



Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós-graduação em Saúde Brasileira

Carolina de Lourdes Julião Vieira Rocha

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE
A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E O PROCESSO DE REPARO
TECIDUAL DE FERIDAS CUTÂNEAS DE CAMUNDONGOS
DIABÉTICOS**

Juiz de Fora
2010

Carolina de Lourdes Julião Vieira Rocha

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE
A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E O PROCESSO DE REPARO
TECIDUAL DE FERIDAS CUTÂNEAS DE CAMUNDONGOS
DIABÉTICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, área de concentração Saúde Brasileira, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup

Juiz de Fora
2010

Rocha, Carolina de Lourdes Julião Vieira.

Avaliação da terapia laser de baixa intensidade sobre a resposta inflamatória e o processo de reparo tecidual de feridas cutâneas de camundongos diabéticos / Carolina de Lourdes Julião Vieira Rocha. – 2010.

112 f. : il.

Dissertação (Mestrado Saúde Brasileira)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

1. Laser. 2. Diabetes mellitus. I. Título.

CDU 621.375.826

Carolina de Lourdes Julião Vieira Rocha

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE
A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E O PROCESSO DE REPARO
TECIDUAL DE FERIDAS CUTÂNEAS DE CAMUNDONGOS
DIABÉTICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, área de concentração Saúde Brasileira, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em: dd/mm/aaaa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Frank Silva Bezerra
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Maria das Graças Afonso Miranda Chaves
Universidade Federal de Juiz de Fora

Para minhas queridas filhas Larissa e Izabella que estiveram ao meu lado em todas as fases e momentos desta jornada, apoiando-me com seus inocentes sorrisos cheios de carinho e amor!

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pela saúde e forças em todos os momentos desta jornada, por me guiar em todas as decisões de minha vida e por acalantar meu coração quando precisei me ausentar da família em prol desta obra.

Às minhas pequenas Larissa e Izabella: obrigada por existirem em minha vida! Com seus sorrisos inocentes me deram forças nos momentos difíceis, de desespero e angústia, trouxeram paz e alegria em minha vida. Obrigada por serem tão boazinhas e comportadas para que eu pudesse terminar o mestrado! Tudo que faço é pensando em vocês e é por vocês. A mamãe ama muito vocês!

Ao meu marido Adeir pelo apoio e amor! Por acreditar que este trabalho seria possível. Pelo incentivo a seguir em frente, me trazendo sempre as soluções para os problemas. Pela ajuda profissional e financeira para o desenvolvimento deste projeto. Por entender minha falta como esposa neste momento de minha vida. Por cuidar das pequenas nos meus momentos ausentes! Amor, esta vitória é nossa! Muito obrigada!

À minha irmã Bia, minha primeira professora, amiga de todas as horas, exemplo de pessoa e de profissional! Obrigada pela ajuda e apoio fundamentais para a realização deste trabalho, pois sei que mesmo sem tempo dedicou-se, especialmente nas correções finais e na parte histopatológica e imuno-histoquímica. Obrigada pelos ensinamentos ao longo da minha vida. Agradeço a você, minha irmã, que me proporcionou estar onde estou e ser o que sou!

Ao Fernando meu orientador, amigo e exemplo de homem e de profissional. Por acreditar em mim e por tornar possível a realização desta pesquisa, mesmo quando os obstáculos surgiram no caminho desta pesquisa. Obrigada pela paciência ao longo destes anos, por entender de maneira ímpar as minhas faltas e saber valorizar o meu esforço e dedicação. Pelos ensinamentos, dedicação e por ser esta pessoa excepcional que é!

À minha mãe pelo apoio incondicional, por me ajudar com as meninas e por ouvir meus desabafos ao longo destes anos! Pelas palavras de conforto nos momentos de desespero e por acreditar no meu potencial. As palavras são poucas para lhe agradecer por tudo que tem feito por mim e pelas minhas filhas! Muito obrigada por tudo!

À amiga e funcionária Danielly, agradeço eternamente pela essencial ajuda com minhas filhas, por sempre trazer palavras de conforto nos meus momentos de maior aflição, pelos lanches que preparou pra mim quando não dava tempo pra nada e por torcer para que esta jornada se concluísse com sucesso!

À minha irmã Tati, pelo apoio espiritual ao longo destes anos! Obrigada por rezar para que tudo desse certo!

Aos amigos Frank e Fatinha que desde a graduação acreditaram em mim e sempre me incentivaram nos estudos!

À professora Darcília, coordenadora adjunta e de ensino da PPgS que se mostrou a disposição para orientar e ajudar os alunos.

À bibliotecária Vânia, obrigada pela atenção e essencial ajuda nas correções das normas textuais exigidas pelos programas de pós-graduação.

RESUMO

O Diabetes Mellitus é um problema mundial de saúde pública, de incidência elevada, em termos de pessoas afetadas e mortalidade prematura. As ulcerações em membros inferiores são a maior causa de morbidade entre os diabéticos, tendo como consequência a amputação. Na presença desta doença, o processo cicatricial é mais dificultado. Diversos estudos estão sendo realizados com a utilização da Terapia Laser de Baixa Intensidade no processo de cicatrização e reparo tecidual. A terapia laser de baixa intensidade tem sido relatada como importante moduladora da cicatrização de feridas cutâneas. No presente estudo, nós avaliamos os efeitos da terapia laser de baixa intensidade sobre a intensidade do infiltrado inflamatório e quantidade de vasos sanguíneos em feridas cutâneas de camundongos diabéticos não obesos (NOD), adicionalmente, analisamos a expressão da enzima ciclooxigenase 2 no sítio do reparo tecidual utilizando o modelo experimental camundongos NOD para estudar a cicatrização de feridas cutâneas. Foram utilizados 30 camundongos NOD. Destes, 14 ficaram diabéticos e foram divididos em dois grupos: grupo I (n = 7), controle, composto por camundongos NOD não submetidos à terapia laser de baixa intensidade e grupo II (n = 7), tratado, composto por camundongos NOD submetidos à terapia laser de baixa intensidade nos seguintes parâmetros: 15 mW de potência, dose de 3,8 J/cm², e tempo de aplicação de 20 segundos. Após sete dias do ato cirúrgico e após aplicação do laser, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestesia e foram colhidas amostras das feridas para posterior análise histopatológica, histomorfométrica e imunohistoquímica. Os resultados em conjunto sugeriram que a terapia laser de baixa intensidade é capaz de modular negativamente a expressão da enzima ciclooxigenase 2 contribuindo para o controle da resposta inflamatória em feridas cutâneas de camundongos NOD.

Palavras-chave: Terapia Laser de Baixa Intensidade. Cicatrização. Diabetes Mellitus. Camundongos NOD. Ciclooxigenase 2.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a worldwide problem of public health, the high incidence, in terms of people affected and premature mortality. Ulcers of the lower limbs are the leading cause of morbidity among diabetic patients, which resulted in amputation. In this disease, the healing process is hampered. Several studies are being conducted with the use of low-level laser therapy in the process of healing and tissue repair. The low-level laser therapy has been reported as an important modulator of healing of skin wounds. In this study we evaluated the effects of low-level laser therapy intensity of the inflammatory infiltrate and number of blood vessels in wounds of non-obese diabetic mice (NOD), in addition, we analyzed the expression of cyclooxygenase 2 enzyme at the site of repair tissue using the NOD mice experimental model to study the healing of skin wounds. Were used thirty NOD mice, these fourteen were diabetic and were divided into two groups: group I (n = 7) underwent a surgical procedure of skin wounds and group II (n = 7) underwent a surgical procedure of skin wounds and treated with LLLT. Group II was submitted to LLLT in the following parameters: 15 mW of power, dose of 3.8 J/cm² and exposure time of 20 seconds. Seven days after surgery and after laser application, animals were euthanized with an overdose of anesthesia and were submitted collected tissue samples for subsequent histological analysis, histomorphometry and immunohistochemistry. A low-level laser therapy has promoted the inhibition of cyclooxygenase 2 expression in skin wounds in mice diabetic. The results together suggested that low-level laser therapy is able to negatively modulate the expression of cyclooxygenase 2 enzyme contributing to the inflammatory response in cutaneous wounds in NOD mice.

Keywords: Low-level laser therapy. Diabetes Mellitus. Healing. NOD mice. Cyclooxygenase 2.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADV	Adenovírus
CO ₂	Gás Carbônico
COX2	Ciclooxigenase 2
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus Tipo I
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
EGF	Fator de crescimento epidérmico
eNOS	Óxido nítrico sintases
FBM	Fotobioestimulação
FC	Fatores de Crescimento
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GaAlAs	Gálio-alumínio-arsênio
GaAlInP	Gálio-alumínio-índio-fósforo
GaAs	Arseneto de Gálio
HeNe	Hélio-neon
HLA	Sistema Antígenos Leucocitários Humanos
IFN- γ	Interferon gama
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina (IL-1, IL-6, IL-10, IL-13, IL-21)
iNOS	Óxido nítrico induzível
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LLLT	Terapia Laser de Baixa Intensidade
LPS	Lipopolysaccharide-induced

MEC	Matriz extracelular
mg/dl	miligramas por decilitro
mg/Kg	miligramas por quilo de peso
mW	miliwatts
nm	nanômetro (comprimento de onda)
nNOS	Óxido nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico
NOD	Non Obese Diabetic
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PG	Prostaglandina
Rato BB	bio-breeding
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SOD	Superóxidodismutase
STZ-D	Estreptozotocina
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador Beta
Th1	Linfócito CD4 ou helper 1
Th2	Linfócito CD4 ou helper 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial
W/cm ²	Watts por centímetro quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	DIABETES E REPARAÇÃO TECIDUAL.....	22
2.2	LASER.....	26
2.2.1	Princípios físicos do Laser.....	26
2.2.2	Tipos e interação do Laser com tecidos.....	28
2.2.3	Terapia Laser de baixa intensidade (LLLT).....	30
2.3	O PROCESSO DE REPARO TECIDUAL: IMPLICAÇÕES DO REPARO NA LLLT.....	31
2.4	FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA (TGF- β) E O REPARO TECIDUAL.....	38
2.5	CONTRIBUIÇÃO DOS MODELOS EXPERIMENTAIS.....	47
2.6	ESTUDOS EM CAMUNDONGOS NON-OBESE DIABETIC – NOD.....	53
3	OBJETIVOS	60
3.1	OBJETIVO GERAL.....	60
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60
4	MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	61
4.2	HISTOPATOLOGIA E HISTOMORFOMETRIA.....	63
4.3	IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	64
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
6	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICE	91

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) um problema de saúde pública, devido a sua alta incidência e prevalência, além do impacto sócio-econômico causado pelas morbidades que podem acompanhar a doença. A Sociedade Brasileira de Diabetes (2009) estima que a cada cinco segundos surge um novo caso da doença no mundo, ou seja, o número de casos mundiais já ultrapassou 258 milhões.

A prevalência do DM cresceu de forma vertiginosa nas últimas décadas nas Américas e em especial no Brasil. O número de indivíduos portadores da doença no ano de 2000 nas Américas foi estimado em 35 milhões. Já a estimativa para o ano de 2025, chega a marca de 64 milhões de novos casos. Acredita-se que este aumento nos países desenvolvidos ocorre em idade pré-senil e senil devido ao aumento da expectativa de vida e em virtude do crescimento populacional e do estilo de vida. Nos países em desenvolvimento, o aumento de casos da doença atinge todas as faixas etárias devido, principalmente, às condições sócio-econômicas desta população (GASTAL, PINHEIRO, VAZQUEZ, 2007; KING, AUBERT, HERMAN, 1998).

Em 2007, a população brasileira entre 20 e 79 anos de idade contava com 119 milhões e 519 mil indivíduos, entre os quais a International Diabetes Federation (IDF) constatou que cerca de 5,8%, 6.913.000 milhões de pessoas com 20 a 79 anos eram portadores de diabetes. Diante disto, a IDF realizou um cálculo de prevalência desta mesma população para o ano de 2025 e constatou um crescente aumento percentual de 11,4% dos 17 milhões 627 mil pacientes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1998).

Além da taxa de incidência, destaca-se o fato de que algumas complicações inerentes ao diabetes levam o paciente a morbidade e mortalidade prematuras. As complicações crônicas mais comuns apresentadas por estes indivíduos são as doenças cardiovasculares (infarto agudo do miocárdio), os acidentes vasculares cerebrais, as nefropatias, as neuropatias, as retinopatias diabéticas e o pé diabético (CARVALHO et al., 2004).

O pé diabético é caracterizado por lesões ulceradas em membros inferiores que quando não tratadas levam a amputação do membro em questão. Tal lesão é responsável por cerca de 20% das hospitalizações o que gera custos onerosos para o sistema público de saúde (CARVALHO et al., 2004; FERNANDES et al., 2001; MARGOLIS, BERLIN, STROM, 1999). De acordo com a International Consultative Section – Working Group on the Diabetic Foot (IWGDF, 2009), 85% das amputações poderiam ser evitadas, porém o que se observa é alarmante: a cada 30 segundos um membro inferior é amputado em decorrência do diabetes.

Diante tal realidade, esclarecimentos sobre a doença, modelos animais portadores de diabetes vêm sendo utilizados em pesquisas na busca de respostas sobre as complicações inerentes à doença e meios de evitá-la (ATKINSON, LEITER, 1999; HOMO-DELARCHE, 2001).

Estas pesquisas envolvem, classicamente, dois modelos experimentais em animais com Diabetes Mellitus Tipo I (DM1) espontânea: ratos BB (Biobreading) e camundongos NOD (Non Obese Diabetic). Estes modelos são suficientemente bem caracterizados para se traçar um paralelo com estudos clínicos em humanos (ATKINSON, LEITER, 1999; HOMO-DELARCHE, 2001).

Destes, o que utiliza o camundongo NOD é a primeira escolha. Estes camundongos são o modelo mais estudado que desenvolve a doença espontaneamente. É o animal de preferência para os cientistas por apresentar um genoma bem definido, maior quantidade de reagentes monoclonais para a análise de componentes do sistema imune e um custo razoavelmente baixo, comparado com a utilização de ratos BB (ATKINSON, LEITER, 1999).

Com o intuito de minimizar o tempo de cicatrização das lesões cutâneas em pacientes diabéticos vários estudos vêm sendo realizados. Em grande número destes estudos destaca-se o tratamento com a terapia laser de baixa intensidade (LLLT), demonstra ser um recurso clínico eficaz para cicatrização (CHROMEY, 1992; SUGRUE et al., 1990). Estudos “*in vitro*” sugerem que a LLLT facilita a síntese de colágeno (HOPKINS et al., 2004), liberando fatores de crescimento (FC’s) (YU, NAIM, LONZAFAME, 1994) além de estimular a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (FORNEY, MAURO, 1999; POURREAU-SCHNEIDER et al., 1990).

Fisiologicamente, o processo de cicatrização de feridas passa por uma seqüência de eventos que envolvem: hemostasia, inflamação (limpeza), proliferação, amadurecimento ou “remodelamento” e desconstrução ou digestão (ROCHA JÚNIOR et al., 2007; SINGER, CLARK, 1999; THOMAS, ONEILL, HARDING, 1995). Quando ocorre uma lesão tecidual o processo de reparo é modulado pela atividade celular das células da resposta inflamatória e das células da borda da lesão e por uma rede de citocinas e de fatores de crescimento que influenciam a migração, a proliferação e a diferenciação celular local (MASON et al., 2002; MURPHY et al., 2006).

