

# Efeito da laserterapia sobre IGF-1 nas glândulas submandibulares e parótidas de animais diabéticos induzidos por estreptozotocina

• **Danielle Lima Corrêa de Carvalho** Department of Biomaterials and Oral Biology, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil • **José Nicolau** Department of Biomaterials and Oral Biology, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil • **Alyne Simões** Department of Biomaterials and Oral Biology, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

**RESUMO** | O Diabetes mellitus é um distúrbio metabólico de etiologia múltipla, caracterizado por hiperglicemia, podendo ocasionar disfunções e falências de órgãos e tecidos, incluindo as glândulas salivares. Estudos demonstraram uma diminuição da glicemia de ratas diabéticas com o uso de laser de baixa potência (LBP) em glândulas salivares; no entanto, o mecanismo de ação do laser sobre o metabolismo dos carboidratos ainda é desconhecido. Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar o efeito da irradiação com LBP na concentração de IGF-1 nas glândulas parótidas e submandibulares de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina. Trinta e oito ratas da raça Wistar receberam uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina ou de tampão conforme o grupo ao qual pertenciam, C (controle) ou D (diabetes). Posteriormente, as ratas foram divididas em 4 subgrupos (Co, DO, C5 e D5), de acordo com a dose de irradiação recebida (0 ou 5 J/cm<sup>2</sup>). Após 29 dias da indução, os animais foram submetidos à simulação ou à irradiação. Após vinte e quatro horas, os animais foram sacrificados e as glândulas salivares, coletadas para a análise da concentração de IGF-1. No dia do sacrifício, a glicemia dos animais diabéticos que receberam irradiação estava diminuída quando comparada com a glicemia de diagnóstico ( $p \leq 0,05$ ). A concentração de IGF-1, entretanto, não sofreu influência da irradiação. Com base nesses resultados, podemos concluir que o LBP pode alterar a glicemia dos animais diabéticos; no entanto, esse efeito parece não estar relacionado com a concentração de IGF-1.

**DESCRITORES** | Diabetes Mellitus; Glicemia; Fator de Crescimento Insulin-Like I; Terapia a Laser; Glândulas Salivares.

**ABSTRACT** | **Effect of laser therapy on IGF-1 in the parotid and submandibular glands of streptozotocin-induced diabetic rats** • Diabetes mellitus is a metabolic disease of multiple etiologies that leads to hyperglycemia and can cause numerous dysfunctions and failure of organs and tissues, including the salivary glands. Some studies using diabetic rats have shown a decrease in glucose blood concentration when low-power laser (LPL) was used on salivary glands; however, the mechanism of action of lasers on carbohydrate metabolism is yet unknown. Thus, the aim of this study was to assess whether LPL irradiation on salivary glands can change the IGF-1 concentration of diabetic rats. Thirty-eight female rats were divided into 4 groups: DO and D5 (diabetic animals) and Co and C5 (control animals), respectively irradiated with 0 and 5 J/cm<sup>2</sup>. Diabetes was induced by administration of streptozotocin and confirmed later by the glycaemia results. Twenty-nine days after induction, the parotid and submandibular glands of groups D5 and C5 were irradiated with a diode laser. Twenty-four hours after irradiation, the animals were sacrificed and their salivary glands were collected to assess IGF-1 concentration. Diabetic animals that received irradiation showed lower glucose concentration on the day of sacrifice in comparison with the day they had been diagnosed ( $p \leq 0,05$ ); however, IGF-1 concentration was unchanged by irradiation. Based on the results of this study, it was concluded that LPL irradiation can decrease blood glucose concentration of diabetic animals; however, this effect appears to be unrelated to the concentration of IGF-1.

**DESCRIPTORS** | Diabetes Mellitus; Blood Glucose; Insulin-Like Growth Factor I; Laser Therapy; Salivary Glands.

**CORRESPONDING AUTHOR**

• **Alyne Simões** Department of Biomaterials and Oral Biology, School of Dentistry University of São Paulo • **Avenida Professor Lineu Prestes, 2227 São Paulo, SP, Brazil** • **05508-000** E-mail: [lysimoes@usp.br](mailto:lysimoes@usp.br)

• **Received** Sep 16, 2013 • **Accepted** Apr 7, 2014  
• **DOI** <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2357-8041.clrd.2014.59344>

## INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é um distúrbio metabólico de etiologia múltipla caracterizada pela falta parcial ou total de insulina, por meio da produção insuficiente de insulina pelo pâncreas ou pela incapacidade do organismo em utilizar efetivamente a insulina produzida, causando uma hiperglicemia crônica, um dos principais fatores relacionados com as complicações do diabetes.<sup>1</sup>

Com o passar do tempo, a hiperglicemia ocasiona algumas complicações no paciente diabético, como, por exemplo, disfunções e falências em alguns órgãos como rins, olhos e coração, além de alterações nos sistemas vascular e nervoso.<sup>2</sup> Na cavidade oral, as complicações relacionadas à hiperglicemia são gengivite, periodontite, cárie dental, candidíase oral, perda de osso alveolar e xerostomia.<sup>3-5</sup>

Alguns estudos com modelos animais verificaram que a hiperglicemia altera bioquimicamente as glândulas salivares parótidas e submandibulares de ratos diabéticos induzidos quimicamente por estreptozotocina.<sup>6-12</sup>

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa analisaram o efeito de algumas terapias sobre as alterações que o diabetes pode causar nas glândulas salivares e na glicemia, como o tungstato de sódio e a terapia com laser de baixa potência (Laser Phototherapy, LPT).<sup>9,11,13</sup> Simões *et al.*<sup>11</sup> e Ibuki *et al.*<sup>13</sup> observaram que a LPT atua revertendo algumas alterações bioquímicas encontradas em glândulas salivares de animais diabéticos, principalmente relacionadas com estresse oxidativo, e atua também diminuindo a glicemia dos animais irradiados.<sup>11,13</sup> No entanto, o mecanismo de ação da LPT sobre o metabolismo dos carboidratos não é conhecido.

Uma vez que o *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) é sintetizado e secretado pelas glândulas salivares e que possui uma estrutura tridimensional semelhante à insulina — sugerindo que o IGF-1 possa mimetizar algumas das atividades metabólicas da

insulina como, por exemplo, auxiliar no controle glicêmico —,<sup>14-18</sup> o objetivo deste estudo foi analisar se a irradiação com laser de baixa potência é capaz de atuar na concentração de IGF-1 das glândulas parótidas (GPs) e submandibulares (GSMs) de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina, o que poderia justificar a diminuição na glicemia observada nos trabalhos anteriores realizados em animais diabéticos irradiados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

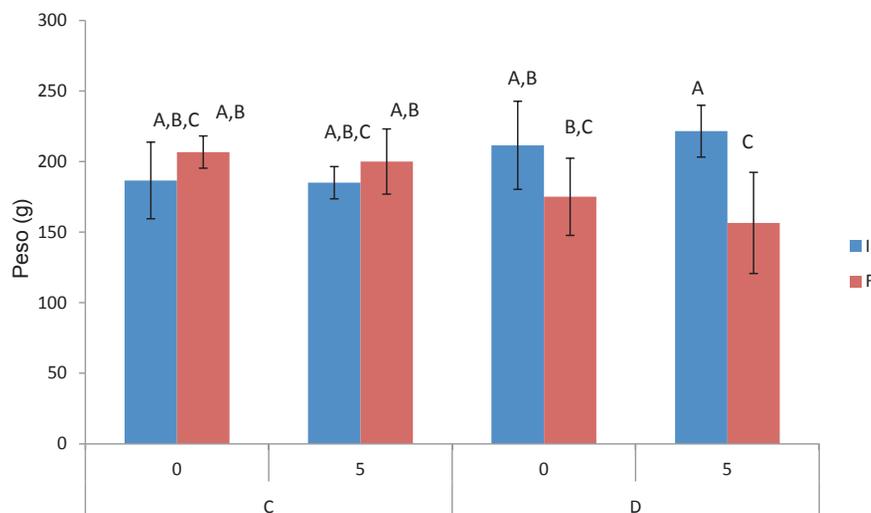
O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Trinta e oito ratas adultas da raça Wistar do Biotério do Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), com peso corporal de aproximadamente 200 g, foram utilizadas, as quais foram mantidas em gaiolas individuais durante todo o período experimental. Os animais foram divididos em dois grupos, Controle (C) e Diabetes (D), e aleatoriamente subdivididos em quatro grupos de acordo com a dose de irradiação laser recebida, sendo Co e Do as denominações dos animais controle e diabéticos, respectivamente, que receberam somente uma simulação de irradiação (0 J/cm<sup>2</sup>), e C5 e D5 as denominações dos animais controle e diabéticos, respectivamente, que receberam 5 J/cm<sup>2</sup> de irradiação.

O diabetes mellitus foi induzido após um período de 15 horas de jejum, com uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão de citrato de sódio 0,1 M, pH 4,5 (Grupo D). Os animais do Grupo C receberam somente uma injeção do veículo. A glicemia de diagnóstico foi aferida 72 horas após a indução do diabetes, e os animais com glicemia igual ou superior a 250 mg de glicose/dL de sangue foram considerados diabéticos.

Após 29 dias da confirmação do estado diabético

**Figura 1** | Peso inicial e final (g) para os diferentes grupos. As colunas representam os valores médios e as barras, o desvio padrão. As letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos (C0, C5, D0 e D5) e tempos experimentais (inicial e final; C0, n = 10; C5, n = 8; D0, n = 10; D5, n = 10).



co, os animais foram anestesiados com ketamina e xilasina, tricotomizados e irradiados na região das GSMs e GPs e sacrificados 24 horas após a irradiação. Nos animais dos Grupos Co e Do, foi feita somente uma simulação da irradiação.

Um laser de diodo InGaAlP (Photon Lase III; DMC Equipamentos Ltda., São Carlos, SP, Brasil), com comprimento de onda de 660 nm e área do spot de 0,028 cm<sup>2</sup>, do Laboratório de Biologia Oral da FOU SP, foi utilizado para o estudo, com potência fixa em 70 mW e com tempo de irradiação de 2 s por ponto para os Grupos C5 e D5, sendo a energia por ponto de 0,14 J e a densidade de energia de 5 J/cm<sup>2</sup>. Os animais foram irradiados uma única vez, de maneira pontual e em contato, no total de 40 pontos (5,6 J de energia total por área) na região de cada GP e nas duas GSMs de uma vez (sendo 3 áreas de irradiação). Cada área foi demarcada com um círculo de aproximadamente 1,13 cm<sup>2</sup>.

Os animais foram eutanasiados 24 horas após a irradiação por destroncamento medular após anestesia com ketamina/xilasina. Para a análise da concentração de IGF-1, as glândulas foram removidas imediatamente, limpas de tecidos aderentes, prensadas entre placas de alumínio e mantidas em gelo seco até serem armazenadas em freezer a -80°C, onde permaneceram até o momento de sua utilização.

As análises da glicemia (de diagnóstico e de sacrifício) foram realizadas com um glicosímetro comercial (Accu-Check Advantage; Roche Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Para a determinação da concentração de IGF-1 nas GSMs e GPs, foi utilizado um kit para ELISA (enzyme-linked immune-sorbent assay; AbFrontier's rat IGF-1 ELISA Kit; Young In Frontier Co., Ltd., Seoul, Coreia), adaptado para glândulas salivares.

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

## RESULTADOS

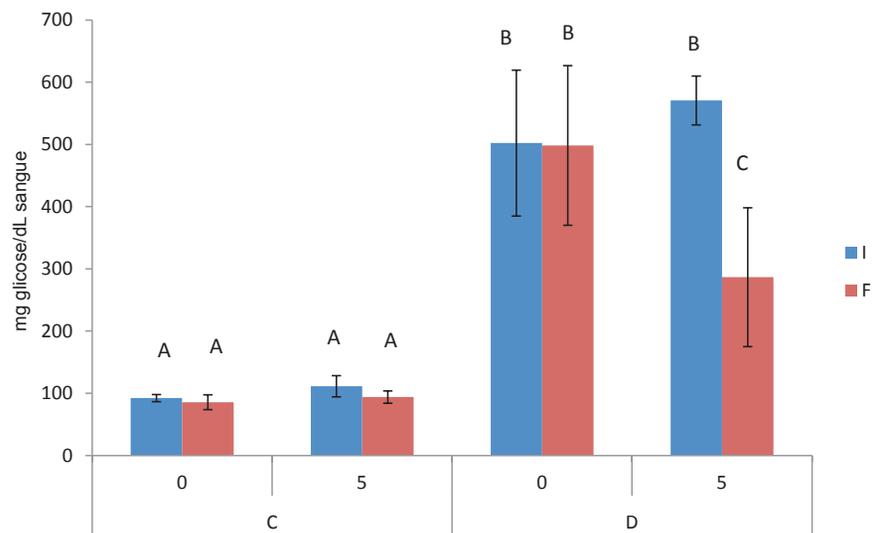
Ao final dos 30 dias do experimento, os animais diabéticos tiveram uma tendência de perda de peso, sendo esta significativa somente no grupo diabético irradiado ( $p < 0,05$ ; Figura 1). A ingestão de ração e o consumo de água apresentaram um aumento significativo para os grupos D0 e D5 quando comparados, respectivamente, com os grupos C0 e C5 ( $p < 0,05$ ; Tabela 1).

Os animais dos grupos D0 e D5 apresentaram uma média de glicemia de diagnóstico de 502,10 mg e 570,60 mg de glicose por dL de sangue, respectivamente, e os animais dos grupos C0 e C5, de 92,2 mg e 111,25 mg de glicose por dL

**Tabela 1** | Médias e desvio padrão da ingestão de ração (g/semana) e do consumo de água (mL/semana) para os diferentes grupos. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa dentro das linhas ( $p < 0,05$ ).

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

**Figura 2** | Glicemia inicial (diagnóstico) e final (sacrifício; em jejum) para os diferentes grupos. As colunas representam os valores médios e as barras o desvio padrão. As letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes grupos (C0, C5, D0 e D5) e tempos experimentais (inicial e final; C0, n = 10; C5, n = 8; D0, n = 10; D5, n = 10).



de sangue, respectivamente. A glicemia aferida no dia de sacrifício, entretanto, foi de 498,30 mg e 286,54 mg de glicose por dL de sangue para os grupos D0 e D5, respectivamente, e de 85,60 mg e 93,87 mg de glicose por dL de sangue para os grupos C0 e C5, respectivamente. No grupo D5, houve uma diminuição significativa na glicemia final quando comparada com sua respectiva glicemia inicial ( $p < 0,05$ ; Figura 2).

Em relação à concentração de IGF-1, observamos que, em glândulas salivares parótidas e submandibulares, não foram vistas diferenças estatisticamente significantes entre os animais dos grupos controle e diabetes (dados não mostrados), independentemente do grupo de irradiação ao qual pertenciam. Porém, ao se comparar a concentração de IGF-1 nas glândulas parótidas e submandibulares na mesma condição sistêmica (controle ou diabetes), foi observado um aumento na concentração

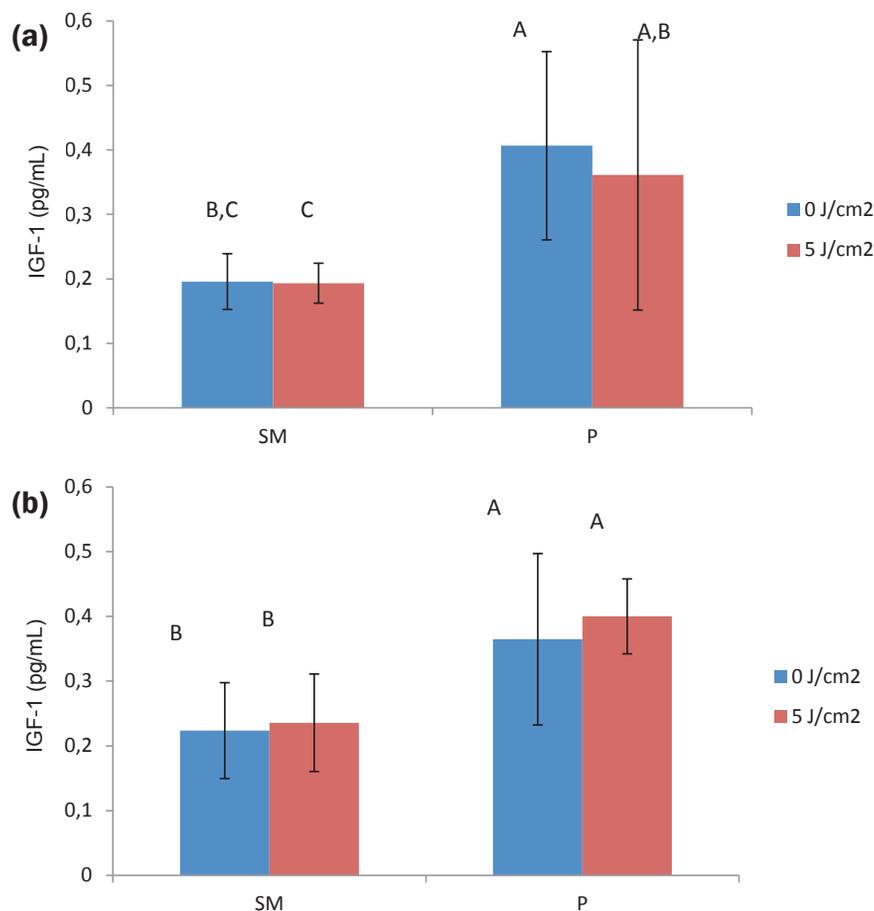
de IGF-1 para as glândulas parótidas em comparação com as glândulas submandibulares ( $p < 0,05$ ; Figura 3a e 3b, respectivamente para animais controles e diabéticos).

## DISCUSSÃO

Como a LPT tem demonstrado efeito sobre a glicemia dos animais diabéticos<sup>11,13</sup> e sobre a concentração do IGF-1 em alguns tecidos, além de este estar relacionado com a homeostase da concentração de glicose, o presente estudo teve como objetivo analisar a concentração de IGF-1 nas glândulas parótidas e submandibulares de animais controles e diabéticos que receberam ou não a laserterapia.

A perda de peso observada nos animais diabéticos, além do aumento na ingestão de ração e água, condiz com a literatura que afirma que perda de peso, fraqueza, polifagia, polidipsia e poliúria são alguns dos sinais e sintomas que caracterizam o

**Figura 3** | Concentração de IGF-1 (pg/mL) das glândulas submandibulares (SM) e parótidas (P) para os animais controles **(a)** e diabéticos **(b)**. As colunas representam os valores médios e as barras, o desvio padrão. As letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as glândulas SM e P que receberam determinada irradiação (0 ou 5 J/cm<sup>2</sup>; C0, n = 8; C5, n = 10; D0, n = 10; D5, n = 10).



diabetes mellitus, sendo este também caracterizado pela hiperglicemia, dado este também encontrado neste trabalho.<sup>6,19-21</sup>

O diabetes experimental induzido quimicamente por estreptozotocina afeta as glândulas salivares, além de outros tecidos, sendo que esta droga age pela destruição das células beta do pâncreas, levando a alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos.<sup>22,23</sup>

As glândulas salivares sofrem inúmeras alterações devido ao diabetes mellitus induzido quimicamente, como, por exemplo, alterações nas atividades do glicogênio, o qual é a principal forma de armazenamento de glicose nos tecidos de mamíferos. Em um estudo de Nicolau *et al.*,<sup>24</sup> foi demonstrado que o diabetes causa um acúmulo de glicogênio nas glândulas parótidas e submandibu-

lares por meio de um aumento da atividade da glicogênio sintase e uma diminuição da atividade da glicogênio fosforilase. Outro estudo demonstrou que a atividade específica da hexoquinase estava aumentada em animais diabéticos, interferindo no metabolismo de carboidratos.<sup>7</sup> Além disso, já foram descritas alterações nas enzimas do sistema antioxidante, e já é de conhecimento que o aumento da glicemia e os excessos de espécies reativas de oxigênio estão associados com as complicações do diabetes.<sup>12,25</sup>

Além dessas alterações descritas anteriormente, já foi observado que o diabetes causa diminuição na atividade da amilase, aumento da peroxidase e catalase, aumento na concentração de malondialdeído, ácido siálico livre e total e redução na concentração de proteína total das glândulas salivares

de animais diabéticos. Além disso, foi observada também a presença de vacúolos lipídicos nas glândulas salivares desses animais, sendo que essas alterações bioquímicas e estruturais podem estar relacionadas à hipofunção das glândulas salivares relacionada ao diabetes.<sup>6-8,10-12,24,25</sup>

Alguns estudos prévios do nosso laboratório objetivaram minimizar os efeitos deletérios do diabetes sobre as glândulas salivares, como o estudo de Leite e Nicolau,<sup>9</sup> que utilizaram o tungstato de sódio, o qual possui propriedades antidiabetogênicas. Nesse estudo, os animais diabéticos receberam um tratamento com tungstato de sódio durante dois tempos experimentais de 2 e 6 semanas, e a glândula parótida foi analisada. Foi observado pelos autores que a glicemia final, do dia da eutanásia, estava diminuída quando comparada com a glicemia inicial (diagnóstico) dos animais que foram tratados por 2 semanas. Observaram-se também uma diminuição da concentração de proteínas totais e um aumento da atividade das enzimas amilase e peroxidase, além de um aumento da concentração de ácido siálico livre e total quando comparadas com as dos animais não diabéticos, sugerindo uma mudança de composição na glândula parótida.<sup>9</sup>

Além do tungstato de sódio, nosso grupo de pesquisa vem estudando o efeito da laserterapia (LPT) sobre as glândulas salivares de animais diabéticos induzidos por estreptozotocina, assim como o efeito da LPT sobre a concentração da glicemia desses animais. Foi observada uma diminuição da glicemia final, quando comparada com a glicemia inicial, nos animais que receberam irradiação. Além disso, Simões *et al.*<sup>11</sup> observaram uma diminuição dos vacúolos lipídicos nas glândulas salivares parótidas, sugerindo uma possível alternativa para auxiliar no tratamento da hipofunção das glândulas salivares causadas pelo diabetes.<sup>11</sup>

Uma vez que em glândulas salivares foi observada a presença de IGF-1, que é sintetizado nas cé-

lulas acinares, especialmente na região dos ductos secretores, em humanos e roedores,<sup>26-28</sup> e que em outros tecidos já foi observado que a LPT pode estimular a produção de IGF-1,<sup>29-31</sup> este trabalho foi o primeiro a analisar se a irradiação com laser de baixa potência é capaz de alterar a concentração de IGF-1 nas glândulas salivares, o que poderia estar relacionado com a diminuição da glicemia observada nos animais irradiados.

Nossos dados claramente mostram a presença de IGF-1 nas glândulas salivares de animais diabéticos e não diabéticos, tanto nas submandibulares quanto nas parótidas; porém, os animais irradiados não apresentaram alteração na concentração de IGF-1, muito embora a glicemia de sacrifício tenha diminuído em relação à glicemia de diagnóstico, após a irradiação, como também observado por Simões *et al.*<sup>11</sup> e Ibuki *et al.*<sup>13</sup>

Sabe-se que os parâmetros de irradiação influenciam os resultados apresentados; dessa forma, outros estudos com LPT, IGF-1, glicemia e outros fatores relacionados com a hiperglicemia são importantes para que possamos entender como a laserterapia age na concentração da glicemia, e para gerar um consenso sobre os parâmetros adequados para a utilização da laserterapia como auxiliar no tratamento das complicações do diabetes.

Com base nos dados obtidos, podemos concluir que a alteração da glicemia dos animais diabéticos irradiados com laser de baixa potência parece não ter relação com a concentração de IGF-1 nas glândulas salivares parótidas e submandibulares, dentro do protocolo utilizado neste estudo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo 2011/14013-1) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

## REFERÊNCIAS

- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003 Jan;26 Suppl 1:S5-20.
- Centers for Disease Control and Federation. IDF Diabetes atlas. 6th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2013 [cited 2013 Mar. 14]. Available from: <http://www.idf.org/diabetesatlas>.
- 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.
- Greenspa FS, Gardner DG, editors. Basic and clinical endocrinology. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2007.
- Negrato CA, Tarzia O. Buccal alterations in diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr*. 2010 Jan 15;2:3. doi: 10.1186/1758-5996-2-3.
- 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.
- Nogueira FN, Santos MF, Nicolau J. Influence of streptozotocin-induced diabetes on hexokinase activity of rat salivary glands. *J Physiol Biochem*. 2005 Sep;61(3):421-7.
- Nicolau J, Souza DN, Nogueira FN. Activity, distribution and regulation of phosphofructokinase in salivary gland of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Braz Oral Res*. 2006 Apr-Jun;20(2):108-13.
- Leite MF, Nicolau J. Sodium tungstate on some biochemical parameters of the parotid salivary gland of streptozotocin-induced diabetic rats: a short-term study. *Biol Trace Elem Res*. 2009 Feb;127(2):154-63. doi: 10.1007/s12011-008-8233-5. Epub 2008 Sep 20.
- Nicolau J, De Souza DN, Simões A. Alteration of Ca(2+)-ATPase activity in the homogenate, plasma membrane and microsomes of the salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct*. 2009 Apr;27(3):128-34. doi: 10.1002/cbf.1544.
- Simões A, de Oliveira E, Campos L, Nicolau J. Ionic and histological studies of salivary glands in rats with diabetes and their glycemic state after laser irradiation. *Photomed Laser Surg*. 2009 Dec;27(6):877-83. doi: 10.1089/pho.2008.2452.
- Ibuki FK, Simões A, Nogueira FN. Antioxidant enzymatic defense in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats: a temporal study. *Cell Biochem Funct*. 2010 Aug;28(6):503-8. doi: 10.1002/cbf.1683.
- Ibuki FK, Simões A, Nicolau J, Nogueira FN. Laser irradiation affects enzymatic antioxidant system of streptozotocin-induced diabetic rats. *Lasers Med Sci*. 2013 May;28(3):911-8. doi: 10.1007/s10103-012-1173-5. Epub 2012 Aug 7.
- Joshi S, Ogawa H, Burke GT, Tseng LY, Rechler MM, Katsoyannis PG. Structural features involved in the biological activity of insulin and the insulin-like growth factors: A27 insulin/BIGF-I. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985 Dec 17;133(2):423-9.
- Kerr M, Lee A, Wang PL, Purushotham KR, Chegini N, Yamamoto H, et al. Detection of insulin and insulin-like growth factors I and II in saliva and potential synthesis in the salivary glands of mice. Effects of type 1 diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol*. 1995 May 17;49(10):1521-31.
- Rocha EM, de M Lima MH, Carvalho CR, Saad MJ, Velloso LA. Characterization of the insulin-signaling pathway in lacrimal and salivary glands of rats. *Curr Eye Res*. 2000 Nov;21(5):833-42.
- Amano O, Iseki S. Expression and localization of cell growth factors in the salivary gland: a review. *Kaibogaku Zasshi*. 2001 Apr;76(2):201-12. Japanese.
- Okada T, Liew CW, Hu J, Hinault C, Michael MD, Krtzfeldt J, et al. Insulin receptors in beta-cells are critical for islet compensatory growth response to insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 22;104(21):8977-82. Epub 2007 Apr 6.
- Anderson LC. Parotid gland function in streptozotocin-diabetic rats. *J Dent Res*. 1987 Feb;66(2):425-9.
- 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.
- 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.
- Ashcroft FM, Rorsman P. Diabetes mellitus and the  $\beta$  cell: the last ten years. *Cell*. 2012 Mar 16;148(6):1160-71. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.010. Review.
- King AJ. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*. 2012 Jun;166(3):877-94. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x.
- 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.
25. Simões A, Ganzerla E, Yamaguti PM, de Paula Eduardo C, Nicolau J. Effect of diode laser on enzymatic activity of parotid glands of diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2009 Jul;24(4):591-6. doi: 10.1007/s10103-008-0619-2. Epub 2008 Nov 4.
  26. Shubnikova EA, Volkova EF, Printseva OYa. Submandibular glands as organs of synthesis and accumulation of insulin-like protein. *Acta Histochem.* 1984;74(2):157-71.
  27. Patel DG, Begum N, Smith PH. Insulin-like material in parotid and submaxillary salivary glands of normal and diabetic adult male mice. *Diabetes.* 1986 Jul;35(7):753-8.
  28. Murakami K, Taniguchi H, Baba S. Presence of insulin-like immunoreactivity and its biosynthesis in rat and human parotid gland. *Diabetologia.* 1982 May;22(5):358-61.
  29. Luo L, Sun Z, Zhang L, Li X, Dong Y, Liu TC. Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF- $\beta$ 1 in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci.* 2013 May;28(3):725-34. doi: 10.1007/s10103-012-1133-0. Epub 2012 Jun 20.
  30. Shimizu N, Mayahara K, Kiyosaki T, Yamaguchi A, Ozawa Y, Abiko Y. Low-intensity laser irradiation stimulates bone nodule formation via insulin-like growth factor-I expression in rat calvarial cells. *Lasers Surg Med.* 2007 Jul;39(6):551-9.
  31. Fujimoto K, Kiyosaki T, Mitsui N, Mayahara K, Omasa S, Suzuki N, et al. Low-intensity laser irradiation stimulates mineralization via increased BMPs in MC3T3-E1 cells. *Lasers Surg Med.* 2010 Aug;42(6):519-26. doi: 10.1002/lsm.20880.