

# LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA NO TRATAMENTO DE ÚLCERAS DIABÉTICAS

## Um Problema de Evidência

Alexandre CAMÕES BARBOSA, Helder SIMÕES, Sara LORGA, Manuela MENDES

### RESUMO

**Introdução:** A Diabetes *Mellitus* representa a principal causa de amputação dos membros inferiores, com importantes custos económicos para os serviços de saúde. O principal factor de risco para a amputação é o desenvolvimento de úlceras diabéticas, sendo acompanhada de uma elevada taxa de mortalidade aos cinco anos. A isquemia por afecção do território macrovascular é um factor fisiopatológico essencial no desenvolvimento de úlceras isquémicas. Os tratamentos existentes são prolongados e associados a elevadas taxas de insucesso e recidiva, exigindo a combinação de múltiplas modalidades terapêuticas. A laserterapia de baixa potência tem sido usada como terapêutica adjuvante do pé diabético, desde a década de 60 do século XX, devido aos seus hipotéticos efeitos estimuladores da microcirculação e da reparação tecidual.

**Material e Métodos:** Identificação de estudos científicos publicados através de uma pesquisa bibliográfica da Pubmed, The Cochrane Library e Cochrane Controlled Trials Register.

**Discussão e Conclusões:** A evidência existente é favorável para modelos celulares *in vitro*, mas conflituosa em modelos animais e populações humanas. Existe uma grande heterogeneidade metodológica, que pode ser responsável pelos resultados discordantes. São propostas orientações para estudos futuros neste âmbito, nomeadamente a caracterização detalhada das úlceras e os parâmetros de tratamento com *laser*. São necessários estudos bem controlados, duplamente ocultos e aleatorizados. Seguindo o *primum non nocere*, a laserterapia pode ser utilizada como terapêutica adjuvante no tratamento do pé diabético, uma vez que é incruenta, de rápida aplicação e de baixo custo, sem efeitos adversos significativos.

### SUMMARY

#### LOW-LEVEL LASER THERAPY IN THE TREATMENT OF DIABETIC ULCERS

##### An Evidence Problem

**Introduction:** Diabetes *Mellitus* is the leading cause of lower limb amputation, representing a significant economic cost for health services. The development of diabetic ulcers is a main risk factor for amputations, which have a high mortality rate at five years. The ischemia caused by macrovascular disease is a key pathophysiological factor in the development of ischemic ulcers. Existing treatments are prolonged and associated with high rates of failure and relapse, requiring the combination of multiple therapeutic modalities. Low-level laser therapy has been used as an adjuvant therapy for diabetic foot ulcers, since the 1960's, due to its hypothetical stimulating effects over microcirculation and tissue repair.

**Material and Methods:** Identification of published scientific studies through a literature search on PubMed, The Cochrane Library and Cochrane Controlled Trials Register.

**Discussion and Conclusions:** Existing evidence is favourable for *in vitro* cell models, but conflicting in animal models and human populations. There is significant methodological heterogeneity, which may be responsible for discordant results. Guidelines are proposed for future studies in this area, including the detailed characterization of ulcers and the parameters of laser treatment. Well-controlled studies, randomized and double-blind are

A.C.B., S.L., M.M.: Serviço de Medicina Física e de Reabilitação. Centro Hospitalar de Lisboa Central. Lisboa. Portugal.

H.S.: Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental. Lisboa. Portugal.

needed. Accordingly to the *primum non nocere*, laser therapy can and should be used as adjunctive therapy in the treatment of diabetic foot, because it isn't invasive, has low costs and is a fast therapy without significant adverse effects.

