DANIELLE LIMA CORRÊA DE CARVALHO

**Análise da glicemia e de IGF-1 após laserterapia nas glândulas salivares
de ratas diabéticas**

São Paulo

2013

DANIELLE LIMA CORRÊA DE CARVALHO

**Análise da glicemia e de IGF-1 após laserterapia nas glândulas salivares
de ratas diabéticas**

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Biomateriais e Biologia Oral

Orientador: Profª Drª Alyne Simões

São Paulo

2013

Carvalho DLC. Análise da glicemia e de IGF-1 após laserterapia nas glândulas salivares de ratas diabéticas. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: / /2013

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, sem Ele nada disso poderia ter acontecido.

As mulheres da minha vida, minha mãe Joana e minha avó Dormélia. Mulheres fortes que sempre estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe por tudo que sempre me ensinou e por todo o apoio que sempre me deu, fosse nos momentos bons ou ruins, sempre ao meu lado me mostrando como ser uma pessoa melhor. Mãe, você é a melhor pessoa do mundo, a melhor mãe, a melhor amiga, minha companheira de todas as horas. Muito obrigada por ter me dado à honra de te ter como mãe. Ao meu pai que mesmo de longe, já alguns anos, mas com quem vivi momentos maravilhosos, que me ensinou o valor de um carinho e de um sorriso em horas inesperadas. Mesmo tendo vivido tão pouco tempo ao seu lado gostaria muito que soubesse que foram momentos maravilhosos. Amo vocês demais, me sinto honrada por ser filha de pessoas tão maravilhosas e únicas. Mãe, Pai obrigada por tudo, pela vida que tenho e tive ao lado de vocês. De todo o meu coração muito obrigada.

Aos meus avôs maternos, Dormélia e Antônio. Casal impressionante e te uma doçura única. Amo vocês desde sempre e para sempre. Meus exemplos de casamento e de vida a dois. Vocês são muito importantes para mim. Obrigada por tudo.

A minha família, meu porto seguro. Muitíssimo obrigada por vocês fazerem parte da minha vida, não seria nada sem vocês.

A minha Tia Darcy, pelo apoio, carinho e dedicação. Muito obrigada por tudo.

Agradeço a minha orientadora, Prof^a Dr^a Alyne Simões pela oportunidade não só dentro do Laboratório de Biologia Oral, mas também no LELO. Muito obrigada pelo crescimento profissional e pessoal. Foi um caminho longo, mas vencemos. Obrigada pelos conselhos e pelo valor a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira, o qual mostrou a Bioquímica Oral de forma divertida na época que era uma disciplina optativa no meu segundo ano de graduação e pela oportunidade de poder iniciar no Laboratório de Bioquímica Oral.

Ao Prof. Dr. José Nicolau por, além, de participar da minha banca de qualificação, sempre ter uma palavra de incentivo e de grande conhecimento, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço a Dr.^a Luciane Azevedo por participar da minha banca de qualificação, além de ser uma profissional maravilhosa uma pessoa sempre disposta a ajudar.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez pela disponibilidade do centro cirúrgico e biotério do Laboratório de Biologia Oral e pelo conhecimento que me passou desde os tempos de graduação.

Ao Prof. Dr Rafael Balester coordenador do Programa de Pós Graduação do Departamento de Biomateriais e Biologia e os demais professores do Departamento.

Ao técnico Douglas Nesadal de Souza, muito mais que um profissional esplêndido, sempre disposto a ajudar fosse a qualquer hora em qualquer situação. Um amigo maravilhoso que sempre me ouviu e me ajudou muito fosse profissionalmente ou pessoalmente, ouviu meus choros e minhas risadas. Obrigada por tudo Douglas, você foi muito mais que um companheiro de trabalho, mas sim de vida.

A minha querida amiga Ana Carolina Romero, estamos juntas desde o primeiro ano de faculdade, passamos por disciplinas, trabalhos, clinicas e estudo, além de iniciação científica, prova para pós-graduação, comemoramos a nossa aprovação e cursamos o mestrado juntas. Muitas risadas, desabafos, mais risadas, longas volta para casa. Ana, você é uma pessoa maravilhosa, seja como profissional seja pessoalmente, obrigada pela amizade e pela companhia. Sem você não teria a graça que teve. Adoro-te.

A minha querida amiga Flávia Kazue Ibuki, exemplo de aluna e dedicação. Flá me lembro de você da Empresa OdontoUSP Júnior, quando a sua gestão estava saindo e a minha entrando, muito bom te conhecer nessa fase. Obrigada pela amizade, pelas risadas, choros, desabafos, conselhos. Adoro-te.

A Rosinha, muito mais do que uma pessoa sempre disposta a ajudar, uma amiga.

A Elidamara, sempre com um sorriso no rosto fosse qualquer situação.

A Edilene, pessoa maravilhosa, sempre disposta e positiva.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro da bolsa de mestrado oferecida para o Programa de Pós Graduação do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral.

Aos meus amados amigos, Simone Coelho, Fernando Li, Melise Domingos, Paula Takassi, Nathália Cayuela, Flávia Naddeo, Danielle Nery, Daniela Gaino,

Débora Perroni, Fernanda Yoshida, Thiago Ramalho, Rafael Cavalcanti de Souza, Bonnie Taylor, Erica Gonçalves dos Santos. O meu sincero obrigada pela amizade, carinho e paciência. Cada um de vocês se tornou uma pessoa muito especial na minha vida.

A minha amiga de toda a vida Mariana Silva Evangelista, mais que uma amiga a irmã que a vida me deu o prazer de escolher. Longe ou perto sei que posso contar com você em qualquer hora em qualquer situação.

Aos amigos da pós do departamento de Biomateriais e Biologia Oral, em especial, Erick de Lima, Karen Fukushima, Lucas Hian, Lucas Pabis, Marcela Rodrigues.

A Juliana Castro, que iniciou junto comigo a iniciação científica em 2010. Já muito obrigada por tudo fosse com os animais, fosse com os pacientes, fosse com a amizade.

A Luana Campos pelos ensinamentos sobre laser e pacientes oncológicos ou sobre o dia a dia. Muito obrigada Lú.

Agradeço ao amigo André de Vito, por todas as risadas, por toda paciência, histórias e mais risadas.

As meninas do Laboratório de Biologia Oral, Vivian Bradaschia, Tatiani Donato, Eloiza Rezende, Mariana Moreira, Lorraine Braga, Erika de Paula, Giovanna Castro, Cintia Fukuoka. Muito obrigada pelo apoio e pela companhia.

Aos amigos/agregados do Laboratório de Bioquímica Oral, Eugen Nesadal, Polliana Scaffa, Cristina Vidal, Alexander Nishida, Bruno Lopes, Tathy Xavier e Flávio Umeda.

A Liliane, Eugênia e Elaine pelo carinho, amizade e profissionalismo. Sem vocês os anos no LELO não teriam sido a mesma coisa.

Agradeço todos os animais que me ajudaram desde a iniciação até a pós-graduação, sem eles nada teria sido realizado.

"Se você pode sonhar, você pode fazê-lo. Lembre-se sempre que essa coisa toda
começou com um sonho e um rato."

Walt Disney

"Às vezes ouço o vento passar, e só de ter ouvido o vento passar, vale a pena ter nascido."

Fernando Pessoa

RESUMO

Carvalho DLC. Análise da glicemia e de IGF-1 após laserterapia nas glândulas salivares de ratas diabéticas [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Original.

O Diabetes mellitus é um distúrbio metabólico de etiologia múltipla que leva a uma hiperglicemia, podendo ocasionar inúmeras disfunções e falências de alguns órgãos e também alterações em cavidade oral. Estudos demonstraram diminuição da glicemia de ratas diabéticas com o uso de laser de baixa potência (LBP) em glândulas salivares. Como o *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) tem uma estrutura semelhante a da insulina, podendo mimetizar algumas de suas funções, o objetivo do presente trabalho foi analisar o efeito da irradiação com LBP na concentração de IGF-1, nas glândulas parótidas (GP) e submandibulares (GSM), e o efeito na glicemia de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina. Ratas da raça Wistar foram utilizadas e receberam uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina ou de tampão conforme o grupo ao qual pertenciam, C (controle) ou D (diabético). Posteriormente, as ratas foram divididas em 4 subgrupos (C0, D0, C5 e D5), de acordo com a dose de irradiação recebida (0 ou 5 J/cm²). O estado diabético dos animais foi confirmado através da glicemia e, após 29 dias, os animais foram submetidos à simulação ou irradiação. O LBP utilizado foi o Photon Lase III (DMC Equipamentos LTDA®). Vinte e quatro horas após o procedimento os animais foram sacrificados para coleta de sangue e das glândulas salivares para as análises da glicemia (método da glicose oxidase e do glicosímetro) e concentração de IGF-1, respectivamente. Os resultados foram analisados pelo teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) e teste de contraste de Tukey, admitindo-se significância de 5%. A glicemia do dia do sacrifício, dos animais diabéticos que receberam irradiação, estava diminuída quando comparada com a glicemia de sacrifício dos animais diabéticos que não receberam o laser ($p < 0,05$). Além disso, a glicemia de sacrifício dos animais diabéticos irradiados foi menor que a aferida no dia do diagnóstico, quando foi utilizado o método do glicosímetro ($p < 0,05$). A concentração de IGF-1, entretanto, não sofreu influência da doença e nem da irradiação, se mostrando alterada somente quando comparada a GP e GSM. Com base nestes resultados

podemos concluir que o LBP pode alterar a glicemia dos animais diabéticos, no entanto, este efeito parece não estar relacionado com a concentração de IGF-1.

Palavras-Chave: Diabetes mellitus. Glicemia. IGF-1. Laserterapia. Glândulas Salivares.

ABSTRACT

Carvalho DLC. Analysis of glucose and IGF-1 after laser therapy in the salivary glands of diabetic rats [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Original.

Diabetes mellitus is a metabolic disorder of multiple etiologies that leads to hyperglycemia and can cause numerous dysfunctions and failures of some organs and also changes in the oral cavity. Studies have shown a decrease on glucose blood concentration in diabetic rats when low-power laser was used upon salivary glands. As *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) has a structure similar to insulin, the aim of this study was to analyze the effect of low-power laser irradiation on IGF-1 concentration of the parotid and submandibular glands as well as on glycemia of diabetic rats induced by streptozotocin. Wistar rats were used and received an intraperitoneal injection of streptozotocin or buffer, depending on the group to which they belonged, being C (control) or D (diabetic). Subsequently, the rats were divided into 4 subgroups (C0, D0, C5 and D5) according to the irradiation dose received (0 or 5 J / cm²). The diabetic state of the animals was confirmed by blood glucose concentration and, after 29 days, the animals were subjected to irradiation or simulation, depending on the group to which they belonged. The laser used was the Photon Lase III (DMC Equipamentos LTDA[®]). Twenty-four hours after the procedure, the animals were sacrificed and blood and the salivary glands were collected to analyse the glycemia and IGF-1 concentration, respectively. The results were analyzed by Analysis of Variance statistical test (ANOVA) and Tukey's contrast test, assuming a significance of 5%. The sacrifice day glycemia of diabetic animals that received irradiation was decreased in comparison with the sacrifice day glycemia of non-irradiated diabetic animals as well as was lower than that measured on the day of diagnosis of irradiated animals ($p < 0,05$). The concentration of IGF-1, however, was not affected by diabetes or irradiation. However, IGF-1 concentration was increased on parotid than submandibular glands. Based on these results of the present study, we conclude that LBP can decrease blood glucose concentration of diabetic animals, however, this effect does not appear to be related to the concentration of IGF-1.

