

Evidências da Ação de Agentes Físicos Sobre o Metabolismo do Tecido Ósseo e Seus Potenciais Usos Clínicos

revisão

RESUMO

A ação de agentes físicos como o laser, o ultra-som pulsado e campos elétrico e eletromagnético (todos de baixa intensidade) no tecido ósseo tem sido muito estudada, revelando que estes são capazes de estimular a osteogênese, acelerar a consolidação de fraturas e aumentar a massa óssea. O uso destas modalidades terapêuticas foi primeiramente baseado na descoberta de que o tecido ósseo é um material piezoelétrico, isto é, que quando deformado torna-se capaz de gerar uma polarização e transformar energia mecânica em elétrica, o que ampliou as possibilidades terapêuticas sobre este tecido. O presente trabalho tem por objetivo apresentar as evidências dos efeitos fisiológicos e discorrer sobre os mecanismos de ação destes agentes físicos sobre o metabolismo ósseo, com base em artigos publicados na literatura científica internacional. (Arq Bras Endocrinol Metab 2005; 49/6:891-896)

Descritores: Ultra-som; Laser; Campo elétrico; Osso; Osteogênese

ABSTRACT

Evidences of Physical Agents Action on Bone Metabolism and their Potential Clinical Use.

The action of physical agents such as low level laser therapy, low-intensity pulsed ultrasound and electrical and electromagnetic fields on bone have been often studied, showing that they are able to promote osteogenesis, accelerate fracture consolidation and augment bone mass. The use of these therapeutic modalities was first based on the finding that bone is a piezoelectric material, that means it can generate polarization when deformed, transforming mechanical energy into electric energy, and this has widen therapeutic possibilities to bony tissue. The present work aims to present evidences of physiologic effects and mechanisms of action of these physical agents on bone metabolism, based on articles published in international scientific literature. (Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/6:891-896)

Keywords: Ultrasound; Laser; Electric field; Bone; Osteogenesis

A VIDA AINDA CARREGA UMA MARCA de sua origem no fato de que a atividade elétrica é intrínseca a todos os processos vivos, e todo tecido biológico tem alguma forma de reação elétrica sob tensão mecânica. Células e tecidos respondem a uma vasta gama de energias elétrica e magnética externamente aplicadas e são fracos emissores de energia eletromagnética. Esta interação eletromagnética forma a base para as modalidades eletroterapêuticas utilizadas em fisioterapia (1).

A resposta de reparo ósseo pode ser acentuada através de vários métodos, como pela estimulação bioquímica por hormônios ou fatores de crescimento, pelo enxerto ósseo ou pela estimulação física por modalidades mecânicas e eletromagnéticas (2).

*Ana Paula R. Lirani
Marise Lazaretti-Castro*

*Disciplina de Endocrinologia,
Departamento de Medicina,
Universidade Federal de São
Paulo (EPM/UNIFESP), São
Paulo, SP.*

*Recebido em 01/04/05
Aceito em 04/11/05*

Os fisiatras e fisioterapeutas têm se utilizado amplamente destes métodos físicos para tratamento de lesões do sistema músculo-esquelético. Entretanto, as justificativas para estas aplicações fogem ao clínico que não circula por estas áreas da terapêutica. Pelas características particulares do tecido ósseo, os estímulos mecânicos e eletromagnéticos vêm sendo utilizados e investigados para uma série de alterações patológicas.

O presente trabalho tem por objetivo apresentar ao clínico as bases fisiológicas e os mecanismos de ação dos principais agentes físicos já classicamente utilizados na reabilitação, e ainda aqueles que potencialmente poderão ser utilizados para o tratamento e prevenção de alterações no metabolismo ósseo, com base em artigos publicados na literatura científica internacional.

