



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA

EFEITO DO LASER HeNe NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DIABÉTICAS EM
RATOS

PÂMELLA FERREIRA RODRIGUES

RIO BRANCO - AC

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA

EFEITO DO LASER HeNe NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DIABÉTICAS EM
RATOS

PÂMELLA FERREIRA RODRIGUES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Inovação Tecnológica.**

Área de concentração: Ciência e Inovação Tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Josimar Batista Ferreira

RIO BRANCO - AC

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA**

Pâmella Ferreira Rodrigues

**EFEITO DO LASER HeNe NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DIABÉTICAS EM
RATOS**

**Prof. Dr. Josimar Batista Ferreira
CCBN – UFAC
(Orientador)**

**Prof. Dra. Clarice Maia Carvalho
(Examinador membro do PPG-CITA)**

**Prof. Dr. Wagner de Jesus Pinto
(Examinador membro externo ao PPG)**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à Deus por manter minha vida e saúde para a realização de conquistas, aos meus pais, que mesmo distante, se fazem sempre presentes e ao meu filho Rodrigo, que por ele luto para novas conquistas e realizações nas nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por minha vida, saúde, força, superação, de poder subir mais um degrau na minha vida;

Aos meus pais, José Ferreira e Rosangela mesmo longe estão sempre do meu lado, agradeço pela confiança, apoio, carinho, amor;

Ao meu filho, Rodrigo, pela compreensão nas minhas ausências, mas tudo isso meu filho é para nossa vida;

Aos meus familiares, irmão, tias, tios, madrinha, também distantes mas sempre no meu coração, obrigada pela força;

Ao meu amigo, companheiro de todas as horas, João Araújo Bueno Júnior, pela paciência, apoio, compreensão, sempre do meu lado, obrigada;

Aos meus orientadores Professor Doutor Josimar, a Professora Doutora Clarice e Professor Doutor Wagner, agradeço infinitamente por tudo que fizeram por mim, sem palavras, só quero um dia ser pelo menos um pedacinho de vocês;

Enfim, agradeço por todos que de certa forma colaboraram com este trabalho, entenderam minhas ausências e angústias.

RESUMO

O Diabetes Melito (DM) é uma condição metabólica crônica caracterizada por hiperglicemia resultante de deficiência absoluta ou relativa na produção ou secreção de insulina. O DM é responsável por uma vasta gama de complicações: cardiopatias, nefropatia, neuropatia periférica e retinopatias. Pacientes pós fratura e portadores de DM apresentam cicatrização retardada, uma vez que o DM influencia na produção de fatores de crescimento endotelial vascular e fator de plaquetas no local da fratura durante fase inicial da cicatrização, resultando em proliferação e diferenciação celular. A terapia com laser de baixa intensidade tem sido utilizada clinicamente para tratar tecidos moles visando acelerar o processo de cicatrização de feridas, bem como caracterizar os processos metabólicos celulares, o que ocasiona aumento na capacidade de regeneração dos tecidos biológicos. Portanto, este trabalho objetivou verificar o efeito do laser HeNe em macrófagos e fibroblastos no tratamento de lesão cutânea em ratos euglicêmicos e diabéticos. Foi utilizado 40 ratos machos jovens Wistar, divididos em dois protocolos com 4 grupos cada, sendo o protocolo 1 com animais controle e diabéticos com lesão tratados ou não com laser por 7 dias, e no protocolo 2 os animais controle e diabéticos com lesão tratados ou não com laser por 14 dias. Os animais foram induzidos ao diabetes por aloxanamonoidratada dissolvida em solução tampão citrato, sendo utilizados animais com níveis glicêmicos igual ou superior a 126mg/100dL de soro. Os procedimentos seguiram as normas da COBEA, os animais foram anestesiados por via peritoneal, e submetidos à tricotomia, em seguida um fragmento de pele e tecido subcutâneo foi retirado por meio de um punch, e iniciou-se a sequência de tratamento após a lesão com aplicações de laser HeNe a 3J/cm², finalizando com análise histológica de macrófagos e fibroblastos. Houve efeito significativo na utilização do laser HeNe na formação de fibroblastos e macrófagos, comparando os dois grupos euglicêmico e diabéticos, sem tratamento e com tratamento em 7 e 14 dias de lesão cutânea, observou-se para ratos euglicêmico, foi significativo em 14 dias comparando animais tratado e não tratado, ao passo que, no grupo diabético tanto com 7 dias quanto com 14 dias pós lesão. Concluímos que a aplicação do laser de baixa intensidade é benéfica ao processo de cicatrização de lesão cutânea em ratos euglicêmicos e diabéticos, visando proliferação de macrófagos e fibroblastos.

Palavras-chave: Cicatrização; Diabetes Melito; Laser HeNe.

ABSTRACT

Diabetes Melito (DM) is a chronic metabolic condition characterized by hyperglycemia resulting from absolute or relative deficiency in the production or secretion of insulin. DM is responsible for a wide range of complications: heart disease, nephropathy, peripheral neuropathy and retinopathies. Post-fracture patients and DM patients present delayed healing, since DM influences the production of vascular endothelial growth factors and platelet factor at the fracture site during the initial healing phase, resulting in cell proliferation and differentiation. Low intensity laser therapy has been used clinically to treat soft tissues in order to accelerate the wound healing process, as well as to characterize cellular metabolic processes, which leads to an increase in the regeneration capacity of biological tissues. Therefore, this work aimed to verify the effect of HeNe laser on macrophages and fibroblasts in the treatment of cutaneous lesions in euglycemic and diabetic rats. A total of 40 young male Wistar rats were divided into two protocols with 4 groups each, being protocol 1 with control animals and diabetics with lesions treated with or without laser for 7 days, and in protocol 2 control animals and diabetics with treated or Not with laser for 14 days. The animals were induced to diabetes by aloxanamonoide dissolved in citrate buffer solution, using animals with glycemic levels equal to or greater than 126mg/100dL serum. The procedures followed COBEA standards, the animals were anesthetized peritoneally and submitted to trichotomy, then a fragment of skin and subcutaneous tissue was removed by means of a punch, and the treatment sequence was started after injury with Applications of HeNe laser at 3J / cm², ending with histological analysis of macrophages and fibroblasts. There was a significant effect in the use of HeNe laser in the formation of fibroblasts and macrophages, comparing the two euglycemic and diabetic groups, without treatment and with treatment in 7 and 14 days of cutaneous lesion, it was observed for euglycemic mice, it was significant in 14 days comparing Treated and untreated animals, while in the diabetic group both at 7 days and at 14 days post injury. We conclude that the application of low intensity laser is beneficial to the healing process of cutaneous lesions in euglycemic and diabetic rats, aiming at proliferation of macrophages and fibroblasts.

Key words: Healing; Diabetes Melito; Laser HeNe.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da molécula de insulina.....	15
Figura 2. Esquematização das fases do processo de cicatrização.....	23
Figura 3. Tricotomia e remoção do fragmento da pele.....	33
Figura 4. Microscopia óptica de macrófagos.....	39
Figura 5. Microscopia óptica de fibroblastos.....	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 DIABETES MELITO.....	12
2.2 CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES MELITO.....	12
2.2.1 Diabetes Melito Tipo 1 (DM 1).....	12
2.2.2 Diabetes Melito Tipo 2 (DM 2).....	13
2.2.3 Diabetes Gestacional.....	13
2.2.4 Outros Tipos de Diabetes.....	14
2.3 IMPACTO DO DIABETES MELITO NO METABOLISMO.....	14
2.4 A NEUROPATIA DIABÉTICA PRECEDE AS FERIDAS DIABÉTICAS.....	19
2.5 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO.....	21
2.6 CARACTERÍSTICAS DO LASER.....	26
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 GERAL.....	31
3.2 ESPECÍFICOS.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 INDUÇÃO DO DIABETES MELITO.....	32
4.2 ATO OPERATÓRIO.....	33
4.3 TRATAMENTO LASER HeNe.....	34
4.4 PROCEDIMENTOS DE EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DE MATERIAL.....	34
4.5 ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	35
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	37
5.1 EFEITO DO LASER HeNe NOS MACRÓFAGOS EM LESÃO CUTÂNEA DE RATOS WISTAR EUGLICÊMICOS E DIABÉTICOS.....	38
5.2 EFEITO DO LASER HeNe NOS FIBROBLASTOS EM LESÃO CUTÂNEA DE RATOS WISTAR EUGLICÊMICOS E DIABÉTICOS.....	40
6. CONCLUSÃO.....	43
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
8. REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes Melito (DM) é uma doença metabólica associada à hiperglicemia, resultante da diminuição ou ausência completa na síntese da insulina secretada pelas células β pancreáticas (PRECECHTELOVA et al., 2014).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) informam que em 2011, aproximadamente 347 milhões de pessoas em todo o mundo eram portadores do DM (DANAEI et al., 2011). No ano 2000 a probabilidade de um indivíduo nascer diabético nos Estados Unidos era de 33% para homens e 39% para mulheres (NARAYAN et al., 2003). O DM pode causar perda da visão, devido edema macular diabético - EDM (MOSS, 1998). De fato, um terço dos diabéticos apresentam retinopatia diabética, dos quais 7% são afetados pela EDM (DING, 2012).

No Brasil, a Pesquisa Nacional de Saúde, realizada pelo Ministério da Saúde em parceria com o IBGE (2015), identificou que o DM atinge 9 milhões de brasileiros, o que corresponde a 6,2% da população adulta, onde 7% das mulheres (5,4 milhões) apresentam maior probabilidade do que os homens, que correspondem a 5,4% (3,6 milhões). De acordo com a *International Diabetes Foundation (IDF)* em 2013, no Brasil consta 14.250.800 portadores do diabetes com idade de 20 a 79 anos, correspondendo a 11,9% da população. Já em 2015 aumentou para 14,3% o número de portadores de DM e neste mesmo ano foram a óbito 130.712 pessoas.

Guariguata et al., (2014) afirma que em 2035 provavelmente haverá 592 milhões de habitantes portadores do DM, doença que em longo prazo evolui, sendo suas complicações mais frequentes: doença coronária, doença vascular periférica, anomalias do sistema nervoso e anomalias do sistema urinário. Após um ferimento, se inicia uma sequência de eventos biológicos, dinâmicos e complexos, com objetivo de promover o reparo da lesão, caracterizando a cicatrização (CASTELO BRANCO-NETO et al., 2006). Embora cada tipo de tecido possua

seus próprios aspectos de cicatrização, este processo é dividido em três fases comuns: inflamação, proliferação e remodelação/maturação (RAND, 2016). A cicatrização de feridas compreende várias fases de sobreposição: hemostasia/coagulação, inflamação, proliferação, reepitelização e remodelação (MOURA et al., 2013).

Durante a hemostasia, em poucas horas é formado um tampão de fibrina, plaquetas agregadas que liberam citocinas e células de crescimento que recrutam células inflamatórias para o local da ferida (MOURA, 2013; SILVA et al., 2003). Na fase inicial da cicatrização, ocorre dano nas células e em pequenos vasos sanguíneos, onde as células morrem pela agressão ocasionada por outras células lesadas (DAVIES, 2002).

Já na segunda fase, inflamatória, é resultante da microcirculação dos tecidos reagindo à lesão, finalizando o processo iniciando a terceira fase, proliferativa, incluindo a reconstrução dos tecidos, revestimento e reforço da ferida, através da formação de um tecido fibroso denso, denominada cicatriz (HERLIKY, 2002). A força do tecido de cicatrização compreende 15% do tecido original após três semanas. Finalizando este processo com a fase de remodelamento do tecido, esta pode se estender por meses ou anos, com estrutura do tecido novo (LOW, 2001).

Feridas agudas progridem através das diferentes fases do processo de cicatrização, porém, em pacientes diabéticos esse processo é mais lento, o que resulta em feridas crônicas não cicatrizantes (TELLECHEA et al., 2010). A resposta inflamatória prolongada é observada, porém, é ineficaz devido ao fato de macrófagos apresentam fagocitose reduzida para liberar as citocinas (ZYKOVA et al., 2000).

Na literatura, a fototerapia é citada como uma terapia eficiente no tratamento de feridas (MEYER, 2010). De acordo com Silva (2003), a utilização do laser terapêutico Hélio-Neônio (HeNe) têm acelerado o processo de cicatrização de lesão, o que favorece a recuperação mais rápida do indivíduo. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito do laser HeNe no tratamento de lesão cutânea em ratos wistar euglicêmicos e diabéticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIABETES MELITO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) representam o maior problema global de saúde, gerando alto número de óbitos prematuros, perda da qualidade de vida, alto grau de limitação e incapacidade, também consideradas responsáveis por impactos econômicos para as famílias, comunidade e para a sociedade geral (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES MELITO

2.2.1 Diabetes Melito Tipo 1

Outrora conhecido como diabetes juvenil, é decorrente da destruição das células beta pancreáticas por meio de uma resposta autoimune, ou seja, pela formação de anticorpos pelo próprio organismo contra as células beta levando a deficiência de insulina. Os anticorpos ICA (anti-ilhota), IAAs (anti-insulina), GAD (ácido glutâmico descarboxilase) e IA-2(anti-tirosinofosfatase) podem ser identificados em amostra de sangue, e estão presentes em cerca de 85 a 90% dos casos de DM 1 no momento do diagnóstico. Em geral costuma acometer crianças e adultos jovens, mas pode ser desencadeado em qualquer faixa etária. O DM 1 ocorre em aproximadamente de 5-10% da população de diabéticos sendo mais prevalente em alguns países europeus. No Brasil, a incidência é de 7 pacientes a cada 100 mil habitantes. Os sintomas do DM1 surgem geralmente na infância e adolescência, o que torna os pacientes dependentes de insulino-terapia por toda a vida (GROTE; WRIGHT, 2016).

2.2.2 Diabetes Melito Tipo 2

Nesta forma de diabetes está incluída a grande maioria dos casos, (cerca de 90% dos pacientes diabéticos), nesse caso, a insulina é sintetizada pelas células beta pancreáticas, porém, em quantidades insuficientes ou sua ação nos tecidos periféricos não ocorre da forma esperada, caracterizando um quadro de resistência insulínica (GROTE et al., 2013).

Essa condição conduz ao aumento da síntese de insulina para tentar manter a glicemia em níveis de referência exaurindo as células beta, nesse momento, surgindo então o diabetes. A instalação do quadro é mais lenta e os sintomas de polidipsia, poliúria, retinopatia, neuropatia e cardiopatias podem demorar vários anos até que se manifestem. Se não reconhecido e tratado a tempo, também pode evoluir para um quadro grave de desidratação e coma (ANNA; WEINREB, 2015).

Ao contrário do DM 1, o DM 2 tem relação direta com o sobrepeso acometendo principalmente adultos a partir dos 50 anos. Contudo, observa-se, cada vez mais, o desenvolvimento do quadro em adultos jovens e até crianças. Isso se deve, principalmente, pelo aumento do consumo de gorduras e carboidratos aliados à falta de atividade física (MUL et al., 2015).

2.2.3 Diabetes Gestacional

O diabetes gestacional pode manifestar-se, por período transitório ou não e, ao término da gravidez, a paciente deve ser investigada e acompanhada. Na maioria das vezes ele é detectado no 3º trimestre da gravidez, através de um teste de sobrecarga oral de glicose. Gestantes com história prévia de diabetes gestacional, de perdas fetais, má formações fetais, hipertensão arterial, obesidade ou história familiar de diabetes não devem esperar o 3º trimestre para realizar o teste, já que sua chance de desenvolverem a doença é maior (KAUTZKY-WILLER et al., 2016).

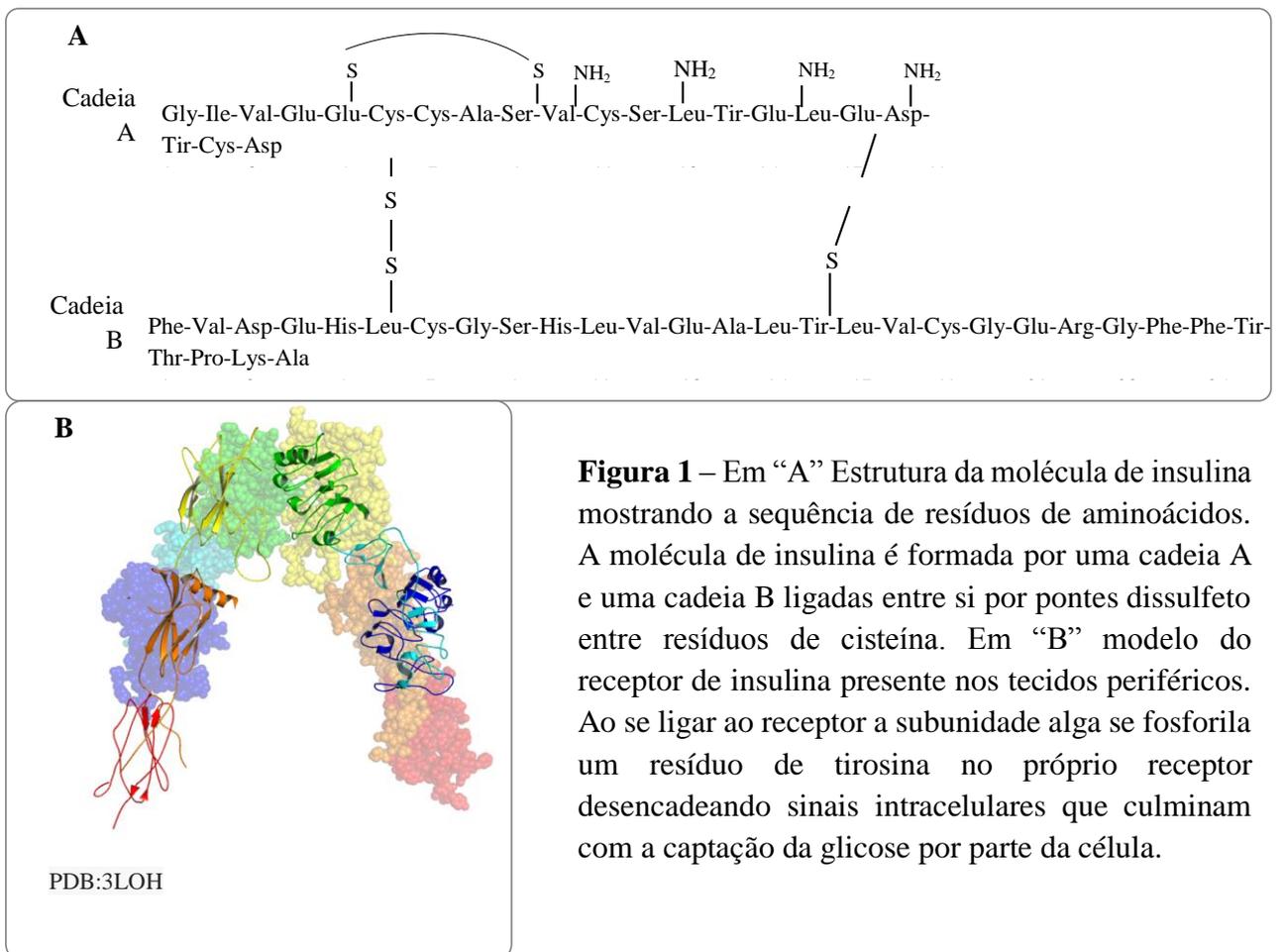
2.2.4 Outros Tipos de Diabetes

Outros tipos de diabetes são bem mais raros e incluem defeitos genéticos da função da célula beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas (pancreatite, tumores pancreáticos, hemocromatose), outras doenças endócrinas (Síndrome de Cushing, hipertireoidismo, acromegalia) e uso de certos medicamentos (CARBONEAU, 2017).

2.3 IMPACTO DO DIABETES MELITO NO METABOLISMO

O diabetes melito é uma condição metabólica na qual as células dos tecidos periféricos, sobretudo tecido adiposo e tecido muscular esqueléticos tornam-se incapazes de aproveitar a glicose como fonte de energia em função de não receberem ou receberem de forma inadequada o sinal da insulina (PINTO, 2014). As células possuem receptores de insulina (receptores do tipo tirosina cinase) que, quando acionados permitem que as células iniciem processos internos que a tornam capaz de captar a molécula de glicose (Figura 1).

Uma falha na produção de insulina resulta em altos níveis de glicose no sangue, já que esta última não é devidamente dirigida ao interior das células. No diabetes melito, a glicemia aumentada excede a capacidade de absorção no sangue está alta (acima do limiar renal), a reabsorção de glicose no túbulo proximal do rim é incompleta, e parte da glicose é excretada na urina (glicosúria). Isto aumenta a pressão osmótica da urina e conseqüentemente inibe a reabsorção de água pelo rim, resultando na produção aumentada de urina (poliúria) e na perda acentuada de líquido. O volume de sangue perdido será repostado osmoticamente da água armazenada nas células do corpo, causando desidratação e sede aumentada fazendo com que o indivíduo busque ingerir água em grande quantidade (polidipsia). A hiperglicemia também causa danos ao sistema circulatório da retina, levando a dificuldades de visão conhecidas como Retinopatia diabética (KEE et al., 2016).



A visão borrada é a queixa mais comum que leva ao diagnóstico de diabetes. O tipo 1 deve ser suspeito em casos de mudanças rápidas na visão, ao passo que o tipo 2 geralmente causa uma mudança mais gradual. Além dessas alterações, o diabetes descompensado pode levar a uma alteração drástica no metabolismo de obtenção de energia resultando em cetoacidose diabética, um estado extremo de desregulação metabólica caracterizada pela liberação de corpos cetônicos através do suor, urina e respiração (respiração de Kussmaul, um padrão de ventilação rápido e profundo), poliúria, náusea, vômito e dor abdominal e qualquer um dos vários estados de consciência alterados (confusão, letargia, hostilidade, mania, etc). Na cetoacidose diabética severa, pode ocorrer o coma (inconsciência), progredindo para a morte. Um estado raro, porém igualmente severo, é o coma hiperosmolar não-cetótico, que é mais comum na diabetes tipo 2, e é principalmente resultante da desidratação devido à perda de

líquido corporal decorrente da ingestão de grandes quantidades de bebidas contendo açúcar, levando a uma desidratação em decorrência da perda de líquido (VILAR, 2016).

O estado crônico de hiperglicemia acontece por manifestações de distúrbios metabólicos, são eles: incapacidade de transformar carboidratos em energia, de modo que a glicose absorvida não é captada pelos tecidos periféricos e se acumula no plasma (LIENHARD et al., 1992). Assim, surgem sintomas como: sede e fome excessiva, perda de peso, fraqueza muscular, hiperglicemia resultando na excreção da glicose pela urina (SAID et al., 2002).

Considerando a população mundial com idade de 20-79 anos, cerca de 14 milhões de pessoas foram diagnosticadas em 2015, e estima-se que até 2040 esse número subirá para 23,3 milhões (IDF, 2013). Esse número cresce pelo aumento e envelhecimento da população, como também pela alta prevalência de obesidade e sedentarismo, e maior tempo de vida das pessoas com DM (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DIABETES, 2016).

As flutuações hipo e hiperglicêmicas podem ocasionar complicações cardiovasculares, úlceras, retinopatias, nefropatia e coma podendo evoluir para óbito (TSUI et al., 2007). São várias as razões pelas quais os diabéticos são suscetíveis a desenvolver doença óssea e adquirir fraturas (NELSON, 2001). López-Barra (2001), sugere a baixa densidade de mineral ósseo, devido a alterações no metabolismo da vitamina D e do cálcio, em função da hiperglicemia, acarretando redução da densidade óssea o que aumenta as chances de fratura (TANAKA, 2009).

Hamada (2009), demonstra que a osteoporose e a osteopenia são complicações dos indivíduos com DM tipo 1, isso acontece pelo decorrente do estresse oxidativo e de alterações da função osteoblástica. De acordo com Maritim (2003), o aumento do estresse oxidativo desencadeia o surgimento e as complicações do DM. De fato, o ácido glutâmico descarboxilase (GAD), um antioxidante de células β -pancreática, é modificado por espécies reativas de oxigênio (ROS). Anticorpos anti-GAD encontrados no soro de pacientes com DM tipo 1, contribui para a patogênese da DM tipo 1 (TRIGWELL et al., 2001).

O diabetes tipo 2 apresenta relação entre resistência à insulina e obesidade, acometendo indivíduos acima de 40 anos. Nesse caso, o pâncreas secreta insulina em excesso, resultando na deteriorização das células β , que perdem a função de produzir a insulina, acarretando ao portador da doença a necessidade de insulina e medicamentos para aumentar a sensibilidade à insulina (GUYTON E HALL, 2002). O DM tipo 2 é um fator de risco significativo para as doenças cardiovasculares, apresentando um risco de duas vezes maior para a doença coronariana e subtipos de acidente vascular cerebral grave (COLLABORATION, 2010).

Alguns fatores predisponentes para o surgimento do DM tipo 2 são: tabagismo, etilismo, dieta baseada em macronutrientes, pobre em vitamina E, magnésio e cromo, aumento da massa do tecido adiposo e inatividade física, acomete mais frequentemente indivíduos adultos com predisposição genética, fatores ambientais como sedentarismo e obesidade, sendo responsáveis pela alteração da homeostase da insulina (RAHATI et al., 2014).

Pacientes que fazem uso de bebidas alcoólicas apresentam fatores de risco para o DM tipo 2, incluindo pancreatite aguda (DAS et al., 2013). Revisões sobre alcoolismo e o DM tipo 2 retratam que o alto consumo de álcool reduz a tolerância à glicose e causa resistência à insulina, o que pode ser considerado um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do DM tipo 2 (LI et al., 2016).

Em alguns países desenvolvidos, o DM tipo 2 é classificado em quarta ou quinta principal causa de morte, ocasionando diversos problemas cardíacos e até acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico ou hemorrágico (MAINAR; ARTIEDA, 2014). O DM tipo 2 acomete de 85% a 90% do total de casos diabéticos, e normalmente, é diagnosticada em adultos que apresentam excesso de peso e hábitos sedentários, além de apresentar complicações como doenças graves do coração, olhos, rins, nervos, desenvolver infecções e amputação de membros inferiores – MMII (FERNANDES, 2009).

Outro tipo de DM é o diabetes mellitus gestacional (DMG), sendo uma das complicações mais frequentes do período gestacional, caracterizada por tolerância à glicose prejudicada que começa ou é reconhecido durante o período gestacional (PAGE et al., 2014).

A triagem da DMG tornou-se rotina no pré-natal devido ao fato de que poucas mulheres grávidas apresentam os sinais clínicos relacionados a doença (DAMM, 2009). Os fatores de risco para a DMG são: idade materna elevada, obesidade ou sobrepeso materno, história prévia de DMG, história familiar de DM tipo 2 (CATALANO, 2014). Vestergaard et al., (2009) concluíram que tanto o DM tipo 1 quanto o DM tipo 2 apresentam risco elevado de fraturas ósseas, e um estudo recente feito por Farr (2016), foi identificado um comprometimento da qualidade óssea e um maior risco de fratura naqueles com DM tipo 2.

O DM está associado com alta taxa de morbidade e mortalidade cardiovascular. A cardiomiopatia diabética é umas das complicações mais graves, sendo uma condição clínica caracterizada por remodelamento cardíaco, disfunção diastólica, fibrose miocárdica intersticial e redução da complacência cardíaca (HE et al., 2013). Maganti et al., (2014) acreditam que o DM é resultante de uma quebra na tolerância imune, resultando na infiltração de células T autorreativas nas ilhotas pancreáticas, alguns portadores têm um processo de cicatrização mais retardado.

A cicatrização é retardada e prejudicada em pacientes pós fratura com DM, prejudicando a produção de fatores de crescimento, transformador beta, semelhante à insulina, fator de crescimento endotelial vascular e fator de plaquetas no local da fratura durante fase inicial da cicatrização da fratura diabética, diferenciação celular e proliferação (GANDHI et al., 2006).

Estudo de Gooch (2000), retrata redução na síntese de colágeno em ratos diabéticos, o que influencia de forma negativa à cicatrização óssea. A membrana das células β pancreáticas contém receptores acoplados à proteína G que são críticos para a regulação da secreção de

insulina por hormônios e neurotransmissores (FRIDLYAND et al., 2016). A expressão do receptor acoplado a proteína G foi demonstrada em diversos tecidos periféricos, em vários tipos de célula, incluindo as ilhotas pancreáticas (KLARIS, 2011).

Por mais que seja importante, ainda não foi possível compreender completamente a interação complexa de sinais moleculares e eventos de transdução de sinal que controlam a funcionalidade e sobrevivência das células β , o que limita-nos a capacidade de desenvolver novas abordagens para prevenção e tratamento do DM (FRIDLYAND et al., 2016).

2.4 A NEUROPATIA DIABÉTICA PRECEDE AS FERIDAS DIABÉTICAS

As neuropatias diabéticas (ND) envolvem síndromes clínicas/subclínicas heterogêneas e complexas associadas à perda progressiva das fibras nervosas do sistema nervoso periférico somático e autonômico que acarretam sequelas importantes. A definição de ND de um consenso internacional é "a presença de sintomas e/ou sinais de disfunção de fibras nervosas periféricas em portadores de DM, após a exclusão de outras causas" (BOULTON et al., 1988), que enfatiza ainda a história e exame clínicos e exclusão de outras causas para confirmar o DM como a causa da ND uma vez que, 10% dos pacientes apresentam neuropatia de etiologia não diabética (DYCK et al., 1993).

Evidências mostram de que as sequelas neuropáticas são indicadores não apenas de risco de úlceras e amputação, (TAPP et al., 2003; VAN BALL et al., 2010), mas também de risco cardiovascular (SPALLONE et al., 2011), causam impacto na qualidade de vida (QV) pelos sintomas dolorosos, depressão e quedas (CAVANAGH et al., 1993). As mais comuns são as polineuropatias generalizadas simétricas, destacando-se a polineuropatia simétrica distal ou sensitivo-motora, denominada de "neuropatia diabética periférica" ou polineuropatia diabética (PND) periférica seguindo-se as autonômicas, sensitivo-agudas; e as focais e multifocais, menos frequentes (BOULTON et al., 2005). As terapias disponíveis incluem o

controle da glicemia e o tratamento da dor neuropática. A limitação dos estudos experimentais em traduzir para os pacientes diabéticos os mecanismos do dano e reparação neuronal explica as falhas dos estudos clínicos e a inexistência de um tratamento efetivo. Assim, no cenário atual a identificação de fatores de risco possíveis de modificação é fundamental, como os componentes da síndrome metabólica (hipertrigliceridemia, obesidade visceral, hipertensão [HAS], dislipidemia, e pré-diabetes [pré-DM]), cuja relação causal com o desenvolvimento de PND possibilitará o surgimento de novas terapias modificadoras da doença (BRIAN et al., 2012).

O excesso intracelular de glicose pode resultar no influxo aumentado da via poliol com aumento de sorbitol e frutose decorrente da maior atividade das enzimas aldose redutase (AR) e sorbitol desidrogenase e aumento do estresse oxidativo; a glicólise excessiva sobrecarrega a cadeia de transporte mitocondrial de elétrons e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS); o fluxo aumentado da via poliol aumenta a osmolaridade celular, reduz os níveis de NADPH e aumenta o estresse oxidativo. Finalmente, o fluxo aumentado da hexosamina está associado à lesão inflamatória. O excesso de ROS induz alterações intracelulares no retículo endoplasmático e no DNA (TAVAKOLI et al., 2011; BRIAN et al., 2012).

Ocorre formação de produtos finais avançados da glicação tardia (AGES) como, por exemplo, hemoglobina glicada, que ativam monócitos, células endoteliais, aumentam citocinas, moléculas de adesão intracelular (ICAM, Intracelular adhesion molecules) e fatores vasculares danificando a função biológica das proteínas (TAVAKOLI et al., 2011; BRIAN et al., 2012). A ligação de AGE com o receptor extracelular (RAGE) inicia uma cascata de efeitos inflamatórios através das NADPH oxidases e mais estresse oxidativo (CALSOLARI et al., 2013). Os AGES interagem com receptores tipo Toll (TLR, Toll-like receptors) e com RAGE ativam o fator de transcrição NFκ-B e citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF-α (VELOSO et al., 2011).

A dislipidemia tem papel importante, sobretudo no DM2. Os ácidos graxos livres (AGL) podem causar dano direto às células de Schwann e têm também efeitos sistêmicos com a liberação de citocinas inflamatórias pelos adipócitos e macrófagos. As LDL podem ser modificadas por oxidação ou glicação e se ligam a receptores extracelulares (incluindo o receptor de LDL oxidada LOX1, TLR-4 e RAGE), desencadeando cascatas de sinalização que ativam a NADPH oxidase e levam ao estresse oxidativo (VINCENT et al., 2009). Adicionalmente, o colesterol pode ser oxidado a oxisteróis que são capazes de causar apoptose em neurônios (VINCENT et al., 2011). Todos esses fatores em conjunto causam danos em fibras nervosas predispondo à formação de feridas diabéticas que podem levar a graves danos tissulares resultando em alguns casos em amputações.

2.5 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

A cicatrização é um processo fisiológico pelo qual o corpo substitui e restabelece a função normal dos tecidos danificados (RIBEIRO et al., 2004). O processo de cicatrização é classificado em fase inflamatória, fase proliferativa ou granulação e fase de remodelação ou maturação (JANIS; HARRISON, 2014).

As lesões cutâneas podem apresentar cicatrização por primeira ou segunda intenção, visto a natureza da ferida e a quantidade de tecido lesado (HESS, 2002; ROBBINS, 2005). Por primeira intenção a cicatrização acontece por aproximação das bordas, menor quantidade de colágeno e tempo de recuperação reduzido (GUIRRO, 2002). Em lesões cutâneas por segunda intenção, impossibilita a aproximação das bordas, além de ser um processo mais lento, com alto risco de infecção, resultando em retração cicatricial, cicatriz extensa e tratamento de alto custo, por sua vez, caracteriza-se por indução do reparo em feridas com perda maior de células e tecidos (MANDELBAUM, 2003).

Após o aparecimento de uma lesão acontece a liberação de mediadores que irão realizar o processo de reparo, inicia-se pela inflamação que é caracterizada pela migração de leucócitos e plaquetas, seguindo para a fase proliferativa ou fase de granulação, destacando aqui a angiogênese e aumento do número de fibroblastos para produção de colágeno, glicosaminoglicanos, elastina, fibronectina e proteases que de forma fisiológica remodela a ferida, finalizando com a epitelização, fase que demora meses, e tem por objetivo a melhoria nos componentes das fibras de colágeno, reabsorção de água, aumentando a força da cicatriz e reduzindo a espessura (SIMÕES, 2009). Portanto, a neovascularização diminui e posteriormente a cicatriz é considerada avascular, como acelular (ROCHA JÚNIOR, 2007).

A fase inicial do processo de reparo leva de 7 a 10 dias e a reabilitação completa pode acontecer por semanas ou meses (ARRUDA, 2007). A fase inflamatória se inicia logo após o trauma ou lesão e permanece por três ou quatro dias, conforme o tamanho da lesão tecidual. Quando o tecido é lesado de forma imediata têm-se respostas vasculares e celulares, onde neutrófilos são os primeiros leucócitos a se movimentarem para o tecido traumatizado, os monócitos se transformam em macrófagos, ingerindo os detritos celulares e os transportam para fora da área, e surgem também antígenos e anticorpos (RIBEIRO et al., 2004).

A fase proliferativa se inicia no segundo ou terceiro dia após a lesão e dura por 2 a 3 semanas, sendo marco inicial da formação da cicatriz (TAZIMA, 2008). Macrófagos vão estimular a angiogênese e os fibroblastos se multiplicam e formam um alicerce para células epiteliais migrantes, o que caracteriza o tecido granular da ferida, produzindo colágeno, elastina e reconstrução do tecido conjuntivo. Os fibroblastos iniciam a síntese de colágeno, formando fibras de diâmetro e tamanhos crescentes, essas que se tornam padrão bem-estruturado de aglomerados compactos. A síntese de colágeno reduz o número de capilares, sendo assim, a síntese de colágeno diminui a tentativa de equilibrar a quantidade de colágeno destruída (RIBEIRO et al., 2004).

Na fase de remodelação, os fibroblastos deixam a ferida, a cicatriz parece grande até que fibras de colágeno se reorganizem umas próximas as outras. Assim, junto com a desidratação, reduz o tamanho da cicatriz e aumenta sua força tensional. Desse modo, a maturação do tecido continua até atingir força máxima, mas não igual ao tecido original antes da lesão, 80% da força original é recuperado. O tecido reconstruído é remodelado de forma gradativa, e a cicatriz começa a ficar clara, plana e menos rígida (RIBEIRO et al., 2004). Na Figura 2 tem-se uma esquematização de como acontece o processo de cicatrização, bem como, cada uma de suas fases.

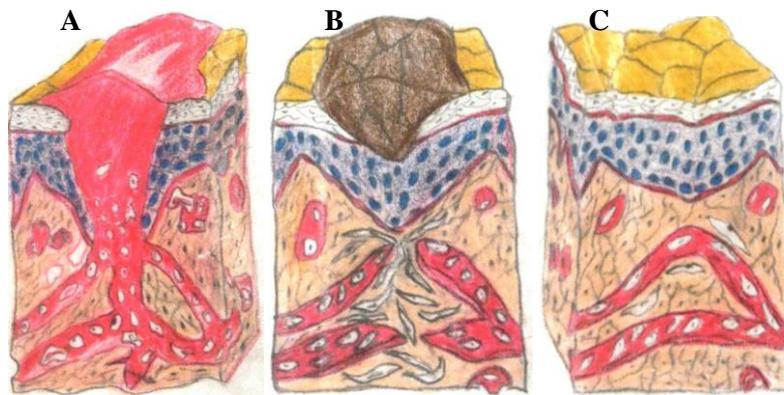


Figura 2. Etapas da cicatrização por primeira intenção. Em (A) fase inflamatória. Em (B) fase proliferativa, (C) fase de remodelação.

Fonte: próprio autor, adaptado do Núcleo de Telessaúde Científico do Rio Grande do Sul.

Os macrófagos fagocitam células senescentes, lesadas e ou mortas, restos celulares e digerem o material ingerido por meio da ação de enzimas hidrolíticas de seus lisossomas. Também auxiliam a defesa do corpo fagocitando e destruindo substâncias estranhas, incluindo microrganismos. Durante uma resposta imunológica fatores liberados por linfócitos ativam macrófagos aumentando sua atividade fagocitária, ou seja, os macrófagos fagocitam substâncias estranhas e células lesadas e senescentes, assim como restos celulares, e também participam do início da resposta imunológica (GARTNER; HIATT, 2007).

Os fibroblastos são as mais abundantes e mais amplamente distribuídas células do tecido conjuntivo. Derivados de células mesenquimais indiferenciadas, sintetizam a matriz extracelular do tecido conjuntivo propriamente dito. Apesar de serem consideradas células fixas do tecido conjuntivo, os fibroblastos são capazes de alguma movimentação, raramente passam por divisão celular, mas isso acontece durante a cicatrização (GARTNER; HIATT, 2007).

Além de degradar componentes da matriz extracelular os macrófagos também são importantes para produzir diversos fatores de crescimento, sendo eles: fator de crescimento epidérmico (FCE), fator de crescimento fibroblástico (FCF), fator de crescimento derivado de plaquetas (FCDP), fator de crescimento transformador beta (FCT- β) e fator de crescimento endotelial vascular (FCEV), (CESAR et al., 2010). A quimiotaxia de fibroblastos, bem como sua proliferação são funções dos FCE, FCF e FCDP, sendo o FCF responsável pela migração e proliferação de queratinócitos e o FCT- β pela deposição de componentes da matriz pelos fibroblastos (TOWNSEND, et al., 2011).

Na cicatrização de feridas, alguns fatores de crescimento como, por exemplo, fator básico de fibroblastos e fator de crescimento derivados de plaquetas, fazem ligação com seus respectivos receptores na membrana celular do fibroblasto. Fibroblastos ativados resultantes da cascata de ativação decorrente mostram níveis aumentados de mobilidade celular quimiotática, proliferação celular e síntese de colágeno (CORMACK, 2008).

Carvalho (2003), relata que as alterações das cicatrizações são responsáveis pela baixa síntese de colágeno e contribuem para aumentar os riscos de infecções e o tempo de reparo tecidual.

Alguns fatores sendo estes, locais e sistêmicos, podem dificultar ou impedir o processo de cicatrização, como por exemplo, déficit da oxigenação no tecido, aporte nutricional inadequado, infecção, necrose, ambiente seco, idade do indivíduo, extensão e profundidade da ferida e imunossupressão (HESS, 2002).

Qualquer alteração no processo de cicatrização acarreta à cicatrização patológica, compreendida com formação deficiente de tecido cicatricial, formação excessiva, caso da cicatriz hipertrófica e quelóide, e formação de contraturas (ROBBINS, 2005).

Devido hipoxemia e redução de células fagocitárias no leito da ferida, acarreta de modo significativo um atraso da cicatrização tecidual. A ND pode afetar 50% dos portadores de DM tipo 1 ou tipo 2 (BOULTON, 2004). Há heterogeneidade de manifestações clínicas e formas da ND na dependência do segmento do sistema nervoso acometido. Quando os nervos motores dos membros inferiores são comprometidos no indivíduo diabético acarreta em hipotrofia muscular, deformidades e pontos de pressão anormais (PORCIÚNCULA, 2007).

Os pacientes portadores de DM podem desencadear complicações macrovasculares e microvasculares, associadas à duração da doença, podendo aparecer em adultos jovens (SECREST et al., 2010). A neuropatia diabética é uma complicação microvascular que afeta 50% dos diabéticos (TESFAYE, 2010). Nesta complicação há perda sensorial, o que aumenta sete vezes mais o risco de ulceração do pé, além de ser o principal contribuinte para amputação não traumática das extremidades dos MMII (PRADHAN et al., 2009).

A neuropatia em portadores de DM apresenta redução de mediadores inflamatórios e um aumento da glicosilação de proteínas, o que favorece a ampliação da lesão inflamatória (COSTA, 2013). As úlceras do pé diabético (UPD) são feridas abertas crônicas que afetam de 15 a 20% dos pacientes com DM, resultando em hospitalizações prolongadas. Além disso, as UPD correspondem a 84% das amputações dos diabéticos, e está relacionada com as altas taxas de morbidade/mortalidade, representando de 25-50% do custo total de cuidados com DM (ARMSTRONG et al., 2013).

O tratamento das UPD é um desafio clínico importante, visto que as terapias disponíveis apresentam eficácia limitada. Sendo assim, novas estratégias de baixo custo e seguras para favorecer a melhora da cicatrização de feridas, seria de grande valor tanto social quanto econômico (EMANUELLI, 2016).

Em uma revisão sistemática realizada em 2016, as taxas de amputação ocasionadas por ulceração diabética variaram de 5 a 35% (BROWNRIGG et al., 2016). Índice que melhora em alguns países de renda alta em 40 a 60% e, mesmo em alguns grupos populacionais de nações ricas também estão em risco alto de amputação (GREGG, 2016). Apesar da vasta pesquisa sobre as melhores opções de tratamento ter sido realizada, as úlceras crônicas ainda são muito frequentes e em média demora cerca de 3 meses para cicatrizar. Já em úlcera diabética a cicatrização ocorre em média 3 anos, sendo necessária identificar novos tratamentos para melhorar a cicatrização destas (EPPS, 2016). As terapias adjuvantes mais avançadas ou potenciais incluem a terapia de oxigênio hiperbárica, terapia de ferida com pressão negativa, fatores de crescimento, terapia eletrofísica e células tronco (AMIN, 2016). Muitas dessas terapias novas são difíceis de implementar, não apresentam evidências de benefícios ou não há consenso sobre qual método de administração é mais eficaz para cada terapia (ELDOR, 2004).

2.6 CARACTERÍSTICAS DO LASER

Segundo Knappe (2004), a palavra laser significa “light amplification by stimulated emission of radiation” – amplificação da luz por emissão estimulada da radiação. O tratamento com laser de baixa potência (low level therapy – LLT) é utilizada desde 1960 para fins terapêuticos, visando um tratamento seguro e eficaz para diversas condições patológicas em tecidos diversos (BASFOR, 1989). Também é utilizado na cura de lesões de tecido mole e ósseo, porém, alguns de seus efeitos ainda não foram explicados e há controvérsias sobre os mecanismos de ação e melhores parâmetros a serem utilizados (COOMBE, 2001).

Pinheiro (2001), cita os efeitos fisiológicos da LLT, sendo estes analgésicos, anti-inflamatório, promoção da proliferação de células e promoção do processo de cicatrização. Várias pesquisas comprovam que LLT aumenta a vascularização, promove a formação de novos vasos sanguíneos, estimula fibroblastos, aumenta a síntese de ATP e estimula as células ósseas (FREITAS, 2002).

Na utilização de laser de baixa intensidade em células e nos tecidos, a energia dos fótons absorvidos não é transformada em calor (baseada em aquecimento), e sim em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos (CATÃO, 2004). E, a partir do momento que a luz laser faz interação com células e tecidos em dose correta, favorecem de forma positiva funções celulares como: proliferação de células, estimulação de linfócitos, ativação de mastócitos, produção de ATP mitocondrial, desencadeando efeitos antiinflamatórios.

De acordo com Nicola (2003), a terapia com laser de baixa intensidade tem sido utilizada clinicamente para tratar tecidos moles visando acelerar o processo de cicatrização de feridas. Bem como, retratar os processos metabólicos celulares, o que ocasiona aumento na capacidade de regeneração dos tecidos biológicos (HENRIQUE, 2010).

As respostas celulares pela radiação visível e infravermelha acontecem por meio das mudanças físicas e químicas dos fotorreceptores que fazem absorção da luz, assumindo estado eletrônico excitado, desencadeando ações primárias como: gerar oxigênio molecular, aceleração da transferência de elétrons, alterações estruturais e atividade bioquímica pelo aquecimento dos cromóforos e aumento da produção superóxido (ANDRADE, 2010).

O aumento da energia e oxigenação celular melhora tanto a microcirculação quanto a síntese de proteína especializadas, como os fatores de crescimento, influenciados pelos fótons, motivo pelo qual o processo de cicatrização é acelerado pelo laser (FAROUK, 2001).

De acordo com Guirro (2002), a inflamação é essencial para o reparo tecidual, onde as células liberam enzimas e produtos de oxigênio, limpando detritos teciduais e bactérias (BAUM, 2005).

Silveira (2009), relata que estudos prévios sobre os efeitos fisiológicos do laser acelera a angiogênese, a proliferação do tecido granular e diminuição de células inflamatórias. Porém, há controversa em relação aos resultados obtidos, o que justifica a realização de trabalhos na prática clínica, para se estabelecer o tipo de laser e melhores parâmetros para utilização (SANTOS et al., 2013).

Araújo (2007), afirma que o laser contribui para a formação e surgimento de linfócitos e macrófagos, reduzindo o edema e o número de neutrófilos após um tempo de aplicação.

O comprimento de onda é a característica mais importante da radiação laser, por determinar quais biomoléculas vão interagir. A radiação visível apresenta uma via mitocondrial e a invisível uma ação sobre cromóforos da membrana celular. Sendo assim, os efeitos terapêuticos são específicos, com possibilidade de se fazer uso de ambas as estimulações para melhores resultados (AMAT, 2006).

Diversos estudos demonstraram que o laser aumenta o teor de colágeno na ferida, promove angiogênese, reduz o tempo de reparo da lesão e aumenta o número de células disponíveis para a cicatrização (MEDEIROS, 2000).

Alguns trabalhos avaliaram resultados através da análise funcional da marcha, demonstrando que a irradiação com o laser na região da lesão e coluna vertebral, acelerou a regeneração no 14º dia de pós-operatório se comparado com o não tratado (SENE, 2013).

O laser HeNe é composto por 90% de gás Hélio e 10% de gás Neônio, apresenta comprimento de onda de 632,8nm, irradia luz visível vermelha, sua emissão contínua pode alcançar mais de 30mW com absorção muito rápida e penetração superficial (10 a 15mm), por fim, seu cromóforo especial é a hemácia (DINDA, 2015).

É recomendada doses entre 1 e 5J/cm² para promover o reparo tecidual e doses superiores provocariam efeitos inibitórios ou insatisfatórios (BAXTER, 2003).

O Quadro 1 traz os tipos de laser, com seu comprimento de onda, potência, absorção, modo de ação e aplicações.

Quadro 1 - Tipo de Laser, comprimento de onda, potência, absorção, modo de ação e aplicações dos tipos de laser disponíveis (AGNE, 2005).

Tipo de Laser	λ (nm)	Potência	Absorção	Modo de Ação	Aplicações
Dióxido de Carbono (CO ²)	10.600 Infravermelho	5-50W	Muito forte (água dos tecidos)	Volatilização Secção	Laser cirúrgico oftalmologia microcirurgia
Argônio (Ar)	487 – Azul 544 – Verde	1-15W	Média	Coagulação Volatilização Secção	Oftalmologia endoscopia digestiva e urinária
Neodímio Ytriun Alumínio Garnet (Nd.YAG)	1.064 Infravermelho	20-120W	Débil	Coagulação Volatilização	Oftalmologia cataratas. Glaucoma endoscopia digestiva, bronquial e urinária
Kriptônio (Kr)	568 – Amarelo 647 – Vermelho	10-50mW	Média	Coagulação Volatilização Secção	Oftalmologia
AsGa (Arseneto de Gálio)	904 Infravermelho	Até 50mW de pico	Intensa	Químico Biológico	Patologia articular, muscular tendinosa
HeNe (Hélio Neônio)	632,8 Vermelho	1-30mW	Intensa	Químico Biológico	Feridas, úlceras, queimaduras

A dose é calculada multiplicando-se a intensidade, P/A (onde P é a potência em watts e A é a área em cm^2), pelo tempo t em segundos: $D=P.t/A$ (J/cm^2). De acordo com Mester et al., (1985) acredita-se que a densidade de energia não deve ultrapassar $12\text{J}/\text{cm}^2$, devido possível efeito inibidor (TÚNER, 1999). O Quadro 2 traz os parâmetros para modulação do laser segundo Agne (2005).

Quadro 2 - Parâmetros em relação ao estágio do processo inflamatório (AGNE, 2005).

Efeito	Dose	Fase	Dose
Analgésico	2 a 4 J/cm^2	Aguda	1 a 3 J/cm^2
Antiinflamatório	1 a 3 J/cm^2	Subaguda	3 a 4 J/cm^2
Cicatrizante	3 a 6 J/cm^2	Crônica	5 a 7 J/cm^2
Circulatório	1 a 3 J/cm^2	-	-

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Verificar o efeito do laser HeNe no tratamento de lesão cutânea em ratos Wistar euglicêmicos e diabéticos.

3.2 Específicos

- ✓ Analisar o efeito do laser HeNe em lâminas histológicas na proliferação de macrófagos em lesão cutânea de ratos Wistar euglicêmicos e diabéticos;
- ✓ Verificar o efeito do laser HeNe em lâminas histológicas na proliferação de fibroblastos em lesão cutânea de ratos Wistar euglicêmicos e diabéticos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no laboratório “Pesquisa Multidisciplinar” na Universidade do Planalto de Araxá – Uniaraxá, após aprovação do Comitê de Ética Animal, pelo número de protocolo 025536/16 - Uniaraxá. O estudo foi realizado com 40 ratos machos jovens Wistar, fornecidos pelo biotério da Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM), onde foram colocados em gaiolas individuais, divididos em oito grupos com cinco animais em cada, onde receberam como alimento ração e água. Em relação ao ambiente, os animais foram mantidos no biotério com 23°C de temperatura e iluminação intercalada em 12 horas claro e 12 horas escuro.

Inicialmente foi realizado a divisão dos grupos:

- ✓ Grupo 1 (G1) → 5 animais, euglicêmicos, com 7 dias de lesão, sem tratamento com laser;
- ✓ Grupo 2 (G2) → 5 animais, diabéticos, com 7 dias de lesão, sem tratamento com laser;
- ✓ Grupo 3 (G3) → 5 animais, euglicêmicos, com 7 dias de lesão, com tratamento com laser;
- ✓ Grupo 4 (G4) → 5 animais, diabéticos, com 7 dias de lesão, com tratamento com laser;
- ✓ Grupo 5 (G5) → 5 animais, euglicêmicos, com 14 dias de lesão, sem tratamento com laser;
- ✓ Grupo 6 (G6) → 5 animais, diabéticos, com 14 dias de lesão, sem tratamento com laser;
- ✓ Grupo 7 (G7) → 5 animais, euglicêmicos, com 14 dias de lesão, com tratamento com laser;
- ✓ Grupo 8 (G8) → 5 animais, diabéticos, com 14 dias de lesão, com tratamento com laser.

4.1 INDUÇÃO DO DIABETES MELITO

Para a obtenção do Diabetes Mellitus experimental, os ratos ficaram em jejum de 24 horas e em seguida foram anestesiados com xilasina e quetamina, com o antibiótico pentabiótico, e o antitérmico e anti-inflamatório benamini. Logo, receberam 35mg/kg de peso

corporal de aloxanamonoidratada (Marca: Sigma), esta que foi dissolvida em solução tampão citrato 0,01 M, pH 4,5 e em seguida injetada por via endovenosa pela veia peniana. Em seguida, os ratos tiveram livre acesso ao alimento e receberam solução glicosada (30%) em um período de 24 horas (LUCIANO; MELLO, 1998).

O diabetes foi comprovado após duas semanas de aplicação de aloxana, através de determinação de níveis glicêmicos, através do aparelho Accu-Chek® (Accu-ChekAdvantage® 2007, Fabricante Roche Farmacêutica®, São Paulo-SP, Brasil). Foram considerados diabéticos e utilizados para a realização do trabalho aqueles que apresentarem nível glicêmico de jejum superior ou igual a 126mg/100mL de soro (AMERICAM DIABETES ASSOCIATION, 2005).

4.2 ATO OPERATÓRIO

Para o ato operatório, os animais foram anestesiados com Francotar (anestésico geral injetável, Virbac® - saúde animal, São Paulo - Brasil), recebendo a dosagem de 1 U.I. por cada 100g de peso corporal, via peritoneal, em caixa de polietileno. Na sequência, foi realizado a tricotomia unilateral, na região do dorso, com tesoura simples. Após anestesia e tricotomia, a lesão foi feita utilizando um “PUNCH” de 5mm de diâmetro, removendo o fragmento circular de pele e o tecido subcutâneo do dorso, (Figura 3).



Figura 3. Lesão cutânea em ratos Wistar após tricotomia e remoção de fragmento circular da pele com punch.

Após a lesão no dorso dos animais, os mesmos receberam 1 U.I. de Supertrin (antibiótico) via intramuscular profunda e 1 U.I. de Diclofenaco 50 (anti-inflamatório, analgésico e antipirético) via subcutânea. Os medicamentos utilizados foram receitados pelo médico veterinário Dr. Willian Ferreira Rodrigues (CRMV – MG n° 9632).

4.3 TRATAMENTO LASER HeNe

A lesão foi irradiada com laser HeNe com comprimento de onda de 660nm, a 3J/cm² em razão de estar associado aos efeitos analgésico, antiinflamatório, cicatrizante e circulatório, de forma pontual, com a caneta laser a aproximadamente 0,5cm de distância da incisão, com o feixe perpendicular a cada um cm da extensão da incisão, com 0,09s de exposição e 10mV de pico de saída (MEDRADO et al., 2003), durante 7 e 14 dias com uma aplicação por dia, sempre a tarde, as 17 horas, com intervalo de 24 horas.

4.4 PROCEDIMENTOS DE EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DE MATERIAL

Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2008) usando dose supra anestésica de Francotar (6mg/100g peso corporal). Após estarem anestesiados foi retirado com bisturi BD® n°15 um fragmento quadrado em volta da lesão, lavados em solução salina 0,5%, grampeado em cartolina branca mantido em 50% solução fixadora PBS-formaldeído à 10% e pH 7,2 e 50% água por 24 horas, em potes plásticos transparentes e devidamente identificados, após 24 horas os grampos e a cartolina foram tirados, mantendo o tecido aberto e sem presença de oxidação.

4.5 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Práticas Histológicas do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), na Universidade Federal de Uberlândia – UFU e Laboratório de Análises da Faculdade Meta – FAMETA.

Os fragmentos foram cortados ao meio e colocados com sua devida identificação dentro de cassetes para o processo histológico. Primeiramente, os fragmentos foram desidratados em álcool, permanecendo 30 minutos em cada porcentagem sendo álcool à 70%, 80%, 90%, absoluto I, absoluto II, absoluto III. Em seguida, foram diafanizados em xilol I, xilol II, xilol III, também permanecendo por 30 minutos em cada. E por fim, passados em parafina líquida, permanecendo 30 minutos em parafina I, parafina II, parafina III, com temperatura de 60°C, dando sequência ao posicionamento em moldes de ferro e completados com parafina histológica permanecendo por mais ou menos 12 horas para serem desenformados os blocos. Os fragmentos foram posicionados mais externamente nos blocos para fornecer secções longitudinais e transversais durante a microtomia.

Após tal procedimento, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo criostato rotativo, sendo realizada com espessura de 5µm. As secções foram distendidas em água destilada, colocadas sobre lâminas histológicas de microscopia desengorduradas (solidor) e foram mantidas em estufa a 37°C durante 24 horas. Foram preparadas três lâminas por animal.

As secções foram coradas utilizando os métodos abaixo:

- Hematoxilina e Eosina – HE (Merk), para avaliação das características morfológicas do tecido muscular (MCMANUS; MOWRY, 1960), como macrófagos e fibroblastos; compreendendo seguinte processo:
- Hidratar (desparafinizar): 10 minutos em xilol III, 10 minutos em xilol II e 10 minutos em xilol I, secagem do excesso de xilol em papel. Seguindo para, 30 segundos em álcool absoluto III, 10 segundos em álcool absoluto II, 10 segundos em álcool absoluto I, 10

segundos em álcool a 95%, 10 segundos em álcool a 85% e 10 segundos em álcool a 70%. Permanecendo durante 20 minutos em água corrente e 5 minutos em água destilada;

- Coloração com Hematoxilina de Harris durante 1 minuto e 30 segundos, em seguida mais 20 minutos em água corrente e 5 minutos em água destilada para retirada do excesso. Recebeu a coloração com Eosina/Floxina por 2 minutos, passando novamente por água corrente durante 30 segundos e 4 segundos em água destilada;
- Desidratar (diafanizar): 10 segundos em álcool a 70%, 10 segundos em álcool a 85%, 10 segundos em álcool a 95%, 10 segundos em álcool absoluto I, 10 segundos em álcool absoluto II, 10 segundos em álcool absoluto III. Secagem do excesso de álcool com papel e em seguida 30 segundos em xilol I, 30 segundos em xilol II e 30 segundos em xilol III, dando sequência à montagem das lâminas com colocação das lamínulas com etanol. Após todo procedimento as lâminas permaneceram na estufa por 12 horas para secagem.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar as diferenças encontradas nos resultados, foi utilizado o teste t de Student unipariado. Foram considerados significantes os dados que apresentaram $p < 0,05$ (STATÍSTICA, 2002). E em relação às análises histológicas foi utilizado o programa HLImage97Application para captura das imagens.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

Para comprovação do DM nos animais utilizados nesta pesquisa, os níveis glicêmicos de cada animal foram verificados antes e após o processo de indução do DM segue o resultado dos valores na Tabela 1.

Tabela 1. Valores glicêmicos de cada animal antes e após o procedimento de indução com aloxana, comprovando o DM nos animais.

Grupo-Animal	Valor glicêmico antes da indução (mg/dL)	Valor glicêmico após indução (mg/dL)
DM, 7, não tratado, n=1	74	149
DM, 7, não tratado, n=2	89	135
DM, 7, não tratado, n=3	86	142
DM, 7, não tratado, n=4	94	129
DM, 7, não tratado, n=5	79	144
DM, 7, laser, n=1	92	158
DM, 7, laser, n=2	98	155
DM, 7, laser, n=3	83	139
DM, 7, laser, n=4	77	131
DM, 7, laser, n=5	75	147
DM, 14, não tratado, n=1	83	152
DM, 14, não tratado, n=2	81	132
DM, 14, não tratado, n=3	79	138
DM, 14, não tratado, n=4	74	142
DM, 14, não tratado, n=5	94	159
DM, 14, laser, n=1	89	151
DM, 14, laser, n=2	86	146
DM, 14, laser, n=3	75	143
DM, 14, laser, n=4	79	141
DM, 14, laser, n=5	82	130

Indução por aloxana.

Miligramas por decilitros de soro - mg/dL.

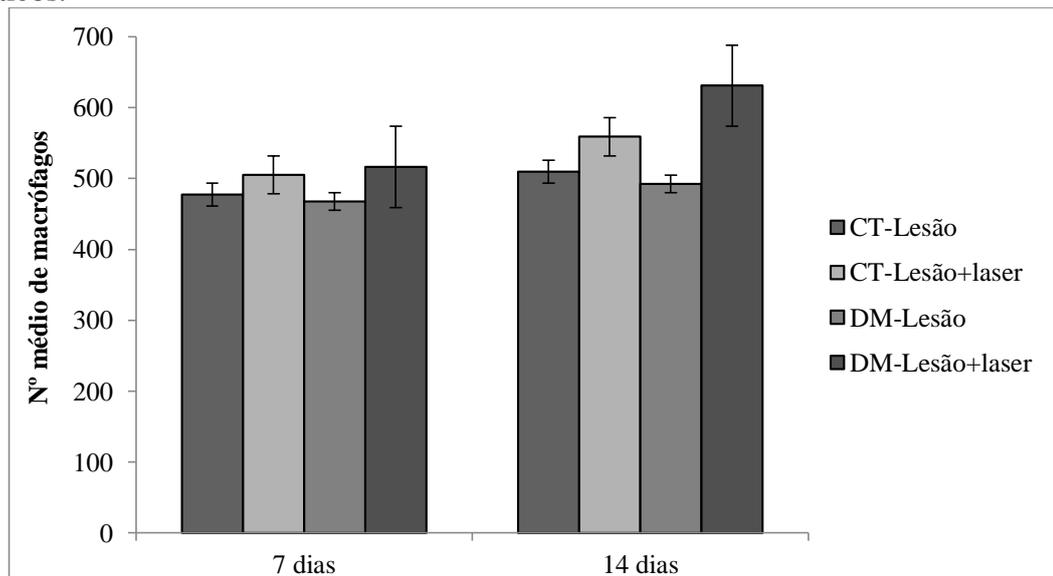
No estudo realizado por Zanoello et al., (2012) foram utilizadas 30 ratas wistar, submetidas a indução do DM por aloxana, resultando a média dos níveis glicêmicos da seguinte forma: grupo controle antes da indução $73,83 \pm 4,72$ e no grupo tratado $112,00 \pm 11,46$; e após a indução o grupo controle apresentou média $192,67 \pm 33,45$ e no grupo tratado $145,75 \pm 10,71$. Assim, os resultados antes da indução no grupo controle foi $83,3 \pm 7,33$ e no grupo tratado $84,11 \pm 7,94$; e após a indução o grupo controle apresentou média $142,2 \pm 9,28$ e no grupo tratado

144,1±9,30 caracterizam o animal em euglicêmico e após a indução como diabético, o mesmo encontrado neste presente trabalho nos grupos submetidos a indução por aloxana.

5.1 EFEITO DO LASER HeNe NOS MACRÓFAGOS EM LESÃO CUTÂNEA DE RATOS WISTAR EUGLICÊMICOS E DIABÉTICOS

Comparando os grupos normais (N) com os grupos diabéticos (D), sem tratamento (S) e com tratamento (C) em sete e quatorze dias de lesão cutânea, os resultados positivos foram obtidos entre o grupo euglicêmico e diabético tratados após 14 dias de lesão, e também, foi encontrado significância entre o grupo euglicêmico tratado e não tratado com 7 e 14 dias e nos grupos diabéticos tratado e não tratado com 7 e 14 dias pós lesão. Esses resultados são demonstrados no Gráfico 1, o que condiz com a literatura sobre a presença dos macrófagos na fase inflamatória.

Gráfico 1. Valores médios de macrófagos em áreas lesionadas de ratos wistar controle e diabéticos.



De acordo com as análises histológicas através da microscopia óptica foi possível observar a quantidade de macrófagos nos animais pertencentes a um grupo tratado e um grupo não tratado com laser HeNe, conforme pode ser observado na Figura 4.

O laser terapêutico aumenta a atividade quimiotática e fagocitária em leucócitos humanos *in vitro*, como também, aumenta a atividade fagocitária de macrófagos no período da fase inicial do processo de reparo, o que corresponde a seis horas pós trauma, o que facilita a limpeza da ferida e estimula a fase proliferativa (LINS et al., 2010). Esta afirmação retrata os achados deste estudo onde foi observado aumento significativo dos macrófagos nos animais diabéticos após tratamento com irradiação laser após 7 e 14 dias de lesão. De acordo com estudo realizado por Carvalho (2002), as fases de cicatrização acontecem em 3, 7 e 14 dias, o que condiz com parte do período de estudo desta pesquisa, que foi realizada em 7 e 14 dias.

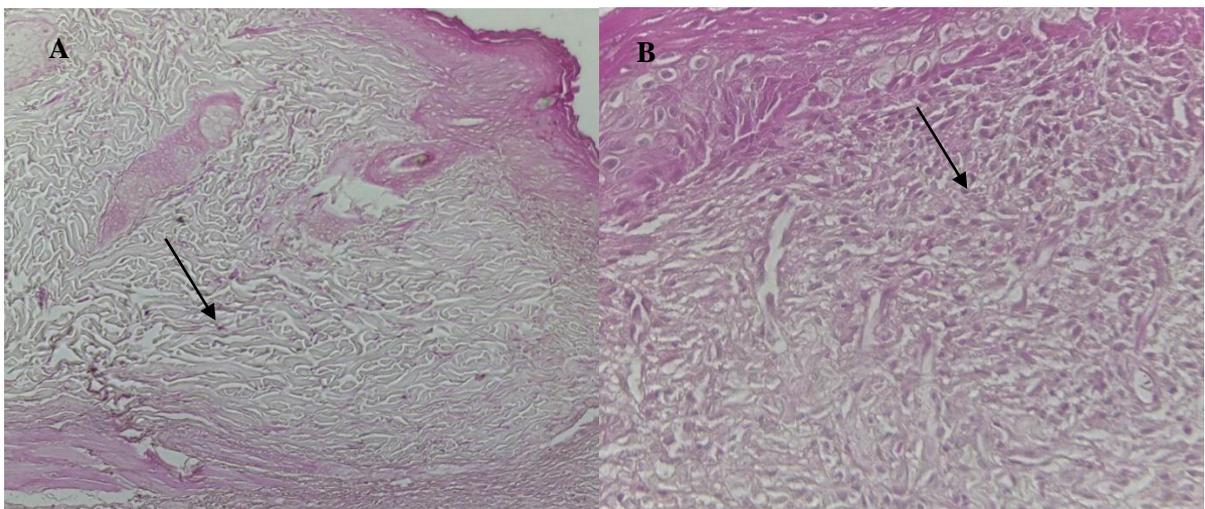


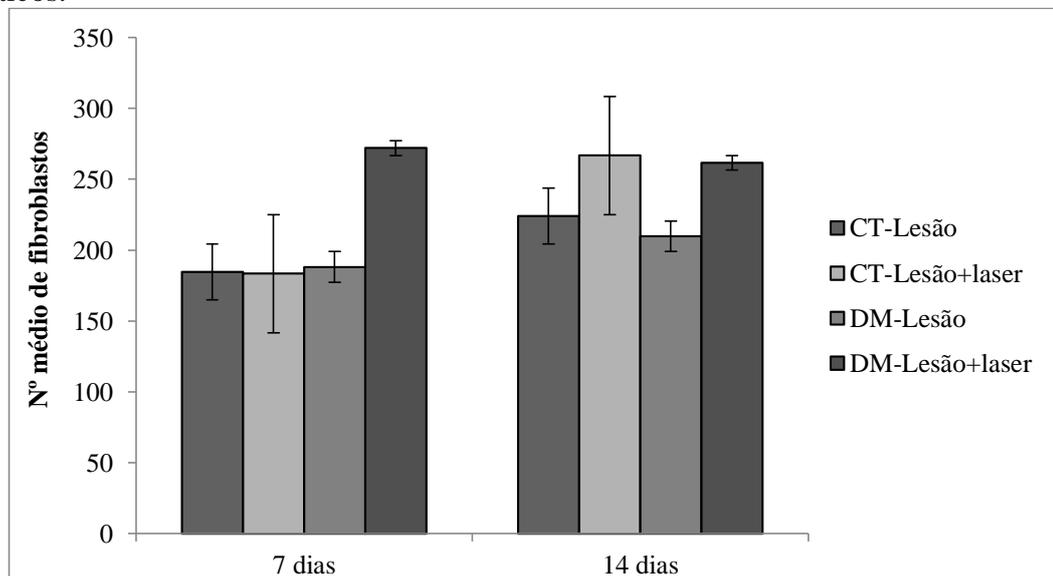
Figura 4. Microscopia óptica com coloração HE e aumento de 40x, de um animal pertencente ao grupo diabético sem tratamento com 14 dias de lesão (A) e (B) pertencente ao grupo diabético com tratamento após 14 dias de lesão, onde mostramos pelas setas há presença de macrófagos com maior incidência em B em relação a A.

Foi observado aumento dos macrófagos em grupos euglicêmicos e diabéticos tratados com laser de 660nm de comprimento de onda, utilizado neste estudo, acordando que macrófagos são presentes no processo inflamatório. Albertini (2007), concluiu em seus experimentos, que o comprimento de onda com 660nm e 684nm do laser trazem resultados positivos para redução de edema e migração de células inflamatórias.

5.2 EFEITO DO LASER HeNe NOS FIBROBLASTOS EM LESÃO CUTÂNEA DE RATOS WISTAR EUGLICÊMICOS E DIABÉTICOS

Em relação a resposta do efeito do laser HeNe nos fibroblastos, comparados dois grupos, apresentou diferença significativa quando comparando grupo euglicêmico e diabético com sete e quatorze dias pós lesão e tratados com laser. No grupo euglicêmico, o resultado foi significativo em 14 dias comparando grupo tratado e não tratado, e também, nos grupos diabéticos tanto com sete quanto com 14 dias pós lesão, tratado e não tratado a resposta também apresentou significância. Esses resultados são demonstrados no Gráfico 2, pela presença de fibroblastos na fase proliferativa.

Gráfico 2. Valores médios de fibroblastos em áreas lesionadas de ratos wistar controle e diabéticos.



De acordo com as análises histológicas, foi possível observar a quantidade de fibroblastos nos animais pertencentes a um grupo tratado e um grupo não tratado com laser HeNe, como pode ser observado na Figura 5.

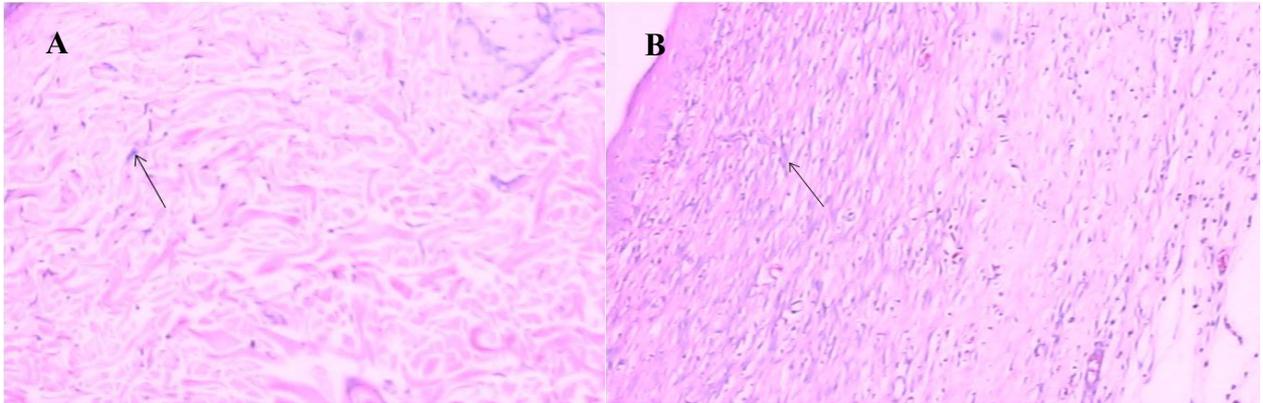


Figura 5. Microscopia óptica com coloração HE e aumento de 40x, de um animal pertencente ao grupo diabético sem tratamento com 14 dias de lesão (A) e pertencente ao grupo diabético com tratamento após 14 dias de lesão (B), sendo destacado pelas setas os fibroblastos.

Após 7 dias de lesão foi obtido aumento de fibroblastos no grupo tratado com o laser HeNe a $3\text{J}/\text{cm}^2$, o que não aconteceu no grupo controle, caracterizando em resposta positiva para esse tratamento pois o mesmo aconteceu no 8º dia de pós operatório em gatos siameses com aplicação de 2 e $4\text{J}/\text{cm}^2$ com laser (AsGa), mostrando reepitelização completa com infiltrado inflamatório em derme e hipoderme, com predomínio de fibroblastos, fibrócitos e neovascularização (TATARUNAS, 1998). Apesar de ter sido diferente o tipo de laser, o resultado coincide com o do presente trabalho.

Pelo período variado entre alguns autores (FOWLER, 1989; PROLIST, 1993) há proliferação de fibroblastos e colagenogênese, o que foi evidenciado principalmente nos grupos diabéticos após intervenção terapêutica do laser HeNe, tanto com 7 quanto com 14 dias pós lesão, sendo evidenciado a presença de elementos da cicatrização (fibroblastos) com significância nos grupos irradiados. No 14º dia a lesão estava totalmente cicatrizada, principalmente pela organização de fibroblastos, fibrócitos e fibras colágenas.

Em um estudo realizado por Hallman (1988), onde foi realizado em diferentes fases de maturação, a irradiação com o laser HeNe em fibroblastos *in vitro*, obteve resultados insatisfatórios, pois não observaram efeito significativo sobre o processo celular irradiada por laser. O mesmo aconteceu com Priestley (1989), onde observaram apenas resultados negativos

para os efeitos proliferativos, concluindo que essas respostas sugeriam que o laser não interferia na fase proliferativa da cicatrização. Mas, nesse estudo, comparando grupos tratados e não tratados foi obtido resultados estatísticos significantes, resultando no aumento de fibroblastos na área irradiada tanto com 7 dias quanto com 14 dias pós lesão, destacando ainda os grupos diabéticos tratados.

Neste estudo, foi observado que as lesões cutâneas submetidas a tratamento com laser de baixa intensidade quando comparado com o grupo controle, mostrou um processo de reparação tecidual mais evoluído. Este achado corrobora com o trabalho de Rocha-Júnior et al., (2007), também com ratos Wistar, divididos em dois grupos (6 animais por grupo, n=12; controle e tratado) porém, foi utilizado um punch de 10mm e o tratamento com outro tipo de laser mas também de baixa potência, com duração de apenas 10 dias, onde foi mostrado também, melhora na cicatrização do grupo tratado com laser de baixa intensidade comparado com o grupo controle.

6 CONCLUSÃO

O laser HeNe foi capaz de promover a proliferação de macrófagos e fibroblastos em lesão cutânea de ratos wistar diabéticos e euglicêmicos, acelerando o processo da cicatrização, acentuando aos 14 dias pós lesão.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação do laser HeNe de baixa intensidade, pode trazer benefícios ao processo de cicatrização de lesão cutânea em ratos euglicêmicos e diabéticos, tanto em relação aos macrófagos quanto fibroblastos. Porém, cabe realizar mais estudos para conclusões concretas em relação aos efeitos deste aparelho na corrente sanguínea, demais células e outras doenças, como por exemplo, a leishmaniose, tendo em vista que este equipamento custa em média R\$ 2.181,20 à R\$ 2.500,00 Determinar também, um valor exato com seu efeito para os devidos tipos de laser, com sua intensidade, potência, dosagem e tempo de tratamento.

8 REFERÊNCIAS

- AGNE, J. E. **Eletrotermoterapia: teoria e prática**. Santa Maria: Orium, ed. 1, p. 309-328, 2005.
- ALBERTINI, R. anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660nm and 684nm) in carrageenan – induced rat paw edema. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. V. 89, n. 1, p. 50-55, 2007.
- AMAT, A.; RIGAU, J.; WAYNANT, R. W.; ILIV, I. K.; ANDERS, J. J. The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy: A hypothesis of mechanism. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**. V. 82, p. 152-60, 2006.
- AMIN, N.; DOUPIS, J. Diabetic foot disease: from the evaluation of the “foot at risk” to the novel diabetic ulcer treatment modalities. **World Journal of Diabetes**. V. 7, n. 7, p. 153-64, 2016.
- ANDRADE, A. G.; LIMA, C. F.; ALBUQUERQUE, A. K. B. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira Queimaduras**. V. 9, n. 1, p. 21-30, 2010.
- ANNA M.; WEINREB, J. E. **Hyperglycemic Hyperosmolar State**. Source. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc, 2015.
- ARAÚJO, C. E. N.; RIBEIRO, M. S.; FAVARO, R.; ZEZELL, D. M.; ZORN, T. M. T. Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne lasertreated wounds. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**. V. 86, p. 87-96, 2007.
- ARMSTRONG, D. G.; KANDA, V. A.; LAVERY, L. A.; MARSTON, W.; MILLS, J. L.; BOULTON, A. J. M. Mind the gap: disparity between research funding and costs of care for diabetic foot ulcers. **Diabetes Care**. V. 36, p. 1815-1817, 2013.
- ARRUDA, E. R. B.; RODRIGUES, N. C.; TACIRO, C.; PARIZOTTO, N. A. Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. **Revista Brasileira Fisioterapia** V. 11, n. 4, São Paulo, 2007.
- Associação Americana Diabetes (AAD). **Standards of Medical Care in Diabetes Care**. V. 34, n. 1, S11–S61, 2011.
- Associação Americana Diabetes (AAD). **Standards of Medical Care in Diabetes**. Diabetes Care. V. 39, n. 1, p. S4-S109, 2016.
- BASFORD, J. R. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings. **Lasers Surgery Medicine**. V. 9, n. 1, p. 1-5, 1989.

BAUM, C. L.; ARPEY, C. I. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatologic Surgery**. V. 31, n. 6, p. 674-86, 2005.

BAXTER, D. **Laserterapia de baixa intensidade**. In: Kitchen S., Ed. Eletroterapia: prática baseada em evidências. Ed.11. Barueri: Manole, p. 171-88, 2003.

BOULTON, A. J. M.; GRIES, F. A.; JEVERVELL, J. Guidelines for the diagnosis and outpatient management of diabetic peripheral neuropathy. **Diabetic Medicine**. V. 15, p. 508-514, 1988.

BOULTON, A. J. M.; MALIK, R. A.; AREZZO, J. C.; SOSENKO, J. M. Diabetic somatic neuropathies. **Diabetes Care**. V. 27, p. 1458-86, 2004.

BOULTON, A. J. M.; VINIK, A. I.; AREZZO, J. C.; BRIL, V.; FELDMAN, E. L.; FREMAN, R.; MALIK, R. A.; MASER, R. E.; SOSENKO, J. M.; ZIEGLER, D. American Diabetes Association. Diabetic neuropathies: a position statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care**. V. 28, p. 956-962, 2005.

BRIAN, C. C.; HSINLIN, T. C.; CATHERINE, L. S.; ANDREA, L. S.; EVA, L. F. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. **The Lancet Neurology**. V. 11, p. 521-34, 2012.

BROWNRIGG, J. R.; HINCHILIFFE, R. J.; APELQVIST, J.; BOYKO, E. J.; FITRIDGE, R.; MILLS, J. L. Performance of prognostic markers in the prediction of wound healing or amputation among patients with foot ulcers in diabetes: a systematic review. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**. V. 32, n. 1, p. 128-35, 2016.

CALSOLARI, M. R.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; VILAR, L.; PEDROSA, H. C. Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na neuropatia diabética. Em: Pedrosa HC, Vilar L, Boulton AJM (Eds), Neuropatias e Pé Diabético. **AC Farmacêutica**. Rio de Janeiro, p. 17-29, 2013.

CARBONEAU, B. A.; BREYER, R. M.; GANNON, M. Regulation of pancreatic β -cell function and mass dynamics by prostaglandin signaling. **J Cell Commun Signal**. doi: 10.1007/s12079-017-0377-7, 2017 .

CARVALHO, P. T. C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos**. Dissertação mestrado EESC-São Carlos, p. 72, 2002.

CARVALHO, P. T. C.; MAZZER, N.; SIQUEIRA, J. F. R.; FERREIRA, J. V. L.; SILVA, I. S. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos a irradiação de laser HeNe. **Fisioterapia Brasileira**. V.4, n.4, p. 253-8, 2003.

CASTELO-BRANCO-NETO, M. L.; FILHO, J. M. R.; MALGFAIA, O.; FILHO, M. A. O.; CZECZKO, N. G.; AOKI, S.; CUNHA, R.; FONSECA, V. R.; TEIXEIRA, H. M.; AGUIAR, L. R. F. Avaliação do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinusterebinthifolius*raddi) no

processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. V. 21, n. 2, p. 17-22, 2006.

CATALANO, P. M. Trying to understand gestational diabetes. **Diabetes Medicine**. V. 3, n. 31, p. 273-81, 2014.

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

CAVANAGH, P. R.; SIMONEAU, G. G.; ULBRECHT, J. S. Ulceration, unsteadiness and uncertainty; the biomechanical consequences of diabetes mellitus. **Journal of Biomechanics**. V. 26, n. 1, p. 23-46, 1993.

CESAR, C. L. G.; FRANCISCO, P. M. S. B.; BELON, A. P.; BARROS, M. B. A.; CARANDINA, L.; ALVES, M. C. G. P. A.; GOLDBAUM, M. Diabetes auto-referido em idosos: prevalência, fatores associados e práticas de controle. **Cad. Saúde Pública**. V. 26, n. 1, p. 175-184, 2010.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea 2008). www.cobea.org.br

COLLABORATION, E. R. F. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. **The Lancet**. N. 9733, p. 2215-2222, 2010.

COOMBE, A. R.; HI, C. T. G.; PHILIPS, J. R.; CHAPPLE, C. C.; YUM, L. W. P.; DARENDELILER, M. A. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. **Clinical Orthodontics and Research**. V. 4, n. 1, p. 3-14, 2001.

CORMACK, D. H. **Fundamentos de Histologia**. Ed. Guanabara Koogan. Ed. 2, p. 99-104, 2008.

COSTA, R. P.; ISAAC, M. L. Prevalence of auditory neuropathy spectrum disorder in an auditory health care service. **Journal of Otorhinolaryngology**. V. 79, n. 4, p. 429-33, 2013.

DAMM, P. Future risk of diabetes in mother and child after gestational diabetes mellitus. **International Journal Gynecology and Obstetrics**. V. 104, n. 1, p. 525-6, 2009.

DANAIEI, G.; FINUCANE, M. M.; LU, Y. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country – years and 2.7 million participants. **Lancet**. V.378, p. 31-40, 2011.

DAS, S. L.; SINGH, P. P.; PHILLIPS, A. R.; MURPHY, R.; WINDSOR, J. A.; PETROV, M. S. Newly diagnosed diabetes mellitus after acute pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. **Gut, gytjnl**. E. 305062, 2013.

DAVIES, A.; BLAKELEY, A. G. H.; KIDD, C. **Fisiologia humana**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

DINDA, A.; NAYAK, S. Lower level laser therapy for pain management an integrative review. **Carib Journal Science technologies**. V. 3, p. 744-751, 2015.

DING, J.; WONG, T. Y. Current epidemiology of diabetic retinopathy and diabetic macular edema. **Current Diabetes Reports**. V. 4, n. 12, p. 346-54, 2012.

DYCK, P. J.; KRATZ, K. M.; KARNES, J. L.; LITCHY, W. J.; KLEIN, R.; PACH, J. M.; WILSON, D. M.; O'BRIEN, P. C.; MELTON, L. J. 3rd, Service FJ. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. **Neurology**. V. 43, p. 817-824, 1993.

ELDOR, R.; RAZ, I.; YEHUDA, A. B.; BOULTON, A. J. M. New and experimental approaches to treatment of diabetic foot ulcers: a comprehensive review of emerging treatment strategies. **Diabetic Medicine**. V. 21, n. 1, p. 1161-73, 2004.

EMANUELLI, T.; BURGEIRO, A.; CARVALHO, E. Effects of insulin on the skin: possible healing benefits for diabetic foot ulcers. **Archives of Dermatological Research**. V.403, n. 16, p.1686, 2016.

EPPS, J. A.; SMART, N. A. Remote ischaemic conditioning in the context of type 2 diabetes and neuropathy: the case for repeat application as a novel therapy for lower extremity ulceration. **Cardiovascular Diabetology**. V. 15, p. 130, 2016.

FAROUK, A. H.; BERNARD, L. A. Laser photons and pharmacological treatments in wound healing. **Laser Therapy**. N. 12, p. 3-11, 2001.

FARR, J. N.; KHOSLA, S. "Determinants of bone strength and quality in diabetes mellitus in humans". **Bone**. V. 82, p. 28-34, 2016.

FERNANDES, A. L.; FERREIRA, E. A. P. Treino em Auto-observação e Adesão à Dieta em Adultos com Diabetes Tipo 2. **Psicologia: teoria e pesquisa**. V. 25, n. 4, p. 629-636, 2009.

FOWLER, D. Wound healing: an overview. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**. V. 4, n.4, p. 256-62, 1989.

FRIDLAND, L. E.; PHILIPSON, L. H. Pancreatic beta cell G-protein coupled receptors and second messenger interactions: a systems biology computational analysis. **Journal pone**. V. 11, n. 5, e. 0152869, 2016.

GANDHI, A.; DUMAS, C.; O'CONNOR, J. P.; PARSONS, J. R.; LIN, S. S. "The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing". **Bone**. V. 38, n. 4, p. 540-546, 2006.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores**. Ed. Elsevier. Ed.3, p.113-160, 2007.

GOOCH, H. L.; HALE, J. E.; FUJIOKA, H.; BALIAN, G.; HUWATIZ, S. R. “Alterations of cartilage and collagen expression during fracture healing in experimental diabetes”. **Connective Tissue Research**. V. 41, n. 2, p. 81-91, 2000.

GREGG, E. W.; SATTAR, N.; ALI, M. K. The changing face of diabetes complications. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**. V.4, n. 6, p. 537-47, 2016.

GROTE, C. W.; GROOVER, A. L.; RYALS, J. M.; GEIGER, P. C.; FELDMAN, E. L.; WRIGHT, D. E. Peripheral nervous system insulin resistance in ob/ob mice. **Acta Neuropathologica Communications**. P. 1:15, 2013.

GROTE, C. W.; WRIGHT, D. E. A Role for Insulin in Diabetic Neuropathy. **Frontiers in Neuroscience**. P. 10:581, 2016.

GUARIGUATA, L.; WHITING, D. R.; HAMBLETON, I.; BEAGLEY, J.; LINNENKAMP, U.; SHAW, J. E. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. **Diabetes research and clinical practice**. V. 103, p. 137-149, 2014.

GUIRRO, E. C. D.; GUIRRO, R. R. J. **Cicatriz hipertrófica e queiloide. In: Fisioterapia dermatofuncional: fundamentos, recursos, patologias**. Ed. 3. Barueri; Manole, p. 413-24, 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Insulina, glucagon e diabetes mellitus. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. P. 827-840, 2002.

HALLMAN, H. O.; BASFORD, J. R.; O'BRIEN, J. F.; CUMMINS, L. A. Does low-energy Helium-Neon irradiation after in vitro replication of human fibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**. New York. V. 8, n. 2, p. 125-129, 1988.

HAMADA, Y.; FUJII, H.; KITAZAWA, R.; YODOI, J.; KITAZAWA, S.; FUKAGAWA, M. “Thioredoxin-1 overexpression in transgenic mice attenuates streptozotocin – induced diabetic osteopenia: a novel role of oxidative stress and therapeutic implications”. **Bone**. V. 44, n. 5, p. 936-941, 2009.

HE, C.; ZHU, H.; LI, H.; ZOU, M. H.; XIE, Z. Dissociation of Bcl-2-Beclin 1 complex by activated AMPK enhances cardiac autophagy and protects against cardiomyocyte apoptosis in diabetes. **Diabetes**. V.62, p. 1270-1281, 2013.

HENRIQUE, A. C. G. Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular. Revisão de Literatura. **Revista do Colégio Brasileiro**. V. 37, n. 4, p. 295-302, 2010.

HERLIHY, B.; MAEBIUS, N. K. **Anatomia e fisiologia do corpo humano saudável e enfermo**. Barueri: Manole, 2002.

HESS, C. T. **Tratamento de feridas e úlcera**. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso. Ed. 4, 2002.

International Diabetes Fundation (IDF). **Diabetes Atlas**. Ed. 6, 2013. Disponível em: http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf

JANIS, J. E.; HARRISON, B. Wound Healing: Part I. Basic Science. **Plastic and reconstructive surgery**. V. 133, n. 2, p. 199-207, 2014.

KAUTZKY-WILLER, A.; HARREITER, J.; BANCHER-TODESCA, D.; BERGER, A.; REPA, A.; LECHLEITNER, M.; WEITGASSER, R. Gestational diabetes mellitus. **Wien Klin Wochenschr**. V. 128, n. 2, p. 103-12, 2016.

KEE, A. R.; WONG, T. Y.; LI, L. J. Retinal vascular imaging technology to monitor disease severity and complications in type 1 diabetes mellitus: A systematic review. **Microcirculation**. V. 17, p. 1-33, 2016.

KLARIS, H.; CHATZISTAMOU, I.; PAPAVALASSILOU, A. G.; ICHALLY, A. V. Growth hormone-releasing hormone: not only a neurohormone. **Trends in Endocrinology e Metabolism**. V. 22, n. 8, p. 311-317, 2011.

KNAPPE, V.; FRANK, L.; ROHDE, E. Principles of lasers and biophotonic effects. **Photomedicine and laser surgery**. V. 22, n. 5, p. 411-417, 2004.

LI, X. H.; YU, F. F.; ZHOU, Y. H.; HE, J. Association between alcohol consumption and the risk of incident type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, ajcn 114389, 2016.

LIENHARD, G. E.; SHOT, J. W.; JAMES, D. E.; MUECKLE, M. M. How cells absorb glucose. **Science American**. V. 266, p. 86-91, 1992.

LINS, R. D. A. V.; LUCENA, K. C. R.; GRANVILLE-GARCIA, A. F.; DANTAS, E. M.; CATÃO, M. H. C. V.; CARVALHO NETO, L. G. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. V. 85, n. 6, p. 849-55, 2010.

LÓPES-BARRA, P. J.; PASTOR, M. M. C.; ESCOBAR-JIMÉNEZ, F. "Bone mineral density at time of clinical diagnosis of adult-onset type 1 diabetes mellitus". **EndocrinePractice**. V. 7, n. S1, p. 346-351, 2001.

LOW, J.; RED. A. **Eletroterapia explicada: princípios e prática**. Ed. 3. Barueri: Manole, 2001.

LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R.; SANTOS, J. W. Treinamento aeróbio e prevenção da diabetes induzida por aloxana em ratos. **Revista Brasileira Atividade Física e Saúde**. V. 5, n. 3, p. 31-40, 1998.

MAGANTI, A.; EVANS-MOLINA, C.; MIRMIRA, R. G. From immunobiology to β -cell biology: The changing perspective on type 1 diabetes. **Islets**. V. 6, n. 2, e-28778-1-5, 2014.

MAINAR, A.; ARTIEDA, R. Use of metformin and vildagliptin for treatment of type 2 diabetes in the elderly. **Drug design, development and therapy**. V. 18, n. 8, p. 811-818, 2014.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. R.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização, conceitos atuais e recursos auxiliares. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. V. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. R. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. V. 17, p. 24-38, 2003.

McMANUS, J. F. A.; MOWRY, R. W. **Staining methods. Histologic and histochemical**. 3. Ed. USA: Harper & Row, 1960.

MEDEIROS, J. S. **O efeito da aplicação do laser no músculo masseter sobre a força de mordida, como auxílio na terapêutica da dor orofacial** [dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, 2000.

MEDRADO, A. R.; PUGLIESE, L. S.; REIS, S. R.; ANDRADE, Z. A. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers in Surgery Medicine**. New York, v. 32, n. 3, p. 29-44, 2003.

MEYER, P. F.; ARAÚJO, H. G.; CARVALHO, M. G. F.; TATUM, B. I. S.; FERNANDES, I. C. A. G.; RONZIO, O. A.; PINTO, M. V. M. Avaliação dos efeitos do LED na cicatrização de feridas cutâneas em ratos wistar. **Fisioterapia Brasil**. V. 11, n. 6, 2010.

MOSS, S. E.; KLEIN, R.; KLEIN, B. E. The 14-year incidence of visual loss in a diabetic population. **Ophthalmology**. V. 6, n.105, p.998-1003, 1998.

MOURA, L. I. F.; DIAS, A. M. A.; CARVALHO, E.; SOUSA, H. C. Recent advances on the development of wound dressings for diabetes foot ulcer treatment – a review. **Acta Biomaterialia**. V. 9, p. 7093-7114, 2013.

MUL, J. D.; STANFORD, K. I. HIRSHMAN, M. F.; GODDYEAR, L. J. Exercise and Regulation of Carbohydrate Metabolism. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. V. 135, p.17-37, 2015.

NARAYAN, K. M.; BOYLE, J. P.; THOMPSON, T. J.; IORENSEN, S. W.; WILLIAMSON, D. F. Lifetime risk for diabetes mellitus in the United States. **JAMA**. V.14, n. 290, p. 1884-90, 2003.

NELSON, D. A.; JACOBBER, S. J. "Why do older women with diabetes have an increased fracture risk?". **The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**. V. 86, n. 1, p. 29-31, 2001.

NICOLA, R. A. Effect of low-power GaAlAs laser (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers in Medical Science**. V. 18, n. 2, p. 89-94, 2003.

PAGE, K. A.; ROMERO, A.; BUCHANAN, T. A.; XIANG, A. H. Gestational diabetes mellitus, maternal obesity and adiposity in offspring. **Journal of Pediatrics**. V. 4, n. 164, p. 807-10, 2014.

PINHEIRO, A. L. B. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. **Laser therapy**. V. 13, p. 73-79, 2001.

PINTO, W. J. A função endócrina do tecido adiposo. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**. V. 16, n. 3, p. 111-120, 2014.

PORCIÚNCULA, M. V. P.; ROLIM, L. C. P.; GAROFOLO, L.; FERREIRA, S. R. G. Análise de fatores associados à ulceração de extremidades em indivíduos diabéticos com neuropatia periférica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. V.51, n. 7, p. 1134-1142, 2007.

PRADHAN, L.; NABZDYK, C.; ANDERSEN, N. D.; LOGERFO, F. W.; VEVES, A. Inflammation and neuropeptides: the connection in diabetic wound healing. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. V. 11, n. 2, 2009.

PRECECHTELOVA, J.; BORSANYIOVA, M.; SARMIROVA, S.; BOPEGAMAGE, S. Type 1 diabetes mellitus: genetic factors and presumptive enteroviral etiology or protection. **Journal of Pathogens**. E. 738512, v.2014, 2014.

PRIESTLEY, G. C.; COLVER, G. B. Failure of a helium-neon laser to affect components of wound healing in vitro. **British Journal of Dermatology**. V. 121, p. 179-186, 1989.

PROLIST, C. W. Wound healing and specific tissue regeneration. In: Slatter, D. Textbook of small animal surgery. **Philadelphia, wb. Saunders Company**. Ed. 2, v. 1, p. 53-63, 1993.

RAHATI, S. Food Pattern, lifestyle and diabetes mellitus. **International Journal of High Risk Behaviors and Addiction**. V. 3, n. 1, e-8725, 2014.

RAND, E.; GELLHORN, A. C. The healing cascade. Facilitating and optimizing the system. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**. V. 27, p. 765-781, 2016.

RIBEIRO, A. G.; SARDENBERG, L. M.; SARDENBERG, J. A. G. N. **Tratamento de Feridas**. Ed. AB, p. 34-35, 2004.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Tecido de renovação e reparação, cicatrização e fibrose. In: Robbins e Cotran. **Patologia: bases patológicas das doenças**. Ed. 7. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 91-124, 2005.

ROCHA JÚNIOR, A. M.; VIEIRA, B. J.; ANDRADE, L. C.; AARESTRUP, F. M. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contribution of in vitro and in vivo experimental studies. **Journal Vascular Brasileiro**. V. 6, p. 258-66, 2007.

SAID, O.; KHALIL, K.; FULDER, S.; AZAIZEH, H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 83, p. 251-65, 2002.

SANTOS, C. F. F.; SANTOS, A. P.; MACHADO, T. G. O.; AVELAR, N. C. P.; OLIVEIRA, M. X. Cicatrização de feridas cutâneas em ratos após terapia laser de baixa intensidade (660nm). **Revista Vozes dos Vales da UFVJM**. V. 2, N. 5, 2013.

SECRET, A. M.; BECKER, D. J.; KELSEY, S. F.; LAPORTE, R. E.; ORCHARD, T. J. Causespecific mortality trends in a large population based cohort with long-standing childhood – onset type 1 diabetes. **Diabetes**. V. 59, p. 3216-3222, 2010.

SENE, G. A. L.; SOUSA, F. F. A.; FAZAN, V. S.; BARBIERI, C. H. Efeitos da laserterapia na regeneração nervosa periférica. **Acta Ortopédica Brasileira**. V. 21, n. 5. São Paulo, 2013.

SILVA, F. L. Atendimento fisioterápico em pacientes queimados. In: 24º Encontro de Fisioterapia e I Simpósio de Reabilitação em Órteses e Próteses da universidade de Cruz alta, Cruz Alta. **Anais Cruz Alta**. Unicruz, 2003.

SILVEIRA, P. C. L. Efeitos da laserterapia de baixa potência na resposta oxidativa epidérmica induzida pela cicatrização de feridas. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. V. 13, n. 4, p. 281-287, 2009.

SIMÕES, N. P.; ALMEIDA, M. F.; NOHAMA, P. Estudo comparativo entre laser He-Ne e a estimulação elétrica microamperada na cicatrização de pele de ratos. **Revista Kinesia**. V.1, p. 19-30, 2009.

SPALLONE, V.; ZIEGLER, D.; FREEMAN, R.; BERNARDI, L.; FRONTONI, S.; POP-BUSUI, R.; STEVENS, M.; KEMPLER, P.; et al. On behalf of the Toronto Consensus Panel on Diabetic Neuropathy. Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: clinical impact, assessment, diagnosis, and management. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**. V. 27, n. 7, p. 639, 2011.

TANAKA, H.; HAMANO, T.; FUJII, N. “The impact of diabetes mellitus on vitamin D metabolismo in predialysis patients”. **Bone**. V. 45, n. 5, p. 949-955, 2009.

TAPP, R. J. et al. Foot complications in Type 2 diabetes: an Australian population-based study. **Diabetic Medicine**. V. 20, n. 2, p.105-13, 2003.

TATARUNAS, A. C.; MATERA, J. M.; DAGLI, M. L. Z. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico. Utilização do laser de baixa potência GAAS (904nm). **Acta Cirurgica Brasileira**. V. 13, n. 2, 1998.

TAVAKOLI, M.; MOJADDID, M.; FADAVI, H.; MALIK, R. A. Pathogenesis of human diabetic neuropathy. In: **Diabetic Neuropathy**, Tesfaye S, Boulton AJM (eds). Oxford University Press, Oxford. V. 2, p.9-16, 2011.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Simpósio Fundamentos em Clínica Cirúrgica**. V. 41, n. 3, cap. 2, p. 259-64, 2008.

TELLECHEA, A.; LEAL, E.; VEVES, A.; CARVALHO, E. Inflammatory and angiogenic abnormalities in diabetic wound healing: role of neuropeptides and therapeutic. **TOC VJ**. V.3, p. 43-55, 2010.

TESFAYE, S.; BOULTON, A. J. M.; DYCK, P. J. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity and treatments. **Diabetes Care**. V.33, p. 2285-2293, 2010.

TOWNSEND, C. M.; BEAUCHAMP, D.; EVERS, M.; MATTOX, K. L. Fabiston textbook of surgery. **St Louis**, mo: Elsevier, p. 192-207, 2011.

TRIGWELL, S. M.; RADFORD, P. M.; PAGE, S. R. Islet glutamic acid decarboxylase modified by reactive oxygen species is recognized by antibodies from patients with type 1 diabetes mellitus. **Clinical e Experimental Immunology**. V. 126, p. 126-242, 2001.

TSUI, H. 'Sensing' autoimmunity in type 1 diabetes. **Trends in Molecular Medicine**. V. 13, n. 10, p. 405-413, 2007.

TÚNER, J.; HODE, L. Low-level laser therapy: clinical practice and scientific background. **Prima Books**, Sweden, 1999.

VAN BAAL, J. et al. Mortality associated with acute charcot foot and neuropathic foot ulceration. **Diabetes Care**. V. 33, n. 5, p. 1086-9, 2010.

VELOSO, C. A.; FERNANDES, J. S.; VOLPE, C. M.; et al. TLR4 and RAGE: Similar routes leading to inflammation in type 2 diabetic patients. **Diabetes Metabolism**. V. 37, n. 4, p. 336-42, 2011.

VESTERGAARD, P.; REJNMARK, L; MOSEKILDE, L. "Diabetes and its complications and their relationship with risk of fractures in type 1 and 2 diabetes". **Calcified Tissue International**. V. 84, n. 1, p. 45-55, 2009.

VILAR, L. **Endocrinologia Clínica**. Ed. Guanabara Koogan. 6 ed., 2016.

VINCENT, A. M.; CALLAGHAN, B. C.; SMITH, A. L.; FELDMAN, E.L. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. **Nature Reviews Neurology**. V. 7, p. 573–83, 2011.

VINCENT, A. M.; HAYES, J. M.; McLEAN, L. L.; VIVEKANANDAN-GIRI, A.; PENNATHUR, S.; FELDMAN, E. L. Dyslipidemia-induced neuropathy in mice: the role of oxLDL/LOX-1. **Diabetes**. V. 58, p. 2376–85, 2009.

ZANOELLO, A. M.; MELAZZO-MAZZANTI, C.; GINDRI, J. K.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; CECIM, M. Efeito protetor do sysygium cumini contra diabetes mellitus induzido por aloxano em ratos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**. V.21, n. 1, p. 31-6, 2012.

ZYKOVA, S. N.; JENSSEN, T. G.; BERDAL, M.; OLSEN, R.; MYKLEBUST, R.; SELJELID, R. Altered cytokine and nitric oxide secretion in vitro by macrophages from diabetic type II – like db/db mice. **Diabetes**. V. 49, p. 1451-1458, 2000.