prejuízo na síntese de glicogênio, estimulação da glicogenólise, diminuição

da síntese protéica e de triglicérides e inibição da glicólise (GREENSPAN; GARDNER, 2004).

A função da insulina de promover a estocagem de nutrientes está relacionada na estimulação da captação de glicose pelos tecidos sensíveis à insulina, que acontece via transportadores de glicose (GLUTs). A insulina aumenta a permeabilidade celular através da translocação destes transportadores para membrana plasmática. Os GLUTs compreendem uma larga família, composta de pelo menos 13 membros. Outra maneira de transportar a glicose através da membrana plasmática, a qual é impermeável à molécula glicose, que possui característica hidrofílica, é através do co-transportador de glicose acoplado ao Na^+ (CHEATHAM; KAHN, 1995; GREENSPAN; GARDNER, 2004).

O GLUT 1 e GLUT 3 estão presentes em todos os tecidos humanos, sendo possivelmente responsáveis pela mediação da captação basal de glicose para o interior da célula, uma vez que possui alta afinidade por esta molécula e portanto, são capazes de transportar em concentrações baixas de glicose. Não há relatos na literatura que demonstrem a presença dos transportadores de glicose nas glândulas salivares, no entanto receptores de insulina na membrana plasmática de células isoladas de glândulas submandibulares já foram descritos (SCACCHI; TURYN; DELLACHA, 1988), assim como expressão destes receptores nas glândulas salivares de ratos Wistar diabéticos pela indução de STZ (ROCHA et al., 2000). Além disso, é bem descrito que há alterações nas glândulas salivares de ratos, após a indução do diabetes com drogas que destroem as células β do pâncreas, o que comprova a função da insulina no metabolismo das glândulas salivares (ANDERSON, 1983; NICOLAU et al., 2005; NICOLAU; ROSA; FAVA-DE-MORAES, 1969; NOGUEIRA et al., 2005).

O cAMP foi descrito na literatura como sendo também capaz de translocar o transportador de glicose para membrana plasmática, em adipócitos de ratos, por uma via diferente da qual a insulina age, podendo interferir no metabolismo da glicose (CLANCY; CZECH, 1990; KELADA; MACAULAY; PROIETTO, 1992). Sabendo-se que o laser em baixa intensidade causa aumento na concentração de cAMP em cultura de células irradiadas com luz em 632 e 404 nm (KARU, 1989; KARU et al., 1985), mais estudos seriam necessários para demonstrar se este aumento na concentração de cAMP pode estar relacionado à diminuição da glicemia observada nas ratas diabéticas 24 h após a irradiação com laser de comprimento de onda de 660 nm.

Além disso, as glândulas salivares são estudadas como órgãos com funções exócrinas e endócrinas relacionadas ao metabolismo dos carboidratos (MURAKAMI; TANIGUCHI; BABA, 1982; SANTOS; CURI; FAVA-DE-MORAES, 1992). Estudos com camundongos, ratos e com glândulas humanas sugerem a presença de células que contém, e que possuem habilidade para sintetizar, um peptídeo similar à insulina pancreática (MURAKAMI; TANIGUCHI; BABA, 1982). Além disso, outros estudos demonstraram que há expressão de um peptídeo insulínico dependente de glicose nas células dos ductos das GSM e que sua expressão é, portanto, regulada por glicose (TSENG et al., 1995). Este peptídeo aumenta a liberação de insulina pelas células β do pâncreas quando administrado em doses fisiológicas, sendo importante para o controle da homeostase de glicose, além disso, este peptídeo pode funcionar como um estimulante parácrino para liberação do peptídeo similar à insulina, o qual também foi localizado nas células ductais das GSM (SHUBNIKOVA; VOLKOVA; PRINTSEVA, 1984; TSENG et al., 1995), assim como em células túbulo mucosas e ductais das GSM de camundongos diabéticos,

pela indução de STZ (PATEL; BEGUM; SMITH, 1986). Na condição de insuficiência de insulina e aumento na concentração de glicose no sangue, as células ductais das GSM liberaram o peptídeo similar à insulina em quantidades aumentadas e quando o peptídeo foi administrado intraperitonealmente, causou diminuição na concentração de glicose no sangue e reação convulsiva nos camundongos, comprovando sua similaridade com a insulina. Os autores concluem que os resultados por eles encontrados norteiam a ação da GSM na regulação da homeostase da glicose (SHUBNIKOVA; VOLKOVA; PRINTSEVA, 1984).

O laser em baixa intensidade ($3,75 \text{ J/cm}^2$; 830 nm) estimula a formação de nódulos ósseos através do aumento na concentração e expressão do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) (SHIMIZU et al., 2007), o qual também é sintetizado e secretado pelas glândulas salivares (KERR et al., 1995). Em culturas de fibroblastos, uma única irradiação com laser em baixa intensidade, 685 nm, 2 J/cm^2 , foi capaz de aumentar a liberação do IGF-1 e estimular a proliferação celular (SAYGUN et al., 2008). Os autores concluem que a fototerapia com laser em baixa intensidade tem um papel importante na reparação periodontal pelo aumento dos fatores de crescimento (SAYGUN et al., 2008).