## INTRODUÇÃO

A Diabetes *Mellitus* representa a principal causa de amputação dos membros inferiores<sup>1</sup>. Em Portugal, mais de 1600 diabéticos são, todos os anos, submetidos a amputação e quase 2000 são internados devido a complicações da doença nos membros inferiores<sup>2</sup>. Anualmente, o Sistema Nacional de Saúde português gasta aproximadamente nove milhões de euros em internamentos relacionados com o “Pé Diabético” e cerca de seis milhões de euros devido a amputações dos membros inferiores<sup>3</sup>. A prevalência de história de ulceração dos membros inferiores em diabéticos caucásianos varia entre 5% e 10%<sup>4</sup>. O desenvolvimento de uma úlcera diabética, sobretudo se isquémica, constitui um factor de risco independente para amputação do membro inferior, de tal forma que 80% das amputações por angiopatia diabética são precedidas pelo desenvolvimento de uma úlcera diabética<sup>5</sup>. Cerca de 20% dos diabéticos terá de ser amputado nos cinco anos seguintes ao desenvolvimento de uma úlcera. Após uma amputação, o risco de morte aumenta substancialmente e as taxas de mortalidade, nos primeiros cinco anos após o evento, variam entre os 39% e 80%. Para além disso, podem ser encontradas taxas de mortalidade semelhantes, nos anos seguintes ao desenvolvimento de uma úlcera diabética, sendo essa taxa superior nos doentes com úlceras com componente isquémico.

A fisiopatologia da úlcera diabética é complexa. Cerca de 60% dos diabéticos que desenvolvem úlcera sofrem de neuropatia diabética periférica e aproximadamente 40% têm doença arterial periférica. A etiologia neuropática é responsável por quase 45% das úlceras diabéticas, em cerca de 16% predomina o componente isquémico e 24% das lesões são neuroisquémicas<sup>6</sup>. Na fisiopatologia das úlceras isquémicas, o compromisso macrovascular tem sido apontado como o factor essencial, mas a afecção do território microvascular desempenha também um papel importante na generalidade das úlceras<sup>7</sup>.

A prevenção da úlcera diabética é de primordial importância, mas quando esta é ineficaz o tratamento apropriado torna-se premente. Este é difícil e prolongado, associa-se a elevadas taxas de insucesso e recidiva, exigindo frequentemente a combinação de várias modalidades terapêuticas. As armas terapêuticas disponíveis são diversas. Incluem a optimização do controlo metabólico e dos vários factores de risco cardiovascular, a antibioterapia, os agentes locais, pensos e apósitos, o desbridamento cirúrgico, os enxertos, entre outros, menos comuns, como o vácuo, o oxigénio hiperbárico ou as larvas. Muitas out-

ras modalidades têm sido propostas. Neste artigo faz-se a revisão do uso da laserterapia de baixa potência (LTBP) no tratamento de úlceras diabéticas. O efeito “bioestimulador” da aplicação da LTBP foi preconizado por Mester *et al.*, na década de 60<sup>8</sup>. Desde então, a laserterapia tem sido considerada como uma terapêutica adjuvante, útil no tratamento de feridas crónicas e tem despertado interesse no caso específico do pé diabético, pelo seu possível efeito benéfico ao nível da microcirculação e na modulação da reparação tecidual.

## MATERIAL E MÉTODOS

Procedemos à identificação de estudos científicos publicados através de uma pesquisa bibliográfica da Pubmed, The Cochrane Library e Cochrane Controlled Trials Register. Foram usadas combinações das palavras-chave ‘laser’, ‘therapy’, ‘wound’, ‘ulcer’, ‘diabetic’, sem restrições linguísticas.

## DISCUSSÃO

A LTBP distingue-se do *laser* tradicional por ser atérmica, tendo potências que variam entre os 5mW e os 500 mW (os *lasers* tradicionais geram potências de 300 W). Trata-se, portanto, de *lasers* das classes III e IIIa. Por vezes, utiliza-se a expressão LTBP de forma intercambiável com a Terapia por Díodos Emissores de Luz (LEDT), pelo que os trabalhos realizados neste âmbito devem referir explicitamente a qual das modalidades são atinentes. Os substratos mais utilizados na LTBP são gases inertes. Em Medicina Física e de Reabilitação, os *lasers* mais comuns são os de Hélio-Néon (HeNe, que emitem luz com comprimento de onda de 632,8 nm) e os de Arsénio-Gálio (AsGa, 904 nm). O mecanismo exacto da LTBP ainda não está completamente esclarecido. A principal teoria consiste na ideia de que a luz *laser* (coerente e monocromática) penetra a epiderme e é absorvida por moléculas fotoaceitadoras, designadas por cromóforos. O efeito luminoso sobre estas moléculas precipita uma cascata de fotobioestimulação, na qual há activação do metabolismo celular e cicatrização. A energia cinética das moléculas fotoaceitadoras aumenta, activando ou desactivando enzimas, as quais, por seu turno, são capazes de alterar as propriedades físicas ou químicas de outras macromoléculas. Alguns autores teorizam o aumento do consumo de ácido ascórbico e formação de hidroxiprolina, o aumento da síntese de ATP mitocondrial

por activação de ATPases e a estimulação da produção de ARNm e da síntese proteica<sup>9</sup>. Estudos mais recentes apon-tam as espécies reactivas de oxigénio como os mensageiros secundários-chave produzidos pela LTBP.