Keywords: Diabetes mellitus. Glycemia. IGF-1. Laser. Salivary Glands.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - A família IGF é composta por 3 ligantes, 3 receptores e 6 proteínas ligantes de IGF.....	28
Figura 2.2 - (a) Estrutura da pro-insulina com peptídeo C (conexão) e a molécula de insulina. (b) Estrutura do IGF-1 humano, as marcações pretas são os aminoácidos semelhantes aos da insulina.	29
Figura 4.1 - Organograma com a divisão dos animais em grupos de acordo com a condição sistêmica (controle e diabético) e dose de irradiação recebida (0 ou 5 J/cm ²).	37
Figura 4.2 - Planejamento das atividades com os animais.....	38
Figura 4.3 - Aparelho Laser Photon Lase III e distribuição dos pontos de irradiação nas áreas das glândulas salivares.	40
Figura 4.4 - (a) Demarcação das glândulas submandibulares prévia a irradiação ou simulação. (b) Demarcação das glândulas parótidas prévia a irradiação ou simulação.	41
Figura 4.5 - Glicosímetro Comercial Accu-Check Advantage II - Roche®.....	43
Figura 4.6 - (a) Reagentes utilizados no Rat Insulin-like growth factor 1 ELISA Kit (AbFRONTIER, Young In Frontier Co., Ltd, Korea). (b) Placa na qual a metodologia foi feita com auxílio de uma pipeta multicanal.....	44

Figura 5.1 - Peso inicial e final (g) para os diferentes.	47
Figura 5.2 - Glicemia inicial (diagnóstico) e final (eutanásia) para os diferentes grupos.	49
Figura 5.3 - Glicemia inicial (diagnóstico) e final (eutanásia) (em jejum) para os diferentes grupos.	50
Figura 5.4 - Concentração de proteínas (mg/mL) das Glândulas Submandibulares e Parótidas para os diferentes grupos.	51
Figura 5.5 - Concentração de IGF-1 (pg/mL) das Glândulas Submandibulares e Parótidas para os diferentes grupos.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
BMP	Bone Morphogenetic Proteins (Proteína Morfogenética Óssea)
C	Controle
CAT	Catalase
cm ²	Centímetro quadrado
dl	Decilitro
DM	Diabetes mellitus
GP	Glândula Parótida
GPx	Glutathione Peroxidase
GSM	Glândula Submandibular
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor-1
IGF-1R	Receptor de Insulin-Like Growth Factor-1
J	Joule
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
Kg	Quilograma
LPT	Fototerapia Laser (Laser Phototherapy)
MAD	Malondialdeído
mg	Miligramas
mW	Miliwatts
nm	Nanometro
s	Segundos
SOD	Superóxido Dismutase
STZ	Streptozotocin (Estreptozotocina)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Diabetes mellitus (DM)	19
2.2 Glândulas Salivares e Saliva	22
2.3 Diabetes mellitus e Glândulas Salivares	24
2.4 Insulin-like Growth Factor -1 (IGF-1).....	27
2.5 LASER	32
3 OBJETIVO	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Comitê de Ética no Uso de Animais	36
4.2 Animais	36
4.3 Indução do Diabetes mellitus.....	37
4.4 Grupos.....	38
4.5 Irradiação com laser em baixa intensidade	39
4.6 Obtenção das amostras.....	42
4.7 Análises.....	42
4.7.1 Determinação de glicemia	42
4.7.1.1 Determinação da glicemia pelo método da glicose oxidase	43
4.7.2 Determinação da concentração de IGF-1.....	44
4.7.3 Determinação concentração de proteínas.....	45
4.7.4 Análise estatística	45
5 RESULTADOS.....	46
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO	71

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization – WHO) e com o Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2003), o diabetes mellitus é um distúrbio metabólico de etiologia múltipla decorrente da produção insuficiente de insulina pelo pâncreas ou da incapacidade do organismo utilizar efetivamente a insulina produzida. Cerca de 80% dos indivíduos diabéticos são de países de baixa e média renda e segundo a WHO, em 2030, o número de pessoas diabéticas será de 366 milhões e o número de mortes por diabetes dobrará em relação ao ano de 2005.

Dados de 2011 mostraram que 25,8 milhões de crianças e adultos nos Estados Unidos têm diabetes, o que corresponde a 8,3% da população norte americana. Em 2007, o diabetes foi considerado causa morte em 71.382 casos e fator contribuinte em 160.022 casos de óbito (American Diabetes Association, 2012).

O diabetes mellitus é basicamente classificado em dois tipos, tipo 1: quando há deficiência absoluta de insulina e tipo 2 quando há resistência à insulina produzida e o organismo não consegue utilizá-la. Em ambos os tipos, a hiperglicemia é um dos principais fatores relacionados com as complicações do diabetes e está relacionada com danos em longo prazo, como disfunções ou falência de vários órgãos, especialmente, olhos, rins e coração e alterações no sistema nervoso e vasos sanguíneos (International Diabetes Federation, 2013).

Além disso, inúmeros estudos clínicos têm relacionado a hiperglicemia crônica em pacientes diabéticos, à maior incidência e progressão de complicações orais, incluindo gengivite, periodontite, cárie dental, candidíase oral, perda do osso alveolar e xerostomia, o que acarreta uma perda na qualidade de vida do paciente diabético (Negrato; Tarzia, 2010).

A saliva é um fluido constituído por componentes orgânicos e inorgânicos, importante para a saúde oral, devido as suas funções de lubrificação, *clearance*, ação antimicrobiana, capacidade tampão, ação digestiva, antioxidante e proteção da dentição, por exemplo. A saliva é composta por aproximadamente 90% da secreção

das glândulas salivares maiores, parótidas, submandibulares e sublinguais. As glândulas salivares são glândulas exócrinas que secretam uma variedade de proteínas, glicoproteínas e eletrólitos importantes para a integridade da saúde dos tecidos orais (Nicolau, 2008).

Além disso, as glândulas salivares são estudadas como órgãos com funções exócrinas e endócrinas relacionadas ao metabolismo dos carboidratos (Murakami et al., 1982; Santos et al., 1992). O *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1), o qual é sintetizado e secretado também pelas glândulas salivares, possui estrutura tridimensional muito semelhante a da insulina (Humbel, 1990), sugerindo que o IGF-1 pode mimetizar algumas das atividades metabólicas da insulina (Canalis, 1980). O IGF-1 é um fator de crescimento encontrado em altas concentrações no plasma e mensurável na saliva e possui como atividades biológicas a divisão celular, diferenciação e síntese de macromoléculas (Ryan et al., 1992).

As drogas diabetogênicas (aloxana ou estreptozotocina), usadas em modelos experimentais de ratos, vêm sendo utilizadas para o estudo dos efeitos da falta parcial de insulina e do aumento da glicemia sobre a função das glândulas salivares. Muitas alterações clínicas, assim como alterações histológicas e bioquímicas nas glândulas salivares já foram descritas decorrentes da indução do diabetes pela estreptozotocina. Aumento da atividade das enzimas antioxidantes das glândulas salivares submandibulares e parótidas, acúmulo lipídico nas células acinares das glândulas salivares maiores dos animais diabéticos, alteração na ingestão de água e comida, assim como perda de peso, são alguns exemplos de alterações observados no animal diabético.

Com isto, nosso grupo de pesquisa estuda algumas terapias que podem auxiliar nestas complicações relacionadas com o diabetes, como por exemplo, o uso da terapia com laser de baixa potência (*Laser Phototherapy* – LPT). Através de estudos foi descoberto que a LPT auxilia na melhora da qualidade de vida de pacientes que apresentam hipossalivação, como os indivíduos submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço e pacientes com Síndrome de Sjögren (Campos, et al., 2009; Simões et al., 2009c). Outros trabalhos demonstraram os efeitos da LPT nas glândulas salivares de animais diabéticos (Simões et al., 2008; Simões et al.,

2009a; Simões et al., 2009b; Simões et al., 2009d; Simões et al., 2010b; Ibuki et al., 2013).

Além dos efeitos localizados nas glândulas salivares, Simões et al. e Ibuki et al., observaram diminuição da glicemia dos animais diabéticos após estes receberem laserterapia nas glândulas salivares maiores, sugerindo que a laserterapia poderia auxiliar, de alguma maneira, no controle da glicemia (Simões et al., 2009a; Ibuki et al., 2013).

Com isto, o objetivo deste projeto é dar continuidade aos estudos anteriores através da avaliação do efeito da LPT na glicemia e no IGF-1 de ratas diabéticas induzidas quimicamente por estreptozotocina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para facilitação das explicações foram feitas as subdivisões dos tópicos.

2.1 Diabetes mellitus (DM)

O pâncreas endócrino é o órgão responsável pela origem da insulina, glucagon, somatostatina e do polipeptídeo pancreático, assim, 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 PP) foram identificados nas ilhotas de Langerhans, as quais constituem o pâncreas endócrino. As células β representam cerca de 60% a 80% do total de células e são as responsáveis pela produção da insulina, uma proteína constituída de 51 aminoácidos, que exerce funções no metabolismo protéico e lipídico, assim como na homeostase da glicose e na regulação do transporte de íons e aminoácidos (Cheatham; Kahn, 1995).

As células α são responsáveis pela secreção do hormônio glucagon e constituem 25% de todas as células da ilhota. As células δ secretam o hormônio somatostatina e representam 10% das células encontradas nas ilhotas. As células PP são encontradas em menor número e secretam um hormônio denominado polipeptídeo pancreático, cuja ação é incerta. O glucagon e a insulina são fundamentais na regulação normal do metabolismo da glicose, dos lipídeos e das proteínas. A homeostase da glicose ocorre através do controle do balanço entre a produção da glicose hepática e a utilização da glicose pelos tecidos dependentes e não dependentes de insulina, como o fígado, músculo e tecido adiposo e cérebro e rins, respectivamente (Gayton; Hall, 1997; Katchiburian; Arana, 2004).

A insulina é uma proteína pequena composta por duas cadeias de aminoácidos conectados por pontes de dissulfeto, isolada pela primeira vez no pâncreas por Frederick G. Banting e Charles H. Best em 1922 (Banting et al. 1991). 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 (Olefsky, 1990; Cheatham; Kahn, 1995).

A insulina ao se ligar a subunidade α , provoca a autofosforilação das subunidades β projetadas para o interior das células, a autofosforilação ativa a tirosina quinase que irá causar a ativação ou inativação de enzimas intracelulares, dirigindo o metabolismo intracelular, para produzir os efeitos desejáveis sobre o metabolismo dos nutrientes, resultando no aumento da captação de glicose pelas células do organismo provocado pelo aumento da permeabilidade celular devido à estimulação da síntese de transportadores de glicose e sua translocação para a membrana plasmática (Banting et al., 1991; Gayton; Hall, 1997).

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. A ausência de insulina, as alterações nos seus receptores ou na afinidade e a resistência à insulina produzida, impedem a captação e a utilização efetiva da glicose pelas células do corpo, elevando conseqüentemente o nível da glicemia. Assim a utilização de glicose pelas células fica cada vez menor enquanto a utilização das gorduras e proteínas aumenta (Gayton; Hall, 1997).

O Diabetes mellitus (DM) é uma doença caracterizada pela relativa ou absoluta falta de insulina levando a uma hiperglicemia. Existem dois tipos básicos de DM: Tipo 1: pessoas que não produzem insulina; 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 o gestacional, que se desenvolve durante a gravidez, porém desaparece em seguida ao parto (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003; Ashcroft; Rorsman, 2012; King, 2012).

