

**FLÁVIA KAZUE IBUKI**

**Estudo do efeito da irradiação com laser em baixa intensidade no sistema  
antioxidante de glândulas salivares de ratas diabéticas  
induzidas por estreptozotocina**

São Paulo

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**FLÁVIA KAZUE IBUKI**

**Estudo do efeito da irradiação com laser em baixa intensidade no sistema  
antioxidante de glândulas salivares de ratas diabéticas  
induzidas por estreptozotocina**

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

Área de Concentração: Materiais  
Dentários

Orientador: Prof. Dr. Fernando Neves  
Nogueira

São Paulo

2010

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

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

Ibuki, Flávia Kazue

Estudo do efeito da irradiação com laser em baixa intensidade no sistema antioxidante de glândulas salivares de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina / Flávia Kazue Ibuki; orientador Fernando Neves Nogueira. -- São Paulo, 2010.

86p. : fig., tab.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Materiais Dentários. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Glândulas salivares. 2. Diabetes mellitus. 3. Antioxidantes. 4. Laser. I. Nogueira, Fernando Neves. II. Título.

Ibuki FK. Estudo do efeito da irradiação com laser em baixa intensidade no sistema antioxidante de glândulas salivares de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Aprovado em:     /     /2010

### **Banca Examinadora**

Prof(a).Dr(a).\_\_\_\_\_Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a).Dr(a).\_\_\_\_\_Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a).Dr(a).\_\_\_\_\_Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico esta Dissertação primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível.

Aos meus queridos pais: Milton Takunori Ibuki e Junko Yamasaki Ibuki, pelo esforço, compreensão, dedicação e por terem sido os principais responsáveis por esta e todas conquistas da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu pai por ter sido uma das pessoas mais importantes da minha vida e que junto com a minha mãe, fizeram com que eu chegasse até aqui. Pai, obrigada pelos ensinamentos, pelas broncas, pelas conversas, pelo carinho, amor e pelos conselhos sempre tão valiosos e que hoje sinto muita falta. Infelizmente o senhor não vai poder ler este agradecimento, mas mesmo assim estou escrevendo, pois sei que onde quer que esteja o senhor está orgulhoso olhando por mim. Sinto muito que não esteja aqui para ver a conclusão de mais uma etapa da minha vida e de um trabalho que graças ao seu esforço e dedicação pôde ser concretizado. Á minha mãe por ser um exemplo para mim em tudo. Mãe obrigada pela companhia nas madrugadas de estudo, pelas orações sempre muito valiosas, pelo incentivo, pelo carinho, amor e dedicação. Muito obrigada pelas palavras de carinho nos momentos de tristeza, pelas palavras de incentivo nos momentos de fraqueza e por estar ao meu lado em todas as etapas da minha vida. Obrigada por me aconselhar e me apoiar em todas as minhas decisões. Foi com a senhora e com o papai que aprendi desde a andar e falar, à importância dos estudos e foi graças a vocês que estou aqui. Eu devo a vocês não só a minha vida como todas as minhas conquistas. Á minha irmã Felícia e à minha irmã Fernanda pelo carinho, amizade, por estarem sempre ao meu lado e me ajudarem em tudo. Ao Kelvin pela sua companhia, carinho e amor incondicional. Ao meu namorado Fabio, pelo amor, amizade, carinho, companhia, proteção, apoio, incentivo, por ter transformado a minha vida e ter trazido muito mais alegria á ela desde que nos conhecemos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira por ter me aceitado como aluna de iniciação científica a 5 anos atrás e desde então me ensinado a gostar de pesquisa. Muito obrigada pelas sugestões e leituras, valiosas e essenciais para que este trabalho se concretizasse. Além da sua orientação, obrigada pela atenção, paciência, pelos conselhos, pela amizade e apoio nos momentos difíceis. Devo muito a você o meu amadurecimento não só como pessoa, mas também como pesquisadora (acho que agora já posso me considerar uma). O fato de você sempre me elogiar e acreditar na minha

capacidade foram essenciais para que eu vencesse a minha insegurança, para o meu crescimento e para que eu chegasse até aqui.

Muito obrigada;

Ao Prof. Dr. José Nicolau pelo carinho, amizade, conselhos, ensinamentos não só de bioquímica como também ensinamentos da vida. E pela sabedoria única e imprescindível. O livro de sua autoria foi essencial para o meu aprendizado em bioquímica oral e para a conclusão desta dissertação: o meu profundo agradecimento;

À Profa. Dra. Alyne Simões por ter idealizado este projeto e por ter me co-orientado neste trabalho. Muito obrigada pelas explicações, ajudas e pelas sugestões de leitura. Os seus ensinamentos principalmente na área de laser foram essenciais para a minha formação e para a conclusão deste trabalho;

Ao Douglas Nesadal, técnico do laboratório, pela paciência, carinho, amizade, conselhos, sugestões e pelas ajudas em tudo. Muito obrigada por sempre me explicar tudo com muito carinho e paciência. As suas ajudas foram essenciais não só para a conclusão deste trabalho como também para todo o meu aprendizado no manuseio com os ratos e também na prática laboratorial: o meu profundo agradecimento;

Ao Prof. Dr. Fábio Daumas e à Profa. Dra. Márcia Marques que participaram da banca da minha qualificação e contribuíram de forma essencial para conclusão deste trabalho;

À Profa. Dra. Marcela Carrilho pela amizade, carinho, apoio e sabedoria;

À Fapesp (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro fornecido para a realização deste projeto;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida a partir de Setembro de 2008 até a conclusão do mestrado.

Aos amigos do laboratório Paulinha Yamaguti, Jonas Matos, Luana Campos, Juliana Castro, Danielle Carvalho e Ana Carolina pela amizade e carinho;



Á minha amiga de graduação e pós-graduação Camila Moraes Espósito pela amizade, carinho, companhia e por ter me tranquilizado nos momentos difíceis;

Á Rosinha (Rosa Cristina Nogueira) e Eli (Elidamar Clementino Guimarães) pela amizade, carinho e orientações.

E enfim á Deus não só por ter criado estas pessoas maravilhosas, mas por tê-las colocado em minha vida no momento certo.

Durante esta jornada tive muitas dificuldades e os momentos de insegurança foram muitos. Às vezes o desânimo quis me contagiar, porém a vontade de ver este trabalho concluído foi maior, fazendo com que eu chegasse até aqui. Agora olho para trás e a sensação de dever cumprido se faz presente. Posso ver que as noites de sono perdidas, lendo, estudando e escrevendo não foram em vão.

"Foi o tempo que perdeste com a tua rosa, que fez a tua rosa tão importante".

*Antoine Saint Exupéry*

## RESUMO

Ibuki FK. Estudo do efeito da irradiação com laser em baixa intensidade no sistema antioxidante de glândulas salivares de ratas diabéticas induzidas por streptozotocina [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

O objetivo do presente estudo foi o de analisar o efeito da irradiação com laser em baixa intensidade no sistema antioxidante enzimático de glândulas salivares submandibular (GSM) e parótida (GP) de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina. As ratas foram inicialmente divididas em grupos não-diabéticas (C) e diabéticas (D) e mantidas pelo período experimental de 30 dias. No vigésimo nono dia as ratas foram subdivididas em seis grupos, sendo três grupos de animais não diabéticos (C0, C5 e C20) e três de animais diabéticos (D0, D5 e D20), de acordo com a dose de irradiação laser que cada grupo recebeu (0, 5 e 20 J/cm<sup>2</sup> respectivamente). Para a indução do diabetes foi realizada a injeção intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 4,5. Os animais pertencentes aos grupos “C” (não diabéticos) receberam a injeção somente do veículo. As glicemias foram verificadas 72 horas após a indução do diabetes, para a confirmação do estado diabético nos grupos “D”. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia superior a 250mg de glicose/dl de sangue. A irradiação com laser em baixa intensidade seguiu a metodologia determinada pelo método de Simões et. al. (2009). Os animais foram eutanasiados 24 horas após a irradiação, sendo imediatamente removidas as glândulas salivares para a realização das análises bioquímicas. Foram determinados através de espectrofotometria, os valores de total antioxidante (TAS) e as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). Através da análise dos resultados podemos concluir que em GSM de ratas diabéticas o laser com dose de 20J/cm<sup>2</sup> causou aumento na atividade da enzima SOD. E independente da dose, causou aumento nos valores de TAS e atividade da enzima CAT. Já em GSM de ratas não diabéticas a dose de 20J/cm<sup>2</sup> causou diminuição dos valores de TAS. E independente da dose a irradiação com laser levou a um aumento da atividade da enzima CAT. Nas parótidas de ratas diabéticas, independente da dose, a irradiação com laser causou diminuição da atividade da

enzima CAT. E em GP de ratas não diabéticas a dose de  $5\text{J}/\text{cm}^2$  causou diminuição da atividade da enzima CAT.

Palavras-Chave: Glândula salivar. Diabetes mellitus. Antioxidantes. Laser

## ABSTRACT

Ibuki FK. Effect of low power laser irradiation on the antioxidant system of salivary glands of diabetic rats induced by streptozotocin [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

The aim of the present study was to analyze the effect of low-power laser irradiation in the antioxidant enzymatic system of submandibular (GSM) and parotid (GP) salivary glands of diabetic rats induced by streptozotocin. The rats were initially divided into non-diabetic animals (C) and diabetic-animals (D) and maintained by the experimental period of thirty days. Twenty-nine days after diabetes induction, the animals were randomly divided into six groups: three diabetic groups (D0, D5 and D20) and three non-diabetic groups (C0, C5 and C20), according with laser irradiation dose that each one received (0, 5 and 20J/cm<sup>2</sup>, respectively). For diabetes induction an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) (60mg/Kg body weight), dissolved in 0.1M sodium citrate buffer, pH 4.5 was performed. In non-diabetic animals, only the citrate buffer was used. The diabetes condition was confirmed seventy-two hours after animals have received the STZ injection. Rats with blood glucose level higher than 14mM (250 mg/100ml) were considered diabetic. The laser irradiation was performed according to Simões et.al. method (2009). Twenty-four hours after the irradiation rats were euthanized. Then, immediately after the euthanasia, salivary glands were removed for biochemical analysis. The total antioxidant values (TAS) and the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxide (GPx) enzymes were determined in spectrophotometer. Analyzing the results we can conclude that in GSM of diabetic rats the laser irradiation with 20J/cm<sup>2</sup> increased the SOD activity. With the two different doses, increased the TAS values and CAT activity. However, in GSM of non-diabetic rats, laser irradiation with 20J/cm<sup>2</sup>, decreased the TAS values and led to an increase in CAT activity, regardless of the dose. In parotid glands laser irradiation decreased the CAT activity with either dose of 5J/cm<sup>2</sup> or 20 J/cm<sup>2</sup> and the laser irradiation with dose of 5J/cm<sup>2</sup>, decreased the CAT activity in parotid glands of non-diabetic rats.

Keywords: Salivary gland. Diabetes. Antioxidant system. Laser

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

CAT	catalase
EROs	espécies reativas de oxigênio
GP	glândula parótida
GPx	glutathione peroxidase
GSM	glândula submandibular
SOD	superóxido dismutase
TAS	total antioxidante

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
<b>2.1 Diabetes mellitus</b> .....	16
<b>2.2 Sistema antioxidante e o estresse oxidativo</b> .....	19
<b>2.3 Sistema antioxidante, estresse oxidativo e diabetes</b> .....	22
<b>2.4 Glândulas salivares e saliva</b> .....	27
<b>2.5 Diabetes, sistema antioxidante e glândulas salivares</b> .....	30
<b>2.6 Laser</b> .....	32
<b>2.7 Laser, diabetes, sistema antioxidante e glândulas salivares</b> .....	36
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	38
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
<b>4.1 Comitê de Ética</b> .....	39
<b>4.2 Animais</b> .....	39
4.2.1 Indução do Diabetes mellitus .....	40
4.2.2 Grupos .....	41
4.2.3 Irradiação com laser em baixa intensidade .....	41
<b>4.3 Obtenção das amostras</b> .....	43
<b>4.4 Análises</b> .....	44
4.4.1 Determinação da glicemia .....	44
4.4.2 Análise do Total antioxidante .....	45
4.4.3 Determinação da atividade da superóxido dismutase .....	46
4.4.4 Determinação da atividade da glutathione peroxidase .....	46
4.4.5 Determinação da atividade da catalase .....	47
4.4.6 Determinação da concentração total de proteínas .....	47
<b>4.5 Análise estatística</b> .....	47
<b>5 RESULTADOS</b> .....	48
<b>5.1 Resultados nas glândulas submandibulares</b> .....	49
<b>5.2 Resultados nas glândulas parótidas</b> .....	50
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	61
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	67
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68
<b>ANEXOS</b> .....	85

## 1 INTRODUÇÃO

Desde o ano de 1889, quando Von Mering e Minkowski descobriram no pâncreas a causa para o diabetes mellitus, pesquisadores se esforçam para encontrar algum efeito benéfico sobre esta doença a fim de diminuir os seus sintomas ou quem sabe encontrar a sua cura (1).

O diabetes mellitus pode ser basicamente classificado em dois tipos (a) Tipo 1: quando há deficiência absoluta de insulina; (b) Tipo 2: quando há resistência á insulina produzida e assim o organismo não consegue utilizá-la efetivamente. Existem ainda outros tipos de diabetes como a gestacional, desenvolvida durante a gravidez, porém desaparece em seguida (2).

Os principais sintomas apresentados pelos pacientes portadores de diabetes são polifagia, poliúria e polidipsia (3). No entanto, muitos estudos mostram complicações orais associadas ao diabetes, incluindo problemas periodontais, maior incidência de cárie dental, xerostomia e/ou hipossalivação (4-8).

Durante o metabolismo são gerados radicais livres, incluindo as espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs contêm elétrons não pareados e a presença de elétrons não pareados no átomo ou na molécula aumenta a sua reatividade química, conferindo-lhes grande instabilidade, pois em busca de estabilidade, tendem a acoplar o elétron que se encontra não pareado com outro que esteja presente em estruturas próximas à sua formação, comportando-se como doadores (redutores) ou receptores (oxidantes) de elétrons (9). Assim, quando em alta concentração podem agir de várias maneiras atingindo macromoléculas do sistema biológico, provocando desde desnaturação de proteínas, com conseqüente inativação de enzimas, até peroxidação lipídica, comprometendo função e estabilidade principalmente das membranas plasmáticas celulares.

No entanto, a fim de prevenir estes possíveis danos, nosso organismo dispõe de mecanismos denominados sistemas antioxidantes. E o desequilíbrio entre os pró-oxidantes e os antioxidantes em favor da geração de danos é conhecido como estresse oxidativo (10).

No paciente portador de diabetes existem consideráveis evidências de que o estresse oxidativo está aumentado, e que este aumento poderia estar relacionado com o desenvolvimento das complicações tardias do diabetes (11, 12). Além disso,



alguns autores relatam que os processos de glicação e a geração de produtos avançados de glicação (AGEs – advanced glycation end-products), mecanismos envolvidos no aparecimento das complicações do diabetes, estaria relacionado também com estresse oxidativo (13, 14). Diversos fatores podem contribuir para uma maior geração de radicais livres no paciente com diabetes. Alguns estudos mostram que o estado hiperglicêmico crônico têm relação direta com este aumento (14), uma vez que auto-oxidação da molécula de glicose (15) e a formação de AGEs levam ao aumento da concentração de EROs (16).

Com o sistema antioxidante possivelmente debilitado, maior geração de radical livre e conseqüentemente maior geração de danos celulares e teciduais, incluindo células e tecidos de glândulas salivares, a produção de saliva no paciente portador de diabetes poderia estar comprometida trazendo como conseqüência a hipossalivação. Segundo estudos prévios, a redução do fluxo salivar em pacientes diabéticos pode estar relacionada com o aumento do estresse oxidativo nas glândulas salivares (17-19).

A indução química do diabetes, por drogas diabetogênicas (aloxana ou estreptozotocina), em modelos experimentais de ratos vem sendo utilizada para estudo dos efeitos da falta parcial de insulina e do aumento da glicemia sobre a função das glândulas salivares.

Desde a criação do primeiro laser, ele vem sendo utilizado em áreas médicas com finalidade principalmente antiinflamatória, analgésica e biomodulatória. Estudos recentes mostram a utilização do laser na melhoria de qualidade de vida de pacientes oncológicos, que devido à radioterapia apresentam mucosite oral associado à dor intensa, xerostomia e/ou hipossalivação (20). Além disso, o laser em baixa intensidade também se mostrou útil na prevenção da mucosite oral (21-23). Outros estudos mostram que aplicações de laser em baixa intensidade melhoram o fluxo salivar de pacientes oncológicos submetidos á quimio e radioterapia (24). Aumento no fluxo salivar e melhoria na xerostomia de pacientes com Síndrome de Sjögren, após irradiação com laser em baixa intensidade também foi relatado (25).

Estudos utilizando glândulas salivares de ratos diabéticos induzidos quimicamente demonstraram interferência da irradiação com laser em baixa intensidade na atividade enzimática, metabolismo protéico e fluxo salivar dos ratos diabéticos comparados com o grupo controle (25-29).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da irradiação com laser em baixa intensidade no sistema antioxidante das glândulas submandibulares e parótidas de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina, através das análises de total antioxidante e atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Diabetes mellitus

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) (2, 30), 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.

O pâncreas é composto por dois tipos principais de tecidos: (1) os ácinos e (2) as ilhotas de Langerhans. As ilhotas são constituídas por quatro tipos principais de células, as células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e PP. As células  $\alpha$  constituem 25% de todas as células da ilhota e são responsáveis pela secreção do hormônio glucagon. Já as células  $\beta$  constituem cerca de 60% do total de células e são responsáveis pela secreção de insulina e amilina. As células  $\delta$  representam cerca de 10% de todas as células e secretam o hormônio somatostatina. Por fim, as células PP que são encontradas em menor número nas ilhotas secretam um hormônio denominado polipeptídeo pancreático, cuja função ainda é incerta. A insulina e o glucagon são dois hormônios fundamentais na regulação normal do metabolismo da glicose, dos lipídeos e das proteínas. Estes hormônios pancreáticos são responsáveis por regular a homeostase da glicose, através do controle do balanço entre a produção da glicose hepática e a utilização da glicose pelos tecidos dependentes de insulina (fígado, músculo e tecido adiposo) e os não dependentes de insulina (cérebro e rins) (31, 32)

A insulina, uma proteína pequena, composta por duas cadeias de aminoácidos conectadas por pontes dissulfeto, foi isolada pela primeira vez do pâncreas em 1922 por Frederick G. Banting e Charles H. Best, revolucionando o tratamento do paciente diabético (1). Além do efeito primário que este hormônio causa na homeostase da glicose, ele também promove uma série de outros eventos celulares como regulação do transporte de íons e aminoácidos, metabolismo de

lipídeos, síntese de glicogênio, síntese e degradação de proteínas e síntese de DNA (31).

Os efeitos do hormônio insulina sobre as células-alvo têm início através da ligação desta aos seus receptores situados na membrana plasmática. O receptor da insulina é composto de quatro subunidades: duas subunidades  $\alpha$  (situadas do lado externo à membrana celular) e duas  $\beta$  (atravessam a membrana, protuindo no citoplasma celular). Devido à ligação existente entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , a insulina ao se ligar a subunidade  $\alpha$ , provoca a autofosforilação das subunidades  $\beta$  projetadas para o interior das células. A autofosforilação ativa a tirosina quinase (enzima ativada) que irá causar a ativação ou inativação de algumas enzimas intracelulares, dirigindo assim o metabolismo intracelular, para então produzir os efeitos desejáveis sobre o metabolismo dos nutrientes, resultando principalmente em aumento da captação de glicose pelas células do organismo provocado pelo aumento da permeabilidade celular devido à estimulação da síntese de transportadores de glicose (GLUTS) e sua translocação para a membrana plasmática (32).

A ausência de insulina, alterações nos seus receptores, 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 (32).

Em 1889, os pesquisadores Baron Joseph Von Mering e Oscar Minkowski, observaram que cães normais desenvolviam diabetes severo quando tinham seu pâncreas removido, identificando no pâncreas a causa do diabetes. A partir desta data iniciaram os estudos sobre diabetes mellitus (1).

O diabetes é caracterizado por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo de carboidratos (33), lipídeos (19, 34) e proteínas (15), a qual em longo prazo está associada a danos, disfunção e falência de vários órgãos, principalmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos.

O quadro clínico do diabetes mellitus depende do tipo de diabetes e da gravidade das complicações clínicas. O diabetes mellitus pode ser classificado basicamente em dois tipos (1) Tipo 1: quando há destruição (auto-imune ou idiopática) das células beta do pâncreas, ocasionando conseqüentemente deficiência absoluta de insulina; (2) Tipo 2: quando há resistência à insulina

produzida e assim o organismo não consegue utilizá-la efetivamente. Existem ainda outros tipos de diabetes como a gestacional, desenvolvida durante a gravidez, porém desaparece em seguida (2).

No diabetes tipo 1 doenças auto-imunes e hereditariedade podem estar envolvidas na destruição das células beta, porém 90 a 95% dos casos a destruição está relacionada com um processo auto-imune. Devido à ausência de insulina, os três principais tecidos alvo da ação da insulina (músculo, fígado e tecido adiposo) ficam incapacitados de captar a glicose, ocasionando hiperglicemia. Assim há um desvio do metabolismo de carboidratos para o metabolismo de gorduras (aumento da utilização de gorduras para obtenção de energia), aumentando a liberação de cetoácidos no plasma, mais rapidamente do que podem ser captados e oxidados pelas células teciduais, e este acúmulo excessivo de cetoácidos leva ao desenvolvimento de acidose metabólica. Pacientes portadores deste tipo de diabetes são geralmente jovens e requerem terapia de reposição de insulina a fim de prevenir a cetoacidose (35). Os principais sintomas apresentados por pacientes acometidos por este tipo de diabetes são poliúria, polidipsia, polifagia com perda de peso e fraqueza.

Enquanto em indivíduos saudáveis, a resposta ao aumento de glicose no plasma ocasiona um aumento na secreção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas, e este aumento nos níveis de insulina circulante resulta em estimulação do transporte de glicose para os tecidos periféricos e inibição da gliconeogênese pelo fígado, em pacientes portadores de diabetes tipo 2, há pelo menos duas deficiências fundamentais: (1) redução da sensibilidade dos tecidos periféricos (músculos, tecido adiposo e fígado) à insulina (resistência à insulina) ou (2) comprometimento da função das células  $\beta$  do pâncreas em secretarem insulina, resultando em hiperglicemia crônica, produção de glicose em excesso pelo fígado (estimulação da glicogenólise) e subutilização de glicose pelos tecidos periféricos. Sendo que, provavelmente, ambos os fatores, genéticos e ambientais, estão envolvidos na patogênese deste tipo de diabetes. Em alguns casos a resistência insulínica pode estar relacionada com alterações na ligação da insulina com o seu receptor, no entanto, geralmente, a resistência à insulina resulta de um defeito na via de sinalização intracelular pós-receptor (31). Pacientes com diabetes tipo 2, têm apresentado redução significativa da atividade da tirosina quinase, enzima importante no controle do metabolismo intracelular através da ativação e inativação

de outras enzimas, provocando principalmente aumento da captação de glicose pelas células do organismo (36). Estes pacientes normalmente apresentam idade superior a 40 anos, algum grau de obesidade e não requerem de terapia de reposição de insulina para sobreviver; embora com o tempo, devido á resistência insulínica, a capacidade secretória do hormônio geralmente acaba se deteriorando e não se consegue mais controlar os níveis de glicose sanguínea apenas com dieta e medicamentos hipoglicêmicos orais, necessitando de tratamento com insulina (35). As características clínicas principais dos pacientes portadores de diabetes tipo 2 são: polifagia, polidipsia , poliúria, obesidade e neuropatia periférica. Sendo que nestes pacientes, a hiperglicemia é freqüentemente associada com hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensão (35, 37).

Altas concentrações de glicose sanguínea causam anormalidades no fluxo sanguíneo e aumento na permeabilidade vascular, ocasionando diminuição da atividade de vasodilatadores e aumento na atividade de vasoconstritores, os quais em longo prazo levam ao desenvolvimento de macro e microangiopatias. Estas juntamente com as neuropatias são exemplos de complicações crônicas do diabetes mellitus e são as principais causas de morbidade e mortalidade (35).

## **2.2 Sistema antioxidante e o estresse oxidativo**

O elemento oxigênio está presente entre nós como uma molécula diatômica,  $O_2$ . Todos os organismos, exceto os anaeróbios e as espécies aerotolerantes, necessitam de  $O_2$  para a produção eficiente de energia (10). O oxigênio é utilizado em diversas reações fundamentais para o crescimento, desenvolvimento e reprodução celular, no entanto mais de 95% do oxigênio consumido é direcionado para a respiração celular (38).

A molécula de oxigênio pode ser reduzida em água com o objetivo de sintetizar ATP na cadeia respiratória, que ocorre no interior da mitocôndria. Esta redução é catalisada por uma enzima denominada citocromo c oxidase localizada na membrana interna mitocondrial (38). Porém os estágios intermediários desta redução são a formação de radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ), correspondendo aos estágios de redução de um,

dois e três elétrons respectivamente (39). Estes três radicais são denominados como espécies reativas de oxigênio (ERO).

As ERO são radicais livres, ou seja, espécies químicas que contêm elétrons não pareados. A presença de elétrons não pareados no átomo ou na molécula aumenta a sua reatividade química. Além disso, essa característica confere-lhes grande instabilidade, pois em busca de estabilidade, tendem a acoplar o elétron que se encontra não pareado com outro que esteja presente em estruturas próximas à sua formação, comportando-se como doadores (redutores) ou receptores (oxidantes) de elétrons. Além delas, as espécies reativas de nitrogênio (óxido nítrico, dióxido de nitrogênio, peroxinitrito), espécies reativas de enxofre (radical tiíla), espécies reativas de cloro (ácido hipocloroso), metais de transição (ferro, cobre, manganês) e as espécies reativas de carbono, são outros exemplos de radicais livres (9).

Os radicais livres são gerados, inevitavelmente, como subproduto de vários processos bioquímicos (redução da molécula de oxigênio durante a respiração celular; oxidação de catecolaminas e a cascata de ativação do ácido araquidônico produzem elétrons que podem reduzir a molécula de  $O_2$  em  $O^{2-}$ ; produção de óxido nítrico pelo endotélio vascular e outras células) e em alguns casos, intencionalmente, como em neutrófilos ativados. Além disso, os radicais livres, também podem ser gerados no organismo em resposta a radiação eletromagnética vinda do meio externo, como raios X, raios gama, raios UV (ultravioletas), ultrassons e microondas, e adquiridos diretamente de poluentes oxidantes como ozônio e dióxido de nitrogênio (10, 39, 40).

Os radicais livres são necessários para manutenção do estado redox e sinalização intracelular e quando em concentrações ideais, garantem o bom funcionamento celular (41). No entanto, estas moléculas são inerentemente instáveis devido à presença de elétrons não pareados e, portanto são altamente reativos. A reação de um radical com uma molécula não radical (todas as macromoléculas biológicas, lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos, são possíveis alvos) gera uma reação em cadeia com a formação de novos radicais livres, que por sua vez podem reagir com mais macromoléculas (40).

As EROs, em particular, podem causar danos a todas as classes de macromoléculas celulares. Os fosfolipídeos do plasma e das membranas plasmáticas estão sujeitas a peroxidação lipídica, uma reação em cadeia iniciada

com a remoção de uma molécula de hidrogênio de um ácido graxo polissaturado pela ERO em busca de estabilidade. Os radicais lipídicos gerados reagem com a molécula de  $O_2$  dando origem a radicais peroxil e peróxido lipídico juntamente com malondialdeído. Uma consequência da peroxidação lipídica é o aumento permeabilidade da membrana plasmática e da membrana de organelas intracelulares, conduzindo a um influxo de  $Ca^{2+}$  e outros íons e subsequente tumefação celular (42). Além disso, o excesso de  $Ca^{2+}$  no interior da mitocôndria pode desencadear apoptose (43). Desnaturação de proteínas, danos à mitocôndria e ao DNA nuclear são outras importantes ações das EROs (40).

No entanto, o nosso organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que protege os sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de reações destas EROs com diversos alvos celulares.

Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas com as do substrato oxidável, atrasa significativamente ou inibe a oxidação do substrato de maneira eficaz (10), podendo agir em diferentes estágios da sequência oxidativa. No interior das células se encontra o sistema antioxidante enzimático composto principalmente pelas enzimas superóxido dismutase, peroxidase e catalase. A enzima superóxido dismutase (SOD) foi descoberta em 1968 por McCord e Fridovich (44, 45) e é responsável por catalisar a reação de dismutação de duas moléculas de  $O_2^-$  em peróxido de hidrogênio e oxigênio. A SOD foi a primeira enzima, capaz de metabolizar EROs, descoberta e está presente no citoplasma (CuZn-SOD) e na mitocôndria (Mn-SOD) em diferentes isoformas (40, 45). Duas enzimas são capazes de remover  $H_2O_2$ . A glutathiona peroxidase (GPx) foi descoberta por Mills em 1959 e desde então já foram identificadas 5 isoformas sendo 4 selênio dependentes e 1 não dependente de selênio (46). A GPx está presente no citoplasma e na mitocôndria, sendo que nas células cerca de 2/3 de sua atividade encontra-se no citoplasma e apenas 1/3 nas mitocôndrias (47). Ela desempenha o principal papel na remoção do  $H_2O_2$ , transformando este peróxido em água e oxigênio. A catalase (CAT) está presente nos peroxissomas de vários tecidos e também remove  $H_2O_2$  quando este se encontra em altas concentrações (40). Esta enzima contém moléculas de NADPH (nicotinamina adenina dinucleotídeo-P) ligadas, a qual é essencial para prevenir a sua inativação. Além disso, a catalase libera  $NADP^+$  quando em estresse oxidativo, o que proporcionará maior remoção de peróxido de hidrogênio pelo sistema glutathiona



redutase/peroxidase (48). Segundo alguns autores, a catalase é a enzima responsável por fazer a conversão de altas concentrações de  $H_2O_2$  em água e oxigênio. Entretanto, quando o peróxido de hidrogênio está presente em baixas concentrações (condições fisiológicas normais), é a glutathione peroxidase que se encarrega de realizar a remoção (10).

Além do sistema antioxidante enzimático o nosso organismo também conta com a ação do sistema antioxidante não-enzimático composto pela vitamina E,  $\beta$ -caroteno, coenzima Q,  $\alpha$ -tocoferol, ácido úrico, ácido ascórbico, flavonóides, entre outros (10).

Quando há um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) e o sistema antioxidante, em favor do aumento de concentração dos oxidantes, tem-se o estabelecimento do estado de estresse oxidativo. Oxidantes são gerados como um produto comum do metabolismo aeróbico podendo ser gerado em concentrações elevadas sob condições patológicas. Assim, se o sistema antioxidante de defesa estiver deficiente, poderão ocorrer danos em vários tecidos (39, 40).

### **2.3 Sistema antioxidante, estresse oxidativo e diabetes**

Existem consideráveis evidências de que o estresse oxidativo está aumentado nos sistemas biológicos do paciente portador de diabetes, e que este aumento teria implicação no desenvolvimento das complicações tardias do diabetes (11, 12). Além disso, alguns autores relatam que o estresse oxidativo estaria relacionado com os processos de glicação e a geração de produtos avançados de glicação (AGEs – advanced glycation end-products), mecanismos envolvidos no aparecimento das complicações do diabetes (13, 14).

Nos tecidos, a hiperglicemia pode causar aumento no estresse oxidativo celular, através da super produção de espécies reativas de oxigênio (15, 35, 49), o que acarreta em mudanças nos parâmetros antioxidantes (34, 50)

Vários fatores podem contribuir para o aumento da geração de radicais livres no diabetes. O estado hiperglicêmico crônico está diretamente associado com este

aumento (14), uma vez que auto-oxidação da molécula de glicose (15) e a formação de AGEs levam ao aumento da concentração de EROs (16).

O excesso de glicose pode causar a glicação de proteínas durante um processo denominado “reação de Maillard” (11, 51). Durante este processo a molécula de glicose pode se ligar ao radical amino da proteína, gerando um composto denominado “Produto Amadori”, que pode sofrer uma oxidação (por EROs), gerando AGEs (10). A glicação de proteínas também pode levar a inativação de enzimas, inclusive as que compõem o sistema antioxidante enzimático (52). Outro mecanismo que estaria relacionado com a hiperglicemia presente no estado diabético, inativação de proteínas e o aumento na geração de radicais livres, é a auto-oxidação da molécula de glicose. Durante este processo, através da enolização é gerado o radical enediol. Este radical transfere seu elétron não pareado á molécula de O<sub>2</sub>, gerando um ânion superóxido e uma dicarbonila. A dicarbonila pode se ligar a duas cadeias protéicas formando uma ligação cruzada entre elas e inativando-as (10, 53). Além disso, o sistema antioxidante pode estar reduzido, como uma consequência da glicação.

Estudos realizados utilizando ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina ou aloxana mostraram resultados uniformes em relação à peroxidação lipídica, indicando aumento na concentração de ácido tiobarbitúrico (TBARS), importante marcador de peroxidação, em pâncreas, coração, sangue. Alta concentração deste composto evidencia indiretamente grande geração de radicais livres (34). Estudos in vivo mostraram aumento dos subprodutos de peroxidação lipídica (TBARS) aumentados no plasma, eritrócitos e membrana de eritrócitos de pacientes diabéticos e ainda maior em pacientes diabéticos que apresentavam complicações (54). Valores de malondialdeído (MDA) (55), hidroperóxidos lipídicos e lipoperóxidos (outros importantes marcadores de peroxidação lipídica) também mostraram estar elevados no plasma de pacientes diabéticos, independente da presença de complicações (56).

Os resultados indicando influência do estado diabético no sistema antioxidante enzimático (SOD, CAT e GPx) apresentaram resultados variados em vários tecidos, tanto de humanos como de ratos diabéticos induzidos quimicamente por estreptozotocina ou aloxana.

Estudos realizados com pacientes portadores de diabetes tipo 1 mostraram aumento na atividade das enzimas SOD e CAT do plasma (55). Outro estudo

mostrou diminuição nos valores da atividade da CAT em eritrócitos de pacientes diabéticos (57). No entanto, valores reduzidos da atividade da SOD foram encontrados em eritrócitos de pacientes diabéticos (56-59) e em células polimorfonucleares de pacientes diabéticos tipo 1 e 2 (60). Estudos mostraram valores menores na atividade da GPx nos eritrócitos e tecido ocular de pacientes diabéticos (56, 61).

Os estudos realizados em ratos e coelhos diabéticos induzidos quimicamente analisaram a influência do estado diabético no sistema antioxidante de diversos tecidos. Sendo que o tempo de indução variou de 0 (62), 1 (62-64), 2 (62, 65-68), 3 (62, 69, 70), 4 (62, 64, 71-76), 5 (62), 6 (62, 77-79), 7 (64, 80-82), 8 (71, 75, 83-86), 10 (34), 12 (77, 79, 87-89), 14 (90), 15 (91) e 32 (92) semanas. A droga diabética utilizada variou entre aloxana (65, 70, 76, 80, 93, 94) e estreptozotocina (34, 62-64, 66-69, 71-75, 77-79, 81-92, 94-96)

Analisando todos os resultados encontrados, observamos grande divergência nas alterações das atividades das enzimas antioxidantes frente ao estado diabético tanto nos estudos com humanos como nos estudos com animais. Em relação aos estudos com animais, esta variabilidade pode ser em parte explicada pelos diferentes modelos de indução de diabetes utilizados, raça e sexo dos animais, a idade dos animais no período da indução e a duração do estado diabético após a indução. Já os estudos com humanos sofrem variabilidade nos seguintes fatores: tipo e duração do diabetes, tipo de tratamento utilizado para o diabetes, presença e ausência de complicações do diabetes, idade e sexo dos indivíduos, entre outros.

### 2.3.1 Atividade da enzima SOD

Em coração de ratos diabéticos foi observado aumento na atividade da enzima SOD (34, 92), porém este aumento não foi confirmado por outros autores (73, 85, 93, 94).

Em rim de ratos diabéticos houve redução na atividade da enzima SOD em alguns estudos (83, 84, 87, 93-95). No entanto, aumento na atividade da enzima SOD foi encontrado por outros autores (62, 77, 78).

Em fígado de ratos diabéticos houve queda na atividade da enzima SOD quando compara ao grupo controle (69, 70, 72, 87, 93-95). Apenas três autores encontraram aumento na atividade desta enzima (34, 71, 74).

Em pâncreas de ratos diabéticos a atividade da enzima SOD foi maior (34, 71, 87, 93). No entanto outro estudo encontrou diminuição da atividade (94).

No sangue a atividade de SOD não mostrou alteração (93). Outro estudo, porém mostrou diminuição (94).

No baço, cérebro e músculo a atividade da enzima SOD foi menor nos ratos diabéticos quando comparados ao controle (94).

Nas células endoteliais da artéria aorta de coelhos diabéticos houve diminuição da atividade da enzima SOD (65). Mas, nenhuma alteração foi encontrada na atividade desta enzima no tecido da artéria aorta de ratos diabéticos (88, 90).

Em eritrócitos de ratos diabéticos houve diminuição da atividade da enzima SOD (79, 94, 95). Outros autores, porém encontraram aumento (66, 80).

### 2.3.2 Atividade da enzima GPx

Em coração de ratos diabéticos nenhuma diferença significativa na atividade da enzima GPx foi encontrada, quando comparada com a do grupo controle (87, 93). No entanto, outros dois autores encontraram queda na atividade (73, 85).

Em rins houve aumento na atividade da enzima GPx com o estado diabético (34, 62, 67, 69, 75, 77, 78, 81-84, 87, 91, 93, 96). Este aumento poderia estar relacionado com o fato de em rins saudáveis o valor da atividade da GPx ser baixo (87), e assim em situações patológicas há um aumento na atividade a fim de proteger o tecido.

Em fígado, a atividade da enzima GPx foi menor no grupo diabético quando comparado ao controle (70, 72, 87, 93). Outros autores, porém observaram aumento (69, 81, 83, 84).

No pâncreas de ratos diabéticos não houve alteração na atividade da GPx (87, 93).

No sangue de ratos diabéticos observou-se aumento na atividade da enzima GPx (89, 93).

Em tecido de artéria aorta de ratos diabéticos aumento na atividade da enzima GPx foi encontrado em um estudo (75, 88). No entanto, outro estudo mostrou não haver alteração (86).

Em células endoteliais de artéria aorta de coelhos diabéticos não houve alteração na atividade de GPX (65).

### 2.3.3 Atividade da enzima CAT

Em coração de ratos diabéticos foi observado aumento na atividade da CAT quando comparado ao grupo controle (34, 68, 73, 81-87, 92, 93). No entanto em células endoteliais de coelhos diabéticos notou-se diminuição (65).

Nenhuma alteração foi encontrada na atividade da CAT em homogenado de artéria aorta de ratos diabéticos (75). Porém outros autores observaram aumento na atividade desta enzima em aorta de ratos diabéticos (88, 90).

Em rins de ratos diabéticos, a redução na atividade da enzima CAT foi mostrada por alguns autores (62, 68, 78, 87, 93). No entanto, outros autores observaram aumento na atividade nos animais diabéticos quando comparada a do grupo controle (67, 69, 75, 94).

Em fígado de ratos diabéticos estudos mostraram queda na atividade da enzima CAT (68, 70, 87, 93). Porém outros estudos observaram aumento (34, 64, 69, 74, 75, 94).

Em pâncreas de ratos diabéticos a atividade da enzima CAT foi maior (34, 68, 71, 87, 93).

Em cérebro de ratos diabéticos foi encontrado aumento na atividade desta enzima (69).

No sangue de ratos diabéticos não houve alteração na atividade da enzima CAT (93). Nos eritrócitos também não encontram nenhuma alteração (87, 93, 94). Porém outros autores encontraram aumento na atividade de CAT em sangue de ratos diabéticos (34, 63, 76, 79).

Apesar da grande variabilidade nos resultados, o que se torna evidente em todos os trabalhos citados é a presença da influência do diabetes no sistema antioxidante.

## 2.4 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 de palato. As glândulas labiais, palatais e bucais são alguns exemplos de glândulas menores (97).

Unidades morfofuncionais denominadas adenômeros compõem as glândulas salivares. Os adenômeros por sua vez são constituídos de ductos e ácinos. As células acinares possuem um formato piramidal e estão arranjadas em um formato de esfera. Elas são responsáveis pela produção da saliva denominada 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 à saliva primária uma composição hipotônica em relação ao plasma, quanto a concentração de NaCl, transformando-a em saliva secundária (98). A saliva, portanto é secretada por um processo de duas fases. Assim, quando a saliva primária passa pelo ducto estriado há uma absorção de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  para a entrada de  $\text{K}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$ , e é com esta composição, da saliva secundária, que este fluido será secretado na cavidade oral (99). A hipotonicidade da saliva secundária em relação à concentração de NaCl da saliva secundária está relacionada com a função gustativa da saliva (97, 100).

As glândulas salivares também podem ser classificadas quanto ao tipo celular de seus ácinos em glândulas serosas, mucosas e mistas. As glândulas serosas possuem células acinares serosas, que se caracterizam pelo núcleo arredondado. Este tipo de glândulas secreta uma saliva fluída (aquosa e fina), rica em enzimas e sua secreção ocorre principalmente durante processos mastigatórios. As glândulas mucosas possuem células acinares mucosas que se caracterizam pelo núcleo

achatado. Elas secretam uma saliva com poucas enzimas, rica em glicoproteínas e com maior viscosidade. A produção de saliva por estas glândulas ocorre o tempo todo. As glândulas mistas são aqueles que possuem tanto ácinos serosos como os mucosos. A glândula parótida segundo esta classificação são glândulas serosas, as glândulas menores são mucosas, as submandibulares são mistas com predomínio de células serosas e as sublinguais são mistas com predomínio de células mucosas (97).

As glândulas parótidas contribuem em 20% do volume total de secreção de saliva não estimulada. As submandibulares e sublinguais contribuem com 60% e 5% respectivamente. E as glândulas menores contribuem com cerca de 10 % do volume total de saliva não estimulada (101).

As glândulas salivares possuem como principal função a síntese de macromoléculas e sua secreção juntamente com água e eletrólitos, formando no conjunto a saliva. A secreção salivar é controlada pelo sistema nervoso autônomo (SNA), onde a transmissão do sinal neural para as células acinares da glândula salivar ocorre quimicamente através de neurotransmissores. O SNA é dividido em: simpático e parassimpático. O volume e tipo de saliva secretada irão depender do tipo e da intensidade da estimulação do SNA. Em geral, a estimulação do ramo parassimpático irá produzir uma saliva rica em água, sais e de baixo teor de proteínas, enquanto a estimulação simpática produz uma saliva rica em glicoproteínas, e conseqüentemente mais viscosa. Grandes volumes de saliva são secretados através de estimulação colinérgica (parassimpática) (100, 102). Os principais neurotransmissores envolvidos são a acetilcolina (parassimpático) e a norepinefrina (simpático) que se ligam, respectivamente, a receptores colinérgico-muscarínicos ( $\alpha$  adrenérgicos, quando o estímulo é parassimpático) e receptores  $\beta$  adrenérgicos (estímulo simpático) (103). Os neurotransmissores ao se ligarem a seus receptores específicos localizados na superfície das células ativam mecanismos de transdução de sinal, que então, transferem o sinal neural para o interior da célula acinar. As duas principais vias de transdução de sinal que atuam nas células acinares são: (1) via do cAMP (adenosina monofosfato cíclico), que envolve receptor  $\beta$  adrenérgico, ativação de proteínas quinases (principalmente a proteína quinase A - PKA) e geração de cAMP, desencadeando vários efeitos metabólicos, (2) via que envolve geração de IP<sub>3</sub> (fosfatidil inositol trifosfato) e DAG

(diacilglicerol), a partir da lise de fosfatidil inositol presente na membrana plasmática e receptores muscarínicos. Para ambas as vias, a estimulação do receptor específico pelo neurotransmissor específico, ativa uma segunda proteína situada na membrana plasmática, denominada proteína G. A proteína G, necessita de GTP para ativar a enzima, adenilato ciclase ou fosfolipase C, que irá catalisar a formação do segundo mensageiro, cAMP e inositol trifosfato/diacilglicerol, respectivamente (104). Apesar de as duas vias contribuírem na secreção salivar a via do cAMP parece ser a principal via reguladora intracelular da exocitose (liberação de macromoléculas) das glândulas parótida e submandibular (102).

A saliva é um fluido importante para a manutenção da saúde oral e geral do organismo (97, 100). Denomina-se saliva total o produto da mistura de fluidos provenientes das glândulas salivares maiores, menores e do fluido gengival crevicular, contendo, além disso, outros materiais, como bactérias orais, restos alimentares, entre outros (105, 106). Noventa e nove por cento (99%) da composição salivar é água e o outro 1% restante é composto por substâncias orgânicas e inorgânicas (97). As substâncias inorgânicas correspondem principalmente aos eletrólitos como sódio, cloro, potássio, cálcio, flúor, bicarbonato, fosfato, magnésio e tiocianato. As orgânicas correspondem a proteínas, imunoglobulinas, enzimas, mucinas, uréia e amônia. Sendo que cada uma dessas substâncias está relacionada com uma ou mais funções da saliva. As principais funções da saliva são lubrificação, ação antimicrobiana, proteção da mucosa oral, limpeza, capacidade tampão, remineralização dental, formação do bolo alimentar, digestão, fonação, deglutição e paladar (97, 100, 101, 107).

A composição salivar varia de acordo com o fluxo salivar (volume de saliva secretado por unidade de tempo). A taxa de fluxo salivar varia de indivíduo para indivíduo (97). E denomina-se hipossalivação, quando há uma redução na taxa de fluxo salivar. Os principais sintomas são sensação de boca seca (xerostomia), sede freqüente, dificuldade na mastigação, deglutição e fonação, dor e irritação na mucosa oral, sensação de queimação na língua, perda de paladar, dificuldade no uso de próteses, alteração na microflora, prejudicando a qualidade de vida do indivíduo (97, 107).

O fluxo salivar e a composição da saliva sofrem influência de vários fatores. 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 (Síndrome de Down), podem causar hipossalivação e/ou xerostomia. Assim como doenças imunológicas como a Síndrome de Sjögren's, que causam destruição progressiva das glândulas salivares, conduzindo a uma redução no fluxo salivar (107-109).

Grande parte dos estudos realizados envolvendo glândulas salivares tem como modelo experimental os ratos, devido às similaridades com as glândulas salivares humanas, principalmente na organização da secreção dos produtos finais e no sistema de ductos. No entanto, existem diferenças anatômicas e fisiológicas entre as glândulas salivares de ratos e humanos, como por exemplo, o fato de a saliva ser secretada espontaneamente em humanos e apenas sob estímulo em ratos (110-112).

## **2.5 Diabetes, sistema antioxidante e glândulas salivares**

Numerosos estudos clínicos têm relacionado baixo controle da hiperglicemia crônica em pacientes diabéticos, à maior incidência e progressão de complicações orais relacionadas ao diabetes, incluindo moléstias orais como gengivite, periodontite, cárie dental, perda de osso alveolar e xerostomia e/ou hipossalivação (3-8).

Relatos clínicos mostram que muitos pacientes com diabetes, principalmente os não-controlados, têm relatado xerostomia associada ou não a disfunção de glândulas salivares. Além disso, a xerostomia provavelmente contribui no desenvolvimento de outras moléstias orais como maior risco de infecções orais (candidíase), mucosite, dificuldade de deglutição e cárie dental (3, 6).

Estudo clínico envolvendo pacientes com diabetes tipo I e tipo II mostrou que pacientes portadores de diabetes de ambos os tipos secretaram quantidade menor de saliva tanto estimulada como não estimulada quando comparados com pacientes saudáveis de idade semelhante. Além disso, este estudo mostrou alterações na composição da saliva; pacientes diabéticos apresentaram valores elevados de cálcio, porém valores reduzidos de magnésio, potássio e zinco (17). Outro estudo

mostrou maior freqüência de xerostomia em pacientes com diabetes tipo I quando comparado com o grupo controle. Além disso, o fluxo salivar dos pacientes diabéticos mostrou estar reduzido (18). Estudos envolvendo diabetes tipo II mostraram, redução na secreção de saliva estimulada da parótida em pacientes diabéticos bem controlados quando comparado com grupo controle (113), redução da secreção salivar estimulada e não estimulada das glândulas submandibular/sublingual e aumento na concentração de proteínas da saliva de pacientes diabéticos (114) e aumento na atividade da amilase e alterações de paladar em pacientes com baixo controle do diabetes (115).

Estudos clínicos investigando o efeito do diabetes no sistema antioxidante das glândulas salivares ainda são escassos. Estudo utilizando pacientes com diabetes tipo I controlado e não-controlado mostrou aumento na concentração de potássio e fosfato e diminuição na concentração de cálcio e magnésio em saliva de pacientes diabéticos (controlado e não controlado) quando comparado com grupo controle. Além disso, mostrou aumento nos valores de Total antioxidante e na atividade das enzimas peroxidase e superóxido dismutase na saliva de pacientes diabéticos quando comparados com os indivíduos saudáveis. Os valores de ácido úrico salivar mostraram-se reduzidos em pacientes diabéticos (116).

Os efeitos da ausência da insulina sobre a função das glândulas salivares têm sido detalhados pela indução química do diabetes mellitus em modelos de animais. Os ratos da raça Wistar são freqüentemente utilizados para o estudo do diabetes devido a sua eficácia e facilidade. As drogas diabetogênicas como a estreptozotocina (STZ) e aloxana são as mais utilizadas e ambas causam a destruição das células  $\beta$  do pâncreas.

Relatos na literatura envolvendo glândulas de ratos diabéticos induzidos quimicamente mostram que há influência do estado hiperglicêmico nas glândulas salivares, no entanto, ainda há poucos estudos na área. Alguns autores não encontraram diferença na concentração total de proteínas das glândulas salivares de ratos diabéticos (117, 118), no entanto, outro estudo encontrou diminuição (119). Diminuição da atividade enzimática da amilase em glândulas salivares de ratos diabéticos foi relatada em alguns estudos (120, 121). Alterações no metabolismo de carboidratos (33), aumento na concentração de cálcio, diminuição na atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (122) e aumentos na concentração de calmodulina glicada em glândulas salivares de ratos diabéticos foram relatados na literatura (123). Com

relação ao sistema antioxidante estudo mostrou alteração na atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase em glândulas parótida e submandibular de ratos diabéticos (19). Outro recente estudo mostrou que o diabetes causou redução na atividade da enzima SOD e aumento na atividade das enzimas CAT e GPx em glândulas submandibulares de ratos induzidos quimicamente e, porém nenhuma alteração no sistema antioxidante da parótida (124).

## **2.6 Laser**

A palavra Laser é um acrônimo para amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation). Os lasers são fontes de radiação eletromagnética, que possuem algumas características especiais que as diferem de outras fontes de luz. Em 1960, Maiman construiu o primeiro emissor de luz laser a rubi. Atualmente, a utilização do laser vem se destacando na medicina e na odontologia. Devido às suas propriedades diferenciadas como monocromaticidade, coerência e colimação, o laser pode depositar grande quantidade de energia nos tecidos biológicos e com extrema precisão, podendo ser utilizado em vários tipos de terapias envolvendo diversos tecidos (125).

Os lasers são classificados na literatura em lasers de baixa potência e alta potência, de acordo com os efeitos causados nos tecidos biológicos. Os lasers de alta potência emitem radiações que produzem efeito térmico no tecido alvo e são utilizados para incisão e vaporização de tecidos moles (126, 127), ablação de tecidos duros (128), coagulação e esterilização (descontaminação) de tecidos biológicos alvo (125, 129). Em razão de suas propriedades fototérmicas e hemostáticas, a utilização dos lasers de alta potência é de grande valia em procedimentos cirúrgicos (127). Os lasers de baixa potência possuem finalidade terapêutica e, portanto excluem a possibilidade de efeito térmico. Assim a energia dos fótons absorvidos não é transformada em calor, mas sim, em efeitos fotoquímicos, fotobiológicos e fotofísicos, causando analgesia, biomodulação (estimulação ou inibição) e ação antiinflamatória nas células e nos tecidos alvo (125, 127, 130). Apesar desta classificação, os lasers de alta potência podem ser

utilizados em baixa intensidade, de modo semelhante à utilização dos lasers de baixa potência de maneira desfocada em relação ao tecido alvo (131).

A radiação laser consegue produzir efeitos sobre o organismo humano apenas se ela for absorvida pelo mesmo e se ocorrer interação entre a radiação emitida com as estruturas moleculares e celulares do corpo humano. Além disso, cada indivíduo possui quantidades diferentes de moléculas e a disposição espacial destas moléculas também varia de indivíduo para indivíduo. Os efeitos terapêuticos da radiação laser dependem, portanto destas variações (132).

A absorção de energia pelos tecidos ocorre nas camadas superficiais, sendo que esta energia ao ser depositada nos tecidos é transformada imediatamente em efeitos biológicos denominados efeitos primários e classificados em bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos. Os efeitos primários, portanto são aqueles que ocorrem na presença da luz laser. Após a absorção da energia luminosa uma cascata de reações bioquímicas é iniciada, provocando principalmente dois grandes efeitos secundários: efeito à micro circulação e ao trofismo celular. Os efeitos secundários ocorrem, portanto sem a presença da luz e podem ocorrer horas ou até dias após a irradiação (125).

A fototerapia com laser em baixa intensidade (FLBI) é caracterizada pela habilidade de induzir processos fotobiológicos não térmicos e não destrutivos intracelularmente e em tecidos. No entanto, teoria que explica exatamente o mecanismo de ação existente por detrás destes efeitos ainda se encontra desconhecida (133-135).

Atualmente, apesar de a utilização da radiação laser como modalidade fototerapêutica para induzir ou acelerar cicatrização de feridas ter sido primeiramente introduzida por Mester e colaboradores em 1970 e apesar de não restarem mais dúvidas quanto aos efeitos terapêuticos dos lasers de baixa potência, ela ainda não é uma terapia bem estabelecida (130, 136). Estudo realizado em 1988, envolvendo osso alveolar de ratos após extração dentária, mostrou que a irradiação com laser em baixa intensidade tem efeito benéfico na cicatrização óssea inicial, já que o grupo de ratos que sofreu irradiação com laser apresentou maior proliferação de fibroblastos e conseqüente maior formação de tecido osteóide trabecular, quando comparados com os ratos do grupo não irradiado (137).

A FLBI é caracterizada pela utilização do laser em baixa intensidade e no comprimento de onda correspondente entre a região do vermelho e infravermelho

próximo, do espectro de luz, onde qualquer efeito biológico observado é atribuído a evento não térmico (138). A interação da luz laser com a matéria pode estimular certas funções celulares. No entanto, quando a função celular se encontra debilitada esses efeitos são bastante evidentes. Estudos mostram que a FLBI possui efeitos mais acentuados sobre órgãos e tecidos enfraquecidos, em *stress*, tais como em pacientes que sofrem algum tipo de desordem funcional ou de injúria ao tecido (130, 139). Na odontologia a FLBI é bastante útil durante os diversos procedimentos odontológicos graças a seus efeitos antiinflamatório, analgésico e de biomodulação.

Os efeitos da FLBI, por não serem visíveis a olho humano, são até hoje muito discutidos e questionados. Algumas teorias já foram propostas na literatura, a fim de explicar o mecanismo de ação da luz laser quando esta incide e interage com o tecido humano. Porém a teoria mais utilizada foi proposta em 1987 por Tiina Karu, sugerindo a ocorrência de mudanças fotoquímicas em moléculas fotorreceptoras participantes da cadeia respiratória (130). Esta teoria acredita que as respostas biológicas das células à irradiação com laser na região do visível e infravermelho próximo ocorre devido à mudanças físicas e químicas em moléculas fotorreceptoras e componentes da cadeia respiratória, como NADH desidrogenase e citocromo c oxidase. As mudanças físicas e/ou químicas induzidas pela luz sobre as moléculas fotorreceptoras são seguidas de uma cascata de reações bioquímicas, como alterações no estado redox de componentes da cadeia respiratória e aceleração da transferência de elétrons, ligadas a mudanças nos parâmetros homeostáticos celulares (pH, concentração de cálcio, adenosina monofosfato cíclico, ATP, entre outros). Os efeitos celulares devido à fototerapia com laser de baixa potência acontecem principalmente na mitocôndria, onde se encontram a maioria das moléculas fotorreceptoras, e podem ser divididos em efeitos primários e secundários. Os efeitos primários são aqueles que ocorrem na presença da luz laser e basicamente acontecem após a absorção da luz pelas moléculas fotorreceptoras, que então assumem estado eletronicamente excitado, causando várias alterações intracelulares. Os efeitos secundários são aqueles que ocorrem horas e até dias após a irradiação e sem a presença da luz (140).

Resultados de vários estudos realizados (141, 142) concordam com a hipótese anteriormente divulgada (143) de que o efeito da terapia com laser em baixa intensidade a nível celular acontece devido ao aumento no metabolismo oxidativo na mitocôndria causado pela excitação de componentes da cadeia

respiratória, como por exemplo, a citocromo c oxidase. Sendo que a ativação do metabolismo celular via cadeia respiratória pode acontecer em todas as células quando submetidas à irradiação laser, porém a susceptibilidade à irradiação e a capacidade para ativação dependem do estado fisiológico das células irradiadas; células cujo potencial redox total está deslocado para um estado mais reduzido e pH menor que o pH fisiológico (por exemplo: células em condições patológicas) são mais sensíveis à irradiação (140, 144). Além disso, estes estudos mostram que o aumento na atividade da cadeia respiratória depende do comprimento de onda da irradiação, sendo que a mitocôndria possui níveis de absorção máximos e, portanto maior sensibilidade a região de espectro compreendida entre o visível (vermelho) e infravermelho próximo (143-145).

Além do aumento no metabolismo oxidativo na mitocôndria, com conseqüente aumento na produção de ATP e multiplicação celular (146), a terapia com laser em baixa intensidade também causa mudanças estruturais e bioquímicas nas mitocôndrias, as quais tiveram seus ancestrais irradiados. Em 1989, foram observadas alterações na concentração de cAMP (adenosina monofosfato cíclico) em cultura de células irradiadas com luz em comprimento de onda de 632.8 e 404nm, evidenciando a relação existente entre a ação da luz visível sobre as células e a regulação do metabolismo celular via cAMP (130). Além disso, observou-se aumento na geração de espécies reativas de oxigênio quando a luz laser na região do espectro visível interage com a mitocôndria. Porém, estudo realizado em 1983, não encontrou diferença na atividade da enzima superóxido dismutase na pele de ratos irradiados com laser de He-Ne (632.8 nm) quando comparados com o grupo controle (147). Outro estudo envolvendo irradiação de mitocôndria com laser de He-Ne mostrou acelerar metabolismo do ATP-ADP (148).

Os efeitos clínicos observados em diversos estudos como ação antiinflamatória, regeneração acelerada de tecidos danificados e melhora na circulação sanguínea em vários órgãos, podem estar associado aos efeitos obtidos nos experimentos: 1) aumento na atividade de células como leucócitos e fagócitos assim como o aumento na concentração de íons cálcio no citoplasma destas células (149, 150); 2) estimulação da divisão e crescimento celular (151-153); 3) ativação da síntese de proteínas e citocinas (154); 4) melhora na circulação sanguínea devido à vasodilação (155-157).

Em 1994, com base nos relatos de literatura avaliados até o momento e experiências próprias, Vladimirov YA, *et.al.* postularam hipóteses de três mecanismos de ação para radiação laser em baixa intensidade nas células humanas e no organismo humano, sendo que a ação biológica do laser na região do vermelho e sua aplicação clínica esta baseada em três reações: 1) ação fotodinâmica na membrana celular, acompanhada pelo aumento de cálcio intracelular e estimulação celular; 2) Fotoreativação da Cu-Zn superóxido dismutase e 3) fotólise de complexos de metaloproteínas e NO. Portanto segundo estes autores, estas três reações constituem a base indireta da ação bactericida, regenerativa e vasodilatadora da radiação laser (158).

A terapia com laser em baixa intensidade parece, também, ter ação sobre algumas enzimas. Estudo demonstrou que a irradiação em baixa intensidade do Laser Er:YAG (2940nm) em dose de  $3,37\text{J}/\text{cm}^2$  aumentou os níveis da Lactado desidrogenase em cultura de células de fibroblastos gengivais (131). Outro estudo mostrou aumento no nível de colinesterase, de proteínas e da glicemia no soro de cobaias após irradiação com laser com comprimento de onda de 632,8nm (159). Aumento na atividade da enzima isocitrato desidrogenase de coração de porco, após irradiação com laser de He-Ne, também foi observada (160). Além disso, outro estudo relatou aumento da atividade da enzima catalase de fígado de boi, *in vitro*, após irradiação com laser vermelho (161). Análise do efeito *In vivo* da irradiação com laser de He-Ne na lisozima salivar, mostraram na maioria dos pacientes irradiados, o nível desta enzima aumentado (162).

## **2.7 Laser, diabetes, sistema antioxidante e glândulas salivares**

Existem poucos estudos na literatura envolvendo efeito da terapia com laser em glândulas salivares. Estudo realizado em 1995, demonstrou que irradiação com laser de He-Ne com potência de 5mW e comprimento de onda de 632,8 nm por 3min, provocou vasodilatação e hiperemia em glândulas salivares de filhotes de galinha 24 horas, 7 e 15 dias após a irradiação. Além disso, este estudo constatou hiperplasia de células basais do epitélio glandular com infiltração eritrocítica após longo período (163). Outro estudo, utilizando laser de He-Ne, com 7mW de potência

e densidade de energia  $11,2\text{J}/\text{cm}^2$  encontrou alteração na síntese protéica e na secreção salivar de glândulas salivares de cobaias (164). Entretanto, este estudo (164), em concordância com alguns (163, 165) e ao contrário de outros, que mostram efeito antiinflamatório da FLBI (137, 149, 166), encontrou modificações estruturais relacionadas à inflamação em 0 a 12 horas após a irradiação. Estas discrepâncias nos resultados provavelmente ocorreram devido à maior densidade de energia utilizada neste ( $11,2\text{J}/\text{cm}^2$ ) diretamente sobre a glândula. Assim como, alguns estudos utilizando baixa densidade de energia ( $2\text{J}/\text{cm}^2$ ) estimularam a proliferação e a função celular de fibroblastos e células do sistema imune, enquanto outros utilizando densidade de energia maior ( $16\text{J}/\text{cm}^2$ ) causaram supressão destas atividades (164). Mostrando que o efeito do laser sofre influência da dose que é aplicada, podendo estimular ou suprimir funções.

Em pacientes com diabetes, a utilização da FLBI ocorre principalmente visando o efeito de bioestimulação, com o intuito de reparar ulcerações crônicas, prevenindo à amputação (167, 168). Além disso, a FLBI mostrou em alguns estudos estimular a proliferação celular e a produção de fatores de crescimento em ratos diabéticos irradiados (167).

Existem poucos estudos na literatura envolvendo efeito da terapia com laser em glândulas salivares, diabetes e sistema antioxidante. Resultados de estudos anteriores mostraram que, o laser infravermelho com doses de 4 e  $8\text{J}/\text{cm}^2$ , estimulou as glândulas salivares de ratos (27), além de aumentar a quantidade de proteína total nas glândulas parótidas (169). Em ratas diabéticas, a irradiação com laser em baixa intensidade, vermelho, com doses de 5 e  $20\text{J}/\text{cm}^2$ , diminuiu a atividade da catalase para resultados similares aos encontrados nas glândulas salivares de ratas não-diabéticas. Além disso, o acúmulo de lipídios encontrado no citoplasma das glândulas parótidas foi menor, assim como a glicemia, que também se mostrou diminuída nos animais diabéticos, que receberam irradiação. Estes dados demonstram que a irradiação com laser em baixa intensidade, interfere no metabolismo protéico, lipídico e de carboidratos.

Analisando os dados existentes na literatura, podemos concluir que existem poucos estudos envolvendo laser em baixa intensidade, sistema antioxidante e glândulas salivares de animais diabéticos, e que os poucos estudos existentes mostram resultados promissores.



### 3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem como objetivo geral analisar o efeito da irradiação com laser em baixa intensidade no sistema antioxidante enzimático de glândulas submandibulares e parótidas de ratas, diabéticas induzidas por estreptozotocina determinando:

- Concentrações totais de proteínas nas glândulas submandibulares (GSM) e parótidas (GP)
- Atividades das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase nas GSM e GP
- Quantificação do total antioxidante nas GSM e GP

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Comitê de Ética**

Este estudo teve seu protocolo de pesquisa aprovado pela Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), parecer 08/08 (Anexo A).

### **4.2 Animais**

Ratas adultas (60 dias de vida) da raça Wistar do Biotério do Centro de Pesquisa em Biologia Oral da FOU SP, com peso corporal em torno de 180 a 250 g foram utilizadas. Os 74 animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o período experimental, com livre acesso a água e alimento. Este sistema de manutenção de animais reduz o manuseio e conseqüentemente o estresse desenvolvido nas ratas, eliminando fatores que poderiam interferir nas condições experimentais alvo. As ratas foram inicialmente divididas em grupos não-diabéticas (C) e diabéticas (D) e mantidas pelo período experimental de 30 dias. No vigésimo nono dia as ratas foram subdivididas em seis grupos, sendo três grupos de animais não diabéticos (C0, C5 e C20) e três de animais diabéticos (D0, D5 e D20), de acordo com a dose de irradiação laser que cada grupo recebeu (0, 5 e 20 J/cm<sup>2</sup> respectivamente) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Divisão dos grupos

<b>GRUPO</b>	<b>ESTADO</b>	<b>POTÊNCIA (W)</b>	<b>DOSE (J/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>N° DE PONTOS</b>	<b>TEMPO DE IRRADIAÇÃO POR PONTO (s)</b>	<b>TEMPO TOTAL DE IRRADIAÇÃO (s)</b>
<b>C0</b>	Não diabético	0,10	0	0	0	0
<b>C5</b>	Não diabético	0,10	5	64	1	64
<b>C20</b>	Não diabético	0,10	20	64	4	248
<b>D0</b>	Diabético	0,10	0	64	0	0
<b>D5</b>	Diabético	0,10	5	64	1	64
<b>D20</b>	Diabético	0,10	20	64	4	248

#### 4.2.1 Indução do Diabetes Melito

Após um período de 15 horas de jejum foi realizada a injeção intraperitoneal de estreptozotocina (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". Os animais pertencentes aos grupos "C" (não diabéticos) receberam a injeção somente do veículo.

As glicemias foram verificadas 72 horas após a indução do diabetes, para a confirmação do estado diabético nos grupos "D". Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia superior a 250mg de glicose/dl de sangue.

### 4.2.2 Grupos

Vinte e nove (29) dias após a indução do diabetes, os animais foram anestesiados com Ketalar/Rompun (4 ml/Kg IM) e tricotomizados nas áreas das glândulas submandibulares e parótidas. Os animais foram então irradiados ou não como se segue:

Grupo C0: animais não diabéticos, os quais foram submetidos pelas mesmas etapas dos demais grupos com exceção da irradiação;

Grupo C5: animais não diabéticos, os quais foram submetidos à irradiação de 5 J/cm<sup>2</sup> de energia total aplicada na área previamente demarcada.

Grupo C20: animais não diabéticos, os quais foram submetidos à irradiação de 20 J/cm<sup>2</sup> de energia total aplicada na área previamente demarcada.

Grupo D0: animais diabéticos, os quais foram submetidos às mesmas etapas dos demais grupos com exceção da irradiação;

Grupo D5: animais diabéticos, os quais foram submetidos à irradiação de 5 J/cm<sup>2</sup> de energia total aplicada na área previamente demarcada.

Grupo D20: animais diabéticos, os quais foram submetidos à irradiação de 20 J/cm<sup>2</sup> de energia total aplicada na área previamente demarcada.

### 4.2.3 Irradiação com laser em baixa intensidade

A irradiação com laser em baixa intensidade seguiu a metodologia determinada pelo método de Simões et. al. (2009). O laser de diodo Quantum (Ecco Fibras®), com comprimento de onda de 660 nm (vermelho), do Centro de Pesquisa, Ensino e Clínica de Laser em Odontologia (LELO-FOUSP), foi utilizado para o estudo. Após a tricotomia, a área das glândulas parótidas (direita e esquerda) e submandibulares (as duas juntas) foram previamente demarcadas com um círculo em caneta vermelha de aproximadamente 1,13 cm<sup>2</sup> resultando em três áreas a serem irradiadas em cada animal (Figura 4.1) (26).

A área irradiada foi de 1,1304 cm<sup>2</sup> e a área do spot do laser 0,0177 cm<sup>2</sup>, para cobrirmos toda a área, foram necessários 64 pontos, que foram distribuídos

conforme figura 4.2. A irradiação foi realizada de maneira pontual, e padronizada para todas as sessões da terapia, um número de 64 pontos, em cada uma das três áreas. A variação entre os grupos ocorreu na dose ( $5\text{J}/\text{cm}^2$  e  $20\text{J}/\text{cm}^2$ ) e no tempo de aplicação (1s e 4 s por ponto), sendo que os animais pertencentes aos grupos que foram irradiados com dose de  $5\text{J}/\text{cm}^2$ , tiveram tempo de irradiação igual a 64 s para cada círculo (1s por ponto) e os animais pertencentes aos grupos que foram irradiados com dose de  $20\text{J}/\text{cm}^2$ , tiveram tempo de irradiação igual a 256 s para cada círculo (4 s por ponto. A potência foi fixa em 100mW (Tabela 4.1) (26). Os cálculos foram realizados conforme o estudo de Simões, et. al (26), utilizando a seguinte fórmula e levando-se em consideração uma perda de 10% do aparelho (26):

$$T = \frac{DE \times A}{P}$$

Onde T= tempo (s)

DE= densidade de energia ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )

A= Área ( $\text{cm}^2$ )

P= Potência (W)

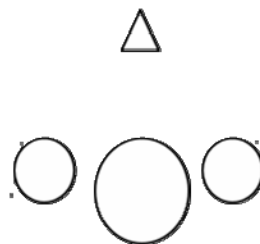


Figura 4.1 - Demarcações das glândulas parótidas e submandibulares, prévias à irradiação

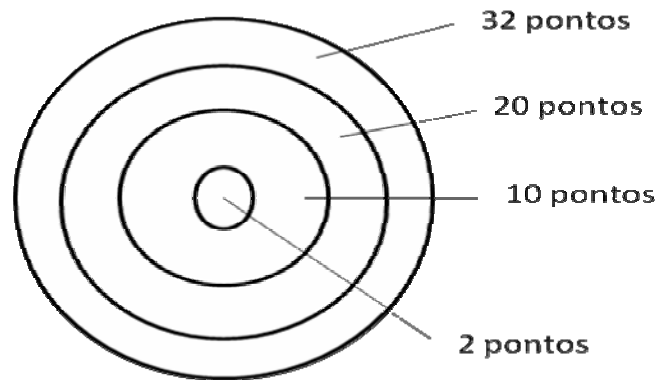


Figura 4.2- Distribuição dos pontos de irradiação nas glândulas salivares

### 4.3 Obtenção das amostras

Os animais foram eutanasiados 24 horas após a irradiação, por destroncamento medular após anestesia com Ketalar/Rompun (4 ml/Kg IM). O peso corporal dos animais foi anotado no início e fim da fase experimental.

Para as análises bioquímicas 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  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da sua utilização.

### 4.4 Análises

Foram realizadas as seguintes determinações:

- Glicemia
- Total antioxidante
- Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)
- Atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx)
- Atividade da enzima Catalase (CAT)
- Determinação da concentração de proteínas totais

Para as análises do total antioxidante, atividade da enzima superóxido dismutase e atividade da enzima glutathione peroxidase, as glândulas foram previamente homogeneizadas a 10% em Tampão fosfato PBS (phosphate buffered saline), centrifugadas a 800 x g (2 500 rpm) por 10 minutos (4°C). O sobrenadante foi separado, sonificado a 300 W três vezes por 10 s cada vez e centrifugado novamente a 20 000 x g (14 500 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi então utilizado nas análises (170).

#### 4.4.1 Determinação da glicemia

A determinação da glicemia foi realizada nos animais de todos os grupos em 4 momentos da fase experimental, através da utilização de um glicosímetro (Roche-Accu-chek advantage).

- ✓ Setenta e duas horas após a injeção da estreptozotocina ou tampão, com os animais em jejum de 15 h e através da coleta de sangue caudal. Esta determinação foi realizada para a confirmação do estado diabético nos grupos D (glicemia inicial).
- ✓ No dia da eutanásia, com os animais em jejum de 15 h e através da coleta de sangue do coração (glicemia final). Esta determinação foi realizada para posterior análise comparativa com a glicemia inicial.

#### 4.4.2 Análise do Total antioxidante

O status antioxidante foi determinado através do Kit TAS (Randox UK). Neste método o reagente ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) é incubado com a peroxidase (metamioglobina) e com o peróxido de hidrogênio para produzir o radical ABTS. Este radical tem uma coloração estável verde-azulada a qual pode ser medida a 600nm. Os antioxidantes presentes no homogenado glandular causam supressão à formação desta coloração, sendo a queda na coloração proporcional à concentração de antioxidantes na amostra. Para este

método foram utilizadas cubetas de plástico e a reação foi acompanhada espectrofotometricamente (171). Os cálculos foram realizados utilizando as seguintes fórmulas:

$$\Delta = \frac{\text{Absorbância final} - \text{Absorbância inicial}}{\text{tempo}}$$

$$\text{Fator} = \frac{\text{Concentração do padrão}}{(\Delta \text{ branco} - \Delta \text{ amostra})}$$

$$\text{mmol por l de homogenado} = \text{Fator} \times (\Delta \text{ branco} - \Delta \text{ amostra})$$

#### 4.4.3 Determinação da atividade da SOD (Superóxido dismutase)

A atividade da enzima SOD foi determinada utilizando o Kit RANSOD (Randox UK).

Neste método é utilizada xantina e xantina oxidase para gerar radicais superóxido os quais reagem com o reagente INT [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride] produzindo uma coloração rósea avermelhada, que pode ser lida a 505 nm. A atividade da enzima SOD, presente no homogenado glandular, é medida através do grau de inibição desta reação. Uma unidade da enzima SOD é aquela capaz de causar 50% de inibição na taxa de redução do INT. Para este método foram utilizadas cubetas de plástico e a reação foi acompanhada espectrofotometricamente (172, 173). Uma curva padrão foi realizada e utilizada para os cálculos.

#### 4.4.4 Determinação da atividade da GPx (Glutathione peroxidase)

A atividade da enzima GPx foi determinada através do Kit RANSEL (Randox UK) de acordo com o método descrito por Paglia e Valentine, que consiste no



seguinte princípio: a glutathione peroxidase é a enzima responsável por catalisar a reação de oxidação da glutathione (GSH) pelo hidroperóxido de cumeno. Na presença da glutathione reductase (GR) e NADPH a glutathione oxidada é imediatamente convertida na sua forma reduzida com a simultânea oxidação do NADPH em NADP<sup>+</sup>. A queda na absorbância à 340 nm é medida. Para este método foram utilizadas cubetas de quartzo e a reação foi acompanhada espectrofotometricamente (174). O Cálculo da atividade foi realizado utilizando as seguintes fórmulas:

$$\Delta amostra = \frac{\text{Absorbância inicial} - \text{Absorbância final}}{\text{tempo}}$$

$$\Delta amostra - \Delta branco = y$$

$$U \text{ de GPx por ml de homogenado} = y \times 8412$$

#### 4.4.5 Determinação da atividade da catalase

As glândulas foram homogeneizadas a 10% (100mg/mL) em tampão fosfato 50mM pH 7,4, centrifugadas a 1.500 x g (4000 rpm) por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado no ensaio de acordo com o método de Aebi (1984) o qual se baseia no acompanhamento da decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, determinada espectrofotometricamente a 240nm durante 5 minutos (175). O Cálculo da atividade foi realizado de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\Delta = \frac{\text{Absorbância inicial} - \text{Absorbância final}}{\text{tempo}}$$

$$U \text{ de catalase por ml de homogenado} = \frac{\Delta \times \text{fator de diluição}}{0,071 \times \text{tomada de ensaio}}$$

#### 4.4.6 Determinação da concentração total de proteínas

A concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (1951) (176), utilizando a solução de albumina bovina 0,5 mg/mL para a realização da curva padrão. Neste método, as proteínas em meio alcalino reagem com o cobre, formando um complexo. Este complexo reduzirá o reativo de folin-ciocalteu, resultando uma coloração azulada, que foi lida em espectrofotômetro à 660nm.

### 4.5 Análise estatística

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

## 5 RESULTADOS

Os animais utilizados neste estudo apresentaram média de peso corporal de aproximadamente 206 g no início do experimento (peso inicial). Os ratos não-diabéticos ao final do experimento (após 30 dias) mostraram ganho de peso corporal de apenas 6,4 – 10%, não apresentando diferença estatística entre o peso inicial e peso final. No entanto, os ratos diabéticos apresentaram perda significativa de peso corporal de 20 – 26% ao final do experimento (Figura 5.1).

Para o diagnóstico do estado diabético no grupo experimental foi aferida a concentração de glicose no sangue (glicemia inicial), com os animais em jejum de aproximadamente 15 horas, 72 horas após a injeção de STZ e com o auxílio de um glicosímetro. Todos os grupos diabéticos apresentaram média de glicemia inicial superior a 350mg/dL de sangue e os animais dos grupos não diabéticos inferior a 91mg/dL de sangue.

Após 30 dias da injeção de STZ/tampão citrato os animais foram eutanasiados, e no dia da eutanásia foi realizada novamente a aferição da concentração de glicose no sangue (glicemia final), não só para a comprovação do estado diabético no grupo experimental ao final do estudo como também para a observação do efeito tardio (24 horas depois) da irradiação com laser na concentração de glicose sanguínea dos animais. Comparando os valores de glicemia inicial (GI) e glicemia final (GF) observamos que, os animais não-diabéticos dos grupos C5 e C20 apresentaram uma leve tendência de aumento de 24% e 16% respectivamente na glicemia final quando comparada com a glicemia inicial, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa. Os animais diabéticos, no entanto, apresentaram os valores de GF menores que os valores de GI, sendo que estas diminuições foram de 37%, 141% e 93% para os grupos D0, D5 e D20, respectivamente, e todas estatisticamente significantes (Figura 5.2).

Além disso, imediatamente antes (glicemia antes) e após (glicemia depois) a aplicação do laser ou simulação (no caso dos grupos C0 e D0) foi realizada a medida das glicemias com os animais alimentados, para a observação do efeito imediato do laser sobre a concentração de glicose no sangue. Nos animais diabéticos não houve diferença entre a glicemia antes e depois da irradiação. Nos

animais não diabéticos, encontrou-se uma leve tendência de aumento na glicemia após a irradiação quando comparada a glicemia antes da irradiação. Sendo a glicemia após a aplicação, 27%, 44% e 45% maiores para os grupos C0, C5 e C20 quando comparada a glicemia antes (Anexo B).

### **5.1 Resultados nas glândulas submandibulares**

Nas glândulas submandibulares os valores de total antioxidante (TA) apresentaram-se menores nos animais do grupo C20 quando comparados aos animais não diabéticos dos outros 2 grupos, sendo esta diminuição de 58,7% em relação ao grupo C0 e de 39% em relação ao grupo C5. Comparando os animais dos grupos diabéticos, podemos observar que houve aumento nos valores de TA tanto com dose de 5J/cm<sup>2</sup> quanto 20 J/cm<sup>2</sup>, sendo estes aumentos de 8,5% e 13,6%, respectivamente. E comparando os animais não diabéticos e diabéticos dentro do mesmo grupo, observamos que os grupos D5 e D20 apresentaram valores significativamente maiores, 31% e 91%, em relação ao respectivo grupo C5 e C20 (Figura 5.3).

Com relação à atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), observamos que nos animais não diabéticos, não houve alteração significativa com a aplicação do laser. No entanto, nos grupos de animais diabéticos, podemos observar aumento no grupo D20 de 15% em relação ao D0 e de 18,5% em relação ao D5, sendo todos estes aumentos significantes. E comparando os animais não diabéticos e diabéticos dentro do mesmo grupo, observamos que os grupos D0 e D20 apresentaram valores significativamente maiores, de 27% e 43%, em relação ao respectivo grupo C0 e C20 (Figura 5.4).

A respeito da atividade da enzima catalase (CAT), observamos que a aplicação do laser ocasionou um aumento nos valores de atividade da CAT de 25% e 23,3% nos grupos C5 e C20, respectivamente, em relação ao grupo de animais não diabéticos que não sofreu irradiação (C0). Nos animais diabéticos o laser com dose tanto de 5J/cm<sup>2</sup> quanto 20 J/cm<sup>2</sup> levou a um significativo aumento de 28,4% e 22%, respectivamente, em relação ao grupo D0. Comparando os animais não diabéticos e diabéticos dentro do mesmo grupo, observamos que todos os grupos de

animais diabéticos apresentaram valores significativamente maiores na atividade da enzima CAT em relação aos respectivos grupos não diabéticos (C0, C5 e C20). Sendo estes aumentos de 66%, 71% e 64% nos grupos D0, D5 e D20, respectivamente (Figura 5.5).

A irradiação com laser não causou alteração significativa na atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) nem entre os grupos de animais diabéticos e nem entre os grupos de animais não diabéticos. E apenas o grupo D20 apresentou aumento significativo (29,7%), os outros 2 grupos D5 e D0 apresentaram apenas uma leve tendência de aumento em relação ao respectivo grupo não diabético (Figura 5.6).

## 5.2 Resultados nas glândulas parótidas

A respeito das glândulas parótidas, comparando os animais não diabéticos entre si, observamos que a aplicação do laser não causou nenhuma alteração estatisticamente significante nos valores de TA, porém a aplicação com dose de  $5\text{J}/\text{cm}^2$  levou a uma tendência de diminuição de 78,4% e 143% em relação aos grupos C0 e C20, respectivamente. O grupo C20 apresentou uma tendência de aumento de 36% e 143% em relação aos grupos C0 e C5, respectivamente. Os animais diabéticos também não apresentaram diferença significativa nos valores de TAS quando comparados entre si. Porém podemos observar uma leve tendência de aumento com a aplicação do laser com dose tanto de  $5\text{J}/\text{cm}^2$  como de  $20\text{J}/\text{cm}^2$ , sendo que os grupos D5 e D20 apresentaram valores de 2% e 31,6% maiores em relação ao grupo D0, respectivamente. Comparando os animais não diabéticos e diabéticos dentro do mesmo grupo, observamos que todos os grupos de animais diabéticos apresentaram valores significativamente maiores em relação ao grupo não diabético que recebeu a mesma dose de irradiação. Sendo estes aumentos de 61%, 193% e 55% para os grupos D0, D5 e D20, respectivamente (Figura 5.7).

A atividade da enzima SOD não sofreu alteração significativa nas glândulas parótida (Figura 5.8).

Os valores de atividade da enzima CAT sofreram diminuição significativa com a aplicação do laser quando comparamos os animais não diabéticos entre si, sendo

esta queda de 35% e 30% para os grupos C5 e C20, respectivamente, em relação ao C0. Nos animais diabéticos também houve uma diminuição significativa de 15,3% e 29% nos grupos D5 e D20, respectivamente. Comparando os animais não diabéticos e diabéticos dentro do mesmo grupo, observamos que todos os grupos de animais diabéticos apresentaram valores significativamente maiores em relação ao grupo não diabético que recebeu a mesma dose de irradiação. Sendo estes aumentos de 94%, 127% e 95,6% para os grupos D0, D5 e D20, respectivamente (Figura 5.9).

A irradiação com laser não causou alteração significativa na atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) nem entre os grupos de animais diabéticos e nem entre os grupos de animais não diabéticos. No entanto, comparando os animais não diabéticos e diabéticos dentro do mesmo grupo, observamos que todos os grupos de animais diabéticos apresentaram valores significativamente maiores em relação ao grupo não diabético que recebeu a mesma dose de irradiação. Sendo estes aumentos de 19,4%, 19,6% e 17,7% para os grupos D0, D5 e D20, respectivamente (Figura 5.10).

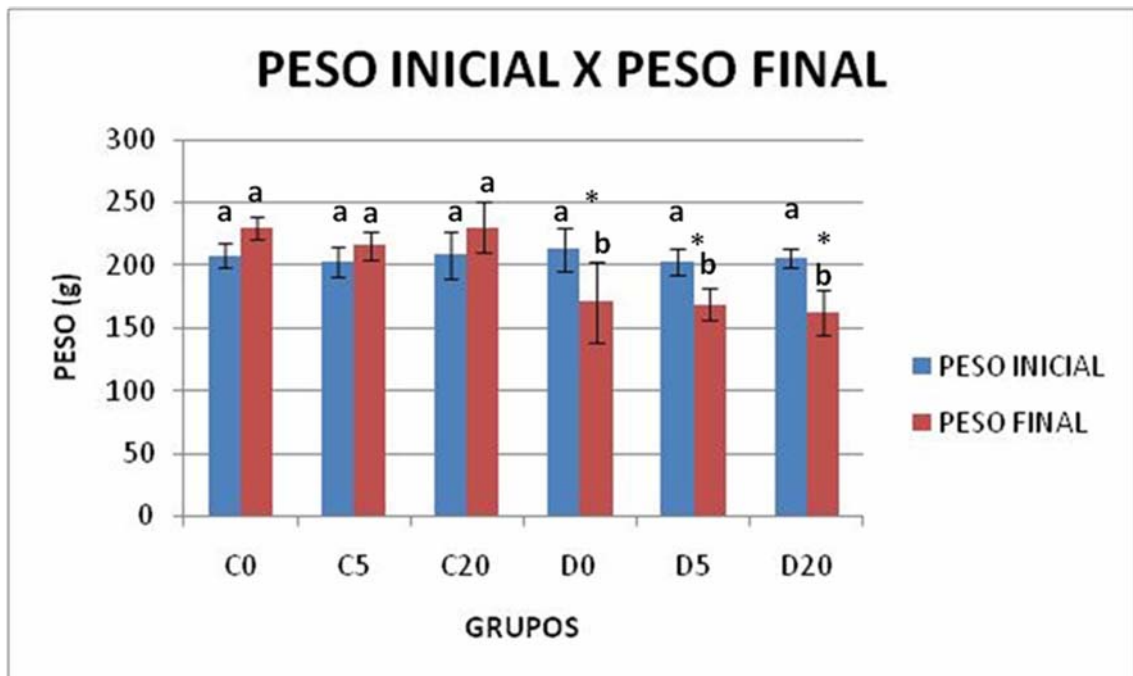


Figura 5.1- Peso inicial e final (g) para os diferentes grupos. As colunas representam os valores médios e as barras o desvio padrão. Os asteriscos indicam diferença estatística entre o valor de peso inicial e final do mesmo grupo. As letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos diabéticos e não diabéticos de diferentes grupos. ( $p < 0,05$ ) ( $n=8$ )

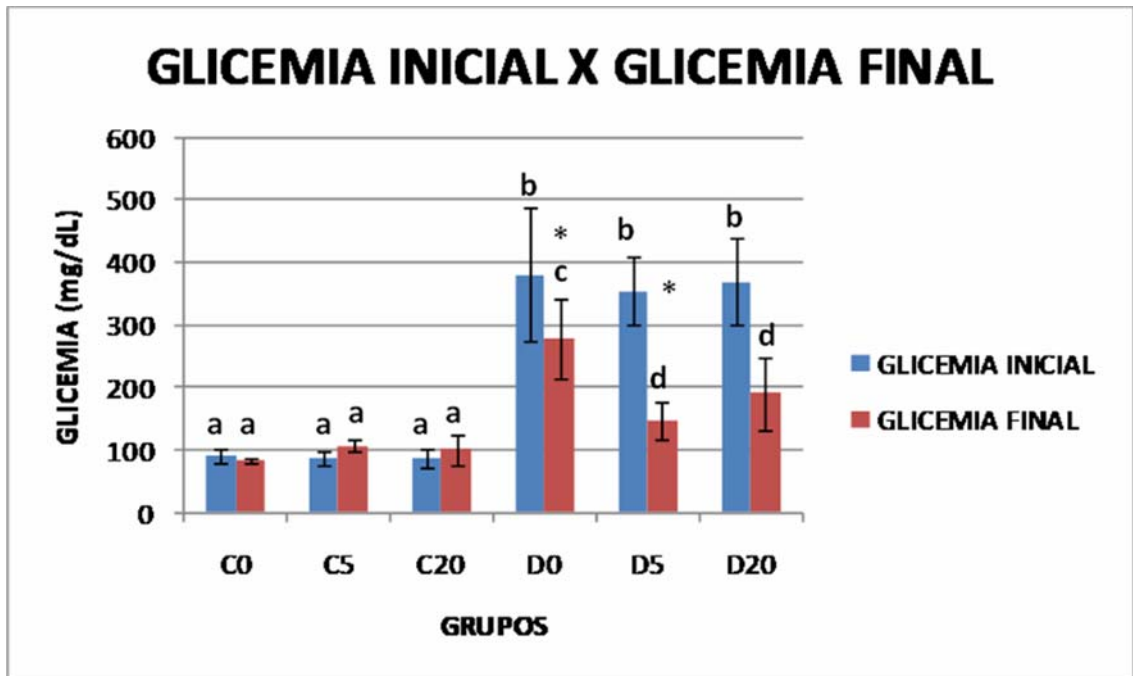


Figura 5.2 - Glicemia inicial e final (em jejum, em mg/dL) para os diferentes grupos. As colunas representam os valores médios e as barras o desvio padrão. Os asteriscos indicam diferença estatística entre o valor de glicemia inicial e final do mesmo grupo. As letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos diabéticos e não diabéticos de diferentes grupos. ( $p < 0,05$ ) ( $n=8$ )

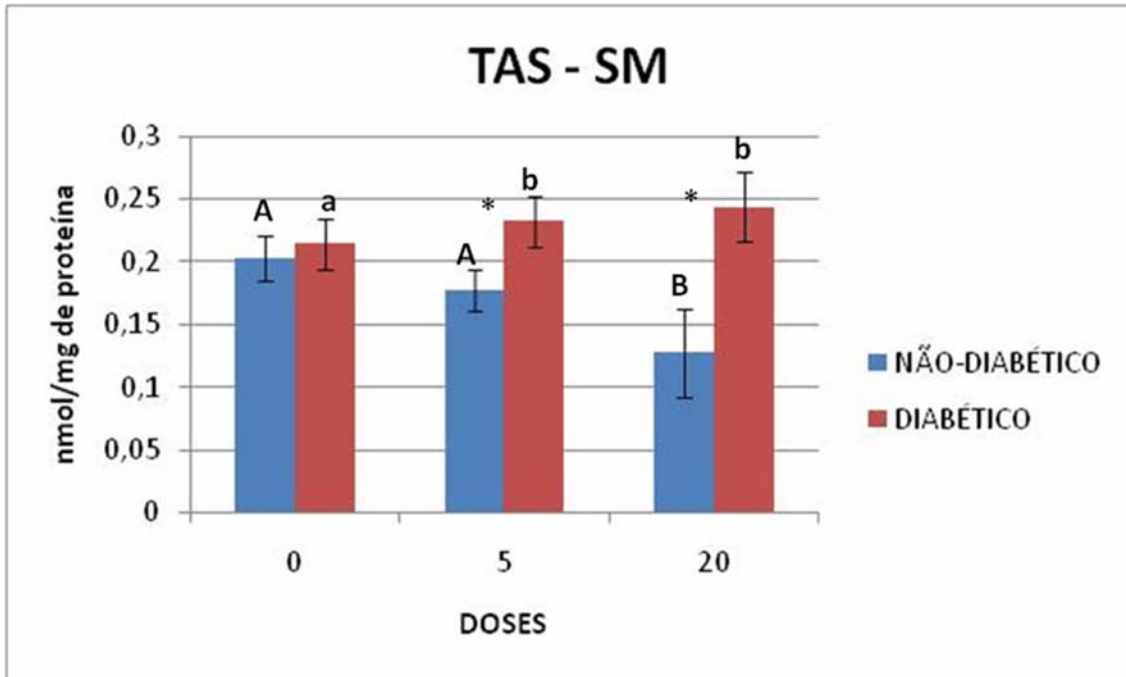


Figura 5.3 - Valores de total antioxidante (nmol/mg de proteína) nas glândulas submandibulares de ratas diabéticas e não diabéticas, que receberam diferentes doses de irradiação. As colunas representam os valores médios e as barras os desvios padrão. Os asteriscos indicam diferença estatística entre o grupo diabético e não diabético que receberam a mesma dose de irradiação. As letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos diabéticos (letra maiúscula) e não diabéticos (letra minúscula) com doses diferentes de irradiação ( $p < 0,05$ ) ( $7 < n < 10$ )



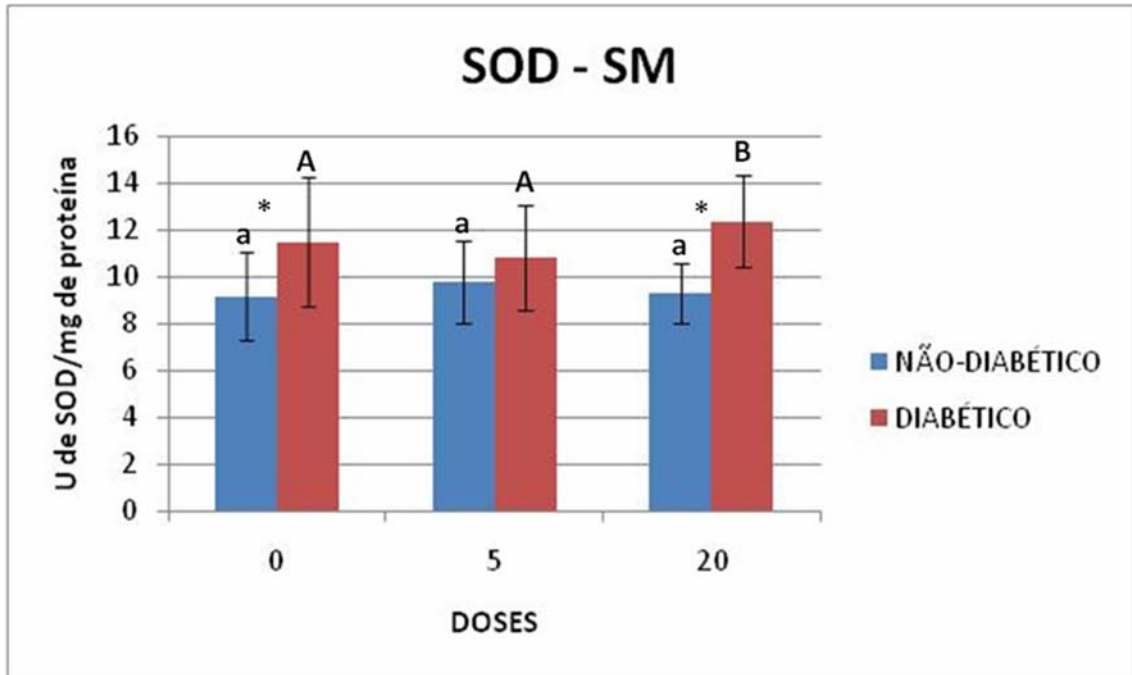


Figura 5.4 - Atividade total da enzima superóxido dismutase (U de SOD/mg de proteína) nas glândulas submandibulares de ratas diabéticas e não diabéticas, que receberam diferentes doses de irradiação. As colunas representam os valores médios e as barras os desvios padrão. Os asteriscos indicam diferença estatística entre o grupo diabético e não diabético que receberam a mesma dose de irradiação. As letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos diabéticos (letra maiúscula) e não diabéticos (letra minúscula) com doses diferentes de irradiação ( $p < 0,05$ ) ( $8 < n < 9$ ).

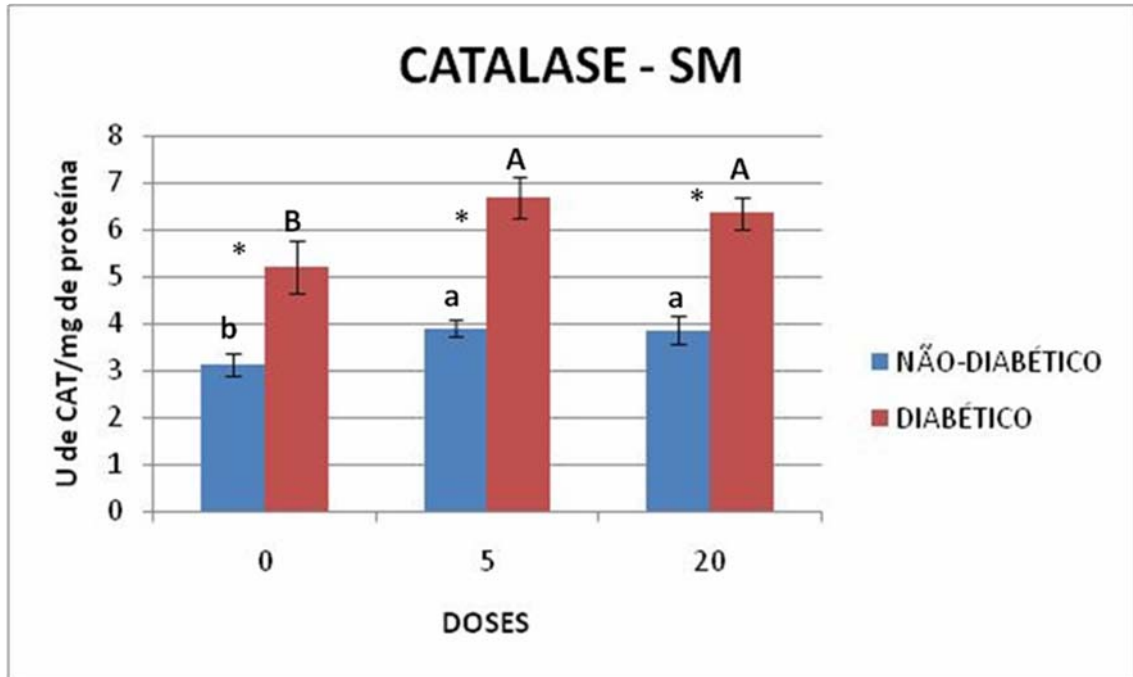


Figura 5.5 - Atividade da enzima catalase (U de CAT/mg de proteína) nas glândulas submandibulares de ratas diabéticas e não diabéticas, que receberam diferentes doses de irradiação. As colunas representam os valores médios e as barras os desvios padrão. Os asteriscos indicam diferença estatística entre o grupo diabético e não diabético que receberam a mesma dose de irradiação. As letras diferentes indicam diferença estatística entre os diabéticos (letra maiúscula) e não diabéticos (letra minúscula) com doses diferentes de irradiação ( $p < 0,05$ ) ( $8 < n < 11$ )

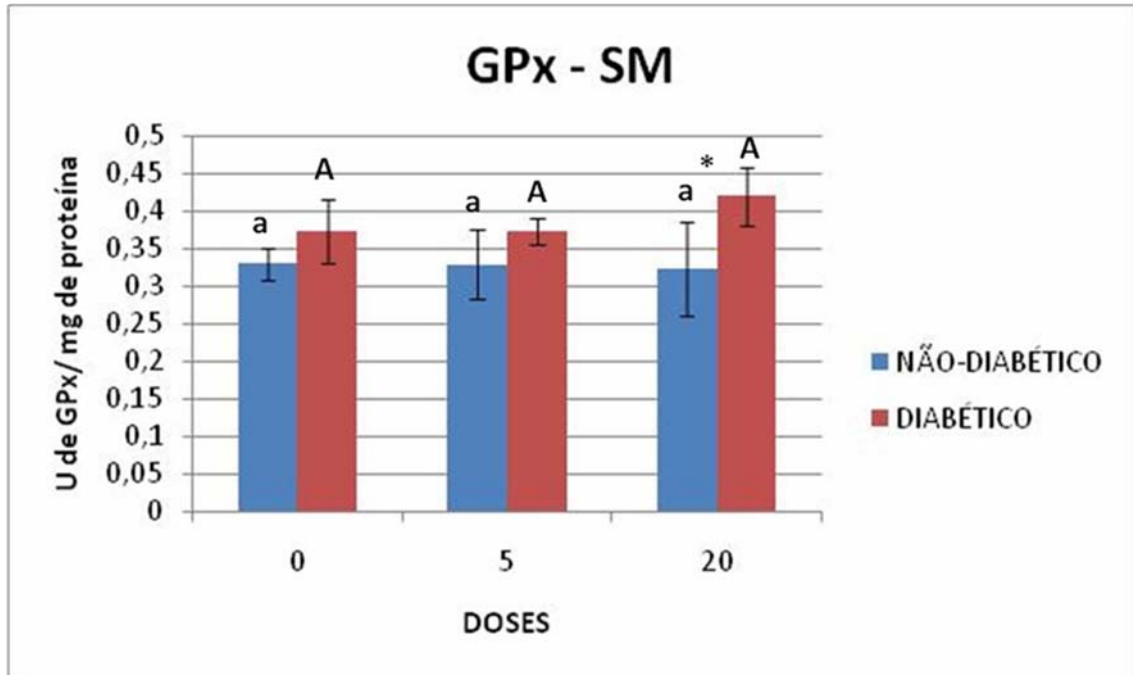


Figura 5.6 - Atividade da enzima glutatona peroxidase (U de GPx/mg de proteína) nas glândulas submandibulares de ratas diabéticas e não diabéticas, que receberam diferentes doses de irradiação. As colunas representam os valores médios e as barras os desvios padrão. Os asteriscos indicam diferença estatística entre o grupo diabético e não diabético que receberam a mesma dose de irradiação. As letras diferentes indicam diferença estatística entre os diabéticos (letra maiúscula) e não diabéticos (letra minúscula) com doses diferentes de irradiação ( $p < 0,05$ ) ( $8 < n < 9$ )

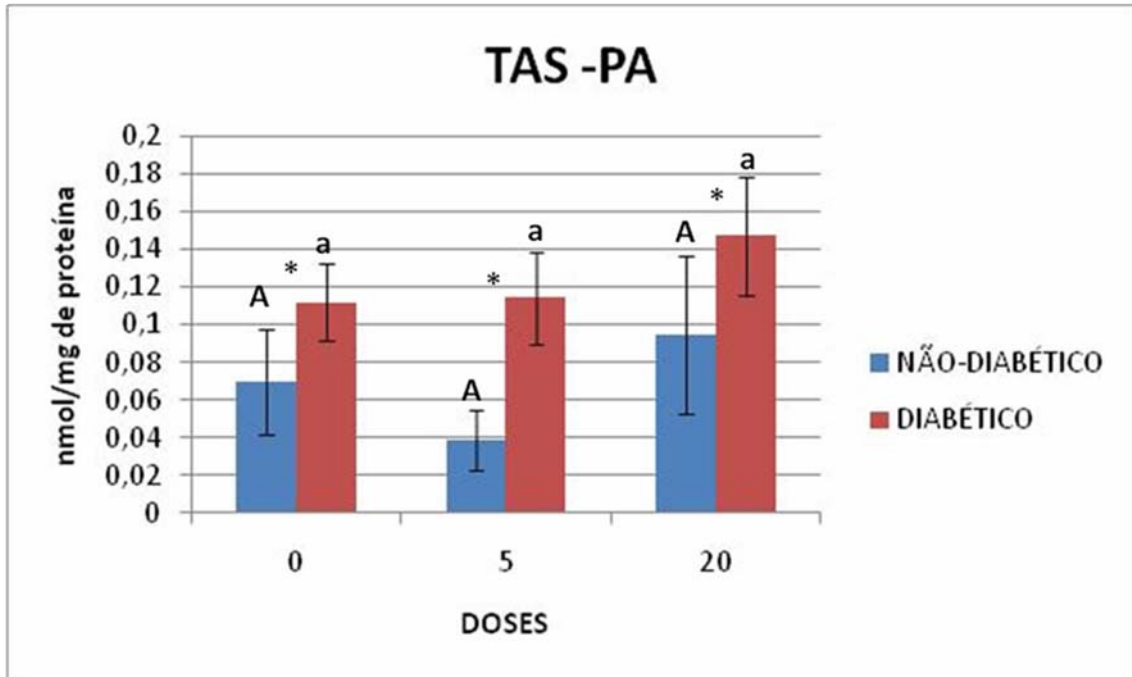


Figura 5.7 - Valores de total antioxidante (nmol/mg de proteína) nas glândulas parótidas de ratas diabéticas e não diabéticas, que receberam diferentes doses de irradiação. As colunas representam os valores médios e as barras os desvios padrão. Os asteriscos indicam diferença estatística entre o grupo diabético e não diabético que receberam a mesma dose de irradiação. As letras diferentes indicam diferença estatística entre os diabéticos (letra maiúscula) e não diabéticos (letra minúscula) com doses diferentes de irradiação ( $p < 0,05$ ) ( $n=8$ )

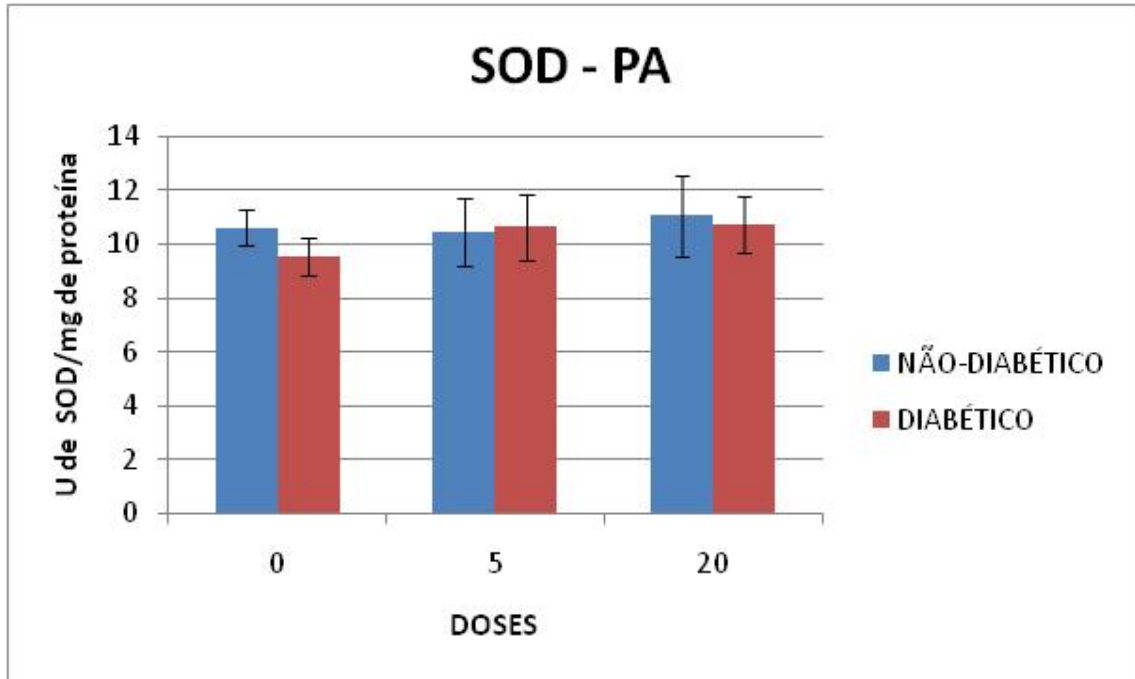


Figura 5.8 - Atividade total da enzima superóxido dismutase (U de SOD/mg de proteína) nas glândulas parótidas de ratas diabéticos (letra maiúscula) e não diabéticos (letra minúscula) que receberam diferentes doses de irradiação. As colunas representam os valores médios e as barras os desvios padrão. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ) ( $n=8$ )

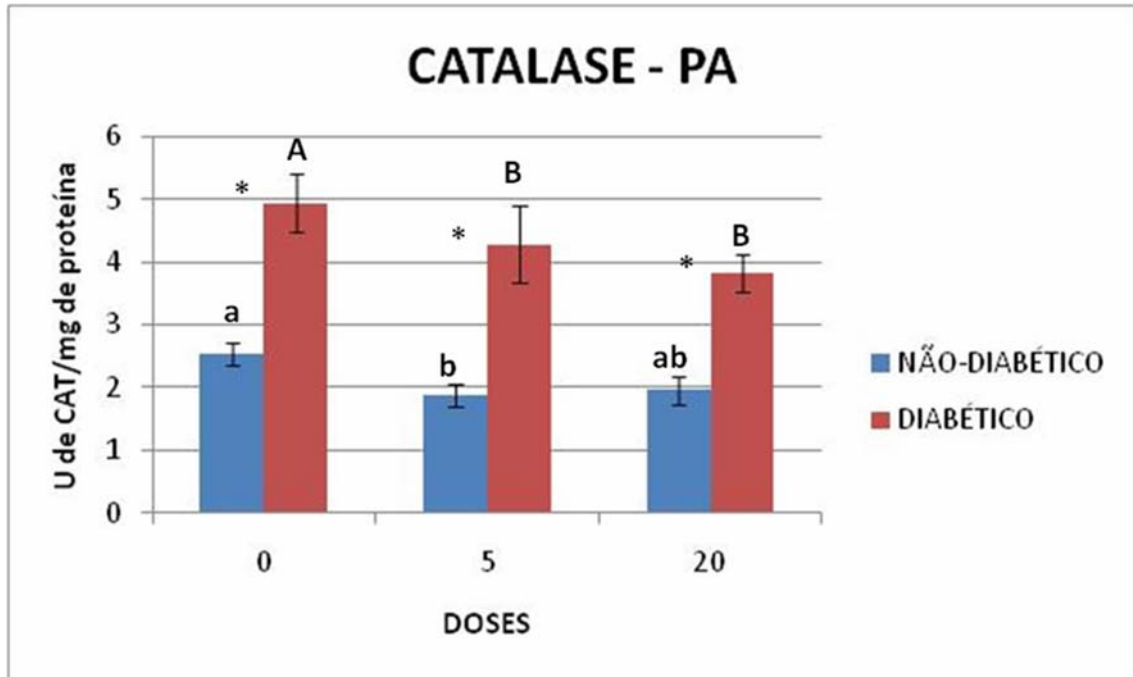


Figura 5.9 - Atividade da enzima catalase (U de CAT/mg de proteína) nas glândulas parótidas de ratas diabéticas e não diabéticas, que receberam diferentes doses de irradiação. As colunas representam os valores médios e as barras os desvios padrão. Os asteriscos indicam diferença estatística entre o grupo diabético e não diabético que receberam a mesma dose de irradiação. As letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos diabéticos (letra maiúscula) e não diabéticos (letra minúscula) com doses diferentes de irradiação ( $p < 0,05$ ) ( $8 < n < 11$ )

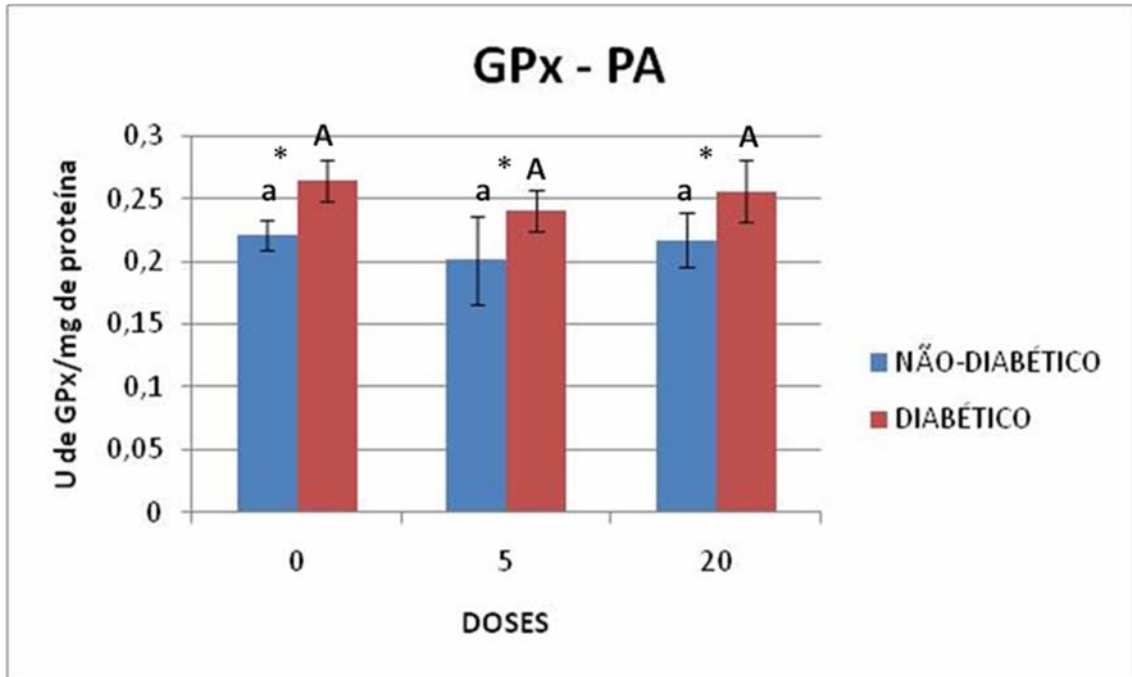


Figura 5.10 - Atividade da enzima glutatona peroxidase (U de GPx/mg de proteína) nas glândulas parótidas de ratas diabéticas e não diabéticas, que receberam diferentes doses de irradiação. As colunas representam os valores médios e as barras os desvios padrão. Os asteriscos indicam diferença estatística entre o grupo diabético e não diabético que receberam a mesma dose de irradiação. As letras diferentes indicam diferença estatística entre os diabéticos (letra maiúscula) e não diabéticos (letra minúscula) com doses diferentes de irradiação ( $p < 0,05$ ) ( $8 < n < 9$ )

## 6 DISCUSSÃO

O diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada pela hiperglicemia crônica. No presente estudo, os animais pertencentes aos grupos diabéticos apresentaram valores de glicemia aproximadamente quatro vezes maior ao do grupo controle. Além disso, relatos na literatura mostram que perda de peso, fraqueza, polifagia, polidipsia e poliúria são alguns dos sintomas que caracterizam esta doença. No presente trabalho os animais do grupo diabético apresentavam claramente todos estes sintomas quando comparados com o grupo controle. A perda de peso pode ser constada analisando os valores de peso inicial e final dos animais diabéticos e comparando-os com os respectivos valores dos animais não diabéticos. Observamos que os animais não diabéticos tiveram manutenção do peso, com uma leve tendência de aumento quando comparamos os pesos iniciais com os finais. No entanto, os animais diabéticos apresentaram perda significativa de peso quando comparamos o peso inicial e o peso após 30 dias de estado diabético.

Analisando os valores de glicemia coletados imediatamente antes e depois não pudemos observar diferença estatística (Anexo B). Apesar disso, notamos que nos animais não diabéticos a irradiação com laser tanto com dose de  $5\text{J}/\text{cm}^2$  quanto de  $20\text{J}/\text{cm}^2$  provocou um leve aumento nos valores de glicemia, sugerindo que o laser pode ter uma ação imediatamente após a sua aplicação na glicemia de indivíduos saudáveis, porém nenhum efeito sobre a glicemia de indivíduos diabéticos. No entanto, ao analisar os valores de glicemia final em relação aos valores de glicemia inicial, notamos que estes se encontram estatisticamente maiores nos animais não diabéticos que sofreram irradiação, quando comparados com aqueles que não sofreram (C0) e estatisticamente menores nos grupos D5 e D20 quando comparados com o D0, sugerindo que o laser 24 horas após a sua aplicação pode diminuir significativamente os valores de glicemia de indivíduos saudáveis, porém aumentar em indivíduos saudáveis.

A literatura mostra que diabetes experimental induzido tanto por estrptozotocina quanto aloxana, causam efeitos sobre a estrutura, função e parâmetros antioxidantes das glândulas salivares (33, 119-124) e de diversos tecidos (62, 65, 67, 68, 70, 72, 77, 78, 95, 170).



A hiperglicemia presente cronicamente no organismo do indivíduo diabético vem sendo indicado como o principal responsável na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), um tipo de radical livre. (53, 177, 178). As EROs podem levar a glicação de proteínas (incluindo enzimas), inativando-as. A glicose quando em alta concentração podem sofrer uma auto-oxidação, gerando além de ânion superóxido uma molécula denominada dicarbonila que se liga a 2 cadeias protéicas formando uma ligação cruzada entre elas e inativando-as (11). A hiperglicemia é, portanto, indiretamente responsável pelo estado de estresse oxidativo aumentado relacionado com o diabetes, pois não só aumentam a geração de EROs como também levam a inativação de enzimas (52), causando um desequilíbrio entre os antioxidantes e pró-oxidantes.

As EROs podem por sua vez causar peroxidação lipídica, desestruturando as membranas celulares, modificando sua integridade e permeabilidade, causando perda parcial ou total de sua função. Além disso, podem inativar proteínas e influenciar na expressão de fatores de crescimento e citocinas, alterando o crescimento e proliferação celular (179).

O nosso organismo possui eficientes sistemas antioxidantes, enzimático e não enzimático, a fim de combater estas EROs e proteger os sistemas biológicos dos efeitos potencialmente danosos de reações destas EROs com diversos alvos celulares. O sistema antioxidante enzimático é composto principalmente por 3 enzimas, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx).

Alguns estudos mostram que a atividade da enzima SOD aumenta na presença de altas concentrações de glicose (180). Outros autores, porém acreditam que há uma perda da atividade desta enzima no diabetes, devido a glicação e conseqüente inativação de proteínas (50). A enzima SOD possui duas isoformas, a MnSOD e a CuZnSOD, sendo que a primeira se encontra no interior das mitocôndrias e a segunda está localizada no citoplasma celular. Em um estudo em glândula submandibular de ratos, o tratamento com isoproterenol (agonista  $\beta$ -adrenérgico), aumentou a atividade da MnSOD, elevando a atividade total da SOD (181). Estudo observando efeito do diabetes na atividade desta enzima em glândulas salivares não encontrou alteração significativa (19). Outro recente estudo mostrou que o diabetes causou redução na atividade da enzima SOD em glândulas

submandibulares de ratos induzidos quimicamente e, porém nenhuma alteração no sistema antioxidante da parótida (124).

Em nosso estudo, analisamos a atividade da SOD total em glândulas submandibulares (GSM) e parótidas (GP). Nas submandibulares, comparando apenas o grupo C0 com D0, a fim de observar o efeito do diabetes apenas nas GSM, notamos que os valores da atividade desta enzima se encontram elevados no grupo D0. E analisando o efeito do laser na atividade da SOD, observamos que nos animais não diabéticos não há influência, já nos diabéticos a aplicação do laser com dose elevada ( $20\text{J}/\text{cm}^2$ ) causou aumento na atividade total da SOD. Estes resultados comprovam relatos na literatura de que a luz laser interage de modo mais pronunciado em tecidos e células enfraquecidas, e no caso da enzima SOD são necessárias doses elevadas para conseguir um aumento significativo na atividade. Nas GSM de animais diabéticos a atividade da SOD parece estar elevada como fator de proteção contra os possíveis danos que elevadas concentrações de EROs, presente no diabetes, poderiam causar. E o laser na dose de  $20\text{J}/\text{cm}^2$  aumenta ainda mais a atividade deste protetor contra EROs. No entanto, nas GP a SOD não se mostrou estatisticamente alterada com o diabetes, uma vez que os valores da atividade da SOD no grupo C0 foram semelhantes aos do grupo D0. E por não se encontrar alterada, o laser pareceu não causar efeito nenhum. A diferença de resultados encontrada na GSM e na GP pode ser explicada pela diferença de metabolismo entre elas, a GP possui um metabolismo aeróbico e, portanto normalmente há uma alta geração de ERO, assim a atividade da SOD não necessitou de aumento para compensar a doença. Já na GSM, por possuir metabolismo anaeróbico, foi necessário haver um aumento da atividade desta enzima para prevenir os possíveis danos. Além disso, anatomicamente, a GSM em ratos se encontra localizada mais superficialmente, visto que a GP possui além da camada gordurosa, vários nódulos linfáticos que podem dificultar a penetração e conseqüente absorção da luz laser para os tecidos e células glandulares da parótida. E assim o efeito do laser na GSM pôde ser observado e na GP não houve alteração.

Neste estudo também foi analisado a atividade de outras duas enzimas importantes que compõe o sistema antioxidante enzimático, a catalase e a glutathiona peroxidase. Ambas as enzimas são responsáveis por remover o peróxido de hidrogênio. Estudo anterior, analisando o efeito do diabetes na atividade destas duas

enzimas em glândulas submandibulares e parótida de ratos, encontrou aumento na atividade da enzima CAT em ambas as glândulas e quanto a atividade da GPx, aumento em GP e diminuição em GSM (19). Outro recente estudo mostrou que o diabetes causou aumento na atividade da enzima CAT e GPx em glândulas submandibulares de ratos induzidos quimicamente e porém nenhuma alteração no sistema antioxidante da parótida (124).

Apesar de ambas as enzimas terem a mesma função, é importante ressaltar que se tratam de dois tipos diferentes de enzimas. Enquanto a CAT é uma heme-enzima e catalisa a reação de dismutação, onde uma molécula de  $H_2O_2$  é reduzida a  $H_2O$  e  $O_2$ , GPx remove  $H_2O_2$  e outros peróxidos reduzindo-os a  $H_2O$  simultaneamente a oxidação da glutathiona reduzida (GSH). No presente estudo, o estado diabético parece aumentar a atividade da enzima CAT em GSM quando comparado a atividade desta enzima no grupo não diabético (C0), e irradiação laser com ambas as doses parece aumentar ainda mais a atividade da enzima CAT nestas glândulas de animais diabéticos. Nos animais não diabéticos, o laser também causou um leve aumento na sua atividade, porém mesmo assim, as atividades nos animais diabéticos que receberam a mesma dose de irradiação continuaram ainda bem acima. Com relação às glândulas parótidas, o estado diabético também causou aumento na atividade desta enzima. A irradiação com laser nas diferentes doses causou diminuição na atividade da CAT tanto em animais diabéticos quanto não diabéticos, no entanto as atividades nos animais diabéticos que receberam a mesma dose de irradiação continuaram mais elevadas. Novamente, a diferença de resultados encontrada na GSM e na GP pode ser explicada pela diferença de metabolismo entre elas, a GP possui um metabolismo aeróbico e, portanto normalmente há uma alta geração de ERO, assim a atividade da CAT não necessitou de aumento para compensar a doença, e por isso o laser causou supressão na atividade desta enzima nesta glândula. Já na GSM, por possuir metabolismo anaeróbico, e em condições fisiológicas normais não gera altas quantidades de EROs foi necessário haver um aumento da atividade desta enzima para prevenir os possíveis danos, e o laser agindo de modo protetor aumentou ainda mais sua atividade. Estudo anterior mostrou que o laser não causa alterações na atividade da CAT em GSM (28). Os resultados diferentes encontrados neste trabalho podem ser explicados por alterações na metodologia, sendo que os desvios padrão encontrados neste trabalho se encontram menores que no trabalho realizado

anteriormente e provavelmente isso aconteceu por termos trabalhado em meio de pH 7,4, considerado pH ideal para esta enzima. E com menor desvio padrão foi possível encontrar diferença estatística.

A respeito da atividade da enzima GPx, o estado diabético aumentou a sua atividade em ambas as glândulas. Porém a aplicação de laser não causou alterações significantes na atividade desta enzima em nenhuma das glândulas. A enzima glutathiona peroxidase age principalmente quando o peróxido de hidrogênio está presente em baixas concentrações (condições fisiológicas normais), portanto provavelmente, o laser não causou alteração na atividade desta enzima em ratos diabéticos, pois nestes animais a concentração de  $H_2O_2$  se encontra alta e neste caso é a catalase a principal responsável pela sua remoção e não a GPx (10). Além disso, a atividade da GPx em células parece se concentrar principalmente na região citoplasmática e com baixa atividade em mitocôndrias e como o laser possui ação principalmente no interior das mitocôndrias, onde estão localizadas as principais moléculas fotorreceptoras, ele acabou não causando alteração na atividade desta enzima (47).

Além disso, foram analisados os valores de total antioxidante (TAS), que inclui não só o sistema antioxidante enzimático como também o não enzimático. Os valores de total antioxidante indicam, quantitativamente, a efetividade do sistema antioxidante. Em nosso estudo, em GSM, a irradiação com laser com ambas as doses causou aumento nos valores de TAS em animais diabéticos (D5 e D20) quando comparados aos animais diabéticos que não receberam irradiação (D0), que apresentavam valores de TAS semelhantes ao respectivo grupo não diabético (C0). Estes resultados mostram claramente que a irradiação independente da dose melhorou o sistema antioxidante das GSM de ratas diabéticas. Nos grupos não diabéticos o laser com dose de  $20J/cm^2$  causou diminuição nos valores de TAS sendo que a dose de  $5 J/cm^2$  não causou alteração, o que nos leva a concluir que em organismo saudável, doses elevadas de laser podem causar supressão do sistema antioxidante, talvez por não haver necessidade de altos valores de antioxidante, visto que se trata de tecidos saudáveis. Nas GP a irradiação causou uma tendência de aumento nos valores de TAS nos animais diabéticos. Já nos animais não diabéticos a irradiação com dose de  $5 J/cm^2$  causou uma tendência de diminuição nos valores de TAS e com dose de  $20J/cm^2$  uma tendência de aumento.

Os dados obtidos neste trabalho mostram o efeito do laser em parte do sistema antioxidante das glândulas submandibulares e parótidas e na glicemia de ratas diabéticas (induzidas por estreptozotocina) e não diabéticas. Analisando os resultados, conseguimos observar que o diabetes induzido por estreptozotocina causou alterações no sistema antioxidante das glândulas salivares, confirmando os resultados encontrados em estudos anteriores (19, 26). Os resultados em GSM principalmente sugerem efeito protetor do laser contra o estresse oxidativo presente nas glândulas salivares de animais diabéticos induzidos quimicamente. Além disso, os resultados mostram que a irradiação com laser de baixa potência possui alguns efeitos não só nas alterações causadas pelo diabetes no sistema antioxidante como também na glicemia sanguínea (26, 28).

## 7 CONCLUSÕES

- Em GSM de ratas diabéticas o laser com dose de  $20\text{J}/\text{cm}^2$  causou aumento na atividade da enzima SOD. E independente da dose, causou aumento nos valores de TAS e atividade da enzima CAT.
- Em GSM de ratas não diabéticas a dose de  $20\text{J}/\text{cm}^2$  causou diminuição dos valores de TAS. E independente da dose a irradiação com laser levou a um aumento da atividade da enzima CAT.
- Em GP de ratas diabéticas, independente da dose, a irradiação com laser causou diminuição da atividade da enzima CAT.
- Em GP de ratas não diabéticas a dose de  $5\text{J}/\text{cm}^2$  causou diminuição da atividade da enzima CAT.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

1. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J.* 1922 Mar;12(3):141-6.
2. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2003 Jan;26 Suppl 1:S5-20.
3. Little JW. Recent advances in diabetes mellitus of interest to dentistry. *Spec Care Dentist.* 2000 Mar-Apr;20(2):46-52.
4. Grossi SG. Treatment of periodontal disease and control of diabetes: an assessment of the evidence and need for future research. *Ann Periodontol.* 2001 Dec;6(1):138-45.
5. Cianciola LJ, Park BH, Bruck E, Mosovich L, Genco RJ. Prevalence of periodontal disease in insulin-dependent diabetes mellitus (juvenile diabetes). *J Am Dent Assoc.* 1982 May;104(5):653-60.
6. Ship JA. Diabetes and oral health: an overview. *J Am Dent Assoc.* 2003 Oct;134 Spec No:4S-10S.
7. Manfredi M, McCullough MJ, Vescovi P, Al-Kaarawi ZM, Porter SR. Update on diabetes mellitus and related oral diseases. *Oral Dis.* 2004 Jul;10(4):187-200.
8. Cherry-Peppers G, Sorkin J, Andres R, Baum BJ, Ship JA. Salivary gland function and glucose metabolic status. *J Gerontol.* 1992 Jul;47(4):M130-4.
9. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000 Nov 9;408(6809):239-47.
10. Halliwell B, Gutteridge, JMC, editor. *Free radicals in biology and medicine.* 4th edition ed. Oxford, New York: Oxford University Press; 2007.

---

<sup>1</sup> De acordo com Estilo Vancouver.

11. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*. 1999 Jan;48(1):1-9.
12. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991 Apr;40(4):405-12.
13. Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest*. 1994 Feb;70(2):138-51.
14. Vlassara H. Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. *Diabetes*. 1997 Sep;46 Suppl 2:S19-25.
15. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J*. 1988 Nov 15;256(1):205-12.
16. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem*. 1994 Apr 1;269(13):9889-97.
17. Mata AD, Marques D, Rocha S, Francisco H, Santos C, Mesquita MF, et al. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Mol Cell Biochem*. 2004 Jun;261(1-2):137-42.
18. 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.
19. Nogueira FN, Carvalho AM, Yamaguti PM, Nicolau J. Antioxidant parameters and lipid peroxidation in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta*. 2005 Mar;353(1-2):133-9.
20. Campos L, Simoes 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.



21. Khouri VY, Stracieri AB, Rodrigues MC, Moraes DA, Pieroni F, Simoes BP, et al. Use of therapeutic laser for prevention and treatment of oral mucositis. *Braz Dent J.* 2009;20(3):215-20.
22. Lang-Bicudo L, Eduardo F de P, Eduardo C de P, Zezell DM. LED phototherapy to prevent mucositis: a case report. *Photomed Laser Surg.* 2008 Dec;26(6):609-13.
23. Franca CM, Nunez SC, Prates RA, Noborikawa E, Faria MR, Ribeiro MS. Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters. *J Photochem Photobiol B.* 2009 Jan 9;94(1):25-31.
24. Cowen D, Tardieu C, Schubert M, Peterson D, Resbeut M, Faucher C, et al. Low energy Helium-Neon laser in the prevention of oral mucositis in patients undergoing bone marrow transplant: results of a double blind randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997 Jul 1;38(4):697-703.
25. Simoes A, Platero MD, Campos L, Aranha AC, Eduardo C de P, Nicolau J. Laser as a therapy for dry mouth symptoms in a patient with Sjogren's syndrome: a case report. *Spec Care Dentist.* 2009 May-June;29(3):134-7.
26. Simoes A, Ganzerla E, Yamaguti PM, de Paula Eduardo C, Nicolau J. Effect of diode laser on enzymatic activity of parotid glands of diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2009 Jul;24(4):591-6.
27. Simoes A, Nicolau J, de Souza DN, Ferreira LS, de Paula Eduardo C, Apel C, et al. Effect of defocused infrared diode laser on salivary flow rate and some salivary parameters of rats. *Clin Oral Investig.* 2008 Mar;12(1):25-30.
28. Simoes A, Nogueira FN, de Paula Eduardo C, Nicolau J. Diode laser decreases the activity of catalase on submandibular glands of diabetic rats. *Photomed Laser Surg.* Feb;28(1):91-5.
29. Simoes A, Siqueira WL, Lamers ML, Santos MF, Eduardo C de P, Nicolau J. Laser phototherapy effect on protein metabolism parameters of rat salivary glands. *Lasers Med Sci.* 2009 Mar;24(2):202-8.
30. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998 Jul;15(7):539-53.

31. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev.* 1995 Apr;16(2):117-42.
32. Guyton AC, Hall JE, editors. *Textbook of Medical Physiology.* 10th ed; Philadelphia: Saunders;2000.
33. 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.
34. Kakkar R, Kalra J, Mantha SV, Prasad K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 1995 Oct 18;151(2):113-9.
35. Tripathi BK, Srivastava AK. *Diabetes mellitus: complications and therapeutics.* *Med Sci Monit.* 2006 Jul;12(7):RA130-47.
36. Le Roith D, Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care.* 2001 Mar;24(3):588-97.
37. Greenspan FS, Gardner DG, editors. *Basic and clinical endocrinology.* 7th.ed. New York: McGraw\_Hill; 2004.
38. Babcock GT. How oxygen is activated and reduced in respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Nov 9;96(23):12971-3.
39. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997 Mar;82(2):291-5.
40. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000 Feb;49(2 Suppl 1):3-8.
41. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994 Jan;74(1):139-62.
42. Devlin TM, editor. *Textbook of biochemistry: with clinical correlations.* 6th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss; 2006.

43. Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychoudhury S, Chakraborti S. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal*. 1999 Feb;11(2):77-85.
44. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic Biol Med*. 1988;5(5-6):363-9.
45. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969 Nov 25;244(22):6049-55.
46. Mills GC. The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. *J Biol Chem*. 1959 Mar;234(3):502-6.
47. Abdalla DSP. Antioxidantes - Conceitos Básicos e Perspectivas Terapêuticas. *ARS CVRANDI,- A revista da clínica médica*. 1993 Nov:/Dez.; 26:141-64.
48. Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci*. 2007 Jan;32(1):44-50.
49. Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, et al. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*. 1993 Jun;42(6):801-13.
50. Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med*. 1988;5(2):113-24.
51. Taniguchi N, Kaneto H, Asahi M, Takahashi M, Wenyi C, Higashiyama S, et al. Involvement of glycation and oxidative stress in diabetic macroangiopathy. *Diabetes*. 1996 Jul;45 Suppl 3:S81-3.
52. Rellier N, Ruggiero-Lopez D, Lecomte M, Lagarde M, Wiernsperger N. In vitro and in vivo alterations of enzymatic glycosylation in diabetes. *Life Sci*. 1999;64(17):1571-83.
53. Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J*. 1987 Jul 1;245(1):243-50.

54. Parthiban A, Vijayalingam S, Shanmugasundaram KR, Mohan R. Oxidative stress and the development of diabetic complications--antioxidants and lipid peroxidation in erythrocytes and cell membrane. *Cell Biol Int*. 1995 Dec;19(12):987-93.
55. Gil-del Valle L, de la CML, Toledo A, Vilaro N, Tapanes R, Otero MA. Altered redox status in patients with diabetes mellitus type I. *Pharmacol Res*. 2005 Apr;51(4):375-80.
56. Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, Dominguez C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med*. 2003 Jun 15;34(12):1563-74.
57. Atalay M, Laaksonen DE, Niskanen L, Uusitupa M, Hanninen O, Sen CK. Altered antioxidant enzyme defences in insulin-dependent diabetic men with increased resting and exercise-induced oxidative stress. *Acta Physiol Scand*. 1997 Oct;161(2):195-201.
58. Skrha J, Hodinar A, Kvasnicka J, Hilgertova J. Relationship of oxidative stress and fibrinolysis in diabetes mellitus. *Diabet Med*. 1996 Sep;13(9):800-5.
59. Ceriello A, Bortolotti N, Falletti E, Taboga C, Tonutti L, Crescentini A, et al. Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care*. 1997 Feb;20(2):194-7.
60. Vucic M, Gavella M, Bozikov V, Ashcroft SJ, Rocic B. Superoxide dismutase activity in lymphocytes and polymorphonuclear cells of diabetic patients. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1997 Jul;35(7):517-21.
61. Altomare E, Grattagliano I, Vendemaile G, Micelli-Ferrari T, Signorile A, Cardia L. Oxidative protein damage in human diabetic eye: evidence of a retinal participation. *Eur J Clin Invest*. 1997 Feb;27(2):141-7.
62. Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J. Antioxidant defense system in diabetic kidney: a time course study. *Life Sci*. 1997;60(9):667-79.
63. Torres MD, Canal JR, Perez C. Oxidative stress in normal and diabetic rats. *Physiol Res*. 1999;48(3):203-8.

64. Caballero F, Gerez E, Batlle A, Vazquez E. Preventive aspirin treatment of streptozotocin induced diabetes: blockage of oxidative status and reversion of heme enzymes inhibition. *Chem Biol Interact.* 2000 Jun 1;126(3):215-25.
65. Tagami S, Kondo T, Yoshida K, Hirokawa J, Ohtsuka Y, Kawakami Y. Effect of insulin on impaired antioxidant activities in aortic endothelial cells from diabetic rabbits. *Metabolism.* 1992 Oct;41(10):1053-8.
66. El-Khatib AS, Moustafa AM, Abdel-Aziz AA, Al-Shabanah OA, El-Kashef HA. Effects of aminoguanidine and desferrioxamine on some vascular and biochemical changes associated with streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. *Pharmacol Res.* 2001 Mar;43(3):233-40.
67. Ugochukwu NH, Cobourne MK. Modification of renal oxidative stress and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats treated with extracts from *Gongronema latifolium* leaves. *Clin Chim Acta.* 2003 Oct;336(1-2):73-81.
68. Asayama K, Hayashibe H, Dobashi K, Niitsu T, Miyao A, Kato K. Antioxidant enzyme status and lipid peroxidation in various tissues of diabetic and starved rats. *Diabetes Res.* 1989 Oct;12(2):85-91.
69. Aragno M, Tamagno E, Gatto V, Brignardello E, Parola S, Danni O, et al. Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 1999 Jun;26(11-12):1467-74.
70. Saxena AK, Srivastava P, Kale RK, Baquer NZ. Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. *Biochem Pharmacol.* 1993 Feb 9;45(3):539-42.
71. Jang YY, Song JH, Shin YK, Han ES, Lee CS. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res.* 2000 Oct;42(4):361-71.
72. Sukalski KA, Pinto KA, Berntson JL. Decreased susceptibility of liver mitochondria from diabetic rats to oxidative damage and associated increase in alpha-tocopherol. *Free Radic Biol Med.* 1993 Jan;14(1):57-65.
73. Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Thomas TP, Hill M, Khaper N, Singal PK. Probucol improves antioxidant activity and modulates development of diabetic cardiomyopathy. *Nutrition.* 1995 Sep-Oct;11(5 Suppl):551-4.

74. Cho SY, Park JY, Park EM, Choi MS, Lee MK, Jeon SM, et al. Alternation of hepatic antioxidant enzyme activities and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats by supplementation of dandelion water extract. *Clin Chim Acta*. 2002 Mar;317(1-2):109-17.
75. Dohi T, Kawamura K, Morita K, Okamoto H, Tsujimoto A. Alterations of the plasma selenium concentrations and the activities of tissue peroxide metabolism enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Horm Metab Res*. 1988 Nov;20(11):671-5.
76. Mohan IK, Das UN. Effect of L-arginine-nitric oxide system on chemical-induced diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med*. 1998 Nov 1;25(7):757-65.
77. Kedziora-Kornatowska KZ, Luciak M, Paszkowski J. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the diabetic kidney: effect of treatment with angiotensin convertase inhibitors. *IUBMB Life*. 2000 Apr;49(4):303-7.
78. Limaye PV, Raghuram N, Sivakami S. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 2003 Jan;243(1-2):147-52.
79. Kedziora-Kornatowska KZ, Luciak M, Blaszczyk J, Pawlak W. Effect of aminoguanidine on erythrocyte lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Clin Chem Lab Med*. 1998 Oct;36(10):771-5.
80. Sailaja Devi MM, Suresh Y, Das. Preservation of the antioxidant status in chemically-induced diabetes mellitus by melatonin. *J Pineal Res*. 2000 Sep;29(2):108-15.
81. Rauscher FM, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Effects of piperine on antioxidant pathways in tissues from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2000;14(6):329-34.
82. Rauscher FM, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Effects of isoeugenol on oxidative stress pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2001;15(3):159-64.
83. Sanders RA, Rauscher FM, Watkins JB, 3rd. Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2001;15(3):143-9.

84. Rauscher FM, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Effects of coenzyme Q10 treatment on antioxidant pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2001;15(1):41-6.
85. Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Khaper N, Seneviratne C, Singal PK. Probucol treatment reverses antioxidant and functional deficit in diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem*. 1996 Jul-Aug;160-161:283-8.
86. Langenstroer P, Pieper GM. Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radicals. *Am J Physiol*. 1992 Jul;263(1 Pt 2):H257-65.
87. Wohaieb SA, Godin DV. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes*. 1987 Sep;36(9):1014-8.
88. Kocak G, Aktan F, Canbolat O, Ozogul C, Elbeg S, Yildizoglu-Ari N, et al. Alpha-lipoic acid treatment ameliorates metabolic parameters, blood pressure, vascular reactivity and morphology of vessels already damaged by streptozotocin-diabetes. *Diabetes Nutr Metab*. 2000 Dec;13(6):308-18.
89. Qujeq D, Aliakbarpour HR, Kalavi K. Relationship between malondialdehyde level and glutathione peroxidase activity in diabetic rats. *Clin Chim Acta*. 2004 Feb;340(1-2):79-83.
90. Ozansoy G, Akin B, Aktan F, Karasu C. Short-term gemfibrozil treatment reverses lipid profile and peroxidation but does not alter blood glucose and tissue antioxidant enzymes in chronically diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 2001 Jan;216(1-2):59-63.
91. Mak DH, Ip SP, Li PC, Poon MK, Ko KM. Alterations in tissue glutathione antioxidant system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 1996 Sep 20;162(2):153-8.
92. Stefek M, Sotnikova R, Okruhlicova L, Volkovova K, Kucharska J, Gajdosik A, et al. Effect of dietary supplementation with the pyridoindole antioxidant stobadine on antioxidant state and ultrastructure of diabetic rat myocardium. *Acta Diabetol*. 2000;37(3):111-7.

93. Godin DV, Wohaiieb SA, Garnett ME, Goumeniouk AD. Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol Cell Biochem.* 1988 Dec;84(2):223-31.
94. Matkovics B, Varga SI, Szabo L, Witas H. The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. *Horm Metab Res.* 1982 Feb;14(2):77-9.
95. Loven D, Schedl H, Wilson H, Daabees TT, Stegink LD, Diekus M, et al. Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozocin-induced diabetes. *Diabetes.* 1986 May;35(5):503-7.
96. Mekinova D, Chorvathova V, Volkovova K, Staruchova M, Grancicova E, Klvanova J, et al. Effect of intake of exogenous vitamins C, E and beta-carotene on the antioxidative status in kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Nahrung.* 1995;39(4):257-61.
97. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent.* 2001 Feb;85(2):162-9.
98. Katchburian EA, *Histologia e Embriologia oral.* 2. ed. Rev.atual. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
99. Martinez JR. Cellular mechanisms underlying the production of primary secretory fluid in salivary glands. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1990;1(1):67-78.
100. Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. *J Dent.* 2005 Mar;33(3):223-33.
101. Diaz-Arnold AM, Marek CA. The impact of saliva on patient care: A literature review. *J Prosthet Dent.* 2002 Sep;88(3):337-43.
102. Berridge MJ, Heslop JP, Irvine RF, Brown KD. Inositol trisphosphate formation and calcium mobilization in Swiss 3T3 cells in response to platelet-derived growth factor. *Biochem J.* 1984 Aug 15;222(1):195-201.
103. Baum BJ, Dai Y, Hiramatsu Y, Horn VJ, Ambudkar IS. Signaling mechanisms that regulate saliva formation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4(3-4):379-84.



104. Baum BJ. Neurotransmitter control of secretion. *J Dent Res.* 1987 Feb;66 Spec No:628-32.
105. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):197-212.
106. Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J.* 1992 Apr 25;172(8):305-12.
107. Llana-Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006 Aug;11(5):E449-55.
108. Siqueira WL, Nicolau J. Stimulated whole saliva components in children with Down syndrome. *Spec Care Dentist.* 2002 Nov-Dec;22(6):226-30.
109. de Almeida P del V, Gregio AM, Machado MA, de Lima AA, Azevedo LR. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract.* 2008;9(3):72-80.
110. Nagler RM. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. *Oral Dis.* 2002 May;8(3):141-6.
111. Tandler B. Introduction to mammalian salivary glands. *Microsc Res Tech.* 1993 Sep 1;26(1):1-4.
112. Tandler B. Structure of the duct system in mammalian major salivary glands. *Microsc Res Tech.* 1993 Sep 1;26(1):57-74.
113. Chavez EM, Taylor GW, Borrell LN, Ship JA. Salivary function and glycemic control in older persons with diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000 Mar;89(3):305-11.
114. Dodds MW, Yeh CK, Johnson DA. Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2000 Oct;28(5):373-81.
115. Dodds MW, Dodds AP. Effects of glycemic control on saliva flow rates and protein composition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997 Apr;83(4):465-70.

116. Reznick AZ, Shehadeh N, Shafir Y, Nagler RM. Free radicals related effects and antioxidants in saliva and serum of adolescents with Type 1 diabetes mellitus. *Arch Oral Biol.* 2006 Aug;51(8):640-8.
117. 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.
118. 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.
119. Anderson LC. Effects of alloxan diabetes and insulin in vivo on rat parotid gland. *Am J Physiol.* 1983 Sep;245(3):G431-7.
120. 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.
121. Kurahashi M, Inomata K. Amylase secretion by parotid glands and pancreas of diabetic rats during feeding. *Am J Physiol.* 1988 Jun;254(6 Pt 1):G878-82.
122. Nicolau J, De Souza DN, Simoes 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.
123. Nicolau J, de Souza DN, Carrilho M. Increased glycosylated calmodulin in the submandibular salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct.* 2009 Jun;27(4):193-8.
124. Leite MF, Lima AM, Massuyama MM, Otton R. Astaxanthin restores the enzymatic antioxidant profile in salivary gland of alloxan-induced diabetic rats. *Arch Oral Biol.* Jul;55(7):479-85.
125. Genovese WJ, editor. *Laser de Baixa Intensidade: aplicações terapêuticas em Odontologia.* São Paulo:Santos; 2007.
126. Azevedo LH, Galletta VC, de Paula Eduardo C, de Sousa SO, Migliari DA. Treatment of oral verrucous carcinoma with carbon dioxide laser. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Nov;65(11):2361-6.

127. Gontijo I, Navarro RS, Haypek P, Ciamponi AL, Haddad AE. The applications of diode and Er:YAG lasers in labial frenectomy in infant patients. *J Dent Child (Chic)*. 2005 Jan-Apr;72(1):10-5.
128. Freitas PM, Navarro RS, Barros JA, de Paula Eduardo C. The use of Er:YAG laser for cavity preparation: an SEM evaluation. *Microsc Res Tech*. 2007 Sep;70(9):803-8.
129. Gouw-Soares S, Tanji E, Haypek P, Cardoso W, Eduardo CP. The use of Er:YAG, Nd:YAG and Ga-Al-As lasers in periapical surgery: a 3-year clinical study. *J Clin Laser Med Surg*. 2001 Aug;19(4):193-8.
130. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys*. 1989 May;56(5):691-704.
131. Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SM, Aoki A, Ishikawa I. Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 2005 Feb;76(2):187-93.
132. Veçoso MC, editor. *Laser em Fisioterapia*. São Paulo: Ed. Lovise; 1993.
133. Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg*. 2005 Aug;23(4):355-61.
134. Kujawa J, Zavodnik L, Zavodnik I, Bryszewska M. Low-intensity near-infrared laser radiation-induced changes of acetylcholinesterase activity of human erythrocytes. *J Clin Laser Med Surg*. 2003 Dec;21(6):351-5.
135. Kujawa J, Zavodnik L, Zavodnik I, Buko V, Lapshyna A, Bryszewska M. Effect of low-intensity (3.75-25 J/cm<sup>2</sup>) near-infrared (810 nm) laser radiation on red blood cell ATPase activities and membrane structure. *J Clin Laser Med Surg*. 2004 Apr;22(2):111-7.
136. Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. *J Investig Med*. 2000 Sep;48(5):312-26.
137. Takeda Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction. Experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1988 Dec;17(6):388-91.

138. Gavish L, Asher Y, Becker Y, Kleinman Y. Low level laser irradiation stimulates mitochondrial membrane potential and disperses subnuclear promyelocytic leukemia protein. *Lasers Surg Med.* 2004;35(5):369-76.
139. Tuner J, Hode L. It's all in the parameters: a critical analysis of some well-known negative studies on low-level laser therapy. *J Clin Laser Med Surg.* 1998 Oct;16(5):245-8.
140. 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.
141. Karu TI, Afanas'eva NI, Koll'iakov SF, Piatibrat LV. [Change in the absorption spectrum of a monolayer of live cells under low-intensity laser irradiation]. *Dokl Akad Nauk.* 1998 May;360(2):267-70.
142. Kol'yakov SF, Pyatibrat LV, Mikhailov EL, Kompanets ON, Karu TI. Changes in the circular dichroism spectra of a suspension of live cells exposed to low-intensity laser radiation ( $\lambda = 820$  nm). *Dokl Biochem Biophys.* 2001 Mar-Apr;377:128-31.
143. Karu TI. [Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser irradiation]. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 1986;291(5):1245-9.
144. Karu TI. Low-Power Laser Therapy. In: Vo-Dinh T, editor. *Biomedical Photonics handbook.* Boca Raton: CRC Press; 2003. Cap. 48.
145. Wilden L, Karthein R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. *J Clin Laser Med Surg.* 1998 Jun;16(3):159-65.
146. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B.* 1995 Mar;27(3):219-23.
147. Parlato G, Cimmino G, De Vendittis E, Monfrecola G, Bocchini V. Superoxide dismutase activity in the skin of rats irradiated by He-Ne laser. *Experientia.* 1983 Jul 15;39(7):750-1.
148. Passarella S, Ostuni A, Atlante A, Quagliariello E. Increase in the ADP/ATP exchange in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988 Oct 31;156(2):978-86.

149. Ricevuti G, Mazzone A, Monaia C, Fratino P, Degiulio R, Dell'Acqua R, et al. In vivo and in vitro HeNe laser effects on phagocyte functions. *Inflammation*. 1989 Oct;13(5):507-27.
150. Karu T. Derepression of the genome after irradiation of human lymphocytes with He-Ne laser. *Laser Therapy*, 1992(4):5-24.
151. Yew DT, Lam ST, Chan YW. Effect of low dose laser on the chorioallantoic culture of retinal pigment cells. *Acta Radiol Oncol*. 1982;21(6):433-8.
152. Karu TI. Effects of visible radiation on cultured cells. *Photochem Photobiol*. 1990 Dec;52(6):1089-98.
153. Tiphlova O, Karu T. Action of low-intensity laser radiation on *Escherichia coli*. *Crit Rev Biomed Eng*. 1991;18(6):387-412.
154. Boulton M, Marshall J. Effects of increasing numbers of phagocytic inclusions on human retinal pigment epithelial cells in culture: a model for aging. *Br J Ophthalmol*. 1986 Nov;70(11):808-15.
155. Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Mosc)*. 2004 Jan;69(1):81-90.
156. Schwengel RH, Gregory KW, Hearne SE, Scott HJ, Beauman GJ, Mergner WJ, et al. Characterization of pulsed-dye laser-mediated vasodilatation in a rabbit femoral artery model of vasoconstriction. *Lasers Surg Med*. 1993;13(3):284-95.
157. Maegawa Y, Itoh T, Hosokawa T, Yaegashi K, Nishi M. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Lasers Surg Med*. 2000;27(5):427-37.
158. Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry*. 2004 Jan;69(1):81-90.
159. Onac I, Pop L, Onac I. Implications of low power He-Ne Laser and monochromatic red light biostimulation in protein and glycoside metabolism. *Laser Therapy*. 1999;11(3):130-7.

160. Lombardi AVRSC. "In vitro" photomodulation of isocitrate dehydrogenase activity by He-Ne Laser irradiation. *Laser Therapy*. 1999;11(4):164-9.
161. Artyukhov VG, Basharina OV, Pantak AA, Sveklo LS. Effect of helium-neon laser on activity and optical properties of catalase. *Bull Exp Biol Med*. 2000 Jun;129(6):537-40.
162. Hubacek J, Matouskova I. Effect of He-Ne laser radiation on lysozyme in saliva. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med*. 1987;116:353-8.
163. Samar ME, Avila RE, Juri HO, Plivelic T, Fabro SP. Histopathological alterations induced by He-Ne laser in the salivary glands of the posthatched chicken. *Clin Laser Med Surg*. 1995;13(4):267-72.
164. Plavnik LM, De Crosa ME, Malberti AI. Effect of low-power radiation (helium/neon) upon submandibulatory glands. *J Clin Laser Med Surg*. 2003 Aug;21(4):219-25.
165. Velez GM, Colls C. Comportamiento de la luz en la interacción con los tejidos en especial, el laser de baja potencia. Centro de documentación Láser Meditec (CDL). Barcelona, España;1988. p. 6-21.
166. Trelles MA, Mayayo, E. Mast cells are implicated in low-power laser effects on tissue: preliminary study. *Lasers Medl Sci* 1992;7:73-7.
167. Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. *Lasers Surg Med*. 1997;20(1):56-63.
168. 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.
169. Simoes A, Siqueira WL, Lamers ML, Santos MF, Eduardo CP, Nicolau J. Laser phototherapy effect on protein metabolism parameters of rat salivary glands. *Lasers Med Sci*. 2008;DOI: 10.1007/s10103-008-0548-0.
170. Jung K, Henke W. Developmental changes of antioxidants enzymes in kidney and liver from rats. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(4):613-7.

171. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*. 1993 Apr;84(4):407-12.
172. Suttle NF, McMurray CH. Use of erythrocyte copper:zinc superoxide dismutase activity and hair or fleece copper concentrations in the diagnosis of hypocuprosis in ruminants. *Res Vet Sci*. 1983 Jul;35(1):47-52.
173. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci*. 1983 May;34(3):253-6.
174. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967 Jul;70(1):158-69.
175. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105:121-6..
176. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
177. Opara EC. Role of oxidative stress in the etiology of type 2 diabetes and the effect of antioxidant supplementation on glycemic control. *J Investig Med*. 2004 Jan;52(1):19-23.
178. Kennedy AL, Lyons TJ. Glycation, oxidation, and lipoxidation in the development of diabetic complications. *Metabolism*. 1997 Dec;46(12 Suppl 1):14-21.
179. Forbes JM, Cooper ME, Oldfield MD, Thomas MC. Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Aug;14(8 Suppl 3):S254-8.
180. Oliveira HR, Curi R, Carpinelli AR. Glucose induces an acute increase of superoxide dismutase activity in incubated rat pancreatic islets. *Am J Physiol*. 1999 Feb;276(2 Pt 1):C507-10.
181. Barroso AS, Quissell DO, Colepicolo P. Modulation of SOD activity in rat submandibular glands. *Arch Oral Biol*. 2003 Feb;48(2):133-9.

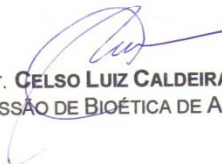
## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA****PARECER DE APROVAÇÃO****PROTOCOLO nº 08/08**

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da FOUSP, APROVOU o protocolo de pesquisa “Estudo do efeito da terapia com laser em baixa intensidade no metabolismo energético da glândulas salivares submandibulares e parótidas de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina”, de responsabilidade do pesquisador Fernando Neves Nogueira.

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

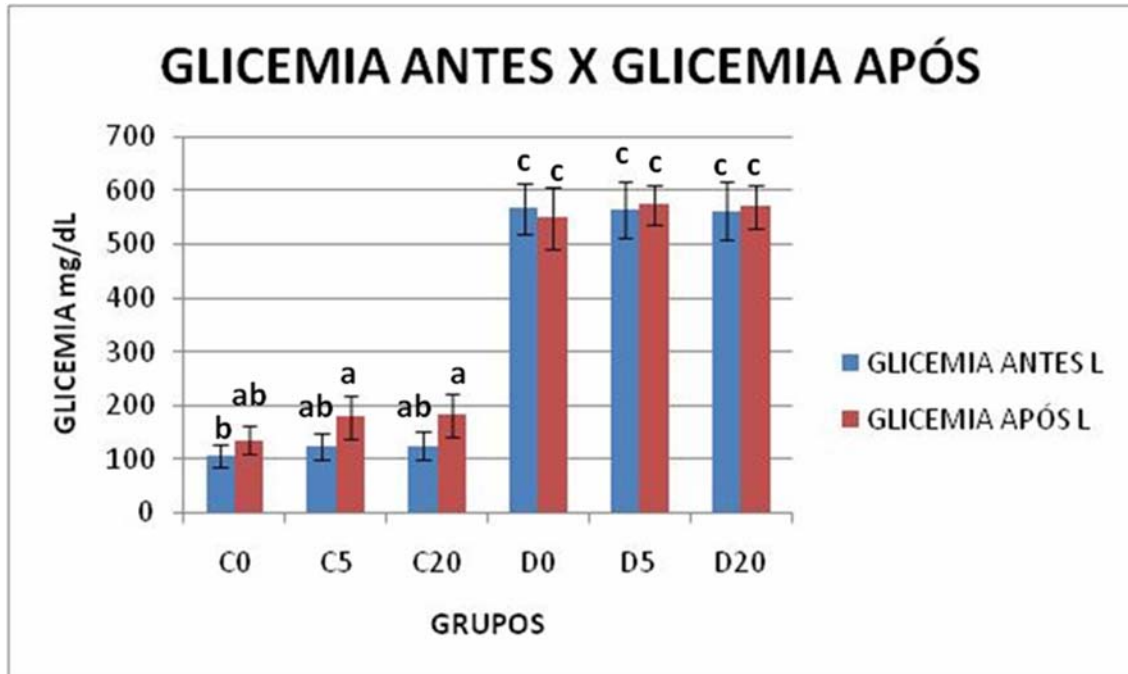
São Paulo, 07 de julho de 2008



Prof. Dr. **CELSO LUIZ CALDEIRA**  
PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOUSP



## ANEXO B – Glicemias Antes e Após a Irradiação



Glicemia (alimentado, em mg/dL) imediatamente antes e após da irradiação ou simulação do laser nos diferentes grupos. As colunas representam os valores médios e as barras o desvio padrão. As letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos diabéticos e não diabéticos de diferentes grupos. ( $p < 0,05$ ) ( $n=8$ )

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)