Vários estudos em modelos celulares *in vitro* e mod-elos animais demonstraram os benefícios potenciais da LTBP<sup>10</sup>.

### Estudos *in vitro*

Estudos usando LTBP revelaram mecanismos de acção ao nível das funções celulares do processo de cicatrização. A aplicação de um *laser* de HeNe aumenta a síntese de pró-colagénio, independentemente do crescimento ce-lular, estimula a angiogénese, aumenta a resistência das cicatrizes a forças de tensão e aumenta a epitelização<sup>11</sup>. Outros efeitos reportados incluem: proliferação e aumento da mobilidade celular dos queratinócitos, libertação de factores de crescimento celular, libertação de interleucina-1-alfa e interleucina-8 pelos queratinócitos, e proliferação e transformação de fibroblastos em miofibroblastos<sup>12</sup>. Zhang *et al.* foram os primeiros a demonstrar, usando microar-ranjos de ADN, uma sobre-regulação (*up-regulation*) dos genes que conduzem à proliferação de fibroblastos: irra-diarão fibroblastos humanos com luz *laser* de 628 nm, e observaram um aumento da expressão de sete categorias de genes reconhecidamente implicados na proliferação ce-lular e supressão da apoptose<sup>13</sup>. A LTBP também estimula directamente o sistema imunitário, o que pode ajudar a prevenir infecção de feridas crónicas<sup>11</sup>. Por outro lado, foi demonstrado que a exposição a um *laser* de 308 nm reduz o crescimento bacteriano, o que pode ser importante em feridas infectadas, como é o caso de muitas úlceras diabéticas<sup>14</sup>.

### Modelos animais

Estudos *in vivo* em modelos roedores expostos a *laser* HeNe mostraram uma cicatrização acelerada e aumento da produção de colagénio<sup>15</sup>. Não houve reprodução dos resul-tados em modelos suínos<sup>16</sup>. Os resultados na cicatrização no tratamento com *laser* de HeNe em modelos animais não têm, assim, sido consistentes.<sup>13,14</sup> Os estudos em modelos animais são, regra geral, metodologicamente superiores aos estudos em humanos, dado que são mais bem controlados. A inconsistência experimental dos resultados pode estar relacionada com as diferentes dosimetrias e diferentes intervalos de tempo utilizados no tratamento com *laser*.

### Ensaio clínico

O uso da laserterapia nos processos de cicatrização foi, primeiramente, usado na Europa, nos anos 70 do século XX, pela equipa húngara de Mester. Os estudos originais eram abertos e não controlados, e referiam uma aceleração nos processos de cicatrização de úlceras da

pele. Não obstante, a *The Food and Drug Administration* (FDA), citando a falta de estudos humanos convincentes, baniu a venda de sistemas *laser* de baixa potência, em 1983. Posteriormente, dois estudos, usando *laser* infra-vermelho, demonstraram uma melhoria da cicatrização de úlceras venosas, resultado que não foi reproduzido num estudo controlado posterior, no qual não houve diferenças nas taxas de cicatrização. Não obstante, um novo estudo, levado a cabo por um grupo austríaco, reafirmou o valor potencial da LTBP na indução da cicatrização de úlceras de diversas etiologias (venosa, diabética, arteriopática, por radiação e vasculite auto-imune) resistentes ao tratamento convencional, sendo os melhores resultados obtidos em úlceras de radiação.

### Ensaio clínico usando laserterapia para o tratamento de úlceras diabéticas

Em 1997, Yu *et al.* demonstraram a eficácia da LTBP na cicatrização de úlceras em ratinhos diabéticos<sup>21</sup>. Nesse estudo, ratinhos geneticamente diabéticos (C57BL/KsJ-db/db) foram irradiados com um *laser* de Árgon (630 nm; densidade de potência 20 mW/cm<sup>2</sup>), e apresentaram melhorias do tempo de cicatrização, da epitelização das feridas, bem como do seu conteúdo celular, formação de tecido de granulação e deposição de colagénio. A equipa de Stadler expôs as feridas de ratinhos diabéticos C57BL/KsJ-db/db a luz *laser* com comprimento de onda de 630 nm (densidade de potência 79mW/cm<sup>2</sup> e densidade de energia 5J/cm<sup>2</sup>), durante cinco dias, mostrando maiores resistência a forças de tracção<sup>22</sup>. Reddy *et al.* concluíram que a fotobi-ostimulação promove a reparação dos tecidos ao acelerar a produção de colagénio e a estabilidade do tecido conectivo, no processo de cicatrização<sup>21</sup>. No seu estudo, irradiaram ratos com diabetes induzida pela estreptozotocina com um *laser* de HeNe (632,8 nm; densidade de energia 1 J/cm<sup>2</sup>; cinco dias por semana até à cicatrização completa). O mesmo autor concluiu haver benefícios semelhantes com um *laser* de AsGa, embora seja preferível o de HeNe<sup>23</sup>. Kawalec *et al.* também demonstrou bons resultados com *laser* de AsGa<sup>24</sup>. Foram Schindl *et al.* os primeiros a demonstrar os benefícios da LTBP no tratamento da microangiopatia diabética humana, através de um estudo aleatorizado, duplamente oculo e controlado com placebo<sup>25</sup>. Nesse ensaio, procedeu-se à irradiação de 30 doentes aleatorizados com úlceras diabéticas ou gangrena, e níveis elevados de hemoglobina glicosilada, usando um *laser* de HeNe. O objectivo era testar se a LTBP aumenta o fluxo sanguíneo em diabéticos com microangiopatia. Os doentes receberam um tratamento de 50 minutos de irradiação de luz *laser* de HeNe (feixe de luz com comprimento de onda 632,8 nm, densidade de potência 30 mW, *spot* 5 mm; divergência realizada por *scanner* do aparelho; densidade de energia de 30 J/cm<sup>2</sup>) ou irradiação placebo, em ambos os pés. Determinou-se previamente que a luz *laser* não

produzia, de per si, um aumento da temperatura em materiais irradiados (zaragatoa). Aos tratamentos seguiu-se uma medição da temperatura de ambos os antepés, usando termografia de infra-vermelhos, de modo a avaliar a circulação sanguínea. A temperatura da pele irradiada com o *laser* de HeNe aumentou significativamente ( $0,58 \pm 0,68^\circ\text{C}$  aos 20 min de tempo de irradiação; e  $1,06 \pm 1,03^\circ\text{C}$  no final dos 50 min), ao passo que a temperatura da pele irradiada com luz placebo diminuiu. A temperatura dérmica manteve-se elevada durante 15 minutos após o termo do tratamento, sugerindo que o aumento do fluxo sanguíneo se mantém, mesmo após a paragem da irradiação. A partir desta observação, os autores postularam que, para além do efeito a longo prazo da LTBP na proliferação de células endoteliais durante a angiogénese previamente demonstrado<sup>23</sup>, existia também um efeito a curto prazo, que se poderia dever à estimulação do metabolismo celular. Num segundo estudo de Schindl *et al.*<sup>27</sup>, o antepé de um dos pés de doentes diabéticos foi exposto uma vez à irradiação de um *laser* de HeNe ( $\lambda=632,8$  nm; densidade energética  $30 \text{ J/cm}^2$ ) ou a uma irradiação placebo. Observou-se um aumento da temperatura em ambos os pés, ao passo que no grupo de controlo se observou uma diminuição térmica em ambos os pés. A partir desta observação, o grupo concluiu que a irradiação com *laser* atérmico de doentes diabéticos com microangiopatia causava um aumento significativo da circulação da pele em ambos os pés, o que denotava a possibilidade da existência de efeitos sistémicos. A demais evidência da eficácia da LTBP nas úlceras diabéticas, dada pelo mesmo grupo, provém, sobretudo, de casos clínicos isolados.<sup>28</sup>

Por outro lado, a LTBP diminui a reacção inflamatória e regula as acções do sistema imunitário, o que ajuda a cicatrização de úlceras diabéticas infectadas. Khurshudian *et al.* expos úlceras infectadas de 174 diabéticos, uma única vez, a um *laser* de hélio-cádmio,  $\lambda=441,6$  nm, com uma densidade energética de  $4,5 \text{ J/cm}^2$ , verificando uma rápida diminuição da reacção inflamatória, bem como desinfecção e aceleração do processo de regeneração<sup>29</sup>. Este trabalho foi posteriormente apoiado pelo trabalho de Kuliev e Babaev<sup>30</sup>, no qual foi descrita uma «rápida estabilização do sistema imunitário, reduzindo a duração do tratamento», após irradiação com luz *laser* de feridas purulentas dos tecidos moles de 152 diabéticos. Pötinen observou que a «estabilização do sistema imunitário» se devia ao aumento da libertação de várias citocinas, aumento das populações leucocitárias e paragem do crescimento bacteriano, sob os efeitos da LTBP<sup>31</sup>. Zubkova também descreveu uma alta eficácia da LTBP no tratamento de perturbações tróficas da pele, entre as quais as úlceras diabéticas<sup>32</sup>.

Actualmente, não existe uma teoria uniforme para explicar o mecanismo da LTBP, o que problematiza a literatura discordante. A inconsistência dos resultados

publicados poderá dever-se à variação dos parâmetros físicos e clínicos utilizados, como diferentes comprimentos de onda, densidades energéticas, densidades de potência, situação clínica dos doentes, tamanho e tipos de úlcera, bem como regimes de tratamento. Apenas um grupo pequeno de artigos dá conta de todos os parâmetros de dosimetria *laser* relevantes, dificultando a reprodução dos ensaios. Além disso, a LTBP tem sido amplamente utilizada nos ex-países do Bloco do Leste Europeu, pelo que existe uma extensa experiência e informações disponíveis neste âmbito. Contudo, a maioria desta literatura encontra-se publicada em russo, sendo também perdida informação nas escassas traduções feitas.

### Estudos futuros

As novas investigações deverão ter um grupo controlo, nos quais os doentes recebam LTBP-placebo ou outro tratamento de referência, e devem incluir métodos de aleatorização e ocultação. O ensaio deverá ser registado, antes de ser iniciado, num registo público de ensaios, de maneira a evitar que só sejam publicados resultados positivos. Os grupos terapêutico e controlo deverão ser mais bem caracterizados quanto ao tipo de úlcera diabética, procurando estratificar as lesões no respeitante à gravidade e etiologia. Essa caracterização pode ser feita recorrendo a várias escalas validadas, como, por exemplo, a classificação PEDIS (*Perfusion, Extent, Depth, Infection, Sensation*), a escala da Universidade do Texas ou a escala de Wagner. Para além desta informação, estudos futuros devem ainda caracterizar as suas populações quanto a aspectos que possam influenciar os resultados das intervenções terapêuticas nas úlceras diabéticas. São disso exemplo o controlo metabólico da Diabetes *Mellitus*, os anos de evolução da doença, a presença de outros factores de risco cardiovascular ou a utilização de outros agentes terapêuticos associados à LTBP.

Quanto aos parâmetros específicos da LTBP, deverá ser dada uma descrição de: (1) número de sessões de tratamento; (2) frequência semanal das sessões; (3) modo de aplicação do *laser* (estacionário em contacto com a pele; estacionário com distância descrita à pele; varrimento); (4) comprimento de onda em nanómetros; (5) potência média em miliwatts (mW); (6) tempo de tratamento em segundos; (7) dose de energia irradiada em joules (usar densidade de energia em  $\text{J/cm}^2$  apenas em estudos em pequenos animais e culturas celulares); tamanho do ponto (*spot*) em centímetros quadrados ( $\text{cm}^2$ ); densidade de potência em miliwatts por centímetro quadrado ( $\text{mW/cm}^2$ ). Deve ser evitada uma intervenção simultânea com esteróides, dada a anulação dos efeitos da LTBP. Devem ser claramente explicitados os efeitos procurados com a LTBP (por exemplo, efeito biotrófico).

## CONCLUSÕES

A fototerapia tem ganho, nos últimos anos, um peso crescente como opção terapêutica médico-cirúrgica, nomeadamente no campo da Medicina Física e de Reabilitação. As feridas crónicas, incluindo as úlceras diabéticas, são um problema importante, que carece de modalidades terapêuticas que estimulem a capacidade de cicatrização do organismo. A LTBP parece ser, em teoria, um instrumento muito atractivo neste âmbito.

