

UNIVERSIDADE TIRADENTES

LUCAS EMANUEL TENÓRIO FERNANDES TELES

EFEITO DA LASER TERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA
SOBRE O REPARO ÓSSEO EM RATOS DIABÉTICOS

Aracaju
2014

LUCAS EMANUEL TENÓRIO FERNANDES TELES

EFEITO DA LASER TERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA
SOBRE O REPARO ÓSSEO EM RATOS DIABÉTICOS

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Coordenação do Curso de
Odontologia da Universidade Tiradentes
como parte dos requisitos para obtenção
do grau de Bacharel em odontologia.
ORIENTADOR: Profa. Dra. Maria de
Fátima Batista de Melo.

Aracaju

2014

LUCAS EMANUEL TENÓRIO FERNANDES TELES

EFEITO DA LASER TERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA
SOBRE O REPARO ÓSSEO EM RATOS DIABÉTICOS

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Coordenação do Curso de
Odontologia da Universidade Tiradentes
como parte dos requisitos para obtenção
do grau de Bacharel em odontologia.

Aprovado em ____/____/____
Banca Examinadora

Prof. Orientador: _____

1º Examinador: _____

2º Examinador: _____

AUTORIZAÇÃO PARA ENTREGA DO TCC

Eu, **Maria de Fátima Batista de Melo** orientador(a) do(a) discente **Lucas Emanuel Tenório Fernandes Teles** atesto que o trabalho intitulado: “**Efeito da laser terapia de baixa potência sobre o reparo ósseo em ratos diabéticos**” está em condições de ser entregue à Supervisão de Estágio e TCC, tendo sido realizado conforme as atribuições designadas por mim e de acordo com os preceitos estabelecidos no Manual para a Realização do Trabalho de Conclusão do Curso de Odontologia.
Atesto e subscrevo,

Orientador(a)

Efeito da laser terapia sobre o reparo ósseo em ratos diabéticos

Lucas Emanuel Tenório Fernandes Teles^a; Maria Amália Gonzaga Ribeiro^b; Maria de Fátima Batista de Melo^c; Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior^d

^(a) Graduando em Odontologia – Universidade Tiradentes; ^(b) Professor Adjunto II do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe ^(c) PhD. Professora Titular do Curso de Odontologia – Universidade Tiradentes e Professor Associado IV da Universidade Federal de Sergipe; ^(d) PhD. Professor Titular do Curso de Odontologia da Universidade Tiradentes.

Resumo

Objetivo: Nós investigamos o efeito da Terapia de Laser de Baixa Potência (TLBP) sobre reparo ósseo em ratos diabéticos. Materiais e Métodos: As cavidades ósseas (19 mm de diâmetro) foram realizadas nos fêmurs de 72 ratos diabéticos induzida por aloxana, que foram divididos em 4 grupos: CTR (controle), DBT (diabéticos), CTRL e DBTL (lasers-irradiados). TLBP (GaAlAs, 780 nm, 17,5 J/cm²) foi realizado a cada 48 horas durante 7 dias perfazendo 4 sessões. Os animais foram eutanasiados com 7, 18 e 30 dias. Os níveis séricos de fosfatase alcalina (F-ALC) e de reparo ósseo foram analisados. Resultados: F-ALC teve um aumento significativo nos grupos TLBP-tratados em 7 e 18 dias (p<0.001). DBTL, grupo diabético tratado com TLBP revelou um aumento significativo na regeneração óssea, comparada com DBT em 7, 18 e 30 dias (p<0.01, p<0.05, p<0.01, respectivamente). Além disso, em 30 dias, o reparo ósseo em DBTL foi estatisticamente similar ao de CTR (p<0.01). Conclusão: A Terapia de Laser de Baixa Potência aumentou os níveis séricos da fosfatase alcalina e otimizou o reparo ósseo em ratos diabéticos.

Palavras-chaves: Laser Arseneto de Galio Alumínio; Diabetis Mellitus; reparo ósseo

ABSTRACT

Objective: We investigated the effect of low-level laser therapy (LLLTT) on bone healing in diabetic rats. Material and Methods: Bone cavities (19 mm diameter) were performed in the femur of 72 alloxan-induced diabetic rats, which were assigned into 4 groups: CTR (control), DBT (diabetic) CTRL and DBTL (irradiated). LLLTT (GaAlAs, 780 nm, 17.5 J/cm²) was performed every 48h for 7 days. The animals were killed at 7, 18 and 30 days. Alkaline phosphatase serum levels (ALK-P) and bone repair were analyzed. Results: ALK-P was significantly increased in LLLTT-treated groups at 7 and 18 days (p<0.001). LLLTT-treated diabetic group (DBTL) showed significant bone healing improvement compared with DBT at 7, 18 and 30 days (p<0.01 p<0.05, p<0.01 respectively). In addition, at 30 days, DBTL bone healing was statistically similar to CTR (p<0.01). Conclusion: Low-level laser therapy increases the serum levels of alkaline phosphatase and improves bone healing in alloxan-induced diabetic rats.

Key-Words: Laser Therapy ; Diabetis Mellitus; Bone formation

1. Introdução

Diabetes mellitus (DM) é uma das mais comuns desordens endócrinas, caracterizada pela deficiência na secreção, ação ou ambos da insulina, resultando em uma hiperglicemia persistente (Sargis et al., 2012). DM tem sido associada há danos em

longo prazo, disfunções e falência de vários órgãos, assim como retinopatia, nefropatia e neuropatia periférica, causando sintomatologia gastrointestinal, urogenital e cardiovascular além de disfunção sexual (American Diabetes Association, 2009).

Tem sido relatado que a DM causa uma série de complicações sobre o metabolismo ósseo, resultando, entre outras

alterações, em osteopenia e perda importante da densidade óssea (Kurra et al., 2013). Desta forma, tem sido demonstrado que a DM impacta negativamente sobre o processo de reparo ósseo, em resposta ao desequilíbrio entre formação/reabsorção óssea e sobre a dinâmica da resposta inflamatória (Wang et al., 2013; Dhaliwal et al., 2014). Além disso, estudos têm demonstrado que na DM ocorre um desequilíbrio entre a ativação e inibição de enzimas proteolíticas, bem como inibição parcial da síntese e liberação de fatores de crescimento angiogênicos, redução das taxas de proliferação celular e aumento da apoptose (Graves et al., 2011). As repercussões da DM sobre o reparo ósseo tem motivado a busca por tecnologias alternativas de controle deste agravo, a exemplo de novos medicamentos e/ou agentes eletrofísicos, como a terapia com laser de baixa potência (Patrocínio-Silva et al., 2013).

A terapia a laser de baixa potencia (TLBP) compreende uma radiação altamente concentrada, não invasiva e não ionizante que, em contato com diferentes tecidos, promove efeitos térmicos, fotoquímicos e não lineares (Hamblin, Demidova, 2006; Prindeze et al., 2010). Tem sido relatado que a TLBP induz efeitos estimulatórios sobre osteoblastos, aumentando a proliferação celular e acelerando o metabolismo ósseo (Fernandes et al., 2013). Além disso, estudos recentes sugerem que a TLBP é capaz de estimular a osteogênese nos locais de fratura, promovendo uma maior deposição de massa óssea e acelerando sua consolidação. (Patrocínio-Silva et al., 2013 Fernandes et al 2013).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da fotobiomodulação utilizando TLBP sobre o processo de reparo ósseo em ratos diabéticos.

2. Material e Métodos

Animais. Utilizaram-se 72 ratos da *linhagem Wistar* machos, adultos jovens, apresentando peso em torno de 250-350g. Esses animais foram mantidos em gaiolas comunitárias, com ração e água *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12h e condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e umidade.

2.1 Procedimentos experimentais e formação de grupos.

Os animais foram submetidos à anestesia dissociativa com injeção intraperitoneal de solução de 0,10 mL/100g de quetamina a 10% (Cetamin*, Rhobifarma Ind. Farmacêutica Ltda.) associado a 0,25 mL/100 mg do relaxante muscular xilazina (Anasedan*, AgribRANDS Purina do Brasil Ltda.). A região femoral foi aberta cirurgicamente, a superfície anterior do fêmur do animal exposta e foi realizada uma perfuração até a cavidade medular. Foi empregada broca de aço esférica número 04 acoplada em motor elétrico de baixa rotação (1.500 rpm) e irrigada com soro fisiológico, a 0,9% (Fig. 1). Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos com seis animais cada, conforme descrito na Tabela 1. Os grupos foram nomeados relacionando o tipo do material de preenchimento do defeito ósseo e a sua associação ou não ao laser de baixa potência. Os animais dos grupos controles foram submetidos ao mesmo nível de estresse que os dos grupo glicêmicos e lasertratados.

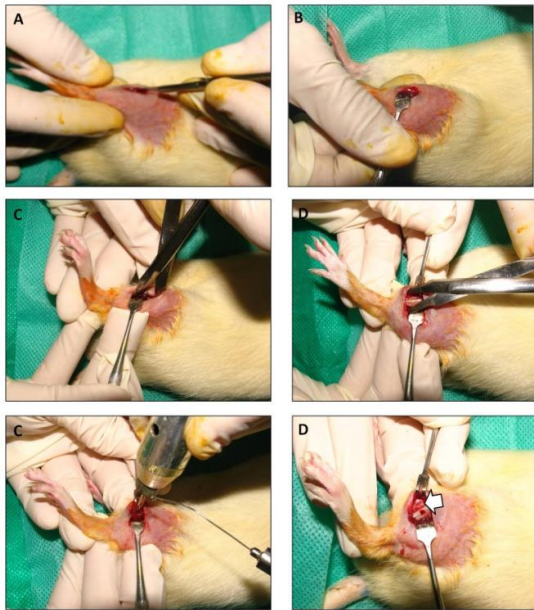


Fig. 1 – Procedimentos experimentais de realização do defeito ósseo. (a) Diérese dos tecidos moles. (b) Exposição da musculatura. (c) e (d) Exposição da superfície óssea femoral. (e) Realização do defeito ósseo. (f) Defeito ósseo realizado.

Tabela 1 - Descrição dos grupos experimentais de acordo com o protocolo de irradiação com laser de baixa potência aplicada.

Grupos (n=18)	Estado Glicêmico	Laserterapia (densidade de energia)
CTR	Normoglicêmico	0 j/cm ²
DBT	Hiperglicêmico (diabético)	0 j/cm ²
CTRL	Normoglicêmico	17,5 j/cm ²
DBLT	Hiperglicêmico (diabético)	17,5 j/cm ²

2.2 Procedimentos de indução de diabetes.

A indução do diabetes foi realizada através de uma injeção intraperitoneal de Aloxana monohidratada (Sigma Chemical Co. St. Luis, Mo, EUA) em estado pós prandial. Foi utilizada a dose de 150mg/kg de massa corporal, dissolvida em citrato 0,01M, PH 4,5. Após 12 h, foi administrada uma solução de glicose a 10% para prevenir quadros de hipoglicemia. Decorridas 72 h, foram obtidas amostras sanguíneas coletadas da veia caudal dos animais para análise e caracterização do quadro hiperglicêmico. A glicemia foi mensurada pro meio do método enzimático da glicose oxidase, utilizando o Kit Accu-Chek Advantage (Boehringer, Alemanha). Este procedimento foi repetido a cada 7 dias, durante 30 dias. Animais cujos níveis séricos de glicose foram superiores a 200 mg/dL foram incluídos nos grupos de ratos hiperglicêmicos (Lima et al., 2014). Animais cujos níveis de glicose flutuaram abaixo desse valor, em qualquer etapa de monitoramento glicêmico de 30 dias, foram excluídos do estudo.

2.3 Procedimentos de Laserterapia.

A irradiação a laser foi realizada utilizando um laser diodo semiconductor GaAlAs – 780 nm (Twin Laser, MMOptics, São Paulo, Brasil), previamente calibrado. Os animais forma submetidos à irradiação transcutânea por contato perpendicular ao defeito ósseo em um único ponto, a cada 48 h durante sete dias, sendo a primeira irradiação realizada imediatamente os procedimentos de síntese. Os parâmetros de irradiação estão dispostos na Tabela 2, perfazendo um total e 4 sessões.

2.4 Determinação dos níveis séricos de fosfatase alcalina.

Para coleta das amostras sanguíneas, os animais foram previamente submetidos a 12 horas de jejum, sendo 1 mL de sangue de cada animal, previamente anestesiado com

quetamina e xilazina i.p. (1,5:1,0), coletado por punção cardíaca, com os animais anestesiados por uma mistura de aplicada via i.p. O sangue foi coletado em tubos secos para avaliação dos parâmetros bioquímicos. Após a coagulação, os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 3500 rpm (rotações por minuto) para a separação do soro. E os níveis séricos de fosfatase alcalina foram mensurados por meio de analisador automatizado ABBOTT, modelo, ARCHITECT C 8000.

Tabela 2 - Descrição dos parâmetros de irradiação com laser de baixa potência aplicados aos grupos CTRL e DBTL.

Parâmetros de Irradiação	Protocolo de laserterapia de baixa potencia
Emissão	Contínuo - CW
Comprimento de Onda	780 nm
Meio Ativo	GaAlAs
Potência	70 mW
Área local	0,04 cm ²
Densidade de Potência	1,75 W/cm ²
Densidade de Energia por sessão	17,5 J/cm ²
Tempo de Irradiação por sessão	10 s
Tempo total	40 s
Energia Total por sessão	0,7 J

2.5 Procedimentos histológicos.

Os animais foram sacrificados em 7, 18 e 30 dias pós-cirúrgicos em câmara de CO₂. Posteriormente, as amostras femurais foram removidas seccionando as articulações do joelho e quadril, dissecadas e fixadas em formol a 10% durante 48 h. Após esse período, estas foram submetidas a descalcificação em ácido nítrico a 5%, e então desidratadas, diafanizadas e incluídas em blocos de parafina. Foram, então, obtidas 15 secções histológicas cortes transversais de 5 µm de espessura, seriadas que foram coradas em hematoxilina-eosina (HE).

2.6 Análises histomorfométrica da neoformação óssea.

Em cada secção histológica foram fotomicrografados quatro campos (em magnificação de 400×), selecionados de modo a perfazer toda a área de neoformação óssea. As imagens fotomicrografadas foram digitalizadas por meio de software de captura de imagens Olympus 2000®, acoplado a microscópio trinocular óptico Olympus CX31, projetadas em monitor Samsung® de 14" e submetidas ao processamento em software específico para morfologia (Image Tool®), para determinação do valor total da área ocupada pelo tecido ósseo depositado na região correspondente à ferida óssea artificialmente induzida. Para tanto, o programa foi calibrado para que os valores obtidos em pixels fossem convertidos em milímetros quadrados (mm²) de osso neoformado.

2.7 Análises estatísticas.

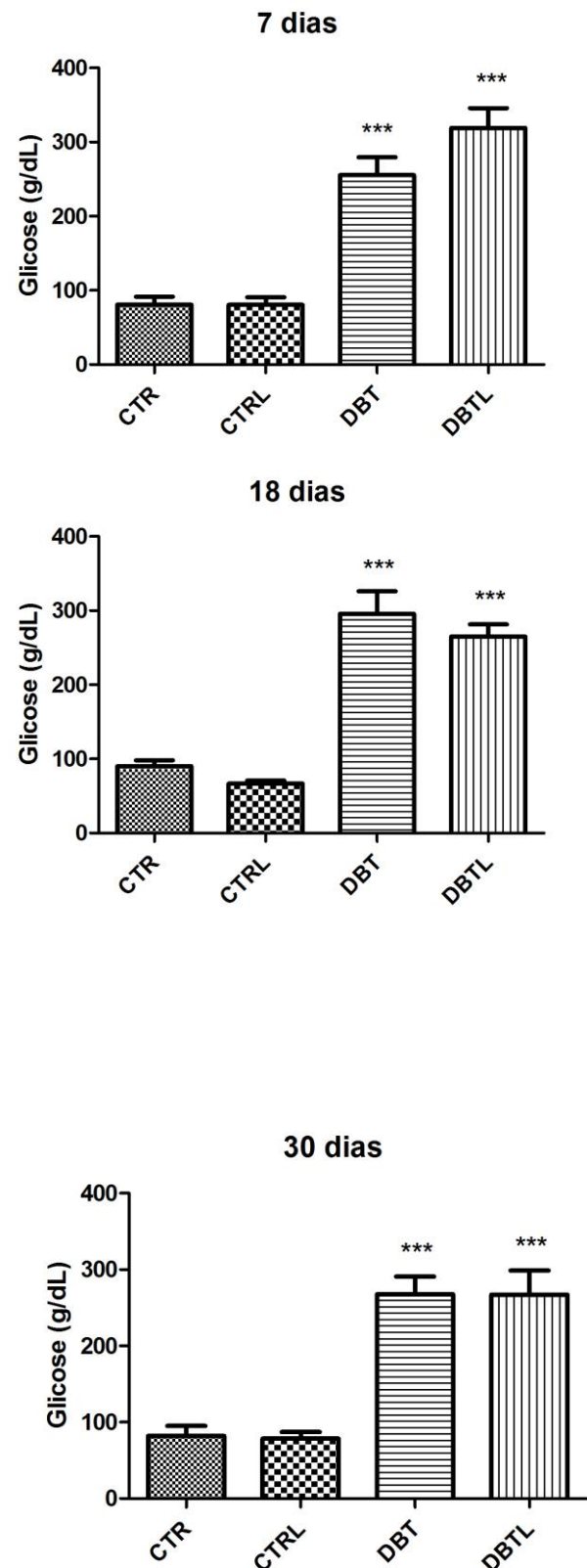
As médias dos valores da dosagem de fosfatase alcalina sérica e as médias da área de neoformação óssea foram comparadas entre os grupos por meio do teste de análise de variância (ANOVA), seguida de extensão post-hoc de Tukey, utilizando o software GraphPad Prisma,

versão 5.0. Valores de p menores que 0,05 foram considerados indicativos de diferenças estatisticamente significativas.

3. Resultados

3.1 Avaliação dos níveis séricos de glicose e fosfatase alcalina.

Como demonstra a Figura. 2, o tratamento prévio dos animais com aloxan apresentou um aumento significativo nos níveis de glicose comparando os grupos controles com o passar do experimento ($p < 0.001$). No entanto, os níveis de glicose não foram influenciados pelo TLBP, sendo em animais com a glicemia normal ou em hiperglicêmicos ($p > 0.05$). Por outro lado, os níveis de FOS-A aumentaram consideravelmente nos grupos tratados com o Laser de Baixa Potência nos períodos de 7 e 18 dias ($p < 0.001$), independentemente das condições glicêmicas dos animais.



3.2 Análises histológicas da formação óssea.

7 dias: Em ambos os grupos normoglicêmicos a formação de osso jovem delgado, não lamelar e trabeculado foi observada nas cavidades, contudo eles parecem ser mais espessos no grupo CTRL comparado ao CTR. No grupo DBT, a presença de discreta formação óssea foi inconspícua, as cavidades continuaram preenchidas por tecido de granulação hiper celularizado frouxamente organizado. O grupo diabético tratado com o LBP (DBTL) mostrou uma evidente deposição de tecido mineralizado em relação ao grupo DBT, porém ainda tinha uma morfologia espaçada e irregular.

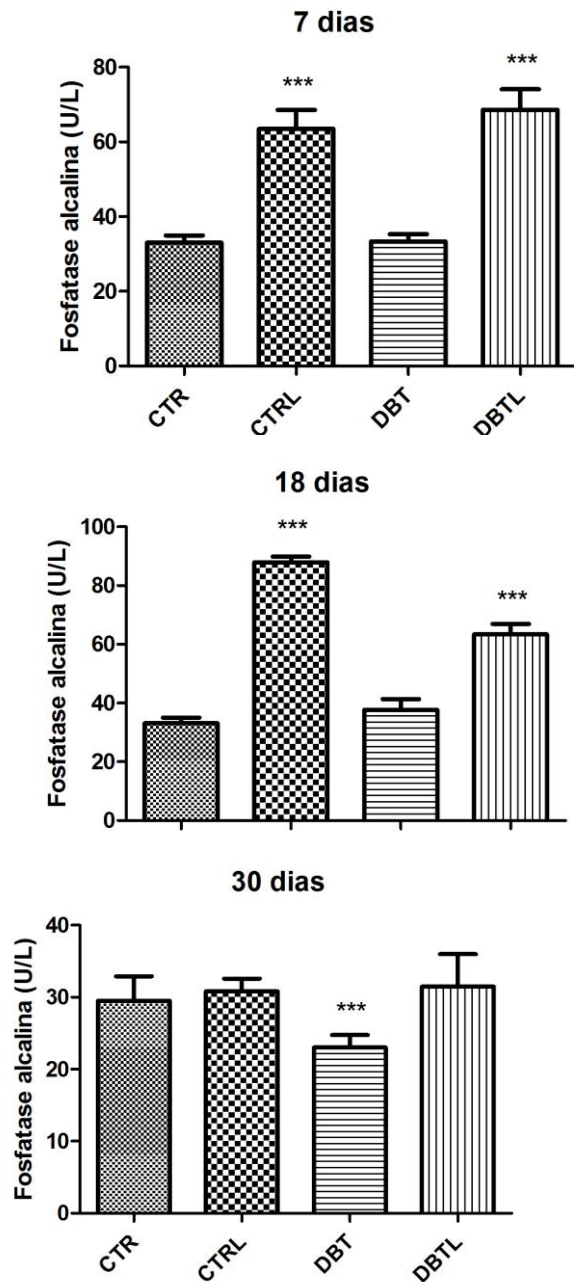
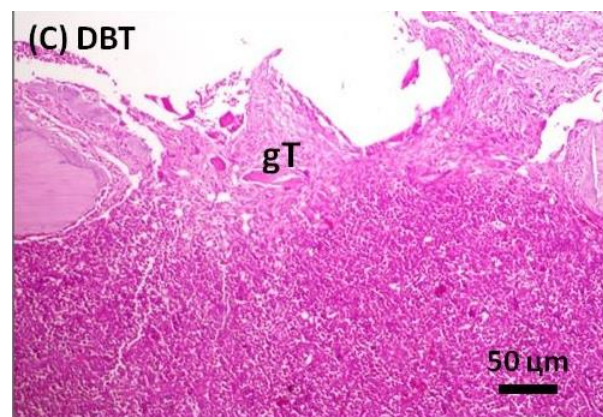
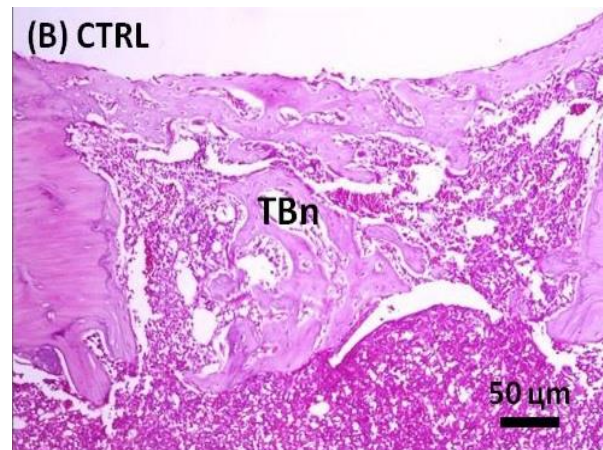
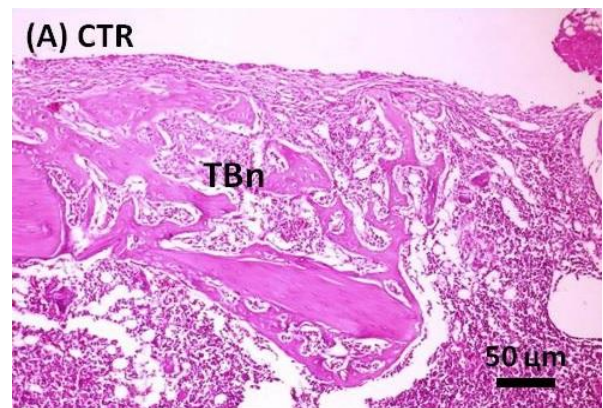
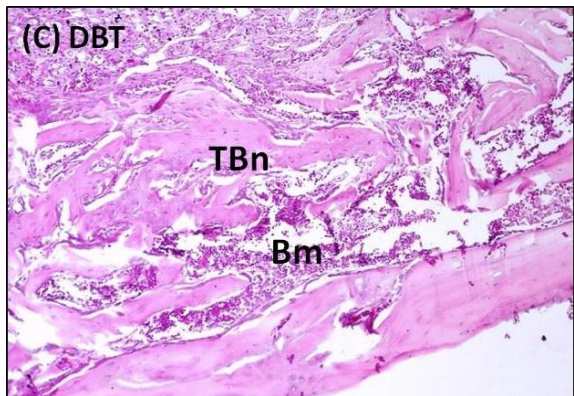
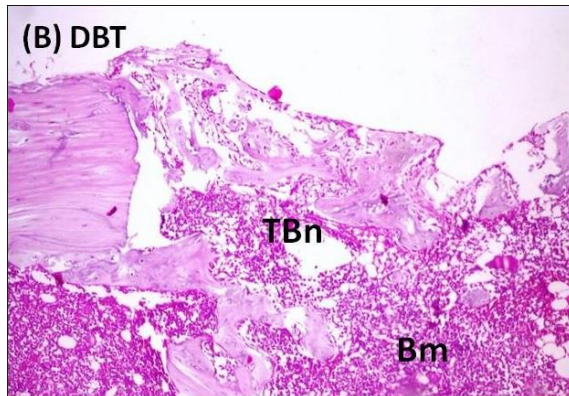
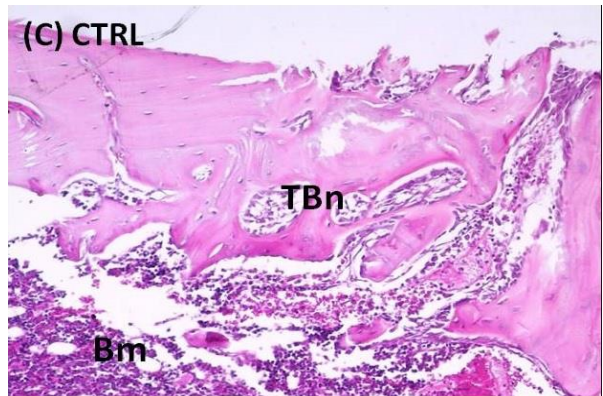
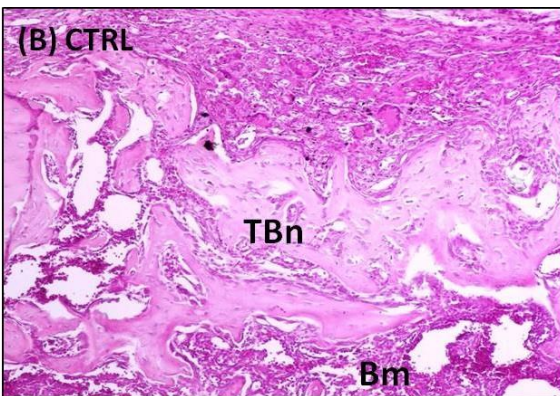
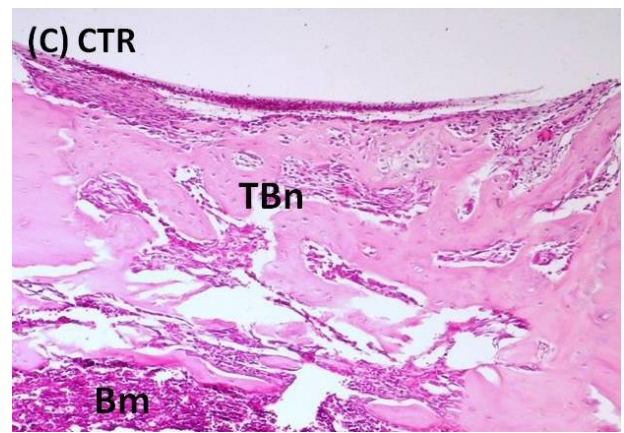
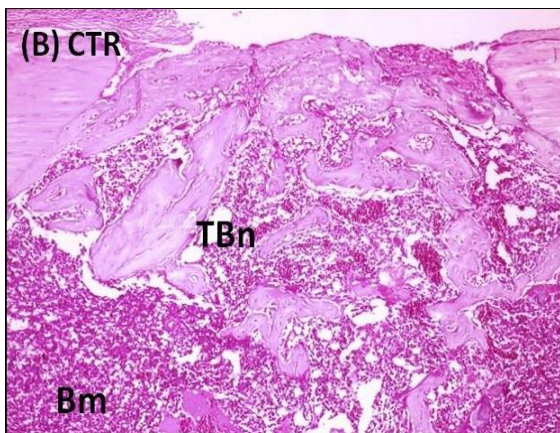
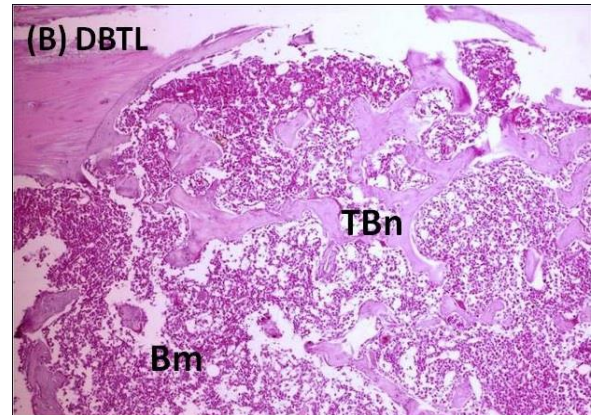
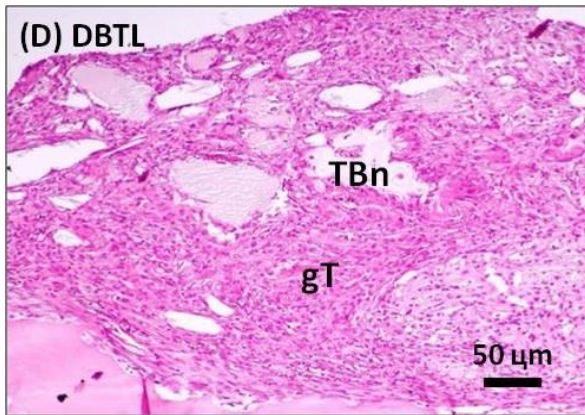


Figure 2. Avaliação dos níveis séricos de glicose e fosfatase alcalina (FOS-A) nos grupos experimentais no período do experimento *** Significativamente diferente do CRT ($p < 0.001$).





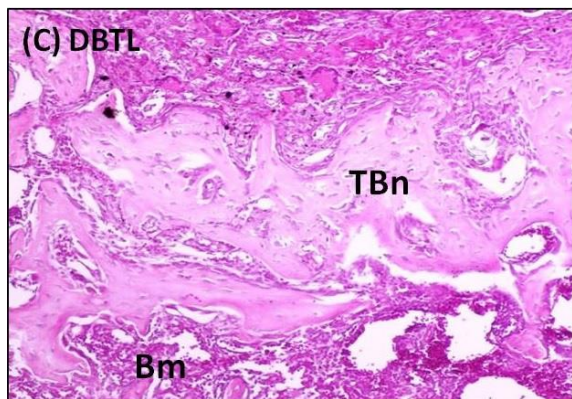


Figura 3.: Cortes histológicos das áreas de reparo ósseo nos grupos experimentais com sete dias. (A) Grupo normoglicêmico controle e (B) Grupo normoglicêmico tratado com LBP apresentando extensa formação de osso jovem irregular e trabecular. Nota-se que a formação óssea é mais espessa no grupo CTRL do que no grupo CTR. (C) Grupo hiperglicêmico, mostra acentuado prejuízo na cicatrização óssea. (D) Grupo hiperglicêmico tratado com LBP com a presença de tecido mineralizado escasso, irregular e não conectado (HE, 200x). TBn – Trabeculado ósseo; gT – Tecido de granulação; Bm – Médula óssea

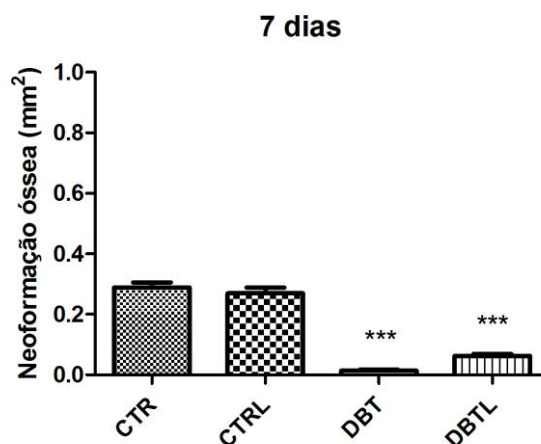
18 dias: A formação de trabéculas ósseas foi observada em todos os grupos, porém a trabécula presente no grupo CTRL estava claramente mais espessa que as restantes. Em ambos os grupo diabéticos tratados e não tratados, a trabécula formada era delgada e irregular deposita nas cavidades. Embora espaços intertrabeculares mais grossos foram vistos no grupo DBTL em comparação com o grupo DBT, os mesmos parecem ser maiores nos grupos CTR e CTRL.

30 dias: As amostras histológicas da regeneração óssea observada em CTR, CTRL e DBTL foram similares, e representadas por uma extensa formação de trabéculas espessas intercaladas por espaços intertrabeculares. Somado a isso, uma substituição do tecido de granulação por

matriz mineralizada em áreas adjacentes as de osso jovem foram encontradas nestes grupos. No grupo DBT, no entanto, a trabeculado formado foi mais delgado e irregular, com grandes espaços intertrabeculares. Adjacente as áreas de reparo, um tecido maduro de granulação residual foi encontrado substituindo a matriz.

3.3 Análise quantitativa da formação óssea.

A área de formação óssea aumentou ao longo do tempo em que o experimento foi realizado nos 4 grupos. Um prejuízo significativo foi observado em ambos os grupos hiperglicêmicos (DBT e DBTL) no que se refere a reparo ósseo após 18 dias de realizado os procedimentos cirúrgicos em comparação com o grupo controle (CTR; $p < 0.001$), porém, DVTL revelou taxas de formação óssea mais altas que o DBT nos dois tempos do experimentos ($p < 0.001$ e $p < 0.05$, respectivamente). Com 30 dias, a área de formação óssea visualizada em DBT foi significativamente menor que CTR ($p < 0.01$), CTRL ($p < 0.01$) e DBTL ($p < 0.01$), mas não foram encontradas diferenças nas comparações entres esses três grupos ($p > 0.05$). Somente em 18 dias, a área de formação óssea no grupo normoglicêmico laser-irradiado (CTRL) pareceu ser maior que CRT ($p < 0.05$).



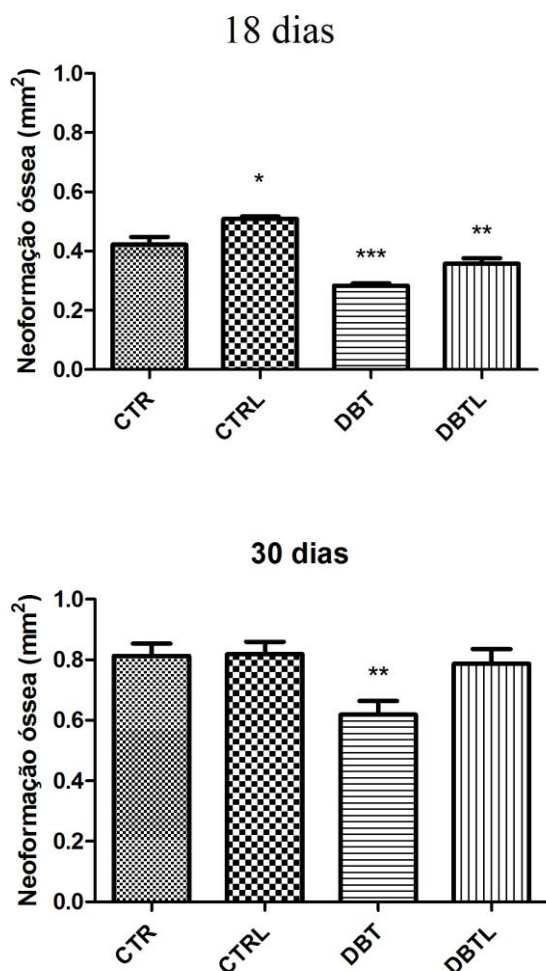


Figura 4. Avaliação das áreas de formação óssea nos grupos experimentais durante o tempo do estudo. Significativamente diferente do grupo CTR (*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

4. Discussão

Neste estudo, o tratamento dos animais com aloxana resultou na indução de diabetes, confirmada pelo aumento significativo dos níveis séricos de glicose. Esses achados são corroborados por estudos prévios, que apontam a administração de aloxana como um excelente modelo para desenvolvimento de diabetes (Lerco et al., 2003). Os efeitos hiperglicemiantes desta

droga estão relacionados à indução de insuficiência insulínica primária do pâncreas secundária a uma lesão irreversível nas células β das ilhotas de Langerhans, provocando uma resposta trifásica nos níveis glicêmicos durante as primeiras horas da administração, seguida do estabelecimento de diabetes permanente nas 24 horas subsequentes. (Dornas et al., 2006).

Foi evidenciado, no presente estudo, que a TLBP promoveu significativa elevação nos níveis séricos da fosfatase alcalina nos dois primeiros períodos experimentais, independente do estado glicêmico dos animais. A fosfatase alcalina é uma enzima amplamente secretada durante a osteogênese, e esta associada à lise de grupamentos fosfato advindos da corrente sanguínea, aumentando a disponibilização local do fosfato inorgânico necessário ao processo de mineralização óssea (Golub e Boesze-Battaglia, 2007). A ausência de diferença significativa entre os grupos em 30 sugere que, neste período, o processo de neoformação/mineralização óssea não seria mais tão expressivo.

Em nossa pesquisa, a indução do estado diabético nos animais determinou um expressivo retardo no processo de neoformação óssea durante todo o período experimental. Estes achados são suportados por estudos recentes previamente descritos na literatura com modelo experimental semelhante ao utilizado no corrente estudo (Oliveira et al., 2012; Molon et al., 2013). Os efeitos deletérios da diabetes sobre o processo de reparo estão associados à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, diminuição da síntese e liberação de óxido nítrico e redução da liberação de fatores de crescimento, bem como das proteínas da via de sinalização da insulina (Lima e Araújo, 2013). Tais relatos indicam que a administração intraperitoneal de aloxana constitui um modelo experimental adequado para o estudo de condições fisiopatológicas em organismos diabéticos.

A neoformação óssea nos ratos diabéticos tratados com TLBP foi significativamente maior que naqueles não irradiados. Os efeitos estimulatórios da TLBP sobre a neoformação óssea estão bem estabelecidos na literatura (Son et al., 2012; Babuccu et al., 2014). Muitos estudos tem buscado elucidar a natureza destes efeitos por meio de técnicas moleculares. Foi relatado que o aumento TLBP-induzido da expressão do gene Runx-2, um fator de transcrição envolvido na diferenciação osteoblástica de células mesenquimais totipotentes (Fernandes et al., 2013; Tim et al., 2013). Adicionalmente, a TLBP promove alterações importantes em mediadores químicos que atuam diretamente no reparo, como redução na expressão da ciclooxigenase tipo 2 (COX-2) nas fases iniciais (reduzindo a intensidade inflamatória) e aumento posterior da expressão do VEGF, um fator de crescimento crucial para a neovascularização típica da formação da reação de granulação (Rodrigues et al., 2013). Também é importante destacar que, além de promover o aumento da atividade metabólica dos osteoblastos, e da diferenciação osteoblástica de células mesenquimais totipotentes, a TLBP também é capaz de induzir proliferação destas células tronco, aumentando a possibilidade de formação de novos osteoblastos na área lesada (Lipovsky et al., 2013).

O aumento da neoformação óssea induzida por TLBP em animais diabéticos não foi expressivo o bastante para determinar índices médios semelhantes ao grupo controle nos dois primeiros tempos experimentais. Contudo, ao final de 30 dias, a área média de osso neoformado nos animais diabéticos irradiados foi similar aos não diabéticos, enquanto que aqueles não irradiados permaneceram com índices deficitários de reparação óssea. Estes achados sugerem que a TLBP promoveu uma aceleração importante na dinâmica do reparo ósseo, ainda que tardia, nos animais hiperglicêmicos.

Os dados obtidos na análise histopatológica sugerem que a TLBP promoveu o aprimoramento na reparação óssea de animais diabéticos em oposição ao quadro de retardo observado nos animais diabéticos não irradiados, expresso por reação fibroblástica medular acentuada e reação de granulação residual. Tais achados apenas corroboram aqueles evidenciados na análise da fosfatase alcalina e da área média de neoformação óssea. De fato, estudos conduzidos por Diniz et al (2011) sugerem que, em razão das deficiências qualitativas nas moléculas de colágeno produzidas em condições diabéticas, ocorre uma hipercolagenização vicariante durante o processo de reparo. Esses relatos poderiam explicar a reação fibrocelular residual vista nos defeitos ósseos de animais diabéticos, indicando que a fase proliferativa do reparo ainda não havia cessado e atestando o retardo osteorreparativo.

5. Conclusão

Com base nos dados obtidos no presente estudo foi possível concluir que, dentro das condições experimentais aqui propostas, a TLBP promoveu aceleração do processo de reparo ósseo em modelo murino. No entanto, estudos posteriores ainda são necessários a fim de determinar as condições e parâmetros biofotônicos adequadas a possíveis extrapolações dos achados obtidos neste estudo para reparo ósseo em humanos.

6. Referências

1. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care** 2009; 32:S62-7.
2. BABUCCU C, KEKLIKOĞLU N, BAYDOĞAN M, KAYNAR A. Cumulative effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound on bone repair in rats. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 2014 Jun;43(6):769-76.

3. BAYAT ET AL.: The Effects of Low-Level Laser Therapy on Bone in Diabetic and Nondiabetic Rats.; **Photomedicine and Laser Surgery** Volume 27, Number 5, 2009
^a Mary Ann Liebert, Inc. Pp. 703–708 DOI: 10.1089=pho.2008.2351.
4. DHALIWAL R, CIBULA D, GHOSH C, WEINSTOCK RS, MOSES AM. Bone quality assessment in type 2 diabetes mellitus. **Osteoporos Int.** 2014 Apr 10.
5. DORNAS WC, NAGEM TJ, DE OLIVEIRA TT, CONTELLI R; Aloxoano e Diabetes. **Revista Brasileira de Toxicologia** 19, n.2 (2006) 81-87.
6. FERNANDES ET AL.: Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes related in the initial stages of bone defects in rats; **Journal of Biomedical Optics** 18(3), 038002 (March 2013).
7. FERNANDES KR, RIBEIRO DA, RODRIGUES NC, TIM C, SANTOS AA, PARIZOTTO NA, DE ARAUJO HS, DRIUSSO P, RENNÓ AC. Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes related in the initial stages of bone defects in rats. **J Biomed Opt.** 2013 Mar; 18(3): 038002.
8. Fernandes KR, Ribeiro DA, Rodrigues NC, Tim C, Santos AA, Parizotto NA, de Araujo HS, Driusso P, Rennó AC. Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes related in the initial stages of bone defects in rats. **J Biomed Opt.** 2013 Mar; 18(3):038002.
9. HAMBILN MR, DEMINOVA TN, Mechanisms of low-level light therapy, **Proc. SPIE.** 6140 (2006) 1–11.
10. KURRA SL, FINK DA2, Siris ES3. Osteoporosis-associated fracture and diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am.** 2014 Mar; 43(1): 233-43.
11. LERCO MM, SPADELLA CT, MACHADO JLM, SCHELLINI AS, PADOVANI CR; Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial; 136 - **Acta Cirúrgica Brasileira** - Vol 18 (2) 2003.
12. LIPOVSKY A1, ORON U, GEDANKEN A, LUBART R. Low-level visible light (LLVL) irradiation promotes proliferation of mesenchymal stem cells. **Lasers Med Sci.** 2013 Jul; 28(4):1113-7.
13. MOLON RS, MORAIS-CAMILO JA, VERZOLA MH, FAEDA RS, PEPATO MT, MARCANTONIO E JR. Impact of diabetes mellitus and metabolic control on bone healing around osseointegrated implants: removal torque and histomorphometric analysis in rats. **Clin Oral Implants Res.** 2013 Jul;24(7):831-7
14. OLIVEIRA PA, OLIVEIRA AM, PABLOS AB, COSTA FO, SILVA GA, SANTOS JN, CURY PR. Influence of hyperbaric oxygen therapy on peri-implant bone healing in rats with alloxan-induced diabetes. **J Clin Periodontol.** 2012 Sep; 39(9): 879-86.
15. PATROCÍNIO-SILVA TLL, DE SOUZA AM, GOULART RL, PEGORARI CF, OLIVEIRA JR, FERNANDES K, MAGRI A, PEREIRA RM, ARAKI DR, NAGAOKA MR, PARIZOTTO NA, RENNÓ AC. The effects of low-level laser irradiation on bone tissue in diabetic rats. **Lasers Med Sci.** 2013 Aug 29.
16. PRINDEZE NJ, MOFFATT LT, SHUPP JW. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. **Exp Biol Med (Maywood).** 2012 Nov; 237(11):1241-8.
17. RODRIGUES NC1, BRUNELLI R, DE ARAÚJO HS, PARIZOTTO NA, RENNO AC. Low-level laser therapy (LLLT) (660nm) alters gene expression during muscle healing in rats. **J Photochem Photobiol B.** 2013 Mar 5; 120:29-35.
18. SARGIS RM, HOWARD SG, NEWBOLD RR, HEINDEL JJ. The Diabetes Epidemic: Environmental Chemical Exposure in

Etiology and Treatment. **San Franc Med.** 2012 Jun; 85(5):18-20.

19. SON J, KIM YB, GE Z, CHOI SH, KIM G. Bone healing effects of diode laser (808 nm) on a rat tibial fracture model. **In Vivo.** 2012 Jul-Aug; 26(4):703-9.
20. TIM CR, PINTO KN, ROSSI BR, FERNANDES K, MATSUMOTO MA, PARIZOTTO NA, RENNÓ AC. Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. **Lasers Med Sci.** 2014 Jan; 29(1):147-56.
21. WANG HL, LÜ YW, LAN L, ZHANG Q, CHEN HL, ZHANG GY, DENG LL, LI JF. Impact of diabetes on the prognosis of hip fracture: a cohort study in the Chinese population. **Chin Med J (Engl).** 2013 Mar; 126(5): 813-8.