Com aumento de glicose pós-prandial em indivíduos saudáveis, a glicose estimula a fosforilação oxidativa mitocondrial, com conseqüente aumento de ATP, fechamento de canais de K^+ , despolarização da membrana e abertura de canais de Ca^{2+} . Com o aumento de cálcio, aciona-se a secreção de insulina (GERBITZ; GEMPEL; BRDICZKA, 1996). Com a falta de insulina e conseqüente alteração na entrada de glicose para a célula, o diabetes altera o transporte de elétrons da cadeia respiratória na mitocôndria.

No presente trabalho, as ratas diabéticas que foram irradiadas com 5 e 20 J/cm², apresentaram concentração de glicose sangüínea diminuída no dia do sacrifício em relação à glicemia de diagnóstico, o que não aconteceu para os animais não diabéticos que tiveram glicemias mais altas no dia da eutanásia. A irradiação com laser em baixa intensidade pode estar atuando de diversas maneiras, estimulando a secreção e liberação dos peptídeos similares à insulina (PATEL; BEGUM; SMITH, 1986; SAYGUN et al., 2008; TSENG et al., 1995) , aumentando a concentração de cAMP (KARU, 1988; KARU, 1986; TUNER, 2007) e ainda estimulando a cadeia respiratória (KARU, 1988; KARU, 1986; LUBART et al., 2005; MANTEIFEL; KARU, 2005; TUNER, 2007; VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004; WILDEN; KARTHEIN, 1998). O efeito da irradiação pode ser ainda mais evidente, uma vez que o tecido alvo está debilitado pela condição do diabetes (RIBEIRO, 2000; TUNER, 2007).

Citocromo c oxidase é uma proteína de membrana com 200 kDa, encontrada na membrana interna da mitocôndria e uma das responsáveis pela transporte de elétrons. Dois domínios heme, dois sítios de cobre, um de zinco e um de magnésio são os possíveis cromóforos absorvedores da luz visível e conseqüentemente dos lasers vermelhos em baixa intensidade (KARU, 1999; WILDEN; KARTHEIN, 1998).

A catalase é uma enzima antioxidante presente principalmente nos peroxissomas das células mamárias. Ela apresenta, em seu sítio ativo, um grupo heme e NADPH e possui duas atividades enzimáticas, dependendo da concentração de peróxido de hidrogênio. Se a concentração é alta, ela age cataliticamente, catalisando a reação de conversão do H₂O₂ em H₂O e O₂. Em baixas concentrações de H₂O₂ e na presença de um doador de hidrogênio (etanol, metanol, etc.), a catalase age peroxidicamente, removendo peróxido de hidrogênio, mas oxidando

seu substrato (KIRKMAN; GAETANI, 2007; SCIBIOR; CZECZOT, 2006). Alterações de temperatura e pH podem interferir na atividade da catalase, sendo que pH 5, por exemplo, pode diminuir a atividade inicial da enzima (GHADERMARZI; MOOSAVI-MOVAHEDI, 1997).

No presente estudo, a atividade da catalase nas GP e GSM apresentou valores aumentados ($p < 0,05$) para os animais diabéticos, quando comparados com os animais não-diabéticos, ambos sem irradiação (Figuras 5.3 e 5.9). Estes valores estão em concordância com os dados previamente obtidos de ratos diabéticos de 30 dias, induzidos por STZ, nas mesmas condições do presente trabalho (NOGUEIRA et al., 2005).

Nos animais não-diabéticos, não houve efeito da irradiação laser na atividade da catalase, em nenhuma das doses estudadas, sendo estes resultados concordantes com aqueles previamente obtidos, onde a irradiação das glândulas salivares de ratos saudáveis foi realizada com laser infravermelho, nas doses de 4 e 8 J/cm² (SIMOES et al., 2008b). No entanto, para os animais diabéticos, do presente estudo, irradiados com laser em baixa intensidade nas doses de 5 e 20 J/cm², os valores da atividade da catalase das GP diminuíram para valores similares aos animais não-diabéticos ($p > 0,05$). Nas GSM, todas as doses (5, 10 e 20 J/cm²) foram efetivas na redução da atividade da enzima.

Além da alteração que a irradiação com laser em baixa intensidade causa no pH da célula irradiada, por agir no transporte de elétrons na mitocôndria e conseqüentemente no bombeamento de prótons (KARU, 1986), o laser pode agir diretamente na estrutura da enzima, modificando sua ação enzimática (ARTYUKHOV et al., 2000). A catalase, por possuir em sua estrutura um grupo heme, pode absorver a luz vermelha (660 nm), assim como é observado na enzima

citocromo oxidase da cadeia respiratória (KARU, 1999) e com isto, ter sua atividade enzimática alterada (ARTYUKHOV et al., 2000).