Diabetes tipo 1 ocorre devido à destruição das células β do pâncreas, ocasionada em 90-95% dos casos por um processo autoimune. Na ausência de

insulina, os três tecidos alvos principais da ação da insulina são fígado, músculo e tecido adiposo, ocorrendo falha na captação da glicose, ocasionando hiperglicemia (Tripathi; Srivastava, 2006). 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. Os pacientes acometidos geralmente são de idade adulta, com algum grau de obesidade, que geralmente não necessitam de reposição de insulina para sobreviver, muito embora sua capacidade secretória de insulina deteriore com o tempo, muitos necessitando de tratamento com insulina para obterem controle da concentração de glicose sanguínea (Kido et al., 2002; Kim et al., 2012). Os pacientes com DM tipo 2, predominantemente apresentam resistência à insulina. A hiperglicemia é frequentemente associada com hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensão nestes pacientes. 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 (Tripathi; Srivastava, 2006; Greenspan; Gardner, 2007). As características clínicas dos pacientes com DM tipo 2 em diagnóstico são visão desfocada, vulvovaginite ou prurido e neuropatia periférica (Greenspan; Gardner, 2007).

A hiperglicemia crônica, no DM, está relacionada com danos em longo prazo, como, disfunções ou falência de vários órgãos, especialmente, olhos, rins e coração e alterações no sistema nervoso e vasos sanguíneos. Macro e microangiopatias e neuropatia estão dentre as principais complicações crônicas do DM. Além disso, o DM está relacionado com algumas complicações na cavidade oral, como será abordado adiante (Gayton; Hall, 1997; Borg Andersson et al., 1998; Kido et al., 2002; Mata et al., 2004; Fieffe et al., 2011; Schneider et al., 2011; Ashcroft e Rorsman, 2012; Kim et al., 2012; King, 2012; American Diabetes Association, 2012).

2.2 Glândulas salivares e saliva

As glândulas salivares constituem um grupo de glândulas exócrinas que vertem seu produto de secreção, a saliva, na cavidade oral. As glândulas salivares podem ser classificadas quanto ao tamanho em glândulas maiores e menores. As glândulas maiores se encontram aos pares e incluem as glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais. As glândulas menores estão distribuídas por toda a mucosa oral, com exceção da gengiva e região anterior do palato. As glândulas labiais, palatais e bucais são alguns exemplos de glândulas menores (Humphrey; Williamson, 2001; Katchburian; Arana, 2004).

Unidades morfofuncionais denominadas adenômeros compõem as glândulas salivares. Os adenômeros são constituídos por ductos e unidades secretoras terminais. As unidades secretoras terminais são responsáveis pela produção de saliva primária, isotônica em relação ao plasma quanto à concentração de cloreto de sódio (NaCl). O sistema ductal, por sua vez, funciona como um regulador eletrolítico, dando a saliva primária uma composição hipotônica em relação ao plasma, quanto à concentração de NaCl, transformando-a em saliva secundária (Kathburian; Arana, 2004; Nicolau, 2008).

As glândulas salivares também são classificadas quanto ao tipo celular de suas unidades secretoras terminais em glândulas serosas, mucosas ou mistas. As glândulas serosas possuem células acinares serosas, que se caracterizam pelo núcleo arredondado. Este tipo de glândula secreta uma saliva fluida, rica em enzimas e a sua secreção ocorre principalmente durante processos mastigatórios. As glândulas mucosas possuem células túbulo mucosas que se caracterizam pelo núcleo achatado. Estas secretam uma saliva com poucas enzimas, rica em glicoproteínas e com maior viscosidade. A produção de saliva nestas glândulas ocorre o tempo todo. As glândulas mistas são aquelas que possuem tanto ácinos serosos como os túbulos mucosos (Kathburian; Arana, 2004).

As glândulas parótidas são glândulas serosas, as glândulas menores são mucosas, as submandibulares são do tipo mista, com predomínio de células serosas e as sublinguais são mistas com predomínio de células mucosas.

Dentre as glândulas maiores, através de coleta em repouso, as parótidas produzem aproximadamente 20% da secreção salivar, sendo bastante fluida e rica em amilase; as glândulas submandibulares representam aproximadamente 70% da produção de saliva e as glândulas sublinguais 2%, aproximadamente. Levando-se em consideração a produção de todas as glândulas salivares, as glândulas salivares maiores compõem a maior parte da saliva total, e os outros 7%, aproximadamente, são produzidos pelas glândulas salivares menores. Já através de estímulos estas porcentagens mudam, sendo que a coleta através de estímulo com ácido temos que as glândulas parótidas produzem cerca de 46% da secreção salivar, as submandibulares contribuem com aproximadamente 46% e as sublinguais com 2% aproximadamente. Com estímulo mecânico, as parótidas contribuem com 60% aproximadamente da secreção salivar, as submandibulares com 33% e as sublinguais com 2%, aproximadamente. Além disso, quando o fluxo salivar é baixo há um predomínio de secreção das glândulas submandibulares e quando o fluxo salivar é alto o predomínio é das glândulas parótidas (Nicolau, 2008).

O estroma de tecido conjuntivo das glândulas salivares é rico em vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, sendo que o fluxo salivar é controlado pela estimulação nervosa simpática e parassimpática. O reflexo para a secreção salivar é mediado pelos quimiorreceptores dos botões gustativos e pelos mecanorreceptores do ligamento periodontal que levam a despolarização das fibras nervosas aferentes com o consequente aumento do fluxo salivar (Katchiburian; Arana 2004).

As glândulas parótidas e submandibular/sublingual são as principais responsáveis pela produção do fluido oral. Estas glândulas secretam uma variedade de componentes, como as proteínas salivares, glicoproteínas e eletrólitos importantes. As glândulas salivares têm funções importantes para manter a saúde oral, e as condições de hipossalivação têm sérias consequências clínicas como cárie dental, mucosite e gengivite, gerando uma diminuição na qualidade de vida (Nicolau, 2008).

Na saliva total encontram-se elementos celulares, epiteliais e do sangue, bactérias, vírus, IgA secretória, íons, enzimas, fatores de crescimento e outras moléculas. Essa complexa mistura confere a saliva, além das funções de lubrificação e formação do bolo alimentar, certas funções, entre as quais atividades

antimicrobianas, maturação e remineralização do esmalte, clearance, dentre outras. Acredita-se também que a saliva está envolvida na reparação tecidual da mucosa oral e que sua alteração ou ausência pode estar ligada a condições patológicas (Gayton; Hall, 1997; Mata et al., 2004; Nicolau, 2008; Simões et al., 2008; Mednieks et al., 2009; Simões et al., 2009c).

A composição da saliva sofre influência de vários fatores, como o fluxo salivar, que por sua vez varia com o tipo, intensidade e duração do estímulo secretório. Determinadas circunstâncias fisiológicas como idade, sexo, quantidade de dentes na cavidade oral, peso corporal e período do dia (ciclo circadiano), podem reduzir a secreção salivar. Além disso, condições patológicas (diabetes, desidratação e hipertensão), o uso de alguns medicamentos, terapia radioativa e algumas desordens genéticas, como a Síndrome de Down, podem causar hipossalivação e/ou xerostomia. Assim como a Síndrome de Sjögren que causa destruição progressiva das glândulas salivares, conduzindo a redução do fluxo salivar (Siqueira; Nicolau, 2002; de Almeida et al., 2008).

Os modelos experimentais de grande parte dos estudos sobre glândulas salivares são feitos com ratos, pois há similaridades entre as glândulas destes animais e de humanos, principalmente em relação à organização da secreção dos produtos finais e no sistema de ductos, existem diferenças anatômicas e fisiológicas, como o fato da saliva humana ser secretada espontaneamente e em ratos apenas com estímulo (Llena-Puy, 2006; de Almeida et al., 2008).

2.3 Diabetes mellitus e glândulas salivares

Inúmeros estudos clínicos têm relacionado a hiperglicemia crônica em pacientes diabéticos à maior incidência e a progressão de complicações orais, incluindo gengivite, periodontite, cárie dental, candidíase oral, perda do osso alveolar e xerostomia (Moore et al., 2001; Greenspan; Gardner, 2007). Entre os adultos jovens, aqueles com diabetes têm o dobro do risco de apresentarem problemas periodontais do que os que não apresentam a doença (Centers for Disease Control and Prevention, 2012).

Alguns estudos clínicos com pacientes diabéticos, tanto do tipo 1 como do tipo 2, têm mostrado que ambos secretam uma quantidade menor de saliva quando comparados com pacientes normorreativos de idade semelhante (Markopoulos; Belazi, 1998; Twetman et al., 2002; Mata et al., 2004). Além disso, pode-se observar que os pacientes portadores do diabetes apresentam valores elevados de alguns íons, como cálcio, magnésio, potássio e zinco na saliva (Mata et al., 2004).

O diabetes leva a inúmeras alterações tanto sistêmicas quanto em cavidade oral, causadas pelo aumento da concentração de glicose sanguínea. Uma das complicações que ocorrem em pacientes com diabetes é a hipossalivação que leva a problemas clínicos como cárie dental, mucosite e gengivite, gerando uma diminuição na qualidade de vida (Moore et al., 2001; Simões et al., 2008; Simões et al., 2009a; Negrato; Tarzia, 2010).

O DM tem sido estudado em modelos animais que utilizam ratos da raça Wistar, nos quais drogas diabetogênicas (aloxana e a estreptozotocina) são injetadas causando destruição das células beta do pâncreas (Szkudelski, 2001). Nestes animais diabéticos, induzidos quimicamente, o fluxo salivar também se mostra reduzido (Moore et al., 2001).

Os agentes químicos para indução do diabetes em estudos com animais são aloxana e estreptozotocina, sendo que estes dois agentes causam destruição das células β das ilhotas de Langerhans e afetam a morfologia e a função das glândulas salivares. A estreptozotocina foi usada primeiramente como um agente anti-tumorgênico e as propriedades diabetogênicas foram descobertas por acaso. Assim como a aloxana, possui uma atividade trifásica em animais. Inicialmente causam uma fase de hiperglicemia seguida por hipoglicemia e posterior e permanentemente uma hiperglicemia (Taylor, 1972; King, 2012).

Estudos com glândulas salivares de ratos diabéticos induzidos quimicamente mostram influência da hiperglicemia nestas glândulas. A hiperglicemia induz a expressão de superóxidos e estes relacionam com as complicações do diabetes. Nas glândulas submandibulares (GSM) Ibuki et al. (2010) mostraram um aumento na atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutational peroxidase (GPx) assim como na concentração de malondialdeído após 21 dias de indução do diabetes com estreptozotocina. Nas glândulas parótidas (GP) estes autores

observaram aumento na atividade da CAT e na concentração de malondialdeído em todos os tempos estudados (7, 14, 21, 28, 45 e 60 dias de diabetes) (Ibuki et al., 2010). Com 30 dias de diabetes, Nogueira et al. (2005a), observaram aumento no conteúdo de malondialdeído no sangue e nas GSM, assim como observou aumento na concentração de GPx nas GSM. Nas GP os autores observaram aumento da atividade da CAT e da GPx. Alterações na atividade da enzima hexoquinase e fosfofrutoquinase 1 em glândulas salivares de animais diabéticos também foram observados (Nogueira et al., 2005a; Nicolau et al., 2006). Leite e Nicolau (2009), observaram uma redução de proteína total e aumento da atividade da amilase e da peroxidase, assim como aumento na concentração de ácido siálico livre e total nas GPs dos animais diabéticos induzidos por estreptozotocina (Leite; Nicolau, 2009). Com relação à homeostase do cálcio, Nicolau et al. (2009) observaram uma diminuição na atividade da Ca^{2+} -ATPase, nas glândulas salivares de ratos diabéticos quando comparados com ratos controles (Nicolau et al., 2009). Além destas alterações bioquímicas, em ratos diabéticos foi notada a presença de vacúolos lipídicos nas glândulas salivares, os quais podem estar relacionados à hipofunção salivar (Simões et al., 2009a).

