

# Ação do *laser* de baixa potência sobre proteínas morfogenéticas em defeitos ósseos

## *Action of low-level laser on bone morphogenetic protein in bone defects*

Simone Garcia Quezini<sup>1</sup>; Paulo de Tarso Camillo de Carvalho<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fisioterapeuta – Uniderp, Campo Grande, MS - Brasil

<sup>2</sup>Prof. Doutor Departamento de Fisioterapia – UFS. São Cristóvão, SE – Brasil

### Endereço para correspondência

Simone Garcia Quezini  
R. 49, n.º. 307, Nova Campo Grande  
79104-390 – Campo Grande, MS [Brasil]  
simonequezini@gmail.com

### Resumo

**Objetivos:** Este estudo teve como objetivo verificar a ação do *Laser AsGaAl*, 650 nm, sobre as BMPs em defeitos ósseos induzidos em fêmures de ratos. **Método:** Os fêmures de 12 ratos Wistar foram submetidos a defeitos ósseos produzidos por uma broca diamantada, divididos em dois grupos: 1 (BMP e *laser*) e 2 (BMP). Após o defeito, utilizou-se no grupo 1 o *laser AsGaAl*, 650 nm, sobre o defeito, por 21 dias consecutivos. Compararam-se as neoformações ósseas no grupo BMP+LLLT, ( $p < 0,0001$ ), entre o período de 7 a 21 dias, e no BMP ( $p < 0,0001$ ). **Resultados:** A comparação intergrupos mostrou ganho significativo no 7º dia, para o grupo BMP+LLLT ( $p < 0,0001$ ), para o 14º dia, com diferença de BMP+LLLT ( $p < 0,0001$ ) e para o 21º dia, ( $p < 0,0001$ ) em relação ao grupo BMP. **Conclusão:** Concluímos que a associação da aplicação do *laser* de baixa potência e a substância osteoindutora alcançou melhor resultado do que apenas o uso das BMPs.

**Descritores:** Biomateriais; Proteínas morfogenéticas ósseas; Remodelação Óssea.

### Abstract

**Objectives:** This study aimed to verify the action of GaAlAs laser, 650 nm, on BMPs in bone defects induced in femurs of rats. **Methods:** The femurs of 12 rats were subjected to bone defects produced by a diamond drill, divided into two groups: 1 (BMP and laser) and 2 (BMP). After the defect was used in group 1 the GaAlAs laser, 650 nm, about the defect, for 21 consecutive days. Compared the new bone formation in BMP + LLLT group ( $p < 0.0001$ ) between the period of 7 to 21 days, and BMP ( $p < 0.0001$ ). **Results:** The intergroup comparison showed significant gain on day 7, with the group BMP + LLLT ( $p < 0.0001$ ), for the 14th day, a difference of BMP + LLLT ( $p < 0.0001$ ) and day 21 ( $p < 0.0001$ ) compared to the BMP group. **Conclusions:** The association of the application of low power laser and bone-inducing substance achieved a better result than just the use of BMPs.

**Key words:** Biocompatible materials; Bone Healing; Bone morphogenetic proteins.

## Introdução

A recuperação de defeitos ósseos de grandes dimensões provocados por fraturas, infecções, etc., tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores, principalmente quando se trata dos fatores que retardam ou dificultam a consolidação óssea. Somente nos Estados Unidos, estima-se que ocorram 5,6 milhões de fraturas por ano, dessas, de 5% a 10% evoluem para retardo de consolidação ou pseudoartrose<sup>1,2</sup>.

O trauma ósseo ocorre com frequência em jovens e, conseqüentemente, os custos médicos e socioeconômicos de fraturas são altos. O risco vitalício de fratura é de um para cada dois homens, e um, para cada três mulheres. Esses números são equivalentes ao de doença coronariana. Os dados demonstram que esse tipo de trauma é um significativo problema de saúde pública<sup>3,4</sup>.