A peroxidase é principalmente secretada na saliva pelas GSM. Na presença de H_2O_2 , a peroxidase salivar catalisa a transformação do tiocianato em hipotiocianato, conferindo-lhe função antimicrobiana e antioxidante (IHALIN; LOIMARANTA; TENOVUO, 2006). No presente trabalho, a peroxidase também apresentou atividade aumentada nas GSM e GP das ratas diabéticas, quando comparadas com as não-diabéticas, sem irradiação (figuras 5.4 e 5.10). O aumento da atividade da enzima peroxidase em GP de ratos diabéticos induzidos por aloxana foi anteriormente descrito na literatura (ANDERSON, 1983), além disso, com tratamento de insulina, a atividade aumentada da peroxidase, retornou a valores similares aos animais não diabéticos (ANDERSON; JOHNSON, 1981). Em GSM, a diminuição da atividade da peroxidase foi observada (ANDERSON; SHAPIRO, 1979), após 14 dias da indução do diabetes por aloxana, a qual também foi revertida com insulina.

Assim como para catalase, em nosso prévio trabalho, não houve alteração da atividade da peroxidase das glândulas salivares de ratos saudáveis após duas irradiações com laser de diodo (808 nm, 4 e 8 J/cm²) (SIMOES et al., 2008b). No presente trabalho, nas GP das ratas não-diabéticas, observa-se aumento na atividade da enzima peroxidase com a dose de 5 J/cm², em relação ao grupo sem irradiação (Figura 5.4). Para os animais diabéticos, que apresentaram valores aumentados na atividade da peroxidase quando comparado com o grupo não-diabético sem laser, a irradiação não apresentou efeito significativo (Figura 5.4). Para as GSM dos animais diabéticos, não houve alteração significativa com a

irradiação laser e para os animais não-diabéticos, um aumento significativo com 10 J/cm² foi observado na atividade da peroxidase (Figura 5.10).

A falta de insulina gera hiperglicemia, que por sua vez relaciona-se com as disfunções ou falência de vários órgãos, especialmente, olhos, rins e coração e alterações no sistema nervoso e vasos sanguíneos. Alterações no sistema antioxidante e conseqüente estresse oxidativo, estão relacionados com a hiperglicemia e com as complicações crônicas do DM, como macro e microangiopatias e neuropatia (BROWNLEE; CERAMI, 1981). Nos tecidos, a hiperglicemia pode resultar em estresse oxidativo celular, através da super produção de espécies reativas de oxigênio (HUNT; DEAN; WOLFF, 1988; KOYA; KING, 1998; WILLIAMSON et al., 1993), o que acarreta em mudanças nos parâmetros antioxidantes (KAKKAR et al., 1995; OBERLEY, 1988), implicações das funções celulares e contribuição para patofisiologia de diversas doenças.

Vários mecanismos parecem estar envolvidos no desenvolvimento do estresse oxidativo na presença de elevada concentração de glicose sanguínea, como a autooxidação da glicose, glicação de proteínas, formações dos AGEs (advanced glycation endproducts) e a via do poliol. Além disso, o aumento da glicose no sangue pode levar ao aumento na atividade e da expressão das enzimas antioxidantes (Cu-Zn-superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) (CERIELLO et al., 1996). Esta super expressão das enzimas antioxidantes pode constituir uma resposta para o estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia.

As glândulas salivares dos animais deste estudo apresentaram aumento da atividade de ambas catalase e peroxidase, comprovando que o diabetes altera o sistema antioxidante e que estas alterações também se relacionam com órgãos periféricos como as glândulas salivares. Com a irradiação, a atividade da catalase

diminui para valores similares àqueles apresentados pelos animais não-diabéticos. No entanto, para a peroxidase, o laser parece não exercer efeito similar ao apresentado pela catalase.

As atividades das enzimas amilase e peroxidase têm sido foco de investigação como indicativas das funções das GP e GSM, respectivamente. Assim como no pâncreas, a atividade da amilase em GP apresenta-se diminuída em animais diabéticos, assim como sua expressão (ANDERSON, 1983; ANDERSON; BEVAN, 1992; ANDERSON; JOHNSON, 1981; KIM et al., 1990), no entanto com a introdução de insulina, a atividade e a expressão da amilase aumenta (ANDERSON, 1983; ANDERSON; BEVAN, 1992; KIM et al., 1990). No presente trabalho não foi observada diferença entre os animais diabéticos e não diabéticos, sem irradiação, no que diz respeito à atividade da amilase (Figuras 5.6 e 5.12). Os dados são conflitantes, uma vez que as condições experimentais são diferentes.

A maioria dos estudos que mostraram diminuição na atividade da amilase utilizou a aloxana para indução do diabetes, assim como sacrificaram os animais sem deixá-los em privação de alimento e com dias diferentes de estado diabético. Em trabalho realizado no laboratório, não houve alteração da atividade da amilase na quarta semana após indução do diabetes com STZ, sugerindo as mesmas condições do presente trabalho (LEITE, 2006). Assim como, também foi demonstrado em outro trabalho que o diabetes induzido por STZ não altera a secreção basal de amilase nas células acinares das glândulas parótidas, no entanto, com o tratamento de um secretagogo (noradrenalina), a secreção se torna diminuída (MAHAY et al., 2004).