As glândulas salivares estão sendo estudadas como órgãos com funções exócrinas e endócrinas relacionadas ao metabolismo dos carboidratos (Murakami et al., 1982; Santos et al., 1992). Em modelos experimentais de ratos, quimicamente induzidos para o diabetes, foi visto que os níveis de insulina tiveram um declínio nas GPs e GSMs e que o potencial de síntese da insulina, IGF-1 e IGF-2 nestas glândulas e suas concentrações na saliva estavam aumentadas (Kerr et al., 1995). Em outro estudo foi demonstrado que, no estado de diabetes, houve um aumento na expressão dos receptores de IGF-1 e que sua expressão pode ajudar na homeostase glandular durante o diabetes (Caldeira e Cagnon, 2008). Além disso, Shubnikova et al. (1984) determinaram a presença de proteínas similares à insulina em glândulas submandibulares de ratos machos e a participação das glândulas na regulação do nível de glicose no organismo.

Em 2009, Simões et al., demonstraram que ratas diabéticas que receberam irradiação com laser de baixa potência nas glândulas salivares maiores, demonstraram diminuição da glicemia, sugerindo que as glândulas salivares podem atuar de alguma maneira no controle glicêmico (Simões et al., 2009a). Este dado foi

posteriormente confirmado por Ibuki et al., no qual foi visto que, após a irradiação das glândulas salivares com 5 e 20J/cm², os níveis de glicose sanguínea deste animais, no dia da eutanásia, estavam diminuídos quando comparada com a glicemia do dia de diagnóstico (Ibuki et al., 2013).

2.4 Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1)

O hormônio do crescimento faz com que o fígado e outros tecidos de menor extensão formem várias pequenas proteínas, chamadas de somatomedinas que, por sua vez, têm o efeito potente de acentuar o crescimento ósseo. Muitos dos efeitos das somatomedinas sobre o crescimento são semelhantes aos efeitos da insulina. Por isso, elas são chamadas de fatores de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like Growth Factor* - IGF).

O IGF é um sistema complexo de hormônios peptídicos, com receptores celulares de superfície e proteínas ligantes na circulação (Pavelic et al., 2007). A família IGF é composta por três ligantes (insulina, IGF-1 e IGF-2), três receptores de superfície celular (insulina, IGF-1 e IGF-2) e seis proteínas ligantes-IGF com alta afinidade (*Insulin-like Growth Factor Bonding Protein* - IGFBPs), como pode ser visto na figura 2.1 e os quais foram inicialmente identificados no fígado (Humbel, 1990; Marc et al., 1993; Murillo-Cuesta et al., 2011; Kurihara, et al., 2013). Além disso, alguns estudos mostram que a biossíntese deste peptídeo também ocorre nas glândulas salivares de roedores e humanos (Canalis, 1980; Murakami et al., 1982; Patel et al., 1986; Humbel, 1990), assim como, demonstraram a localização e expressão de IGF-1 em glândulas salivares de roedores (Kerr et al., 1995; Rocha et al., 2000; Amano e Iseki, 2001; Okada et al., 2007).

Figura 2.1 - A família IGF é composta por 3 ligantes, 3 receptores e 6 proteínas ligantes de IGF (Werner; Katz, 2004)

Pelo menos quatro somatomedinas foram isoladas, mas a mais importante delas é a somatomedina C, também chamada de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*Insulin-like Growth Factor 1* - IGF1) (Gayton; Hall, 1997).

O IGF-1 é um polipeptídeo, encontrado no plasma humano, que possui uma homologia com a molécula de pró-insulina (Figura 2.2 “a” e “b”). Estudos com computação gráfica indicam que os IGF-1 e IGF-2 podem assumir uma estrutura tridimensional similar à insulina e, o espectro de atividades biológicas exibidas por estes compostos, são qualitativamente similares, embora exista a variação dependendo do tecido e da célula utilizada para o experimento (Joshi et al., 1985).

O IGF-1 humano, o qual foi primeiramente isolado do soro, contém 70 aminoácidos, sendo que alguns deles estão em posições idênticas aos da cadeia da insulina humana (Figura 2.2 “a” e “b”) (Rinderknecht; Humbel, 1978; Shubnikova et al., 1984; Costigan et al., 1988). O IGF-1 desempenha um papel fundamental no crescimento pós-natal de mamíferos, assim como é um mediador importante, através do qual o hormônio do crescimento exerce seus efeitos biológicos. Além

disso, o IGF-1 tem papel importante no desenvolvimento embrionário e na homeostase do sistema nervoso adulto através de mecanismos endócrinos, autócrinos e parácrinos (Rotwein et al., 1986; Adamis; Meagher, 2011; Murillo-Cuesta et al., 2011).

Figura 2.2 - (a) Estrutura da pro-insulina com peptídeo C (conexão) e a molécula de insulina (Greenspan; Gardner, 2007). (b) Estrutura do IGF-1 humano, as marcações pretas são os aminoácidos semelhantes aos da insulina (Humbel, 1990)

A atividade biológica do IGF-1 está ligada à divisão celular e, síntese e diferenciação de macromoléculas. A sua concentração em saliva é menor do que no plasma, além disso, este peptídeo pode atuar de maneira autócrina em glândulas salivares e talvez de maneira parácrina em cavidade oral e/ou trato gastrointestinal (Ryan et al., 1992). Pavelic et al., também referem o papel do IGF-1 na proliferação celular, diferenciação e apoptose e que o mesmo constitui um fator de risco associado para malignidades, incluindo câncer de mama, próstata, colo retal e pulmões, quando em altas concentrações no soro (Pavelic et al., 2007). A redução dos níveis de IGF-1 está associada à redução do risco de câncer, prolongando assim a vida, mas por outro lado, baixos níveis de IGF-1 também estão associados com risco aumentado de condições relacionadas à idade, como a perda cognitiva, demência, a fragilidade, a atrofia dos tecidos e à disfunção vascular. Os autores referem que esta aparente contradição de funções ainda não está bem esclarecida, muito provavelmente pelas complexas ações biológicas do IGF-1 que envolvem diferentes vias e moléculas (Adamis; Meagher, 2011).

Os receptores de insulina e IGF-1 são heterotetrâmeros glicosilados compostos por duas subunidades alfa e duas subunidades betas ligadas por pontes dissulfeto. A subunidade α é extracelular e a subunidade β pertence ao domínio transmembrana e, intracelularmente, causa a autofosforilação (Humbel, 1990). Há também receptores híbridos para insulina e IGF-1, os quais são formados pela combinação de uma subunidade alfa e uma beta do receptor da insulina com uma alfa e uma beta do IGF-1. Como a sensibilidade do receptor da insulina para o IGF-1 é cerca de 200 vezes inferior para o IGF-1 em comparação com a insulina, é questionável se o IGF-1 exerce função significativa através dos receptores de insulina. No entanto, os receptores híbridos possuem 20 vezes maior afinidade pelo IGF-1 e eles ativam os mecanismos de sinalização relacionados com os receptores de insulina. Com isto, concentrações fisiológicas de IGF-1 podem desencadear ações relacionadas com a insulina (Seely et al., 1995; Sakai et al., 2002; Clemmons, 2004).

Independentemente do subtipo de receptor que é utilizado, na maioria dos tecidos, o IGF-1 tem mostrado estimular ações relacionadas com a insulina, como estimulação do transporte de glicose, oxidação da glicose e translocação dos transportadores de glicose, GLUT4, para a membrana plasmática (Dimitriadis et al.,

1992). Essas ações similares com a insulina variam de intensidade de acordo com o tecido estudado, por exemplo, o músculo esquelético parece ser mais sensível, ao contrário do fígado (Clemmons, 2004).

Markopoulos et al. (2000) afirmam que altas concentrações de IGF-1 sugerem um papel endócrino deste peptídeo, podendo modular aspectos celulares fisiológicos, incluindo proliferação e nutrição celular, além de indução e manutenção da diferenciação celular. Canalis et al. (1980) observaram o efeito estimulatório similar do IGF-1 e da insulina, na síntese de colágeno ósseo, em cultura de osteoblastos da calvaria de ratos. Os autores concluem que o IGF-1 estimula a síntese de DNA, colágeno e proteínas não colágenas em cultura de células ósseas indicando que o IGF-1 é importante na regulação do crescimento aposicional e que a insulina e o IGF-1 estimulam a síntese de colágeno.

Alguns trabalhos, realizados em animais e humanos, sugerem que os níveis de IGF-1 circulante são importantes na patogênese do diabetes tipo 2, através da regulação da sensibilidade à insulina ou da manutenção da massa de células β , sugerindo a importância do IGF-1 na homeostase da glicose. Além disso, alguns estudos experimentais têm demonstrado que o receptor de IGF-1 é importante para o desenvolvimento das células β pancreáticas e para sua sobrevivência (Dunger et al., 2003).

O IGF-1 e a insulina são estruturalmente homólogos e são responsáveis por algumas respostas biológicas. A insulina é muito mais potente que o IGF-1 em efeitos metabólicos de curto espaço de tempo como a estimulação do transporte de glicose em adipócitos, porém, o IGF-1 tem um efeito maior na estimulação da síntese de DNA de fibroblastos quando comparada com a insulina (Joshi et al., 1985).

Caldeira e Cagnon (2008) demonstraram que no estado diabético nota-se um aumento da expressão dos receptores de IGF-1 em glândulas salivares e que esta expressão poderia ajudar na homeostase glandular durante o diabetes. Segundo Kerr et al. (1995) o IGF-1 pode se ligar ao receptor de insulina, sendo possível que este fator de crescimento possa compensar o declínio nos níveis de insulina para tentar manter a homeostase de glicose nos tecidos dos animais diabéticos.

O IGF-1 pode se ligar aos receptores de insulina estimulando o transporte de glicose também em células musculares e adipócitos, para inibir a produção de glicose hepática e diminuir a glicose sanguínea enquanto ocorre a supressão da secreção de insulina. No entanto, o exato papel do IGF-1 na manutenção normal da homeostase de glicose e na sensibilidade à insulina ainda não foi definida.

Em estudos com pacientes diabéticos, quando pacientes com diabetes do tipo 1 foram investigados, a concentração sanguínea de IGF-1 estava abaixo do limite normal e, em resposta à terapia com insulina, os valores aumentaram (Bereket et al., 1995). Além disso, pacientes com deleção dos genes do IGF-1 ou animais com deleção na produção de IGF-1 pelo fígado, mostraram uma resistência à insulina severa, a qual foi revertida com terapia com IGF-1, além de ter havido redução na necessidade de receber insulina exógena (Clemmons, 2004). Com isto, esses trabalhos suportam a idéia de que o IGF-1 é necessário para uma sensibilidade normal à insulina e, o prejuízo na síntese de IGF-1, resulta na piora desta resistência (Pao et al., 1992; Moses et al., 1996; Dominici et al., 1999; Fernandez et al., 2001).

2.5 Laser

A palavra LASER é um acrônimo de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação). A laserterapia é caracterizada por usar os comprimentos de onda do vermelho e do infravermelho próximo, em baixa intensidade, onde se observa um efeito biológico que é atribuído aos eventos não térmicos.

Os lasers podem ser de alta e baixa potência. Os lasers de alta potência agem nos tecidos principalmente através do aumento de temperatura. Por outro lado, os lasers de baixa potência possuem ação terapêutica, caracterizados por induzir processos celulares fotobiológicos não térmicos e não destrutivos (Karu; Tiflova, 1987). Os efeitos da terapia com laser de baixa potência (Laser Phototherapy – LPT), por não ser visível a olho nu, são até hoje muito discutidos e questionados, porém, a teoria mais utilizada para explicar seu mecanismo de ação é

a proposta por Karu e Tiflova (1987), que sugere a ocorrência de mudanças fotoquímicas em moléculas fotorreceptoras participantes da cadeia respiratória (Karu, 1989). Os efeitos do laser no tecido podem ser divididos em primários e secundários, sendo primários àqueles que ocorrem na presença do laser, gerando, por exemplo, aumento de ATP e alteração do potencial da membrana mitocondrial e, os efeitos secundários, podem ocorrer minutos, horas e dias após a irradiação, sem a presença da luz, gerando alguns efeitos como o aumento da síntese de DNA e RNA, aumento do metabolismo, da ativação/inibição de enzimas, dentre outros (Mester et al., 1991; Karu, 1999).