O reparo de grandes defeitos ósseos continua sendo um desafio para os profissionais da traumatologia, os métodos tradicionais de tratamento utilizam o enxerto ósseo autógeno pela sua propriedade osteogênica e facilidade de incorporação em relação aos enxertos homogêneos e xenógenos<sup>5,6</sup>.

Estudos realizados na área da biologia molecular levaram à descoberta de novos biomateriais e a elucidação dos componentes reparadores, principalmente a ação dos fatores de crescimento, e sua capacidade de promover a diferenciação de células mesenquimais osteoprogenitoras imaturas em células osteocompetentes, tem contribuído muito para consolidação dos resultados das técnicas empregadas em reparação óssea<sup>7</sup>.

As proteínas morfogenéticas ósseas (Bone Morphogenetic Protein – BMP) são fatores diferenciadores, cuja principal função é induzir a transformação das células mesenquimais indiferenciadas em condroblastos e osteoblastos de forma dose-dependente<sup>8</sup>.

As indicações para o uso de BMPs estão associadas principalmente a grandes perdas ósseas, decorrentes de anomalias de desenvol-

vimento, bem como defeitos ósseos causados por algum trauma na estrutura óssea, doenças infecciosas e inflamatórias. Os potenciais usos clínicos dessas proteínas incluem a substituição de enxertos ósseos no tratamento de uniões retardadas, não uniões, má-consolidações, artrodeses e procedimentos ortopédicos reconstrutivos, entre outros<sup>9,10</sup>.

Para que as BMPs cumpram seu papel osteoindutor, é necessária sua associação com carreadores. Diversos tipos de carreadores têm sido utilizados, entre eles: colágeno e polímeros, em sítios heterotópicos e ortotópicos. Entre as funções do carreador estão o atraso na rápida dispersão da proteína morfogenética óssea do local do implante e proteção contra lises não específicas<sup>9</sup>.

Tão importante quanto a obtenção de proteínas morfogenéticas é a atuação dos carreadores. Os carreadores proveem três diferentes e importantes funções:

- 1- atuam como um espaçador tridimensional, fornecendo a estrutura necessária para a formação do novo tecido;
- 2 - mantêm o nível de concentração crítico das BMPs no local, permitindo que o processo de calcificação ocorra com segurança;
- 3- contêm a BMP no lugar desejado, impedindo que haja calcificação em locais indesejados, ou seja, favorece a bioatividade dessa proteína<sup>11</sup>.

Os carreadores analisados para o uso com BMPs são variados: colágeno, cerâmicas, polímeros naturais e sintéticos, coral, hidroxiapatita, alginatos e muitos outros<sup>11</sup>.

É absolutamente crítico o tempo de reabsorção do carreador: se for demasiado curto, não mantém a concentração adequada de BMP durante o tempo necessário, e sendo muito longo pode impedir fisicamente o desenvolvimento do novo tecido calcificado, levando à formação óssea não orientada e pseudoartrose<sup>12</sup>.

Para avaliar a potencialidade da proteína morfogenética óssea em acelerar a consolidação

de fraturas, Bouxsein et al.<sup>13</sup> realizaram fraturas bilaterais na porção medial da ulna de coelhos. Os animais foram divididos em grupos que receberam esponja de colágeno absorvível contendo BMP e de colágeno absorvível com tampão, e um não tratado. No período de duas semanas, a área do calo mineralizado, foi avaliada por tomografia computadorizada quantitativa, e os autores concluíram que os animais com essa proteína apresentaram uma velocidade de cicatrização óssea 33% maior.

De Biase e Capanna<sup>14</sup>, em sua pesquisa, relatam que há outras áreas interessantes para aplicações futuras de fatores de crescimento a fim de aumentar a regeneração óssea, tais como aceleração do reparo de fratura – particularmente em pacientes que estão propensos a alto risco de não união – e tratamento de não união estabelecido por meio de preparações de BMPs injetáveis; fusão espinal e tratamento de pseudoartrose espinal; fixação de próteses óssea. É possível também realizar uma revisão sobre os conceitos de artroplastia com o uso do BMPs como preenchimento. Fatores de crescimento não são apenas estratégias disponíveis para aumentar a restauração óssea no futuro, servem para pesquisa de células mesenquimais e terapia gênica, que já chegou à fase pré-clínica.

