KAREN MÜLLER RAMALHO

**TERAPIA COM LASER EM BAIXA INTENSIDADE NA PREVENÇÃO DOS
EFEITOS CAUSADOS PELA ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NA
PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE FIBROBLASTOS**

Dissertação de Mestrado Apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2007

KAREN MÜLLER RAMALHO

**TERAPIA COM LASER EM BAIXA INTENSIDADE NA PREVENÇÃO DOS
EFEITOS CAUSADOS PELA ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NA
PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE FIBROBLASTOS**

Dissertação de Mestrado Apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:
Biologia Celular e Tecidual

Orientadora:
Marinilce Fagundes dos Santos

São Paulo

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Karen Müller Ramalho.

Título da Dissertação: Terapia com laser em baixa intensidade na prevenção dos efeitos causados pela elevada concentração de glicose na proliferação e migração de fibroblastos.

Orientador(a): Marinilce Fagundes dos Santos.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 124, referente ao projeto intitulado “*Alterações decorrentes da exposição a uma elevada concentração de glicose em células HSG (Human Salivary Gland) – potencial envolvimento do TGF-β1*” sob a responsabilidade de **Karen Muller Ramalho**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEP SH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 30 de novembro de 2005.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Vice Coordenador em Exercício
CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEP SH - ICB/USP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,
com amor e gratidão

Este trabalho teve apoio financeiro da FAPESP em forma de auxílio à pesquisa. A pós-graduanda recebeu bolsa de Mestrado da CAPES durante esse período.

Devemos
fazer da queda, um passo de dança
do medo, uma escada
do sonho, uma ponte
da procura, um encontro

Fernando Pessoa

RESUMO

Ramalho KM. Terapia com laser em baixa intensidade na prevenção dos efeitos causados pela elevada concentração de glicose na proliferação e migração de fibroblastos [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

Muitas complicações do Diabetes Mellitus, dentre elas a deficiência na cicatrização de feridas, estão associadas à hiperglicemia crônica, que promove estresse oxidativo e glicação protéica aleatória. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da elevada concentração de glicose (ECG) sobre a migração, proliferação e morte de fibroblastos cultivados, e o potencial da terapia com laser em baixa intensidade (LILT) (660 e 780 nm; 40mW; 2, 5, 10 e 30J/cm²) na prevenção desses efeitos. A ECG reduziu a proliferação em cerca de 40%, reduziu a migração em 50% e aumentou a morte celular em 30%. A irradiação diária com LILT em 660nm e 10J/cm² mostrou-se eficaz na prevenção desses efeitos sobre a proliferação e migração celular. A ECG também aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio pelas células, um efeito não observado em células irradiadas com LILT. Dessa forma, pode-se sugerir que a terapia com LILT favorece a proliferação e migração de células cultivadas sob ECG, processos essenciais para a cicatrização, possivelmente através de um efeito antioxidante.

PALAVRAS CHAVES: Diabetes Mellitus, cicatrização, LILT.

ABSTRACT

Ramalho KM. Prevention of high glucose concentration effects in fibroblasts proliferation and migration by low intensity laser therapy [Master Thesis]. São Paulo: Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo; 2007.

Diabetic complications, including wound healing deficiency, are usually associated to chronic hyperglycemia, which leads to oxidative stress and aleatory protein glycation. The aim of this study was to evaluate the effects of high glucose concentrations (HGC) on proliferation, migration and death of cultured fibroblasts, as well as the potential effect of low intensity laser therapy (LILT) (660 and 780 nm; 40mW; 2, 5, 10 and 30J/cm²) preventing these effects. HGC reduced cell proliferation in about 40%, cell migration in about 50% and increased cell death in 30%. Daily irradiation at 660nm and 10J/cm² was efficient preventing the effects on cell proliferation and migration. HGC also increased the production of reactive oxygen species, an effect totally prevented by LILT. The results suggest that LILT favors cell proliferation and migration, processes very important for healing, possibly through an anti-oxidant effect.

KEY WORDS: Diabetes Mellitus, wound healing, LILT.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus (DM) é uma desordem metabólica que acomete 200 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo a 12^o causa de morte (*World Health Organization*). Está associado a uma insuficiência da insulina, que pode ser causada tanto pela baixa produção de insulina pelo pâncreas, como pela falta de resposta dos tecidos periféricos a este hormônio, resultando num aumento no nível sanguíneo de glicose (hiperglicemia) (Neville et al., 1995; Robbins et al., 1989). Os níveis sanguíneos normais de glicose situam-se entre 70 e 120mg/dl; em indivíduos diabéticos, estes níveis encontram-se frequentemente entre 200 e 400 mg/dl.

O DM é geralmente dividido em dois grupos: insulina-dependente (DMID) ou tipo I e não insulina-dependente (DMNID), ou tipo II. O DMID é caracterizado por uma deficiência acentuada na produção de insulina, geralmente desde a infância (Neville et al., 1995; Robbins et al., 1989). Os indivíduos geralmente apresentam hiperglicemia intensa e cetoacidose, necessitando de injeções de insulina exógena para sobreviver. O DMNID é mais freqüente em adultos e pessoas obesas e está associado a uma baixa responsividade à insulina. Embora a hiperglicemia esteja presente, a cetoacidose raramente se desenvolve (Neville et al., 1995; Robbins et al., 1989).

O DM é uma doença importante quando se consideram as inúmeras complicações dele decorrentes e o seu impacto econômico na sociedade. A causa mais comum de hospitalização de indivíduos diabéticos provém de feridas crônicas, de difícil cicatrização e com recorrência de infecções (Frykberg, 1999). Uma das principais complicações é a doença vascular periférica, devido à microangiopatia, que pode resultar num acometimento isquêmico dos membros. A isquemia predispõe o indivíduo a infecções graves, como por exemplo, a gangrena, que pode gerar uma necessidade de amputação do membro. A cada ano, 20.000 amputações de membros inferiores são realizadas nos EUA devido a complicações gangrenosas do DM (Neville et al., 1995). Os mecanismos envolvidos nesta

complicação, no entanto, não estão completamente elucidados (Greenhalgh, 2003). Além da microangiopatia, outras complicações como neuropatia, retinopatia e falência de órgãos, como por exemplo, os rins, são freqüentes.

1.2. Alterações celulares causadas pela hiperglicemia

A hiperglicemia crônica pode modificar proteínas intra e extracelulares através de glicação (glicosilação não enzimática e aleatória) em suas porções amina, alterar o metabolismo celular pela formação de radicais livres e causar uma expressão aberrante de diferentes fatores de crescimento, como por exemplo TGF- β (*Transforming Growth factor β*) e CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*). Fatores de crescimento, atuando provavelmente em combinação, são responsáveis pelo desenvolvimento de complicações crônicas importantes, inclusive na microvasculatura (Chiarelli et al., 2000).