A LPT tem como efeitos principais a biomodulação, a analgesia e o efeito anti-inflamatório. Estes efeitos são baseados na modulação de vários processos, convertendo energia luminosa do laser, que através de processos bioquímicos e fotofísicos, produzem energia que será usada pela célula (Karu; Tiflova, 1987).

Com relação ao efeito do laser sobre o IGF-1, Shimizu et al., mostraram que a irradiação com laser de baixa potência estimula a formação de nódulos ósseos via expressão de IGF-1 (Shimizu et al., 2007). Em outro trabalho, em que o efeito do laser de baixa potência sobre o IGF-1 foi estudado, os autores sugerem que o laser de baixa potência tenha efeito de estimulação da mineralização, *in vitro*, via aumento da expressão da proteína morfogenética óssea (Bone Morphogenetic Proteins – BMP) e que um dos fatores de crescimento associado a este evento seja o IGF-1. Fujimoto et al. (2010) demonstraram que ocorre aumento da produção de IGF-1 quando células osteoblásticas foram irradiadas, *in vivo* e *in vitro*, com laser de baixa potência, sugerindo a inclusão do IGF-1 como um dos fatores de regeneração óssea.

Nos pacientes com diabetes, o uso da LPT, relaciona-se principalmente com o efeito de bioestimulação, reparando as ulcerações crônicas, podendo prevenir as amputações. Além de estimular a proliferação celular e produção de fatores de crescimento em ratos diabéticos que foram irradiados como foi visto em alguns estudos (Yu et al., 1997; Kawalec et al., 2004).

Em paciente com hipossalivação, como Síndrome de Sjögren e pacientes irradiados de cabeça e pescoço, a LPT se mostrou uma terapia efetiva, melhorando a qualidade de vida do paciente (Campos et al., 2009; Simões et al., 2009c; Simões et al., 2010a). Além disso, no estudo com ratos diabéticos induzidos quimicamente

observou-se a queda na glicemia desses animais quando receberam aplicações com diferentes doses de irradiação (Simões et al., 2009a; Ibuki et al., 2013). Os autores também observaram diminuição do acúmulo lipídico das células acinares nas glândulas parótidas de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina (Simões et al., 2009a), além do aumento na concentração proteica destas glândulas, após receberem a LPT (Simões et al., 2009a; Ibuki et al., 2013). Esses resultados sugerem que a LPT pode ser auxiliar no controle das complicações relacionadas com o diabetes já que influencia tanto no metabolismo de carboidratos, lipídeos como no de proteínas.

Em animais sadios, alguns estudos observaram que a laserterapia com irradiação infravermelha, em doses de 4J/cm² e 8J/cm², estimulou as glândulas salivares de ratos e aumentou a concentração de proteínas totais em glândulas parótidas. Nestes estudos foi observado um aumento do fluxo salivar em ratos irradiados, sugerindo a LPT como auxiliar na terapia para hipofunção ou inflamação das glândulas salivares (Simões et al., 2009b; Simões et al., 2010b).

Visto que a LPT demonstrou efeito sobre a glicemia de animais diabéticos e sobre a concentração de IGF-1, em alguns tecidos, somado ao fato do IGF-1 estar relacionado com a homeostase da concentração de glicose, o presente trabalho teve como objetivo analisar se a diminuição na glicemia, observada em animais diabéticos, pode estar relacionada com alterações na concentração de IGF-1.

3 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral analisar o efeito da irradiação com laser de baixa potência na concentração de IGF-1 nas glândulas parótidas e submandibulares e na glicemia de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para facilitação das explicações foram feitas as subdivisões dos tópicos.

4.1 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Este estudo teve seu protocolo de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) (Anexo A).

4.2 Animais

Ratas adultas (60 dias de vida) da raça Wistar do Biotério do Laboratório de Biologia Oral da FOUSP, com peso corporal de aproximadamente 200g foram utilizadas. Os 40 animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o período experimental, com acesso controlado a água e alimento. Os animais foram divididos em dois grandes grupos: Diabéticos (D) e Controles (C) e aleatoriamente as ratas foram subdivididas em quatro subgrupos, sendo dois grupos de animais diabéticos (D0 e D5) e dois grupos de animais controles (C0 e C5), de acordo com a dose de irradiação laser que cada grupo recebeu (0 e 5 J/cm² respectivamente) (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Organograma com a divisão dos animais em grupos de acordo com a condição sistêmica (controle e diabético) e dose de irradiação recebida (0 ou 5 J/cm²)

4.3 Indução do *diabetes mellitus*

Após o período de 15 horas de jejum foi realizada uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (60 mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 4,5, para a indução do diabetes nas ratas dos grupos “D” (diabéticos). Os animais do grupo “C” (não diabéticos) receberam a injeção somente do veículo.

A glicemia foi verificada 72 horas após a indução do diabetes, para a confirmação do estado diabético nos grupos “D”. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia igual ou superior a 250 mg de glicose/dl de sangue. Após 29 dias da indução os animais receberam laserterapia ou simulação e 24 horas após, os animais foram eutanasiados e a glicemia novamente aferida (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Planejamento das atividades com os animais

4.4 GRUPOS

Vinte e nove dias após a indução do diabetes com a injeção de STZ/tampão, os animais foram anestesiados com Ketamina/Xilazina, na dose 80 mg/Kg de peso corporal e 20mg/Kg de peso corporal, respectivamente, e tricotomizados nas áreas das glândulas submandibulares e parótidas. Os animais foram irradiados ou não como se segue (Tabela 4.1):

Grupos D0 e C0: animais diabéticos e não diabéticos, respectivamente, onde somente a simulação da irradiação foi realizada;

Grupos D5 e C5: animais diabéticos e não diabéticos, respectivamente, irradiados com 5 J/cm².

Tabela 4.1 - Parâmetros de irradiação para os diferentes grupos

Grupo	Condição	Potência (W)	Fluência (J/cm ²)	Tempo de Irradiação por ponto (s)
D0	Diabético	0,07	0,0	0
D5	Diabético	0,07	5,0	2
C0	Controle	0,07	0,0	0
C5	Controle	0,07	5,0	2

4.5 Irradiação com laser em baixa intensidade

O laser Photon Lase III (DMC Equipamentos LTDA), com comprimento de onda de 660 nm (vermelho), do Laboratório Biologia Oral (LBO-FOUSP), foi utilizado 29 dias após a indução do diabetes (Figura 4.3a).

As áreas das GP (direita e esquerda) e GSM (as duas juntas) foram previamente demarcadas com um círculo de aproximadamente 1,13 cm² com uma caneta vermelha, o que resultou em três áreas irradiadas. Tricotomia para remoção dos pêlos dos animais foi realizada nestas regiões (Figuras 4.4a e b).

A irradiação foi realizada de maneira pontual em cada uma das três áreas, padronizadas anteriormente (Figura 4.3). A potência estava fixa em 70 mW e o tempo de irradiação de 2 segundos por ponto para os grupos D5 e C5, sendo a energia por ponto de 0,14J. A área do spot do laser é de 0,028 cm².

Sendo a área irradiada de 1,1304 cm² e a área do spot do laser 0,028 cm², foram necessários 40 pontos para que toda a área das glândulas fosse coberta ($1,1304 / 0,028 = 40,35$ pontos) (Figura 4.3b).

Figura 4.3 - (a) Aparelho Laser Photon Lase III e (b) distribuição dos pontos de irradiação nas áreas das glândulas salivares

Figura 4.4 - (a) Demarcação das glândulas submandibulares prévias a irradiação ou simulação. (b) Demarcação das glândulas parótidas prévias a irradiação ou simulação

Os animais receberam uma irradiação e foram sacrificados com 30 dias de diabetes (24 horas após a irradiação).

4.6 Obtenção das amostras

Os animais foram eutanasiados 24 horas após a irradiação por destroncamento medular após anestesia com Ketamina/Xilazina, na dose 80 mg/Kg de peso corporal e 20mg/Kg de peso corporal, respectivamente. O peso corporal dos animais foi anotado no início e no final da fase experimental, assim como a quantidade de comida e bebida ingerida.

Para as análises da concentração de proteína e de IGF-1, 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 até o momento da sua utilização. Para as análises da concentração de glicose no sangue, foi coletado material no dia do diagnóstico do diabetes e no dia do sacrifício, com os animais de jejum de 12 horas. A glicemia foi aferida pelo método da glicose oxidase e do glicosímetro.

4.7 Análises

Para facilitação das explicações foram feitas as subdivisões dos tópicos.

4.7.1 Determinação de Glicemia

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

Advantage – Roche) (Figura 4.5) e do método da Glicose Oxidase (Bergmeyer, 1965).

Figura 4.5 - Glicosímetro Comercial Accu-Check Advantage II - Roche®

4.7.1.1 Determinação da Glicemia pelo Método da Glicose Oxidase

O método da Glicose Oxidase foi descrito Bergmeyer (Bergmeyer, 1965), sendo que seu fundamento é:

δ – Gluconolactona é primeiramente formada, e espontaneamente hidrolisada a ácido D – Glucônico. O Peróxido de Hidrogênio é decomposto pela peroxidase e o oxigênio liberado oxida o doador de hidrogênio DH2 (O-Dianisidina), dando o derivado corado D.

A intensidade de cor formada a partir de DH2 é uma medida de quantidade de glicose oxidada. O espectro de absorção da cor formada a partir de O-Dianisidina

tem um pico máximo ao redor de 460nm, porém a reação pode ser monitorada na faixa de 425-475nm.

4.8 Determinação da concentração de IGF-1

A determinação da concentração de IGF-1 foi feita através do *Rat Insulin-like growth factor 1 ELISA Kit* (AbFRONTIER, Young In Frontier Co., Ltd, Korea) para animais usando as GSM e GP, adaptando o kit para glândulas (Figura 4.6a).

A metodologia é baseada na detecção de anticorpos policlonais de ratos por biotinizilação. As amostras e os anticorpos de detecção foram adicionados aos poços e em seguida lavados com tampão PBS ou TBS. O complexo Avidin-Biotin-Peroxidase foi adicionado e o substrato foi visualizado através da adição de tetrametilbenzidina (TMB), o qual foi catalisado e que produziu uma cor azul que mudou para amarela após a adição de ácido sulfúrico 1N (Figura 4.6b). A densidade de amarelo é proporcional à concentração de IGF-1 e foi lida em ELISA a 450 nm

Figura 4.6 - (a) Reagentes utilizados no *Rat Insulin-like growth factor 1 ELISA Kit* (AbFRONTIER, Young In Frontier Co., Ltd, Korea). (b) Placa na qual a metodologia foi feita com auxílio de uma pipeta multicanal

4.7.3 Determinação da concentração de proteínas totais

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.

4.7.4 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 utilizados no início dos experimentos apresentaram uma média de peso de 200g, aproximadamente. O grupo controle sem e com irradiação mostraram, ao final dos 30 dias de experimento, um ganho de peso corporal de aproximadamente 10 e 8%, respectivamente. Por outro lado, para os animais diabéticos, houve uma perda de peso de 17 e 29%, respectivamente (Figura 5.1), sendo esta diferença somente significativa para o grupo irradiado ($p<0,05$).