Paralelamente com a evolução em biotecnologia e ciências médicas, a terapia com os lasers de baixa potência (TLBP), tornou-se popular, e atualmente, surgindo como uma alternativa complementar não invasiva na aceleração do reparo ósseo. É frequentemente citada e comprovada por trabalhos de vários pesquisadores, como Lirani et al.<sup>2</sup>, que demonstraram em seu estudo, como a laserterapia é capaz de acelerar o processo de reparo ósseo, em fraturas de tíbia de ratos.

Nicolau et al.<sup>16</sup> avaliaram a atividade de células ósseas, após aplicação do laser de arsenieto de gálio e alumínio em defeitos ósseos em fêmur de ratos. As irradiações foram realizadas perpendicularmente à superfície epitelial, correspondente ao sítio cirúrgico, com doses de 1 J/cm<sup>2</sup>, após 2, 4, 6 e 8 dias de pós-operatório. Os

resultados demonstraram aumento da atividade de osteócitos e de osteoclastos; no entanto, não mostraram mudanças na estrutura óssea com a aplicação do laser.

Diante do exposto, objetivou-se neste estudo verificar a ação do laser de baixa potência sobre BMPs no reparo de defeitos ósseos, produzidos em fêmures de ratos.

## Material e método

### Animais de experimentação

A amostra foi composta de 12 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, com peso corporal variando de 300 a 350 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal – Uniderp, Campo Grande (MS).

Os animais foram confinados em gaiolas de 0,15m<sup>2</sup>, três por gaiola, e mantidos em fotoperíodo de 12 horas e em condições de luminosidade e temperatura controladas, ração sólida e água ad libitum, ficando sob observação por um período de dois dias, antes da sua utilização no experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais, conforme o procedimento a ser realizado:

Grupo 1: constituído por seis animais submetidos a defeito ósseo e tratados com BMP associada a irradiação do laser 650nm;

Grupo 2: formado por seis animais submetidos a defeito ósseo e tratados com BMP sem laser.

Ambos os grupos foram ainda subdivididos, em relação ao período a que foram submetidos a eutanásia, e os subgrupos resultantes, denominados: Grupo 1: G1A7 ; G1A14; G1A21 e Grupo 2: G2B7; G2B14; G2B21.

## Processo cirúrgico

Os animais foram anestesiados com mistura de ketamina a 5% e xilasina a 2%, na proporção 1:2, em doses de 0,10-0,15 ml/100 g de peso corporal, por via intraperitoneal

Após o procedimento anestésico, foi realizada a tricotomia da face lateral da coxa direita, em extensão suficiente para permitir a visualização da região a ser abordada. O animal foi, então, posicionado em decúbito ventral, prendendo-se as patas dianteiras e traseiras esquerda em abdução e o local da incisão preparado com antiseptia (álcool-iodado).

Realizou-se uma incisão de acesso ao fêmur direito com um bisturi. Após a incisão da fáscia lata, realizou-se a diáfise femoral e na face crânio-lateral a  $\pm$  50 mm da epífise proximal foi realizado um defeito ósseo com brocas esféricas diamantadas nº 1016 (KG Sorensen), acopladas em um contra-ângulo odontológico (Kawo – Kawo do Brasil), acionado por motor de implante (Easy Implant – Easy Equipamentos) a 4.000 RPM, sob irrigação constante com soro fisiológico, perfurando a cortical do osso até o acesso do canal medular.

Nos grupos 1 e 2, o defeito foi preenchido com uma pasta formada de substância osteoindutora Gen – Tech, composta pela aglutinação de matriz orgânica de osso, osso bovino inorgânico, proteínas morfogenéticas do osso, hidroxapatita e colágeno, na proporção de 10:1, homogeneizado com solução salina 9%.

Para que as BMPs não sofressem dispersão, os defeitos foram recobertos com membrana biológica constituída de cortical óssea bovina descalcificada Gen Derm. Após esses procedimentos, realizou-se a síntese dos planos com fio de nylon poliamida 0,30, agulhado.

## Aplicação do Laser Diodo Arsenieto de Gálio e Alumínio (AsGaAl)

Foi utilizado o Laser AsGaAl da marca Laserline®, modelo Inova, com potência de 50 mW, área do feixe de 0,1cm<sup>2</sup>, e comprimento de onda de  $\lambda$  650 nm. A forma de aplicação se deu pelo método transcutâneo pontual, com dose pré-determinada de 4 joules/cm<sup>2</sup> e tempo de 80 segundos para uma área de 1cm<sup>2</sup>.

A aplicação foi iniciada no primeiro dia de pós-operatório e durante os 21 dias consecutivos sobre a região da lesão no grupo experimental 1.

## Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia por dose excessiva de thiopental sódico 100mg/kg, e as amostras do osso foram retiradas e encaminhadas para a realização de procedimentos histológicos e análise morfométrica nos 7º, 14º e 21º dias de pós-operatório.

## Procedimentos histológicos

Os segmentos destinados à histologia foram fixados em formol a 10%, por 24 horas. Após esse período, descalcificados por EDTA, incluídos em blocos de parafina e submetidos a cortes transversais de 5  $\mu$ m de espessura, preparando-se lâminas com dois cortes cada e, em seguida, foi utilizado HE para a coloração.

## Análise morfométrica

Para analisar essas lâminas, foi realizada avaliação morfométrica das células ósseas por digitalização de imagens e análise computacional por meio de um programa específico de processamento e análise de imagens o Image Pró Plus, versão 4.5.

Foram analisados cinco quadrantes por lâmina, sendo quatro periféricos e um central, realizando-se a contagem da área total de osso neoformado.

## Análise estatística

Os dados foram tabulados de acordo com a distribuição dos valores em cada grupo, relacionados a cada período. Para a análise estatística, utilizou-se o Software GrafPhad 4.0. O gráfico foi plotado no Software Microsoft Excel 2003. A forma de distribuição dos valores foi testada para cada grupo. A hipótese de nulidade se referiu à distribuição normal dos valores, e a hipótese alternativa, a não distribuição normal. O nível de decisão foi estabelecido em  $p < 0,05$ . Para tal análise, usou-se o teste de Shapiro-Wilk. O teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns foi utilizado para a comparação intra e intergrupos em cada período. O valor de decisão foi  $p < 0,05$ .

## Resultados

Os resultados mostraram que a maioria das ordenações de valores não apresentou distribuição normal, quando comparados com o teste não paramétrico. Em primeira análise, compararam-se os valores obtidos em cada período de 7, 14 e 21 dias entre os grupos BMP+ LLLT e BMP. A segunda comparação averiguou a hipótese de alteração significativa em cada um dos grupos, de acordo com a evolução do período mencionado.

Foram comparadas as neoformações ósseas no grupo BMP+LLLT, com diferença (ganho) de 38,9 ( $p < 0,0001$ ), entre o período de 7 a 21 dias com o grupo BMP, que obteve ganho de 29,8 ( $p < 0,0001$ ).

A comparação intergrupos mostrou ganho significativo para o 7º dia, com diferença de 12,2 maior para o grupo BMP+LLLT ( $p < 0,0001$ ); para o 14º dia, com diferença de 21,8 a mais para o grupo BMP+LLLT ( $p < 0,0001$ ), e para o 21º dia, com 21,3 a mais ( $p < 0,0001$ ) em relação ao grupo BMP.

Os resultados da análise morfométrica estão apresentados na Tabela 1.

## Discussão

Optou-se por utilizar ratos, nesta pesquisa, pela sua facilidade de trabalho em labora-

**Tabela 1:** Resultado das médias da análise morfométrica indicando a evolução da neoformação óssea ao longo dos 21 dias

Período	BMP + LLLT	BMP	p valor
7	67,2±2,5	55,0±5,7	$p < 0,0001$
14	97,9±2,7	76,1±4,0	$p < 0,0001$
21	106,1±6,5	84,8±3,8	$p < 0,0001$
p valor	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	

Dados estão expressos como média e desvio padrão (DP), exceto quando não foi possível.

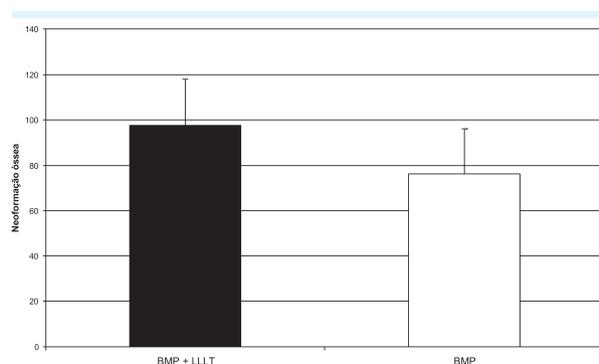
tório e, também, em razão de recentes estudos, tanto com foco nas proteínas morfogenéticas do osso quanto na terapia com laser de baixa potência ou ambos associados, estarem citando e observando resultados favoráveis com esse modelo animal.

Mussano et al.<sup>17</sup> realizaram uma revisão sistemática dos trabalhos controlados e randomizados, para avaliar a eficácia clínica do uso das BMPs na regeneração óssea. Os 17 estudos selecionados em humanos foram divididos pelo segmento ósseo tratado (10 em vértebras lombares, 1 em vértebra cervical, 3 em tíbia, 1 em fíbula e 2 em processo alveolar), tamanho da série (7 estudos com 30 pacientes, 6 envolveram entre 30 e 100 pacientes e 4 analisaram mais de 100 pacientes) e tipo de BMP. Os autores concluíram que essas divisões mostraram claramente a falta de uniformidade entre os estudos publicados, o que evidencia a dificuldade em sumarizar os resultados. Nota-se, então, a necessidade de mais pesquisas na área.

Neste trabalho, utilizou-se o protocolo já testado e usado por outro estudo semelhante a este experimento<sup>18</sup>.

A análise estatística dos grupos descartou a hipótese de nulidade, demonstrando a existência de diferença significativa entre os grupos com  $p < 0,001$  (valor de decisão  $p < 0,05$ ). O grupo tratado com associação da BMP com o laser de baixa potência, obteve maiores valores de neoformação óssea, quando comparado com o outro só BMP. Esses valores maiores foram comprovados nos três dias de pós-operatório (7º, 14º e 21º).

Aos sete dias desta pesquisa (Figura 1), observou-se que as lâminas dos animais com defeito ósseo tratados com BMP + Laser apresentaram tecido conjuntivo fibroso com neoformação de vasos na área do defeito, bem como áreas de tecido ósseo neoformado e grande concentração de osteócitos com evidentes canalículos. Esses resultados corroboram estudo realizado por outros autores<sup>16</sup> que investigaram a atividade das células ósseas, após a utilização da terapia do laser de baixa potência (AsGaAl), no local do ferimento ósseo. Os animais foram avaliados no 2º, 4º, 6º e 8º dias, após a cirurgia e se verificou que a atividade e o volume do osso eram mais elevados no grupo irradiado.

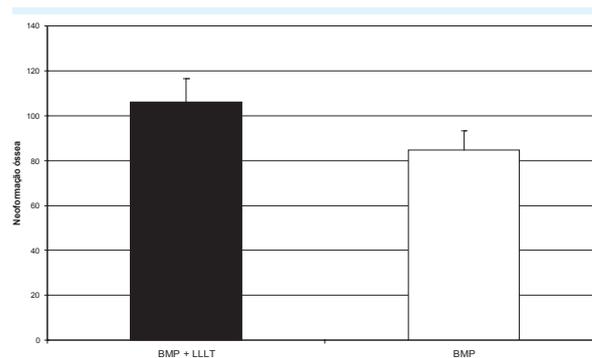


**Figura 1:** Comparação dos valores de neoformação óssea intergrupos, durante 7 dias. Valores expressos em média e desvio-padrão. Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. \*\*  $p < 0,001$  em comparação ao grupo não tratado com Laser (BMP)

No grupo tratado somente com BMP, observou-se tecido conjuntivo fibroso com neoformação de vasos e algumas escassas áreas de tecido ósseo neoformado. Ciani et al.<sup>19</sup>, utilizando um modelo animal diferente do aqui analisado, avaliaram o uso de um pool de proteína osteoindutora de origem bovina na regeneração de defeitos ósseos segmentares empregando coelhos. Foi observado no grupo controle ponte óssea unindo as extremidades ósseas seccionadas em quatro animais; entretanto, o osso neoformado apresentava baixa radiopacidade e ocupava em torno de 80% da falha. Já nos membros tratados aos 60 dias de pós-operatório havia nítido limi-

te do defeito, com pequeno crescimento ósseo na borda proximal apenas em dois coelhos, representando a osteoindução causada pela BMP, mesmo com modelos animais diferentes.

Aos quatorze dias deste estudo (Figura 2), o grupo tratado com BMP + Laser apresentava trabéculas ósseas neoformadas, exibindo numerosos osteoblastos, alinhados em sua periferia, e intensa presença de neoformação de vasos. Esses resultados reforçam as conclusões de Pretel<sup>20</sup> que observou, no 15º dia, após a cirurgia que o leito do defeito ósseo já estava totalmente preenchido pelo biomaterial, com a presença de muitas células, vasos sanguíneos e osteoblastos, presença de tecido ósseo neoformado e ausência de inflamação.



**Figura 2:** Comparação dos valores de neoformação óssea intergrupos, durante 14 dias. Valores expressos em média e desvio-padrão. Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. \*\*  $p < 0,001$  em comparação ao grupo não tratado com Laser (BMP)

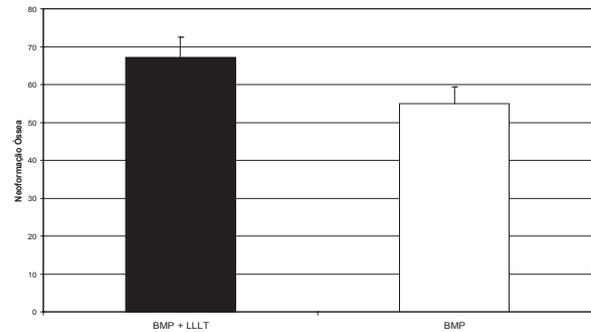
Os resultados obtidos por este experimento no grupo tratado somente com BMP, mostraram a presença de tecido de preenchimento e de trabéculas ósseas neoformadas, numerosos osteoblastos não alinhados e presença de células gigantes, o que demonstra que o tratamento com BMP induz a consolidação do tecido ósseo lesado, mesmo em curto período. Resultados semelhantes foram apresentados em estudos com BMP<sup>21</sup>, que investigaram 42 sujeitos submetidos à cirurgia lombar anterior. Todos os pacientes que receberam a BMP mostraram evidência radiográfica de osteoindução; 10 do grupo controle

apresentaram formação óssea fora da região lesada, o que não aconteceu no tratado com BMP. Em mais uma pesquisa os autores<sup>22</sup> concluíram que oito, dos 48 defeitos tratados com matriz óssea em ratos, mostraram total cicatrização, em 16 semanas, já no grupo sem implantes nenhum dos defeitos apresentaram esse resultado.

O que confirma outros estudos em que afirmam que tanto a aplicação da BMP isolada como associada ao laser de baixa potência produz aceleração da neoformação e da neovascularização de acordo com os autores<sup>18, 20, 23, 24, 25</sup> entre outros.

Aos vinte e um dias (Figura 3), o grupo tratado com BMP + Laser deste estudo mostrou a presença de trabéculas ósseas densas com aspecto de osso lamelar e fragmentos do biomaterial envoltos por tecido ósseo neoformado e se observou reconstituição do espaço medular. Resultado que demonstra a eficiência do laser sobre a BMP acentuando sua ação osteoindutora, além do biomaterial já estar sendo absorvido pelo organismo, provando a eficiência do tratamento. Tal eficiência já foi também citada<sup>23</sup> em um trabalho com 24 ratos em que se observou a presença de grandes quantidades de fibras de colágeno no grupo irradiado. Esse resultado pode representar um efeito adiantado da terapia com laser de baixa potência (LLLT) no reparo ósseo, pois outros estudos também demonstraram aumento da produção do colágeno depois da aplicação do laser. Como o colágeno é um componente importante da matriz extracelular do osso e as quantidades aumentadas, como vistas neste estudo, podem indicar um efeito positivo da terapia com LLLT na cicatrização óssea.

Os resultados observados no grupo tratado com BMP sem aplicação do laser de baixa potência só reforçam que ele acelera a atuação da proteína morfogenética óssea, pois o processo de recuperação da fratura, neste grupo, encontra-se menos evoluído do que o grupo BMP + Laser, mostrando a presença de osteoblastos e osteócitos alinhados tanto na periferia quanto dentro da trabécula, respectivamente, observando canal medular mal definido de pequena



**Figura 3:** Comparação dos valores de neoformação óssea intergrupos, durante 21 dias. Valores expressos em média e desvio-padrão. Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. \*\*  $p < 0,001$  em comparação ao grupo não tratado com Laser (BMP)

dimensão. Khadra et al.<sup>26</sup>, utilizando somente laser de baixa potência, no 28º dia, concluíram que os animais do grupo experimental apresentavam significativamente mais cálcio, fósforo e proteína do que os do controle. Outros pesquisadores<sup>27</sup>, estudando a BMP isolada concluiu que somente no 30º dia de pós-operatório ocorreu maior porcentagem de restabelecimento cortical na fratura tratada com biomaterial. O que demonstra que o laser de baixa potência também possui outras finalidades benéficas para o tratamento ósseo, principalmente associado a outros fatores facilitadores.

## Conclusão

Ao final deste estudo, concluímos que a associação da aplicação do laser de baixa potência e a substância osteoindutora alcançou melhor resultado do que apenas o uso das BMPs.

## Referências

1. Padct - Edital SNM 02/9404. Apoio a projetos para o desenvolvimento de novos materiais. Pesquisa e desenvolvimento de biomateriais baseado em poliuretanas derivadas de óleo de mamona. São Carlos: Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo. jul.; 1994.

2. Lirani APR, Silva OL. Propriedades mecânicas de fraturas ósseas submetidas à terapia laser de baixa intensidade. *Rev Bras Biomec.* 2004;5:19-24.
3. Gomberg BF, Gruen GS, Smith WR, Spott M. Outcomes in acute orthopaedic trauma: a review of 130,506 patients by age. *Injury.* 1999;30:431-7.
4. Brinker Mr, O'connor DP. The incidence of fractures and dislocations referred for orthopaedic services in a capitated population. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86:290-7.
5. Figueiredo AS. Estudo morfológico comparativo entre implantes de osso bovino desvitalizado, hidroxiapatita porosa de coral, poliuretana de mamona e enxerto ósseo autógeno, em coelhos. [tese de doutorado] – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. São Paulo; 2001.
6. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg.* 2002;84(3):454-65.
7. Kirker-Head CA. Recombinant bone morphogenetic protein: novel substances for enhancing bone healing. *Vet Surg.* 1995;24:408-19.
8. Forell EB, Straw RC. Bone morphogenetic proteins and bone derived growth factors. *Vet Comp OrthopTraumatol.* 1993;6:166-70.
9. Bax BE, Wozney JM, Ashhurst DE. Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. *Calci Tissue Int.* 1999;65:83-9.
10. Santos AA, Miranda CDO, Alves MTS, Faloppa F. O papel da proteína morfogenética óssea na reparação de tecido ósseo. *Acta Ortop Bras.* 2005;13(4):194-5.
11. Saito N, Takaoka K. New Synthetic biodegradable polymers as BMP carriers for bone tissue engineering. *Biomaterial, Surrey.* 2003;24:2287-90.
12. Geiger M, Li RH, Friess W. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Advanced Drug Delivery Reviews, Amsterdam.* 2003;28(55):1613-29.
13. Boussein ML, Turek TJ, Blake CA, D'Augusta D, Li X, Stevens M, Seeherman HJ, Wozney JM. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *J Bone Joint Surg. Am.* 2001;83(8):1219-30.
14. De Biase P, Capanna R. Bone morphogenetic proteins and growth factors: emerging role in regenerative orthopaedic surgery. *J Orthopaed Traumatol.* 2007;8:43-8.
15. Lirani APR. Estudo comparativo dos efeitos do ultrassom e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tíbia de rato. [dissertação de mestrado] – Escola de Engenharia de São Carlos - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos; 2004.
16. Nicolau RA, Jogetti V, Rigau J, Pacheco MTT, Dos Reis LM, Zangaro RA. Effect of low-power gaalas (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci.* 2003;18:89-94.
17. Mussano F, Ciccone G, Ceccarelli M, Baldi I, Bassi F. Bone Morphogenetic proteins and bone defects. *Spine.* 2007;32(7):821-30.
18. Carvalho PTC, Silva IS, Reis FA, Belchior ACG, Facco GG, Guimarães RN, Fernandes GHC, Denadai AS. Effect of 650nm Low-Power Laser on bone morphogenetic protein in bone defects induced in rat femurs. *Acta Cir Bras.* 2006;21(4):63-8.
19. Ciani RB, Rahal SC, Volpi RS, Taga R, Granjeiro JM, Cestari TM, Mamprim MJ. Mistura de proteínas morfogenéticas ósseas, hidroxiapatita, osso inorgânico e colágeno envolta por membrana de pericárdio no preenchimento de defeito ósseo segmentar em coelhos. *Arq Bras Méd Vet Zootec.* 2006;58(1):59-67.
20. Pretel H. Ação de biomateriais e laser de intensidade na reparação tecidual óssea. Estudo histológico em ratos. [dissertação de mestrado em Ciências Odontológicas]. Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Araraquara-SP; 2005.
21. Burkus JK, Dorchak JD, Sanders DL. Radiographic assessment of interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein type 2. *Spine.* 2003;28:372-7.
22. Oakes DA, Lee CC, Lieberman JR. An evaluation of human demineralized bone matrices in a rat femoral defect model. *Clin Orthop Relat Res.* 2003;413:281-90.
23. Pinheiro ALB, Limeira Júnior FA, Gerbi MEM, Ramalho LMP, Marzola C, Ponzi EAC, Soares AO, Carvalho LCB, Lima HCV, Gonçalves TO. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. *J Clin Laser Medicine & Surgery.* 2003;21(6):383-8.

24. Gerbi MEM, Marques AMC, Ramalho LMP, Ponzi EAC, Carvalho CM, Santos RC, Oliveira PC, Nóia M, Pinheiro ALB. Infrared laser light further improves bone healing when associated with bone morphogenic proteins: an in vivo study in a rodent model. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2008;26(1):55-60.
25. Pinheiro ALB, Gerbi MEM, Ponzi EAC, Ramalho LMP, Marques AMC, Carvalho CM, Santos RC, Oliveira PC, Nóia M. Infrared laser light further improves bone healing when associated with bone morphogenic proteins and guided bone regeneration: an in vivo study in a rodent model. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2008;26(2):167-74.
26. Khadra M, Kasem N, Haanaes HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathology*, Jun. 2000;97(6):693-700.
27. Lima AFM, Rahal SC, Volpi RS, Granjeiro JM, Taga R, Cestari TM. Effect of bovine bone morphogenetic proteins on radius fracture healing in rabbits. *Acta Cir Bras*. 2007;22(4):259-63.