A diminuição da atividade da amilase nas glândulas salivares encontrada em alguns estudos é justificada pelo aumento do consumo de alimentos pelos animais

diabéticos (polifagia) e conseqüente aumento na secreção desta enzima na saliva (ANDERSON, 1983; KIM et al., 1990). No presente trabalho, os animais foram mantidos em jejum de no mínimo de 15 h para serem então sacrificados sempre no período da manhã, evitando a interferência do ritmo circadiano.

A irradiação com laser em baixa intensidade aumentou a atividade da enzima amilase, nas GP, com 5 J/cm² e com 10 e 20 J/cm² para os animais diabéticos e não diabéticos, respectivamente (Figura 5.6). Os grupos de animais diabéticos que receberam a irradiação em doses de 10 e 20 J/cm², mostraram valores menores estatisticamente significantes, quando comparados com os animais não diabéticos que receberam as mesmas doses ($p < 0,05$) (Figura 5.12). Para as GSM a única diferença encontrada foi nos animais não-diabéticos, que com a dose de 10 J/cm², apresentaram maior atividade que os que não sofreram irradiação.

Na literatura há relatos dos efeitos da condição diabética quimicamente induzida, na concentração total de proteínas nas glândulas salivares. Alguns autores demonstraram diminuição em GP e GSM de ratos diabéticos induzidos por aloxana e STZ (ANDERSON, 1983; ANDERSON; SHAPIRO, 1979; CHANGRANI et al., 2006), outros não demonstram diferenças (KIM et al., 1990; ZEBROWSKI; BRIMMER, 1978). No presente trabalho, com relação à concentração total de proteína, não houve alteração para as GP, no entanto nas GSM, os animais diabéticos apresentaram menor concentração de proteína total, com 0 e 20 J/cm² de irradiação (Figura 5.5 e 5.11), e com as doses de 5 e 10 J/cm², não houve diferença entre os animais diabéticos e não-diabéticos ($p > 0,05$).

Vários trabalhos na literatura demonstram que a FLBI estimula a proliferação celular e síntese protéica, pelo aumento no metabolismo celular, aumento da síntese de DNA e RNA no núcleo celular, (ANDERS et al., 1993; BISHT et al., 1994;

EFENDIEV et al., 1992; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006; LOEVSCALL; ARENHOLT-BINDSLEV, 1994; MARQUES et al., 2004; MESTER; SNOW; SHAMAN, 1991; SIMOES et al., 2008b; VACCA et al., 1996; YU; NAIM; LANZAFAME, 1994). Nas GSM de animais diabéticos, uma diminuição da concentração de proteína total, em comparação com os animais não-diabéticos, foi encontrada. No entanto, com 5 e 10 J/cm², esta diferença não se manteve. Embora, o aumento observado na concentração total de proteína no grupo D5 não tenha sido estatisticamente significativo com relação ao D0 (4,38 mg/mg tec para D5 e 3,82 mg/mg tec para D0), foi suficiente para eliminar a diferença com os animais não-diabéticos do mesmo grupo de irradiação, o qual também apresentou uma diminuição numérica na concentração total de proteína, em comparação com C0 (4,94 para 4,42 mg/mg tec).

Análises histológicas demonstram diminuição no número de grânulos de secreção salivar e grande quantidade de vacúolos, com lipídeos em seu interior, principalmente no citoplasma das células secretórias das GP, GSM e GSL dos animais diabéticos (ANDERSON; JOHNSON, 1981; HAND; WEISS, 1984; MAHAY et al., 2004). A causa deste acúmulo lipídico nas células das glândulas salivares de ratos diabéticos, segundo alguns autores, pode ocorrer devido ao aumento da captação de triglicérides para ser usado como fonte de energia, ou pelo uso diminuído destes triglicérides na síntese de grânulos de secreção e no material da membrana plasmática (ANDERSON; GARRETT, 1986).

No presente trabalho foram observadas gotículas de gordura somente nas células acinares das glândulas parótidas dos animais diabéticos (Figuras 5.7, 5.8 e 5.13) e a análise das microscopias sugerem que os animais que receberam irradiação com laser de diodo em baixa intensidade, apresentaram menor acúmulo

lipídico nestas glândulas (Figuras 5.7 e 5.8). No entanto para confirmar os resultados, outras análises microscópicas devem ser realizadas.

Poucos trabalhos que analisam o efeito da irradiação com laser em baixa intensidade no tecido adiposo, são encontrados na literatura (BROWN et al., 2004; MEDRADO et al., 2006; NEIRA et al., 2002). Alguns autores sugerem que o laser age na abertura de poros de membrana, que permitem a saída da gordura do adipócito (NEIRA et al., 2002), no entanto outros autores não confirmam estes resultados (BROWN et al., 2004).