Alguns autores sugerem que tal padrão das citocinas dependerá diretamente da predominância populacional do infiltrado inflamatório, seja o tipo celular predominante linfócitos ou macrófagos (GEMMELL, SEYMOUR, 1994; ROSSOMANDO et al., 2000; TOKORO et al., 1997).

Ambas as células caracterizam reações crônicas de longa duração. Os linfócitos morfológicamente se subdividem em populações funcionais – CD4, CD8, *natural killer* (NK). Enquanto que os macrófagos derivam do sistema fagocitário mononuclear (SFM) e são altamente capazes de fagocitar e liberar FC's. Os linfócitos TCD4 são subdivididos em grupos funcionais, conforme o padrão de produção de citocinas em Th1 (linfócito CD4 ou helper 1) e Th2 (linfócito CD4 ou helper 2). Esta divisão é de importância imunológica relevante, tendo em vista as funções que estas células realizam: a Th1 está funcionalmente associada a resposta imune tipicamente pró-inflamatória, realiza a mediação da resposta ao dano tissular havendo ativação de macrófagos. A resposta Th2, por sua vez é reguladora auxiliando na síntese de anticorpos por plasmócitos e ativando eosinófilos, além de participar da resposta cicatricial e processos fibróticos (ABBAS, MURPHY, SHER, 1996; HINORUBU 2002; SANDLER et al., 2003).

Estas subpopulações linfocitárias – Th1, Th2, são ativadas diante a lesão tecidual e liberam as interleucinas (IL). As células Th1 secretam interferon-gamma (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2) e as células Th2 secretam interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10), interleucina-13 (IL-13) e fator transformador beta (TGF- β) (HINORUBU, 2002; KAHN et al., 1999; OKADA, KIDA, YAMAGAMI, 1983; SANDLER, et al., 2003; TAUBMAN, KAWAI, 2001; YAMAMOTO, KAWABATA, McGHEE, 1996).

Sabe-se que muitos destes mediadores inflamatórios estão envolvidos no processo de reparo tecidual e vários estudos relatam os efeitos benéficos da LLLT no reparo tecidual de lesões cutâneas, porém o mecanismo de ação desta terapia ainda não foi elucidado e seus efeitos anti-inflamatórios são pouco relatados (AIMBIRE et al., 2006b; FILLIPIN et al., 2005; MASON et al., 2002; ROCHA JÚNIOR et al., 2006; ROCHA JÚNIOR et al., 2007; ROCHA JÚNIOR et al., 2009).

Dentre as mais relevantes na literatura estão o TGF- β (HINORUBU, 2002; MURPHY et al., 2006; WU et al., 2006). O TGF- β é uma citocina pró-inflamatória envolvida em processos fisiológicos e patológicos, incluindo remodelamento vascular (angiogênese e neogênese) e fibrose cutânea (CIPOLLONE et al., 2004; MURPHY et al., 2006). Ainda, este mediador regula múltiplas funções celulares, incluindo a atividade mitótica e a indução à diferenciação celular (MAIER et al., 2006; YASUDA, AOSHIBA, NAGAI, 2003). Através deste controle, influencia o aumento da população de fibroblastos que depositam a matriz extracelular (MEC) via síntese de colágeno e inibe a ativação de proteases que degradam esta matriz (BERNASCONI et al., 1995; SPORN, ROBERTS, 1993).

O estudo de Ranganathan et al. (2007) demonstrou que o TGF- β inibe proliferação e promove apoptose celular além de induzir angiogênese em situações de estresse oxidativo. Além do TGF- β , o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), produzida principalmente por macrófagos, é uma citocina presente em situações na qual há destruição tecidual local (OLD, 1976). A modulação da expressão desta citocina ocorre diante de reações de inflamação, na qual a apoptose atua como um importante

mecanismo de controle da resposta imunológica (AARESTRUP et al., 1995; KLINGLER et al., 1997).

Fisiologicamente, a apoptose é controlada por expressões genéticas decorrentes da interação entre meio celular e meio externo. As alterações moleculares resultam em modificações morfológicas que culminam com a formação de estruturas residuais chamadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são imunologicamente inativos, ou seja, não desencadeiam resposta inflamatória, pois os componentes celulares degradados não são extravasados para o meio extracelular, são eliminados por fagocitose. Esta remoção, realizada por macrófagos, é denominada “*clearance*” (CALDONCELLI et al., 2003).

Alguns autores destacam, além da persistência dos leucócitos no sítio da lesão, a fisiopatologia do infiltrado inflamatório como um dos fatores determinantes da patogênese da lesão secundária, na qual o estresse oxidativo se caracteriza como um dos reflexos da resposta imunológica celular exacerbada no local da inflamação (BATISTA et al., 2002; LOSCALZO et al., 2005; SCHWARZNAU et al., 2009; SHAPIRA et al., 1998).

O grau de estresse oxidativo é medido através dos níveis de antioxidantes enzimáticos (superoxidodismutase – SOD e catalase) e não enzimáticos (vitaminas E e C). Panjamurthy, Manoharan, Ramachandran (2005) demonstraram que maiores níveis de antioxidantes enzimáticos, sobretudo o SOD, associados à atividade inflamatória, decorrente do estresse oxidativo local.

Em situações de estresse oxidativo ocorre superprodução de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de oxigênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO), ácido hipocloroso (HOCl) e oxigênio (O_2). Estes produtos de radicais livres, produzidos por células

ativadas imunologicamente podem causar destruição do DNA e proteínas, oxidação de enzimas e, principalmente, estimular a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos, especialmente o TNF- α (SHAPIRA et al., 1998; SPANIKOVA et al., 2008).

Dentre os espécimes reativos de O₂, destaca-se o NO, um gás produzido em resposta a diversos estímulos inflamatórios por macrófagos, linfócitos TCD4+, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais, células ósseas e condrócitos, a partir da L-arginina por ação de enzimas denominadas NO sintases (NOS) (HIROSE et al., 2001; SHAPIRA et al., 2000).

O NO permanece no sítio inflamatório por alguns segundos após sua liberação. Por esta razão, suas enzimas precursoras são utilizadas amplamente como marcadores indiretos de seus níveis teciduais e de seu potencial de ação (KENDALL et al., 2001; MONCADA, ERUSALIMSKY, 2002).

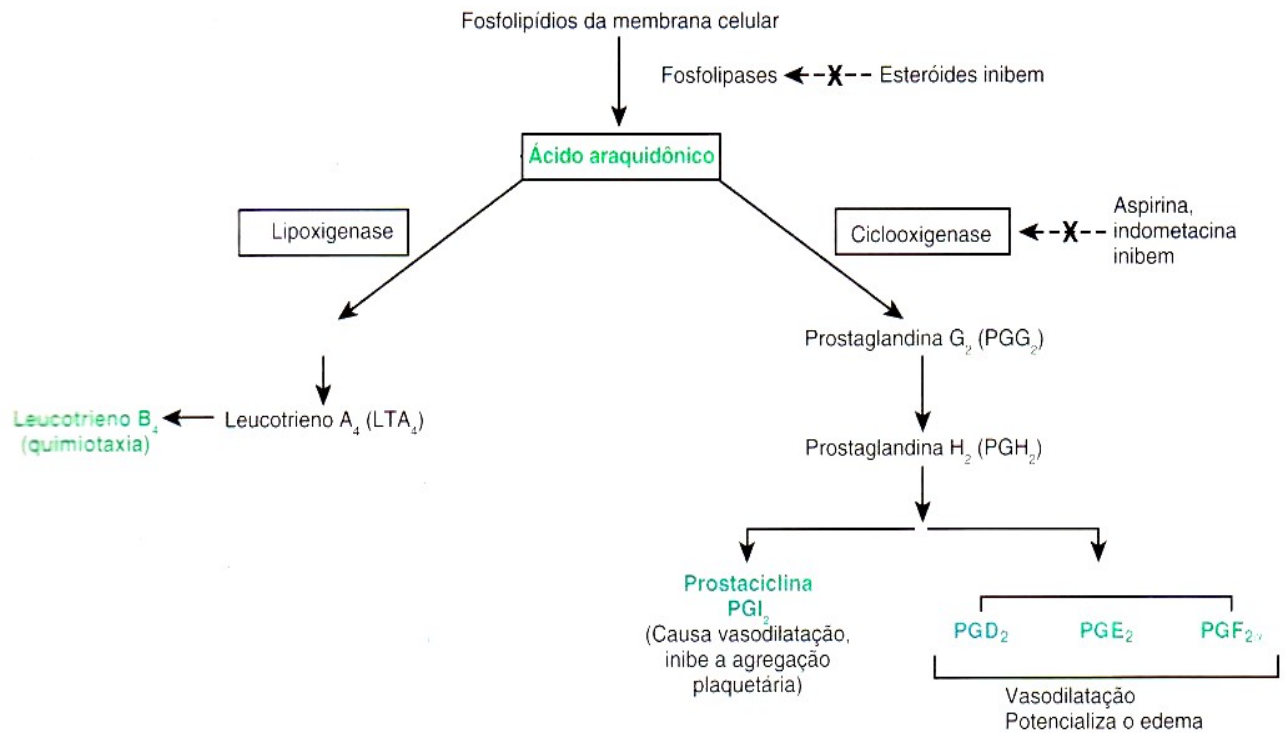
São conhecidas três isoformas enzimáticas distintas conforme sua estrutura molecular, distribuição tecidual e expressão, responsáveis pela produção de NO: NO sintase endotelial (eNOS), NO sintase neuronal (nNOS) e NO sintase induzível (iNOS) (BATISTA et al., 2002; COTRAN, KUMAR, COLLINS, 2001; SALVEMINI et al., 1997).

A iNOS está amplamente associada a eventos patológicos secundários à resposta inflamatória (BATISTA, et al., 2002; SALVEMINI, et al., 1997). O NO, em níveis fisiológicos participa da modulação da resposta imunológica contra bactérias, vírus e células tumorais. Porém, em concentrações elevadas, torna-se patológica, exercendo função citotóxica levando a lesões secundárias nas áreas inflamadas

(BATISTA et al., 2002; SUSCHEK, SCHNORR, KOLB-BACHOFEN, 2004; ZOCHODNE, LEVY, 2005).

Diversos pesquisadores tem estudado o papel imunomodulador pró-inflamatório do NO através da elevação dos níveis de ciclooxigenase 2 (COX-2), além das análises das enzimas NO sintases (BALIGA et al., 2005; BATISTA et al., 2002; BEZERRA et al., 2000; SALVEMINI et al., 1997; SUSCHEK, SCHNORR, KOLB-BACHOFEN, 2004). A COX-2 pertence à família de enzimas que convertem o ácido araquidônico em prostaglandina (PG) (Esquema 1).

Esquema 1: Metabolismo do ácido araquidônico



Fonte: Adaptado de COTRAN, KUMAR, COLLINS, 2001.

A forma induzível desta enzima é estimulada por citocinas inflamatórias, lipopolissacarídeos (LPS) e fatores de crescimento (FC) (SALVEMINI et al., 1997; LOHINAI et al., 2001).

Diversos autores têm estudado o papel do NO na modulação da COX-2 (SALVEMINI et al., 1993; SALVEMINI et al., 1997; MORTON, DONGARI-BAGTZOGLU, 2001; TIPTON et al., 2003; ZHANG, SU, JIN, 2003; MIYAUCHI et al., 2004). Os sistemas enzimáticos COX e NOS estão intimamente associados por similaridades e desenvolvem funções fisiopatológicas semelhantes. Os padrões NOS e COX são marcados pelo NO e sua capacidade biológica de elevar os níveis de prostaglandinas (PG) (SALVEMINI et al., 1993; SALVEMINI et al., 1997).

Mason et al. (2002) sugere em seu estudo envolvendo tratamento com terapia laser de baixa intensidade (LLLT) na isquemia cerebral induzida experimentalmente que este tipo de terapia pode inibir a atividade do NOS e regular a expressão do TGF- β . Outro estudo recente, ainda relata que a terapia laser pode modular a inflamação aguda e induzir uma redução nos níveis de TNF- α (AIMBIRE et al., 2006b).

Estudo realizado em nosso laboratório utilizando a LLLT como tratamento de feridas cutâneas em modelo experimental em ratos Wistar, demonstrou níveis elevados de TGF- β no grupo tratado em comparação com o grupo controle, ou seja, houve redução da resposta inflamatória e indução de regeneração tecidual, em contrapartida a terapia é importante indutora de apoptose em células epiteliais durante o processo de reparo. Os resultados sugeriram que a LLLT é um método útil e não-invasivo para regular a intensidade da reação inflamatória, sendo instrumento importante na cicatrização de feridas cutâneas (ROCHA JÚNIOR et al., 2009).

Neste trabalho, objetivamos estudar os efeitos da LLLT sobre o reparo tecidual em camundongos NOD. Avaliamos seus efeitos sobre a intensidade do infiltrado inflamatório, o número de vasos sangüíneos por campo microscópico, além de investigarmos os efeitos da terapia em questão sobre a expressão da COX2 no sítio de desenvolvimento do processo de reparo tecidual em feridas cutâneas de camundongos NOD. Esperamos, desta maneira, contribuir para o estabelecimento de novos protocolos terapêuticos adequando-os para pacientes diabéticos portadores de lesões ulceradas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DIABETES E REPARAÇÃO TECIDUAL

O Diabetes Mellitus (DM) é uma condição altamente prevalente em todo o mundo e que acomete, no Brasil, aproximadamente 8% da população (GASTAL et al. 2007). O DM pode ser classificado de acordo com sua etiologia. Até o final dos anos 90 os termos insulino dependente e não-insulino dependente eram comumente utilizados, porém, atualmente caíram em desuso (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003). Assim as formas mais usuais, mais incidentes e prevalentes são denominadas diabetes melitus tipo 1 (DM1) e diabetes melitus tipo 2 (DM2), que diferem entre si pela forma de apresentação clínica. O DM1 acomete mais freqüentemente pessoas jovens e a instalação é abrupta se caracteriza pelo caráter auto-imune, predisposição genética e influência do meio ambiente contribuindo para a patogênese da doença que envolve a destruição das células beta produtoras de insulina. O DM2 manifesta-se principalmente nos adultos-jovens (40 anos de idade) e ocorre resistência à ação da insulina com perda progressiva das células beta pancreáticas e está fortemente associado à obesidade (MILECH, OLIVEIRA, 2004).

No DM1 a auto-imunidade é mediada por monócitos, macrófagos e linfócitos T havendo destruição progressiva das células beta pancreáticas levando, numa primeira fase, à perda ou insuficiência na secreção de insulina e conseqüentemente à elevação proporcional dos níveis glicêmicos (ALEXANDRAKI et al., 2006; CESARINI et al., 2003; REWERS, KLINGENSMITH, 1997).

Ainda, o estabelecimento do DM1, tem forte associação com a expressão do sistema HLA (Antígenos Leucocitários Humanos), sendo um fator genético predisponente para o desenvolvimento e estabelecimento da doença (MELANITOU, FAIN, EISENBARTH, 2003).

Os níveis glicêmicos que permitem o diagnóstico do DM estão listados e contidos na Tabela 1.

TABELA 1: Valores de Glicose Plasmática para diagnóstico de Diabetes Mellitus

VALORES DE GLICOSE		PLASMÁTICA (mg/dl)	
CATEGORIAS	JEJUM* E/OU 2H APÓS 75G	GLICEMIA PLASMÁTICA	
		GLICOSE	CASUAL**
Glicemia de jejum alterada	>110 e <126	<140 (quando realizada)	
Tolerância a glicose diminuída	<126	> ou = a 140 e <200	
Diabetes Mellitus	> ou = a 126 ou >200	> 200***	

Fonte: Adaptado do Consenso Brasileiro de Diabetes (2003, p.8).

*Jejum: mínimo de 8 horas. Quando alterado realiza-se novo teste após duas horas com ingestão de 75 gramas de glicose.

**realizada em qualquer hora do dia.

***o paciente já apresenta sintoma clássicos da doença (poliúria, polidipsia e perda inexplicada de peso).

Em associação à hiperglicemia, o paciente apresenta alterações na resposta imunológica celular que influenciam, direta ou indiretamente, a história natural da inflamação e, conseqüentemente da cicatrização. São relatadas baixa atividade metabólica em neutrófilos, menor expressão de fatores quimiotáticos e menor adesão de leucócitos em geral às moléculas de adesão tecidual (ROCHA et al.; 2002). Ainda, os níveis glicêmicos acima dos considerados normais levam a alterações vasculares que têm como conseqüência o espessamento e a rigidez da camada íntima de arteríolas e de capilares. Este processo dificulta o mecanismo de vasodilatação necessário a diapedese; juntamente com o aumento da parede vascular, há diminuição da luz, bem como ligação estável da glicose à hemoglobina, no sítio de ligação desta com o oxigênio – acarretando isquemia e hipóxia nos tecidos irrigados pelos ramos terminais do sistema circulatório (FORNEY, MAURO, 1999).

Clinicamente, as conseqüências desta evolução no processo inflamatório são extremamente relevantes, devido às complicações agudas e crônicas associadas que se refletem diretamente no processo cicatricial, dependente de mediadores químicos, citocinas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1998; CARVALHO et al., 2004; MARGOLIS, BERLIN, STROM, 1999; PEDROSA et al.; 2004).

Os pacientes portadores desta doença possuem deficiência cicatricial apresentando evolução mais lenta na reparação de lesões quando comparados a pessoas saudáveis. Isto explica o fato dos diabéticos serem mais susceptíveis a morbidades inerentes a doença o que dificulta o processo cicatricial, como o risco aumentado para infecções, evolução da ferida, podendo levar a amputação do membro afetado (BOULTON, 2008; CATALANO, PASTORINO, 1996; CHEN et al.; 2008; FERNANDES et al.; 2001; FORNEY, MAURO, 1999; GARDNER, FRANTZ, 2008;

LINCOLN et al.; 2008; PEDROSA et al., 2004; MARGOLIS, BERLIN, STROM, 1999; WU et al.; 2008).

Tais alterações vasculares são responsáveis também por acidentes vasculares encefálicos, as ulcerações em membros inferiores, glomerulonefrite, além da própria dificuldade de cicatrização fazer com que lesões pré-existentes e feridas pós-cirúrgicas fiquem sujeitas a infecções secundárias (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1998; CARVALHO et al.; 2004; MARGOLIS, BERLIN, STROM, 1999; PEDROSA et al.; 2004). Estas infecções secundárias têm como principais sedes anatômicas os tratos respiratório e urinário, o periodonto, e “partes moles em geral” – como pele, mucosas e musculatura associada (GARDNER, FRANTZ, 2008; ROCHA et al.; 2002).

Dada a relevância clínica do retardo no processo cicatricial e sua correlação direta com a alta morbidade a qual os pacientes diabéticos estão sujeitos, diversos estudos experimentais, *in vitro* e *in vivo* vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de acelerar o processo cicatricial nesta população específica.

2.2 LASER

2.2.1 Princípios Físicos do Laser

A palavra “Laser” tem origem inglesa e significa Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (GOLDMAN, 1967; SPICER, GOLDBERG, 1996).

Em 1917, o físico Albert Einstein estudou e conceituou a emissão estimulada da radiação através de seu artigo intitulado “Zur Quantum Theories der Strahlung”, descreveu a Teoria do Quantum, na qual o átomo entra no seu estado de excitação e

retorna espontaneamente ao repouso emitindo energia através de um comprimento de onda específico. Este átomo foi denominado fóton de luz e quando ele se choca com um outro átomo excitado, este volta ao estado de repouso emitindo fóton sincrônico e similar ao primeiro fóton (GOLDMAN, 1967; SPICER, GOLDBERG, 1996).

Este processo foi denominado emissão estimulada que posteriormente recebeu o nome de “fenômeno laser” (BAGNATO, 2001). O fenômeno laser é classificado de acordo com sua ação sobre os tecidos corporais: “alta potência”, com poder destrutivo e “baixa potência”, sem potencial destrutivo em tecidos em geral (HOPKINS et al., 2004). A partir desta teoria, no final da década de 50 e início dos anos 60 desenvolveu-se o primeiro aparelho Laser, o Ruby Laser, com comprimento de onda em torno de 694nm (SPICER et al., 1996).

O aparelho de emissão do laser é formado basicamente por três componentes: uma fonte de energia, um meio ativo que pode ser sólido, líquido ou gasoso e um tubo de ressonância, ou seja, uma cavidade óptica que possui espelhos em suas extremidades. A fonte libera energia, excita os átomos, espontaneamente os mesmos retornam ao estado de metaestabilidade, ou seja, estado de excitação intermediária, posteriormente repouso. Quando a maioria dos átomos está na fase de metaestabilidade ocorre liberação de energia em forma de calor. A este processo dá-se o nome de inversão de polarização. Quando ocorre passagem para o estado de repouso, os fótons de luz são liberados ocorrendo emissão estimulada de radiação. Assim, para gerar um Laser o meio ativo deve ficar contido em cavidade óptica, e esta, por sua vez, conter espelhos nas extremidades permitindo a movimentação horizontal dos fótons dentro desta cavidade. Esta movimentação gera estados de metaestabilidade e retorno a fase de repouso, liberando ainda mais fótons, gerando

uma reação em cadeia emitindo alta quantidade de energia em curto período de tempo. A luz gerada é de alta energia composta por ondas alinhadas entre si, colimadas ou concentradas e monocromáticas, ou seja, pertencentes a um determinado comprimento de onda (GOLDMAN, 1967; BAGNATO, 2001; SPICER, GOLDBERG, 1996; TOREZAN, OSÓRIO, 1999).

2.2.2 Tipos e Interação do Laser com Tecidos

Os tipos de Lasers são classificados de acordo com a emissão de luz e o comprimento de onda (dado em nanômetros – nm) que eles emitem. A seleção do tipo de laser que se quer utilizar dependerá do objetivo que se pretende atingir.

Existem três tipos de emissão de luz pelo Laser: contínua, pseudocontínua e pulsada. A contínua emite energia de maneira constante. A pseudopulsada difere da pulsada por emitir pulsos muito rápidos com intervalos muito curtos entre eles. Já a pulsada emite energia com pulsos variados (GOLDMAN, 1967; SPICER, GOLDBERG, 1996; TOREZAN, OSÓRIO, 1999).

Alguns exemplos de tipos de Laser são o de Argônio, contínuo que penetra de um a dois milímetros (mm) na pele e tem comprimento de onda entre 488-514nm; o Laser de cobre, pseudocontínuo, utilizado para lesões pigmentadas, tem comprimento de onda de 511 e 578nm; o Laser de gás carbônico (CO₂), contínuo ou pulsado, tido como terapia de alta potência, ocorre necrose tecidual, é utilizado para cortes cirúrgicos (TOREZAN, OSÓRIO, 1999). Também encontra-se no mercado Lasers de diodo como Gálio-alumínio-índio-fósforo (GaAlInP), Hélio-neon (HeNe) e Gálio-alumínio-arsênio (GaAlAs), laser de arseneto de gálio (AsGa) aparelhos de irradiação laser de baixa

intensidade amplamente estudados por promover cicatrização tecidual. Estes modelos possuem espectro de luz vermelho e emissão infravermelha (KOLAROVA, DITRICHOVA, WAGNER, 1999; ROCHA et al., 2004).

Para designar o tipo de Laser a ser utilizado devemos nos ater para alguns princípios básicos: a irradiância, a fluência e o tempo de exposição. A irradiância consiste na quantidade de energia liberada por área de pele tratada em um pulso. Descreve a potência, ou seja, a intensidade da energia que é medida em watts por centímetro quadrado (W/cm^2). Quanto mais curto for o pulso, maior deverá ser a irradiância a fim de alcançar energia suficiente para obtenção de efeito térmico. Exemplificando, alta irradiância leva ao aquecimento rápido do tecido, ocasionando vaporização, já baixa irradiância leva à coagulação. A fluência é a energia liberada por área de tecido em específico intervalo de tempo. Descreve a intensidade de energia e é medido em joules por centímetro quadrado (J/cm^2). A fluência é diretamente proporcional à destruição tecidual, ou seja, à medida que se aumenta a fluência, a capacidade de destruição do tecido também aumenta (GOLDMAN, 1967; TOREZAN, OSÓRIO, 1999).

A interação do Laser com os tecidos dependem do tipo de Laser a ser utilizado, da forma de liberação da energia (contínua, pseudopulsada, pulsada), das características da pele ou do tecido alvo a ser tratado, do comprimento de onda (quanto menor o comprimento de onda maior sua ação e penetração no tecido). Outro ponto relevante engloba os objetivos que se pretende obter (laser de alta intensidade, lesão tecidual – incisão cirúrgica ou laser de baixa intensidade, reparação tecidual) (ANDERSON, PARRISH, 1983; DALLAN, OLIVEIRA, 2000; ROCHA JÚNIOR et al., 2007).

Anderson, Parrish (1983) postulam que a absorção tecidual seletiva por um tipo de luz acarreta destruição seletiva do mesmo tecido, ou seja, uma determinada lesão cutânea pode ser tratada com um tipo de comprimento de onda que corresponda a um pico de absorção do cromóforo contido nessa lesão. Os cromóforos são grupos de átomos que conferem cor a uma substância e absorve um comprimento de onda específico.

Atualmente a grande aplicabilidade da ótica deve-se à existência do raio laser, pois o mesmo funciona como fonte de luz de características únicas e possui propriedades especiais que o tornam um excelente instrumento de uso científico e tecnológico (BAGNATO, 2001).

2.2.3 Terapia Laser de Baixa Intensidade (LLLT)

Diante de tais descobertas e dadas as propriedades e resultados clínicos da terapia laser, especialmente a de baixa intensidade, tornou-se um meio físico importante no tratamento terapêutico, bem como no desenvolvimento de pesquisas e experimentos que buscam obter maiores conhecimentos a respeito de seus efeitos fisiológicos e parâmetros ideais de aplicação, visando o uso mais efetivo dessa terapia (FORNEY, MAURO, 1999; NUSSBAUM, BIEMANN, MUSTARD, 1994).

Quando há transmissão da luz pela Terapia Laser de Baixa Intensidade (LLLT) não há emissão de calor e sim efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos. Por isto que quando o laser é aplicado em doses adequadas há estimulação celular com resolução do processo cicatricial através do aumento da produção de adenosinatrifosfato (ATP) mitocondrial, células de defesa (linfócitos e mastócitos),

proliferação fibroblástica, além de realizar analgesia e ter efeito anti-inflamatório (CATÃO, 2004; GOMEZ-VILLAMANDOS, VALENZUELA, CALATRAVA, 1995).

A LLLT só obtém sucesso se os parâmetros básicos de aplicação forem bem estabelecidos como o tipo de laser a ser utilizado (HeNe, CO₂, GaAlAs, dentre outros), a potência (dada em J/cm²), o comprimento de onda (dado em nm) e o tempo de aplicação (ROCHA JÚNIOR et al., 2007; WEIS, et al., 2005; ROCHA et al., 2004).

Kolarova, Ditrichova, Wagner (1999), constataram que o laser com comprimento de onda entre 640 e 940nm é o ideal a ser utilizado com a finalidade de cicatrização de lesões cutâneas, pois o poder de penetração nos tecidos atinge dezenove milímetros (mm) de espessura, ou seja, engloba todas as camadas da epiderme e derme dependendo é claro, da potência/intensidade a ser instituída e do tempo de aplicação.

Diversos estudos são desenvolvidos com o intuito avaliar os efeitos da LLLT sobre a cicatrização. Para isto, os cientistas testaram tipos diferentes de aparelhos laser com comprimentos de onda variados e com determinadas potências, além do tempo de aplicação em lesões cutâneas *in vitro* e *in vivo* a fim de buscar uma melhor resposta na cicatrização destas lesões.

2.3 O PROCESSO DE REPARO TECIDUAL: IMPLICAÇÕES DO REPARO NA LLLT

Os seres vivos superiores, em presença à danos tissulares seja de natureza química, física ou biológica estudaram o processo de reparo tecidual. Tal processo tem seu início com uma lesão intersticial através de uma resposta rápida (ROCHKIND, ROUSSO, NISSAN, 1989). Para isto, o organismo desencadeia uma cascata de

eventos celulares e moleculares com liberação de enzimas e de moléculas de alta complexidade que interagem entre si para que haja reconstituição tecidual. O reparo tecidual ocorre de maneira dinâmica e sincrônica através de fenômenos bioquímicos e fisiológicos seja pela regeneração com recomposição da atividade funcional do tecido, seja pela cicatrização com restabelecimento da homeostasia do tecido. Porém, nesta última situação, há perda da atividade funcional e formação de cicatriz fibrótica (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005; MANDELBAUM, DI SANTIS, MANDELBAUM, 2003).

Tal processo ocorre através da ativação do ciclo celular, que é composto de quatro fases: fase S, onde ocorre a síntese do DNA celular e uma fase M, onde ocorre o processo de mitose, estas são intercaladas por duas fases, G1 e G2 (DUARTE, PASCHOAL, 2005).

A cicatrização de tecidos tem sido freqüentemente descrita como um mecanismo complexo, no qual, vários fatores contribuem para criação de diversos tipos de cicatrização, um dos fatores é o tipo de ferida (SAHL, CLEVER, 1994; TANAKA et al.; 2004).

A lesão cutânea pode ser classificada em dois tipos: ferida de espessura parcial, quando atinge a derme incompletamente e a ferida de espessura total quando atinge a derme completamente podendo lesionar também tecido subcutâneo. Na lesão de espessura parcial a reparação faz-se por reepitelização e como resultado deste processo gera uma cicatriz quase que imperceptível. Já na lesão de espessura total há a necessidade de formação de um novo tecido, o tecido de granulação, fase chamada de epitelização e como resultado gera uma cicatriz pronunciada (MANDELBAUM, DI SANTIS, MANDELBAUM, 2003).

Aos primeiros sinais de lesão tissular uma cascata de eventos é acionada havendo ativação de células nervosas, estromais, vasculares e circulatórias feitas por estrutura de células rompidas (as porções de membrana celular e organelas), os fragmentos de elementos inerentes ao tecido, como os colágenos, elastinas, fibronectinas, também são acionados. As proteínas séricas que extravasam dos vasos rompidos por ação de mediadores inflamatórios pré-formados, liberam principalmente os grânulos das plaquetas, os mastócitos e as terminações nervosas periféricas. Estas moléculas, ao se ligarem a receptores localizados na superfície da membrana celular, induzem a modificações metabólicas na expressão de genes. Como resposta a esta cascata observa-se a produção de nova liberação de mediadores de natureza lipídica e peptídica (citocinas, fatores de crescimento e neuropeptídeos). Além disso, em decorrência ao próprio trauma ou da ativação celular, a composição físico-química do microambiente da lesão fica alterada (baixo aporte de oxigênio, diminuição de pH, presença de espécies ativas de oxigênio e nitrogênio como o peróxido de oxigênio- H_2O_2 , óxido nítrico-NO, ácido hipocloroso-HOCl e oxigênio- O_2) sendo esta uma outra forma de sinalização que ativa as células envolvidas no reparo tissular (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005; COTRAN, KUMAR, COLLINS, 1998; SPANIKOVA et al., 2008).

Progressivamente, o tecido lesado em cicatrização sofre, na continuidade do processo, a infiltração de células circulantes, os neutrófilos e monócitos e a migração de células das áreas adjacentes como as células epiteliais, queratinócitos e fibroblastos. A interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), citocinas que atuam sobre os receptores das células endoteliais, induzem a produção do óxido nítrico (NO), bem como a expressão de moléculas de adesão para neutrófilos

(BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005). Os fibroblastos juntamente com as células locais presentes ativadas serão responsáveis pela produção de colágeno. Este fenômeno é denominado fibroplasia com a deposição de matriz extracelular, além da angiogênese, a cicatrização e reepitelização da região da ferida que acontecem simultaneamente (SINGER, CLARK, 1999).

A fim de facilitar o entendimento do reparo tecidual, didaticamente o processo é dividido em algumas etapas. Alguns autores consideram três estágios no processo de cicatrização: primeiramente um estágio inflamatório, seguido pelo estágio de proliferação e finalizando com o estágio de remodelação (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005; TANAKA et al., 2004; THOMAS, ONEILL, HARDING, 1995). Uma outra classificação mais completa descreve o processo em cinco fases: coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação. Em um determinado período de tempo as fases coincidem e acontecem simultaneamente a fim de permitir o sucesso da cicatrização (MANDELBAUM, DI SANTIS, MANDELBAUM, 2003).

A cicatrização também pode ser classificada em primária ou de primeira intenção e secundária ou de segunda intenção. A cicatrização de primeira intenção ocorre na ferida cujas bordas estão próximas por suturas, a cicatrização é mais branda e como resultado final do processo a cicatriz é quase que imperceptível. Já a cicatrização de segunda intenção ocorre em lesões onde as bordas estão distantes, a regeneração da epiderme é mais lenta e o tempo de resolução da ferida é mais demorado e como resultado final do processo gera cicatriz proeminente (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005; COTRAN, KUMAR, COLLINS, 2001).

Este complexo processo de migração tecidual é desencadeado no início da lesão com a formação do coágulo. A lesão e o coágulo ativam fatores quimiotáticos e

vasoativos que promovem exsudação dos líquidos do sangue para as margens da lesão. Há a presença dos polimorfonucleares (PMN) por volta das primeiras 24 horas pós-lesão. A partir de 48 horas os PMN diminuem, sendo que o exsudato passa a ser constituído predominantemente por macrófagos. As células da camada basal entram em mitose e migram sobre a superfície do coágulo, recompondo o epitélio. Devido à lesão tecidual, o coágulo se forma e ativa os mononucleares a participarem do processo de reparo. Os fibroblastos são ativados, proliferam e migram para a MEC. A MEC é composta por rede complexa de macromoléculas (colágenos, elastina, glicoproteínas e proteoglicanas) que são secretadas na reparação tissular (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 2001; TARTARUNAS, MATERA, DAGLI, 1998).

Em feridas extensas, como ocorre nas úlceras de pressão em diabéticos, este processo torna-se mais acentuado, o coágulo é maior e em presença de infecção, surge um processo inflamatório intenso. As células da epiderme proliferam, ocorre certo grau de hiperplasia devido a grande quantidade de fatores de crescimento liberados a partir das células exsudatas. O tecido de granulação torna-se saliente à superfície da ferida e há retração da cicatriz pelos miofibroblastos (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 2001; TARTARUNAS, MATERA, DAGLI, 1998).

Em ambos os tipos de cicatrização ocorrem a ativação dos fibroblastos pelos fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), sintetizado por macrófagos e plaquetas, ainda produzem fator de crescimento endotelial (Fgfb) com importante função mitogênica dos componentes da MEC. Os macrófagos ativados no processo de reparo produzem IL-1, TNF- α e TGF- β que são estimuladores potentes da síntese de

colágeno pelos fibroblastos. O TGF- β é estimulador da cicatriz, pois ativa a colagenogênese e inibe a colagenólise (DALLAN, OLIVEIRA, 2000).

Portanto o reparo ocorre de maneira dinâmica inicialmente com a fase inflamatória devido à ruptura da barreira endotelial pela lesão tissular, seguida pela fase fibroblástica com depósito de MEC e fase de remodelamento. Para este processo ocorrer de forma organizada e harmônica há a liberação dos mediadores químicos, como os mediadores derivados da circulação (fatores da coagulação, moléculas do sistema fibrinolítico, hormônios esteroidais, tiroideanos e insulina), as cininas (histamina, bradicinina e serotonina), os mediadores peptídicos (citocinas, fatores de crescimento, neuropeptídeos e estruturas da MEC) e os mediadores lipídicos (eicosanóides e fator de ativação plaquetária-PAF) (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005).

Podemos observar que diversos fatores podem alterar o processo de divisão celular e, conseqüentemente, o reparo tecidual, como é o caso dos portadores de diabetes (BOULTON, 2008; CATALANO, PASTORINO, 1996; CHEN, 2008; FERNANDES et al., 2001; GARDNER, FRANTZ, 2008; LINCOLN et al., 2008; MARGOLIS, BERLIN, STROM, 1999; PEDROSA et al., 2004; WU et al., 2008).

A LLLT vem sendo alvo de estudos científicos mostrando ser um recurso eficaz na diminuição do tempo de reposição tecidual, ou seja, melhora a qualidade da reparação tecidual. Sendo assim considerada terapia benéfica (BISHT, GRUPTA, MISRA, 1994; BISHT et al., 1999; GAL et al., 2006; KHADRA et al., 2004; MARCON, SAFELICE, 2005; NUSSBAUM, ZUYLEN, BAXTER, 1999; ROCHA JÚNIOR et al., 2006; ROCHA JÚNIOR et al., 2009; VIEGAS et al., 2007; WOODRUFF et al., 2004). Porém alguns autores estão em desacordo quanto aos efeitos desta terapia e sugerem a realização de novos estudos (ALLENDORF et al., 1997; DEMIR, BALAY, KIRNAP,

2004; POSTEN et al., 2005). Há um questionamento sobre os melhores parâmetros a serem utilizados, como o tipo de aparelho (HeNe, GaAlAs, GaAlInP, entre outros), o comprimento de onda (632nm, 670nm, 780nm, 830nm), a intensidade ($3,6\text{J}/\text{cm}^2$; $4\text{J}/\text{cm}^2$; $9\text{J}/\text{cm}^2$; $16\text{J}/\text{cm}^2$; $30\text{J}/\text{cm}^2$) e o tempo de aplicação (HAWKINS, ABRAHAMSE, 2005; MARCON, SAFELICE, 2005; HAWKINS, ABRAHAMSE, 2006; VINCK et al., 2003; HOURELD, ABRAHAMSE, 2007a; HOURELD, ABRAHAMSE, 2007b).

Tendo em vista a necessidade de novas pesquisas um estudo de revisão realizado por nosso grupo de pesquisadores teve o objetivo de rever aspectos da patogênese tecidual a fim de compreender melhor a cicatrização de lesões cutâneas e o papel do laser de baixa intensidade na cicatrização tecidual. A coleta de dados demonstrou que diversos estudos relatam os efeitos da radiação a laser nos tecidos descrevendo seus benefícios na cicatrização tecidual. Entretanto, ainda existem diversas dúvidas a serem respondidas o que exigem pesquisas mais detalhadas sobre o mecanismo de ação e os parâmetros utilizados do laser de baixa intensidade nas diferentes fases do reparo tecidual das lesões, a fim de esclarecer como este método atua a nível celular nos processo cicatriciais (ROCHA JÚNIOR et al., 2007).

Em estudos experimentais prévios, desenvolvidos em nosso laboratório, um estudo experimental com o objetivo de avaliar os efeitos da LLLT sobre o comportamento histológico e clínico de feridas cutâneas provocadas na região dorsal de ratos. Utilizaram 30 *Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar, divididos de forma aleatória em dois grupos (controle e tratado). Os 15 animais do grupo tratado foram submetidos ao tratamento com laser de baixa intensidade (LLLT), com $3,8\text{ J}/\text{cm}^2$ de dosagem, 15mW de potência e 15 segundos de aplicação, sendo realizada três aplicações: primeira, após a lesão, segunda realizada 48 horas após o procedimento cirúrgico e a

terceira aplicação, sete dias após a realização da ferida cirúrgica. Dez dias após o ato cirúrgico foram colhidas biópsias das amostras dos grupos controle e tratado com o objetivo de conhecer e esclarecer o mecanismo de ação do laser em processos cicatriciais, e, principalmente, avaliar a expressão de TGF- β e presença de células em apoptose (Método de Túnel) no processo cicatricial em lesões cutâneas realizados em ratos submetidos ao tratamento com LLLT. O resultados obtidos evidenciaram uma maior expressão de TGF- β 2 nas amostras teciduais dos animais tratados com laserterapia assim como um nível significativamente maior de células em apoptose neste mesmo grupo. Estes resultados indicam que a LLLT possui um importante efeito imunomodulador reduzindo a reação inflamatória durante a cicatrização de lesões cutâneas, como também é um importante indutor de apoptose no reparo tecidual (ROCHA JÚNIOR et al., 2009).

2.4 FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA (TGF- β) E O REPARO TECIDUAL

Originalmente a expressão “fatores de crescimento” foi empregada para descrever uma classe de polipeptídeos secretados que interagiriam com receptores de superfície resultando em tradução do sinal mitógeno da célula-alvo. Além disto suscitam um amplo espectro de efeitos biológicos sobre as células-alvo, incluindo quimiotaxia e acúmulo de matriz extracelular. A cicatrização de feridas é mediada por uma série de

sinais representados por fatores de crescimento secretados por células ativadas que serão citados abaixo na Tabela 2 idealizada por Thomaz (2001):

TABELA 2: Denominação, origem celular e atividade dos principais fatores de crescimento.

FATOR DE	ORIGEM CELULAR	ATIVIDADE
CRESCIMENTO		
TGF- α (fator de crescimento transformador alfa)	Plaquetas, macrófagos, ceratinócitos	Ativa neutrófilos, mitogênico para fibroblasto, estimula angiogênese.
TGF- β (fator de crescimento transformador beta)	Plaquetas, macrófagos, linfócitos	Estimula fibroplasia e angiogênese, induz a proliferação de vários tipos de células e a diferenciação do miofibroblasto.
PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas)	Plaquetas, macrófagos, ceratinócitos, células endoteliais	Quimiotático para neutrófilos, fibroblastos, mitogênico para células musculares lisas e fibroblastos.
FGF (fator de crescimento de fibroblastos)	Macrófagos, tecido neural	Estimula o crescimento de célula endotelial, mitogênico para células derivadas de mesoderma e neuroectoderma.
EGF (fator de crescimento epidérmico)	Plaquetas, ceratinócitos, glândula salivar	Mitogênico para ceratinócitos, células endoteliais e fibroblastos.
IGF (fator de crescimento semelhante à insulina)	Fígado	Mitogênico pra fibroblastos, estimula células musculares lisas, linfócitos e condrócitos.
TNF- α (fator de necrose tumoral alfa)	Macrófagos e linfócitos	Quimiotático para ceratinócitos e células inflamatórias, mitogênico para ceratinócitos e fibroblastos, angiogênico.

Fonte: Adaptado de Thomaz (2001).

Diante a importância dos fatores de crescimento, algumas citocinas inflamatórias estão sendo estudadas no processo de cicatrização de lesões (BREM et al., 2009; HIRONOBU, 2002; MURPHY et al., 2006; WU et al., 2006). Uma das mais importantes citocinas envolvidas ativamente na associação entre cicatrização de lesões teciduais e reação inflamatória é o TGF- β . A superfamília do TGF- β está envolvida em diversas condições fisiológicas e patológicas que incluem remodelação vascular, fibrose cutânea e inflamação pulmonar (CIPOLLONE et al., 2004; MURPHY et al., 2006).

O TGF- β promove deposição de tecido de granulação e de MEC em geral, regula diversas funções que incluem inibição e estimulação de crescimento celular, apoptose e diferenciação celular. Funcionalmente apresenta atividades quimioatraentes, possuem papel importante na fibroplasia e são mitogênicos para fibroblastos, mas inibidores da proliferação de várias células incluindo os queratinócitos (BALBINO et al., 2005). Esta citocina pertence a uma superfamília de polipetídeos homólogos que incluem três isoformas apesar de distintas em mamíferos (TGF- β_1 , TGF- β_2 e TGF- β_3) com estruturas idênticas (HIRONOBU, 2002).

O TGF- β_1 exerce função quimioatraente para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, além disto induz vários tipos celulares a produzir mais TGF- β_1 o que eleva sua concentração no foco inflamatório. O TGF- β_2 é uma citocina imunossupressora que atua durante o desenvolvimento e reações inflamatórias associadas com o processo de reparo tecidual, reduzindo o perfil de monócitos e macrófagos, promovendo a neovascularização, fibrose cutânea e deposição de colágeno (MAIER et al., 2006; ROCHA JÚNIOR et al., 2009; SHAH, FOREMAN, FERGUSON, 1995;

YASUDA, AOSHIBA, NAGAI, 2003). Estudos com a isoforma TGF- β_3 indicam que este tipo antagoniza os efeitos das outras isoformas (SHAH, FOREMAN, 1995).

Além disto, uma rede complexa de citocinas está envolvida no controle de fibrose durante o processo de reparo tecidual, sendo o TGF- β de modo geral, um dos mais potentes estimuladores pró-fibróticos para os fibroblastos (HIRONOBU, 2002). O TGF- β possui um papel central no reparo tecidual. Entre suas múltiplas funções destacam-se a indução de depósitos de matriz extracelular, a modulação da expressão dos receptores da matriz e a inibição de proteases que degradam proteínas da matriz (BERNASCONI et al., 1995; SPORN, ROBERTS, 1993).

Ainda, algumas citocinas possuem um importante papel no processo de perda celular e apoptose durante a formação de tecido de granulação no reparo tecidual (AKASAKA et al., 2004). Acredita-se que o TGF- β inibe o crescimento celular e promove apoptose em células epiteliais normais e em contraste induzindo a angiogênese tumoral (RANGANATHAN et al., 2007). Esta citocina desempenha um papel central no reparo de feridas e na formação subsequente da cicatriz. Estudo demonstra que o TGF- β promove a apoptose de fibroblastos em lesões sob condições de exposição ao estresse oxidativo (YASUDA, AOSHIBA, NAGAI, 2003). Além disso, observou-se em presença de lesões ulcerativas isquêmicas, um aumento na produção de TGF- β associado a vasculogênese local, ou seja, esta citocina atuou no processo de cura desta lesão (MURPHY et al., 2006). Sobre a formação subsequente de cicatriz foi demonstrado em um experimento com ratos tratadas com anticorpos neutralizantes de TGF- β_1 e TGF- β_2 ocorrem a redução das cicatrizes em feridas cutâneas quando comparadas ao grupo controle (SHAH, FOREMAN, FERGUSON, 1995).

Estudos demonstram que a LLLT tem efeito imunomoduladora sobre a expressão do TGF- β_2 em feridas cutâneas experimentais, sendo indutora de apoptose, reduzindo a inflamação durante o processo de cicatrização (ROCHA JÚNIOR et al., 2009).

Adicionalmente, esta citocina possui propriedades quimiotáticas para fibroblastos e macrófagos, além de modular a deposição de matriz extracelular. São ainda relatados efeitos antagônicos à IL-1, ao TNF- α e ao interferon gama (IFN- γ) (THOMAZ, 2001).

Outras citocinas também apresentam uma importância fundamental no processo de reparo tecidual, como por exemplo, o TNF- α . Thomaz (2001) cita que o TNF- α é uma citocina que demonstrou ampla gama de atividades biológicas tanto “in vitro” quanto “in vivo”. Ainda promove a proliferação de fibroblastos normais, inibe a síntese de colágeno e aumenta a produção de metaloproteases de matriz, assim como exerce papel de inibidor tecidual de metaloproteinases.

Para que o processo de reparo seja compreendido de maneira global não podemos deixar de mencionar algumas particularidades do sistema imune, mais especificamente a multifuncionalidade dos linfócitos T e sua importância imunológica. Os dois tipos principais de linfócitos envolvidos na resposta imune são os linfócitos bursa-dependentes (células B) e os linfócitos timo-dependentes (células T) (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 2001).

Os linfócitos B são progenitores dos plasmócitos que secretam anticorpos, enquanto que os linfócitos T são os mediadores da imunidade mediada por células. Os macrófagos, apesar de não produzirem anticorpos ou dar origem a células sensibilizadas, desempenham papel importante na indução da maioria das respostas

imunes. Os linfócitos T estão presentes no tecido linfóide periférico e no sangue circulante. Eles desempenham duas principais funções: uma ligada a reações imunocelulares e outra exercendo função regularora (linfócitos T reg). As reações imunocelulares que as células T exercem englobam as reações de hipersensibilidade retardada, a resistência a infecções bacterianas e virais, rejeição à transplantes e resistência contra tumores. As células T exercem ainda uma importante função reguladora, a fim de modular a resposta imune mediada por outras células T e células B. Esta função pode ser expressa como facilitação ou supressão de uma resposta imune. Algumas outras subdivisões funcionais destas células incluem células T auxiliares (auxiliam as células B e outras células T a responderem a certos antígenos), as células T supressoras (suprimem a resposta imune) e as células T indutoras (induzem as células auxiliares ou as regularoras) (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 2001).

Estudo envolvendo os linfócitos T e sua resposta sobre processo inflamatório foi realizado com a finalidade de caracterizar quanto à funcionalidade este tipo de células do sistema imune. Os linfócitos T foram caracterizados com base em seus perfis de citocinas. As células Th1 são produtoras de IL-2 e IFN- γ , enquanto que as células Th2 são produtoras de IL-4 e IL-10. Os resultados sugerem que as células T exercem poder regulatório no processo inflamatório (GEMMELL, SEYMOUR, 1994).

Alguns trabalhos hipotetizaram que o processo do reparo tecidual é regulado pelo tipo de citocinas produzidas durante seu desenvolvimento. Assim, a inflamação mediada por Th1 está presente em danos teciduais, enquanto a Th2 é relacionada com a cicatrização de feridas e fibrose tecidual. Nesta resposta as IL-10, IL-13 e o TGF- β

são os mais importantes mediadores da resposta imune Th2 (HIRONOBU, 2002; SANDLER et al., 2003).

Bettini, Vignali (2009), em seu trabalho de revisão descreveu o que acontece com a funcionalidade das células T reg no processo inflamatório em presença de doenças auto-imunes, como é o caso do DM1. Para isto, analisaram os estudos recentes e enfatizaram em primeiro lugar o papel das citocinas inflamatórias, como IL-6, na qual a função das células T reg é inibida, em segundo lugar a questão das células T reg em relação à plasticidade, em terceiro lugar a possível resistência das células T reg no sistema auto-imune, em quarto lugar a associação das células T reg com citocinas inibidoras TGF- β , IL-10, IL-35 no sentido de facilitar e promover a atividade supressora das células T em questão.

Ainda, trabalho envolvendo o DM1 e perfil gênico das células do sistema imune sugere que em presença da doença ou em indivíduos de risco para a doença, o aparecimento de anticorpos de células beta-positivas, observou aumento de apoptose e diminuição das células T regs. O estudo objetivou elucidar os genes e as vias de sinalização que desencadearam apoptose em células T reg no início de desenvolvimento do DM1 e em indivíduos saudáveis no grupo controle. Os autores concluíram que a expressão das células T regs em portadores de DM1 reflete resposta celular que leva ao aumento da sensibilidade à apoptose devido a privação de citocinas, o que não foi observado no grupo controle (JAILWALA et al., 2009).

Existem diversos estudos sobre o efeito de LLLT na produção dos mediadores das reações inflamatórias. Estudo experimental que induziu a isquemia cerebral transitória em ratos evidenciou que quando realizado o tratamento com a LLLT foi

observado uma inibição na ativação e síntese de NO aumentando a regulação da expressão de TGF- β 1 (MASON et al., 2002). Foi demonstrado que a LLLT pode modular a inflamação aguda e induzir a redução nos níveis da expressão do TNF- α , e consequentemente seus efeitos pró-inflamatórios (AIMBIRE et al., 2006a; AIMBIRE et al., 2006b).

O efeito da LLLT sobre os níveis de TNF- α foi investigado por Aimbire, et al. (2006a) em diafragma de ratos após infecção por lipopolysaccharide-induced (LPS). Foi constatado que as concentrações de TNF- α no diafragma dos animais tratados pela LLLT, reduziram significativamente.

Em outro trabalho experimental, Aimbire, et al. (2006c) demonstraram que a aplicação da LLLT foi capaz de restaurar parcialmente o relaxamento dos músculos da traquéia em ratos com disfunção de músculos lisos das vias respiratórias, medidas pelo TNF- α .

Hourel, Abrahamse (2007c), realizaram um estudo com o objetivo de determinar os efeitos da LLLT sobre a proliferação celular, a migração e a expressão da IL -6 em cultura de células diabéticas e em cultura de lesões diabéticas (wounded fibroblast cells-WS1). As células foram irradiadas utilizando o laser de HeNe com 632,8 nm de comprimento de onda, 23 mW de potência, sendo que as células foram irradiadas com duas intensidades distintas: cinco e 16 J/cm². Concluíram com o estudo que LLLT quando utilizada com a intensidade de 5J/cm² estimulou a expressão da IL-6 e a proliferação das células in vitro, já a intensidade de 16J/cm² tem efeito inibidor nestas células.

2.5 CONTRIBUIÇÃO DE MODELOS EXPERIMENTAIS

Diversos estudos vêm demonstrando considerável contribuição da LLLT no processo de reparo tecidual. Pesquisas evidenciaram um aumento na atividade mitótica, no número de fibroblastos, na síntese de colágeno e na neovascularização dos tecidos lesados após tratamento com laser, além de efeitos significativos na produção de FGF e no desenvolvimento do tecido de granulação e reepitelização das feridas em ratos Wistar tratados com laser de HeNe (BISHT et al. 1994; GOMEZ- VILLAMANDOS, VALENZUELA, CALATRAVA, 1995; YU, NAIM, LANZAFAME, 1994).

Al-Watban, Zhang, Andres (2007), realizaram um estudo para observar os efeitos da LLLT em diferentes doses e diferentes comprimentos de onda na cicatrização de lesões em ratos diabéticos. O DM foi induzido em 51 ratos Sprague Dawley através da aplicação de Estreptozotocina (STZ-D) (70 miligramas por quilo de peso mg/Kg). Posteriormente lesões ovais foram criadas na pele dos animais através de um bisturi. Os animais foram tratados pela LLLT em um período de três vezes por semana. Sendo observado que nos animais não tratados a cicatrização foi mais lenta e os animais tratados com a LLLT de 633 nm e 10J/cm² obtiveram uma cicatrização mais eficaz e uma maior redução no tamanho das lesões.

Um estudo realizado por Rabelo, Villaverde, Nicolau (2006) comparou o efeito da LLLT sobre o processo de cicatrização em ratos diabéticos e não-diabéticos. Os animais (n = 25) foram divididos em dois grupos, diabéticos induzidos por injeções de estreptozotocina (STZ-D) (n = 15) e não-diabéticos (n = 10). Realizado uma lesão de oito milímetros (mm) no dorso de todos os animais. Para tratamento dos animais foi

utilizado um aparelho laser HeNe com comprimento de onda de 632,2nm com os seguintes parâmetros: 15 mw de potência, 17 segundos de aplicação e dosagem de 10 J/cm². Após análise histopatológica das amostras cutâneas foi confirmado que os animais tratados apresentaram um processo inflamatório discreto, sugerindo efeitos eficazes da LLLT na cicatrização de lesões cutâneas de ratos diabéticos e não-diabéticos.

Em estudo experimental desenvolvido por Demir, Balay, Kirnap (2004) foram investigados os efeitos da estimulação elétrica e da LLLT na cicatrização de feridas. Foram utilizados 124 ratos Swiss-albinos, fêmeas, com 200 a 240g de peso com oito a dez meses de idade. Realizou-se uma incisão linear de seis centímetros na região dorsal de todos os ratos que foram divididos em quatro grupos com trinta animais cada. Utilizaram um protocolo onde no grupo I foi aplicada a estimulação elétrica como tratamento (modelo Endomed 582, Enraf-Nonius Co, Holandês) com uma corrente de 300 microamper (µA) por trinta minutos por dia, esta corrente foi aplicada com polarização negativa nos três primeiros dias e polarização positiva nos sete últimos. Para o grupo II estipularam um procedimento similar, onde incluíram uma solução salina para aplicação, mas sem a aplicação da corrente. No grupo III, o laser AsGa (modelo Laserpet 100, Petas Co, Turco), com um comprimento de onda de 904nm, 6mW de potência média, e uma dosagem de um J/cm² com frequência máxima de 128 Hz. Esta dosagem foi aplicada de forma contínua por dez minutos por dia, em um período de dez dias, com 27 mW de potência de pico e uma angulação de 15^o para emissão. No grupo IV foi realizado um procedimento similar sem aplicação do laser. Foi observado que ambas as modalidades de tratamento possuem efeitos positivos nas

fases de proliferação, aumentando o número de fibroblastos e estimulando a síntese e organização de colágeno quando comparado com os grupos controle. A estimulação elétrica e o tratamento a laser possuem efeitos positivos durante a inflamação, proliferação e na maturação das feridas, podendo ser utilizados com sucesso em úlceras de decúbito e feridas crônicas.

Realizamos, em nosso laboratório, pesquisa experimental com o objetivo de investigar a evolução de feridas cutâneas provocadas na região dorsal de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), que foram submetidos ao tratamento com laser de baixa intensidade, com 3,8 J/cm² de dosagem, 15mW de potência e tempo de aplicação de 15 segundos. Os animais (n = 12) foram divididos em dois grupos, um controle e outro tratado com laser. Foram realizadas, no grupo tratado, três aplicações (imediatamente após o ato cirúrgico, 48 horas e sete dias após a realização das feridas cirúrgicas). Dez dias após o ato cirúrgico foram colhidas amostras das lesões de ambos os grupos para realização de estudo histopatológico e histomorfométrico. Os resultados evidenciaram aumento da neovascularização e da proliferação fibroblástica, e diminuição da quantidade de infiltrado inflamatório nas lesões cirúrgicas submetidas à terapia com laser. Observaram no grupo controle, junto à borda da ferida cirúrgica, discreta proliferação epitelial e, em praticamente toda a sua extensão, notava-se a presença de tecido exibindo ampla área de ulceração e material fibro-necrótico sobre tecido de granulação. Era evidente, por outro lado, no grupo II, submetido a LLLT, a análise histopatológica evidenciou epiderme íntegra revestindo tecido de granulação bem desenvolvido, constituído por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas orientadas paralelamente à superfície da ferida, determinando um processo de reparo tecidual mais organizado. Estes resultados em conjunto sugerem que a terapia a laser de baixa

intensidade é um método eficaz no processo de modulação da reparação tecidual, contribuindo significativamente para a cicatrização tecidual mais rápida e mais organizada (ROCHA JÚNIOR et al., 2006).

Tais eventos cicatriciais envolvendo o crescimento epidérmico e dérmico, mostraram-se prejudiciais quando em indivíduos diabéticos sendo que a migração e o tanto de células epiteliais quanto de fibroblastos são fundamentais para o sucesso do reparo (SULLIVAN et al., 2007). Estudo *in vitro* avaliou a proliferação celular através da aplicação da LLLT em amostras de culturas de pele e órgãos de ratos diabéticos induzidos por STZ-D. As amostras foram submetidas à indução do diabetes e dois conjuntos de pele foram extraídos e divididas em dois grupos, um onde os fibroblastos proliferaram “in vitro” e outro em cultura de órgãos. Foi usado laser HeNe com dose 0,9 – quatro J/cm² aplicados quatro vezes em cada grupo. A análise final revelou que a dose de quatro J/cm² aumenta significativamente os fibroblastos em comparação às pseudo-culturas expostas (MIRZAEI et al., 2007).

Byrnes et al. (2004), através de um estudo experimental investigaram os efeitos da fotobiomodulação (FBM) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em modelo animal (*ratos Psammomy obesus*) com DM2. Os resultados evidenciaram benefícios no padrão histológico na cicatrização das feridas seguindo com fechamento da lesão com o tratamento, onde fora utilizado como protocolo quatro J/cm², 16mW de potência, 250 segundos de aplicação por quatro dias consecutivos. Esta dosagem de quatro J/cm² evidenciou o fechamento das feridas no grupo dos ratos diabéticos quando comparado com os não diabéticos, havendo aumento na expressão do FGF. Estes resultados demonstraram que a FBM com uma densidade de energia de quatro J/cm² é efetiva na melhora do processo de cicatrização de lesões em animais modelos com

DM2, sugerindo assim que a FBM (632nm, quatro J/cm²) pode ser um tratamento promissor para feridas crônicas em pacientes com diabetes.

Por outro lado, o trabalho desenvolvido por Allendorf et al. (1997) não demonstrou efeitos significativos da LLLT no processo cicatricial. Os autores estudaram a influência das diferentes doses da LLLT em relação a bioestimulação. Os animais foram divididos em dois grupos: no primeiro foram feitas duas incisões de 1,5 cm de diâmetro (n = 23) na região dorsal de cada rato, na qual uma foi tratada com um J/cm² e a outra incisão foi tida como controle. Os animais tratados com dois e quatro J/cm² ou somente anestesia sem a LLLT possuíam apenas uma incisão em seu dorso. Não houve diferença na contração da ferida entre os animais tratados. No segundo grupo foi realizada uma incisão de dois cm de diâmetro (n = 24) e posteriormente foram submetidos ao tratamento. Não houve diferença entre os ratos tratados com dois J/cm² e os que receberam apenas anestesia. Observaram, com isto, que não ocorreu diferenças significativas na cicatrização das lesões. Entretanto ressalta-se a presença de efeitos positivos neste tipo de terapia.

Em estudo realizado por Maiya, Kumar, Rao (2005), com o objetivo determinar o efeito da LLLT na cicatrização de feridas (quatro cm²) em ratos diabéticos induzidos por Aloxana. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo tratado (n = 24) com laser de He-Ne, 632,8 nm e 4,8 J/cm² por cinco dias na semana até que as lesões se fecharem por completo, no grupo controle (n = 24) não foram irradiados. Os resultados evidenciaram através de análise histopatológica e bioquímica que o grupo tratado com laser obteve um reparo tecidual mais acelerado quando comparado com o grupo controle. No grupo tratado com laser o tempo médio de cicatrização foi de 18 dias

enquanto que no grupo controle este tempo aumentava para 59 dias. Evidenciando assim que a LLLT possui efeitos positivos nas lesões de ratos diabéticos.

Rabelo, Villaverde, Nicolau (2006) avaliaram a eficácia da LLLT comparando a cicatrização de ratos não-diabéticos e diabéticos induzidos experimentalmente. Para isto, os autores separaram os animais em grupos: os diabéticos (n = 15), os não-diabéticos (n = dez) e o grupo controle (n = 25). Realizaram uma ferida na região dorsal dos mesmos de oito milímetros (mm) de diâmetro em todos os animais, sendo que previamente induziram o diabetes com STZ-D em 15 animais do grupo tratado. Utilizaram o laser de HeNe com comprimento de onda de 632,8 nm, potencia 15mv e dose de dez J/cm² aplicado de cada lado da lesão. Foram colhidas amostras dos grupos para análise histopatológica quantitativa e qualitativa. Observaram que ao comparar células inflamatórias, vasos sangüíneos e fibroblastos observaram que grupo submetido a LLLT exibiu um processo inflamatório discreto e, com isto, uma cicatrização mais eficiente, tanto em ratos diabéticos quanto em ratos não-diabéticos quando comparados ao grupo controle.

Carvalho, Mazzer, Reis (2006) estudaram comparativamente, através de análises morfométricas das fibras colágenas, a influência da irradiação com laser HeNe no percentual de colágeno de lesões cutâneas induzidas em ratos diabéticos e não diabéticos. Foram utilizados 48 ratos Wistar, machos sendo estes divididos em grupos: Grupo I diabético tratado com laser, grupo II diabético não-tratado, grupo III não-diabético tratado e grupo IV não-diabéticos não-tratados. Nos grupos I e II diabetes foi induzido por injeção intravenosa. Todos os animais foram submetidos a uma lesão no dorso e os Grupos I e III, foram tratados com laser HeNe com dosagem de quatro J/cm² por 36 s. Um animal de cada grupo sofreu eutanásia no 3º, 7º e 14 dias após a lesão.

Realizaram análises histopatológicas das lesões e os dados foram submetidos a análise estatística. Os resultados obtidos das amostras retiradas aos 3º, 7º e 14 dias após a lesão, demonstram que o grupo tratado com laser apresentou média de fibras colágenas estatisticamente significante ($p < 0.05$), em relação ao grupo não-tratado, tanto para diabéticos ($p = 0.0104$), como não-diabéticos ($p = 0.039$). Concluíram que o laser de baixa intensidade (632,8 nm) se mostrou capaz de influenciar o percentual de colágeno em feridas cutâneas, aumentando a média de fibras colágenas, tanto para o grupo diabético como no não-diabético.

Stadler et al. (2001) analisaram a eficácia da aplicação da LLLT com comprimento de onda de 830nm, 79 mW/cm² de potência e dose de 5 J/cm² em feridas realizadas nas ratas diabéticas C57BL/Ksj/db/db. O protocolo experimental ocorreu em um período de 23 dias. Concluíram que a LLLT 830nm aprimora significativamente a contração da ferida no modelo diabético estudado, porém há a necessidade de outros estudos sobre o mecanismo de ação da LLLT na cicatrização de lesões cutâneas.

2.6 ESTUDOS EM CAMUNDONGOS NON-OBESE DIABETIC – NOD

Estudos experimentais que envolvem a patogênese da DM vêm sendo destacados os modelos animais que desenvolvem a doença espontaneamente: o rato BB (*bio-breeding*), o camundongo db/db (diabetic) e o camundongo NOD (*non-obese diabetic*) (YOU et al. 2006).

Desenvolvido no final da década de 70, no Japão, este animal apresenta espontaneamente DM1 devido a diversas anormalidades imunológicas concomitantes,

intimamente relacionadas à modulação da resposta celular (DELOVITCH, SINGH, 1997; LEITER, PROCHAZKA, COLEMAN, 1987; NAGY et al. 2001).

Os camundongos NOD exibem hiperglicemia intensa de forma abrupta por volta dos 120 dias, o que corresponderia, em humanos, ao início da adolescência (LEITER, PROCHAZKA, COLEMAN, 1987). O período de 120 dias que caracteriza o animal com diabetes instalada também é descrito por Ohneda et al. (1984), que realizaram experimento com o objetivo de avaliar os níveis de glucagon antes e depois da doença estabelecida. Os autores dividiram os animais em grupos com 60 dias de idade (antes da presença de hiperglicemia) e 120 dias (hiperglicemia associada a diabetes estabelecida); este último foi subdividido em dois grupos, dos quais um deles recebeu tratamento com insulina durante quatro semanas. Os resultados evidenciaram que os animais tratados com insulina apresentaram níveis séricos de glucagon reduzidos em relação aos demais grupos do experimento. O desenvolvimento espontâneo do diabetes ocorre por volta dos 120 dias também (YOU et al., 2006).

Somente após destruição de pelo menos 95% das células beta-pancreáticas produtoras de insulina é que o diabetes mellitus se manifesta em camundongos NOD (HERNANDORENA, GONZALES, GARCIA, 2001; KANAZAWA et al., 1984). Embora todos os camundongos NOD desenvolvam insulite, isto nem sempre é acompanhado de diabetes. A proporção dos camundongos NOD que sobreviveram e apresentaram diabetes em ambos os sexos foi de 38% da amostra estudada por Kirsten (2006).

De maneira interessante, é observado que nas cepas de camundongos NOD, apesar de todas as fêmeas e todos os machos apresentarem reação auto-imune, as fêmeas exibem inflamação e destruição mais exacerbada das áreas endócrinas do pâncreas em relação aos machos, fazendo com que a incidência seja mais alta nas

primeiras, com 80-90% das fêmeas, em relação a 10-40% dos machos acometidos (DELOVITCH, SINGH, 1997).

Diante destas características, o camundongo NOD vem sendo amplamente utilizado em pesquisas experimentais pelas semelhanças entre a história natural de sua diabetes apresentar características clínicas e fisiopatológicas bastante semelhantes às humanas. Estas alterações patológicas similares levam estes animais a serem propostos, atualmente, como boa escolha para estudo não só da diabetes em si, mas também da Síndrome de Sjögren, do lupus eritematoso e da Síndrome de Cushing (GHOREISHI, DUTZ, 2009; ZHANG, NAKAYAMA, EISENBARTH, 2008; YOU et al. 2006).

Dentre as diversas características compartilhadas entre os camundongos NOD e os pacientes diabéticos estão a presença de fatores de risco genético associada a mutações, possíveis em aproximadamente 20 genes que controlam a resistência e a susceptibilidade á diabetes; alterações funcionais no receptor de células T (TCR) e alterações em diversas regiões das moléculas Do com complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e II; detecção sérica de anticorpos anti-células β pancreáticas, além da presença de clones de células T auto-reativas (DELOVITCH, SINGH, 1997; YANG, SANTAMARIA, 2006; ZHANG, NAKAYAMA, EISENBARTH, 2008). Sutherland et al. (2009) sugerem, ainda, que as células produtoras de insulina nos camundongos NOD exibem superexpressão da IL-21, o que seria responsável por desencadear uma resposta celular autoimune (Esquema 2).

Esquema 2: Evolução da patogênese do diabetes em modelo experimental que expressa diabetes espontaneamente (camundongo NOD)

CAMUNDONGO DIABÉTICO NÃO-OBESO (NOD)
Susceptibilidade genotípica associada ao MHC



Fonte: adaptada de YANG, SANTAMARIA (2006).

Bioquimicamente, após seis semanas de vida, anticorpos anti-insulina são detectados no soro sanguíneo destes camundondos, com picos entre a sexta e a 18^a. semanas (ZHANG, NAKAYAMA, EISENBARTH, 2008). Leiter, Prochazka, Coleman (1987) relatam glicemia indo dos níveis normais a 140-160 mg/dl evoluindo gradualmente para um quadro hiperglicêmico permanente de 400 mg/dl.

Segundo Delovitch, Singh (1997) e Ridgway (2003) a patogênese da doença é determinada microscopicamente, nestes animais diabéticos, pela presença de reação inflamatória ao redor de pequenos vasos sanguíneos associados às ilhotas de Langerhans, que gradualmente ocupa a periferia da própria ilha – caracterizando a peri-insulite. Este infiltrado inflamatório é composto inicialmente por células dendríticas e, posteriormente, por linfócitos T CD4+, T CD8+ e B. Segue-se, de forma lenta e progressiva, a destruição das células β mediada pelas células T previamente instaladas no tecido (DELOVITCH, SINGH, 1997).

O início do processo autoimune, precocemente observado entre a terceira e a quarta semana de vida, possivelmente se deve a um defeito funcional na população de células Th2, falhando durante a seleção clonal negativa de células Th1 auto-reativas às células β pancreáticas (DELOVITCH, SINGH, 1997; YOU et al. 2006). Alguns autores sugerem que esta produção de células regulatórias (Th2) alteradas é induzida pelo TGF- β e, ainda, que o bloqueio de seus receptores inibe o desenvolvimento do diabetes em camundongos NOD (FU et al. 2004; YOU et al. 2006). Esta citocina exerce efeitos antagônicos em sua interação com diversos mediadores químicos na resposta imunológica local, entre elas o TNF- α , importante modulador apoptótico (HIRONOBU, 2002; SANDLER et al., 2003; THOMAZ, 2001).

Segundo experimento realizado por Darby et al. (1997), o processo apoptótico associado a baixo índice de proliferação celular e de diferenciação de miofibroblastos – sugestivamente devido à deficiência na síntese de fatores de crescimento - pode ser responsável pelo aumento do tempo de evolução cicatricial em camundongos NOD.

A possível influência da síntese de fatores de crescimento no reparo associado ao diabetes também foi alvo de pesquisa desenvolvida por Chen et al. (2005). Os autores relatam que os componentes celulares cicatriciais nos camundongos NOD apresentam, em relação a animais não-diabéticos, menor expressão de fatores de crescimento endotelial (VEGF) e para músculo liso (alpha-SMA) levando a um suprimento vascular deficiente na área do reparo e, conseqüentemente, maior tempo para fechamento da lesão.

Recentemente, Brem et al. (2009) utilizaram transferência genética mediada por adenovírus (ADV) associada à citocina VEGF em dois grupos compostos por camundongos diabéticos (NOD e db/db). Após realização de ferida cirúrgica dorsal, os animais receberam o complexo (ADV/VEGF) via intradérmica. Após obtenção de amostras da lesão por biópsia foi realizada análise histopatológica onde foram observadas, em ambos os grupos, que a reepitelização e a deposição de colágeno foram eficazes para o fechamento da ferida associadas à diminuição do tempo cicatricial.

A aplicação da LLLT foi descrita em modelo experimental de camundongo diabético db/db, por Stadler et al. (2001) com o objetivo geral de se observar possíveis efeitos da irradiação sobre áreas cirurgicamente lesadas. Os autores utilizaram aplicações de laser de HeNe (830nm, 79mW, cinco J/cm²) nas lesões de camundongos nos primeiros quatro dias após o procedimento cirúrgico e, em outro grupo, durante o

3°. e 7°. dias após o procedimento. Um terceiro grupo não recebeu o tratamento. Os resultados sugeriram que houve otimização do tempo de fechamento das lesões nos grupos diabéticos, porém devem ser realizados mais estudos para a compreensão da ação do laser sobre o processo cicatricial.

Até o momento, não foram encontrados dados publicados envolvendo a LLLT em processo cicatricial e aspectos inflamatórios em lesões cutâneas em camundongos NOD.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da terapia laser de baixa intensidade (LLLT) sobre o reparo tecidual em feridas cutâneas de camundongos diabéticos não obesos (NOD).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da LLLT sobre a intensidade do infiltrado inflamatório em feridas cutâneas de camundongos diabéticos não obesos – NOD;
- Verificar os efeitos da LLLT sobre o processo inflamatório em feridas cutâneas de camundongos diabéticos não obesos (NOD);
- Verificar os efeitos da LLLT sobre o número de vasos sanguíneos em feridas cutâneas de camundongos diabéticos não obesos (NOD);
- Analisar os efeitos da LLLT sobre a expressão da enzima COX2 no sítio do desenvolvimento do processo de reparo tecidual.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados 30 camundongos NOD, fêmeas, com 120 a 150 dias de idade e 20 gramas de peso em média. Dos 30 camundongos NOD selecionados para a pesquisa, 14 ficaram diabéticos (46,6% da amostra). Os animais foram obtidos no Biotério da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ) – Salvador/BA e o experimento foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal/UFJF com protocolo número 001/2008. Os animais foram alojados no Biotério do Núcleo Biomédico da Faculdade de Medicina da Fundação Dom André Arcoverde – FAA/Valença-RJ e mantidos segundo critérios pré-estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os animais foram mantidos em ambiente climatizado, com temperatura controlada em 22°C. A iluminação controlada é mista – luz natural e lâmpadas fluorescentes – sendo as últimas controladas automaticamente para acenderem às 6h e apagarem às 18h. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, providas de camas de maravalhas selecionadas, esterilizadas, mamadeira para água e cocho para ração do tipo “peletizada”.

Os animais foram submetidos a dosagens glicêmicas diárias. Realizou-se a verificação do nível sérico de glicose colhendo-se uma gota de sangue através de uma pequena incisão com um bisturi-lanceta na veia dorsal da cauda do camundongo. Procedia-se com a aferição realizada através de fitas reagentes de medição de glicemia

acopladas ao medidor Accu-Check Advantage®. Foram considerados diabéticos os camundongos NOD que apresentaram glicemia maior ou igual a 250 mg/dL.

Os animais foram previamente anestesiados com 100mg/Kg de Ketamine e 10 mg/Kg de Xylazine, posteriormente foram submetidos a um procedimento cirúrgico para a remoção de um fragmento circular de tecido cutâneo de aproximadamente 10 mm de diâmetro na região dorsal dos animais com auxílio de um bisturi. Os camundongos foram divididos de forma aleatória em dois grupos com sete animais cada: grupo I como controle, composto por camundongos NOD não submetidos a LLLT e grupo II tratado, composto por camundongos NOD submetidos a LLLT. O aparelho a ser utilizado no grupo tratado possui as seguintes características: Twin Laser de emissão infravermelha, pulsátil, semicondutores de arsênio e gálio, comprimento de onda de 780nm, potência de pico de 70mW, potência média de saída de 0,5 a 3,5mW e aplicação através de fibra ótica. No grupo controle não foi realizado nenhuma forma de tratamento, no grupo II as feridas experimentais foram submetidas a LLLT nos seguintes parâmetros: 15mW de potência, dose de 3,8 J/cm² e 20 segundos de aplicação. A primeira aplicação realizada logo após o ato cirúrgico e uma segunda aplicação 48h após o procedimento cirúrgico. Realizou-se aplicação do laser pelo método “pontual” em um tempo de 20 segundos, englobando a área central e as bordas adjacentes à lesão a fim de tratar a área lesionada uniformemente. Decorridos sete dias do ato cirúrgico e após aplicação do laser, todos os animais foram eutanasiados através de sobredose de anestesia. Posteriormente, colheu-se amostras das lesões contendo, na sua profundidade, parte da pele adjacente às bordas da ferida e todo o tecido cicatricial. Todas as amostras foram submetidas a análises histopatológicas,

histomorfométricas e imuno-histoquímica e os resultados submetidos à análise estatística.

4.2 HISTOPATOLOGIA E HISTOMORFOMETRIA

As amostras das lesões cutâneas obtidas foram fixadas em formol tamponado a 10% (pH 7) por período mínimo de 24 horas. Após a fixação, as amostras foram desidratadas gradativamente em concentrações crescentes de álcool etílico (70 a 100%), diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina, conforme métodos histológicos de rotina. Posteriormente, os fragmentos foram incluídos em parafina utilizando-se o micrótomo modelo "820" Spence, obtendo-se seções de 5µm de espessura. Foram realizados cortes histológicos em duas diferentes profundidades de cada amostra coletada. As lâminas histológicas foram mantidas em estufa para secagem e os cortes submetidos à coloração por hematoxilina e eosina para posterior análise.

A histomorfometria foi realizada através de imagens capturadas e avaliadas por sistema computadorizado de captura de imagens Axiostar Plus (Zeiss, Berlin, Germany). As imagens de todos os campos microscópicos de cada amostra foram capturadas com aumento original de 400x. As imagens foram arquivadas e submetidas à contagem de células inflamatórias e vasos por campo microscópico com auxílio de marcação digital pelo sistema de imagens Axion Vision (Zeiss, Berlim, Alemanha).

4.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para a realização da imuno-histoquímica foi utilizado o método do complexo avidina-biotina peroxidase anti-peroxidase (ABC) para verificar a expressão de COX2, para que possamos elucidar o mecanismo de ação da LLLT em lesões cutâneas de camundongos diabéticos.

O método foi realizado nas seguintes etapas: a) fixação em acetona (10 min); b) reidratação dos cortes em PBS, pH 7,4 (10 min); c) bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 0,4% (30 min); d) lavagem em PBS (10 min); e) incubação com soro normal de cavalo (Vector Laboratory, Inc., Burlington, Califórnia, EUA) em câmara úmida (20 min); f) incubação com o anticorpo primário policlonal por uma hora – anti-COX2, Rabbit Polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, USA, diluição 1:100); g) lavagem em PBS (10 min); h) Incubação com anticorpo de cabra biotilado de coelho (Dakopatts, Copenhagen, Dinamarca) diluído em PBS (30 min); i) lavagem em PBS (30 min); j) incubação com tampão acetato 0,2 M, pH 5,2 (10 min); l) revelação do produto da reação imunológica empregando a solução de 3-amino-9-eticarbazol (1 a 3 min); m) lavagem em água corrente (10 min); n) contracoloração com hematoxilina de Harris (1 min); o) lavagem em água corrente (10 min); p) montagem da lâmina com Elvanol (polivinilálcool) e lamínula.

O controle da reação imuno-histoquímica foi realizado omitindo-se, em alguns cortes, a etapa de incubação com o anticorpo primário. As imagens dos campos analisados foram obtidas através do sistema computadorizado de análises de imagens Axiovision (AxioStar Zeiss, Carl Zeiss, Hamburg, Germany).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi obtida utilizando os métodos não-paramétricos Mann-Whitney e teste t de Student com nível de significância $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos ao término deste trabalho, assim como as discussões referentes a este estudo serão apresentadas em forma de artigo científico (Apêndice).

6 CONCLUSÕES

- Os resultados em conjunto sugeriram que a LLLT é capaz de modular negativamente a expressão da enzima COX2 contribuindo para o controle da resposta inflamatória em feridas cutâneas de camundongos NOD.
- Os resultados deste estudo experimental em camundongos diabéticos sugerem que a LLLT pode ser terapêutica viável no tratamento de feridas cutâneas em pacientes diabéticos. Estes dados, entretanto, devem ser confirmados em estudos clínicos em humanos.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. et al. The effect of thalidomide on BCG-induced granulomas in mice. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 28, no. 10, p. 1069-76, Oct. 1995.

ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, no. 6603, p. 787-93. Oct. 1996.

AIMBIRE, F. et al. Low-level laser therapy can reduce lipopolysaccharide-induced contractile force dysfunction and TNF-alpha levels in rat diaphragm muscle. . **Lasers in surgery and medicine**, v. 21, no. 4, p. 238-44, Dec. 2006a.

AIMBIRE, F. et al. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF-alpha levels in acute inflammation. **Photomedicine and laser surgery**, v. 24, no. 1, p. 33-7, Feb. 2006b.

AIMBIRE, F. et al. Low-level laser therapy partially restores trachea muscle relaxation response in rats with tum or necrosis factor alpha-mediated smooth airway muscle dysfunctiono. **Lasers in surgery and medicine**, v. 38, no. 8, p. 773-8, Sep. 2006c.

AKASAKA, Y. et al. Basic fibroblast growth factor promotes and suppresses granulation tissue in acute incisional wounds. **The journal of pathology**, v. 203, no. 2, p. 710-20, Jun, 2004.

ALEXANDRAKI, K. et al. Inflammatory process in type 2 diabetes: the role of cytokines. **Annals of the New York academy of sciences**, v. 1084, p. 89-117. 2006.

ALLENDORF J. D. et al. Helium-neon laser irradiation at fluences of 1, 2, and 4 J/cm² failed to accelerate wound healing as assessed by both wound contracture rate and tensile strength. **Lasers in surgery and medicine**, v. 20, no. 3, p. 340-5. 1997.

AL-WATBAN, F. A.; ZHANG, X. Y.; ANDRES, B. L. Low-level laser therapy enhances wound healing in diabetic rats: a comparison of different lasers. **Photomedicine and laser surgery**, v. 25, no. 2, p. 72-7. 2007.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Economic consequences of diabetes mellitus in the U.S in 1997. **Diabetes Care**, v. 21, p. 296-309. 1998.

ANDERSON, R. R.; PARRISH, J. A. Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation. **Science**, v. 220, p. 524-7. 1983.

ATKINSON, M. A.; LEITER, E. H. The NOD mouse model of type 1 diabetes: As good as it gets? **Nature Medicine**, v. 5, no. 6, p. 601-4, June. 1999.

BAGNATO, V.S. Os fundamentos da luz laser. **Física na Escola**, v. 2, n. 2, p. 4-9. 2001.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51. 2005.

BALIGA, R. S. et al. AIDS related vasculopathy: evidence for oxidative and inflammatory pathways murine and human AIDS. **American journal of physiology: heart and circulatory physiology**, v. 289, no. 4, p. H1373-80, Oct. 2005.

BATISTA, A. C. et al. Nitric oxide síntesis and severity of human periodontal disease. **Oral diseases**, v. 8, no. 5, p. 254-60, Sep. 2002.

BERNASCONI, P. et al. Expression of TGF- β 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis: pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. **Journal of clinical investigation**, v. 96, no. 2, p. 1137-44, Aug. 1995.

BETTINI, M.; VIGNALI, D. A. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. **Current Opinion of Immunology**, v. 21, no. 6, p. 612-8, Dec. 2009.

BEZERRA, M.M. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, v. 71, no. 6, p. 1009-14, June. 2000.

BISHT, D. et al. Effect of helium-neon laser on wound healing. **Indian journal of experimental biology**, v. 27, no. 2, p. 187-9, Feb. 1999.

BISHT, D.; GRUPTA, S.C.; MISRA, V. Effects of low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Indian Journal Medicine Research**, v. 100, p. 43-6. 1994.

BOULTON, A. J. M. The diabetic foot – an update. **Foot and Ankle Surgery**, v. 14, p. 120-4. 2008.

BREM H. et al. Mechanism of sustained release of vascular endothelial growth factor in accelerating experimental diabetic healing. **Journal of investigative dermatology**, v. 129, no. 9, p. 2275-87, Sep. 2009.

BYRNES, K.R. et al. Photobiomodulation improves cutaneous wound healing in a animal model of type II diabetes. **Photomedicine and laser surgery**, v. 22, no. 4, p. 281-90. 2004.

CALDONCELLI, F. F. et al. Apoptose na involução da glândula mamária. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 12, no. 4, p. 39-44. 2003.

CARVALHO, C. B. M. et al. Pé diabético: Análise Bacteriológica de 141 Casos. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 48 , no. 3, p. 398-405. 2004.

CARVALHO, P. T. C.; MAZZER, NO.; REIS, F. A. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 177-83. 2006.

CATALANO, C.; POSTORINO, M. The impact of diabetes on patients' survival in dialysis patients with non-diabetic renal disease and in patients who develop diabetes during chronic dialysis. **Nephrology dialysis transplantation**, v. 11, p. 1124-8, Jan. 1996.

CATÃO, M. H. C. V. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. **Revista Brasileira de Patologia Oral**, v. 3, n. 4, p. 214-8. 2004.

CESARINI, P. R. et al. Prevalência dos marcadores imunológicos anti-GAD e anti-IA2 em parentes de primeiro grau de diabéticos do tipo 1 em amostra da população da grande São Paulo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 4, p. 395-400. 2003.

CHEN J. et al. Tissue factor as a link between wounding and tissue repair. **Diabetes**, v. 54, no. 7, p. 2143-54, July. 2005.

CHEN, M. C. et al. Influencing factors of outcome after lower-limb amputation: a five-year review in a plastic surgical department. **Annals of plastic surgery**, v. 61, p. 314-8, July. 2008.

CHROMEY, P. A. The efficacy of carbon dioxide laser surgery for adjunct ulcer therapy.

Clinics in podiatric medicine and surgery, v. 9, p. 709-19. 1992.

CIPOLLONE, F. et al. Increased expression of transforming growth factor- β 1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques. **Stroke**, v. 35, p. 2253-7. 2004.

CONSENSO BRASILEIRO DE DIABETES. **Diagraphic Editora**. Rio de Janeiro, 2003.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins: **Patologia estrutural e funcional**.

Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 44-100.

DALLAN L. A. O., OLIVEIRA S. A. Cirurgia de revascularização transmiocárdica a laser de CO₂. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 15, p. 89-104. 2000.

DARBY, I. A. et al. Apoptosis is Increased in a Model of Diabetes-impaired Wound Healing in Genetically Diabetic Mice. **International journal of biochemistry and cell biology**, v. 29, no. 1, p. 191-200, August. 1997.

DELOVITCH, T.; SINGH, B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. **Immunity**, v. 7, p. 727-38, Dec. 1997.

DEMIR, H.; BALAY, H.; KIRNAP, M. A comparative study of the effects of electrical stimulation and laser treatment on experimental wound healing in rats. **Journal of Rehabilitation Research e Development**. v. 41, no. 2, p. 147-54, Mar/Apr. 2004.

DUARTE, R. L. M.; PASCHOAL, E. M. Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. **Journal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 1, p. 56-65. 2005.

FERNANDES, A.R.C.; et al. Avaliação por imagem do pé diabético. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 41, n. 5, p. 305-8, set/out. 2001.

FILLIPIN, L. I. et al. Lo-level laser therapy (LLLT) prevent oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendono. **Journal of clinical laser medicine and surgery**, v. 37, no. 4, p. 293-300, Oct. 2005.

FORNEY, R.; MAURO, T. Using laser in diabetic wound healing. **Diabetes technology & therapeutics**, v. 1, no. 2, p. 189-92. 1999.

FU, S. L. et al. Anti-Cancer effects of COX-2 inhibitors and their correlation with angiogenesis and invasion in gastric cancer. **World journal of gastroenterology**, v. 10, no. 13, p. 1971-4, July. 2004.

GAL, P. et al. Histological assessment of the effect of laser irradiation on skin wound healing in rats. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 24, no. 4, p. 480-8. 2006.

GARDNER, S. E.; FRANTZ, R. A. Wound bioburden and infection-related complications in diabetic foot ulcers. **Biological Research for Nursing**. v. 10, no.1, p. 44-53, July. 2008.

GASTAL, D. A.; PINHEIRO, R. T.; VAZQUEZ, D. P. Self-efficacy scale for Brazilians with type 1 diabetes. **São Paulo medical journal: revista paulista de medicina**, v. 125, no. 2, p. 96-101, Apr. 2007.

GEMMELL, E.; SEYMOUR, G.J. Modulation of immunune responses to periodontal bacteria. **Current opinion in periodontology** ,. p.28-38. 1994.

GHOREISHI, M.; DUTZ, J. P. Murine models of cutaneous involvement in lupus erythematosus. **Autoimmunity Reviews**. DOI: 10.1016/j.autrev.2009.02.028 (journal homepage: www.elsevier.com/locate/autrev). 2009.

GOLDMAN, L. **Biomedical aspects of the Laser**. New York: Springer Verlag, 1967. p. 1-8. 1967.

GOMEZ-VILLAMANDOS, R. J.; VALENZUELA, J. M. S.; CALATRAVA, I. R. He-Ne laser therapy by fibroendoscopy in the mucosa of the equine upper airway. **Lasers in surgery and medicine**, v. 16, p. 184-8. 1995.

HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wound human skin fibroblasts. **Photomedicine and laser surgery**, v. 23, no. 3, p. 251-9, June. 2005.

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 in surgery and medicine**, v. 38, no. 1, p. 74-83, Jan. 2006.

HERNANDORENA, B. H.; GONZALES, J. C. R.; GARCIA, J. C. R. Animais de laboratório em la Endocrinologia: Biomodelos de la Diabetes Mellitus tipo 1. **Revista Cubana Endocrinologia**, v. 12, n. 3, p. 168-77. 2001.

HIRONOBU, I. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF- β and CTGF. **Current opinion in rheumatology**, v. 14, p. 681-5. 2002.

HIROSE, M. et al. Expression of cytokines and inducible nitric oxide syntase in inflamed gingival tissue. **Journal of Periodontology**, v. 72, no. 5, p. 590-7, May. 2001.

HOMO-DELARCHE, F. Is pancreas development abnormal in the non-obese diabetic mouse, a spontaneous model of type I diabetes? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, no.4, p. 437-47, Feb. 2001.

HOPKINS, J.T.; eet al. Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: a triple-blind, sham-conrolled study. **Journal of athletic training**, v. 39, no. 3, p. 223-9, Sep. 2004.

HOURELD, NO.; ABRAHAMSE, H. In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm². **Photomedicine Laser Surgery**, v. 25, no. 2, p. 78-84, Apr. 2007a.

HOURELD, NO.; ABRAHAMSE, H. Effectiveness of helium-neon laser irradiation on viability and cytotoxicity of diabetic-wounded fibroblast cell. **Photomedicine Laser Surgery**, v. 25, no. 6, p. 474-81, Dec. 2007b.

HOURELD, NO.; ABRAHAMSE, H. Irradiation with a 632.8 nm helium-neon laser with 5 J/cm² stimulates proliferation and expression of interleukin-6 in diabetic wounded fibroblast cells. **Diabetes technology & therapeutics**, v. 9, no. 5, p. 451-9, Oct. 2007c.

INTERNATIONAL CONSULTATIVE SECTION – Working Group on the Diabetic Foot (**IWGDF**, 2009) Dec. 2009. Disponivel em: < www.iwgdf.org >. Acesso em: 01 Dec. 2009

JAILWALA, P. et al. Apoptosis of CD4⁺ CD25(high) T cells in type 1 diabetes may be partially mediated by IL-2 deprivation. **PLoS ONE (Online)**, v. 4, no. 8, p. e6527, Aug. 2009.

KAHI, S et al. A switch towards Th2 during serological rebound in children with congenital toxoplasmosis. **Clinical and experimental immunology**, v. 117, no. 3, p. 524-8, Sep. 1999.

KANAZAWA, Y. et al. Non-obese-diabetic mice: immune mechanisms of pancreatic β -cell destruction. **Diabetologia**, v. 27, p.113-5. 1984.

KENDALL, H. K. et al. Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts. **Journal of periodontal research**, v. 35, no. 4, p. 194-200, Aug. 2000.

KHADRA, M. et al. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. **Clinical oral implants research**, v. 15, no. 3, p. 325-32, June. 2004.

KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W. H. Global burden of diabetes, 1995-2025- prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**, v. 21, no. 9, p, 1414-24, Sep. 1998.

KIRSTEN, V. R. **Caracterização do modelo experimental NOD (Nonobese diabetic) em ambiente convencional**. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde)-Faculdade de Medicina da PUCRS, Porto Alegre, 2006.

KLINGLER K. et al. Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes. **Infection and immunity**, v. 65, no. 12, p. 5272-8, Dec. 1997.

KOLÁROVÁ, H.; DITRICHOVÁ, D.; WAGNER, J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. **Lasers in surgery and medicine** , v. 24, p. 231-5. 1999.

LEITER, E. H.; PROCHAZKA, M.; COLEMAN, D. L. Animal model of human disease: The Non-Obese Diabetic (NOD) Mouse. **American Journal of Pathology**, v. 128, no. 2, p. 380-3, Aug. 1987.

LINCOLN, NO. B. et al. Education for secondary prevention of foot ulcers in people with diabetes: a randomised controlled trial. **Diabetologia**, v. 51, p. 1954-61, Aug. 2008.

LOHINAI, Z. et al. Evidence for the expression of cyclooxygenase-2 enzyme in periodontitis. **Life sciences**, v. 70, no. 3, p. 279-90, Dec. 2001.

LOSCALZO, J. et al. Genetic determinants of vascular oxidant stress and endothelial dysfunction. **Congest Heart Fail**, v. 11, no. 2, p. 73-9, Mar-Apr. 2005.

MAIER, P. et al. Determination of active TGF- β 2 in aqueous humor prior to and following cryopreservation. **Molecular Vision**. v. 12, p. 1477-82. 2006.

MAIYA, G. A.; KUMAR, P.; RAO, L. Effect of low intensity helium-neon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. **Photomedicine and laser surgery**, v. 23, no. 2, p. 187-90. 2005.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 78, no. 4, p. 393-410. 2003.

MARCON, K.; SAFELICE, A. E. Efeitos do laser GaAlInP no processo de cicatrização de feridas induzidas em ratos. **Revista da Fisioterapia da FURB**, v. 1, n. 1, p. 1-8, fev. 2005.

MARGOLIS, D.J.; BERLIN, J.A.; STROM, B.L. Risk factors associated with the failure of a venous leg ulcer to heal. **Archives of dermatology**, v. 135, p. 920-6, Aug. 1999.

MASON, C. P. L. et al. Treatment of experimentally induced transient cerebral ischemia with low energy inhibits nitric oxide synthase activity and un-regulates the expression of transforming growth factor-beta 1. **Laser in Surgery Medicine**, v. 31, p. 283-8, May. 2002.

MELANITOU, E.; FAIN, P.; EISENBARTH, G.S. Genetics of type 1A (immune mediated) diabetes. **Journal of Autoimmunity**, v. 21, p. 93-8. 2003.

MILECH, A.; OLIVEIRA J. E. P. **Diabetes Mellitus: clínica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar**. São Paulo: Atheneu, 2004.

MIRZAEI, M. et al. Effect of low-level laser therapy on skin fibroblasts of streptozotocin-diabetic rats. **Photomedicine and laser surgery**, v. 25, no. 6, p. 519-25. 2007.

MIYAUCHI, M. et al. Immuno-localization of COX-1 and COX-2 in the rat molar periodontal tissue after topical application of lipopolysaccharide. **Archives of oral biology**, v. 49, no. 9, p. 739-46, Sep. 2004.

MONCADA, S.; ERUSALIMSKY, J. D. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? **Nature reviews - Molecular cell biology**, v. 3, no. 3, p. 214-20, Mar. 2002.

MORTON, R. S.; DONGARI-BAGTZOGLU, A. I. Cyclooxygenase-2 is upregulated in inflamed gingival tissues. **Journal of periodontology**, v. 72, no. 4, p. 461-9, Apr. 2001.

MURPHY, M. O. et al. Expression of growth factors and growth factor receptor in non-healing and healing ischaemic ulceration. **European journal of vascular and endovascular surgery**, v. 31, p. 516-22, May. 2006.

NAGY, A. et al. reduced oral wound healing in the NOD mouse model for type 1 autoimmune diabetes and its reversal by epidermal growth factor supplementation. **Diabetes**, v. 50, no. 9, p. 2100-4, Sep. 2001.

NUSSBAUM, E. L.; ZUYLEN, J. V.; BAXTER, G. D. Especification of treatment dosage in laser therapy: unreliable equipment and radiantpower determination as confounding factors. **Brazilian journal of physical therapy**, p. 157-67. 1999.

OHNEDA, A et al. Insulin and glucagon in spontaneously diabetic non-obese mice. **Diabetologia**, v. 27, p. 460-3, Aug. 1984.

OKADA, H.; KIDA, T.; YAMAGAMI, H. Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingival of human chronic periodontitis. **Infection and immunity**, v. 41, no. 1, p. 365-74, July. 1983.

OLD, L.J. Tumor necrosis factor. **Clinical bulletin** , v. 6, no. 3, p. 118-20. 1976.

PANJAMURTHY, K.; MANOHARAN, S.; RAMACHANDRAN, C.R. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. **Cellular & molecular biology letters**, v. 10, no. 2, p. 255-64. 2005.

PEDROSA, H. C. et al. The diabetic foot in South America: progress with the Brazilian save the diabetic foot project. **Neuropathy Issue**, v. 16, p. 10-7. 2004.

POSTEN, W. et al. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. **Dermatologic surgery**, v. 31, no. 3, p. 334-40, Mar. 2005.

POURREAU-SCHNEIDER NO., et al. Helium-neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. **American journal of pathology**, v. 137, p. 171-8. 1990.

RABELO, S. B.; VILLAVERDE, A. B.; NICOLAU, R. et al. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, no. 4, p. 474-9. 2006.

RANGANATHAN, P. et al. Expression profiling of genes regulated by TGF-beta: differential regulation in normal and tumor cells. **BMC Genomics**, v. 8, p. 98. 2007.

REWERS M.; KLINGENSMITH, G. J. Prevention of Type 1 Diabetes. **Diabetes Spectrum**, v. 10, no. 4, p. 282-92. 1997.

RIDGWAY, W. M. The Non Obese Diabetic (NOD) Mouse: A Unique Model for Understanding the Interaction Between Genetics and T Cell Responses. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v.4, p. 263-9. 2003.

ROCHA J. C.T. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogênese. **Revista Sul-Brasileira de odontologia**, v. 17, no. 1, p. 44-8, Out. 2004.

ROCHA J. L. L. et al. Aspectos relevantes da interface entre diabetes mellitus e infecção. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 46, no. 3, p. 221-9. 2002.

ROCHA JÚNIOR, A. M. et al. Effects of the low level laser therapy on the evolution of the wound healing in human: the contribution of in vitro and in vivo experimental studies. **Jornal vascular brasileiro**, v. 6, no. 3, p. 258-66, Feb. 2007.

ROCHA JÚNIOR, A. M. et al. Low-level laser therapy increases transforming growth factor- β 2 expression and induces apoptosis of epithelial cells during the tissue repair process. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, no. 2, p. 303-7. 2009.

ROCHA JÚNIOR, A. M. et al. Modulation of fibroblast proliferation and inflammatory response by low-intensity laser therapy in tissue repair process. **Anais brasileiros de dermatologia** , v. 81, n. 2, p. 150-6, Mar. 2006.

ROCHKIND, S.; ROUSSO, M.; NISSAN, M. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Laser in Surgery Medicine**, v. 9, p. 174-8. 1989.

ROSSOMANDO, E. F. et al. Tumour necrosis factor alfa in gengival fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. **Archives of oral biology**,. v. 35, p. 431-4. 2000.

SAHL, W.J.JR.; CLEVER, H. Cutaneous scars: part I. **International journal of dermatology** ,. 33, no. 10, p. 681-91, Oct. 1994.

SALVEMINI, D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. **Cellular and molecular life sciences** , v. 53, no. 7, p. 576-82, Jul. 1997.

SALVEMINI, D.; et al. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 90, no. 15, p. 7240-4, Aug. 1993.

SANDLER, N. O. G. et al. Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. **Journal of immunology**, v. 171, p. 3655-67. 2003.

SCHWARZNAU, A. et al. IL-1beta receptor blockade protects islets against pro-inflammatory cytokine induced necrosis and apoptosis. **Journal of cellular physiology**, v. 220, no. 2, p. 341-7, Aug. 2009.

SHAH, M.; FOREMAN, D. M.; FERGUSON, M. W. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wound reduces scarring. **Journal of cell science**, v. 108, p. 985-1002. 1995.

SHAPIRA, L. et al. Experimental stress suppresses recruitment of macrophages but enhanced their *P. gingivalis* LPS-stimulated secretion of nitric oxide. **Journal of periodontal research**, v. 71, no. 3, p. 476-81, Mar. 2000.

SHAPIRA, L. et al. Strain-dependent activation of monocytes and inflammatory macrophages by lipopolysaccharide of *porphyromonas gingivalis*. **Infection and immunity**, v. 66, no. 6, p. 2736-42, June. 1998.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **New England journal of medicine**, v. 341, no.10, p. 738-46, Sep. 1999.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Consenso Brasileiro sobre diabetes: diagnóstico e classificação do Diabetes Mellitus e tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2. Rio de Janeiro, 2003.

SPANIKOVA, A. et al. The effect of chronic nitric syntases inhibition on regulatory proteins in rat hearts. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 312, no. 1-2, p. 113-20, May. 2008.

SPICER, M. S.; GOLDBERG D. J. Laser in Dermatology. **JADA**, v. 34, p. 1-25. 1996.

SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B. A major advance in the use of growth factors to enhance wound healing. **Journal of clinical investigation**, v. 92, p. 2565-6. 1993.

STADLER, I. et al. 830-nm irradiation increases the wound tensile strength in a diabetic murine model. **Laser in surgery and medicine**, v. 28, no. 3, p. 220-6. 2001.

SUGRUE, M. E. et al. The use of infrared laser therapy in the treatment of venous ulceration. **Annals of vascular surgery**, v. 4, p. 179-81. 1990.

SULLIVAN, S. R. et al. Topical application of laminin-332 to diabetic mouse wounds. **J Dermatol Sci**. v. 48, no. 3, p. 177-88, Dec. 2007.

SUSCHEK, C. V.; SCHNORR, O.; KOLB-BACHOFEN, V. The role of iNOS in chronic inflammatory process in vivo: is it damage-promoting, protective, or active at all? **Current molecular medicine**, v. 4, no. 7, p. 763-75, Nov. 2004.

SUTHERLAND, A. P. et al. Interleukin-21 is required for the development of type 1 diabetes in NOD mice. **Diabetes**, v. 58, no. 5, p. 1144-55, May. 2009.

TANAKA, A. et al. Expression of p53 family in scars. **Journal of dermatological science**, v. 34, p. 17-24. 2004.

TARTARUNAS, A.C.; MATERA, J. M., DAGLI, M. L. Z. Estudo clínico anátomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico: utilização do laser de baixa potência AsGa (940nm). **Acta cirúrgica brasileira**, v. 13, p. 86-93. 1998.

TAUBMAN, M. A.; KAWAI, T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. **Critical reviews in oral biology and medicine**, v. 12, no. 2, p. 125-35. 2001.

THOMAS, D. W.; ONEILL, I. D.; HARDING, K. G. Cutaneous wound healing: a current perspective. **Journal of oral maxillofacial surgery**, v. 53, p. 442-7. 1995.

THOMAZ J. B. **Síndromes venosas**: diagnóstico e tratamento. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. Cap. 14, p. 191-2.

TIPTON, D. A. et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors decrease interleukin-1-beta-stimulated prostaglandin E2 and IL-6 production by human gingival fibroblast. **Journal of periodontology**, v. 74, no. 12, p. 1754-63, Dec. 2003.

TOKORO, Y. et al. Relevance of local Th2-type cytokine mRNA expression in immunocompetent infiltrates in inflamed gingival tissue to periodontal disease. **Clinical and experimental immunology**, v. 107, no. 1, p. 166-74, Jan. 1997.

TOREZAN, L. A. R., OSÓRIO, NO. Laser em Dermatologia: principios físicos, tipos e indicações. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 74 n. 1, p. 13-20, jan/fev. 1999.

VIEGAS, V. N. O. et al. Effect of low-level laser therapy on inflammatory reactions during wound healing: comparision with meloxicam. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, no. 6, p. 467-73. 2007.

VINCK, E.M.; et al. Increase fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser radiation. **Laser in medical science**, v. 18, p. 95-9, May. 2003.

WEIS, L.C. et al. Utilização do laser de baixa potência nas clínicas de fisioterapia de Piracicaba, SP. **Fisioterapia Brasil**, v. 6, n. 2, p. 124-9. 2005.

WOODRUFF, L.D. et al. The efficacy of laser therapy in wound repair a meta-analysis of the literature. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 22, no.3, p. 241-7. 2004.

WU, S. C. et al. Use of pressure offloading devices in diabetic foot ulcers. Do we practice what we preach? **Diabetes Care**, v. 31, no. 11, p. 2118-9, Nov. 2008.

WU, X.Y. et al. The role of connective tissue growth factor, transforming growth factor β 1 and Smad signaling pathway in cornea wound healing. **Chinese medical journal** , v. 119, no. 1, p. 57-62, July. 2006.

YAMAMOTO, M.; KAWABATA, K.; MCGHEE, J. Absence of exogenous interleukin-4 apoptosis of gingival macrophages may contribute to chronic inflammation in periodontal diseases. **The American journal of pathology**, v. 148, no. 1, p. 331-9, Jan. 1996.

YANG, Y.; SANTAMARIA, P. Lessons on autoimmune diabetes from animal models. **Clinical Science**, v. 110, p. 627-39, doi: 10.1042/CS20050330, May. 2006.

YASUDA, K.; AOSHIBA, K.; NAGAI, A. Transforming growth factor-beta promotes fibroblast apoptosis induced by H_2O_2 . **Experimental lung research**, v. 29, no. 3, p. 123-34. 2003.

YOU, S. et al. Transforming growth factor- β and T-cell-mediated immunoregulation in the control of autoimmune diabetes. **Immunological Reviews**, v. 212, p. 185-202. 2006.

YU, W.; NAIM, J. O.; LANZAFAME, R. J. The effects of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. **Photochemistry and photobiology**, v. 59, no. 2, p. 167-70, Feb. 1994.

ZHANG, L., NAKAYAMA M.; EISENBARTH, G.S. Insulin as an Autoantigen in NOD/Human Diabetes. **Current opinion in immunology**, v. 20, no. 1, p. 111-8, February. 2008.

ZHANG, Y. M.; SU, Y.; JIN, Z. Q. Research on histologic changes of periodontal tissue, testification of TNF-alfa and their relationship in diabetics rats. **Shanghai journal of stomatology**, v. 12, no. 5, p. 352-5, Oct. 2003.

ZOCHODNE, D. W.; LEVY, D. Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system. **Cellular and molecular biology**, v. 51, no. 3, p. 255-67, Sep. 2005.