

REVISÃO

OS EFEITOS OSTEOGÊNICOS DO ULTRA-SOM E DO LASER TERAPÊUTICO DE BAIXA INTENSIDADE NO PROCESSO DE CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

THE OSTEOGENIC EFFECTS OF THE ULTRA-SOUND AND THE LOW LEVEL LASER THERAPY ON THE BONE CONSOLIDATION: A BIBLIOGRAPHIC REVIEW.

Suellen Maurin Feitosa¹, Renata Luri Tomal Ana Claudia Muniz Renno²

¹Graduandas em Fisioterapia, Universidade Federal de São Paulo - Campus Baixada Santista.

² PhD, Docente, Curso de Fisioterapia, Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de São Paulo- Campus Baixada Santista.



Endereço para correspondência:
Rua Casper Líbero, n.º. 18 ap. 404.
Bairro: José Menino
CEP: 11065-230
Santos – SP

RECEBIDO: 02/07/2007 - REVISADO: 09/09/2007 - ACEITO: 14/09/2007

RESUMO

O laser terapêutico de baixa intensidade (LLLT) e o ultra-som (US) são recursos eletrofísicos que vem demonstrando efeitos positivos na proliferação de células ósseas e na aceleração do processo de consolidação de fraturas ósseas. Dentro deste contexto, este estudo tem como objetivo fazer um levantamento da literatura a respeito dos trabalhos já realizados, investigando os efeitos do laser de baixa intensidade e do ultra-som no metabolismo ósseo e no processo de consolidação de fraturas. Foi realizado um levantamento bibliográfico nas bases de dados Medline e Scielo e foram obtidos estudos publicados entre os anos de 1993 a 2007. Para essa revisão foram considerados tanto estudos que investigavam a ação desses recursos em células ósseas (in vitro), bem como a ação destes no processo de consolidação de fraturas (estudos in vivo). A grande maioria dos trabalhos observou que o LLLT e o US foram eficazes para promover a diminuição do tempo de regeneração da fratura óssea e também capaz de estimular a proliferação de osteoblastos. No entanto, alguns desses trabalhos não observaram nenhum efeito desses recursos no metabolismo ósseo. Embora inúmeros estudos afirmem que a LLLT e o US tem um efeito positivo na consolidação óssea, mais estudos devem ser feitos para uma melhor definição dos parâmetros, visto que há uma discrepância quanto à utilização desses.

Palavras-chave: fratura óssea, laser de baixa intensidade, ultra-som, osteogênese, consolidação óssea.

ABSTRACT

The low level laser therapy (LLLT) and the ultra-sound (US) has been used to stimulate various biologic tissues. Some authors have showed, in experimental and clinical studies, the biostimulatory effects of these electrophysical devices on bone cells, mainly on osteoblasts cells, and on bone fracture consolidation. In this context, this paper aimed to review the studies of literature about the osteogenic effects of LLLT and US on bone cells and on fracture consolidation. It was made a review in the PubMed (Medline) database and it was selected articles that met the inclusion criteria stated below: papers published between 1993 and 2007, including the words "LLLT, US and bone", in the title, abstract, or keywords. It was included studies investigating the effect of the LLLT and US on bone cell cultures and fracture consolidation. The majority of the studies observed that the LLLT and US were efficient to produce an increase in osteoblast proliferation and an acceleration on fracture consolidation. However, some of the studies did not show any effect of these devices on bone metabolism. Moreover, it was observed a wide variety of the parameters of LLLT used in the studies analyzed. Although, a lot of studies state that LLLT contributes to accelerate the consolidation of bone fracture, further studies are necessary to investigate the effects of LLLT and US on bone tissue and to determine the best parameters of treatment.

Key words: bone fractures, LLLT, ultra-sound, osteoblasts, bone consolidation.

INTRODUÇÃO

O reparo ósseo é um processo regenerativo altamente complexo, que inclui a interação de uma série de eventos, como a síntese de genes e a ação de um grande número de células e proteínas, que irão restaurar a integridade do tecido ósseo¹. No entanto, no decorrer deste processo algumas alterações podem ocorrer, o que determina um atraso do processo de consolidação e mesmo na não-união óssea. Essas são comumente encontradas na prática médica, e estão associadas a altos índices de morbidade e mortalidade, bem como a altos custos para os sistemas de saúde¹.