Muito embora os animais diabéticos tenham perdido peso durante o experimento, a ingestão de ração e o consumo de água apresentaram um aumento significativo para os grupos D0 e D5, quando comparados aos grupos C0 e C5, respectivamente (Tabela 5.1).

Com relação à análise glicêmica, pelo método da Glicose Oxidase, os animais diabéticos dos grupos D0 e D5, apresentaram média de 431,58 e 324,73 mg glicose/dl sangue, respectivamente, no início do experimento (glicemia de diagnóstico). Para os animais dos grupos C0 e C5, as médias foram 83,04 e 99,92 mg glicose/dl sangue, respectivamente. No dia da eutanásia (glicemia final), as médias eram 487,24 e 286,54 mg de glicose/dl sangue para os grupos D0 e D5, respectivamente, e 98,33 e 74,21 mg de glicose/dl sangue para os grupos C0 e C5, respectivamente. O grupo D5, no final do experimento, apresentou uma glicemia menor (aproximadamente 40%) que o grupo de animais diabéticos que não recebeu irradiação – D0 ($p<0,05$) (Figuras 5.2 e 5.3).

A glicemia foi também aferida pelo glicosímetro e as médias da quantidade de glicose (mg) por dl sangue para os grupos D0 e D5 no início do tratamento (glicemia de diagnóstico) foram de 502,10 e 570,60, respectivamente. Para os animais C0 e C5, as médias foram de 92,2 e 111,25, respectivamente. No dia da eutanásia (glicemia final), as médias foram de 498,30 e 286,54 para os grupos D0 e D5 e, 85,60 e 93,87 para os grupos C0 e C5, respectivamente. O grupo D5 apresentou diminuição significativa na glicemia final (eutanásia) quando esta foi comparada à sua respectiva glicemia inicial (de diagnóstico) e quando comparada à glicemia final

dos animais do grupo D0, sendo esta diminuição de 50 e 42%, respectivamente ($p<0,05$) (Figuras 5.2 e 5.3).

Os dados da concentração total de proteínas não mostrou diferença estatística entre os grupos diabéticos e não diabéticos e nem em relação à simulação ou irradiação (Figura 5.4).

Analisando-se a concentração de IGF-1 nas glândulas salivares parótidas e submandibulares, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os animais controles e diabéticos, independentemente se receberam ou não irradiação. No entanto, quando comparada a concentração de IGF-1 nas glândulas submandibulares com a concentração nas parótidas na mesma condição (controle ou diabético), foi observado um aumento na concentração de IGF-1 para as glândulas parótidas em comparação com as glândulas submandibulares, sendo esta diferença significativa estatisticamente somente para os grupos controles (C0 e C5) ($p<0,05$) (Figura 5.5).

Figura 5.1 – Peso inicial e final (g) para os diferentes grupos. As colunas representam os valores médios e as barras o desvio padrão. As letras diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$) entre os grupos (C0, C5, D0 e D5) e tempos experimentais (inicial e final) (C0, $n=10$; C5, $n=8$; D0, $n=10$; D5, $n=10$)

Tabela 5.1 – Médias e desvio padrão da ingestão de ração (g/semana) e do consumo de água (ml/semana) para os diferentes grupos. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa dentro das linhas ($p < 0,05$)

	<i>Controle</i>		<i>Diabético</i>	
	0 J/cm ²	5 J/cm ²	0 J/cm ²	5 J/cm ²
Água (ml/semana)	82,25±8,40 B n = 10	86,56±8,84 B n = 8	528,5±63,45 A n = 10	516,5±32,97 A n = 10
Comida (g/semana)	66,37±11,73 B n = 10	63,75±9,93 B n = 8	99,62±17,95 A n = 10	108,50±6,68 A n = 10

Figura 5.2 – Glicemia inicial (diagnóstico) e final (eutanásia) para os diferentes grupos, aferida pelo método da Glicose Oxidase. As colunas representam os valores médios e as barras o desvio padrão. As letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos (C0, C5, D0 e D5) e tempos experimentais (inicial e final) (C0, $n=10$; C5, $n=8$; D0, $n=10$; D5, $n=10$)

Figura 5.3 – Glicemia inicial (diagnóstico) e final (eutanásia) (em jejum) para os diferentes grupos, aferida através de um glicosímetro. As colunas representam os valores médios e as barras o desvio padrão. As letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos (C0, C5, D0 e D5) e tempos experimentais (inicial e final) (C0, $n=10$; C5, $n=8$; D0, $n=10$; D5, $n=10$)

Figura 5.4 – Concentração de proteínas (mg/mL) das Glândulas Submandibulares e Parótidas para os diferentes grupos. As colunas representam os valores médios e as barras o desvio padrão (C0, n=8; C5, n=10; D0, n=10; D5, n=10)

Figura 5.5 – Concentração de IGF-1 (pg/mL) das glândulas submandibulares e parótidas para os diferentes grupos. As colunas representam os valores médios e as barras o desvio padrão. As letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos (C0, C5, D0 e D5) (C0, $n=8$; C5, $n=10$; D0, $n=10$; D5, $n=10$)

6 DISCUSSÃO

Visto que o laser de baixa potência tem demonstrado efeito sobre a glicemia de animais diabéticos e sobre a concentração de IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), em alguns tecidos, somado ao fato do IGF-1 estar relacionado com a homeostase da concentração de glicose, o presente trabalho teve como objetivo analisar se a diminuição na glicemia observada em animais diabéticos que receberam LPT pode estar relacionada com alterações na concentração de IGF-1.

A perda de peso dos animais diabéticos, além do aumento de ingestão de água e de ração, condiz com a literatura que afirma que perda de peso, fraqueza, polifagia, polidipsia e poliúria são alguns dos sintomas que caracterizam o diabetes mellitus, sendo este também caracterizado pela hiperglicemia, dado este também encontrado no presente trabalho (Anderson, 1987; Kim et al., 1990; Anderson; Bevan, 1992; Nogueira et al., 2005a; Nogueira et al., 2005b).

Além disso, a literatura mostra que o diabetes experimental induzido quimicamente por estreptozotocina ou aloxana afeta as glândulas salivares, além de outros tecidos. A estreptozotocina age pela destruição das células β do pâncreas levando a alterações no metabolismo de carboidratos, das proteínas e de lipídeos (Ashcroft; Rorsman, 2012; King, 2012).

As complicações da hiperglicemia crônica estão relacionadas à disfunção e falência de vários órgãos, especialmente em rins, coração e olhos, além de alterações nos sistemas vascular e nervoso (Gayton; Hall, 1997; Borg Andersson et al., 1998; Mata et al., 2004; Greenspan; Gardner, 2007; Fieffe et al., 2011; Schneider et al., 2011; Ashcroft; Rorsman, 2012; Kim et al., 2012; King, 2012; American Diabetes Association, 2013). Em cavidade oral, as complicações mais comuns causadas pelo aumento da glicemia são a hipossalivação, cárie dental, mucosite e gengivite (Centers for Disease Control and Prevention, 2012; Humphrey; Williamson, 2001; Moore et al., 2001; Mata et al., 2004; Simões et al., 2008; Simões et al., 2009a; Simões et al., 2009d).

As glândulas salivares sofrem inúmeras alterações devido ao diabetes mellitus, como por exemplo, alterações nas atividades das enzimas superóxido

dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), hexoquinase, fosfofrutoquinase 1, amilase, peroxidase, Ca^{2+} -ATPase, aumento na concentração de malondialdeído (MAD), ácido siálico livre e total, redução da concentração de proteína total, além da presença de vacúolos lipídicos (Nicolau et al., 2005; Nogueira et al., 2005a; Nogueira et al., 2005b; Nicolau et al., 2006; Nicolau et al., 2009; Simões et al., 2009a; Simões et al., 2009d; Ibuki et al., 2013).

Com o objetivo de minimizar os efeitos deletérios do diabetes sobre as glândulas salivares, alguns pesquisadores buscam alternativas para auxiliar no tratamento ou prevenção destas complicações orais do diabetes mellitus, Leite & Nicolau em seu estudo utilizaram o tungstato de sódio, o qual possui propriedades antidiabetogênicas. Os animais diabéticos, induzidos por estreptozotocina, receberam um tratamento com tungstato de sódio durante dois tempos experimentais, 2 e 6 semanas e a glândula parótida foi analisada. Os autores observaram que a glicemia final (dia da eutanásia) dos animais diminuiu quando comparada com a glicemia inicial (diagnóstico) e que, nos animais tratados por 2 semanas, as glândulas parótidas apresentavam uma redução na concentração total de proteínas e um aumento da atividade das enzimas amilase, peroxidase e um aumento da concentração de ácido siálico livre e total quando comparadas com os animais não diabéticos, sugerindo uma mudança de composição na glândula parótida (Leite; Nicolau, 2009).

Outros estudos testaram o efeito da LPT sobre as glândulas salivares de animais diabéticos induzidos por estreptozotocina, assim como o efeito desta terapia sobre a concentração de glicose no sangue destes animais. Os autores observaram diminuição da glicemia final, quando comparada com a glicemia de diagnóstico, nos animais diabéticos que receberam a irradiação. Além disso, os autores observaram também diminuição no conteúdo lipídico nas glândulas salivares parótidas, sugerindo a LPT como uma possível alternativa para auxiliar no tratamento da hipofunção das glândulas salivares decorrente do diabetes (Simões et al., 2009a; Ibuki et al., 2013).

O laser de baixa potência interage com os tecidos, porém esta interação irá depender de algumas características próprias do laser, como o seu comprimento de onda, potência, tempo de exposição, dentre outros, além das características do

tecido alvo. Os efeitos do laser serão gerados através da absorção da luz pelo tecido em questão, sendo que este tecido necessita da presença de cromóforos ou fotorreceptores para que ocorra esta absorção e esta energia seja utilizada pelas células. Os efeitos gerados pelo laser são biomodulação, anti-inflamatório e analgesia (Karu, 1989; Eduardo, 2010).

Uma vez que os trabalhos anteriores demonstraram que a laserterapia foi capaz de alterar a glicemia dos animais que receberam a irradiação, o objetivo deste trabalho foi de verificar se esta diminuição glicêmica pode estar relacionada com a concentração de IGF-1 nas glândulas salivares.

Já foi descrito na literatura que o IGF-1 pode ser expresso nas glândulas salivares. O IGF-1 foi localizado nas células ductais das glândulas submandibulares, de ratos, através de radioimunoensaio e, pelo método de imunofluorescência, este peptídeo foi localizado no ducto granular destas glândulas em ratos e hamsters. (Shubnikova et al., 1984).

Patel et al. (1986) detectaram, por radioimunoensaio, a presença de material semelhante à insulina em pâncreas, glândulas parótidas e submandibulares em animais diabéticos e não diabéticos, sendo que a concentração em glândulas parótidas foi maior que nas submandibulares. Além de determinarem a presença de IGF-1, os autores localizaram, através de imunomarcação, material semelhante à insulina nos ductos intercalares de glândulas parótidas de camundongos e nas unidades secretoras terminais das glândulas submandibulares. Em outro estudo foi observada a presença de extrato de material semelhante à insulina em glândulas parótidas de humanos e ratos. Além disso, os autores sugerem a presença de células β em glândulas parótidas existindo assim uma produção de insulina pela glândula (Murakami et al., 1982).

Nossos dados demonstraram que o IGF-1 está presente em glândulas salivares de animais diabéticos e não diabéticos, tanto em submandibulares como em parótidas, porém, não foram vistas diferenças estatísticas entre a concentração de IGF-1 nas glândulas dos animais, quando levada em consideração a doença (diabéticos e não diabéticos), assim como o tratamento recebido (irradiados e não irradiados). No entanto, assim como no trabalho descrito acima, foi notada

concentração aumentada de IGF-1 em glândula parótida quando comparada com as glândulas submandibulares.