O quadro crônico de hiperglicemia pode também atuar sobre as células através de vias bioquímicas como a via do poliol e das hexosaminas (Browlee, 2001). Existem algumas hipóteses para explicar os efeitos deletérios da via do poliol aumentada no DM, mas a mais provável é a diminuição de glutathione reduzida (GSH) devido a uma diminuição da quantidade de NADPH citosólico (o NADPH seria consumido na redução da glicose pela enzima aldose redutase para formação de sorbitol). Já que o NADPH é necessário para a regeneração de GSH e este, por sua vez, é uma importante defesa contra o estresse oxidativo intracelular; seu decréscimo na hiperglicemia exacerbaria o estresse oxidativo. Espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas por fosforilação oxidativa, atividade da NADPH oxidase, xantina oxidase, ou desacoplamento de lipoxigenases. Uma vez formadas, ROS oxidam lípidos, DNA e proteínas, ocasionando alterações na estrutura e função celulares. Além disso, depletam defesas anti-oxidantes, deixando as células e tecidos afetados mais susceptíveis ao dano oxidativo e podem atuar como segundos mensageiros na regulação de vias sinalizadoras intracelulares e de expressão gênica.

A hiperglicemia intracelular também estimula a síntese *de novo* de diacilglicerol (DAG), ativando diversas isoformas da proteína cinase C (PKC) em diferentes tipos celulares. A ativação da PKC tem sido relacionada à redução na produção de óxido nítrico (Craven et al., 1997), contribuindo para a indução da

expressão de TGF- β 1 e conseqüente aumento da deposição de MEC (matriz extracelular) em vasos. Adicionalmente, a PKC também pode ser ativada devido à ativação da via do poliol ou pelo aumento da geração de ROS durante estresse oxidativo (Keogh et al., 1997). Um evento muito importante na presença de hiperglicemia intracelular é a glicação de moléculas, formando os produtos finais de glicação, ou AGEs (Degenhardt et al., 1998). Basicamente, os AGEs se formam devido à auto-oxidação intracelular da glicose, gerando dicarbonilas reativas (glyoxal, methylglyoxal e 3-deoxyglucosone) que reagem com grupos amina intra e extracelulares.

Os AGEs possuem estabilidades variadas, com meia-vida variando de dias a anos sob condições fisiológicas (Verziji et al., 2000; Ahmed, 2005) e com muitos efeitos biológicos. Alguns AGEs fazem ligações cruzadas entre proteínas (Paul & Bailey, 1996), podendo promover sua desnaturação, conferir resistência à proteólise e alterar as interações célula-MEC. Quando se formam em sítios críticos em enzimas ou outras proteínas, estão associadas com inativação enzimática e perda da função fisiológica (Sakamoto et al., 2002). Além disso, proteínas plasmáticas modificadas por AGEs ligam-se a receptores em células endoteliais, macrófagos e células mesangiais, aumentando a produção de ROS (Brownlee, 2001).

AGEs podem atuar em fibroblastos através de receptores distribuídos pela membrana celular (RAGEs) e assim promover efeitos como a diminuição da síntese de colágeno (Owen, 1998) ou ativação de caspases envolvidas na apoptose (Alikhani et al., 2005). AGEs podem também alterar a sinalização de receptores para fatores de crescimento, como por exemplo do EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Portero-otín et al., 2002) ou até mesmo alterar a estrutura de fatores de crescimento como o FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor 2*) (Giardino et al., 1994).

1.3. A cicatrização no diabetes mellitus

No DM o processo de cicatrização encontra-se alterado por diversos fatores com supressão de reações inflamatórias, diminuição da angiogênese, alteração na proliferação de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, aumento na apoptose de queratinócitos e células endoteliais, diminuição na migração de

fibroblastos, defeitos na deposição de colágeno e diminuição na produção de fatores de crescimento (Goodson e Hunt, 1977; Werner et al., 1994; Baumgartener-Parzer et al., 1995; Doxey et al., 1995; Mehlen et al., 1996; Tanaka et al., 1996; Shaw et al., 1997; Hehenberger et al., 1998; Spravchicov et al., 2001; Loots 2002; Lerman et al., 2003; Deveci et al., 2005). Além disso, a doença vascular periférica e neuropatia também influenciam negativamente a reparação tecidual (Lerman et al., 2003).

Quando há perda da integridade de um tecido, os fibroblastos são estimulados a proliferar e migrar para o sítio da lesão, onde sintetizam colágeno e proteoglicanas, restabelecendo a integridade do tecido. O fibroblasto possui um papel central no processo de deposição de MEC e sua remodelação. Suas funções na síntese de MEC e na sinalização (secretando importantes fatores de crescimento) são de grande importância para a cicatrização. E, se por algum motivo, a proliferação e migração dos fibroblastos encontrarem-se alteradas, a cicatrização será debilitada (Clark et al., 1993). Alguns estudos sugeriram uma diminuição na produção de fatores de crescimento tais como KGF (*Keratinocyte Growth Factor*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) como possíveis fatores etiológicos para a cicatrização debilitada encontrada no diabético (Werner et al., 1994; Shaw et al., 1997). Os fibroblastos também secretam metaloproteinases (MMPs), que são de extrema importância na migração celular e remodelação tecidual durante o processo de cicatrização. Aparentemente, MMPs apresentam-se elevadas em feridas experimentais de ratos diabéticos e em fluidos recolhidos de feridas crônicas (Neely et al., 2000; Bullen et al., 1995).

Diversos estudos mostraram que a elevada concentração de glicose produz diversas alterações em fibroblastos e outros tipos celulares. Aparentemente, a elevada concentração de glicose leva a uma diminuição na proliferação de fibroblastos e células endoteliais e na migração de fibroblastos (Rowe et al., 1977; Goldstein et al., 1978; Turner e Bierman, 1978; Goldstein et al., 1979; Sprachikov et al., 2001; Lateef et al., 2005), ao passo que outros tipos celulares parecem reagir de forma diferente. Danesh et al. (2002), por exemplo, relataram um aumento na proliferação de células mesangiais tratadas com alta concentração de glicose (30mM) e o mesmo efeito foi relatado em células musculares lisas (Avena et al., 1999). Lerman et al. (2003), verificaram uma diminuição de 75% na capacidade

migratória de fibroblastos derivados da pele de ratos, cultivados em elevada concentração de glicose, mas não verificaram alterações na proliferação celular. Por outro lado, Hehenberger et al. (1998) relataram uma diminuição significativa na proliferação de fibroblastos provenientes de feridas dos pés de diabéticos. Esse resultado foi confirmado por Loots et al., em 1999. Jochen et al. (2006), verificaram que o tratamento com insulina não foi capaz de reverter este efeito em diabéticos.

Estudos experimentais e clínicos demonstraram que a alta concentração de glicose induz apoptose em células endoteliais, queratinócitos e células progenitoras neurais, mas nenhum estudo relatou o mesmo efeito em fibroblastos (Baumgartner-Parzer et al., 1995; Mehlen et al., 1996; Deveci et al., 2005; Fu 2006).

Diversas terapias têm sido utilizadas na tentativa de melhorar a reparação tecidual sob condições hiperglicêmicas, com resultados promissores: aplicação de fatores de crescimento exógenos como o FGF, KGF, TGF β 1, PDGF, diversos agentes antioxidantes e também a aplicação do *laser* em baixa intensidade (Pierce et al., 1992; Robson et al., 1992; Puolakkainen, et al., 1995; Heggors et al., 1997; Shukla et al., 1997).

1.4. Terapia com *laser* em baixa intensidade (LILT)

A utilização do *laser* operando em baixa intensidade tem sido estudada desde a década de 1960. O primeiro *laser* da história foi construído em 1960 por Theodore Maiman na Califórnia – EUA (Maiman 1960). Era um *laser* de Rubi, operando em 694.3nm.

A palavra *laser* é um acrônimo com origem na língua inglesa: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação). A radiação *laser* é monocromática, ou seja, emite radiações em um único comprimento de onda. É uma radiação com coerência espacial e temporal, onde as ondas propagam-se com a mesma fase no espaço e tempo. Essas características permitem a obtenção de uma alta densidade de energia concentrada em pontos, e com o auxílio de dispositivos ópticos, sua radiação pode ser ainda polarizada. Essa radiação é eletromagnética não ionizante, sendo um tipo de fonte luminosa com características distintas da luz fluorescente ou de luz halógena. Dessa forma, as características inerentes da luz *laser* lhes conferem propriedades terapêuticas importantes, assim como pode ser

também utilizada em cirurgias (*Laser em Alta Intensidade ou Cirúrgico*) (Gutknecht e Eduardo, 2004).

As radiações produzidas pelos *lasers* têm basicamente as mesmas características, porém os resultados clínicos podem ser diferentes. O meio ativo onde é gerada a radiação geralmente dá nome ao *laser*, determinando sua pureza espectral e seu comprimento de onda, conferindo características diferentes de emissão e de possível ação biológica.

O comprimento de onda é fator determinante da interação *laser*-tecido. Corresponde à distância percorrida pela onda em uma oscilação completa, sendo medida em nanômetros (nm). É extremamente importante, pois é fator determinante na penetração dos fótons no tecido-alvo (Bourgelaie 1983; Fuller 1983). Diferentes comprimentos de onda apresentam diferentes coeficientes de absorção para o mesmo tecido. A monocromaticidade do *laser* determina a absorção seletiva por parte dos cromóforos. As radiações emitidas na região do ultravioleta e na região do vermelho apresentam alto coeficiente de absorção pela pele, fazendo com que a radiação seja absorvida na superfície, enquanto que na região do infravermelho constata-se baixo coeficiente de absorção, implicando em máxima penetração no tecido (Karu 1987).

Os *lasers* terapêuticos mais utilizados nas décadas de 70 e 80 foram os de He-Ne (Hélio-Neônio) com emissão na região do visível. Nesta região do espectro eletromagnético, a radiação *laser* apresenta pequena penetração nos tecidos biológicos, o que limita sua utilização. Para aplicação desse tipo de *laser* em lesões mais profundas, era necessária uma fibra óptica para guiar a radiação até o local de aplicação, limitando e contra-indicando muitas vezes esse tipo de terapia, por ser uma técnica invasiva. Outra limitação do *laser* de He-Ne era sua grande dimensão e a curta vida útil do equipamento, visto que o gás He-Ne permeava rapidamente a parede da ampola de vidro onde era contido.

No final da década de 70 começaram a ser desenvolvidos diodos *laser* semicondutores, dando origem ao primeiro diodo operando na região do infravermelho próximo (904nm). Dentre as vantagens em comparação ao He-Ne estão a menor dimensão e maior penetração no tecido. Em 1981 apareceu, pela primeira vez, o relato da aplicação clínica para atenuação da dor por um diodo *laser* As-Ga-Al (Arseneto-Gálio-Alumínio), publicado por Calderhead.

Devido às suas características de aliviar a dor, estimular a reparação tecidual, reduzir o edema e hiperemia nos processos antiinflamatórios, prevenir infecções, além de atuar em parestesias e paralisias, a terapia com *laser* em baixa intensidade tem sido empregada frequentemente em múltiplas especialidades médicas e odontológicas (Albergel et al., 1984; Lyon et al., 1987; Conlan et al., 1996; Reddy et al., 2001; Gutknecht e Eduardo 2004) . Utiliza-se essa terapia para melhorar a cicatrização no tratamento de queimados e de pacientes que receberam algum tipo de enxerto ou retalhos, ativando a vascularização dessas regiões, assim como no tratamento de dores agudas e crônicas de diversos tipos (Kert e Rose 1989). Também é frequentemente utilizado por fisioterapeutas e por médicos em pacientes que sofrem de traumas esportivos, em quadros de distensões e contraturas musculares (Tunér e Hode, 1996). Estudos evidenciaram aumento na microcirculação local (Maier et al., 1990), alteração no sistema linfático (Lievens 1990, 1991), proliferação de células epiteliais (Steinlechner e Dyson, 1993) e fibroblastos (Lubart et al., 1995; Webb et al., 1998; Pereira 2002), assim como aumento da síntese de colágeno (Enwemeka et al., 1990; Skinner et al., 1996; Araújo et al., 2007). Muitos estudos clínicos foram publicados confirmando esses efeitos (Trelles et al., 1989, Bihari e Mester, 1989; Rochkind et al., 1989; Kameya et al., 1995; Tang et al., 1997; Reddy et al., 1998).

Os *lasers* utilizados nesse tipo de terapia estão situados na porção visível do espectro das radiações eletromagnéticas, bem como no infravermelho próximo. Os comprimentos de onda mais utilizados estão entre 600 e 1000nm, pois são relativamente pouco absorvidos e apresentam uma boa transmissão na pele e nas mucosas. O milliwatt (mW) é mais comumente utilizado para especificar a irradiância nesses sistemas (Trelles et al., 1989; Mester e Mester 1989, Rochkind et al., 1989; Terribile et al., 1992). A dose, fluência ou densidade de energia, é a quantidade de energia por unidade de área transferida à matéria. Geralmente é medida em J/cm² e é o parâmetro mais importante para observação dos resultados obtidos com essa terapia.

A ação de diferentes comprimentos de onda no metabolismo celular vem sendo estudada por diferentes autores. Já se sabe que a ação desses *lasers* varia segundo a posição que ocupam no espectro das ações eletromagnéticas, e que sua ação sobre as células é diferente para os comprimentos de onda infravermelhos e para os visíveis (Karu 1988). Entretanto, a resposta clínica não

varia intensamente. A literatura mostra que não há efeitos colaterais ou contra-indicações relacionados à terapia com *laser* em baixa intensidade, desde que essa terapia seja administrada corretamente e que não haja incidência do feixe, direta ou indiretamente, nos olhos (Tuner e Hode, 1998; Kert et al., 1989).

1.5. Efeitos do *laser* em baixa intensidade nas células

A terapia utilizando *lasers* em baixa intensidade não é baseada em aquecimento, ou seja, a energia dos fótons absorvidos não é transformada em calor. Quando a luz interage com as células ou tecidos, se administrada na dose adequada, certas funções celulares poderão ser estimuladas (Karu, 1989). O mecanismo de interação do *laser* em nível molecular foi descrito primeiramente por Karu (1988). A energia dos fótons de uma radiação *laser* absorvida por uma célula é transformada em energia bioquímica e utilizada na cadeia respiratória.

Karu (1988) descreveu um mecanismo de ação diferente para os *lasers* emitindo radiação na região do visível e do infravermelho próximo. A luz visível induz uma reação foto-química, ou seja, há uma direta ativação da síntese de enzimas (Bolognani et al., 1993; Ostuni et al., 1994; Bolton et al., 1995) e essa luz tem como primeiro alvo o citocromo c na mitocôndria. A absorção da luz pelos componentes da cadeia respiratória causaria sua ativação e oxidação de NADH, levando a uma alteração no potencial redox mitocondrial. A ativação da cadeia transportadora de elétrons levaria a um aumento do potencial eletrolítico da membrana mitocondrial e aumento de ATP, alcalinização do citoplasma e, finalmente, ativação na síntese de ácidos nucleicos. As organelas não absorvem luz infravermelha, apenas as membranas apresentam resposta a este estímulo. As alterações no potencial de membrana causadas pela energia dos fótons no infravermelho próximo induzem efeitos que se traduzem intracelularmente por um incremento na síntese de ATP (Passarela et al., 1984; Karu 1989). Estes incrementos de ATP que se produzem após a irradiação com *laser* favorecem um grande número de reações que interferem no metabolismo celular (Passarela et al., 1984; Pourreau-Schneider et al., 1989; Friedman et al., 1991).

Recentemente, um estudo realizado por Zhang et al. (2003) avaliou a expressão gênica em fibroblastos humanos irradiados com *laser* em baixa intensidade (628nm; 0.88 J/cm²), verificando que 111 genes tiveram sua expressão

alterada. A maioria destes genes estava direta ou indiretamente relacionada com o aumento da proliferação celular e supressão da apoptose. Diversos genes relacionados a efeitos antioxidantes e ao metabolismo energético da mitocôndria também estavam mais expressos após a irradiação com *laser*. Estudos *in vitro* utilizando fibroblastos descrevem um efeito modulador da síntese protéica, proliferação e síntese de colágeno, dependendo das características e parâmetros utilizados (Mester e Mester, 1989; Karu 1990; Al-Watban e Zhang, 1994) Outros estudos confirmaram esses efeitos *in vivo* (Abergel et al., 1987; Trelles et al., 1989; Bihari e Mester, 1989; Halevy et al., 1997).

O significado biológico e clínico da coerência do *laser* ainda não está bem definido. Karu (1987), com base em estudos com cultura de células e bactérias, demonstrou que a coerência não é importante. A mesma conclusão foi feita por Young et al. (1990), após estudos em macrófagos e fibroblastos utilizando fontes de luz não-coerente. A coerência da luz perde-se nos primeiros estratos da pele, devido ao fenômeno de dispersão, antes que se produza a absorção dos fótons por cromóforos como a melanina, hemoglobina, porfirinas, citocromo oxidase, entre outros (Hazeki e Tamura 1989; Young et al., 1990; Lubart et al., 1995). Dessa forma, conclui-se que os efeitos biológicos dos *lasers* operando em baixa potência dependem principalmente de sua monocromaticidade (Berki, 1988; Karu 1987; Kubota et al., 1989; Bihari e Mester 1989) e da fluência (Shiroto et al., 1989; Lubart et al., 1992; Karu et al., 1996).

O efeito do *laser* é particularmente evidenciado se as células em questão tem sua função debilitada (Karu 1989). Trabalhos encontrados na literatura mostram que a terapia com luz *laser* em baixa intensidade tem efeitos mais pronunciados sobre órgãos ou tecidos enfraquecidos, tais como em pacientes que sofrem algum tipo de desordem funcional ou de injúria ao tecido (Túner e Hode, 1998) ou células cultivadas em deficiência nutricional (Almeida-Lopes et al., 2001; Pereira et al., 2002; Eduardo et al., 2007).

1.6. Efeito do *laser* em baixa intensidade na reparação tecidual

Diversos estudos *in vivo* utilizando animais de laboratório e pacientes sugerem que a regeneração tecidual é favorecida pela terapia com *laser* em baixa

intensidade. Mester produziu uma série de trabalhos desde meados da década de 60 e concluiu que o *laser* em baixa intensidade acelerava a divisão celular e aumento na síntese de colágeno. Em 1985, Mester verificou, por exemplo, aumento de 78% na velocidade de reparação das feridas após aplicação de um *laser* de He-Ne (632.8 nm, 50mW) e um *laser* de Argônio (488nm, 100mW) com a fluência de 4J/cm². Alterações na síntese e remodelação de colágeno, número de fibroblastos, diâmetro e força de tração das feridas tratadas, viabilidade dos enxertos tratados, vascularização, vasodilatação e no sistema linfático já foram associadas ao *laser* em baixa intensidade (Gal et al., 2006).

Kameya et al. (1995) irradiaram feridas no dorso de ratos com *laser* de diodo em diferentes comprimentos de onda (632.8, 680, 830nm) e observaram maior proliferação celular no tecido conjuntivo e maior presença de vasos sanguíneos.

Estudos *in vitro* utilizando células cultivadas também foram realizados, sendo observado efeito do *laser* em baixa intensidade na proliferação, migração celular e síntese de colágeno. Pourreau-Schneider et al. (1989) estudaram a proliferação de fibroblastos de gengiva humana irradiados com *laser* de He-Ne e verificaram que após uma ou duas irradiações não havia alteração no número de células, porém a partir da terceira irradiação houve um aumento estatisticamente significativo. Em 1990, Haas et al. verificaram aumento de 3x na velocidade migratória de queratinócitos.

Lubart et al. (1992) estudaram os efeitos de *lasers* diodo operando em diferentes comprimentos de onda (360, 632, 780nm) sobre a proliferação de fibroblastos e verificaram que o número de mitoses aumentou significativamente quando foi utilizada a fluência até 15J/cm². Quando utilizada a fluência de 60J/cm², o número de mitoses diminuiu. Em 1993, Steinlechner e Dyson concluíram que tanto o *laser* de HeNe como de diodo operando em 904nm (0.25J/cm²) estimulam a proliferação de queratinócitos.

Em 1994, Loevschall e Arenholt-Bindslev, estudaram os efeitos de um diodo *laser* de comprimento de onda de 812nm sobre a proliferação de fibroblastos de gengiva humana, com fluências de 4.5 a 4500 mJ/cm². Houve aumento da síntese de DNA, com efeito máximo na fluência de 459mJ/cm². Os mesmos resultados foram confirmados por Webb et al. (1998), utilizando um diodo *laser* em 660nm sobre duas linhagens de fibroblastos humanos com fluências de 2.4 e 4 J/cm².

1.7. **Laser em baixa intensidade e cicatrização de feridas de diabéticos**

Diversos estudos mostraram efeitos benéficos da terapia com *laser* em baixa intensidade acelerando a cicatrização de feridas em ratos diabéticos. Um dos primeiros estudos foi realizado por Tsuchida et al. (1991), em feridas cirúrgicas de ratos normais e diabéticos, irradiadas com *laser* de He-Ne ($5\text{J}/\text{cm}^2$) e verificou-se aceleração da cicatrização. Yu et al. (1997) verificaram que a irradiação (632.8nm , 20mW , $5\text{J}/\text{cm}^2$ durante 4 dias) de feridas cutâneas de ratos geneticamente diabéticos resultou em um aumento significativo na velocidade de reparação das feridas, acelerando a re-epitelização, formação do tecido de granulação e aumentando a deposição de colágeno. Reddy (2003), verificou que a irradiação com *laser* Ga-AS (904nm – 7mW - $1\text{J}/\text{cm}^2$ – 5 dias/semana durante 3 semanas) em feridas no dorso de ratos diabéticos promoveu um aumento de 14% na deposição de colágeno, em comparação a ratos diabéticos não irradiados, além de promover cicatrizes com maior resistência a tensões. Byrnes et al. (2004) avaliaram a cicatrização de feridas no dorso de ratos com diabetes tipo II e verificaram que cicatrização dos animais diabéticos irradiados foi mais rápida (HeNe 632nm – 16mW – $4\text{J}/\text{cm}^2$), além de haver um aumento na produção de FGF nas feridas de animais irradiados. Maiya et al., (2005) irradiou com *laser* de HeNe (632.8nm ; $4.8\text{J}/\text{cm}^2$; 5 dias/semana até terminar a cicatrização) feridas no dorso de ratos diabéticos e verificou completa cicatrização depois de 18 dias, ao passo que os animais diabéticos não irradiados tiveram a média da cicatrização da ferida no 59^a dia. Os animais irradiados nesse estudo apresentaram uma maior quantidade de colágeno no tecido cicatricial, um aumento na proliferação de fibroblastos e quantidade de capilares formados.

2. CONCLUSÕES

O cultivo de fibroblastos em elevada concentração de glicose leva a uma diminuição no seu crescimento e migração, além de aumentar a morte celular.

A terapia com *laser* em baixa intensidade foi efetiva na prevenção dos efeitos sobre a proliferação e migração, mas apenas quando realizada a cada 24 horas.

O comprimento de onda de 660nm foi mais efetivo do que o 780nm, principalmente na fluência de 10 J/cm^2 , na prevenção dos efeitos da elevada concentração de glicose sobre a migração e crescimento celular.

A terapia com *laser* em baixa intensidade não preveniu os efeitos da elevada concentração de glicose na morte celular.

Um possível mecanismo de ação do *laser* em baixa intensidade é uma ação anti-oxidante, já que a irradiação reduziu a geração de ROS.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed N. Advanced glycation end products - Role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005; 67(1): 3-21.

Albergel RP, Meeker CA, Lam TS. Control of connective tissue metabolism by lasers: recent developments and future perspectives. *J Am Acad Dermat.* 1984; 11: 1142-1150.

Albergel RP, Lyons RF, Castel JC, Dwyer RM, Uitto J. Biostimulation of wound healing by lasers: Experimental approaches in animal models and in fibroblast cultures. *J Dermatol Surg Oncol.* 1987; 13(2): 127-133.

Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM, Nagao K, Trackman PC, Graves DT. Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J Biol Chem.* 2005 Apr 1; 280(13): 12087-12095.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblast proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med.* 2001; 29: 179-184.

Al-Watban FAH, Zhang Z. Dosimetry-related wound healing response in the rat model following helium neon laser LLT. *Laser Therapy.* 1994; 119-124.

Araújo ENC, Ribeiro MS, Favaro R, Zezell DM, Zorn TMT. Ultrastructural and radiographical analysis show faster skin repair in He-Ne laser treated wounds. *J Photochem Photobiol B.* 2007; 86: 87-96.

Avena R, Mitchell ME, Carmody B, Arora S, Neville RF, Sidaway AN. Insulin-like growth factor-1 receptors mediate infrageniculate vasacular smooth muscle cell proliferation in response to glucose and insulin not by insulin receptor. *Am J Surg.* 1999; 178: 156-161.

Babazono T, Kapor-Drezgic J, Dlugosz JA, Whiteside C. Altered expression and subcellular localization of diacylglycerol-sensitive protein kinase C isoforms in diabetic rat glomerular cells. *Diabetes.* 1998; 47(4): 668-676.

Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Pettermann M, Grillari J, Gessl A, Waldhausl W. High-glucose triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes*. 1995; 44: 1323-1327.

Berki T. Biological effect of low power helium neon (HeNe) laser irradiation. *Lasers Med Sci*. 1988; 3: 35-40.

Bihari J, Mester AR. The biostimulative effects of low level laser therapy on longstanding crural ulcers using helium neon laser plus infrared lasers, and noncoherent light: preliminary report of randomised double blind comparative study. *Laser Therapy*. 1989; 1(2): 97- 102.

Bolognani L, Majni G, Costato M, Milani M. ATPase and ATPsynthetase activity in myosin exposed to low power laser and pulsed eletromagnetic fields. *Bioelec Bioene*. 1993; 32:155-164.

Bourgelaie DBC. The physics of lasers. In: Arndt, KA. *Cuttaneous laser therapy*. New Yourk: John Wiley & Sons, 1983.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 13; 414(6865):813-820.

Bullen EC, Longaker MT, Updike DL, Benton R, Ladin D, Hou Z, Howard EW. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol*. 1995; 104: 236-240.

Byrnes Kr, Barna L, Chenault M, Waynant RW, Ilev IK, Longo L, Miracco C, Johnson B, Anders JJ. Photobiomodulation improves cutaneous wound healing in an animal model of type II diabetes. *Photomed Laser Surg*. 2004; 22 (4): 281-290.

Calderhead RG. The Nd:YAG and GaAlAs lasers: a laser comparative analysis in pain therapy. In Atsumi K, Nimsakul N. *Laser*. Tokyo: Japan Society for Laser Medicine, 1981.

Chiarelli F, Santilli F, Mohn A. Role of growth factors in the development of diabetic complications. *Horm Res*. 2000; 53: 53-67.

Clark RAF. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. J Invest Dermatol. 1993; 11(4): 647-661.

Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low energy laser irradiation. J Clin Periodontol. 1996; 23: 492-496.

Cosio FG. Effects of high glucose concentrations on human mesangial cell proliferation. J Am Soc Nephrol. 1995; 5: 1600-1609.

Craven PA, Studer RK, Felder J, Phillips S, DeRubertis FR. Nitric oxide inhibition of transforming growth factor-beta and collagen synthesis in mesangial cells. Diabetes. 1997; 46(4): 671-81.

Danesh FR, Sadeghi MM, Amro N, Phillips C, Zeng L, Lin S, Sahai A, Kanwar YS. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors prevent high glucose-induced proliferation of mesangial cells via modulation of Rho GTPases/p21 signaling pathway: Implications for diabetic nephropathy. PNAS. 2002; 11(12): 8301-8305.

Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 1998 Nov; 44(7): 1139-1145.

Deveci M, Gilmont RR, Dunham WR, Mudge BP, Smith DJ, Marcelo CL. Glutathione enhances fibroblasts collagen contraction and protects keratinocytes from apoptosis in hyperglycaemic culture. British J Dermatol. 2005; 152: 217-224.

Doxey DL, Ng MC, Dill RE, Iacopino AM. Platelet-derived growth factor levels in wounds of diabetic rats. Life Sci. 1995; 57(11): 1111-1123.

Eduardo FPE, Mehnert DU, Monezi TA, Zezzel DM, Schubert MM, Eduardo CP, Marques MMM. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. Lasers Surg Med 2007; 39:365-372.

Enwemeka CS, Rodriguez O, Gall N, Walsh N. Morphometries of collagen fibril population in He-Ne laser photostimulated tendons. J Clin Laser Med Surg. 1990; 10: 47-52.

Friedman H, Lubart R, Laulicht I. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol B*. 1991; 11: 87-95.

Friedman EA. Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care*. 1999; 22(2): 65-71.

Frykberg RG. Epidemiology of the diabetic foot: ulcerations and amputations. *Adv Wound Care*. 1999; 12: 139-141.

Fu J, Tay SSw, Ling EA, Dheen ST. High glucose alters the expression of genes involved in proliferation and cell-fate specification of embryonic neural stem cells. *Diabetologia*. 2006; 49(5):1027-1038.

Fuller AT. Fundamentals of lasers in surgery and medicine. In: Dixon JA (Ed). *Surgical applications of lasers*. Chicago: Year Book Medical Publisher, 1983.

Gal P, Vidinsky B, Toporcer T, Mokry M, Mozes S, Longauer F, Sabo J. Histological assessment of the effect of laser irradiation on skin wound healing in rats. *Photom Laser Surg*. 2006; 24(4): 480-488.

Gavish L, Asher Y, Becker Y, Kleinman Y. Low level laser irradiation stimulates mitochondrial membrane potential and disperses subnuclear promyelocytic leukemia protein. *Lasers Surg Med*. 2004; 35: 369-376.

Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. *J Clin Invest*. 1994 Jul; 94(1): 110-117.

Goldstein S, Moerman EJ, Soeldner JS, Gleason RE, Barnett DM. Chronologic and physiologic age affect replicative life-span of fibroblasts from diabetic, prediabetic and normal donors. *Science*. 1978; 199: 781-782.

Goldstein S, Moerman EJ. Diabetes mellitus and genetic prediabetes. *J Clin Invest*. 1979; 63: 358-370.

Goodson WH, Hunt TK. Studies of wound healing in experimental diabetes mellitus. *J Surg Res*. 1977; 22: 221-227.

Greenhalgh DG. Wound healing and diabetes mellitus. *Clin Plast Surg*. 2003; 30: 37-45.

Gutknecht N, Eduardo CPE. A odontologia e o laser. Atuação do laser na especialidade odontológica. Quintessence, 2004.

Haas AF, Isserott RR, Wheeland RG, Rood PA, Graves PHI. Low energy Helium-Neon laser irradiation increases the motility of cultured human keratinocytes. *S Invest Dermatol Inc* 1990; 4: 822-826.

Halevy S, Lubart R, Reuveni H, Grossman N. Infrared (780nm) low level laser therapy for wound healing in vivo and in vitro studies. *Laser Therapy* 1997; 9: 159-164.

Han DC, Isono M, Hoffman BB, Ziyadeh FN. High glucose stimulates proliferation and collagen type I synthesis in renal cortical fibroblasts: mediation by autocrine activation of TGF-beta. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10: 1891-1989.

Hawkins D, Abrahamse H. Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. *Photom Laser Surg*. 2005; 23(3): 251-259.

Hawkins D, Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low level laser therapy on the cellular response of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Lasers Surg*. 2006a; 24(6): 705-714

Hawkins D, Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers Surg Med*. 2006b; 38: 74-83.

Hayashi JN, Ito H, Kanayaasu T, Asuwa N, Morita I, Ishii T, Murota S. Effects of glucose on migration, proliferation and tube formation by vascular endothelial cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1991; 60: 245-252.

Hazeki O, Tamura M. Near infrared quadruple wl. Spectrophotometry of rat head. *Adv Exper Med Biol*. 1989; 248: 63-66.

Hehenberger K, Heilborn JD, Brismar K, Hansson A. Inhibited proliferation of fibroblasts derived from chronic diabetic wounds and normal dermal fibroblasts

treated with high glucose is associated with increase formation of l-lactate. *Wound Repair Regen.* 1998; 6: 135-141.

Heggers JP, Elzaim H, Garfield R. Effect of combination of aloe vera, nitroglycerin, and l-NAME on wound healing in the rat excisional model. *J Altern Complement Med.* 1997; 3: 149-153.

Higuchi C, Sanaka T, sato T, Omata M, Watanabe M, Mine S, Inuzuka N, Nihei H. The effect of glucose on the proliferation of peritoneal fibroblasts. *Adv Perit Dial.* 1997; 13: 253-256.

Johnen C, Hartmann B, Steffen I, Bräutigam K, Witascheck T, Toman N, Küntscher MV, Gerlach JC. Skin cell isolation and expansion for cell transplantation is limited in patients using tobacco, alcohol, or are exhibiting diabetes mellitus. *Burns.* 2006; 26: 194-200.

Kameya T, Ide SH, Acorda JA, Yamada H, Taguchi K, Abe N. Effects of different wavelengths of low level laser therapy on wound healing in mice. *Laser Therapy.* 1995; 7: 33-36.

Kannan K, Jain SK. Effect of high glucose on cellular proliferation and lipid peroxidation in cultured Vero cells. *Horm Metab Res.* 1994; 26:322-325.

Karu TI. Photobiological fundaments of low power laser therapy. *IEEE Journal Quantum Eletronics QE-23.* 1987; 10: 1703-1717.

Karu TI. Molecular mechanism of therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers Life Sci.* 1988; 2(1): 53-74.

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

Karu TI. Effects of visible radiation on cultured cells. *Photochem Photobiol.* 1990; 52(6): 1089-1098.

Karu TI, Lyapunova TS, Pomoshnikova NA. The activation of yeast metabolism with He-Ne laser radiation. Relationship between the activity of catalase and stimulation of protein synthesis. *Lasers in Life Sciences.* 1993; 5(4): 251-257.

Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS, Esenaliev RO. Effects of monochromatic low intensity light and laser irradiation on adhesion of He La cells in vitro. *Lasers Surg Med.* 1996; 18: 171-177.

Karu T. The science of low power laser therapy. Amsterdam: Gordon Breach 1998.

Kato K, Shinzawa K, Yoshikawa S. Cytochrome oxidase is a possible photoreceptor in mitochondria. *Photobiochem Photobiophys.* 1981; 2: 263-269.

Kawalec JS, Hetherington VJ, Pfennigwerth TC, Dockery DS, Dolce M. Effect of a diode laser on wound healing by using diabetic and nondiabetic mice. *J Foot & Ankle Surg.* 2004; 43(4): 214-220.

Keogh RJ, Dunlop ME, Larkins RG. Effect of inhibition of aldose reductase on glucose flux, diacylglycerol formation, protein kinase C, and phospholipase A2 activation. *Metabolism.* 1997; 46(1): 41-7.

Kert J, Rose L. Clinical laser therapy: low level laser therapy. Copenhagen: Scandinavian Medical Laser Technology, 1989

Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes.* 1998; 47: 859-866.

Kreisler M, Christoffers AB, Willerstaen B, d'Hoedt B. Effect of low level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 353-358.

Kubota J, Ohshiro T. The effects of diode laser low reactive level laser therapy (LILT) on flap survival in a rat model. *Laser Therapy.* 1989; 1(3): 127-130.

Kubasova T, Kovacs L, Somosy Z, Unk P, Kokai A. Biological effect of He-Ne laser: investigations on functional and micromorphological alterations of cell membranes in vitro. *Lasers Surg Med.* 1984; 4: 381-388.

Lateef H, Aslam MN, Stevens MJ, Varani J. Pretreatment of diabetic rats with lipoic acid improves healing of subsequently-induced abrasion wounds. *Arch Dermatol Res.* 2005; 297: 75-83.

Lerman OZ, Galiano RD, Armour M, Levine JP, Gurtner GC. Lerman OZ, Galiano RD, Armour M, Levine JP, Gurtner GC. Impairment in migration, vascular endothelial growth factor production and response to hypoxia. *Am J Pathol.* 2003; 162(1): 303-312.

Lievens PC. The effect of a combined He-Ne and IR laser treatment on the regeneration of the lymphatic system during the process of wound healing. *Lasers News.* 1990; 3(3): 3-9.

Lievens PC. The effect of IR laser irradiation on the vasomotricity of the lymphatic system. *Laser Med Sci.* 1991; 6: 189-191.

Loevschall H, Arenholt-Bindslev D. Effects of low level diode laser irradiation of human oral mucous fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med.* 1994; 14: 347-354.

Loots MAM, Kenter SB, Au FL. Fibroblasts derived from chronic diabetes ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-I, bFGF and PDGF-AB compared to controls. *Eur J Cell Biol.* 2002; 81: 153-160.

Loots MAM, Lamme EN, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E. Cultured fibroblasts from chronic diabetic wounds on the lower extremity (non-insulin-dependent diabetes mellitus) show disturbed proliferation. *Arch Dermatol Res.* 1999; 291: 93-99.

Lubart R, Wollman Y, Friedmann H et al. Effects of visible and near infrared lasers on cell culture. *J Biochem Photobiol.* 1992; 12: 305-310.

Lubart R, Friedman H, Sinyakov M, Shiman A, Grossman N, Adamek M, Shainberg A. The effect of He-Ne laser (633nm) radiation on intracellular Ca^{2+} concentration in fibroblasts. *Laser Therapy.* 1997; 9: 115-120.

Lyon RF, Abergel RP, White RA et al. Biostimulation of wound healing in vivo by helium neon laser. *Ann Plast Surg.* 1987; 18: 47-50.

Maier M, Haina D, Landthaler M. Effect of low energy laser on the growth and regeneration of capillaries. *Lasers Med Sci.* 1990; 5: 381-386.

Maiman TH. Stimulated optical radiation in ruby. *Nature.* 1960; 187: 493-494.

Maiya AG, Kumar P, Rao L. Effect of low intensity helium neon (HeNe) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. *Photom Laser Surg.* 2005; 23(2): 187-190.

Mehlen P, Schulze-Osthoff K, Arrigo A. Small stress protein as novel regulators of apoptosis. *J Biol Chem.* 1996; 271: 16510-16514.

Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med.* 1985; 5: 31-39.

Mester AF, Mester A. Wound healing. *Laser Therapy.* 1989; 1(1): 7-15.

Moore P, Ridgway TD, Higdee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low intensity laser irradiation stimulates cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med.* 2005; 36: 8-12.

Nahman NSJR, Leonhart KL, Cosio FG, Hebert CL. Effects of high glucose on cellular proliferation and fibronectin production by cultured human mesangial cells. *Kidney Int.* 1992; 41: 396-402.

Nakao-Hayashi J, Ito H, Kawashima S. Na oxidative mechanism is involved in high glucose induced serum protein modification causing inhibition of endothelial cell proliferation. *Atherosclerosis.* 1992; 97: 89-95.

Neely NA, Clendening CE, Gardner J, Greenhalgh DG. Gelatinase activities in wounds of healing-impaired mice versus wounds of non-healing –impaired mice. *J Burn Care Rehabil.* 2000; 21: 395-402.

Nelson DM, Curran EM. High glucose levels decrease proliferation of cultured human fetal cells from placenta. *Am J Obstet Gynecol.* 1989; 161: 1553-1558.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral & Maxilofacial.* Editora Guanabara, 1995.

Ostuni A, Passarella S, Quaglianiello E. The nergy dose dependent of the activity of glutamate dehydrogenase irradiated with helium neon lasaer. *Laser Technol.* 1994; 4(1): 13-16.

Owen WF Jr, Hou FF, Stuart RO, Kay J, Boyce J, Chertow GM, Schmidt AM. Beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products modulates collagen synthesis by human fibroblasts. *Kidney Int.* 1998 May; 53(5):1365-73.

Park SH, Choi HJ, Lee JH, Woo CH, Kim JH, Han HJ. High glucose inhibit renal proximal tubule cell proliferation and involves PKC, oxidative stress and TGF- β 1. *Kidney Int.* 2001; 59: 1695-1705.

Passarella S, Casamassima E, Molinari S, Pastore D, Quagliariello E, Catalano IM, Cingolani A. Increase of proton electrochemical and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *FEBS Lett.* 1984; 175(1): 95-9.

Paul RG, Bailey AJ. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996; 28(12): 1297-1310.

Pekiner C, Cullum NA, Hughes JN, Hargreaves AJ, Mahon J, Casson IF, McLean WG. Glycation of brain actin in experimental diabetes. *J Neurochem.* 1993; 61: 436-442.

Pereira AN, Eduardo CPE, Matson E, Marques MM. Effect of low power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002; 31: 263-267.

Pierce GF, Vande Berg J, Rudolph R. Platelet-derived growth factor-bb and transforming growth factor beta 1 selectively modulates glycosaminoglycans, collagen and myofibroblasts in excisional wounds. *Am J Pathol* 1992; 138: 629-646.

Porte DJ, Schwartz MW. Diabetes complications: why is glucose potentially toxic? *Science.* 1996; 272: 699-700.

Portero-Otin M, Pamplona R, Bellmunt MJ, Ruiz MC, Prat J, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Advanced glycation end product precursors impair epidermal growth factor receptor signaling. *Diabetes.* 2002; 51(5): 1535-1542.

Pourreau-Schneider N, Soudry M, Remusat M, Franquin JC, Martin PM. Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblasts. *Quintessence Int.* 1989; 20 (12): 887-893.

Puolakkainen PA, Twardzik DR, Ranchalis JE. The enhancement in wound healing by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) depends on the topical delivery system. *Ann Surg Res.* 1995; 58: 321-329.

Rabelo SB, Villaverde AB, Nicolau RA, Salgado MAC, Melo MS, Pacheco TT. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level-laser therapy. *Photom Laser Surg.* 2006; 24(4): 474-479.

Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. *Lasers Surg Med.* 1998; 22: 281-287.

Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. *Wound Rep Reg.* 2001; 9: 248-255.

Reddy GK. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and Infrared Ga-As Lasers on healing impaired diabetic rat wounds. *Lasers Surg Méd.* 2003; 33: 344-351.

Ribeiro MS. Interação da radiação laser linearmente polarizada de baixa intensidade com tecidos vivos: efeitos na aceleração de cicatrização tissular em lesões de pele [Disseratação] – São Paulo - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2000.

Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. *Patologia Estrutural e Funcional*. Editora Guanabara, 1989.

Robson MC, Phillips LG, Thomason LE. Platelet-derived growth factor bb for the treatment of chronic pressure ulcers. *Lancet.* 1992; 339: 23-25.

Rochkind S, Rousso M, Nissan M, Villareal M, Barr-Nea L, Rees DG. Systemic effects of low power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. *Lasers Surg Med.* 1989; 9: 174-182.

Rowe DW, Starman BJ, Fujimoto WY, Williams RH. Abnormalities in proliferation and protein synthesis in skin fibroblasts cultures from patients with diabetes mellitus. *Diabetes.* 1977; 26: 284-290.

Sakamoto H, Mashima T, Yamamoto K, Tsuruo T. Modulation of heat-shock protein 27 (Hsp27) anti-apoptotic activity by methylglyoxal modification. *J Biol Chem*. 2002; 277(48): 45770-45778.

Shaw JE, Boulton AJ. The pathogenesis of diabetic foot problems: an overview. *Diabetes*. 1997; 46(2): 58-61.

Shioto MC, Sugawara K, Kumae T, sasaki K, Ohshiro T. effect of diode laser radiation in vitro on activity of human neutrophils. *Laser Therapy*. 1989; 1(3): 135-140.

Shukla A, Rasik AM, Patnaik GK. Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defence enzymes in a healing cutaneous wound. *Free Radic Res*. 1997; 26: 93-101.

Skinner SM, Gage JP, Wilce PA, Shaw RM. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. *Aust Dent J*. 1996; 41(3):188-192.

Spravchikov N, Sizyakov G, Gartsbein M, Accili D, Tennenbaum T, Wertheimer E. Glucose effects on skin keratinocytes. *Diabetes*. 2001; 50: 1627-1635.

Steinlechner CWB, Dyson M. The effects of low level laser therapy on the proliferation of keratinocytes. *Laser Therapy*. 1993; 5: 65-73.

Tanaka E, Ase K, Okuda T, Okumura N, Nogimori K. Mechanism of acceleration of wound healing by basic fibroblast growth factor in genetically diabetic mice. *Biol Pharm Bull*. 1996; 19: 1141-1148.

Tang J, Godlewski G, Rovy S, Delacretaz G. Morphologic changes in collagen fibers after 830nm diode lasers welding. *Lasers Surg Med*. 1997; 21: 438-443.

Terribile WMV, Corti L, Velussi C, Ceccherelli F, Boso C, Belfontali S. Experimental wound healing with coherent and non-coherent radiation. *Laser Technol*. 1992; 2(3): 121-134.

Tsuchida T, Aizawa K, Baba J, Furukawa K, Yamamoto H, Kawate N, Konaka CH, Kato H, Hayata Y, Ishitsuki M. Wound healing in mice He-Ne scanning laser. *J Clin Med Surg*. 1991; 9(4): 265-266.

Tuner J, Hode L. Laser Therapy in dentistry and medicine. Stockholm: Prima Books, 1996.

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

Turner JL, Bierman EL. Effects of glucose and sorbitol on proliferation of cultured human skin fibroblasts and arterial smooth muscle cells. *Diabetes.* 1978; 27: 583-588.

Trelles MA, Mester A, Rigau J, Mayayo E, Rosa A, Lapin R. Clinical use of He-Ne laser for wound healing. *J Bloodless Med Surg.* 1989; 7(1): 3-7.

Van-Breugel HHFI, Bär D. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than the total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med.* 1992; 12:528-537.

Verziji N, DeGroot J, Thorpe SR, Bank RA, Shaw JN, Lyons TJ, Bijlsma JW, Lafeber FP, Baynes JW, TeKoppele JM. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 2000; 275(50): 39027-39031.

Webb C, Dyson M, Lewis WH. Stimulatory effect of 660nm low level laser energy on hypertrophic scar derived fibroblasts: possible mechanism of increase in cell counts. *Lasers Surg Med.* 1998; 22: 294-301.

Werner S, Breiden M, Hubner G, Greenhalgh DG, Longaker Mt. Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse. *J Invest Dermatol.* 1994; 103: 469-473.

Williams SK, Howarth NL, Devenny JJ, Bitensky MW. Structural and functional consequences of increased tubulin glycosylation in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982; 79: 6546-6550.

Wolf G, Sharma K, Chen Y. High glucose induced proliferation in mesangial cells is reverted by autocrine TGF- β . *Kidney Int.* 1992; 42: 647-656.

Yamamoto M, Patel NA, Taggart J, Sridhar R, Cooper DR. A shift from normal to high glucose levels stimulates cell proliferation in drug sensitive MCF-7 human breast cancer cells but not in multidrug resistant MCF-7/ADR cells with overproduce PKC- β II. *Int J Cancer*. 1999; 83: 98-106.

Young SR, Dyson M, Bolton P. Effects of light on calcium uptake by macrophages. *Laser Therapy*. 1990; 2(2): 53-57.

Yu W, Naim JO, Lanzaforme RF. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. *Photochem Photobiol*. 1994; 59(2): 167-170.

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

Zhang Y, Song S, Fong CC, Tsang CH, Yang Z, Yang M. cDNA Microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblasts cells irradiated with red light. *J Inv Dermatol* 2003; 120: 849-857.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to *Biomedical Journal*: sample references. C2003 – [update 2005 June 15; cited 2006 May 16].

Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html