Os íons são necessários para diversas funções celulares, como ativação de enzimas, sinalização nuclear, regulação de canais, atividade de co-transportador, (SAYGUN et al., 2008), secreção de enzimas e hormônios, estabilização da estrutura de membrana, dentre outras (YAGO et al., 2002). Alterações na concentração dos íons em glândulas salivares e saliva na condição diabética foram pouco estudadas. Os relatos da literatura, no entanto, demonstram aumento nas concentrações de Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} em saliva de pacientes com diabetes do tipo 1 e 2, bem controlados, assim como Zn^{2+} apresenta-se diminuído (MATA et al., 2004). Nas GP e GSM, diminuição na concentração de Na^{+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e não alteração de K^{+} , Fe^{2+} foram observadas em animais diabéticos induzidos por STZ após 7-8 semanas da indução. O cátion Cu^{2+} se apresentou diminuído para as GP e não alterado nas GSM. O Ca^{2+} , mostrou valores diminuídos nas GP e aumentada nas GSM (CHANGRANI et al., 2006). No presente estudo, nenhuma alteração iônica significativa foi encontrada nos animais diabéticos, em comparação com os animais não-diabéticos (Tabelas 5.3 e 5.4).

7 CONCLUSÕES

Com base nas condições experimentais deste estudo e nos resultados obtidos, podemos concluir que a irradiação com laser em baixa intensidade nas glândulas salivares maiores de ratas, diminui a concentração de glicose sangüínea, assim como diminuiu a atividade da enzima antioxidante catalase nas glândulas parótidas e submandibulares de ratas diabéticas.

As análises histológicas sugerem que a irradiação promove a diminuição do acúmulo lipídico, observado nas glândulas parótidas dos animais diabéticos.

Com isto, mais estudos sobre o efeito da irradiação laser na glicemia e na atividade das enzimas antioxidantes são necessários, uma vez que a hiperglicemia e as alterações no sistema antioxidante estão diretamente relacionadas com as complicações do diabetes. Órgãos controladores da glicemia e afetados pelo estresse oxidativo, no diabetes, devem ser analisados após a irradiação com laser em baixa intensidade.

REFERÊNCIAS¹

Aebi H. Catalase in vitro. In: Methods Enzymol; 1984.

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.

Anderson LC. Effects of alloxan diabetes and insulin in vivo on rat parotid gland. Am J Physiol 1983;245(3):G431-7.

Anderson LC. Peroxidase release from rat submandibular salivary acinar cells in vitro. Arch Oral Biol 1986;31(7):501-3.

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.

Anderson LC, Garrett JR. Lipid accumulation in the major salivary glands of streptozotocin-diabetic rats. Arch Oral Biol 1986;31(7):469-75.

Anderson LC, Garrett JR. Neural regulation of submandibular gland blood flow in the streptozotocin-diabetic rat: evidence for impaired endothelium-dependent vasodilatation. Arch Oral Biol 2004;49(3):183-91.

Anderson LC, Johnson DA. Effect of alloxan diabetes on rat parotid gland and saliva. Comp Biochem Physiol B 1981;70B:725-30.

Anderson LC, Shapiro BL. The effect of alloxan diabetes and insulin in vivo on peroxidase activity in the rat submandibular gland. Arch Oral Biol 1979;24(5):343-5.

Artyukhov VG, Basharina OV, Pantak AA, Sveklo LS. Effect of helium-neon laser on activity and optical properties of catalase. Bull Exp Biol Med 2000;129(6):537-40.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

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.

Baxter G. Therapeutic lasers: theory and practice. London: Churchill Livingstone; 1997.

Bellavia SL, Moreno J, Sanz E, Picas EI, Blanco A. alpha-Amylase activity of human neonate and adult saliva. *Arch Oral Biol* 1979;24(2):117-21.

Berridge MJ, Heslop JP, Irvine RF, Brown KD. Inositol trisphosphate formation and calcium mobilization in Swiss 3T3 cells in response to platelet-derived growth factor. *Biochem J* 1984;222(1):195-201.

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.

Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med* 2006;23(6):594-608.

Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab* 2000;26(3):163-76.

Brown SA, Rohrich RJ, Kenkel J, Young VL, Hoopman J, Coimbra M. Effect of low-level laser therapy on abdominal adipocytes before lipoplasty procedures. *Plast Reconstr Surg* 2004;113(6):1796-804; discussion 805-6.

Brownlee M, Cerami A. The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Biochem* 1981;50:385-432.

Byrnes KR, Barna L, Chenault VM, Waynant RW, Ilev IK, Longo L, et al. Photobiomodulation improves cutaneous wound healing in an animal model of type II diabetes. *Photomed Laser Surg* 2004;22(4):281-90.

Ceriello A, dello Russo P, Amstad P, Cerutti P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes* 1996;45(4):471-7.

Chandra T, Das R, Datta AG. Role of thyroid gland on the peroxidase and iodinating enzymes of submaxillary gland. *Eur J Biochem* 1977;72(2):259-63.

Changrani NR, Chonkar A, Adeghate E, Singh J. Effects of streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus on total protein concentrations and cation contents in the isolated pancreas, parotid, submandibular, and lacrimal glands of rats. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1084:503-19.

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

Christopherson K. The impact of diabetes on wound healing: implications of microcirculatory changes. *Br J Community Nurs* 2003;8(12):S6-13.

Cianciola LJ, Park BH, Bruck E, Mosovich L, Genco RJ. Prevalence of periodontal disease in insulin-dependent diabetes mellitus (juvenile diabetes). *J Am Dent Assoc* 1982;104(5):653-60.

Clancy BM, Czech MP. Hexose transport stimulation and membrane redistribution of glucose transporter isoforms in response to cholera toxin, dibutyryl cyclic AMP, and insulin in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1990;265(21):12434-43.

Committee. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2002;25(Supplement 1):S5-S20.

de Valk HW, Hardus PL, van Rijn HJ, Erkelens DW. Plasma magnesium concentration and progression of retinopathy. *Diabetes Care* 1999;22(5):864-5.

Efendiev AI, Tolstykh PI, Dadashev AI, Azimov SA. [Increasing the scar strength after preventive skin irradiation with low-intensity laser]. *Klin Khir* 1992(1):23-5.

Fisher EH, Stein E. The α -amylase from human saliva. *Biochemical preparations* 1961;8:27-33.

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.

Friedmann H, Lubart R, Laulicht I, Rochkind S. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol B* 1991;11(1):87-91.

Gavish L, Asher Y, Becker Y, Kleinman Y. Low level laser irradiation stimulates mitochondrial membrane potential and disperses subnuclear promyelocytic leukemia protein. *Lasers Surg Med* 2004;35(5):369-76.

Gerbitz KD, Gempel K, Brdiczka D. Mitochondria and diabetes. Genetic, biochemical, and clinical implications of the cellular energy circuit. *Diabetes* 1996;45(2):113-26.

Ghademarzi M, Moosavi-Movahedi AA. The effects of temperature and pH on the kinetics of reactions between catalase and its suicide substrate hydrogen peroxide. *Ital J Biochem* 1997;46(4):197-205.

Gontijo I, Navarro RS, Haypek P, Ciamponi AL, Haddad AE. The applications of diode and Er:YAG lasers in labial frenectomy in infant patients. *ASDC J Dent Child* 2005;72(1):10-5.

Gouw-Soares S, Tanji E, Haypek P, Cardoso W, Eduardo CP. The use of Er:YAG, Nd:YAG and Ga-Al-As lasers in periapical surgery: a 3-year clinical study. *J Clin Laser Med Surg* 2001;19(4):193-8.

Greenspan FS, Gardner DG. Basic and clinical endocrinology. New York: McGraw-Hill; 2004.

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.

Hand AR, Weiss RE. Effect of Streptozotocin-Induced Diabetes on the Rat Parotid Gland Laboratory Investigation 1984;51(4):429-40.

Hargitai IA, Sherman RG, Strother JM. The effects of electrostimulation on parotid saliva flow: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99(3):316-20.

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.

Hubacek J, Matouskova I. Effect of He-Ne laser radiation on lysozyme in saliva. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med* 1987;116:353-8.

Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 2001;85(2):162-9.

Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 1988;256(1):205-12.

Ihalin R, Loimaranta V, Tenovu J. Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Arch Biochem Biophys* 2006;445(2):261-8.

Jori G, Schindl, L., Schindl, A., Polo, N. Novel approaches towards a detailed control of the mechanism and efficiency of photosensitized processes in vivo. *J Photochem Photobiol A* 1996;102:101-7.

Kakkar R, Kalra J, Mantha SV, Prasad K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 1995;151(2):113-9.

Karu T. Molecular Mechanism of the Therapeutic Effect of Low-Intensity Laser Radiation. *Lasers Life Sci* 1988;2(1):53-74.

Karu T. Photobiological fundamentals of low-power lasers therapy. *IEEE J Quantum Elect* 1987;23(10):1703-19.

Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys* 1989;56(5):691-704.

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.

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.

Karu TI. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser irradiation. *Dokl Akad Nauk SSSR* 1986;291(5):1245-9.

Karu TI, Lobko VV, Lukpanova GG, Parkhomenko IM, Chirkov I. Effect of irradiation with monochromatic visible light on the cAMP content in mammalian cells. Dokl Akad Nauk SSSR 1985;281(5):1242-4.

Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. Lasers Surg Med 2005;36(4):307-14.

Katchburian E, Arana V. Histologia e embriologia oral. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 2004.

Kawalec JS, Hetherington VJ, Pfennigwerth TC, Dockery DS, Dolce M. Effect of a diode laser on wound healing by using diabetic and nondiabetic mice. J Foot Ankle Surg 2004;43(4):214-20.

Kelada AS, Macaulay SL, Proietto J. Cyclic AMP acutely stimulates translocation of the major insulin-regulatable glucose transporter GLUT4. J Biol Chem 1992;267(10):7021-5.

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.

Kim SK, Cuzzort LM, McKean RK, Allen ED. Effects of diabetes and insulin on alpha-amylase messenger RNA levels in rat parotid glands. J Dent Res 1990;69(8):1500-4.

Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. Trends Biochem Sci 2007;32(1):44-50.

Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. Diabetes 1998;47(6):859-66.

Kujawa J, Zavodnik L, Zavodnik I, Buko V, Lapshyna A, Bryszewska M. Effect of low-intensity (3.75-25 J/cm²) near-infrared (810 nm) laser radiation on red blood cell ATPase activities and membrane structure. J Clin Laser Med Surg 2004;22(2):111-7.

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.

Leite MF. Estudo temporal do efeito da administração de tungstato de sódio sobre alguns parâmetros de glândulas salivares e saliva de ratas diabéticas. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006.

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.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.

Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg* 2005;23(1):3-9.

Mahay S, Adeghate E, Lindley MZ, Rolph CE, Singh J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus alters the morphology, secretory function and acyl lipid contents in the isolated rat parotid salivary gland. *Mol Cell Biochem* 2004;261(1-2):175-81.

Manfredi M, McCullough MJ, Vescovi P, Al-Kaarawi ZM, Porter SR. Update on diabetes mellitus and related oral diseases. *Oral Dis* 2004;10(4):187-200.

Manteifel VM, Karu TI. Structure of mitochondria and activity of their respiratory chain in subsequent generations of yeast cells exposed to He-Ne laser light. *Izv Akad Nauk Ser Biol* 2005(6):672-83.

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.

Mata AD, Marques D, Rocha S, Francisco H, Santos C, Mesquita MF, et al. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Mol Cell Biochem* 2004;261(1-2):137-42.

Medrado AP, Trindade E, Reis SR, Andrade ZA. Action of low-level laser therapy on living fatty tissue of rats. *Lasers Med Sci* 2006;21(1):19-23.

Mester AF, Snow JBJ, Shaman P. Photochemical effects of laser irradiation on neuritic outgrowth of olfactory neuroepithelial explants. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1991;105(3):449-56.

Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med* 1985;5(1):31-9.

Midda M, Renton-Harper P. Lasers in dentistry. *Br Dent J* 1991;170(9):343-6.

Moore PA, Guggenheimer J, Etzel KR, Weyant RJ, Orchard T. Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92(3):281-91.

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.

Nagler RM. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. *Oral Dis* 2002;8(3):141-6.

Neira R, Arroyave J, Ramirez H, Ortiz CL, Solarte E, Sequeda F, et al. Fat liquefaction: effect of low-level laser energy on adipose tissue. *Plast Reconstr Surg* 2002;110(3):912-22; discussion 23-5.

Nicolau J, Matos JA, Souza DN, Neves LB, AC L. Altered glycogen metabolism in the submandibular and parotid salivary glands of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Oral Science* 2005;47(2):111-6.

Nicolau J, Rosa R, Fava-de-Moraes F. The effect of alloxan diabetes upon N-acetylneuraminic acid concentration in the submaxillary glands of rats. *Acta Physiol Lat Am* 1969;19(2):106-10.

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.

Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med* 1988;5(2):113-24.

Olefsky JM. The insulin receptor. A multifunctional protein. *Diabetes* 1990;39(9):1009-16.

Olson JE, Schimmerling W, Tobias CA. Laser action spectrum of reduced excitability in nerve cells. *Brain Res* 1981;204(2):436-40.

Onac I, Pop L, Onac I. Implications of low power He-Ne Laser and monochromatic red light biostimulation in protein and glycoside metabolism. *Laser Therapy* 1999;11(3):130-7.

Oppenheim FG, Salih E, Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1098:22-50.

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.

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.

Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SM, Aoki A, Ishikawa I. Effect of Low-Level Er:YAG Laser Irradiation on Cultured Human Gingival Fibroblasts. *J Periodontol* 2005;76(2):187-93.

Reddy GK. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. *Lasers Surg Med* 2003;33(5):344-51.

Ribeiro MS. Interação da radiação laser linearmente polarizada de baixa intensidade com tecidos vivos: efeitos na aceleração de cicatrização tissular em lesões de pele [Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2000.

Rocha EM, de MLMH, Carvalho CR, Saad MJ, Velloso LA. Characterization of the insulin-signaling pathway in lacrimal and salivary glands of rats. *Curr Eye Res* 2000;21(5):833-42.

Santos MF, Curi R, Fava-de-Moraes F. Possible role of the submandibular glands in the control of glucose metabolism in mouse enterocytes. *Braz J Med Biol Res* 1992;25(9):957-60.

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.

Scacchi GE, Turyn D, Dellacha JM. Identification of insulin binding sites in isolated cells from rat submaxillary gland. *Arch Biol Med Exp (Santiago)* 1988;21(1):189-93.

Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. *J Investig Med* 2000;48(5):312-26.