Dentro deste contexto, diversos avanços biológicos e biofísicos têm sido introduzidos com o objetivo de minimizar o retardo de consolidação de fraturas e as possíveis complicações advindas desse processo anormal de regeneração². Dentre os avanços, podem ser citados os efeitos de tratamentos como a aplicação de proteínas ósseas morfogenéticas, materiais bioativos, correntes elétricas, bem como o ultra-som e o laser de baixa intensidade³.

Os fisioterapeutas têm se utilizado amplamente destes métodos físicos para tratamento de lesões do sistema músculo-esquelético. No entanto, por ser de uma tecnologia muito recente, o US e o LLLT necessitam de melhor parametrização das variáveis para se obter os estímulos mais apropriados, pois muitos dos reais efeitos e limitações ainda não estão totalmente claros e há muita controvérsia sobre seu mecanismo de ação sobre os tecidos^{3,4}.

Além disso, muitas pesquisas produzidas não têm validade científica pela baixa confiabilidade dos dados devido a problemas metodológicos^{3,4}. Entretanto, excelentes estudos abrem horizontes para esse campo, que no futuro levarão o indivíduo acometido por uma lesão óssea a um retorno mais rápido às suas funções normais, evitando as conseqüências de uma imobilização prolongada, como a perda de massa muscular, aderências, diminuição de densidade óssea e ângulos articulares, hipersensibilidade cutânea, alterações proprioceptivas e os desconfortos em geral.

Dentro deste contexto, o presente trabalho tem por objetivo apresentar as bases fisiológicas e os mecanismos de ação do US e do LLLT no metabolismo ósseo e os principais trabalhos encontrados na literatura, investigando os efeitos destes recursos na proliferação celular e no processo de consolidação óssea.

Ultra-som (US)

O US é uma forma de onda mecânica de alta frequência que transmite energia através da vibração das partículas no meio no qual se propaga, promovendo micro deformações na região estimulada⁴. O US destaca-se como recurso terapêutico ao promover a aceleração do processo de cicatrização após uma lesão⁵, redução da dor e espasmo muscular⁶ e aumento da síntese de colágeno⁷. Atualmente é um dos recursos fisioterápicos mais utilizados para o tratamento de lesões de tecidos moles^{8,9}.

Após a introdução do conceito de piezoelectricidade do osso, por Fukada e Yasuda, em 1957, alguns estudos começaram a preconizar seu uso para estimular a osteogênese e acelerar o processo de consolidação de fraturas¹⁰. Estes estudos tiveram início na década de 70, com professor Duarte, do Departamento de Engenharia Elétrica, da Universidade de São Paulo, campus de São Carlos. Em um trabalho pioneiro, com animais, esse pesqui-

sador demonstrou que o US foi capaz de acelerar a consolidação em defeitos ósseos induzidos em coelhos¹⁰. A partir dessas evidências, outros autores também demonstraram a eficiência do US na aceleração da consolidação óssea após uma fratura bem como, no aumento da força mecânica do calo ósseo em ratos e coelhos^{11,12}.

Alguns estudos *in vitro* com culturas de células osteoblasticas sugerem que o US é capaz de promover um aumento da proliferação celular¹³, um aumento da atividade de fosfatase alcalina e um aumento do conteúdo de cálcio¹⁴. Além disso, outros estudos observaram também que o US estimula a síntese de genes relacionados à produção de proteínas que participam da diferenciação celular e a mineralização¹⁵. O óxido nítrico e as prostaglandinas, que constituem mediadores fundamentais para indução da formação óssea, também parecem estar aumentados após a estimulação com US¹⁶. Além disso, Yang et al.¹⁷ demonstraram que o US promoveu a reorganização do citoesqueleto de osteoblastos, além de aumentar a síntese de integrinas, que tem um papel fundamental de sinalização na superfície celular e participa da construção da rede de matriz de colágeno. Yang et al.¹⁷ e Gebauer et al.¹⁸ atribuem a formação do calo ósseo ao aumento na síntese de proteínas da matriz extracelular na cartilagem, o que aceleraria a maturação de condrócitos e a formação de osso endocondral. Reher et al.¹⁷ atribuem o estímulo de formação óssea à síntese de colágeno. Leung et al.¹⁹ avaliaram os efeitos do US pulsado em osteoblastos humanos e observaram que este recurso aumentou a proliferação celular, a síntese de fosfatase alcalina e osteocalcina.