As parótidas são glândulas salivares serosas responsáveis por cerca de 20% da secreção salivar em repouso e secretam uma saliva bastante fluida e rica em proteínas. As submandibulares são glândulas mistas com predomínio de células serosas, sendo responsáveis por cerca de 70% da secreção salivar em repouso (Katchiburian; Arana, 2004; Nicolau, 2008). Além dos dados supracitados têm-se também as diferenças metabólicas das glândulas em questão, Nicolau; Sasaki (1976) demonstraram, através da análise do metabolismo de carboidratos, diferença da atividade metabólica dessas glândulas salivares maiores, incluindo a glândula sublingual. Neste estudo foi visto que a glândula submandibular consumia mais oxigênio que a glândula sublingual ou glândula parótida, sugerindo a diferença de metabolismo aeróbio e anaeróbio por parte destas glândulas. Uma vez que estas glândulas possuem diferenças relacionadas com a anatomia, morfologia e função, a diferença encontrada na concentração de IGF-1, no presente estudo, poderia ser esperada. Pelos dados da literatura e os nossos dados, podemos concluir que as glândulas parótidas, as quais são serosas, têm uma maior importância na expressão do IGF-1, mesmo após os animais estarem em jejum de 12h, fato importante, uma vez que é sabido que as glândulas parótidas têm sua função de secreção aumentada frente ao estímulo mecânico da mastigação (Nicolau, 2008).

A saliva produzida pelas glândulas salivares contém diferentes componentes entre eles o IGF (Patel et al., 1986), onde seus efeitos biológicos são mediados pelos receptores de IGF que são alterados em diferentes condições, como por exemplo, a hiperglicemia. Os autores através de imunofluorescência observaram que os animais não diabéticos apresentaram suave expressão do receptor de IGF (IGF-R) nas glândulas salivares submandibulares e parótidas e os animais diabéticos, por outro lado, mostraram intensa expressão de receptor de IGF, sugerindo uma tentativa de adequação do tecido lesado. Os autores sugerem que este aumento da expressão de IGF-R e a sua atividade com o IGF-1 na regulação de função de alguns tecidos, poderia estar ligado a um possível efeito regulador do metabolismo celular e ao transporte celular de glicose, já que são considerados, como uma futura estratégia, para o tratamento de algumas desordens sistêmicas causadas por diferentes condições, incluindo a condição de hiperglicemia. O estudo

também demonstra uma expressão mais intensa em glândula parótida, podendo esta ser menos afetada pela condição sistêmica do que a glândula submandibular, demonstrando uma melhor adaptação da glândula para a condição de hiperglicemia (Yashida et al., 2011).

Em glândulas salivares os IGFs são sintetizados nas células acinares especialmente na região dos ductos secretores, tanto em humanos quanto em roedores, e seus efeitos são mediados por receptores específicos de membrana. Com auxílio da microscopia confocal foi visto que, em glândulas parótidas há uma expressão moderada e uniforme do IGF-1R nos animais não diabéticos, principalmente nas células acinares dos ductos secretores e uma expressão intensa do IGF-1R nos grupos com 10 e 20 dias de diabetes, estando localizadas próximas as células ductais. Em glândulas submandibulares foi demonstrada a mesma intensidade de IGF-1R, porém os animais diabéticos de 20 dias os apresentavam, especialmente, próximos aos ductos secretores (Caldeira; Cagnon, 2008).

Luo et al. (2013) estudaram os efeitos da LPT na homeostase do sistema antioxidante e a expressão de IGF-1 em musculatura estriada durante o processo de reparação, uma vez que o IGF-1 está relacionado com a regulação da regeneração muscular. Os autores usaram um laser com 635nm de comprimento de onda, 7mW de potência por 20 minutos nas contusões do músculo gastrocnêmio. Como resultado, os autores observaram que o grupo de animais que receberam a laserterapia apresentou uma melhor regeneração muscular e redução da formação de escaras comparados com os grupos controle sem lesão e com contusão, além disso, verificou que a atividade da SOD e o conteúdo de MDA estavam aumentados quando comparando o grupo que recebeu irradiação com o grupo que não recebeu tratamento para a contusão. E em relação à expressão de IGF-1, o grupo controle com contusão apresentava aumento contínuo de sua expressão pelos tempos experimentais analisados, sendo 0 hora, 1, 2, 3, 7, 14, 21 e 28 dias, já os animais com contusão que receberam a irradiação mostraram um aumento da expressão de IGF-1 até o 14º dia após a injúria e um decréscimo dessa expressão nos dias seguintes. Com isto, os autores concluíram que a LPT pode modular a homeostase local das espécies reativas de oxigênio e a expressão de IGF-1 durante a reparação da musculatura estriada.

Os autores Shimizu et al. (2007) e Fujimoto et al. (2010) referem que, estimulando culturas de osteoblastos com o laser de baixa potência, o IGF-1, no primeiro trabalho, levou de 1 a 3 dias para sua expressão na formação de nódulos ósseos e, no segundo de 6 a 12 horas, após a aplicação da LPT. Shimizu et al. (2007) utilizaram $3,75\text{J}/\text{cm}^2$ de dose de irradiação com um comprimento de onda de 830nm por 10 minutos sendo que a irradiação foi realizada uma única vez, concluindo que o efeito estimulatório do laser na formação do nódulo ósseo foi parcialmente mediado pela expressão do IGF-1. Fujimoto et al. (2010) utilizaram 3 doses de irradiação, 0,96, 1,91 e $3,82\text{ J}/\text{cm}^2$ com os tempos de irradiação de 5, 10 e 20 minutos, respectivamente, com um comprimento de onda de 830nm, o autor afirma que o IGF-1 pode ser um importante fator estimulado pelo laser nas células similares a osteoblastos utilizadas no estudo.

Estas diferenças de expressão vistas nos diferentes trabalhos podem ser devido à diferença do tipo de célula irradiada, dose, tempo de irradiação utilizados pelos autores, mas estes trabalhos demonstraram influência da LPT na expressão do IGF-1, auxiliando tanto na osteogênese como na regeneração muscular.

Com isso observamos que a concentração de IGF-1 pode ser alterada pelo laser de baixa potência, porém, não temos um padrão de irradiação e de tempos experimentais em glândulas salivares para compararmos o nosso estudo com outros. Nosso estudo foi o primeiro trabalho a verificar o efeito da LPT na concentração de IGF-1 em glândulas salivares parótidas e submandibulares.

Em relação à concentração total de proteínas em animais diabéticos existem dados conflitantes, pois alguns autores encontraram resultados onde ocorre diminuição da concentração de proteínas (Anderson; Shapiro, 1979; Anderson, 1983) e outros não encontraram diferença (Zebrowski; Brimmer, 1978; Kim et al., 1990). Simões et al., demonstrou que a laserterapia não alterou a concentração total de proteínas em glândulas parótidas e em glândulas submandibulares a concentração de proteínas estava diminuída quando comparou o grupo diabético que não recebeu irradiação com o grupo controle que também não recebeu irradiação e no grupo de animais que receberam $5\text{J}/\text{cm}^2$ a concentração total de proteínas estava aumentada quando comparando os animais controles e diabéticos deste grupo de irradiação (Simões et al., 2009a). No presente trabalho, com relação

às glândulas parótidas e as glândulas submandibulares (Figura 5.4), não houve diferença estatística entre os animais diabéticos e não diabéticos.

Em relação à glicemia dos animais os nossos dados também analisam o efeito da LPT na glicemia dos animais diabéticos. Segundo Simões et al., os animais diabéticos que receberam irradiação com $5\text{J}/\text{cm}^2$ tiveram diminuição da glicemia final quando comparada com a inicial (Simões et al., 2009a). Além disso, Ibuki et al. (2013) comparando as glicemias inicial e final também mostraram diferença estatística na glicemia dos animais que receberam irradiação com $5\text{J}/\text{cm}^2$, utilizando o glicosímetro comercial.

Os diferentes parâmetros de irradiação influenciam os resultados apresentados, dessa forma estudos com a LPT, IGF-1 e glicemia e outros fatores relacionados com hiperglicemia são importantes para que possamos entender como a laserterapia age na concentração da glicose sanguínea e, assim, gerar um consenso nos estudos futuros para se ter parâmetros adequados para utilizarmos a LPT.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos do presente trabalho, assim como da metodologia empregada, podemos concluir que a alteração da glicemia dos animais diabéticos irradiados com laser de baixa potência parece não ter relação com a concentração de IGF-1 nas glândulas salivares parótidas e submandibulares.

REFERÊNCIAS¹

Adamis D, Meagher D. Insulin-like growth factor I and the pathogenesis of delirium: a review of current evidence. *J Aging Res.* 2011;2011:951403.

Amano O, Iseki S. [Expression and localization of cell growth factors in the salivary gland: a review]. *Kaibogaku Zasshi.* 2001 Apr;76(2):201-12. Japanese.

American Diabetes Association. 2012 [cited 05 01 2012]. Available from <http://www.diabetes.org/>

Anderson LC. Parotid gland function in streptozotocin-diabetic rats. *J Dent Res.* 1987 Feb;66(2):425-9.

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

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, 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.

Ashcroft FM, Rorsman P. Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years. *Cell.* 2012 Mar 16;148(6):1160-71. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.010. Review.

Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report. 1922. *CMAJ.* 1991 Nov 15;145(10):1281-6.

Bereket A, Lang CH, Blethen SL, Gelato MC, Fan J, Frost RA, et al. Effect of insulin on the insulin-like growth factor system in children with new-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995 Apr;80(4):1312-7.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

Bergmeyer HU. Methods of enzymatic analysis. 2nd ed. New York and London. Verlag Chemie Weinheim Academic Press; 1965

Borg Andersson A, Birkhed D, Berntorp K, Lindgärde F, Matsson L. Glucose concentration in parotid saliva after glucose/food intake in individuals with glucose intolerance and diabetes mellitus. *Eur J Oral Sci.* 1998 Oct;106(5):931-7

Caldeira EJ, Cagnon VH. IGF-I and INS receptor expression in the salivary glands of diabetic Nod mice submitted to long-term insulin treatment. *Cell Biol Int.* 2008 Jan;32(1):16-21. Epub 2007 Aug 26.

Campos L, Simões A, Sá PH, Eduardo C de P. Improvement in quality of life of an oncological patient by laser phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2009 Apr;27(2):371-4.

Canalis E. Effect of insulinlike growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J Clin Invest.* 1980 Oct;66(4):709-19.

Centers for Disease Control and Federation (2013). [cited 03 14 2012]. Available from <http://www.idf.org/diabetesatlas>.

Centers for Disease Control and Prevention. [cited 05 26 2012]. Available from <http://www.cdc.gov/>.

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

Clemmons DR. Role of insulin-like growth factor in maintaining normal glucose homeostasis. *Horm Res.* 2004;62 Suppl 1:77-82.

Costigan DC, Guyda HJ, Posner BI. Free insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-II in human saliva. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988 May;66(5):1014-8.

de Almeida P del V, Grégio AM, Machado MA, de Lima AA, Azevedo LR. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract.* 2008 Mar 1;9(3):72-80. Review.

Dimitriadis G, Parry-Billings M, Bevan S, Dunger D, Piva T, Krause U, et al. Effects of insulin-like growth factor I on the rates of glucose transport and utilization in rat

skeletal muscle in vitro. *Biochem J.* 1992 Jul 1;285 (Pt 1):269-74. Erratum in: *Biochem J* 1992 Nov 1;287(Pt 3):1023.

Dominici FP, Cifone D, Bartke A, Turyn D. Loss of sensitivity to insulin at early events of the insulin signaling pathway in the liver of growth hormone-transgenic mice. *J Endocrinol.* 1999 Jun;161(3):383-92.

Dunger DB, Ong KK, Sandhu MS. Serum insulin-like growth factor-I levels and potential risk of type 2 diabetes. *Horm Res.* 2003;60 Suppl 3:131-5. Review.

Eduardo, CP. *Lasers em odontologia.* 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2003 Jan;26 Suppl 1:S5-20.

Fernández AM, Kim JK, Yakar S, Dupont J, Hernandez-Sanchez C, Castle AL, et al. Functional inactivation of the IGF-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes. *Genes Dev.* 2001 Aug 1;15(15):1926-34.

Fieffe S, Morange I, Petrossians P, Chanson P, Rohmer V, Cortet C, et al. French Acromegaly Registry. Diabetes in acromegaly, prevalence, risk factors, and evolution: data from the French Acromegaly Registry. *Eur J Endocrinol.* 2011 Jun;164(6):877-84.

Fujimoto K, Kiyosaki T, Mitsui N, Mayahara K, Omasa S, Suzuki N, et al. Low-intensity laser irradiation stimulates mineralization via increased BMPs in MC3T3-E1 cells. *Lasers Surg Med.* 2010 Aug;42(6):519-26.

Gayton A C., Hall J E., editors. *Tratado de fisiologia médica.* 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.

Greenspan, FS and Gardner DG, editors. *Basic and clinical endocrinology.* 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2007.

Humbel RE. Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem.* 1990 Jul 5;190(3):445-62. Review.

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

Ibuki FK, Simões A, Nogueira FN. Antioxidant enzymatic defense in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats: a temporal study. *Cell Biochem Funct*. 2010 Aug;28(6):503-8.

Ibuki FK, Simões A, Nicolau J, Nogueira FN. Laser irradiation affects enzymatic antioxidant system of streptozotocin-induced diabetic rats. *Lasers Med Sci*. 2013 May;28(3):911-8.

Joshi S, Ogawa H, Burke GT, Tseng LY, Rechler MM, Katsoyannis PG. Structural features involved in the biological activity of insulin and the insulin-like growth factors: A27 insulin/BIGF-I. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985 Dec 17;133(2):423-9.

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

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B*. 1999 Mar;49(1):1-17. Review.

Karu TI, Tiflova OA. [Effect of low-intensity monochromatic visible light on the growth of *Escherichia coli* cultures]. *Mikrobiologiya*. 1987 Jul-Aug;56(4):626-30. Russian.

Katchiburian, E., Arana, V. *Histologia e embriologia oral*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 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 Jul-Aug;43(4):214-20.

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 May 17;49(10):1521-31.

Kido Y, Nakae J, Hribal ML, Xuan S, Efstratiadis A, Accili D. Effects of mutations in the insulin-like growth factor signaling system on embryonic pancreas development

and beta-cell compensation to insulin resistance. *J Biol Chem.* 2002 Sep 27;277(39):36740-7.

Kim MY, Bae JS, Kim TH, Park JM, Ahn YH. Role of transcription factor modifications in the pathogenesis of insulin resistance. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:716425.

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 Aug;69(8):1500-4.

King AJ. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol.* 2012 Jun;166(3):877-94.

Kurihara O, Takano M, Yamamoto M, Shirakabe A, Kimata N, Inami T, et al. Impact of prediabetic status on coronary atherosclerosis: a multivessel angioscopic study. *Diabetes Care.* 2013 Mar;36(3):729-33.

Leite MF, Nicolau J. Sodium tungstate on some biochemical parameters of the parotid salivary gland of streptozotocin-induced diabetic rats: a short-term study. *Biol Trace Elem Res.* 2009 Feb;127(2):154-63.

Llena-Puy C. The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006 Aug;11(5):E449-55. Review.

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

Luo L, Sun Z, Zhang L, Li X, Dong Y, Liu TC. Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF- β 1 in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci.* 2013 May;28(3):725-34.

Marc R Blackman, S Michel Harman, Jesse Roth, Jay R. Shapiro. GHRH, GH AND IGF-I Basic and Clinical Advances. Serond Symposia USA. Springer-Verlag. 1993

Markopoulos AK, Belazi M. Histopathological and immunohistochemical features of the labial salivary glands in children with type I diabetes. *J Diabetes Complications.* 1998 Jan-Feb;12(1):39-42.

Markopoulos AK, Pouloupoulos AK, Kayavis I, Papanayotou P. Immunohistochemical detection of insulin-like growth factor-I in the labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Oral Dis.* 2000 Jan;6(1):31-4.

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

Mednieks MI, Szczepanski A, Clark B, Hand AR. Protein expression in salivary glands of rats with streptozotocin diabetes. *Int J Exp Pathol.* 2009 Aug;90(4):412-22.

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

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 Sep;92(3):281-91.

Moses AC, Young SC, Morrow LA, O'Brien M, Clemmons DR. Recombinant human insulin-like growth factor I increases insulin sensitivity and improves glycemic control in type II diabetes. *Diabetes.* 1996 Jan;45(1):91-100.

Murakami K, Taniguchi H, Baba S. Presence of insulin-like immunoreactivity and its biosynthesis in rat and human parotid gland. *Diabetologia.* 1982 May;22(5):358-61.

Murillo-Cuesta S, Rodríguez-de la Rosa L, Cediell R, Lassaletta L, Varela-Nieto I. The role of insulin-like growth factor-I in the physiopathology of hearing. *Front Mol Neurosci.* 2011;4:11.

Negrato CA, Tarzia O. Buccal alterations in diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr.* 2010 Jan 15;2:3.

Nicolau, J. Editor. Fundamentos de bioquímica oral. 1ª ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan; 2008.

Nicolau J, Sasaki KT. Metabolism of carbohydrate in the major salivary glands of rats. *Arch Oral Biol.* 1976;21(11):659-61.

Nicolau J, De Souza DN, Simões A. Alteration of Ca(2+)-ATPase activity in the homogenate, plasma membrane and microsomes of the salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct.* 2009 Apr;27(3):128-34.

Nicolau J, Souza DN, Nogueira FN. Activity, distribution and regulation of phosphofructokinase in salivary gland of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Braz Oral Res.* 2006 Apr-Jun;20(2):108-13.

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

Nogueira FN, Carvalho AM, Yamaguti PM, Nicolau J. Antioxidant parameters and lipid peroxidation in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta.* 2005a Mar;353(1-2):133-9.

Nogueira FN, Santos MF, Nicolau J. Influence of streptozotocin-induced diabetes on hexokinase activity of rat salivary glands. *J Physiol Biochem.* 2005b Sep;61(3):421-7.

Okada T, Liew CW, Hu J, Hinault C, Michael MD, Krtzfeldt J, et al. Insulin receptors in beta-cells are critical for islet compensatory growth response to insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 May 22;104(21):8977-82.

Olefsky JM. The insulin receptor. A multifunctional protein. *Diabetes.* 1990 Sep;39(9):1009-16. Review. Erratum in: *Diabetes* 1991 Jan;40(1):159.

Pao CI, Farmer PK, Begovic S, Goldstein S, Wu GJ, Phillips LS. Expression of hepatic insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 genes is transcriptionally regulated in streptozotocin-diabetic rats. *Mol Endocrinol.* 1992 Jun;6(6):969-77.

Patel DG, Begum N, Smith PH. Insulin-like material in parotid and submaxillary salivary glands of normal and diabetic adult male mice. *Diabetes.* 1986 Jul;35(7):753-8.

Pavelić J, Matijević T, Knezević J. Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family. *Indian J Med Res.* 2007 Apr;125(4):511-22. Review.

Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.* 1978 Apr 25;253(8):2769-76.

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

Rotwein P, Pollock KM, Didier DK, Krivi GG. Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. Alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides. *J Biol Chem.* 1986 Apr 15;261(11):4828-32.

Ryan J, Mantle T, McQuaid S, Costigan DC. Salivary insulin-like growth factor-I originates from local synthesis. *J Endocrinol.* 1992 Oct;135(1):85-90.

Sakai K, Lowman HB, Clemmons DR. Increases in free, unbound insulin-like growth factor I enhance insulin responsiveness in human hepatoma G2 cells in culture. *J Biol Chem.* 2002 Apr 19;277(16):13620-7.

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.

Schneider A, Pfeifer LF, da Silva Neto JW, Hax LT, Antunes MM, Del Pino FA, Paludo GR, Corrêa MN. Effect of exogenous insulin and fasting on growth hormone receptor and IGF-I expression in the pre-ovulatory follicle of ewes. *Animal.* 2011 Aug;5(9):1420-5.

Seely BL, Reichart DR, Takata Y, Yip C, Olefsky JM. A functional assessment of insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors. *Endocrinology.* 1995 Apr;136(4):1635-41.

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 Jul;39(6):551-9.

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

Simões A, de Campos L, de Souza DN, de Matos JA, Freitas PM, Nicolau J. Laser phototherapy as topical prophylaxis against radiation-induced xerostomia. *Photomed Laser Surg.* 2010a Jun;28(3):357-63.

Simões A, de Oliveira E, Campos L, Nicolau J. Ionic and histological studies of salivary glands in rats with diabetes and their glycemic state after laser irradiation. *Photomed Laser Surg.* 2009a Dec;27(6):877-83.

Simões A, Ganzerla E, Yamaguti PM, de Paula Eduardo C, Nicolau J. Effect of diode laser on enzymatic activity of parotid glands of diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2009b Jul;24(4):591-6.

Simões A, Nicolau J, de Souza DN, Ferreira LS, de Paula Eduardo C, Apel C, et al. Effect of defocused infrared diode laser on salivary flow rate and some salivary parameters of rats. *Clin Oral Investig.* 2008 Mar;12(1):25-30.

Simões A, Nogueira FN, de Paula Eduardo C, Nicolau J. Diode laser decreases the activity of catalase on submandibular glands of diabetic rats. *Photomed Laser Surg.* 2010 b Feb;28(1):91-5.

Simões A, Platero MD, Campos L, Aranha AC, Eduardo Cde P, Nicolau J. Laser as a therapy for dry mouth symptoms in a patient with Sjögren's syndrome: a case report. *Spec Care Dentist.* 2009c May-June;29(3):134-7.

Simões A, Siqueira WL, Lamers ML, Santos MF, Eduardo Cde P, Nicolau J. Laser phototherapy effect on protein metabolism parameters of rat salivary glands. *Lasers Med Sci.* 2009d Mar;24(2):202-8.

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

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

Taylor KW. The biosynthesis and secretion of insulin. *Clin Endocrinol Metab.* 1972 Nov;1(3):601-22. Review.

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

Twetman S, Johansson I, Birkhed D, Nederfors T. Caries incidence in young type 1 diabetes mellitus patients in relation to metabolic control and caries-associated risk factors. *Caries Res.* 2002 Jan-Feb;36(1):31-5.

Werner H, Katz J. The emerging role of the insulin-like growth factors in oral biology. *J Dent Res.* 2004 Nov;83(11):832-6. Review.

Yashida MH, Da Silva Faria AL, Caldeira EJ. Estrogen and insulin replacement therapy modulates the expression of insulin-like growth factor-I receptors in the salivary glands of diabetic mice. *Anat Rec (Hoboken).* 2011 Nov;294(11):1930-8.

Yu W, Naim JO, Lanzafame 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 – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **187** nas fls. **115** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Alyne Simões Gonçalves**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Análise da glicemia e de fatores correlacionados (IGF-1 e insulina) após laserterapia nas glândulas salivares de ratas diabéticas*" do qual participam o(s) aluno(s) **Danielle Lima Corrêa de Carvalho** e o pesquisador **José Nicolau**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **07.02.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 14 de fevereiro de 2012.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP