

Estudo histológico e biomecânico dos efeitos do Laser terapêutico de baixa potência, 660nm, em defeito ósseo de tíbias de ratos

Study histological and biomechanical of the effects of low-level Laser therapy, 660nm, on bone defects in tibia of rats

Suellen Maurin Feitosa¹; Kelly Rossetti Fernandes¹; Renata Luri Toma¹; Poliani de Oliveira²; Ana Claudia Muniz Rennó³; Daniel Araki Ribeiro⁴

¹Acadêmicas do curso de Fisioterapia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – Campus Baixada Santista, Santos, SP – Brasil.

²Mestranda em Biotecnologia pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR – São Carlos, SP – Brasil.

³Doutora em Fisioterapia pela Griffith University – Austrália – e pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR – São Carlos, SP – Brasil. Professor Adjunto do Departamento de Biociências da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – Campus da Baixada Santista, Santos, SP – Brasil.

⁴Pós-doutor em Patologia pela Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP – Botucatu, SP – Brasil. Professor Adjunto do Departamento de Biociências da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – Campus Baixada Santista, Santos, SP – Brasil.

Endereço para correspondência:

Suellen Maurin Feitosa
Rua Bento Araújo, nº 149, apto. 141, bloco D, Barro
Branco
02345-900 – São Paulo – SP [Brasil]
suellenfisio01@gmail.com

Resumo

Introdução: Fraturas de difícil consolidação são comumente encontradas e associadas a altos índices de morbidade. O uso do Laser terapêutico de baixa potência tem sido estudado na tentativa de minimizar o tempo de consolidação óssea. **Objetivo:** Analisar os efeitos do Laser terapêutico de baixa potência, $\lambda = 660$ nm, com fluências de $60\text{J}/\text{cm}^2$ e $120\text{J}/\text{cm}^2$, em defeitos ósseos em tíbias de ratos. **Métodos:** Foram utilizados 30 ratos, distribuídos nos grupos: 1) controle, com defeito ósseo e sem tratamento; 2) defeito ósseo, tratado com Laser 660nm, 30mW, fluência de $60\text{J}/\text{cm}^2$; 3) defeito ósseo, tratado com Laser 660nm, 30mW, fluência de $120\text{J}/\text{cm}^2$. Os animais foram sacrificados 14 dias após o defeito ósseo, e as tíbias seguiram para análises histológicas e biomecânicas. **Resultados:** Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais em ambas as análises. **Conclusão:** O Laser 660 nm não acelerou o processo de reparo e não melhorou as propriedades mecânicas do calo ósseo.

Descritores: Ratos, Consolidação da fratura, Terapia a Laser de baixa potência.

Abstract

Introduction: Consolidation of difficult fractures are commonly found and associated with high rates of morbidity. Within this context, the use of low level Laser therapy have been studied in an attempt to minimize the time of bone consolidation. **Objective:** To analyze the effects of low level Laser therapy, $\lambda = 660$ nm, with fluences of $60\text{J}/\text{cm}^2$ and $120\text{J}/\text{cm}^2$, on bone defects in tibia of rats. **Methods:** We used 30 rats, distributed in the following groups: 1) control (with bone defect, without treatment); 2) bone defect, treated with Laser 660nm, 30mW, fluence $60\text{J}/\text{cm}^2$; 3) bone defect, treated with Laser 660nm, 30mW, fluence $120\text{J}/\text{cm}^2$. The animals were sacrificed 14 days after the defect, and the tibia followed for histological and biomechanical analysis. **Results:** There were no statistical difference in histological and biomechanical analysis. **Conclusion:** The Laser 660nm did not accelerate the healing process and did not improve the mechanical properties of bone callus.

Keywords: Rats, Fracture healing, Laser therapy, Low-Level.

Introdução

O osso possui uma capacidade única de se autoreparar¹, porém, o reparo ósseo é um processo regenerativo altamente complexo, que inclui a interação de uma série de eventos biológicos, nos quais podem ocorrer alterações que irão culminar na deficiência da regeneração e, conseqüentemente, no atraso da consolidação e, até mesmo, na não-união óssea. Casos de atraso na consolidação óssea e mesmo de não-união óssea são comumente encontrados na prática médica e estão associados a elevados índices de morbidade e mortalidade, bem como a altos custos para os sistemas de saúde. Estima-se que, nos EUA, das 6,2 milhões de fraturas que ocorrem anualmente, cerca de 10% evoluem para a não consolidação e para a pseudoartrose².