Os efeitos do US no processo de consolidação óssea também tem sido amplamente investigados. Takikawa et al.²⁰ investigaram os efeitos deste recurso em um modelo de não união óssea em ratos. Após 6 semanas de tratamento com US (200 milissegundos, 1,5 MHz, 30 mW/cm², 20 minutos diários), foi observado que, 7 das 14 fraturas, apresentaram consolidação. Estes mesmos resultados foram encontrados por Sun²¹ e Galvão et al.²².

Douat²³ estudou o efeito do ultra-som de 1MHz nas frequências de repetição de pulso de 100 Hz e 16 Hz (0,5 W/cm²) no processo de reparo de tibia de ratos após osteotomia. Os autores observaram que os grupos tratados com US apresentaram uma maior densidade de matriz óssea, e maior concentração de fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e vasos sanguíneos. Os resultados mostraram ainda que o UST 100 foi mais eficiente que o UST¹⁶ nesse período de recuperação óssea.

Azuma et al.²⁴ investigaram os efeitos do US (30 mW/cm², 20 min/dia), no processo de consolidação em fraturas em fêmures de ratos. Após 25 dias de tratamento, os autores observaram que a força mecânica do calo ósseo foi superior a do grupo controle. Estes autores sugerem que o US pode modular a resposta inflamatória inicial, estimular a angiogênese, a ossificação endocondral e o remodelamento ósseo, acelerando o processo de consolidação de fraturas.

Erdogan et al.²⁵ investigaram os efeitos do US no processo de regeneração após a osteotomia em mandíbulas de coelhos. Os animais foram tratados diariamente, por 20 min/dia, por 20 dias (1,5 MHz, 200 Hz e 30 mW/cm²). Os autores observaram

que os animais tratados apresentaram um aumento da força do calo ósseo.

Gebauer et al.²⁶ avaliaram os efeitos da influência do ultra-som (30mW/cm² e 1.5MHz) na cicatrização de fratura no fêmur em ratos Wistar com e sem diabetes mellitus. Esses autores observaram que, o tratamento com US, mesmo em ratos diabéticos, foi eficaz para aumentar a força do calo ósseo. Sakurakichi et al.²⁷ também observou resultados positivos do US na maturação óssea em distrações osteogênicas em modelos animais.

Diferentemente dos resultados apresentados acima, Jorge²⁸ não observou nenhum efeito positivo do US nas propriedades mecânicas dos calos ósseos em ratos. Este autor comparou a rigidez e a carga máxima de calo de tíbias de ratos e observou que os animais do grupo tratado não apresentaram diferença significativa quando comparado com o grupo controle.

Em humanos, Jingushi et al.²⁹ analisaram 72 casos de fraturas de difícil consolidação presentes em vários locais, incluindo a clavícula, úmero, rádio, ulna, escápula, fêmur e tíbia. Foi observado que, após o tratamento com US (1.5MHz, 30mW/cm²), 75% dos casos apresentaram consolidação da fratura. Rutten et al.³⁰ trataram com US, 71 pacientes com história de não-união óssea pos-traumática. Eles observaram que 73% dos casos apresentaram consolidação após o tratamento e afirmam que o US é um meio efetivo, seguro e com baixo custo para ser utilizado em fraturas com difícil consolidação.

Gebauer et al.¹⁸ avaliaram os efeitos do US em pacientes com fraturas com histórico de não-união óssea há pelo menos 8 meses. Foi verificado que após 168 dias, em média, de tratamento com US, 85% dos casos havia se consolidado.

Heckman et al.³¹ também observaram que o US pulsado de baixa intensidade (1.5MHz, 30MW/cm², 20 min) foi eficaz para acelerar o tempo de reparação de fraturas em humanos. Foram examinadas 67 fraturas fechadas na tíbia de humanos: 33 fraturas destas foram tratadas com o US e 34 serviram como controle placebo. Foi verificado que o tempo médio de reparação da fratura no grupo tratado foi muito menor quando comparado com o grupo controle, evidenciando o efeito benéfico do US na aceleração do processo de consolidação.

Laser

O laser de baixa intensidade (LLLT) é outro recurso que vem demonstrando efeitos positivos na proliferação de células ósseas e no processo de consolidação de fraturas em animais³². O LLLT tem sido utilizado desde 1960, por seus efeitos terapêuticos no tratamento de uma série de condições patológicas de diversos tecidos, incluindo o tecido nervoso, o tecido muscular, tendões, cartilagem, entre outros³³. Foi observado que o laser promove a reabsorção de exsudatos, a síntese e remodelação de colágeno, aumento do número de fibroblastos, aumento da viabilidade dos enxertos³³.

No tecido ósseo, o LLLT é capaz de produzir um aumento da proliferação de osteoblastos^{34,35}, aumento a síntese de DNA^{36,37,38}, aumento das concentrações de fosfatase alcalina, aumento da velocidade de reorganização da estrutura trabecular e canais haversianos^{39,40,41}.

Em um estudo in vitro, Hamajima et al.⁴² observaram que o laser 830nm promoveu um aumento significativo da expressão dos genes osteoglicina em osteoblastos. Martinasso et al.⁴³, em um estudo investigando os efeitos da irradiação pulsada do laser na proliferação e formação do osso em células humanas osteoblásticas, observaram que o laser estimulou a proliferação celular e aumentou a expressão de osteocalcina e fosfatase alcalina. Ozawa et al.⁴⁴ e Stein et al.³⁷ evidenciaram um aumento significativo na síntese de DNA, no número de células osteoblásticas, bem como um aumento na atividade da fosfatase alcalina e na formação de nódulos calcificados após estimulação com LLLT. Além disso, Yamamoto et al.⁴⁵ verificaram que, após a irradiação com o laser 830 nm, a síntese de mRNA para os genes MCM3, que estão envolvidos com a replicação de DNA nas células eucarióticas, estavam aumentadas em culturas de osteoblastos, o que poderia ser a explicação para o aumento da proliferação celular após a irradiação com laser.

Em estudos com fraturas em modelos animais, o LLLT parece promover uma série de modificações metabólicas e estruturais no local, como por exemplo, o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, a maior formação de tecido de granulação, a estimulação de fibroblastos, a maior deposição de colágeno, o aumento na síntese de ATP e a estimulação de células ósseas⁴⁶. Essas modificações são responsáveis por um aumento da osteogênese bem como, aceleração no processo de reparo ósseo⁴⁷.

De acordo com Baruska et al.³⁸ e Luger et al.³⁴, o laser He-Ne (6,0 mW, 31 J/cm² e 35 mW, 297 J/cm², respectivamente) foi eficaz para acelerar no processo de consolidação óssea em animais. Os mesmos resultados foram encontrados por Pinheiro et al.⁴⁸ utilizando o laser As-Ga-Al (830 nm, contínuo, 40 mW, 57, 6 J/cm²). Ainda, Nissan et al.⁴⁹, avaliaram os efeitos do laser de baixa intensidade (Ga-As) na recuperação tecidual após a indução de um defeito ósseo cirúrgico na mandíbula do rato. Foi usado o laser Ga-As: 904nm, densidades de potência de 4 e 22,4 mW/cm² e densidades de energia de 0,72 e 4,32 J/cm², por 3min diariamente, iniciado imediatamente após a sutura. O estudo mostrou que a irradiação com densidade de energia 0,72 J/cm² aplicada por 2 semanas, teve efeitos benéficos estimulando a mineralização no processo de formação de osso.

Trelles e Mayaio⁴⁰, evidenciaram a aceleração da consolidação óssea em estudo histológico do calo ósseo de fraturas experimentais em tíbias de ratos, tratadas com laser He-Ne (632 nm), 4 mW de potência, com fonte de irradiação mantida a 20 cm de distância, na dose de 2.4 J, tempo de exposição de 10 minutos, em um total de 12 sessões a cada 48 horas, iniciadas no dia zero. Da mesma forma, Takeda⁵⁰ evidenciou um aumento na proliferação de fibroblastos e tecido osteóide trabecular, conseqüentes ao aumento da atividade osteogênica e à aceleração da ossificação, ao irradiar com laser de Ga-As (904 nm, 25 mW/cm², 20 J/cm², 5 minutos, aplicações diárias), alvéolos dentários após extração dentária em ratos, comparados ao grupo controle não irradiado.

Garcia et al.⁵¹ também observaram em estudo histológico, os efeitos positivos do LLLT, na reparação alveolar em molares de ratos após uma fratura, tratada com laser Ga-As (904 nm, 10 W, 2 mW, 3 minutos, 3 J/cm², aplicação única).

Nicolli-Filho e Okamoto⁵² utilizando o modelo experimental de reparação alveolar em molares de ratos, também evidenciaram em estudo histológico uma proliferação de fibroblastos e formação de tecido osteóide trabecular mais proeminentes no grupo irradiado com laser He-Ne (632,8 nm), 0,95 mW, densidade de energia de 1 J/cm², em aplicação única de 6 minutos diretamente sobre a lesão, imediatamente após a cirurgia.

Morrone et al.⁵³ concluíram, através de estudos histomorfométricos, que a LLLT (laser diodo Ga-Al-As, 780 nm, pulsátil, na frequência de 300 Hz, 1 W, 300 J/s) reduziu o tempo de reparo das lesões osteocondrais provocadas no côndilo femoral de coelhos, avaliados nos períodos de 2, 6 e 12 semanas de pós-operatório.

Caffalli et al.⁵⁴ utilizando laser Ga-Al-As (920 nm), 4 J/cm², em um total de 3 aplicações com intervalos de 2 dias, iniciadas a partir do dia zero, no tratamento de lesão osteocondral induzida no côndilo femoral de coelhos, evidenciaram através de estudo histológico, que a LLLT estimulou a formação mais rápida do calo ósseo.

Garavello-Freitas⁵⁵ também observou que o LLLT acelera o processo de consolidação óssea e estimula o crescimento da área trabecular. Em seu estudo, sobre a ação do laser He-Ne no processo de reparação óssea em fraturas tibiais em ratos, utilizando-se 3 doses distintas (3.15, 31.5 e 94.5 J/cm²) por um período de 7 ou 14 dias, foi verificado que o laser foi eficaz em acelerar o processo de consolidação óssea, principalmente na dose de 94,5 J/cm².

Silva Junior et al.⁵⁶ utilizando o laser As-Ga-Al, 830 nm, 40mW no reparo ósseo de fraturas de fêmures de ratos constataram que há relação entre a eficiência e o estágio em que são feitas as aplicações. Eles observaram que o laser foi mais eficaz em estágios iniciais de reparação (7 dias após a lesão) quando comparados com estágios tardios (28 dias após a lesão). Isto sugere que o estímulo à formação óssea decorrente da LLLT atue em estágios proliferativos e precoces da diferenciação de células e precursores, e não em estágios tardios.

Nicolau et al.⁵⁷ avaliaram quantitativamente os efeitos do LLLT na atividade da célula óssea durante o período inflamatório de fechamento da ferida no fêmur do rato. O grupo irradiado foi tratado com laser Ga-Al-As, 660nm, 10 J/cm² sendo expostos a irradiação no 2º, 4º, 6º e 8º dias após a cirurgia. O resultado encontrado foi o aumento da atividade das células ao redor do sítio de fratura. Ocorreu aumento da superfície de osteoclastos no 5º dia após a cirurgia e elevada atividade osteoblástica no 15º dia após a cirurgia. Porém, não houve alterações na arquitetura óssea, possibilitando a conclusão de que o LLLT aumentou a atividade normal da célula, tanto a reabsorção quanto a formação durante o fechamento da lesão.

Contrariamente, em estudo realizado por David et al.⁵⁸ os resultados radiológicos, histológicos e biomecânicos não demonstraram qualquer efeito estimulatório da LLLT sobre o processo de reparação óssea no modelo experimental de osteotomia transversa da tibia em ratas, utilizando os seguintes parâmetros: laser He-Ne (632,8 nm), contínuo, 10 mW de potência, com doses nos valores de 0; 28 e 56 J/cm², num período total de 2, 4 e 6 semanas.

Giordano et al.⁵⁹ também observaram bioquímica e histologicamente os efeitos do laser sobre o processo de consolidação de fraturas fechadas e não imobilizadas de tíbias de ratos. Os animais foram divididos em dois grupos: o primeiro grupo foi irradiado com laser com 6J/cm² de densidade de energia, durante dois minutos, com aplicação do tipo contato, sobre o foco de fratura, a cada dois dias, e o segundo não recebeu intervenção do laser. Os resultados não demonstraram maior estímulo à osteogênese em animais submetidos à terapia com laser. Nas condições estudadas, observou-se que o laser He-Ne não acelera o processo de consolidação óssea em fraturas fechadas e não imobilizadas.

Dickson et al.⁶⁰ investigaram a influência da LLLT no processo de reparação óssea, através de análise quantitativa da densidade mineral óssea (DMO), por meio de densitometria óssea, juntamente com a avaliação histológica qualitativa do calo ósseo, em estudo realizado no modelo experimental de osteotomia femoral transversa. Os parâmetros de tratamento utilizado foram: laser diodo Ga-Al-As (830 nm), contínuo, 70 mW de potência, densidade de energia de 4 J/cm², em aplicações a cada 24 horas, iniciadas no dia zero, num total de 7 sessões. Na análise no grupo irradiado, houve uma estimulação da atividade osteoclástica e fagocitária, no entanto, os valores da densidade mineral óssea foram maiores no grupo controle até a quarta semana pós cirurgia, tornando-se estatisticamente similares entre os grupos experimentais ao final de 5 semanas. Como explicação para estes resultados, os autores sugerem que a extensão maior de osso morto presente no grupo controle, combinada a uma formação variável de tecido osteóide, acusaram um valor temporariamente mais elevado da DMO no mesmo.

Num estudo realizado em 2006, Galvão et al.²² compararam as consequências do LLLT e do ultra-som pulsado de baixa intensidade na reparação óssea. Animais fraturados foram tratados com LLLT (Ga-Al-As laser, 780 nm, 30 Mw, 112.5J/cm²) e outros com US (1.5 MHz, 30 mW/cm²). Ambos agentes físicos promoveram mudanças na reparação óssea, mas em diferentes fases da recuperação. O US aumentou a reparação óssea promovendo a reabsorção óssea na área fraturada, enquanto o LLLT acelerou esse processo através da formação óssea e mostrou estatisticamente maior resistência máxima quando comparado aos grupos controle e US.

CONCLUSÃO

Há na literatura muitas evidências científicas que demonstram os efeitos positivos do laser de baixa intensidade e do ultra-som no metabolismo ósseo, o que promove um aumento da proliferação de osteoblastos, aumentando a neoformação óssea e acelerando o processo de consolidação de fraturas. No entanto, percebe-se que há uma variação muito grande dos protocolos de tratamento utilizados, demonstrando que não há um consenso em relação aos parâmetros mais eficazes. Esse fato também leva a uma dificuldade em comparar os efeitos terapêuticos destes recursos.

Apesar das comprovadas evidências, mais estudos precisam ser realizados para a elucidação dos mecanismos

moleculares de ação destes dois recursos na osteogênese, bem como, a definição de uma melhor parametrização do uso desses recursos, levando ao desenvolvimento de meios de tratamento seguros e cada vez mais eficazes para diminuir o tempo de consolidação óssea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sena K, Leven RM, Mazhar K, Sumner DR, Viridi AS. Early gene response to low-intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells. *Ultrasound MED Bio* 2005; 31:703-708.
2. Hadjiargyrou M, McLeod K, Ryaby JP, Rubin C. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. *Clinical orthopedics and related research* 1998; 355: 216-229.
3. Brighton CT, McCluskey WP. Response of cultured bone cells to a capacitively coupled electric field: inhibition of camp response to parathyroid hormone. *Journal of orthopaedic research* 1988; 6: 567-571.
4. Ter Haar G. Basic physics on therapeutic ultrasound. *Physiotherapy* 1987; 73:110-113.
5. Shomoto K, Takatori K, Morishita S, Nagino K, Yamamoto W, Shimohira T, et al. Effects of ultrasound therapy on calcificated tendonitis of the shoulder. *J Jpn Phys Ther Assoc* 2002; 5:7-11.
6. Lyon R, Liu XC, Meier J. The effects of therapeutic vs. high-intensity ultrasound on the rabbit growth plate. *J Orthop Res* 2003; 21: 865-871.
7. Reher P, Elbeshir ELI, Harvey W, Meghji S, Harris M. The stimulation of bone formation in vitro by therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1997; 23:1251-1258.
8. Dyson M. Non-thermal cellular effects of ultrasound. *Br J Cancer* 1982; 45: 65-171.
9. Rawool NM, Goldberg BB, Forsberg F, Winder AA, Hume E. Power Doppler assessment of vascular changes during fracture treatment with low-intensity ultrasound. *J Ultrasound Med* 2003; 22:145-153.
10. Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1983; 101:153-159.
11. Takikawa S, Matsui N, Kokubu T, Tsunoda M, Fujioka H, Mizuno K, et al. Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. *J Ultrasound Med* 2001; 20:197-205.
12. Lia JK, Changa WH, Lina JC, Ruaanb RC, Liuc HC, Sunc JS. Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. *Biomaterials* 2003; 24: 2379-2385.
13. Naruse K, Takagaki YM, Azuma Y, Ito M; Oota T; Kameyama K, et al. Anabolic response of mouse-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound. *Biochemical and biophysical research communication* 2000; 268: 216-220.
14. Yang KH, Parvizi J, Wang SJ, Lewallen DG, Kinnick RR, Greenleaf JF, et al. Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. *J Orthop Res* 1996; 5: 802-809.
15. Naruse K, Miyauchi A, Ito T, Yamashita A, Wakita M, Nishisaka T. High-intensity pulsed laser irradiation accelerates bone formation in metaphyseal trabecular bone in rat femur. *J Bone Miner Metab* 2003; 21: 169-78.
16. Reher P, Harris M, Whiteman M, Hai HK, Meghji S. Ultrasound stimulates nitric oxide and prostaglandin E2 production by human osteoblasts. *Bone* 2002; 31:236-41.
17. Yang RS, Lin WL, Chen YZ, Tang CH, Huang TH, Lu BY, et al. Regulation by ultrasound treatment on the integrin expression and differentiation of osteoblasts. *Bone* 2005; 36:276-83.
18. Gebauer D, Correll J. Pulsed low-intensity ultrasound a new salvage procedure for delayed unions and nonunions after leg lengthening in children. *J Pediatr Orthop* 2005; 25: 750-754.
19. Leung KS, Cheung WH, Zhang C, Lee KM, Lo HK. Low intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic activity of human periosteal cells. *Clin Orthop Relat Res.* 2004; 418: 253-9.
20. Takikawa S, Matsui N, Kokubu T, Tsunoda M, Fujioka H, Mizuno K, et al. Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. *J Ultrasound Med.* 2001; 20: 197-205.
21. Sun J. Bone defect healing enhanced by ultrasound stimulation: an in vitro tissue culture model. *J. Biomaterials Mater Research* 1999; 46: 253-261.
22. Galvão APL, Jorgetti V, Silva O. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomedicine Laser Surg.* 2006; 24: 735-740.
23. Douat E. Estudo Comparativo do efeito do ultra-som terapêutico de 1 MHz com frequência de repetição de pulso de 100 Hz e 16 Hz no reparo de osteotomia por escareação em tibia de rato. 2004. 73 p. (Tese de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo).
24. Azuma Y, Ito M, Harada Y, Takagi H, Ohta T, Jinguishi S. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. *J. Bone Miner. Res.* 2001; 16: 671-680.
25. Erdogan O, Esen E, Ustün Y, Kürkçü M, Akova T, Gönülşen G, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on healing of mandibular fractures: an experimental study in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 64:180-8.
26. Gebauer GP, Lin SS, Beam HA, Vieira P, Parsons JR. Low-intensity pulsed ultrasound increases the fracture callus strength in diabetic BB Wistar rats but does not affect cellular proliferation. *Journal Orthop Res* 2002; 20: 587-592.
27. Sakurakichi K, Tsuchiya H, Uehara K, Yamashiro T, Tomita K, Azuma Y. Effects of timing of low-intensity pulsed ultrasound on distraction osteogenesis. *Journal of Orthopaedic Research* 2004; 22: 395-403.
28. Jorge F. Influência da estimulação ultra-sônica de baixa intensidade no reparo de osteotomias de tíbias com fixação flexível. 2004. 61p. (Tese de mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de Federal de São Carlos).
29. Jinguishi S, Mizuno K, Matsushita T, Itoman M. Low-intensity pulsed ultrasound treatment for postoperative delayed union or

- nonunion of long bone fractures. *J Orthop Sci* 2007; 12: 35–41.
30. Rutten S, Nolte PA, Guit GL, Bouman DE, Albers GH. Use of low-intensity pulsed ultrasound for posttraumatic nonunions of the tibia: a review of patients treated in the Netherlands. *J Trauma* 2007, 62: 902-908.
31. Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Kilcoyne RF. Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg Am.* 1994; 76: 26-34.
32. Karu TI. *The science of low-power laser therapy.* Amsterdam: Copyringht; 1998.
33. Basford JR. Low energy laser therapy: controversies and new research findings. *Laser in Surgery and Medicine* 1989; 9: 1-5.
34. Luger EJ, Wollman Y, Rochkind S, Dekel S, Ouaknine GE, Chernihovsky T, et al. The effect of low level laser irradiation on bone cell culture. *Laser Therapy* 1998; 10: 55-58.
35. Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers in Surgery and Medicine* 1985; 5: 31-39.
36. Kim KS, Kim JK, Kim SW, Lee JH, Kim YK, Ko SY, et al. Effects of low level laser irradiation (LLLI) with 904 nm pulsed diode laser on osteoblasts: a controlled trial with the rat osteoblast model. *Laser Therapy* 1996; 8: 223-232.
37. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23: 161-166.
38. Barushka O, Yaakobi T, Oron U. Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. *Bone* 1995; 16: 47-55.
39. Freitas IGF, Baranauskas V, Cruz-Höfling MA. Lasers effects on osteogenesis. *Applied Surface Science* 2000; 154: 548-554.
40. Trelles MA, Mayaio E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Lasers in Surgery and Medicine* 1987; 7: 36-45.
41. Tang XM, Chai BP. Effect of CO2 laser irradiation on experimental fracture healing: a transmission electron microscopic study. *Lasers in Surgery and Medicine* 1986; 6: 346-352.
42. Hamajima S, Hiratsuka K, Kishikawa MK, Tagawa T, Kawahara M, Ohta M, et al. Effect of low-level laser irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. *Laser Med Sci* 2003;18:78-82.
43. Martinasso G, Mozzati M, Pol R, Canuto RA, Muzio G. Effect of superpulsed laser irradiation on bone formation in a human osteoblast-like cell line. *Minerva Stomatol* 2007; 56: 27-30.
44. Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G.; Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone* 1998; 22: 347-354.
45. Yamamoto M, Tamura K, Hiratsuka K, Abiko Y. Stimulation of MCM3 gene expression in osteoblast by low level laser irradiation. *Lasers Med Sci.*2001; 16: 213-217.
46. Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Pai-Silva MD, Cruz-Höfling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J. Photochem. Photobiol. B* 2003; 70: 81–89.
47. Tuner, J.; Hode, L. *Low level laser therapy. Clinical practice and scientific background.* Sweden: Prima Books; 1999.
48. Pinheiro ALB. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. *Laser Therapy* 2001; 13: 73-79.
49. Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A, Binderman I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *Journal of Oral Rehabilitation* 2006; 33: 619–624.
50. Takeda Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction. Experimental study in rats. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 1988; 17: 388-391.
51. Garcia VG, Okamoto T, Fonseca RG, Theodoro LH. Reparação de feridas de extração dental submetidas ao tratamento com raio laser - estudo histológico em ratos. *Revista da FOL – Faculdade de Odontologia de Lins* 1996; 9: 33-42.
52. Niccolli-Filho WD, Okamoto T. Effect of the helium-neon laser on the healing of extraction wounds: a histological study in rats. *Journal of Laser Applications* 1994; 6: 237-240.
53. Morrone G, Guzzardella GA, Torricelli P, Rocca M, Tigani D, Brodano GB, et al. Osteochondral lesion repair of the knee in the rabbit after low-power diode Ga-Al-As laser biostimulation: an experimental study. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2000; 28: 321-336.
54. Caffali FA, Borelli V, Holzchuh MP, Farias EC, Cipola WWV, Neto ACC, et al. Estudo experimental dos efeitos da radiação laser de baixa energia na regeneração osteocartilagínea em joelhos de coelhos. *Rev.Bras Ortop* 1993; 28: 673-678 .
55. Garavello, IF. Ação do laser He-Ne no processo de reparação óssea em fraturas tibiais em ratos. (1995-2001), 2001. 83 p. (Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação- Universidade Estadual de Campinas).
56. Júnior AS, Pinheiro AL, Ramalho L, Nicolau R. Computerized Morphometric Assessment of the effect of Low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. *J. Clin. Laser Surg* 2002; 20:83-87.
57. Nicolau RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MTT, Reis LM, Zângaro RA. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci* 2003; 18: 89–94.
58. Davide, R.; Nissan, M.; Cohen, I.; Soudry, M. Effect of low-power He-Ne laser on fracture healing in rats. *Lasers Surg. Méd.* 19: 458-464, 1996.
59. Giordano IGV, Knackfuss RCG, Giordano M, Mendonça RG, Coutinho F. Influência do laser de baixa energia no processo de consolidação de fratura de tibia: estudo experimental em ratos. *Rev Bras Ortop* 2001, 36: 174-178.
60. Dickson G, Clingen C, Taggart H. Bone mineral density of repairing femoral fractures (osteotomies) after low level laser therapy (LLLT) at 830 nm wavelength. *Proceedings 2nd. Congress World Association for Laser Therapy, Kansas City, Missouri, USA, 1998; 23-24.*