Scibior D, Czczot H. [Catalase: structure, properties, functions]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2006;60:170-80.

Shimizu N, Mayahara K, Kiyosaki T, Yamaguchi A, Ozawa Y, Abiko Y. Low-intensity laser irradiation stimulates bone nodule formation via insulin-like growth factor-I expression in rat calvarial cells. *Lasers Surg Med* 2007;39(6):551-9.

Shubnikova EA, Volkova EF, Printseva O. Submandibular glands as organs of synthesis and accumulation of insulin-like protein. *Acta Histochem* 1984;74(2):157-71.

Simoes A, Moura J, Aranha A, Caporale J, Mori M, Eduardo C. Diagnóstico Interdisciplinar de Doença de Refluxo Gastroesofágico: Relato de Caso. *Clínica. Int J Braz Dent* 2006;2(4):368-76.

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* 2008a;12(1):25-30.

Simoes A, Siqueira WL, Lamers ML, Santos MF, Eduardo CP, Nicolau J. Laser phototherapy effect on protein metabolism parameters of rat salivary glands. *Lasers Med Sci* 2008b;DOI: 10.1007/s10103-008-0548-0.

Siqueira WL, Nicolau J. Stimulated whole saliva components in children with Down syndrome. *Spec Care Dentist* 2002;22(6):226-30.

Sjogren A, Floren CH, Nilsson A. Magnesium deficiency in IDDM related to level of glycosylated hemoglobin. *Diabetes* 1986;35(4):459-63.

Sjogren A, Floren CH, Nilsson A. Magnesium, potassium and zinc deficiency in subjects with type II diabetes mellitus. *Acta Med Scand* 1988;224(5):461-6.

Smith K. The photobiological basis of low level lasers irradiation therapy. *Laser Therapy* 1991;3:19-24.

Takeda Y. Irradiation effect of low-energy laser on rat submandibular salivary gland. *J Oral Pathol* 1988;17(2):91-4.

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

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

Thylstrup A, Fejerskov O. *Cariologia Clínica*. 2 ed: Santos Livraria Editora; 1994.

Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. *Med Sci Monit* 2006;12(7):RA130-47.

Tseng CC, Boylan MO, Jarboe LA, Williams EK, Sunday ME, Wolfe MM. Glucose-dependent insulintropic peptide (GIP) gene expression in the rat salivary gland. *Mol Cell Endocrinol* 1995;115(1):13-9.

Tuner J. *The Laser Therapy Handbook*. Grangesberg: Prima Books; 2007.

Tuner J, Hode L. It's all in the parameters: a critical analysis of some well-known negative studies on low-level laser therapy. *J Clin Laser Med Surg* 1998;16(5):245-8.

Tunér J, Hode L. *Low Level Laser Therapy - Clinical Practice and Scientific Background*; 1999.

Vacca RA, Marra E, Passarella S, Petragallo VA, Greco M. Increase in cytosolic and mitochondrial protein synthesis in rat hepatocytes irradiated in vitro by He-Ne laser. *J Photochem Photobiol B* 1996;34(2-3):197-202.

Vatta MS, Hope SI, Prendes GM, Bianciotti LG, Elverdin JC, Fernandez BE. Salivary glands and noradrenergic transmission in diabetic rats. *Auton Autacoid Pharmacol* 2002;22(2):65-71.

Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry* 2004;69(1):81-90.

Watanabe M, Yamagishi-Wang H, Kawaguchi M. Lowered susceptibility of muscarinic receptor involved in salivary secretion of streptozotocin-induced diabetic rats. *Jpn J Pharmacol* 2001;87(2):117-24.

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.

Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, et al. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 1993;42(6):801-13.

Wiseman LR, Faulds D. Oral pilocarpine: a review of its pharmacological properties and clinical potential in xerostomia. *Drugs* 1995;49(1):143-55.

Yago MD, Mata AD, Manas M, Singh J. Effect of extracellular magnesium on nerve-mediated and acetylcholine-evoked in vitro amylase release in rat parotid gland tissue. *Exp Physiol* 2002;87(3):321-6.

Yu W, Naim JO, Lanzafrance RJ. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. *Photochem Photobiol* 1994;59(2):167-70.

Yu W, Naim JO, Lanzafrance RJ. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. *Lasers Surg Med* 1997;20(1):56-63.

Zebrowski EJ, Brimmer M. Effect of alloxan-diabetes on alpha-amylase and sialic acid levels in the parotid and submandibular glands of rats. *Pharmacol Ther Dent* 1978;3(1):7-16.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
PROTOCOLO nº 17/05

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, **APROVOU** o protocolo de pesquisa ***“Estudo do efeito da terapia com laser em baixa intensidade no metabolismo celular das glândulas salivares submandibulares e parótidas de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina”***, de responsabilidade da pesquisadora **Alyne Simões**, sob orientação do Professor Doutor **José Nicolau**.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01(um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em “cd” ou “disquete” ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 06 de outubro de 2005

Prof. Dr. CELSO LUIZ CALDEIRA
PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP