

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIAGNÓSTICO SALIVAR DE DIABETES MELLITUS UTILIZANDO
ESPECTROSCOPIA DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA NO
INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (ATR-FTIR)

DOUGLAS CARVALHO CAIXETA

UBERLÂNDIA – MG

2018

DOUGLAS CARVALHO CAIXETA

**DIAGNÓSTICO SALIVAR DE DIABETES MELLITUS UTILIZANDO
ESPECTROSCOPIA DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA NO
INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (ATR-FTIR)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Robinson Sabino da Silva

Co-orientador: Foued Salmen Espindola

UBERLÂNDIA – MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C138d Caixeta, Douglas Carvalho, 1992
2018 Diagnóstico salivar de Diabetes mellitus utilizando espectroscopia
de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier
(ATR-FTIR) / Douglas Carvalho Caixeta. - 2018.
64 f : il.

Orientador: Robinson Sabino da Silva.
Coorientador: Foued Salmen Espindola.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.707>
Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Diabetes - Teses. 3. Saliva - Teses. 4.
Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - Teses. I.
Silva, Robinson Sabino da. II. Espindola, Foued Salmen. III.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Douglas Carvalho Caixeta

**DIAGNÓSTICO SALIVAR DE DIABETES MELLITUS UTILIZANDO
ESPECTROSCOPIA DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA NO
INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (ATR-FTIR)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Aprovado em 15 de fevereiro de 2018.

Banca Examinadora

Presidente da Banca: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva – Universidade Federal de Uberlândia

Titular: Profa. Dra. Renata Roland Teixeira – Universidade Federal de Uberlândia

Titular: Profa. Dra. Denise Maria Zezell – Universidade de São Paulo

*À minha família por toda a dedicação, esforço
e apoio á minha formação profissional*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sebastião e Gizelda, e à minha irmã, Nayara, pelo aprendizado e incentivo em todos esses anos. Sou grato pelo carinho, amor, compreensão, amizade, conselhos e apoio. À eles dedico este trabalho, pois essa conquista é nossa!

Ao Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva pela orientação, paciência e inúmeros aprendizados adquiridos nestes dois anos de pós-graduação, que sem dúvida me proporcionaram um amadurecimento científico.

Ao Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, pela co-orientação e por nunca ter fechado as portas do laboratório, o qual tive a oportunidade de iniciar a minha jornada como pesquisador.

À Profa. Dra. Renata Roland Teixeira pelas parcerias em projetos, conselhos e palavras de apoio.

Aos amigos e integrantes do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Adriele V. Souza, Danielle D. Vilela, Leonardo G. Peixoto, Heitor C. G. Silva, Allison B. Justino, Júlia Q. Siqueira e Rodrigo R. Franco pelo aprendizado, companheirismo e trabalho em equipe. Obrigado pela amizade, momentos de risadas e descontração que possibilitaram que a convivência e a rotina no laboratório fosse a melhor.

Às companheiras de trabalho Léia C. Souza e Emília M. G. Aguiar pelo aprendizado e ajuda no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos demais membros dos laboratórios que tiveram participação direta ou indiretamente na minha formação.

Aos meus amigos, Manoela, Iara, Ana Luiza, Ianna e Paulo César, pela amizade, apoio e conselhos. Agradeço por estarem presentes na minha vida desde a graduação.

Ao meu amigo Matheus que sempre me incentivou a superar cada momento de questionamento e dificuldade. Agradeço pela sua amizade e companheirismo.

Aos meus amigos de longa data, Guilherme, Emmanuela, Michele, Camila e Éden. Agradeço pelo carinho, união e alegria. Vocês são minhas referências.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas, Instituto de Biotecnologia e ao Centro de Pesquisa de Biomecânica, Biomateriais e Biologia Celular pela infraestrutura para realização das pesquisas.

À CNPq e a FAPEMIG pelo incentivo financeiro para o desenvolvimento do projeto e a CAPES pela concessão da bolsa.

*“Todo caminho é o caminho certo. Tudo poderia ter sido
qualquer outra coisa e teria sido igualmente importante”*

Mr. Nobody

RESUMO

Introdução: Atualmente o diagnóstico do diabetes é realizado por procedimento invasivo, dolorido e de custo alto. Consequentemente a busca por um método diagnóstico mais barato (sem utilização de reagentes), não-invasivo e específico ao diabetes é de grande interesse. **Objetivo:** Esta pesquisa investigou a aplicação da espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) em amostras de saliva como alternativa para o diagnóstico de DM. **Materiais e métodos:** Ratos Wistar foram divididos em: não-diabético (ND), diabético (D) e diabético tratado com 6U de insulina (D6U). O DM foi induzido por uma injeção intraperitoneal (60 mg / kg) de estreptozotocina (STZ). Vinte e um dias após a indução do diabetes foi iniciado o tratamento, que ocorreu durante 7 dias, com insulina ou veículo. O peso corporal, a ingestão alimentar e hídrica, glicemia, volume urinário e concentração de glicose na urina foram avaliados durante o experimento. O perfil salivar foi analisado por espectroscopia ATR-FTIR e os modos vibracionais foram avaliados quanto à capacidade diagnóstica pela curva ROC. **Resultados:** Foram identificados treze modos vibracionais dos espectros da saliva de animais ND, D e D6U, e destes, 4 modos vibracionais foram pré-validados como potenciais biomarcadores para diagnóstico pela curva ROC e significativa correlação com a glicemia. Em comparação com o espectro ND, os modos vibracionais 1377 cm^{-1} , 1255 cm^{-1} , 628 cm^{-1} e 616 cm^{-1} de animais D apresentaram uma sensibilidade e especificidade de 100% ($p < 0.001$). Além disso, os biomarcadores espectrais 1255 cm^{-1} e 628 cm^{-1} demonstraram uma alta correlação com a glicemia (r de 0,84 e 0,8595, respectivamente). **Conclusão:** Dessa forma, os espectros salivares 1255 cm^{-1} e 628 cm^{-1} podem ser utilizados como uma nova alternativa para o diagnóstico de diabetes.

Palavras chave: Diabetes, saliva, ATR-FTIR, biomarcador e diagnóstico

ABSTRACT

Introduction: Monitoring of blood glucose is an invasive, painful and costly procedure in diabetes. Consequently, the search for more a cost-effective (reagent-free), non-invasive and specific diabetes diagnostic method is of great interest. **Objective:** This research investigated the application of ATR-FTIR spectroscopy as an alternative for the diagnosis of DM by quantitative salivary spectrum analysis. **Material and methods:** Wistar rats were divided in non-diabetic (ND), diabetic (D) and diabetic 6U-treated of insulin (D6U). DM was induced by an intraperitoneal injection (60 mg/kg) of streptozotocin (STZ). The animals were submitted to 28 days of diabetes, and on the 21st day, the treatment was started for 7 days with insulin or vehicle solution according to the group. Body weight, food and water intake, glycemia, urinary volume and urine concentration of urine were evaluated during the experiment. The salivary profile was analyzed by ATR-FTIR spectroscopy and the vibrational modes were evaluated for diagnostic ability by ROC curve. **Results:** Thirteen vibrational modes of saliva spectra of ND, D and D6U were identified, and of these, four vibrational modes were pre-validated as potential biomarkers for diagnosis by the ROC curve, with a significant correlation with glycemia. Compared to the ND, 1377 cm^{-1} , 1255 cm^{-1} , 628 cm^{-1} and 616 cm^{-1} bands of D rats gave a sensitivity and specificity of 100% ($p < 0.001$). In addition, the spectral biomarkers 1255 cm^{-1} and 628 cm^{-1} demonstrated a high correlation with glycemia (R^2 of 0.84 and 0.8595, respectively). **Conclusion:** Altogether, 1255 cm^{-1} and 628 cm^{-1} spectral salivary biomarkers may provide a novel robust alternative for diabetes diagnostics.

Keywords: Diabetes, saliva, ATR-FTIR, biomarkers and diagnosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estimativa de diabetes mellitus em 2017	17
Figura 2. Esquema de funcionamento do espectrofotômetro FTIR.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Representação da quantidade média de alguns componentes presentes na saliva e sangue.....	22
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADA	Associação Americana de Diabetes
AGEs	Produtos finais da glicação avançada
AMPc	Adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico
ATR	Reflexão total atenuada
ATR-FTIR	Espectroscopia de Reflexão Total Atenuada no Infravermelho com Transformada de Fourier
Curva ROC	<i>Receiver operator characteristic curve</i>
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GAD 65	Antidescarboxilase do ácido glutâmico
HbA1c	Hemoglobina glicada
IR	Espectroscopia de infravermelho
LADA	<i>Latent autoimmune diabetes in adults</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PKA	Proteína quinase A
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SGLT1	Cotransportadores de Na ⁺ /glicose/água tipo 1
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
TOTG	Teste Oral de Tolerância a Glicose
Znt 1A	Antitransportador de zinco

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Fundamentação Teórica.....	17
2.1 Diabetes Mellitus.....	17
2.2 Glândulas Salivares e Secreção Salivar.....	20
2.3 Diabetes Mellitus e Complicações Orais.....	24
2.4 Saliva como Fluido Diagnóstico.....	25
2.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....	27
3. Objetivo.....	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4. Artigo.....	32
5. Referências Bibliográficas.....	55

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica que acomete milhões de pessoas e apresenta proporções epidêmicas em todo o mundo, incluindo o Brasil. Dessa forma, torna-se necessário implementar políticas de saúde pública que visem a prevenção, monitoramento e diagnóstico precoce do DM (Maia & Araújo, 2004). O DM é definido como uma síndrome metabólica resultante de uma insuficiente secreção e/ou de uma reduzida ação da insulina nos tecidos periféricos e consequentemente estado hiperglicêmico (Ashcroft e Rorsman, 2012).

O monitoramento frequente da glicemia é fundamental para o controle glicêmico em indivíduos diabéticos, no entanto, o número de mensurações ainda é insuficiente. Em parte, isto ocorre devido a presença de dor no momento da mensuração, a presença de calos e diminuição da circulação sanguínea nos dedos (local frequente da retirada do sangue) pela utilização dos testes atuais para medidas glicêmicas. Devido a esses inconvenientes associado a característica de ser um exame invasivo, a média de medidas glicêmicas é de duas vezes por dia, o que é abaixo dos 4-7 monitoramentos recomendados. Em virtude da frequente redução no número de medidas de glicemia diárias, a glicose plasmática não constitui um parâmetro totalmente eficiente para o controle da glicemia durante um intervalo prolongado de tempo (Fullerton *et al.*, 2014). Dessa forma, a utilização de amostras de sangue para o monitoramento do controle glicêmico dificulta um controle adequado, o que demonstra a necessidade de novas abordagens não invasivas para detecção e monitoramento desta doença endócrina.

Uma alternativa é a utilização da saliva como fluído diagnóstico, uma vez que ela pode indicar alterações sistêmicas, sendo um substituto do sangue em testes laboratoriais para diversas patologias (Rathnayake *et al.*, 2013). A saliva é formada principalmente pelas glândulas salivares e é considerada um fluido fundamental para a manutenção da saúde oral. A secreção salivar é controlada pelo sistema nervoso autônomo (SNA), por um arco reflexo formado pela via aferente (estímulo mecânico da mastigação e químico da gustação e olfação) e

eferente (simpático e parassimpático), além disso, este arco reflexo também pode receber atuação do sistema nervoso central (Pedersen *et al.*, 2002).

Com os avanços das ciências ômicas (genômica, proteômica, transcriptômica, metabolômica) integrado às técnicas quantitativas na biologia de sistemas tem-se configurado plataformas importantes para a descoberta de biomarcadores para diversas doenças. Alguns metabólitos, proteínas e peptídeos foram encontrados e podem ser utilizados para investigação dos mecanismos moleculares, diagnóstico e monitoramento do DM (Rao *et al.*, 2009).

Os biomarcadores salivares com potencial diagnóstico para o diabetes podem ser avaliados considerando a sua sensibilidade, especificidade e valores preditivos em relação à glicemia de jejum, teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e os níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) (Takada *et al.*, 2013). Assim, a utilização da saliva como fluido de diagnóstico é um campo crescente para realizar o diagnóstico de doenças orais e sistêmicas, como o DM.

O estabelecimento de métodos de diagnóstico não invasivo, indolor e rápido por meio da saliva poderia reduzir as complicações do DM. Atualmente ainda não foi demonstrado nenhum biomarcador robusto de DM que tenha sido validado para utilização na clínica. Sendo assim, uma alternativa é através de técnicas espectroscópicas, como a Espectroscopia de Reflexão Total Atenuada no Infravermelho com Transformada de Fourier (ATR-FTIR). Dessa forma, o uso da saliva como monitoramento do DM reduziria as complicações da patologia e aumentaria o número de medidas de controle glicêmico que poderiam ser usadas pelo médico para prescrição mais eficiente no tratamento da população diabética.

No presente estudo, nossa hipótese foi identificar se os modos de vibracionais diferencialmente expressos podem servir como biomarcadores salivares para detecção de diabetes mellitus. Portanto, o objetivo do nosso estudo foi indicar quais os modos vibratórios analisados na saliva por espectroscopia ATR-FTIR que são adequados para diagnóstico do diabetes. Para isso, o perfil salivar não diabético, diabético e diabético tratado com insulina foram avaliados quantitativamente, bem como a capacidade de diagnóstico dos modos vibracionais da saliva.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus (DM) é uma doença endócrina caracterizada por um déficit na produção e/ou ação da insulina associado com hiperglicemia inapropriada. Uma situação de hiperglicemia crônica, ocasionada pelo DM, pode acarretar distúrbios e alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios (Zheng *et al.*, 2017). O DM é uma doença crônica grave que acomete milhões de pessoas e apresenta proporções epidêmicas em todo o mundo, incluindo o Brasil. Segundo a Federação Internacional de Diabetes, o DM afeta atualmente cerca de 425 milhões de pessoas em todo o mundo e estima-se que 212 milhões de pessoas não foram ainda diagnosticadas. No Brasil são 12,4 milhões de pessoas diagnosticadas com DM. Além disso, o número da população mundial de diabéticos pode aumentar para 629 milhões em 2040, se nenhum esforço for realizado para diminuir e/ou controlar esse aumento (IDF, 2017). A prevalência de DM é crescente e decorrente do aumento do envelhecimento populacional, sedentarismo, obesidade, maior urbanização e sobrevida dos pacientes diabéticos (Shaw *et al.*, 2010). As estimativas e projeções da prevalência de DM em nível nacional e mundial são fundamentais para desenvolver estratégias de prevenção e tratamento com a finalidade de diminuir o crescimento dessa síndrome metabólica (Asif, 2014).

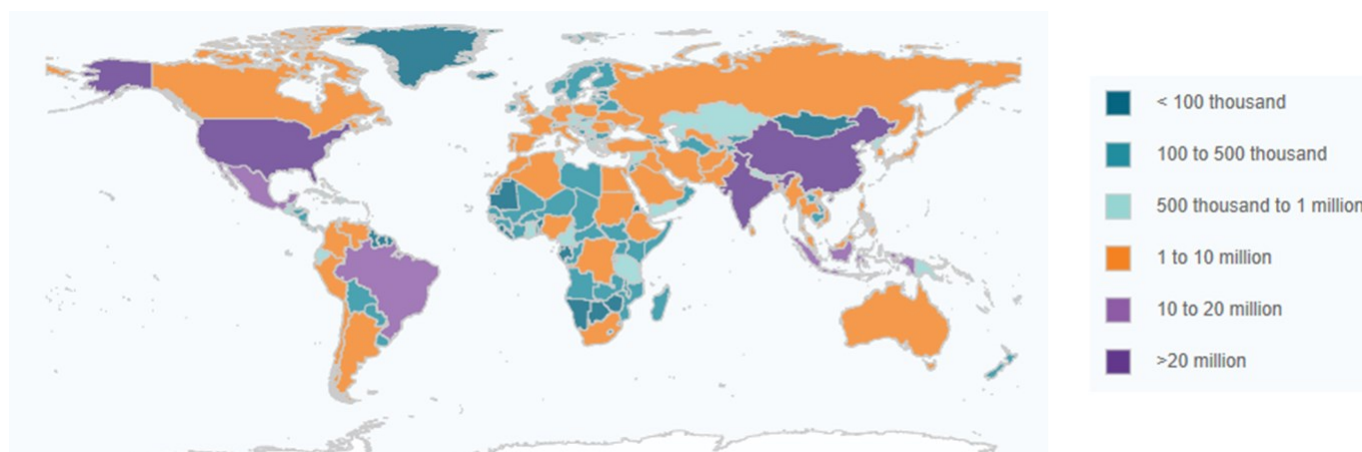


Figura 1. Estimativa de diabetes mellitus em 2017 (IDF, 2017).

A classificação do DM é baseada em sua etiologia e foi proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA). Atualmente são reconhecidas quatro classes clínicas de DM: diabetes tipo 1 (DM1) que é subdividido em autoimune e idiopático, diabetes tipo 2 (DM2), diabetes gestacional e tipos específicos de DM por outras causas (ADA, 2017).

O DM1 é uma desordem que surge após a destruição autoimune das células beta-pancreáticas produtoras de insulina e atinge cerca de 5% dos pacientes diabéticos (Atkinson e Eisenbarth, 2001). A taxa de destruição das células beta-pancreáticas é variável, sendo, em geral, mais rápida entre as crianças (SBD, 2016). A forma lentamente progressiva ocorre em adultos, a qual se refere como diabetes autoimune latente do adulto (LADA, acrônimo em inglês de *latent autoimmune diabetes in adults*). Os marcadores de autoimunidade são os auto-anticorpos anti-ilhota de Langerhans ou antígenos específicos da ilhota de Langerhans (anti-insulina, antidescarboxilase do ácido glutâmico - GAD 65 -, antitirosina-fosfatases - IA2 e IA2B - e antitransportador de zinco - Znt 1A). Por sua vez, o DM1 idiopático é definido pela ausência de marcadores de autoimunidade contra as células betapancreáticas, sendo poucos os casos classificados como essa etiologia do DM1 (Katsarou *et al.*, 2017).

O DM2 é causado por alterações na ação e secreção da insulina, ocasionando uma resistência à insulina em órgãos alvos periféricos, uma elevada produção de glicose hepática e disfunção dos adipócitos (Groop *et al.*, 1989; Pessin e Saltiel, 2000; DeFronzo, 2004; Pirola *et al.*, 2004). Fatores genéticos e ambientais, como sedentarismo, envelhecimento e dieta rica em gorduras estão associados na ocorrência de DM2 e em sua maioria, o DM2 desenvolve-se de forma progressiva (Kolb e Martin, 2017). Dessa forma, nos estágios iniciais é difícil a realização do diagnóstico, uma vez que não apresenta sintomas específicos (ADA, 2017).

O DM gestacional é uma condição, que pode ser temporária ou não, definida por uma intolerância a glicose e resistência à insulina que é diagnosticada pela primeira vez durante a gravidez (Chen *et al.*, 2015; Adam e Rheeder, 2017). Os altos níveis glicêmicos maternos possuem o risco de desenvolvimento de DM no feto, sendo uma das preocupações durante a gestação (Kim, 2010; Chen *et al.*, 2015). A prevalência de DM gestacional tem

crescido com os anos em virtude do aumento da obesidade, avanço da idade materna e histórico familiar de DM (Adam e Rheeder, 2017) e possui como estimativa de ocorrência de 1 a 14% de todas as gestações (SBD, 2016).

Por sua vez, a classe de outros tipos específicos de DM inclui formas menos comuns de DM desde que as suas causas possam ser identificadas (SBD, 2016). Estão incluídos como causas nessa categoria alguns distúrbios genéticos na função das células beta, alterações genéticas na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, DM induzidos por medicamentos ou agentes químicos e entre outras condições que possam desencadear o DM (ADA, 2017).

O diagnóstico de DM segue as orientações da ADA e da Sociedade Brasileira de Diabetes, e atualmente os critérios para o diagnóstico são: glicemia independente do horário das refeições, maior que 200 mg/dL associada aos sintomas clássicos de diabetes (perda de peso, poliúria e polidipsia); glicemia de jejum maior ou igual a 126 mg/dL; teste de tolerância oral à glicose com glicemia de 2 horas após receber 75g de glicose maior ou igual a 200 mg/dL e teste de hemoglobina glicada (HbA1c) com valores maiores ou igual a 6,5% (ADA, 2017).

O DM apresenta alguns fatores de riscos, como o mau controle metabólico, tabagismo, alcoolismo e hipertensão arterial (Wylie-Rosett *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2014). Após o estabelecimento do DM, ocorre algumas complicações que podem ser agudas e crônicas. Dentre as complicações agudas destacam-se a hipoglicemia, o estado hiperglicêmico hiperosmolar e a cetoacidose diabética (Umpierrez e Korytkowski, 2016). As complicações crônicas geralmente ocorrem pelas alterações na microcirculação e macrocirculação decorrentes do DM, podendo desenvolver retinopatia, nefropatia, neuropatia, cardiopatia isquêmica, doenças cerebrovasculares e complicações neurológicas (Fullerton *et al.*, 2014; Gibbons e Freeman, 2015; Naito e Kasai, 2015; Srinivasan *et al.*, 2017; Winocour, 2017). Além disso, em indivíduos com DM de longa duração e estado glicêmico mal controlado, a glicose pode interagir em excesso com proteínas plasmáticas por meio de ligações covalentes em uma reação não-enzimática (glicação) (Kalousova e Zima, 2014; Singh *et al.*, 2014). Este processo juntamente com os produtos finais da glicação avançada (AGEs) também desempenham importante papel nas complicações do DM (Ahmed, 2005; Sato *et al.*, 2006). Estas complicações estão

associadas com a elevada morbidade e mortalidade de indivíduos diabéticos, bem como a alto custo à saúde pública (Bhowmick *et al.*, 2005; Umpierrez *et al.*, 2011; Zhuo *et al.*, 2013; Kruljac *et al.*, 2017).

O custo com DM é elevado devido a grande quantidade de recursos aplicada para o sistema de saúde e para previdência social decorrentes das complicações desta doença (Logminiene *et al.*, 2004). Diante disso, o Ministério da Saúde vêm adotando algumas estratégias e ações para reduzir os gastos dessa doença metabólica na população brasileira. Os custos com DM podem variar entre 2,5 e 15% do orçamento anual da saúde de um país, dependendo da sua prevalência e do grau de complexidade do tratamento disponível (Torquato *et al.*, 2003). As despesas do Brasil com o tratamento ambulatorial dos pacientes diabéticos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) é de US\$ 2.108,00 por paciente, dos quais US\$ 1.335,00 estão relacionados a custos diretos (Bahia *et al.*, 2011). Levando em consideração o DM como diagnóstico principal, o custo anual é de aproximadamente R\$ 40,3 milhões, sendo 91% decorrentes de internações hospitalares (SBD, 2016).

Apesar dos avanços sobre o entendimento da fisiopatologia do DM, a perda do controle glicêmico em indivíduos diabéticos representa o principal fator de risco para o desenvolvimento das complicações dessa patologia. Dessa forma, acreditamos que as pesquisas relacionadas com o monitoramento e diagnóstico precoce da doença são relevantes para diminuir as complicações tardias do DM, reduzir os custos para os sistemas de saúde e melhorar a qualidade de vida dos pacientes diabéticos.

2.2 GLÂNDULAS SALIVARES E SECREÇÃO SALIVAR

As principais glândulas salivares incluem as glândulas parótidas, localizadas próximas aos primeiros molares superiores, e as glândulas submandibulares e sublinguais, que são encontradas entre o tecido conjuntivo na base da boca e atrás da inserção do músculo milo-hioideo. Além disso, existem glândulas salivares menores que são encontradas no lábio inferior, língua, palato, bochechas e faringe (Humphrey e Williamson, 2001; De Paula *et al.*, 2017). As principais glândulas salivares são responsáveis por cerca de 90%

da secreção salivar, enquanto que as glândulas salivares menores, fluido crevicular gengival, compostos derivados do sangue e refluxo gastrointestinal representam cerca de 10% da composição final de saliva (Dodds *et al.*, 2005; Holmberg e Hoffman, 2014).

Nas glândulas salivares são encontrados células acinosas, células do sistema ductal e células mioepiteliais. As células acinosas determinam o tipo de secreção salivar produzida pelas diferentes glândulas salivares, que podem ser serosa, mucosa ou mista. A secreção serosa (aquosa e menos viscosa) é produzida pelas glândulas parótidas, as glândulas sublinguais secretam saliva mucosa (secreção enriquecida de mucinas), enquanto que as glândulas submandibulares secretam uma saliva mista (mucoserosa) em humanos (Veerman *et al.*, 1996; Humphrey e Williamson, 2001).

A secreção salivar é controlada pelo sistema nervoso autônomo (SNA). Sob o estímulo do SNA simpático, a secreção da saliva torna-se mais viscosa e rica em proteínas, porém em menor volume, enquanto que sob estímulo do SNA parassimpático o fluxo salivar é aumentado (Pedersen *et al.*, 2002; Obayashi, 2013).

A estimulação pelo SNA parassimpático, e consequentemente liberação de acetilcolina promove, a ativação de receptores colinérgicos muscarínicos M3 e M1, desencadeando uma cascata de sinalização com liberação intracelular de Ca^{2+} pelos retículos endoplasmáticos das células acinosas. O aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular induz a abertura dos canais de Cl^- na membrana apical e consequente secreção de Cl^- no lúmen. A secreção de Na^+ e Cl^- cria um gradiente osmótico através dos ácinos, permitindo a passagem de água para o lúmen com o auxílio dos transportadores de água denominados Aquaporina 5. Este gradiente osmótico também permite o fluxo de água pela via paracelular. Desse modo, a saliva inicial secretada no lúmen (saliva primária - rica em Na^+ , Cl^- e água) consiste em um fluido isotônico em relação ao sangue (estágio 1). Esta saliva primária é modificada durante a sua passagem ao longo do epitélio ductal, onde a maioria do Na^+ e Cl^- é reabsorvido, enquanto que o K^+ e HCO_3^- é secretado (estágio 2). Desse modo, devido o epitélio ductal ser pouco permeável à água em situações fisiológicas (pode ocorrer transporte por Aquaporinas 4 e cotransportadores de Na^+ /glicose/água tipo 1 - SGLT1), a saliva final é hipotônica em relação ao sangue. A saliva final possui constituintes

inorgânicos os quais incluem principalmente Na^+ , Cl^- , HCO_3^- , K^+ e, em menor quantidade, Ca^{2+} , Mg^{2+} e fosfato (Dodds *et al.*, 2005; Mese e Matsuo, 2007; Catalan *et al.*, 2009; Carpenter, 2013; Sabino-Silva *et al.*, 2013).

A secreção de saliva sob o estímulo do SNA simpático, ocorre pela interação da noradrenalina e/ou adrenalina via receptores beta-adrenérgicos, o que induz uma reduzida ação dos transportadores aquaporinas 5, dessa forma, menos fluido é secretado. A ativação desses receptores aumenta os níveis intracelulares de adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (AMPc) que ativam proteínas quinases A (PKA), cujos alvos, embora ainda não estão completamente elucidados, sabe-se que o conteúdo liberado compreende uma ampla variedade de proteínas com funções biológicas importantes para a homeostasia da cavidade oral (Vatta *et al.*, 2002; Melvin *et al.*, 2005; Mese e Matsuo, 2007).

A saliva é uma secreção exócrina mucoserosa composta principalmente por água (99%) e uma pequena parte de compostos orgânicos e inorgânicos (1%) (Lima *et al.*, 2010). Sendo assim, a saliva é constituída por água, enzimas, íons, hormônios, lipídeos e diversas proteínas, como amilase, aldolases, mucinas, imunoglobulinas, proteínas ricas em prolina, albumina, fibronectina e cromogranina A (Humphrey e Williamson, 2001; De Almeida Pdel *et al.*, 2008; Denny *et al.*, 2008). Na tabela 1 pode-se observar a concentração de alguns componentes que fazem parte da composição da saliva e do plasma.

Tabela 1. Representação da quantidade média de alguns componentes presentes na saliva e sangue.

	Componentes	Saliva (mM)	Plasma (mM)
Inorgânicos	Ca^{2+}	1 - 2	2.5
	Mg^{2+}	0.2 - 0.5	1.0
	Na^+	6 - 26	140
	K^+	14 - 32	4
	NH_4^+	1 - 7	0.03
	H_2PO_4 & HPO_4^{2-}	2 - 23	2
	Cl^-	17 - 29	103

	HCO ₃ ⁻	2 - 30	27
	F ⁻	0.0005 - 0.005	0.001
	SN ⁻	0.1 - 2.0	—
Orgânicos	Uréia (Adultos)	2 - 6	5
	Uréia (Crianças)	1 - 2	—
	Ácido Úrico	0.2	3
	Aminoácidos	1 - 2	2
	Glicose	0.05	5
	Lactato	0.1	1
	Ácidos Graxos (mg/l)	10	3000
Macromoléculas	Proteínas	1400 - 2000	70000
	Glicoproteínas	110 - 300	1400
	Amilase	380	—
	Lisozima	109	—
	Peroxidase	3	—
	IgA	194	1300
	IgG	14	13000
	IgM	2	1000
	Lipídeos	20 - 30	5500

(Edgar e O'Mullane, 1996)

Estes componentes presentes na composição salivar estão relacionados com as inúmeras funções da saliva, que podem ocorrer tanto pela sua característica fluida como pelos componentes específicos (Pedersen *et al.*, 2002). A limpeza da cavidade oral, formação do bolo alimentar, facilitação da mastigação e deglutição, solubilização de substâncias alimentares, remoção de bactérias e alimentos, lubrificação da mucosa e a facilitação da fala estão relacionadas com as características fluidas da saliva. Já a proteção dos dentes pela neutralização dos ácidos, a ação bactericida e bacteriostática, a manutenção da saturação de fosfato de cálcio relacionada à hidroxiapatita, modulação do pH, processo de desmineralização, remineralização e a participação na formação da película adquirida, são exemplos de funções

relacionadas aos componentes específicos da saliva (Humphrey e Williamson, 2001; Pedersen *et al.*, 2002).

2.3 DIABETES MELLITUS E COMPLICAÇÕES ORAIS

A hiperglicemia crônica promove alterações metabólicas e disfunção em vários órgãos, como pâncreas, fígado, cérebro, rins e glândulas salivares (Pirola *et al.*, 2004; Ashcroft e Rorsman, 2012; Brinkman, 2017). Nas glândulas salivares, o DM causa alterações morfológicas e funcionais que podem resultar em doenças orais (Zalewska *et al.*, 2013; Lilliu *et al.*, 2015). Parte destas alterações observadas ocorrem devido a relação existente entre o DM e as doenças orais causada pela inadequada função salivar em indivíduos diabéticos (Dodds *et al.*, 2005; Carda *et al.*, 2006).

A saliva é essencial para a manutenção da saúde oral e sistêmica (Leite *et al.*, 2013). Este fluido tem papel relevante para digestão, mastigação, gustação, fonação, deglutição e proteção de tecidos mineralizados e mucosos (De Almeida Pdel *et al.*, 2008). A diminuição do fluxo salivar e as alterações na composição da saliva podem causar complicações orais nos indivíduos diabéticos mal controlados, que incluem: xerostomia (Lin *et al.*, 2002), doenças periodontais (Sima e Glogauer, 2013), aumento da incidência e severidade de cáries (Vernillo, 2001), desta forma o DM é provavelmente a doença metabólica que apresenta maiores complicações orais (Lopez-Pintor *et al.*, 2016). O método mais utilizado na clínica para avaliar a disfunção salivar é a sialometria. A hipossalivação é considerada quando os valores do fluxo salivar não estimulado estão abaixo de 0.1 mL/min ou 0.7 mL/min sob estimulação (Borges *et al.*, 2010; Lopez-Pintor *et al.*, 2016).

Diversos trabalhos descrevem diminuição do fluxo salivar em seres humanos e em ratos diabéticos (Moore *et al.*, 2001; Yeh *et al.*, 2012; Tickotsky e Ofran, 2018). A diminuição do fluxo salivar decorrente do DM pode ser devido aos danos no parênquima, matriz extracelular e na microcirculação das glândulas salivares, além da desidratação e a falta de controle glicêmico que podem estar associados na disfunção salivar (Saleh *et al.*, 2015; Lopez-Pintor *et al.*, 2016). A secreção salivar reduzida é observada frequentemente em

situações de DM descompensado. Além disto, a saliva de indivíduos diabéticos, com pobre controle metabólico apresenta comumente níveis elevados da concentração de glicose salivar (Abd-Elraheem *et al.*, 2017).

2.4 SALIVA COMO FLUÍDO DIAGNÓSTICO

Devido ao recente enorme desenvolvimento tecnológico, a capacidade de utilizar a saliva para monitorar a saúde de um paciente apresenta grande potencial para utilização na saúde pública. Desta forma, nos últimos anos ocorreu um grande aumento de estudos focados na capacidade da saliva para refletir o espectro de estados de saúde e doenças. Já foi descrito que a saliva pode refletir níveis teciduais de substâncias fisiológicas e uma grande variedade de moléculas introduzidas no organismo por dependência terapêutica, estados emocionais, hormonais, imunológicos e influências metabólicas e nutricionais (Bandodkar e Wang, 2014; Saxena *et al.*, 2017).

Considerando que os componentes da saliva podem indicar alterações sistêmicas, a saliva pode ser um substituto do sangue em testes laboratoriais para diagnóstico de doenças. Além de contribuir na homeostase da cavidade oral, as proteínas salivares também apresentam grande potencial para serem utilizadas como diagnóstico e monitoramento de doenças (Rathnayake *et al.*, 2013). As proteínas podem mover-se a partir da circulação sanguínea em glândulas salivares através de transporte ativo, difusão passiva ou ultrafiltração. Além disso, outro mecanismo de secreção de proteínas ocorre diretamente pelas glândulas salivares (Melvin *et al.*, 2005). Independente do mecanismo de secreção, estas proteínas podem potencialmente serem utilizadas no desenvolvimento de novos testes de diagnóstico e monitoramento não-invasivos para diversas patologias (Rathnayake *et al.*, 2013).

A saliva é um fluido biológico que pode ser coletado de forma fácil, de forma indolor com desconforto reduzido (não-invasiva), de fácil manipulação e armazenamento, menor risco de contaminação quando comparado ao sangue, não necessita de equipamentos e profissionais especializados para a sua coleta, pode ser coletada com mais frequência, além de ser possível realizar a coleta em praticamente todos os tipos de doenças e faixas etárias (Pfaffe *et al.*, 2011).

A coleta de saliva pode ocorrer de forma não-estimulada com a coleta de forma passiva em algum recipiente adequado. Outra alternativa é a coleta por meio de drenagem da saliva diretamente dos canais de secreção das glândulas salivares. Além disso, a coleta salivar também pode ser realizada pelo método de absorção com o auxílio de materiais absorventes, o mais comum é o algodão, ou polietileno (Navazesh, 1993; Yoshizawa *et al.*, 2013; Chojnowska *et al.*, 2017).

Atualmente não existe um modelo ou um critério uniforme estabelecido para a coleta de saliva, desse modo, o processo de investigação e pesquisa fica restrito pois impede a reprodução de resultados. Desta forma, algumas variações de resultados são encontradas devido a influência do método de coleta na quantificação dos componentes presentes na saliva (Yoshizawa *et al.*, 2013; Chojnowska *et al.*, 2017). Contudo, essa limitação é reduzida em comparação a diversas vantagens do uso da saliva como fluido diagnóstico para diversas patologias. O potencial da saliva para diagnóstico de diversas doenças sistêmicas já foi descrito para câncer de ovário (Lee *et al.*, 2012), câncer de pulmão (Xiao *et al.*, 2012), câncer de mama (Zhang *et al.*, 2010); refluxo gastroesofágico (Dy *et al.*, 2016), malária (Buppan *et al.*, 2010), síndrome de Sjörgen (Baldini *et al.*, 2011), diabetes mellitus (Reznick *et al.*, 2006) e entre outras patologias.

No DM mal controlado está bem estabelecido que ocorre diminuição do fluxo salivar, alteração na expressão de proteínas salivares e aumento dos níveis de glicose presentes na saliva (Rao *et al.*, 2009; Bajaj *et al.*, 2012; Sabino-Silva *et al.*, 2013). A partir desses parâmetros, evidencia-se a possibilidade de utilizar componentes salivares para refletir a presença e a severidade da hiperglicemia (Reznick *et al.*, 2006; Balaji *et al.*, 2017). A correlação da glicemia com a concentração de glicose na saliva ainda não está muito bem estabelecida, por isso não é utilizada para verificar o grau de controle metabólico (Gupta *et al.*, 2015; Kadashetti *et al.*, 2015; Puttaswamy *et al.*, 2017). Gupta *et al.* (2015) observaram que os valores de glicose salivar não podem ser considerados como uma ferramenta de diagnóstico para indivíduos diabéticos, pois apresentaram uma correlação de Pearson não significativa com a glicemia. Outra limitação da utilização da glicose salivar para refletir a glicemia, é a potencial presença de glicose nos alimentos que pode interagir com tecidos da cavidade oral e desta forma alterar a concentração de glicose salivar no momento da coleta. Assim, a

utilização da saliva como fluido de diagnóstico é um campo emergente para identificar potenciais componentes para o diagnóstico de doenças sistêmicas, como o DM.

A utilização de componentes salivares como biomarcadores de DM e de outras patologias, como forma de diagnóstico e monitoramento, geralmente necessita de equipamentos sofisticados, profissionais especializados e maior tempo de execução, pois são realizados por técnicas de *Western blotting* e ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Entretanto, o desenvolvimento de plataformas diagnósticas utilizando análises espectroscópicas pode ser uma excelente alternativa para o diagnóstico rápido, de baixo custo e não invasivo do DM.

2.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Define-se como espectroscopia o conjunto de técnicas de análise que utilizam a interação da radiação eletromagnética com a matéria com a finalidade de obter informações físicas e químicas de determinado material ou amostra biológica (Barth, 2007). Quando a luz (ou um fóton) interage com uma molécula, ela pode ser espalhada elasticamente ou inelasticamente. Quando o fóton perde ou ganha uma quantidade de energia relacionada ao espaçamento de energia vibracional na molécula, pode ser detectado por aparelhos espectroscópicos, incluindo a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Assim, a absorção de luz na região infravermelho do espectro eletromagnético proporciona um espectro correspondente aos modos vibracionais específicos que são exclusivos de cada estrutura molecular avaliada (Bunaciu *et al.*, 2017). A vibração dos átomos no interior de uma molécula apresenta energia compatível com a região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho, sendo por isso utilizada em estudos de modos vibracionais de materiais e amostras biológicas na espectroscopia de absorção no infravermelho, pois cada componente apresenta uma assinatura específica no espectro (Severcan *et al.*, 2010).

Atualmente os espectrofotômetros de absorção no infravermelho possuem em sua óptica o interferômetro de Michelson, o que permite uma melhor resolução e qualidade do espectro promovendo incremento da razão sinal/ruído e maior velocidade de varredura e aquisição dos espectros (Al-Saeed e Khalil, 2012).

No interferômetro de Michelson, um *beamsplitter* divide o feixe de radiação infravermelha em dois e direciona parte destes a um espelho fixo e o outro para um espelho móvel. Após a reflexão nos espelhos, ambos os feixes voltam a se combinar e atingem a amostra (Al-Saeed e Khalil, 2009; 2012). A Figura 2 demonstra um esquema de funcionamento do espectrofotômetro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier. A radiação emitida por uma fonte no infravermelho passa por um interferômetro antes de incidir na amostra. A radiação não absorvida pela amostra incide em um detector, e é gerado um interferograma que mostra a intensidade da radiação detectada em função do deslocamento do espelho móvel. O processamento de dados usados no FTIR segue a lei de Bouguer-Beer-Lambert, ou simplesmente lei de Beer, relacionando a intensidade da banda à sua concentração (Khaustova *et al.*, 2010).

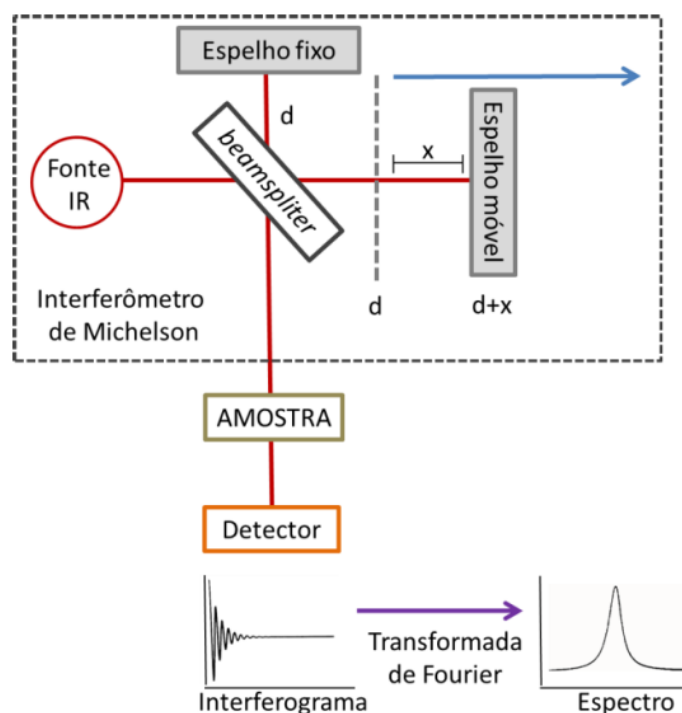


Figura 2. Esquema de funcionamento de um espectrofotômetro FTIR (Benetti, 2014).

A configuração do aparelho para aquisição dos espectros FTIR pode ser feita de diferentes maneiras, dentre estas as mais utilizadas são a de transmissão, transflexão e reflexão total atenuada (ATR). As análises espectrais por reflexão geralmente são mais utilizadas em relação as de transmissão, uma vez que os espectros obtidos por transmissão devem ser corrigidos computacionalmente devido a ocorrência de interferências físicas (Chan e Kazarian, 2013; Beasley *et al.*, 2014). Ao contrário da transmissão e transflexão, medidas no ATR não requerem substratos especiais e nenhuma ou pouca preparação da amostra, necessitando apenas que o material estudado (sólido ou líquido) seja colocado em contato direto com o elemento de reflexão interna, tornando o processo de análise mais rápido e simples, sendo mais indicado para processos de diagnósticos de desordens patológicas (Tatulian, 2003; Dorling e Baker, 2013).

A região do infravermelho médio obtida com a espectroscopia FTIR (400-4000 cm^{-1}) compreende os modos vibracionais associados a importantes componentes bioquímicos (proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos), que podem ser utilizados como marcadores na identificação de alterações metabólicas decorrentes de diversas doenças, incluindo o DM (Scott *et al.*, 2010; Bunaciu *et al.*, 2017).

A capacidade de diagnosticar de forma rápida, não-invasiva, livre de reagentes, volume muito reduzida de amostra e com alta especificidade alguma doença oferece diversos benefícios no desenvolvimento de estratégias de intervenções terapêuticas que possam minimizar as morbidades e reduzir a mortalidade, além de diminuir os recursos econômicos dos sistemas de saúde (Bunaciu *et al.*, 2017). Além disso, dentre as técnicas atualmente estudadas como possíveis ferramentas de diagnóstico, as análises de espectrômetria no infravermelho com transformada de Fourier é de especial interesse devido a sua alta sensibilidade na detecção de alterações bioquímicas e moleculares em amostras biológicas (Baker *et al.*, 2014).

A espectroscopia de infravermelho (IR) está emergindo como uma poderosa técnica quantitativa e qualitativa para caracterização de compostos biológicos podendo ser utilizada como alternativa para diagnóstico (Bellisola e Sorio, 2012). Considerando que uma molécula é determinada pela sua estrutura única, cada biomolécula exibirá um espectro ATR-FTIR único, representando o

modo vibracional dessa ligação estrutural (Severcan *et al.*, 2010; Ojeda e Dittrich, 2012). Os modos de vibração IR de amostras biológicas, como saliva, podem ser considerados como impressões bioquímicas que podem se correlacionar com a presença ou ausência de doenças. Além disso, os modos vibracionais IR ainda fornecem a base para a determinação quantitativa de vários analitos que possuem potencial para diagnóstico (Khaustova *et al.*, 2010; Caetano Júnior *et al.*, 2015).

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar potenciais modos vibracionais salivares analisados por espectrometria de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) que podem ser utilizados para detectar assinaturas específicas de diabetes mellitus adequadas para o diagnóstico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em animais não-diabéticos, diabéticos e diabéticos tratados com insulina:

- Determinar o perfil salivar por espectrometria de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR);
- Identificar potenciais biomarcadores salivares por espectrometria de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR);
- Avaliar o potencial diagnóstico destes possíveis biomarcadores espectrais da saliva por meio da Curva ROC (*receiver operator characteristic curve*);
- Correlacionar os melhores biomarcadores salivares encontrados com a glicose sanguínea por meio de Correlação de Pearson.

4. ARTIGO

Salivary diagnosis of diabetes mellitus using ATR-FTIR-spectroscopy

CAIXETA, D.C.^{1,2}, AGUIAR, E. M. G.^{1,3}, CARDOSO-SOUSA, L. ¹, ESPINDOLA F.S.², CROSARA, K.T.B.⁴, SIQUEIRA W.L.⁴, SABINO-SILVA, R. ^{1,*}

¹ Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

² Institute of Biotechnology , Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

³ School of Dentistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Schulich Dentistry and Department of Biochemistry, Schulich School of Medicine & Dentistry, University of Western Ontario, London, ON, Canada.

***Corresponding Author:**

Federal University of Uberlandia (UFU), Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), ARFIS, Av. Pará, 1720, Campus Umuruama, CEP 38400-902, Uberlandia, MG, Brazil

Phone: +55 34 82 3218 2100

E-mail: robinsonsabino@gmail.com

Abstract:

Monitoring of blood glucose is an invasive, painful and costly practice in diabetes. Consequently, the search for a more cost-effective (reagent-free), non-invasive and specific diabetes diagnostic method is of great interest. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy has been used in diagnosis of several diseases, however, applications in endocrine diseases are just beginning to emerge. Here, we used ATR-FTIR spectroscopy to evaluate saliva of non-diabetic (ND), diabetic (D) and diabetic 6U-treated of insulin (D6U) rats to identify potential salivary biomarkers related to diabetes stage. The spectrum of saliva of ND, D and D6U rats showed thirteen vibrational modes and from these, four vibrational modes were pre-validated as potential diagnostic biomarkers by ROC curve with significant correlation with glycemia. Compared to the ND rats, bands 1377 cm^{-1} , 1255 cm^{-1} , 628 cm^{-1} and 616 cm^{-1} of D rats demonstrated a sensitivity and specificity of 100% ($p < 0.001$). Moreover, 1255 cm^{-1} and 628 cm^{-1} spectral biomarkers proved to be robust with the results from glycemia highly correlated (R^2 of 0.84 and 0.8595, respectively). Altogether, 1255 cm^{-1} and 628 cm^{-1} spectral salivary biomarkers may provide a novel robust alternative for diabetes diagnostics.

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia which results from insufficient secretion and/or reduced insulin action in peripheral tissues ^{1,2}. According to the International Diabetes Federation (IDF), there are an estimated 415 million adults with diabetes worldwide, these include an estimated undiagnosed 193 million (IDF, 2015). Early diagnosis of diabetes is essential for improved prognosis and to delay clinical complications related with diabetes. Besides, the early screening of DM could be a paramount strategy to reduce the incidence of this metabolic disorder worldwide ³. Despite being invasive and painful, blood analysis per glucometer is currently feasible for screening, monitoring and diagnosing diabetes by needle finger punctures ^{4,5}. The constant need of piercing the fingers several times daily by most patients is inconvenient, painful, and may lead to the development of finger calluses and difficulty in obtaining blood samples ⁴.

Saliva may reflect several physiological function of the body ^{6,7}. In this way, salivary biomarkers might be an attractive alternative for early detection of systemic diseases ⁸. Among the advantages, saliva is simple to collect, non-invasive, convenient to store and, compared to blood, requires less handling during diagnostic procedures. Besides, saliva also contains analytes with real-time diagnostic value ^{7,9}. Currently, a broad set of methods used to analyze saliva includes immunoassay, colorimetric, enzymatic, kinetic, chromatographic and mass spectrometric analysis ¹⁰. Several studies showed higher salivary glucose levels in DM patients than non-hyperglycemic controls, which suggest that salivary glucose monitoring might be useful to guide screening for diabetic patients. However, other studies reject the idea of a direct relationship between salivary glucose and glycemia ^{5,11-13}. A main limitation of salivary-based measurement of glucose for diabetes diagnosis is the presence of glucose in foods, which can disturb the diagnosis because it induces changes in salivary glucose concentration. Therefore, other alternatives of salivary diagnosis should be studied as the FTIR.

Infrared (IR) spectroscopy is emerging as a powerful quantitative and qualitative technique for diagnostic characterization of biological molecules in fluids ¹⁴. The attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR)

spectrometry is a global, sensitive and highly reproducible physicochemical analytical technique that identifies structural molecules on the basis of their IR absorption¹⁵. Considering that a biomolecule is determined by its unique structure, each biomolecule will exhibit a unique ATR-FTIR spectrum, representing the vibrational mode of this structural bond ^{15,16}. The IR vibrational modes of biological samples, such as saliva, may be considered as biochemical fingerprints that correlate directly with the presence or absence of diseases, and, further, provide the basis for the quantitative determination of several analytes of diagnostic interest ^{17,18}. The potential of salivary diagnostic for diabetes by IR spectroscopy was suggested using a complex biochemical profile ¹⁹.

In the present study, we tested the hypothesis that specific spectral salivary biomarkers can be identified in saliva of hyperglycemic diabetic rats, and the differentially expressed vibrational modes can serve as salivary biomarkers for diabetes detection. Thus, the aim of our study was to identify unique vibrational modes, analyzed by ATR-FTIR spectroscopic, of saliva may be used to detect diabetes signatures that are suitable to diagnosis. For this, the salivary vibrational modes profile of non-diabetic, diabetic and insulin-treated diabetic rats was quantitatively evaluated.

Results

Characterization of diabetes mellitus

To confirm the effectiveness of diabetes induction and insulin treatment, several parameters were assessed in anesthetized animals. Table 1 shows that diabetes reduce weight gain ($p < 0.05$), increase water intake ($p < 0.05$) and food ingestion ($p < 0.05$) compared with ND rats. As expected in diabetic condition, higher plasma glucose ($p < 0.05$), as well as most pronounced urine volume ($p < 0.05$), associated with higher urine glucose concentration ($p < 0.05$), were observed in D rats compared with ND rats. Insulin treatment contributed to increase ($p < 0.05$) weight gain and decrease water intake ($p < 0.05$) compared with placebo-treated D rats. As expected, insulin treatment decreased plasma glucose ($p < 0.05$), urine volume ($p < 0.05$) and urine glucose concentration compared with D rats. Glycemia and urine volume were similar ($p > 0.05$) in ND and D6U animals, indicating that insulin treatment completely reverted

hyperglycemia and higher urine volume described in D rats. The insulin treatment promoted a strong reduction in the urinary glucose concentration, however, the urinary glucose concentration was increased ($p < 0.05$) in D6U compared to ND animals.

ATR-FTIR spectra of stimulated saliva

The infrared spectrum of whole saliva of ND, D and D6U rats is represented in Figure 1 with a superposition of several salivary components. These salivary spectra showed several differences among non-diabetic, diabetic and insulin-treated diabetic conditions. The salivary vibrational mode at 3284 cm^{-1} did not change among the groups (Figure 2-A). The salivary vibrational mode at 2959 cm^{-1} increased ($p < 0.05$) in D rats compared with ND rats and decreased ($p < 0.05$) in D6U compared to D rats (Figure 2-B). The 1650 cm^{-1} salivary vibrational mode did not change among ND, D and D6U rats (Figure 2-C), while salivary vibrational mode at 1556 cm^{-1} (Figure 2-D) increased ($p < 0.05$) in D compared with ND rats. This vibrational mode was similar ($p > 0.05$) in D6U and ND rats. In addition, 1452 cm^{-1} salivary vibrational mode was similar in ND, D e D6U rats (Figure 2-E). Moreover, 1377 cm^{-1} salivary vibrational mode decreased ($p < 0.05$) in the saliva of D rats compared with ND rats. Besides, this salivary vibrational mode was increased ($p > 0.05$) in D6U compared to D rats (Figure 2-F). Furthermore, the salivary vibrational modes at 1304 cm^{-1} (Figure 2-G) and 1255 cm^{-1} (Figure 2-H) were found only in the saliva of D rats. Both salivary vibrational modes were increased ($p > 0.05$) in D animals. The salivary vibrational mode at 1032 cm^{-1} (Figure 2-I) increased ($p < 0.05$) in D rats compared to ND, and insulin treatment was capable to reduce ($p < 0.05$) this vibrational mode. The vibrational mode at 837 cm^{-1} (Figure 2-J) decreased ($p < 0.05$) in D rats compared to ND; however, no difference was observed in D6U compared to D rats. ATR-FTIR vibrational modes assignments of saliva are represented in Table 2.

Other salivary vibrational modes at 628 cm^{-1} (Figure 3-A), 616 cm^{-1} (Figure 3-B) and 590 cm^{-1} (Figure 3-C) were found, but these vibrational modes have not been identified in other scientific studies yet, therefore are unassigned bands. The salivary vibrational mode at 628 cm^{-1} decreased in D rats compared to ND and increased in D6U compared to D rats. Besides, the vibrational modes at 616 cm^{-1} and 590 cm^{-1} were found only in the saliva of D rats.

Pre-validation as diagnostic potential by ROC curve and Pearson correlation

Considering that, sensitivity and specificity are basic characteristics to determine the accuracy of diagnostic test, ROC analysis were used to ascertain the potential diagnostic of these vibrational modes (Figure 4). The area under curve (AUC) of 3284 cm^{-1} salivary vibrational mode was 0.634 ($p = 0.368$) with a sensitivity of 42.8% and specificity of 88.8% to a cutoff value of 156.4 (Figure 4-A). The AUC of 2959 cm^{-1} salivary vibrational mode was 0.841 ($p = 0.022$) with a sensitivity of 85.7% and specificity of 77.7% to a cutoff value of 0.345 (Figure 4-B). On the other hand, AUC of 1650 cm^{-1} salivary vibrational mode was 0.523 ($p = 0.873$) with a sensitivity of 42.8% and specificity of 88.8% (Figure 4-C) to a cutoff value of 40.3. The vibrational mode at 1556 cm^{-1} AUC was 0.825 ($p = 0.030$) with a sensitivity of 85.7% and specificity of 88.8% (Figure 4-D) to a cutoff value of 5.9. The AUC of salivary at 1452 cm^{-1} was 0.857 ($p = 0.017$) with a sensitivity of 85.7% and specificity of 88.8% (Figure 4-E) to a cutoff value of 3.5. The AUC of 1377 cm^{-1} salivary vibrational mode was 1 ($p = 0.0009$) with a sensitivity of 100% and specificity of 100% (Figure 4-F) to a cutoff value of 8. The AUC of salivary at 1304 cm^{-1} was 0.928 ($p = 0.004$) with a sensitivity of 85.7% and specificity of 100% (Figure 4-G) to a cutoff value of 0.17. The AUC of a1255 cm^{-1} was 1 ($p = 0.0009$) with a sensitivity of 100% and specificity of 100% (Figure 4-H) and the cutoff value was 0.32. Besides, the AUC of 1032 cm^{-1} salivary vibrational mode was 0.825 ($p = 0.030$) with a sensitivity of 85.7% and specificity of 88.8% (Figure 4-I) to a cutoff value of 1.4. The AUC of 837 cm^{-1} was 0.857 ($p = 0.017$) with a sensitivity of 85.7% and specificity of 88.8% (Figure 4-J) to a cutoff value of 2.9.

The ROC curve was also performed in unassigned bands. The area under curve of 628 cm^{-1} salivary vibrational mode (Figure 5-A) and 616 cm^{-1} salivary vibrational mode (Figure 5-B) was 1 ($p = 0.0009$) with a sensitivity of 100% and specificity of 100% to a cutoff value of 1.2 and 0.02, respectively. Besides, the AUC of 590 cm^{-1} salivary vibrational mode (Figure 5-C) was 0.857 ($p = 0.017$) with a sensitivity of 71.4% and specificity of 100% to a cutoff value of 0.03.

To investigate whether these salivary vibrational modes would be reflective of glycemia, four salivary vibrational modes were found as the best

values of sensitivity and specificity from the analysis of ROC curve. Pearson's correlation between these four salivary vibrational modes areas (1377 cm^{-1} , 1255 cm^{-1} , 628 cm^{-1} and 616 cm^{-1}) with glycemia showed a strong correlation (Figure 6). The salivary vibrational mode at 1377 cm^{-1} observed strong negative correlation ($r = -0.8015$; $p < 0.0001$) (Figure 6-A). The salivary vibrational mode at 1255 cm^{-1} showed strong positive correlation with blood glucose levels ($r = 0.84$; $p < 0.0001$) (Figure 6-B). The two unknown salivary vibrational modes (628 cm^{-1} and 616 cm^{-1}) had also strong negative ($r = -0.8595$; $p < 0.0001$) and positive ($r = 0.7631$; $p < 0.0001$) correlation, respectively (Figure 6-C-D).

Discussion

Herein, we have investigated potential biomarkers in saliva of diabetic rats using ATR-FTIR technology. Thirteen vibrational modes were detected by ATR-FTIR and, from these, four vibrational modes were pre-validated as salivary biomarkers by ROC Curve analysis. The discriminatory power of these four salivary ATR-FTIR biomarkers candidates for diabetes reached 100% of specificity and 100% of sensitivity. Besides that, these four salivary vibrational modes also exhibited significant correlation with glycemia. The 1255 cm^{-1} and 628 cm^{-1} salivary spectral biomarkers demonstrated a strong correlation with glycemia, which suggest potential candidates for detection of diabetes using saliva.

As expected in diabetic state, plasma glucose, urine volume and urine glucose concentration are increased in non-treated diabetic rats compared to non-diabetic rats. In addition, insulin treatment decreased glycemia, urine volume and urine glucose. These findings are consistent with other studies^{24,20,21,22,23}. It is known that salivary composition changes in diabetes mellitus²⁴⁻²⁶. Also, diabetes mellitus frequently decreases salivary flow, alters the expression of salivary proteins and increases glucose levels in saliva^{24,26,27}. From these parameters, it is possible to use salivary components to reflect the presence and severity of hyperglycemia²⁸. Saliva of diabetics with poor metabolic control shows an increase in salivary glucose concentration²⁹. The correlation of glycemia with glucose concentration in saliva is still not well established, so it is not used to verify the degree of metabolic control and diagnosis in diabetes

mellitus³⁰⁻³². Herein, ATR-FTIR spectroscopy has been used as an alternative diagnostic method to other chronic disease, since it is a rapid, noninvasive, label-free, high-throughput, and cost effective analytical method^{33,34}.

The method of analyzing ATR-FTIR spectra of dried saliva samples described in the present study may be used in rodent and human models. Spectral parameters, such as shifts in peak positions and changes in vibrational modes intensity can be used to obtain valuable information about sample composition, which may have diagnostic potential¹⁶. The salivary pattern of two vibrational modes representing secondary structure appear to be different between diabetic and non-diabetic conditions⁴⁰; however, this study does not show statistics and accuracy of these changes focusing in salivary diagnostic of diabetes. In the present study, ATR-FTIR analysis in saliva evidenced the presence of several differences in vibrational modes among hyperglycemic and normoglycemic conditions. The salivary vibrational modes 1377 cm⁻¹ and 1255 cm⁻¹ are likely to be attributable to the cytosine/guanine and amide III/phospholipids, respectively. The salivary vibrational modes at 628 cm⁻¹ and 616 cm⁻¹ are unassigned bands. These four salivary vibrational modes showed a 100% of sensitivity and 100% of specificity in ROC analysis. ROC curve analysis is widely considered to be the most objective and statistically valid method for biomarker performance evaluation^{41,35}. Furthermore, a significant correlation between glycemia and these vibrational modes was observed in saliva of rats. Clinically, the most interesting comparisons are between salivary vibrational modes and glycemia. Several levels of glucose concentration should ideally be possible to differentiate. Regarding the potential for translation to the clinic, our results suggest that 1255 cm⁻¹ and 628 cm⁻¹ salivary vibrational modes can be considered a non-invasive spectral biomarkers of diabetes. These results indicate that these vibrational modes can be used as a diagnostic platform for diabetes mellitus. Interestingly, insulin treatment was also able to revert the salivary spectra observed in hyperglycemic state. Thus, insulin treatment is not a potential confounding factor that may influence salivary vibrational mode in comparisons with glycemia. Some studies have indicated specific salivary biomarkers for diabetes, such as glucose, alpha-amylase, immunoglobulins, myeloperoxidases^{9,26,36,37}, with similar diagnostic potential.

Although we have shown that ATR-FTIR technology is useful for the identification of possible biomarkers for diabetes mellitus in the saliva of rats, this is a first exploratory study using ATR-FTIR technology for this purpose. Therefore, further studies are needed to validate the suggested biomarkers in humans and to determine the applicability of this technique for the diagnosis of diabetes mellitus in human saliva. Also, one limitation of this study is the inclusion of rats in higher levels of glycemia, which was not intentional but could be explained by effect of streptozotocin on beta cells.

In conclusion, we showed that ATR-FTIR spectroscopy in saliva samples to differentiate diabetic from non-diabetic conditions in rats could be continue to be explored as an additional/alternative method for the detection of diabetes stage. Our study highlighted four salivary vibrational modes (1377 cm^{-1} , 1255 cm^{-1} , 628 cm^{-1} and 616 cm^{-1}) with high accuracy (AUC:1; sensitivity: 100% and specificity:100%) to differentiate hyperglycemic from matched normoglycemic conditions. In addition, the 1255 cm^{-1} and 628 cm^{-1} spectral biomarkers demonstrated a positive correlation with glycemia (R^2 of 0.84 and 0.8595, respectively). In summary, these results indicated that ATR-FTIR spectroscopy may be a reliable tool for the investigation of spectral biomarkers for diabetes in saliva.

Methods

Animals

This study was carried out in accordance with recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian Society of Laboratory Animals Science (SBCAL). All experimental procedures for the handling, use and euthanasia were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Uberlandia (UFU) (License #CEUA-UFU No. 013/2016) according to Ethical Principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). All effort was taken to minimize the number of animals used and their discomfort.

Wistar rats (~250g) were obtained from Center for Bioterism and Experimentation at the Federal University of Uberlandia. The animals were maintained under standard conditions ($22 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $60\% \pm 5\%$ humidity and 12-

hour light/dark cycles, light on at 7 AM) and were allowed with free access to standard diet and water at the Institute of Biomedical Sciences rodent housing facility.

Induction of Diabetes and insulin treatment

Animals were divided in Non-Diabetic (ND, n = 9), Diabetic (D, n = 7) and diabetic treated with 6U insulin (D6U, n = 8). Diabetes was induced in overnight-fasted animals by an intraperitoneal injection (60 mg/kg) of streptozotocin (STZ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. USA) dissolved in 0.1 M citrate buffer (pH 4.5). Animals with hyperglycemia (>250 mg/dl) were chosen as diabetics. Non-diabetic animals received injection of NaCl 0.9% in similar volume.

Twenty one days later after induction of diabetes, diabetic rats were submitted to a 7-day treatment with vehicle (ND and D) or with 6U of insulin (D6U) per day (2U at 8:30 a.m. and 4U at 5:30 p.m.) subcutaneously²³. Glucose levels in overnight-fasted were obtained from the tail vein and measured using reactive strips (Accu-Chek Performa, Roche Diagnostic Systems, Basel, Switzerland) in the moment of samples collection.

In the last day of treatment, the animals were kept in metabolic cages and water intake, food intake, urine volume were measured. Urine was collected over 24 h and the glucose concentration in the urine was evaluated using an enzymatic Kit (Labtest Diagnostica SA, Brazil). Besides that, variation of gain/loss body weight (Δ body weight) compared parameters in STZ or vehicle induction with parameters after insulin or vehicle treatment.

Saliva collection

After 7-days of treatment, the animals were intraperitoneally anaesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg). Stimulated saliva was collected with parasympathetic stimulation through pilocarpine injection (2 mg/kg, i.p.). Stimulated saliva was collected in pre weighed flasks for 10 min from the oral cavity²⁴. The collected saliva were stored at -80°C for further processing and analysis.

Chemical profile in stimulated saliva by ATR-FTIR Spectroscopy

Salivary spectra were recorded in 4000 cm^{-1} to 400 cm^{-1} region using ATR-FTIR spectrophotometer Vertex 70 (Bruker Optics, Reinstetten, Germany) using a micro-attenuated total reflectance (ATR) component. The crystal material in ATR unit was a diamond disc as internal-reflection element. The salivary pellicle penetration depth ranges between 0.1 and 2 μm and depends on the wavelength, incidence angle of the beam and the refractive index of ATR-crystal material. In the ATR-crystal the infrared beam is reflected at the interface toward the sample. Two μl of saliva was directly dried on ATR-crystal for 2 min before salivary spectra recorded. The air spectra was used as a background in ATR-FTIR analysis. Sample spectra and background was taken with 4 cm^{-1} of resolution and 32 scans were performed for salivary analysis.

Spectra data evaluation procedures

The spectra data obtained were processed using Opus 6.5 software (Bruker Optics, Reinstetten, Germany). For the generation of mean spectra and band areas, the spectra were normalized by vector and baseline corrected to avoid errors during the sample preparations and spectra analysis.

Statistical analysis

The data were analyzed using the one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey Multiple Comparison as a *post-hoc* test. For all biomarkers candidates, we constructed the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve and computed the area under the curve (AUC) value, sensitivity and specificity by numerical integration of the ROC curve. The correlation between mean values of blood glucose concentration and potential salivary biomarkers were analyzed by the Pearson correlation test. The Kolmogorov-Smirnov test was applied to test the normality of the variables. All analyses were performed using the software GraphPad Prism (GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Only values of $p < 0.05$ were considered significant and the results were expressed as mean $\pm$ S.D.

Acknowledgements

This research was supported by a grant from CAPES/CNPq (#458143/2014), FAPEMIG (#APQ-02872-16) and National Institute of Science

and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology (CNPq Process N.: 465669/2014-0). We would like to thank our collaborators at the Dental Research Center in Biomechanics, Biomaterials and Cell Biology (CPbio).

Contributions

D.C.C. collected, analyzed and interpreted the data, conceived the research hypothesis and wrote the manuscript. E.M.G.A and L.C.S assisted with research assays and data collection. F.S.E., K.T.B.C and W.L.S were involved in conceiving the study, data analysis and interpretation, as well as reviewing and editing all parts of the final document for publication. R.S.S. was involved in conceiving and designing the study, conceived the research hypothesis, reviewed and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing Interests

The authors declare no competing financial interests.

References

- 1 Ashcroft, F. M. & Rorsman, P. Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years. *Cell* **148**, 1160-1171, doi:10.1016/j.cell.2012.02.010 (2012).
- 2 Rolo, A. P. & Palmeira, C. M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and applied pharmacology* **212**, 167-178, doi:10.1016/j.taap.2006.01.003 (2006).
- 3 USPSTF. Screening for type 2 diabetes mellitus in adults: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Annals of internal medicine* **148**, 846-854 (2008).
- 4 Dowlaty, N., Yoon, A. & Galassetti, P. Monitoring states of altered carbohydrate metabolism via breath analysis: are times ripe for transition from potential to reality? *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **16**, 466-472, doi:10.1097/MCO.0b013e328361f91f (2013).
- 5 Mascarenhas, P., Fatela, B. & Barahona, I. Effect of diabetes mellitus type 2 on salivary glucose--a systematic review and meta-analysis of observational studies. *PLoS One* **9**, e101706, doi:10.1371/journal.pone.0101706 (2014).
- 6 Desai, G. S. & Mathews, S. T. Saliva as a non-invasive diagnostic tool for inflammation and insulin-resistance. *World journal of diabetes* **5**, 730-738, doi:10.4239/wjd.v5.i6.730 (2014).

- 7 Javaid, M. A., Ahmed, A. S., Durand, R. & Tran, S. D. Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. *Journal of oral biology and craniofacial research* **6**, 66-75, doi:10.1016/j.jobcr.2015.08.006 (2016).
- 8 Hu, S., Loo, J. A. & Wong, D. T. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. *Expert review of proteomics* **4**, 531-538, doi:10.1586/14789450.4.4.531 (2007).
- 9 Zhang, C. Z. *et al.* Saliva in the diagnosis of diseases. *International journal of oral science* **8**, 133-137, doi:10.1038/ijos.2016.38 (2016).
- 10 Saxena, S., Sankhla, B., Sundaragiri, K. S. & Bhargava, A. A Review of Salivary Biomarker: A Tool for Early Oral Cancer Diagnosis. *Advanced biomedical research* **6**, 90, doi:10.4103/2277-9175.211801 (2017).
- 11 Gupta, S., Sandhu, S. V., Bansal, H. & Sharma, D. Comparison of salivary and serum glucose levels in diabetic patients. *Journal of diabetes science and technology* **9**, 91-96, doi:10.1177/1932296814552673 (2015).
- 12 Naing, C. & Mak, J. W. Salivary glucose in monitoring glycaemia in patients with type 1 diabetes mellitus: a systematic review. *Journal of diabetes and metabolic disorders* **16**, 2, doi:10.1186/s40200-017-0287-5 (2017).
- 13 Nunes, L. A., Mussavira, S. & Bindhu, O. S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochemia medica* **25**, 177-192, doi:10.11613/bm.2015.018 (2015).
- 14 Bellisola, G. & Sorio, C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *American journal of cancer research* **2**, 1-21 (2012).
- 15 Ojeda, J. J. & Dittrich, M. Fourier transform infrared spectroscopy for molecular analysis of microbial cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **881**, 187-211, doi:10.1007/978-1-61779-827-6_8 (2012).
- 16 Severcan, F., Bozkurt, O., Gurbanov, R. & Gorgulu, G. FT-IR spectroscopy in diagnosis of diabetes in rat animal model. *Journal of biophotonics* **3**, 621-631, doi:10.1002/jbio.201000016 (2010).
- 17 Caetano Júnior, P. C., Strixino, J. F. & Raniero, L. Analysis of saliva by Fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes. *Research on Biomedical Engineering* **31**, 116-124 (2015).
- 18 Khaustova, S., Shkurnikov, M., Tonevitsky, E., Artyushenko, V. & Tonevitsky, A. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. *The Analyst* **135**, 3183-3192, doi:10.1039/c0an00529k (2010).
- 19 Scott, D. A. *et al.* Diabetes-related molecular signatures in infrared spectra of human saliva. *Diabetology & metabolic syndrome* **2**, 48, doi:10.1186/1758-5996-2-48 (2010).
- 20 Eleazu, C. O., Iroaganachi, M., Okafor, P. N., Ijeh, I. & Eleazu, K. C. Ameliorative Potentials of Ginger (*Z. officinale* Roscoe) on Relative Organ Weights in Streptozotocin induced Diabetic Rats. *Int J Biomed Sci* **9**, 82-90 (2013).
- 21 Kusari, J., Zhou, S., Padillo, E., Clarke, K. G. & Gil, D. W. Effect of memantine on neuroretinal function and retinal vascular changes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Investigative ophthalmology & visual science* **48**, 5152-5159, doi:10.1167/iovs.07-0427 (2007).

- 22 Diniz Vilela, D. *et al.* The Role of Metformin in Controlling Oxidative Stress in Muscle of Diabetic Rats. *Oxid Med Cell Longev* **2016**, 6978625, doi:10.1155/2016/6978625 (2016).
- 23 Sabino-Silva, R. *et al.* Na⁺-glucose cotransporter SGLT1 protein in salivary glands: potential involvement in the diabetes-induced decrease in salivary flow. *The Journal of membrane biology* **228**, 63-69, doi:10.1007/s00232-009-9159-3 (2009).
- 24 Sabino-Silva, R. *et al.* Increased SGLT1 expression in salivary gland ductal cells correlates with hyposalivation in diabetic and hypertensive rats. *Diabetology & metabolic syndrome* **5**, 64, doi:10.1186/1758-5996-5-64 (2013).
- 25 Srinivasan, M., Blackburn, C., Mohamed, M., Sivagami, A. V. & Blum, J. Literature-based discovery of salivary biomarkers for type 2 diabetes mellitus. *Biomarker insights* **10**, 39-45, doi:10.4137/bmi.s22177 (2015).
- 26 Rao, P. V. *et al.* Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. *Journal of proteome research* **8**, 239-245, doi:10.1021/pr8003776 (2009).
- 27 Bajaj, S., Prasad, S., Gupta, A. & Singh, V. B. Oral manifestations in type-2 diabetes and related complications. *Indian journal of endocrinology and metabolism* **16**, 777-779, doi:10.4103/2230-8210.100673 (2012).
- 28 Rao, P. V., Laurie, A., Bean, E. S., Roberts, C. T., Jr. & Nagalla, S. R. Salivary protein glycosylation as a noninvasive biomarker for assessment of glycemia. *Journal of diabetes science and technology* **9**, 97-104, doi:10.1177/1932296814554414 (2015).
- 29 Abd-Elraheem, S. E., El Saeed, A. M. & Mansour, H. H. Salivary changes in type 2 diabetic patients. *Diabetes & metabolic syndrome* **11 Suppl 2**, S637-s641, doi:10.1016/j.dsx.2017.04.018 (2017).
- 30 Gupta, A. *et al.* Evaluation of Correlation of Blood Glucose and Salivary Glucose Level in Known Diabetic Patients. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* **9**, Zc106-109, doi:10.7860/jcdr/2015/12398.5994 (2015).
- 31 Kadashetti, V. *et al.* Glucose Level Estimation in Diabetes Mellitus By Saliva: A Bloodless Revolution. *Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne* **53**, 248-252, doi:10.1515/rjim-2015-0032 (2015).
- 32 Puttaswamy, K. A., Puttabudhi, J. H. & Raju, S. Correlation between Salivary Glucose and Blood Glucose and the Implications of Salivary Factors on the Oral Health Status in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry* **7**, 28-33, doi:10.4103/2231-0762.200703 (2017).
- 33 Yu, M. C. *et al.* Label Free Detection of Sensitive Mid-Infrared Biomarkers of Glomerulonephritis in Urine Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Scientific reports* **7**, 4601, doi:10.1038/s41598-017-04774-7 (2017).
- 34 Simsek Ozek, N. *et al.* Differentiation of Chronic and Aggressive Periodontitis by FTIR Spectroscopy. *Journal of dental research* **95**, 1472-1478, doi:10.1177/0022034516663696 (2016).
- 35 Xia, J., Broadhurst, D. I., Wilson, M. & Wishart, D. S. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial.

- Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* **9**, 280-299, doi:10.1007/s11306-012-0482-9 (2013).
- 36 Border, M. B. *et al.* Exploring salivary proteomes in edentulous patients with type 2 diabetes. *Molecular bioSystems* **8**, 1304-1310, doi:10.1039/c2mb05079j (2012).
- 37 Zloczower, M., Reznick, A. Z., Zouby, R. O. & Nagler, R. M. Relationship of flow rate, uric acid, peroxidase, and superoxide dismutase activity levels with complications in diabetic patients: can saliva be used to diagnose diabetes? *Antioxidants & redox signaling* **9**, 765-773, doi:10.1089/ars.2007.1515 (2007).
- 38 Moshaverinia, A. *et al.* Modification of conventional glass-ionomer cements with N-vinylpyrrolidone containing polyacids, nano-hydroxy and fluoroapatite to improve mechanical properties. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* **24**, 1381-1390, doi:10.1016/j.dental.2008.03.008 (2008).
- 39 Mitchell, A. L., Gajjar, K. B., Theophilou, G., Martin, F. L. & Martin-Hirsch, P. L. Vibrational spectroscopy of biofluids for disease screening or diagnosis: translation from the laboratory to a clinical setting. *Journal of biophotonics* **7**, 153-165, doi:10.1002/jbio.201400018 (2014).
- 40 Orphanou, C. M., Walton-Williams, L., Mountain, H. & Cassella, J. The detection and discrimination of human body fluids using ATR FT-IR spectroscopy. *Forensic science international* **252**, e10-16, doi:10.1016/j.forsciint.2015.04.020 (2015).

Table 1. Effect of diabetes and insulin treatment on body weight, water intake, food intake, glycemia, urine volume and urine glucose concentration.

Parameters	ND	D	D6U
Δ Body weight (g)	48.4±25.1	-2.7±30.1*	39.5±36.3#
Water intake (mL)	39.1±9.4	166.4±25.8*	58.7±15.7#
Food intake (g)	18.3±4.0	36.2±12.0*	32.7±5.4*
Glycemia (mg/dL)	83.2±12.6	497.6±52.0*	81.0±54.4#
Urine volume (mL)	22.1±10.3	128.9±22.8*	34.6±13.8#
Urine glucose (mg/dL)	24.73±20.3	342.8±45.2*	134.9±102.9*#

Values are expressed as mean ± S.D. *p < 0. 05 vs ND rats; #p < 0. 05 vs D rats. Non-Diabetic rats (ND), diabetic rats (D) and diabetic treated with 6U insulin (D6U).

Table 2. ATR-FTIR vibrational mode assignments and identification of the respective component of whole saliva.

Peak frequency	Assignments
3284 cm^{-1}	Amide A (N-H stretching)
2959 cm^{-1}	CH ₃ asymmetric stretching of lipids
1650 cm^{-1}	Amide I (ν_{NH})
1556 cm^{-1}	Amide II (δ_{NH})
1452 cm^{-1}	Methylene bending of amino acid side chains, lipids and proteins
1377 cm^{-1}	Stretching C-N cytosine and guanine
1304 cm^{-1}	Amide III
1255 cm^{-1}	Amide III and phospholipids
1032 cm^{-1}	Sugar moieties
837 cm^{-1}	Left-handed helix DNA (Z form)
628 cm^{-1}	Unassigned bands
616 cm^{-1}	Unassigned bands
590 cm^{-1}	Unassigned bands

Note: Used the following references for vibrational mode assignments ^{17,18,38-40}

Figures

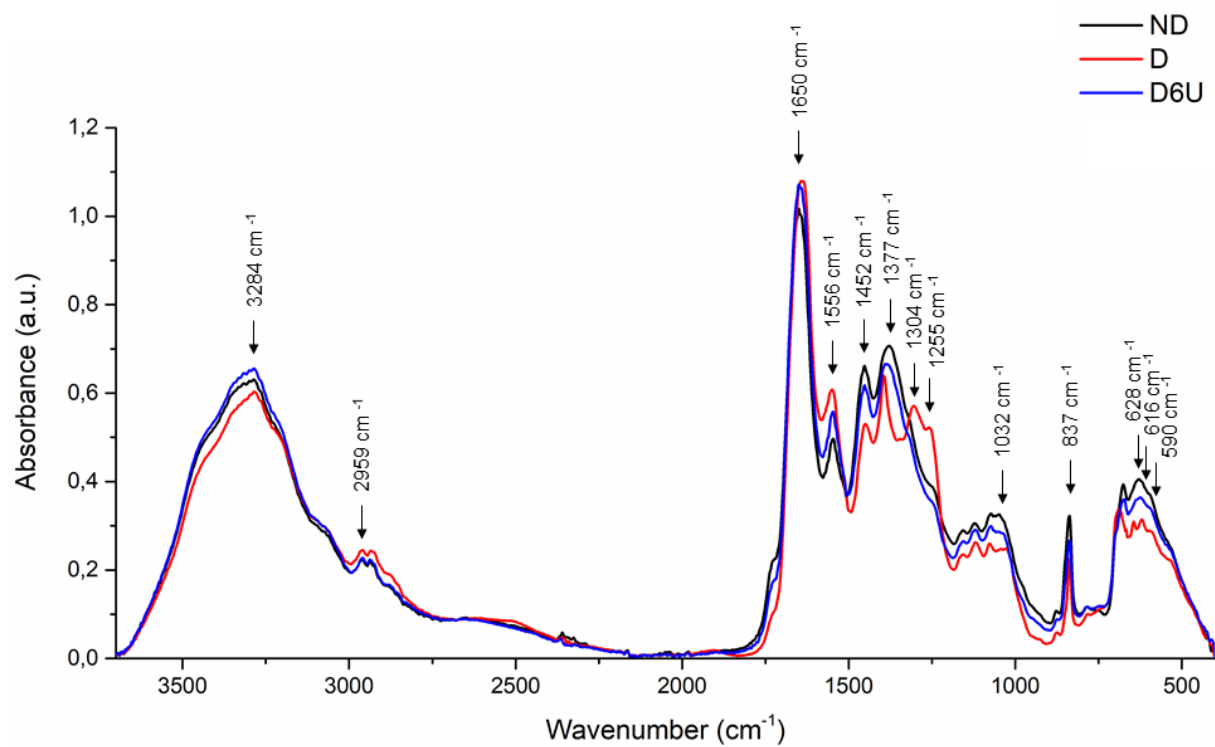


Figure 1. Average ATR-FTIR spectra ($3700\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) in saliva of Non-Diabetic rats (ND), diabetic rats (D) and diabetic treated with 6U insulin (D6U).

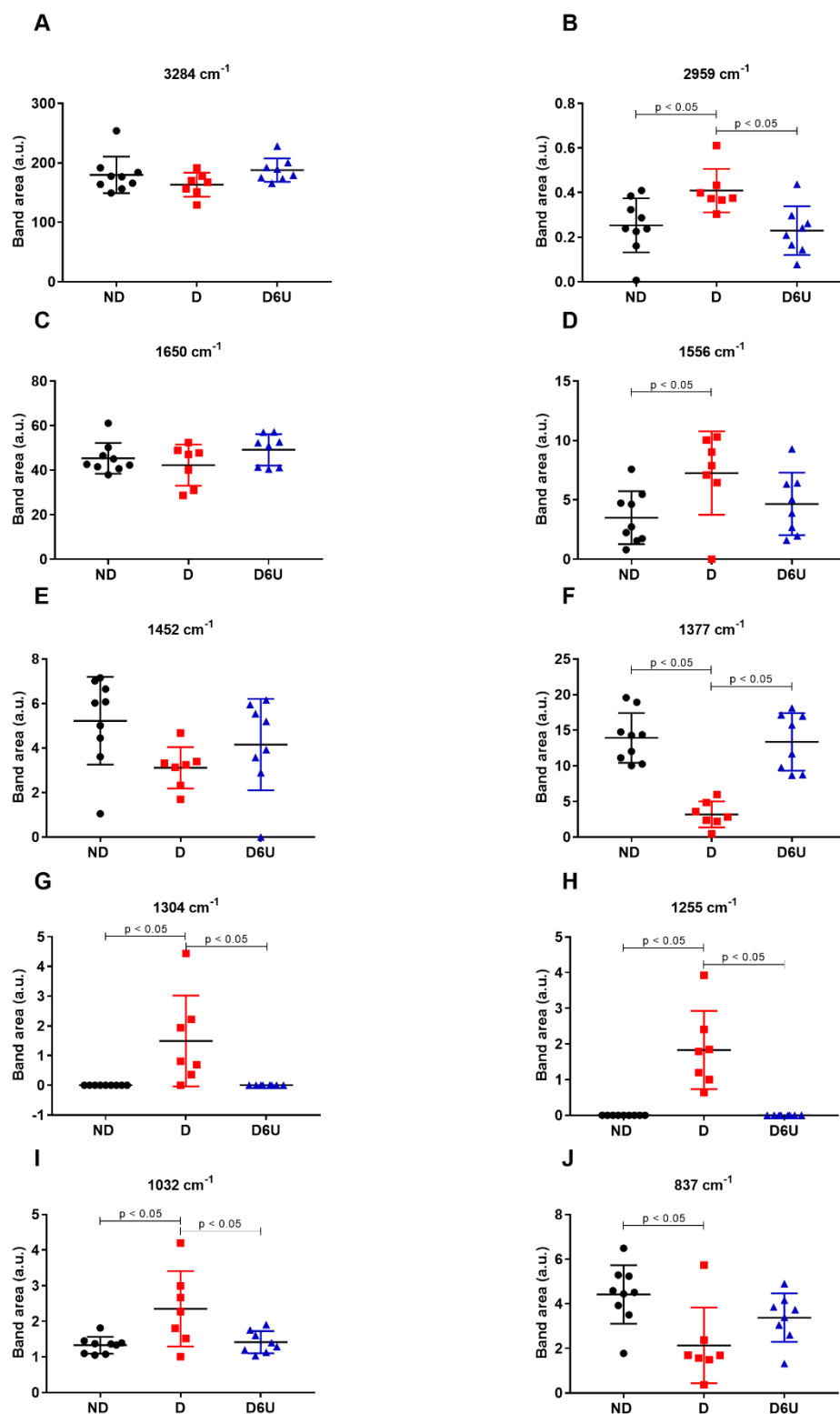


Figure 2. Band area of the ATR-FTIR (3700-400 cm^{-1}) spectrum of the whole saliva of non-diabetic rats (ND), diabetic rats (D) and diabetic treated with 6U insulin (D6U). 3284 cm^{-1} (A), 2959 cm^{-1} (B), 1650 cm^{-1} (C), 1556 cm^{-1} (D), 1452 cm^{-1} (E), 1377 cm^{-1} (F), 1304 cm^{-1} (G), 1255 cm^{-1} (H), 1032 cm^{-1} (I) and 837 cm^{-1} (J). Values are expressed as mean $\pm$ S.D.

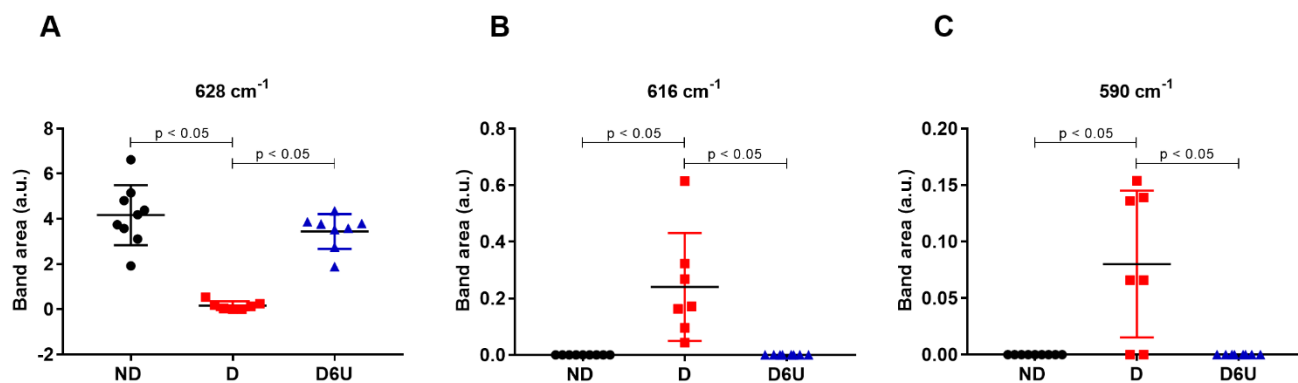


Figure 3. Unassigned bands area of the ATR-FTIR spectrum of the whole saliva of non-diabetic rats (ND), diabetic rats (D) and diabetic treated with 6U insulin (D6U). 628 cm⁻¹ (A), 616 cm⁻¹ (B), 590 cm⁻¹ (C). Values are expressed as mean $\pm$ S.D.

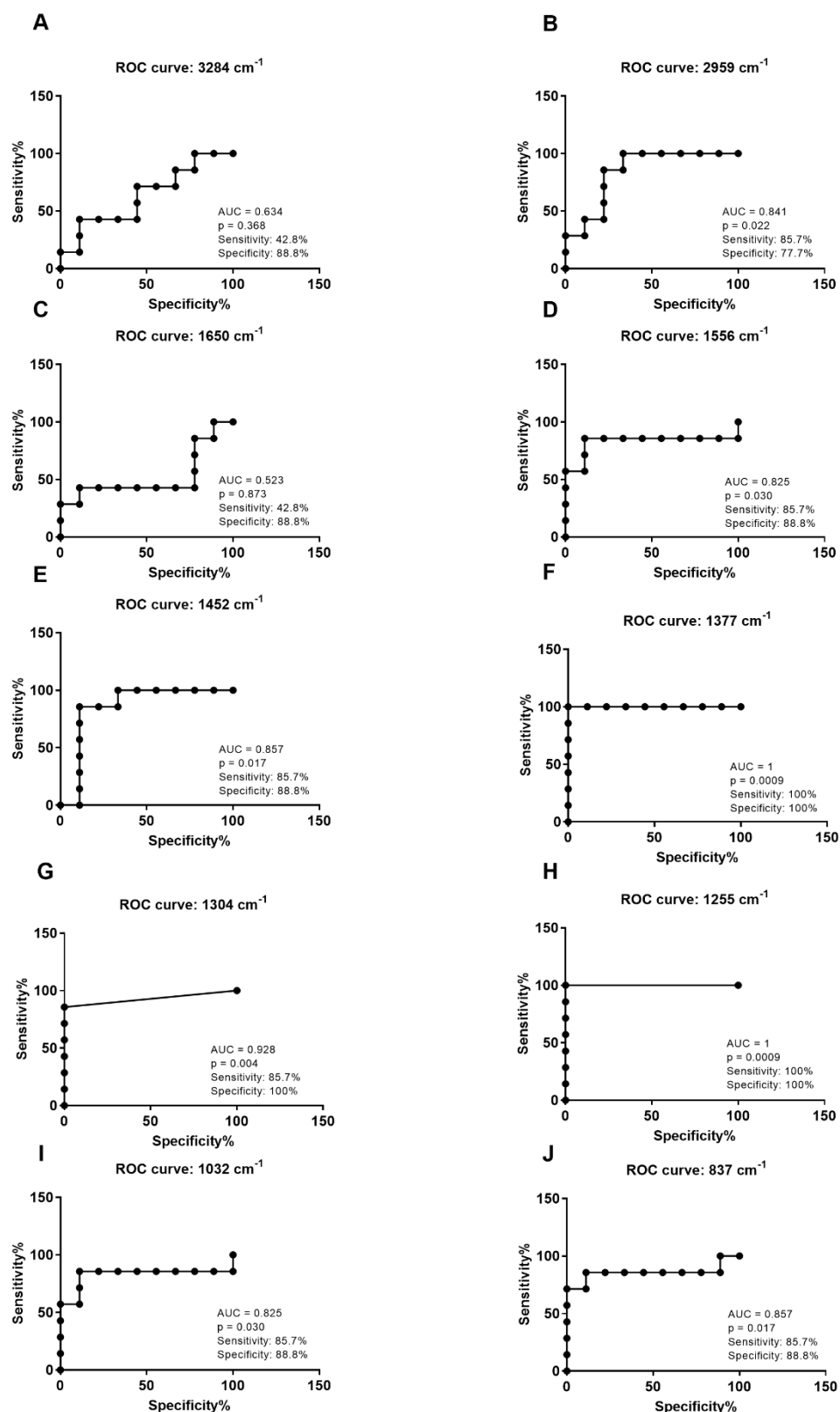


Figure 4. ROC analysis of salivary vibrational modes in diagnosis of diabetes for non-diabetic (ND) vs. diabetic rats (D). 3284 cm^{-1} (A), 2959 cm^{-1} (B), 1650 cm^{-1} (C), 1556 cm^{-1} (D), 1452 cm^{-1} (E), 1377 cm^{-1} (F), 1304 cm^{-1} (G), 1255 cm^{-1} (H), 1032 cm^{-1} (I) and 837 cm^{-1} (J).

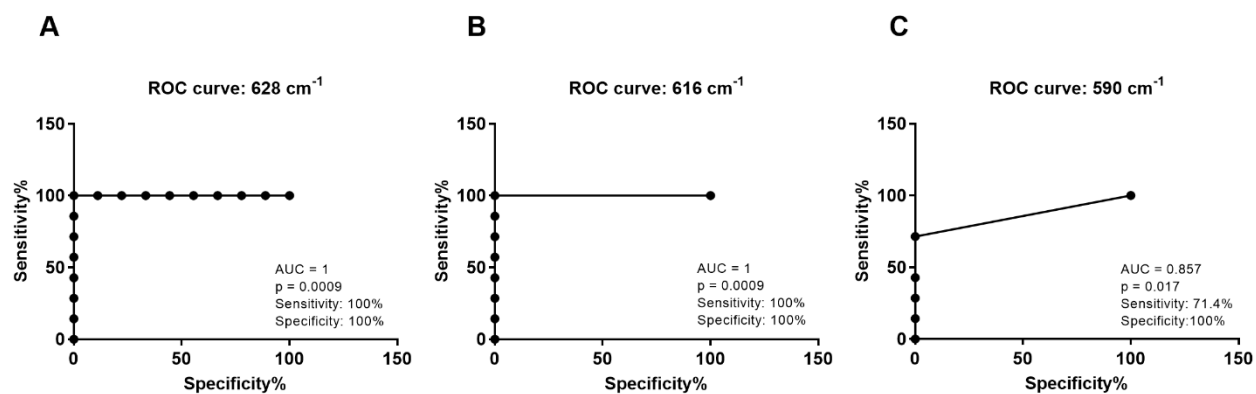


Figure 5. ROC analysis of salivary unassigned bands in diagnosis of diabetes for non-diabetic (ND) vs. diabetic rats (D). 628 cm^{-1} (A), 616 cm^{-1} (B), 590 cm^{-1} (C).

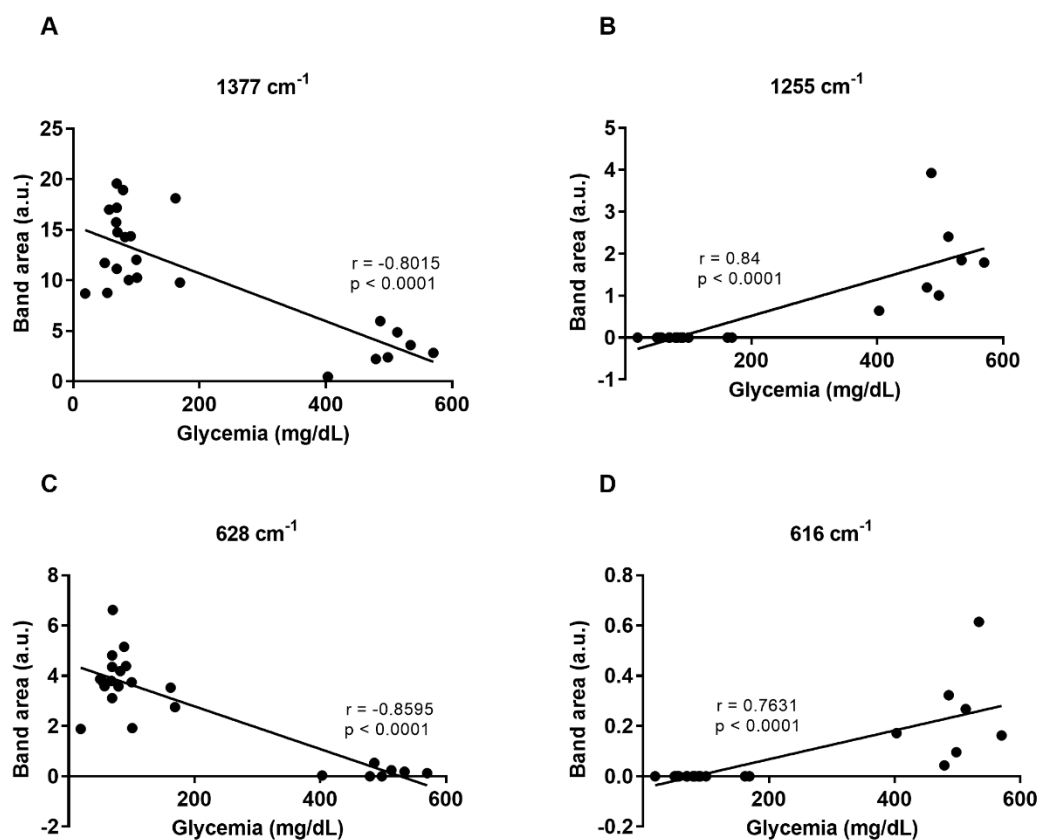


Figure 6. Pearson correlation between glycemia and best vibrational modes analyzed by ROC curve of non-diabetic rats (ND), diabetic rats (D) and diabetic treated with 6U insulin (D6U). 1377 cm^{-1} (A), 1255 cm^{-1} (B), 628 cm^{-1} (C) and 616 cm^{-1} (D).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELRAHEEM, S. E.; EL SAEED, A. M.; MANSOUR, H. H. Salivary changes in type 2 diabetic patients. **Diabetes Metab Syndr**, v. 11 Suppl 2, p. S637-s641, Dec 2017. ISSN 1871-4021.

ADA. **Classification and Diagnosis of Diabetes**. **Diabetes Care**, v. 40, n. Supplement 1, p. S11-S24, 2017. Disponível em: < http://care.diabetesjournals.org/content/diacare/40/Supplement_1/S11.full.pdf >.

ADAM, S.; RHEEDER, P. Selective Screening Strategies for Gestational Diabetes: A Prospective Cohort Observational Study. **J Diabetes Res**, v. 2017, p. 2849346, 2017.

AHMED, N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 67, n. 1, p. 3-21, Jan 2005. ISSN 0168-8227 (Print)

0168-8227.

AL-SAEED, T. A.; KHALIL, D. A. Dispersion compensation in moving-optical-wedge Fourier transform spectrometer. **Appl Opt**, v. 48, n. 20, p. 3979-87, Jul 10 2009. ISSN 1559-128x.

_____. Signal-to-noise ratio calculation in a moving-optical-wedge spectrometer. **Appl Opt**, v. 51, n. 30, p. 7206-13, Oct 20 2012. ISSN 1559-128x.

ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1160-71, Mar 16 2012. ISSN 0092-8674.

ASIF, M. The prevention and control the type-2 diabetes by changing lifestyle and dietary pattern. **Journal of Education and Health Promotion**, India, v. 3, p. 1, 02/21 2014. ISSN 2277-9531

2319-6440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3977406/> >.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet**, v. 358, n. 9277, p. 221-9, Jul 21 2001. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736.

BAHIA, L. R. et al. The costs of type 2 diabetes mellitus outpatient care in the Brazilian public health system. **Value Health**, v. 14, n. 5 Suppl 1, p. S137-40, Jul-Aug 2011. ISSN 1098-3015.

BAJAJ, S. et al. Oral manifestations in type-2 diabetes and related complications. **Indian J Endocrinol Metab**, v. 16, n. 5, p. 777-9, Sep 2012. ISSN 2230-9500.

BAKER, M. J. et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nat Protoc**, v. 9, n. 8, p. 1771-91, Aug 2014. ISSN 1750-2799.

BALAJI, A. et al. Salivary Interleukin-6 - A pioneering marker for correlating diabetes and chronic periodontitis: A comparative study. **Indian J Dent Res**, v. 28, n. 2, p. 133-137, Mar-Apr 2017. ISSN 0970-9290.

BALDINI, C. et al. Proteomic analysis of saliva: a unique tool to distinguish primary Sjogren's syndrome from secondary Sjogren's syndrome and other sicca syndromes. **Arthritis Res Ther**, v. 13, n. 6, p. R194, 2011. ISSN 1478-6354.

BANDODKAR, A. J.; WANG, J. Non-invasive wearable electrochemical sensors: a review. **Trends Biotechnol**, v. 32, n. 7, p. 363-71, Jul 2014. ISSN 0167-7799.

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1767, n. 9, p. 1073-101, Sep 2007. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002.

BEASLEY, M. M. et al. Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: implications for assessment of bone bioapatite diagenesis. **Journal of Archaeological Science**, v. 46, p. 16-22, 2014/06/01/ 2014. ISSN 0305-4403.
Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305440314000879> >.

BELLISOLA, G.; SORIO, C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. **Am J Cancer Res**, v. 2, n. 1, p. 1-21, 2012. ISSN 2156-6976.

BHOWMICK, S. K.; LEVENS, K. L.; RETTIG, K. R. Hyperosmolar hyperglycemic crisis: an acute life-threatening event in children and adolescents with type 2 diabetes mellitus. **Endocr Pract**, v. 11, n. 1, p. 23-9, Jan-Feb 2005. ISSN 1530-891X (Print)

1530-891x.

BORGES, B. C. et al. Xerostomia and hyposalivation: a preliminary report of their prevalence and associated factors in Brazilian elderly diabetic patients. **Oral Health Prev Dent**, v. 8, n. 2, p. 153-8, 2010. ISSN 1602-1622 (Print)

1602-1622.

BRINKMAN, A. K. Management of Type 1 Diabetes. **Nurs Clin North Am**, v. 52, n. 4, p. 499-511, Dec 2017. ISSN 0029-6465.

BUNACIU, A. A.; HOANG, V. D.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Vibrational Micro-Spectroscopy of Human Tissues Analysis: Review. **Crit Rev Anal Chem**, v. 47, n. 3, p. 194-203, May 4 2017. ISSN 1040-8347.

BUPPAN, P. et al. Comparative detection of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum DNA in saliva and urine samples from symptomatic malaria patients in a low endemic area. **Malar J**, v. 9, p. 72, Mar 9 2010. ISSN 1475-2875.

CAETANO JÚNIOR, P. C.; STRIXINO, J. F.; RANIERO, L. Analysis of saliva by Fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes. **Research on Biomedical Engineering**, v. 31, p. 116-124, 2015. ISSN 2446-4740. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2446-47402015000200116&nrm=iso >.

CARDA, C. et al. Structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 11, n. 4, p. E309-14, Jul 1 2006. ISSN 1698-4447.

CARPENTER, G. H. The secretion, components, and properties of saliva. **Annu Rev Food Sci Technol**, v. 4, p. 267-76, 2013. ISSN 1941-1413 (Print) 1941-1421.

CATALAN, M. A.; NAKAMOTO, T.; MELVIN, J. E. The salivary gland fluid secretion mechanism. **J Med Invest**, v. 56 Suppl, p. 192-6, 2009. ISSN 1343-1420.

CHAN, K. L.; KAZARIAN, S. G. Correcting the effect of refraction and dispersion of light in FT-IR spectroscopic imaging in transmission through thick infrared windows. **Anal Chem**, v. 85, n. 2, p. 1029-36, Jan 15 2013. ISSN 0003-2700.

CHEN, P. et al. Risk factors and management of gestational diabetes. **Cell Biochem Biophys**, v. 71, n. 2, p. 689-94, Mar 2015. ISSN 1085-9195.

CHOJNOWSKA, S. et al. Human saliva as a diagnostic material. **Adv Med Sci**, v. 63, n. 1, p. 185-191, Nov 14 2017. ISSN 1896-1126.

DE ALMEIDA PDEL, V. et al. Saliva composition and functions: a comprehensive review. **J Contemp Dent Pract**, v. 9, n. 3, p. 72-80, Mar 1 2008. ISSN 1526-3711.

DE PAULA, F. et al. Overview of Human Salivary Glands: Highlights of Morphology and Developing Processes. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 300, n. 7, p. 1180-1188, Jul 2017. ISSN 1932-8486.

DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Med Clin North Am**, v. 88, n. 4, p. 787-835, ix, Jul 2004. ISSN 0025-7125 (Print)
0025-7125.

DENNY, P. et al. The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. **J Proteome Res**, v. 7, n. 5, p. 1994-2006, May 2008. ISSN 1535-3893 (Print)
1535-3893.

DODDS, M. W.; JOHNSON, D. A.; YEH, C. K. Health benefits of saliva: a review. **J Dent**, v. 33, n. 3, p. 223-33, Mar 2005. ISSN 0300-5712 (Print)
0300-5712.

DORLING, K. M.; BAKER, M. J. Highlighting attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy for rapid serum analysis. **Trends Biotechnol**, v. 31, n. 6, p. 327-8, Jun 2013. ISSN 0167-7799.

DY, F. et al. Salivary Pepsin Lacks Sensitivity as a Diagnostic Tool to Evaluate Extraesophageal Reflux Disease. **J Pediatr**, v. 177, p. 53-58, Oct 2016. ISSN 0022-3476.

FULLERTON, B. et al. Intensive glucose control versus conventional glucose control for type 1 diabetes mellitus. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 2, p. Cd009122, Feb 14 2014. ISSN 1361-6137.

GIBBONS, C. H.; FREEMAN, R. Treatment-induced neuropathy of diabetes: an acute, iatrogenic complication of diabetes. **Brain**, v. 138, n. Pt 1, p. 43-52, Jan 2015. ISSN 0006-8950.

GROOP, L. C. et al. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 84, n. 1, p. 205-13, Jul 1989. ISSN 0021-9738 (Print)
0021-9738.

GUPTA, A. et al. Evaluation of Correlation of Blood Glucose and Salivary Glucose Level in Known Diabetic Patients. **J Clin Diagn Res**, v. 9, n. 5, p. Zc106-9, May 2015. ISSN 2249-782X (Print)

0973-709x.

HOLMBERG, K. V.; HOFFMAN, M. P. Anatomy, biogenesis and regeneration of salivary glands. **Monogr Oral Sci**, v. 24, p. 1-13, 2014. ISSN 0077-0892 (Print) 0077-0892.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. **J Prosthet Dent**, v. 85, n. 2, p. 162-9, Feb 2001. ISSN 0022-3913 (Print) 0022-3913.

KADASHETTI, V. et al. Glucose Level Estimation in Diabetes Mellitus By Saliva: A Bloodless Revolution. **Rom J Intern Med**, v. 53, n. 3, p. 248-52, Jul-Sep 2015. ISSN 1220-4749 (Print) 1220-4749.

KALOUSOVA, M.; ZIMA, T. [AGEs and RAGE - advanced glycation end-products and their receptor in questions and answers]. **Vnitr Lek**, v. 60, n. 9, p. 720-4, Sep 2014. ISSN 0042-773X (Print) 0042-773x.

KATSAROU, A. et al. Type 1 diabetes mellitus. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 17016, Mar 30 2017. ISSN 2056-676x.

KHAUSTOVA, S. et al. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. **Analyst**, v. 135, n. 12, p. 3183-92, Dec 2010. ISSN 0003-2654.

KIM, C. Gestational diabetes: risks, management, and treatment options. **Int J Womens Health**, v. 2, p. 339-51, Oct 7 2010. ISSN 1179-1411.

KOLB, H.; MARTIN, S. Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. **BMC Med**, v. 15, n. 1, p. 131, Jul 19 2017. ISSN 1741-7015.

KRULJAC, I. et al. Diabetic ketosis during hyperglycemic crisis is associated with decreased all-cause mortality in patients with type 2 diabetes mellitus. **Endocrine**, v. 55, n. 1, p. 139-143, Jan 2017. ISSN 1355-008x.

LEE, Y. H. et al. Salivary transcriptomic biomarkers for detection of ovarian cancer: for serous papillary adenocarcinoma. **J Mol Med (Berl)**, v. 90, n. 4, p. 427-34, Apr 2012. ISSN 0946-2716.

LEITE, R. S.; MARLOW, N. M.; FERNANDES, J. K. Oral health and type 2 diabetes. **Am J Med Sci**, v. 345, n. 4, p. 271-3, Apr 2013. ISSN 0002-9629.

LILLIU, M. A. et al. Diabetes causes morphological changes in human submandibular gland: a morphometric study. **J Oral Pathol Med**, v. 44, n. 4, p. 291-5, Apr 2015. ISSN 0904-2512.

LIMA, D. P. et al. Saliva: reflection of the body. **Int J Infect Dis**, v. 14, n. 3, p. e184-8, Mar 2010. ISSN 1201-9712.

LIN, C. C. et al. Impaired salivary function in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus with xerostomia. **J Diabetes Complications**, v. 16, n. 2, p. 176-9, Mar-Apr 2002. ISSN 1056-8727 (Print)
1056-8727.

LOGMINIENE, Z.; NORKUS, A.; VALIUS, L. [Direct and indirect diabetes costs in the world]. **Medicina (Kaunas)**, v. 40, n. 1, p. 16-26, 2004. ISSN 1010-660x.

LOPEZ-PINTOR, R. M.; CASANAS, E.; GONZALEZ-SERRANO, J. Xerostomia, Hyposalivation, and Salivary Flow in Diabetes Patients. v. 2016, p. 4372852, 2016.

MELVIN, J. E. et al. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. **Annu Rev Physiol**, v. 67, p. 445-69, 2005. ISSN 0066-4278 (Print)
0066-4278.

MESE, H.; MATSUO, R. Salivary secretion, taste and hyposalivation. **J Oral Rehabil**, v. 34, n. 10, p. 711-23, Oct 2007. ISSN 0305-182X (Print)
0305-182x.

MOORE, P. A. et al. Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 92, n. 3, p. 281-91, Sep 2001. ISSN 1079-2104 (Print) 1079-2104.

NAITO, R.; KASAI, T. Coronary artery disease in type 2 diabetes mellitus: Recent treatment strategies and future perspectives. **World J Cardiol**, v. 7, n. 3, p. 119-24, Mar 26 2015. ISSN 1949-8462 (Print).

NAVAZESH, M. Methods for collecting saliva. **Ann N Y Acad Sci**, v. 694, p. 72-7, Sep 20 1993. ISSN 0077-8923 (Print)
0077-8923.

OBAYASHI, K. Salivary mental stress proteins. **Clin Chim Acta**, v. 425, p. 196-201, Oct 21 2013. ISSN 0009-8981.

OJEDA, J. J.; DITTRICH, M. Fourier transform infrared spectroscopy for molecular analysis of microbial cells. **Methods Mol Biol**, v. 881, p. 187-211, 2012. ISSN 1064-3745.

PEDERSEN, A. M. et al. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. **Oral Dis**, v. 8, n. 3, p. 117-29, May 2002. ISSN 1354-523X (Print)

1354-523x.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 106, n. 2, p. 165-9, Jul 2000. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738.

PFAFFE, T. et al. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. **Clin Chem**, v. 57, n. 5, p. 675-87, May 2011. ISSN 0009-9147.

PIROLA, L.; JOHNSTON, A. M.; VAN OBBERGHEN, E. Modulation of insulin action. **Diabetologia**, v. 47, n. 2, p. 170-84, Feb 2004. ISSN 0012-186X (Print)

0012-186x.

PUTTASWAMY, K. A.; PUTTABUDHI, J. H.; RAJU, S. Correlation between Salivary Glucose and Blood Glucose and the Implications of Salivary Factors on the Oral Health Status in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. **J Int Soc Prev Community Dent**, v. 7, n. 1, p. 28-33, Jan-Feb 2017. ISSN 2231-0762 (Print)

2231-0762.

RAO, P. V. et al. Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. **J Proteome Res**, v. 8, n. 1, p. 239-45, Jan 2009. ISSN 1535-3893 (Print)

1535-3893.

RATHNAYAKE, N. et al. Salivary biomarkers for detection of systemic diseases. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61356, 2013. ISSN 1932-6203.

REZNICK, A. Z. et al. Free radicals related effects and antioxidants in saliva and serum of adolescents with Type 1 diabetes mellitus. **Arch Oral Biol**, v. 51, n. 8, p. 640-8, Aug 2006. ISSN 0003-9969 (Print)

0003-9969.

SABINO-SILVA, R. et al. Increased SGLT1 expression in salivary gland ductal cells correlates with hyposalivation in diabetic and hypertensive rats. **Diabetol Metab Syndr**, v. 5, n. 1, p. 64, Oct 24 2013. ISSN 1758-5996 (Print) 1758-5996.

SALEH, J. et al. Salivary hypofunction: an update on aetiology, diagnosis and therapeutics. **Arch Oral Biol**, v. 60, n. 2, p. 242-55, Feb 2015. ISSN 0003-9969.

SATO, T. et al. TAGE (toxic AGEs) theory in diabetic complications. **Curr Mol Med**, v. 6, n. 3, p. 351-8, May 2006. ISSN 1566-5240 (Print)

1566-5240.

SAXENA, S. et al. A Review of Salivary Biomarker: A Tool for Early Oral Cancer Diagnosis. **Adv Biomed Res**, v. 6, p. 90, 2017. ISSN 2277-9175 (Print)

2277-9175.

SBD. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015–2016)**. AC Farmacêutica, São Paulo, 2016.

SCOTT, D. A. et al. Diabetes-related molecular signatures in infrared spectra of human saliva. **Diabetol Metab Syndr**, v. 2, p. 48, Jul 14 2010. ISSN 1758-5996.

SEVERCAN, F. et al. FT-IR spectroscopy in diagnosis of diabetes in rat animal model. **J Biophotonics**, v. 3, n. 8-9, p. 621-31, Aug 2010. ISSN 1864-063x.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 87, n. 1, p. 4-14, Jan 2010. ISSN 0168-8227.

SIMA, C.; GLOGAUER, M. Diabetes mellitus and periodontal diseases. **Curr Diab Rep**, v. 13, n. 3, p. 445-52, Jun 2013. ISSN 1534-4827.

SINGH, V. P. et al. Advanced glycation end products and diabetic complications. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 18, n. 1, p. 1-14, Feb 2014. ISSN 1226-4512 (Print)

1226-4512.

SRINIVASAN, S. et al. Corneal and Retinal Neuronal Degeneration in Early Stages of Diabetic Retinopathy. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 58, n. 14, p. 6365-6373, Dec 1 2017. ISSN 0146-0404.

TAKADA, T. et al. Serum monomeric alpha2-macroglobulin as a clinical biomarker in diabetes. **Atherosclerosis**, v. 228, n. 1, p. 270-6, May 2013. ISSN 0021-9150.

TATULIAN, S. A. Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a method of choice for studying membrane proteins and lipids. **Biochemistry**, v. 42, n. 41, p. 11898-907, Oct 21 2003. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960.

TICKOTSKY, N.; OFRAN, Y. Integrating genomic data from high-throughput studies with computational modeling reveals differences in the molecular basis of hyposalivation between type 1 and type 2 diabetes. **Clin Oral Investig**, v. 22, n. 1, p. 151-159, Jan 2018. ISSN 1432-6981.

TORQUATO, M. T. et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirao Preto (Sao Paulo), Brazil. **Sao Paulo Med J**, v. 121, n. 6, p. 224-30, Nov 6 2003. ISSN 1516-3180 (Print)

1516-3180.

UMPIERREZ, G.; KORYTKOWSKI, M. Diabetic emergencies - ketoacidosis, hyperglycaemic hyperosmolar state and hypoglycaemia. **Nat Rev Endocrinol**, v. 12, n. 4, p. 222-32, Apr 2016. ISSN 1759-5029.

UMPIERREZ, G. E. et al. Randomized study of basal-bolus insulin therapy in the inpatient management of patients with type 2 diabetes undergoing general surgery (RABBIT 2 surgery). **Diabetes Care**, v. 34, n. 2, p. 256-61, Feb 2011. ISSN 0149-5992.

VATTA, M. S. et al. Salivary glands and noradrenergic transmission in diabetic rats. **Auton Autacoid Pharmacol**, v. 22, n. 2, p. 65-71, Apr 2002. ISSN 1474-8665 (Print)

1474-8665.

VEERMAN, E. C. et al. Human glandular salivas: their separate collection and analysis. **Eur J Oral Sci**, v. 104, n. 4 (Pt 1), p. 346-52, Aug 1996. ISSN 0909-8836 (Print)

0909-8836.

VERNILLO, A. T. Diabetes mellitus: Relevance to dental treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 91, n. 3, p. 263-70, Mar 2001. ISSN 1079-2104 (Print)

1079-2104.

WINOCOUR, P. H. Diabetes and chronic kidney disease: an increasingly common multi-morbid disease in need of a paradigm shift in care. **Diabet Med**, Dec 16 2017. ISSN 0742-3071.

WU, Y. et al. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. **Int J Med Sci**, v. 11, n. 11, p. 1185-200, 2014. ISSN 1449-1907.

WYLIE-ROSETT, J.; HERMAN, W. H.; GOLDBERG, R. B. Lifestyle intervention to prevent diabetes: intensive and cost effective. **Curr Opin Lipidol**, v. 17, n. 1, p. 37-44, Feb 2006. ISSN 0957-9672 (Print)
0957-9672.

XIAO, H. et al. Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. **Mol Cell Proteomics**, v. 11, n. 2, p. M111.012112, Feb 2012. ISSN 1535-9476.

YEH, C. K. et al. Hyperglycemia and xerostomia are key determinants of tooth decay in type 1 diabetic mice. **Lab Invest**, v. 92, n. 6, p. 868-82, Jun 2012. ISSN 0023-6837.

YOSHIZAWA, J. M. et al. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, n. 4, p. 781-91, Oct 2013. ISSN 0893-8512.

ZALEWSKA, A. et al. Salivary lysosomal exoglycosidases profiles in patients with insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetes mellitus. **Adv Clin Exp Med**, v. 22, n. 5, p. 659-66, Sep-Oct 2013. ISSN 1899-5276 (Print)
1899-5276.

ZHANG, L. et al. Discovery and preclinical validation of salivary transcriptomic and proteomic biomarkers for the non-invasive detection of breast cancer. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15573, Dec 31 2010. ISSN 1932-6203.

ZHENG, Y.; LEY, S. H.; HU, F. B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **Nat Rev Endocrinol**, Dec 8 2017. ISSN 1759-5029.

ZHUO, X.; ZHANG, P.; HOERGER, T. J. Lifetime direct medical costs of treating type 2 diabetes and diabetic complications. **Am J Prev Med**, v. 45, n. 3, p. 253-61, Sep 2013. ISSN 0749-3797.