O mecanismo exacto da LTBP ainda não está completamente esclarecido, pensando-se que actua pela influência sobre moléculas fotoaceitadoras, resultando no aumento da síntese de ATP mitocondrial, estimulação da produção de ARNm e síntese proteica.

Estudos *in vitro* demonstraram consensualmente os efeitos na aceleração da cicatrização, particularmente no aumento da síntese de pró-colagénio, estimulação da angiogénese, aumento da resistência às forças de tensão, aumento da epitelização, proliferação de fibroblastos e transformação em miofibroblastos, bem como estimulação do sistema imunitário e redução da proliferação bacteriana. Estudos em modelos animais apresentaram, contudo, disparidades, uma vez que a LTBP parece acelerar a cicatrização em roedores, mas não em suínos.

Quanto aos estudos em populações humanas, a evidência tem, também, sido contraditória.

No que concerne especificamente à Diabetes *Mellitus*, os efeitos benéficos na cicatrização foram consistentemente demonstrados em ratinhos. Schindl *et al.* demonstraram a utilidade da LTBP na melhoria da circulação em doentes com angiopatia diabética, num estudo aleatorizado de dupla ocultação e controlado. Outros estudos parecem mostrar uma diminuição da reacção inflamatória, bem como uma desinfecção de úlceras diabéticas humanas.

Apesar de toda a existência favorável, a inconsistência dos resultados publicados instala ainda dúvida sobre a sua eficácia. Essa inconsistência poderá residir na heterogeneidade dos parâmetros físicos e clínicos utilizados nos diferentes estudos. São assim necessários estudos prospectivos, bem controlados, para avaliar a eficácia desta modalidade terapêutica e, caso se revele eficaz, quais os parâmetros físicos a utilizar e quais as populações de doentes que mais beneficiariam da sua aplicação. Uma vez que não fere o *primum non nocere*, é incruenta, de rápida aplicação e de baixo custo, a LTBP pode ser utilizada no tratamento do pé diabético.

### Conflito de interesses:

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

### Fontes de financiamento:

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

## REFERÊNCIAS

- BOULTON AJ, VILEIKYTE L. The diabetic foot: the scope of the problem. *J Fam Pract.* 2000 Nov;49(11 Suppl):S3-8.
- CORREIA L, BOAVIDA J, CARDOSO M, DUARTE J, DUARTE R, FERREIRA H *et al.* Diabetes: Factos e Números. Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes. Sociedade Portuguesa de Diabetologia. 2010. Disponível em: URL: <http://www.spd.pt>.
- GÍRIA J, CARDOSO C. Epidemiologia dos Internamentos por Diabetes Mellitus: 2000 a 2007. *Revista Portuguesa de Diabetes.* 2009;4(3) Suppl:18-26.
- REIBER GE. *Epidemiology of Foot Ulcerations and Amputations in Diabetes.* 6th ed. St. Louis: Mosby; 2001.
- SOHN MW, STUCK R, PINZUR M, LEE T, BUDIMAN-MAK E. Lower-extremity Amputation Risk After Charcot Arthropathy and Diabetic Foot Ulcer. *Diabetes Care.* 2010 Jan;33:98-100. Epub 2009 Oct 13.
- MOULIK P, MTONGA R, GILL G. Amputation and Mortality in New-Onset Diabetic Foot Ulcers Stratified by Etiology. *Diabetes Care.* 2003 Feb;26:491 – 494.
- FLYNN MD, TOOKE JE. Aetiology of diabetic foot ulceration: a role for the microcirculation? *Diabet Med.* 1992 May;9(4):320-329.
- MESTER E, JUHASZ J, VARGA P, KARIKA G. Lasers in clinical practice. *Acta Chir Hungar Akad Sci.* 1968;9:335.
- VACCARA, MARRA E, QUAGLIARIELLO E, GRECO M. Increase of both transcription and translation activities following separate irradiation of the *in vitro* system components with He-Ne laser. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;15;203(2):991-7.
- ZHANG J, XING D, GAO X. Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2008 Nov;217(2):518-28.
- TAKADUMA, T. Possible application of the laser in immunobiology. *Keio J Med.* 1993 Dec;42(4):180-2.
- POURREAU-SCHNEIDER N, AHMED A, SOUDRY M, JACQUEMIER J, KOPP F, FRANQUIN JC, MARTIN PM. Helium-Neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. *Am J Pathol.* 1990;137:171-78.
- ZHANG Y, SONG S, FONT CC, TSANG TH, YANG Z, YANG M. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *J Invest Dermatol.* 2003 May;120(5):849-57.
- FOLWACZNY M, LIESENHOFF T, LEHN N, HORCH HH. Bactericidal action of 308 nm excimer-laser radiation: an *in vitro* investigation. *Journal of Endodontics.* 1998;24(12):781-5.
- KANAJS, HUTSCHNREITER G, HAINAD, WAIDELICH W. Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Arch Sur.* 1981;116:293-6.
- HUNTER J, LEONARD L, WILSON R, SNIDER G, DIXON J. Effects of low energy laser on wound healing in a porcine model. *Lasers Surg Med.* 1984;3(4):285-90.
- MESTER E, SPIRY T, SZENDE B, TOJA JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg.* 1971;122:532-35.
- SUGRUE ME, CAROLAN J, LEEN EJ, FEELEY TM, MOORE DJ, SHANIK GD. The use of infrared laser therapy in the treatment of venous ulceration. *Ann Vasc Surg.* 1990;4:179-81.
- LUNDEBERG T, MALM M. Low-power HeNe laser treatment of venous leg ulcers. *Ann Plastic Surg.* 1991;27:537-39.
- SCHINDL M, KERSHAN K, SCHINDL A, SCHÖN H, HEINZL H, SCHINDL L. Induction of complete wound healing in recalcitrant ulcers by low-intensity laser irradiation depends on ulcer cause and size. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1999 Feb;15(1):18-21.
- YU W, NAIM JO, LANZAFAME RJ. The effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. *Lasers Surg Med.* 1997;20(1):56-63.
- Stadler I, Lanfazame RJ, Evans R, Narayan V, Dailey B, Buehner N, Naim JO. 830-nm irradiation increases the wound tensile strength in

- diabetic murine model. *Lasers Surg Med.* 2001;28(3):220-6.
23. REDDY GK. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. *Lasers Sur Med.* 2003;33(5):344-51.
24. KAWALEC JS, HETHERINGTON VJ, PFENNIGWERTH TC, DOCKERY DS, DOLCE M. Effect of diode laser on wound healing by using diabetic and nondiabetic mice. *J Foot Ankle Surg.* 2004 Jul-Aug;43(4):214-20.
25. SCHINDLA, SCHINDL M, SCHÖN H, KNOBLER R, HAVELEC L, SCHINDL L. Low-intensity laser irradiation improves skin circulation in patients with diabetic microangiopathy. *Diabetes Care.* 1998;21:580-84.
26. GHALI L, DYSON M. The direct effect of light therapy on endothelial cell proliferation in vitro. In *Angiogenesis Key Principles-Science-Technology-Medicine.* Steiner R, Weisz PB, Langer R. Eds. Basel. Birkhäuser. 1992;411-14.
27. SCHINDL A, HEINZE G, SCHINDL M, PERNERSTORFER-SCHÖN H, SCHINDL L. Systemic effects of low-intensity laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. *Microvasc Res.* 2002 Sep;64(2):240-6.
28. SCHINDL A, SCHINDL M, SCHINDL L. Successful treatment of a persistent radiation ulcer by low power laser therapy. *J Am Dermatol.* 1997;37:646-48.
29. KURSHUDIAN AG. Use of helium-cadmium lasers in the complex treatment of suppurative diseases in patients with diabetes mellitus. *Khirurgiia (Mosk).* 1989 Jun;(6):38-42.
30. KULIEV RA, BABAEV RF. Therapeutic action of laser irradiation and immunomodulators in purulent injuries of the soft tissues in diabetic patients. *Probl Endokrinol (Mosk).* 1991 Nov-Dec;37(6):31-2.
31. PÖTINEN PJ. Biological effects of LLLT. In: PJ Potinen, ed. *Low level laser therapy as a medical treatment modality.* Art Urpo. Tampere, Finland. 1992;99-101.
32. ZUBKOVA ST. The use of helium-neon laser radiation in the treatment of trophic disorders in patients with diabetes mellitus. *Klin Khir.* 1992;(3):47-9.