É evidente que a perda de tecido ósseo, decorrente de traumatismos e problemas na consolidação óssea, está associada a uma substancial incapacidade física para os indivíduos acometidos e a altos custos socioeconômicos, constituindo um importante desafio a clínica médica. Com isso, pesquisas que tem como objetivo a investigação de recursos que estimulem a osteogênese e que possam ser empregados no tratamento de fraturas com atraso na consolidação são de extrema importância. Dentro deste contexto, vários recursos terapêuticos têm sido estudados na tentativa de minimizar o tempo de consolidação óssea e de diminuir a chance de possíveis complicações advindas do processo anormal de regeneração³. Mais recentemente, vem se destacando a utilização do Ultra-som de baixa intensidade (US) e do Laser terapêutico de baixa potência (LLLT)⁴.

O LLLT tem sido aplicado, desde 1960, com fins terapêuticos, como um tratamento seguro e efetivo para uma série de condições patológicas nos mais diversos tecidos⁵. Dentre os seus principais efeitos, podemos citar os de caráter antiinflamatório, analgésico e cicatrizante⁶.

Em estudos de fraturas com modelos animais, o LLLT parece promover uma série de modificações metabólicas, celulares e estruturais

no local da fratura, 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 na atividade celular da medula óssea, a estimulação da proliferação e da atividade de osteoblastos e osteoclastos e a elevação da taxa de aposição mineral^{7,8,9}. Essas modificações são responsáveis por um aumento da osteogênese, bem como pela aceleração do processo de reparo ósseo¹⁰.

Os fisioterapeutas têm se utilizado amplamente destes métodos físicos para tratamento de lesões do sistema músculo-esquelético. No entanto, há uma divergência na escolha de parâmetros desses recursos entre os profissionais, devido ao não esclarecimento de parâmetros adequados para a resolução de condições patológicas. Assim, esses recursos 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 controvérsia quanto ao seu mecanismo de ação sobre os tecidos^{4,11}.

Dessa forma, este estudo teve o objetivo de analisar os efeitos do LLLT, 660nm, com fluências de 60J/cm² e 120J/cm², no processo de consolidação óssea em defeitos em tíbias de ratos, por meio da análise das propriedades histológicas e mecânicas do calo ósseo.

Material e método

Animais e modelo experimental de defeito ósseo

A pesquisa foi realizada após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP-CEP (0653/07). Este projeto contou com financiamento do auxílio à pesquisa FAPESP 2007/110500.

Neste trabalho, foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com três meses de idade e peso corporal médio de 250-300 gramas no início do experimento, provenientes do biotério

central da UNIFESP. Os animais foram alimentados com ração comercial e água à vontade, mantidos em regime de luz (10 horas claro e 14 horas escuro) e temperatura controlada a 22 ± 2 C. Foram manipulados 30 ratos, divididos aleatoriamente, após os procedimentos cirúrgicos, nos seguintes grupos, com 10 animais cada:

- Grupo 1 (G1) – Controle com defeito ósseo: os ratos deste grupo foram submetidos ao defeito ósseo e a nenhum tipo de tratamento.
- Grupo 2 (G2) – Grupo com Laser (60J/cm²): os ratos deste grupo foram submetidos ao defeito ósseo e tratados com Laser ($\lambda = 660\text{nm}$), 30mW, com fluência de 60 J/cm².
- Grupo 3 (G3) – Grupo com Laser (120J/cm²): os ratos deste grupo foram submetidos ao defeito ósseo e tratados com Laser ($\lambda = 660\text{nm}$), 30mW, com fluência de 120 J/cm².

As cirurgias foram realizadas de acordo com os princípios éticos de instrumentação animal, sob condições padrão de assepsia e anestesia geral. Para a realização desses defeitos, foi utilizada uma mini furadeira, acionada por um minidrill com rotação de 18.000rpm e com fresa de 2mm de diâmetro, irrigada com soro fisiológico para evitar queimadura do tecido ósseo. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Ketamina e Xilasina (30 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente). Após anestesia, tricotomia e assepsia da área a ser operada, foram realizados os defeitos ósseos em ambas as tíbias, por meio de uma incisão tibial, no terço proximal. O defeito foi realizado a 10mm de distância da articulação do joelho e medido com um paquímetro. Para a realização do defeito ósseo, a mini furadeira foi mantida na posição horizontal e perpendicular em relação ao eixo longitudinal do osso, de modo a penetrar a cortical medial e danificar o canal medular abaixo desta, porém sem atingir a face contralateral. Finalizando, a pele foi suturada com fio de náilon monofilamentar 4-0 e distância de 1 cm entre os pontos, e foi providenciada a limpeza local.

Tratamento

O tratamento foi realizado através de um aparelho modelo portátil de Laser DMC, classe 3B no comprimento de onda de 660 nm, InGaAlP, emissão contínua, potência de saída de 30 mW, densidade de potência de 50 W/cm², diâmetro do feixe de 0,6 mm, divergência de 1.5°, nas fluências de 60 e 120 J/cm².

O laser foi aplicado imediatamente após o procedimento operatório e no segundo, quarto, sexto, oitavo, décimo e décimo segundo dias de pós-operatório, totalizando sete aplicações em catorze dias. Foi utilizado somente um único ponto de aplicação sobre o defeito ósseo, medido com um paquímetro. Nas aplicações, foi empregada a técnica pontual em contato, sendo a caneta do equipamento posicionada perpendicularmente ao tecido.

No décimo quarto dia após o procedimento experimental, os animais foram anestesiados e sacrificados com uma dose letal de cloreto de potássio (KCl), injetado por via intracardíaca. Após a eutanásia, foi realizada a ressecção cirúrgica das duas tíbias de cada animal.

Análise histológica e morfométrica

As tíbias esquerdas dissecadas, de todos os animais, foram fixadas em formalina tampoadas a 10% por 24 horas e submetidas à descalcificação em solução descalcificadora de MORSE (Citrato de Sódio a 20% e Acido Fórmico a 50% em partes iguais) por aproximadamente 15 dias, para posterior processamento histológico. As tíbias foram incluídas, de maneira transversal, em blocos de parafinas, e a confecção das lâminas (cortes semi-seriados de 5 μm de espessura) foi realizada para análise histológica. Cada animal foi representado por duas lâminas histológicas, cada uma com uma série de 3 cortes consecutivos. Todas as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H.E.) e com Tricômio de Masson (T.M.).

Com as lâminas coradas com H.E., foi efetuada a análise qualitativa, através da descrição morfológica dos defeitos, obedecendo aos seguin-

tes requisitos: presença de processo inflamatório e tecido de granulação, presença de osso neoformado, área de necrose e organização tecidual. Esses requisitos foram definidos tendo como base critérios observados em estudos prévios^{12,13,14} e levando-se em consideração as características de organização apresentadas pelas lâminas.

Com a utilização das lâminas coradas com T.M., foi realizada análise morfométrica quantitativa na região do defeito ósseo, tendo sido avaliada e quantificada a presença de osso neoformado, através de imagens obtidas por fotomicrografias. Para a realização da análise morfométrica, foi utilizado um microscópio Nikon Eclipse E 2000, e o programa de análise de imagem Motic Images Plus versão 2.0 para obtenção de fotomicrografias e análise das imagens. Foram selecionados dois campos pré-determinados da região do defeito ósseo de cada lâmina: campo superior e campo inferior. Cada um deles foi fotografado com a objetiva de 10x e teve toda área de neoformação óssea contornada, com o valor expresso em μm^2 .

Os valores da área de osso neoformado de cada campo foram armazenados em planilha eletrônica, e, por fim, o valor da área de osso neoformado dos dois campos de uma mesma lâmina foi somado, revelando o valor total da área de osso neoformado para o animal analisado.

Análise biomecânica

O teste biomecânico (flexão óssea) foi realizado na tíbia direita dos animais de todos os grupos, numa máquina de ensaio universal Instron, modelo 4444, em temperatura ambiente. Para a realização do teste foi utilizada uma célula de carga com capacidade máxima de 1 KN e pré-carga de 5 N. Para aplicação dos ensaios, ambas as extremidades das tíbias foram fixadas na posição horizontal em forma de engaste a blocos de apoio padronizados, mantidos a uma distância de 7,5 mm a partir da área do defeito ósseo – que se encontra voltada para baixo e no centro –, somando-se, ao final, 15 mm de

distância entre os mesmos. A partir desse teste foram obtidas as seguintes variáveis: rigidez à flexão (kgf/mm^2), carga máxima (kgf), resiliência ($\text{kgf}\cdot\text{mm}$) e tenacidade ($\text{kgf}\cdot\text{mm}$).

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente seguindo-se técnicas descritivas, na forma de médias e desvios padrão. Na comparação entre os grupos, foi empregada a análise de variância (ANOVA). Já para as conclusões das análises estatísticas, foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). As análises foram realizadas no programa EXCEL e no software STATISTICA.

Resultados

Todos os grupos analisados apresentaram características histológicas semelhantes: moderada presença de tecido ósseo neoformado; presença leve de tecido de granulação; organização tecidual intermediária, com delimitação de, no mínimo, metade da borda da lesão; leve presença de infiltrado inflamatório e sem área de necrose. Assim, os grupos tratados com o Laser apresentaram características semelhantes ao grupo que sofreu o defeito ósseo, mas não recebeu nenhum tipo de tratamento, evoluindo para intermediário o estágio de organização de todas as amostras, em conformidade com a evolução temporal normal do processo de regeneração.

Foi encontrada média maior de área de osso neoformado no grupo tratado com Laser na fluência 120 J/cm^2 em comparação ao grupo Controle defeito ósseo e ao grupo tratado com Laser na fluência 60 J/cm^2 . Essas diferenças, contudo, não foram estatisticamente significantes. Foi observada ainda média maior de área de osso neoformado no grupo tratado com o Laser na fluência 60 J/cm^2 em comparação ao grupo Controle defeito ósseo, embora essa diferença também não tenha sido estatisticamente significativa (Figura 1).

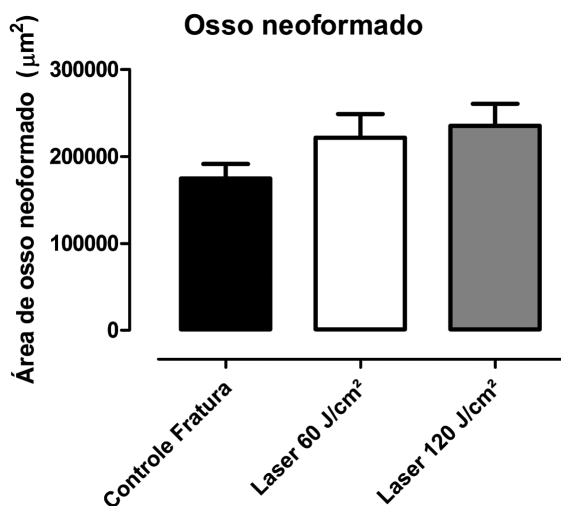


Figura 1: Comparação entre tipos de tratamento para área de osso neoformado (µm²). As diferenças encontradas não foram estatisticamente significantes.

Na análise biomecânica, foi observada média maior para o valor de rigidez à flexão e para o valor de tenacidade no grupo controle defeito ósseo em comparação aos grupos tratados com Laser nas duas fluências, porém, essas diferenças não foram estatisticamente significantes. A Tabela 1 demonstra os dados obtidos para a variável Rigidez à flexão, e a Tabela 2 os adquiridos para a variável Tenacidade.

Foi constatada ainda média maior para o valor de carga máxima e de resiliência no grupo tratado com Laser na fluência 60 J/cm² em comparação aos grupos Controle defeito ósseo e tratado com Laser na fluência de 120 J/cm², ainda que essas diferenças não tenham sido estatisticamente significantes. A Figura 2 demonstra os dados obtidos para a variável Carga máxima, e a Tabela 3 os resultantes para a variável Resiliência.

Discussão

Através da análise histológica qualitativa, foi observado que as amostras de todos os grupos apresentaram organização tecidual em conformidade com a evolução temporal normal do processo de regeneração. Os grupos tratados

Tabela 1: Comparação entre tipos de tratamento para rigidez à flexão (kgf/mm²)

Grupos	Médias	Desvios-padrão
Controle fratura	172,33	54,8388
Laser 60 J/cm²	170,47	32,52421
Laser 120 J/cm²	142,82	29,83212

Foi encontrada média maior para o valor de rigidez à flexão no grupo Controle fratura em comparação aos grupos tratados com Laser, nas duas fluências, porém, essas diferenças não foram estatisticamente significantes.

Tabela 2: Comparação entre tipos de tratamento para tenacidade (kgf.mm²)

Grupos	Médias	Desvios-padrão
Controle fratura	0,05691	0,011282
Laser 60 J/cm²	0,04173	0,012686
Laser 120 J/cm²	0,03224	0,013764

Foi encontrada média maior para o valor de tenacidade no grupo Controle fratura em comparação aos grupos tratados com Laser nas duas fluências, porém, essas diferenças não foram estatisticamente significantes.

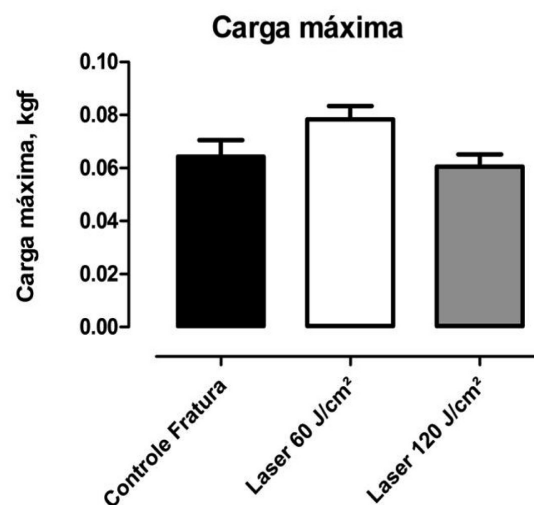


Figura 2: Comparação entre tipos de tratamento para carga máxima (kgf) Foi encontrada média maior para o valor de carga máxima no grupo tratado com Laser na fluência de 60 J/cm², em comparação aos outros dois grupos, porém, essas diferenças não foram estatisticamente significantes.

Tabela 3: Comparação entre tipos de tratamento para resiliência ($\text{kgf}\cdot\text{mm}^2$)

Grupos	Médias	Desvios-padrão
Controle fratura	0,02935	0,012012
Laser 60 J/cm ²	0,03449	0,011244
Laser 120 J/cm ²	0,02023	0,006962

Foi encontrada média maior para o valor de resiliência no grupo tratado com Laser na fluência de 60 J/cm², em comparação aos outros dois grupos, porém, essas diferenças não foram estatisticamente significantes.

com Laser não apresentaram quantidade significativamente maior de osso neoformado nem variáveis biomecânicas significativamente superiores ao grupo Controle. Isso nos permite sugerir que o Laser terapêutico com o comprimento de onda de 660 nm (InGaAlP) não acelerou a resolução do processo de regeneração óssea.

Está bem estabelecido na literatura a existência de uma curva dose-resposta, e a especificidade do tecido tem sido postulada^{15,16}, o que nos levaria a crer que o Laser com um comprimento de onda específico apresentaria efeito estimulatório particularmente mais eficaz no tecido ósseo. Porém, é possível encontrar na literatura uma vasta gama de fluências e comprimentos de onda da radiação laser, utilizada por diversos autores para a recuperação de fraturas ósseas e relatos de resultados conflitantes em relação ao melhor comprimento de onda para efeitos estimulantes no tecido em questão.

Com a finalidade de encontrar o comprimento de onda mais adequado para acelerar o metabolismo e reparo ósseo, diversos autores têm comparado diferentes tipos de Laser, fazendo-se uso, porém, de metodologias variadas. Assim, podemos destacar o estudo realizado por Blaya e colaboradores¹⁷, no qual, utilizaram, em defeito cirúrgico no fêmur de ratos, dois Lasers: o GaAlAs, 830nm, 50 mw, 10J/cm² e o InGaAlP, 685nm, 35mw, 10J/cm². Opostamente ao encontrado no presente estudo, esses pesquisadores observaram que os animais irradiados pelos dois tipos de Laser apresentaram maior

quantidade de osso neoformado do que aqueles do grupo Controle, com maior atividade de remodelação óssea em 15 dias, tendendo a uma estabilização após 21 e 30 dias, sugerindo estimulação da proliferação de células, pelos Lasers, em estágios iniciais de recuperação.

De forma semelhante ao estudo supracitado, Ré Poppi e colaboradores¹⁸ utilizaram, em defeito cirúrgico no fêmur de ratas fêmeas, submetidas à ovariectomia com posterior diminuição da massa óssea, dois Lasers – o InGaAlP (660nm) e o AsGaAl (808 nm) –; ambos com a dose de 133J/cm². Verificaram, após 14 e 21 dias do defeito ósseo, que tanto o comprimento de onda de 660nm quanto o de 808nm inibiram o processo inflamatório e induziram a proliferação de células responsáveis pela remodelação e reparo do tecido do osso.

Da Rosa e colaboradores¹⁹ compararam os mesmos comprimentos de onda de Laser acima mencionados – InGaAlP (660nm, 100mW, 3.57W/cm²) e AsGaAl (808nm, 100mW, 3.57W/cm²) –; ambos com 4J, em modelo animal de osteoartrite com lesão induzida na cartilagem do joelho de ratos. Os autores notaram que a terapia laser estimulou a angiogênese e reduziu a formação de fibrose, tendo ocorrido com maior intensidade no comprimento de onda 808nm.

Em pesquisa realizada anteriormente por nosso grupo²⁰, empregando os mesmos procedimentos cirúrgicos do presente estudo, foi investigada a ação do Laser 830 nm (GaAlAs) e do Ultrassom em defeitos ósseos, tendo sido observado efeito estimulatório desse Laser no metabolismo do osso, com resultados estatisticamente significantes. Nesse sentido, os grupos tratados com o Laser apresentaram um valor significativamente maior de tecido ósseo neoformado quando comparado ao grupo Controle defeito ósseo, mostrando aceleração da sua formação e do processo de regeneração. Com a adoção do mesmo procedimento para obtenção do defeito ósseo, no presente estudo, o Laser InGaAlP (660nm) não apresentou os mesmos resultados positivos no processo de regeneração óssea apresentados pelo Laser GaAlAs utilizado anteriormente.

Além dos estudos comparativos já citados, diversos outros confirmam a estimulação do metabolismo ósseo e contribuição positiva do Laser GaAlAs no processo de regeneração óssea, levando à aceleração do processo de reparo da fratura com o aumento do volume do calo ósseo, especialmente em estágios iniciais^{21,22,23}.

Em relação ao Laser HeNe (632,8 nm), estudos relatam tanto a aceleração do processo de reparação óssea com acúmulo mais rápido de osso novo nas patas submetidas à irradiação^{7,24}, quanto à ausência de efeito estimulatório no processo de reparo²⁵.

Alguns autores têm sugerido que doses no intervalo de 1-5J/cm² podem induzir efeitos estimulantes em tecidos moles e no tecido ósseo²⁶. Já outros recomendam doses mais elevadas²⁷. Em razão dessa controvérsia, ainda não é possível determinar um protocolo ideal de tratamento.

Abdi e colaboradores²⁸ examinaram os efeitos do Laser HeNe (632.8 nm, 10mW) em defeito ósseo parcial criado em tíbias de ratas diabéticas, com doses de 369.4J/cm² e de 66.8J/cm². Após 6 semanas da cirurgia, a irradiação laser de dose 369.4J/cm² resultou em aumento significativo de rigidez à flexão e carga de estresse em relação aos demais grupos, embora o Laser HeNe não tenha acelerado a reparação óssea.

Pode-se observar que ainda há muita divergência na literatura a respeito das doses e comprimentos de onda para estimular adequadamente o metabolismo ósseo. Além disso, as diferentes metodologias adotadas pelos diversos autores fazem com que a comparação entre os estudos se torne difícil. Com isso, torna-se de grande importância pesquisas que, utilizando os mesmos procedimentos cirúrgicos, investiguem e comparem os efeitos de diferentes fluências e comprimentos de onda do Laser, possibilitando a determinação, com maior precisão, de parâmetros mais adequados de tratamento.

Conclusões

Este estudo investigou os efeitos do Laser 660 nm, utilizado em duas fluências, no proces-

so de reparo ósseo após a indução de defeitos em tíbias de ratos. A partir dos resultados deste trabalho, pode ser sugerido que o Laser terapêutico 660 nm não acelerou o processo de reparo ósseo, não contribuiu para maior deposição de tecido ósseo nem promoveu melhora nas propriedades mecânicas do calo ósseo.

Agradecimentos

Os autores agradecem o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2007/110500.

Referências

1. Rosenberg AE. Ossos, articulações e tumores de tecidos moles. In: Robbins SL, Cotran RS. Patologia – bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005;1331–85.
2. Sena K, Leven RM, Mazhar K, Sumner DR, Virdi AS. Early gene response to low intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells. *Ultrasound Med Biol.* 2005;31:703-8.
3. Hadjiargyrou M, McLeod K, Ryaby JP, Rubin C. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;355:216-29.
4. Brighton CT, McCluskey WP. Response of cultured bone cells to a capacitively coupled electric field: inhibition of cAMP response to parathyroid hormone. *J Orthop Res.* 1988;6:567-71.
5. Basford JR. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings. *Lasers Surg Med.* 1989;9:1-5.
6. Karu TI. The science of low-power laser therapy. Amsterdam: Copyringht; 1998.
7. Freitas G, 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;70:81–9.

8. 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.
9. Freitas IG, Baranauskas V, Hofling MAC. The effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibia. *Histol Histopathol.* 2004;19:43-8.
10. Ninomiya T, Miyamoto Y, 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;21:67-73.
11. Ter Haar, G. Basic physics on therapeutic ultrasound. *Physiotherapy.* 1987;73:110-13.
12. Matsumoto MA, De Oliveira A, Junior PDR, Filho HN, Ribeiro DA. Short-term administration of non-selective and selective COX-2 NSAIDS do not interfere with bone repair in rats. *J Mol Histol.* 2008;39:381-7.
13. Akyol UK, Güngörmüş M, Gündođdu C, Erdem H. Histologic evaluation of the effects of Er: YAG Laser on bone ablation. *J Contemp Dent Pract.* 2009;10:65-72.
14. Bos GD, Goldberg VM, Gordon NH, Dollinger BM, Zika JM, Powell AE et al. The long-term fate of fresh and frozen orthotopic bone allografts in genetically defined rats. *Clin Orthop Relat Res.* 1985;197:245-54.
15. Renno AC, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2007;25:275-80.
16. Coombe AR, Ho C, Philips JR, Chapple CC. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthod Res.* 2001;4:3-14.
17. Blaya DS, Guimarães MB, Pozza DH, Weber JBB, Oliveira MG. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. *Journal Contemp Dent Pract.* 2008;9:1-8.
18. Ré Poppi R, da Silva AL, Nacer RS, Vieira RP, de Oliveira LV, Júnior NSF et al. Evaluation of the osteogenic effect of low-level laser therapy (808 nm and 660 nm) on bone defects induced in the femurs of female rats submitted to ovariectomy. *Lasers Med Sci.* 2011;26:515-22.
19. Da Rosa AS, Dos Santos AF, Da Silva MM, Perreira DM, Alves AC, Leal Junior EC et al. Effects of Low-Level Laser Therapy at Wavelengths of 660 nm and 808 nm in Experimental Model of Osteoarthritis. *Photochem Photobiol.* 2011. doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.01032.x. [Epub ahead of print].
20. Fávoro-Pípi E, Feitosa SM, Ribeiro DA, Bossini P, Oliveira P, Parizotto NA et al. Comparative study of the effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on bone defects in tibias of rats. *Lasers Med Sci.* 2010;25:727-32.
21. Liu X, Lyon R, Méier HT, Thometz J, Haworth ST. Effect of lower-level laser therapy on rabbit tibial fracture. *Photomed Laser Surg.* 2007;25:487-94.
22. Pinheiro ALB, Oliveira MG, Martins PPM, Ramalho LMP, de Oliveira MAM, Júnior AN et al. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. *Laser Therapy.* 2001;13:73-9.
23. Pretel H, Lizarelli RFZ, Ramalho LTO. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. *Lasers Surg Med.* 2007;39:788-96.
24. Merli LAS, Dos Santos MTBR, Genovese WJ, Faloppa F. Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair. *Photomed Laser Surg.* 2005;23:212-15.
25. Davide R, Nissan M, Cohen I, Soudry M. Effect of low-power He-Ne laser on fracture healing in rats. *Lasers Surg. Med.* 1996;19:458-64.
26. Dörtbudak O, Hass R, Mailath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11:540-45.
27. Lirani-Galvão AP, Jorgetti V, da Silva OL. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomed Laser Surg.* 2006;24:735-40.
28. Abdi S, Bayat M, Javadieh F, Mohsenifar Z, Rezaie F, Bayat M. The Effects of Helium-Neon Light Therapy on Healing of Partial Osteotomy of the Tibia in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Photomed Laser Surg.* 2009;27:907-12.