OSSO E PIEZOELETRICIDADE

A palavra piezoeletricidade literalmente significa "eletricidade de pressão": o prefixo piezo é derivado da palavra grega *piezin*, que significa pressão. Piezoeletricidade é uma polarização elétrica produzida por certos materiais, como algumas moléculas e cristais, quando submetidos a uma deformação mecânica. A estrutura do colágeno ósseo preenche as características de material piezoelétrico, que sob deformação mecânica (como a produzida por tração, compressão ou torção) pode sofrer modificações espaciais, produzindo uma polarização elétrica.

O primeiro relato das propriedades piezoelétricas do osso foi feito por Fukada e Yasuda (3), que, em um estudo com ossos humanos, constataram a piezoeletricidade do osso, pois este produziu, sob ação de uma carga mecânica, uma polarização elétrica, convertendo então a energia mecânica em energia elétrica (efeito piezoelétrico direto). Com esta descoberta, nova onda de trabalhos de pesquisa se iniciou, tendo como tema central o conhecimento e o uso da eletricidade como meio para atingir o osso por processos terapêuticos. Desde então, a eletricidade e a necessidade de reparo ósseo têm sido associados (4).

O efeito inverso também existe, isto é, onde o estresse mecânico pode ser produzido por um campo elétrico. O efeito piezoelétrico inverso é obtido quando se aplica um campo elétrico a um material piezoelétrico, como por exemplo o osso, que se deforma mecanicamente. Esta deformação mecânica produzida atinge a atividade celular por estimular o movimento do fluido intersticial no osso, contri-

buindo para o aumento do transporte de nutrientes e metabólitos (5).

O campo elétrico é diretamente induzido por fontes eletromagnéticas e indiretamente pelo movimento mecânico dos fluidos iônicos e efeito piezoelétrico. Pilla (6) propõe que o campo elétrico no meio mecânico do osso em reparo ou remodelamento pode agir como um estímulo de crescimento. Assim, este autor cita que o primeiro mensageiro afetando a atividade celular é o campo elétrico, sugerindo que o reparo ou remodelamento ósseo possa ser modulado utilizando-se sinais mecânicos (ultra-som e vibração) ou eletromagnéticos (campo eletromagnético pulsado e radiação laser).

ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA E ELETROMAGNÉTICA

A estimulação elétrica para reparo ósseo existe há 3 décadas e é um tratamento aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) americana para retardo de consolidação de fraturas e pseudartrose (2). Em 1984 nos Estados Unidos, Brighton e cols. (7) patentearam um estimulador elétrico não invasivo para prevenir e tratar osteoporose, mas apenas baseado em um estudo com ratos que foram submetidos à neurectomia parcial do nervo ciático.

Pulsed Electromagnetic Fields (PEMF) é um termo restrito a campos eletromagnéticos pulsados que induzem no osso padrões de voltagem de forma de onda similar àquela resultante de deformação mecânica natural (8). PEMF é um agente terapêutico que causa efeito biológico independente de qualquer influência térmica, conforme constatado por Smith e cols. (9), que examinaram os efeitos desta estimulação no diâmetro de arteríolas no músculo cremaster de ratos.

Vários estudos experimentais têm demonstrado que campos eletromagnéticos pulsados podem acelerar o reparo ósseo de fraturas em animais com resultados significativos relativos à atividade osteoblástica em osteotomia de metacarpo de cavalos (10), maior taxa de aposição mineral, menor porosidade no córtex adjacente à linha da osteotomia e melhores propriedades mecânicas em tíbias de cães (11), todos tratados com PEMF em relação aos controles.

Modelos experimentais de retardo de consolidação permitiram a demonstração da eficácia dos PEMFs em ratos (12) e em coelhos (13). Os PEMFs podem causar uma redução significativa na perda de volume ósseo após o tratamento (12), bem como maiores velocidades de reparo em até 4 semanas, aumentando a resistência mecânica óssea (13).

Trabalhos com cultura de células ósseas submetidas à estimulação elétrica produziram, em células de metacarpo de bovinos, uma aceleração da formação mineral óssea (14) e em células de calvária de ratos recém-natos, um aumento da proliferação de osteoblastos (15), quando comparados ao grupo controle. Além disso, Diniz e cols. (16) relataram que os efeitos estimulatórios do PEMF na proliferação e diferenciação de osteoblastos são mediados pelo aumento da síntese de óxido nítrico.

Brighton e cols. (17), em um estudo com campos elétricos e eletromagnéticos, indicaram que os sinais elétricos estimulam a proliferação celular em cultura de células ósseas. Este estudo ainda cita que este aumento na proliferação seja decorrente de um aumento na concentração citoplasmática de cálcio, que ocorre por dois mecanismos: pela abertura dos canais de cálcio voltagem-dependentes, ou pela mobilização do cálcio contido em compartimentos intracelulares para o citoplasma, conforme demonstrado com o uso de inibidores metabólicos específicos.

Em uma investigação clínica, Bassett e cols. (18) analisaram o uso de PEMF no tratamento de retardo de consolidação óssea, juntamente com enxerto ósseo, em pacientes adultos, por uma média de 4 meses, e obtiveram cura em 87% dos casos quando o campo eletromagnético pulsado foi utilizado, quando comparado com os controles sem tratamento.

Evidências de que estímulos mecânicos ou elétricos de relativa baixa amplitude e alta frequência podem influenciar a formação e reabsorção ósseas sugerem que estas modalidades possam ser usadas clinicamente para inibir ou reverter osteopenias (5).

Em um estudo cego e randomizado, 40 pacientes com osteoporose pós-menopausa foram expostas ao campo eletromagnético pulsado (PEMF) (100Hz) (n= 20) ou placebo (n= 20) por 1h/dia, 3 vezes por semana por 3 meses (o campo gerado expunha a coluna vertebral e pelve). No grupo tratado observou-se um aumento significativo na osteocalcina sérica e no peptídeo C-terminal do pró-colágeno tipo I (PICP), que são marcadores da formação óssea. Estes resultados sugerem que PEMFs podem estimular a osteogênese em três meses de tratamento, por aumentar a atividade osteoblástica, em mulheres pós-menopausadas com osteoporose (19).

Pouco se sabe sobre a eficácia do campo elétrico ou eletromagnético quando comparados a outras modalidades terapêuticas como o laser e o ultra-som, também usados para acelerar o processo de reparo ósseo, e em qual fase do reparo ósseo cada um destes agentes físicos é mais eficaz.

ULTRA-SOM

Desde quando Fukada e Yasuda (3) constataram a piezoelectricidade do osso, preconizou-se o uso do ultra-som pulsado de baixa intensidade (LIPUS – *low intensity pulsed ultrasound*) (1,5MHz, ciclo de trabalho 1:4, 30mW/cm²) para acelerar o reparo ósseo com base na semelhança do mesmo com o processo natural de cura de fraturas (20). O processo natural de reparo de fraturas começa quando os restos celulares e coágulos sanguíneos são removidos por macrófagos, e há proliferação de endóstio e perióstio próximo ao local da fratura formando um colar conjuntivo que dá origem a um tecido ósseo imaturo por ossificação endocondral e intramembranosa, formando então o calo ósseo. A descarga de peso e outros estímulos mecânicos determinam a remodelação deste calo ósseo, fazendo com que o tecido ósseo primário seja reabsorvido por osteoclastos e substituído por tecido ósseo lamelar formado por osteoblastos (21). Muitos trabalhos experimentais (20,22-24) e clínicos (4,25-27) têm sido publicados desde então e, atualmente, esta modalidade terapêutica é bem estabelecida, aprovada pela FDA americana e amplamente utilizada.

Segundo Duarte (20), o ultra-som pulsado atinge o tecido ósseo por uma sucessão de impulsos, cada um deles resultando em um sinal elétrico como resposta do osso. Daí por diante, o processo de formação do osso é regulado pelo campo elétrico assim formado e o metabolismo ósseo é estimulado eletricamente. No entanto, o mecanismo de interação do ultra-som com o tecido ósseo ainda é alvo de especulação científica, pois há autores que acreditam que o ultra-som possa exercer uma força mecânica nas células de tecidos moles no local da fratura (22), ou que as ondas de pressão geradas pelo ultra-som possam mediar a atividade biológica diretamente pela deformação mecânica da membrana celular ou, indiretamente, pelo efeito elétrico causado por esta deformação (26).

Existem evidências de que campos elétricos variáveis, com frequência semelhante àquela do ultra-som utilizado em estimulação de formação óssea, produzem aumento na incorporação de cálcio iônico intracelular em culturas de células ósseas, através da ativação de canais de transporte de cálcio do tipo L (sensíveis à variação de tensão elétrica) presentes na membrana plasmática (28). Mais tarde, foi determinado que os canais de transporte de cálcio do tipo L são mecano-sensíveis, ou seja, respondem a estímulos mecânicos (29,30).

Através de histomorfometria óssea demonstrou-se que a estimulação ultra-sônica pode acelerar a regeneração trabecular óssea em fêmures de ratos *in vitro*

(31), em tíbias de ratos *in vivo* com fratura recente (32) e em modelo experimental de não-união de fratura de tíbia de ratos (22).

Chang e cols. (33) investigaram os efeitos do ultra-som pulsado e das microondas no reparo de fraturas em coelhos e obtiveram aumento na neoformação óssea e na resistência à torsão apenas no grupo tratado com ultra-som, o que os permitiu afirmar que não foi o efeito térmico que estimulou a formação óssea.

Em modelo experimental de pseudartrose de tíbia de ratos (22), o ultra-som pulsado de baixa intensidade foi utilizado com sucesso para acelerar o processo de reparo ósseo. Após seis semanas de tratamento diário (20 minutos por dia), 50% das fraturas tratadas foram consolidadas, enquanto nenhuma fratura do grupo controle obteve cura neste intervalo de tempo. O ultra-som também pode melhorar as propriedades mecânicas de ossos fraturados de ratos diabéticos, como demonstrado em um estudo de Gebauer e cols. (23).

Diversos estudos clínicos comprovam a eficácia do ultra-som no reparo ósseo, como o de Heckman e cols. (26), que verificaram seu efeito na cura de fraturas corticais de tíbia de 66 pacientes como um complemento ao tratamento ortopédico convencional. O tratamento se iniciava 7 dias após a fratura e consistia em uma aplicação diária de 20 minutos por 20 semanas ou até que o avaliador considerasse a fratura curada. Ao final do tratamento houve uma diminuição estatisticamente significativa no tempo total de cura clínica e radiológica no grupo tratado. Cento e vinte dias após a fratura, 88% das fraturas do grupo tratado estavam curadas, comparadas com 44% do grupo placebo.

Um estudo clínico multicêntrico, prospectivo, randomizado e duplo-cego com controle placebo foi conduzido por Kristiansen e cols. (27) para testar a eficácia do LIPUS na redução do tempo de cura radiológica de fraturas de rádio que foram tratadas com manipulação e gesso. Trinta pacientes receberam o tratamento que se iniciou sete dias após a fratura, e foi realizado por 20 minutos diários por 10 semanas, e outros trinta pacientes receberam tratamento placebo. O tempo de reparo foi significativamente menor no grupo tratado: 61 ± 3 dias comparado com 98 ± 5 dias no grupo placebo.

É interessante notar que ambos estudos de Kristiansen e cols. (27) e Heckman e cols. (26) obtiveram uma redução no tempo de reparo das fraturas muito semelhante com a utilização da estimulação ultra-sônica. Ambas foram em torno de 40% quando comparados aos grupos não tratados.

Outras investigações clínicas ainda tiveram sucesso com o uso do LIPUS para tratar fraturas complexas de tíbias (34) e fraturas de alto impacto de ossos longos (35).

O mecanismo específico pelo qual o ultra-som pulsado de baixa intensidade acelera o reparo ósseo continua assunto de especulação científica; no entanto, em termos de mecanismos físicos, o ultra-som pode exercer uma força mecânica nas células de tecidos moles no local da fratura (22). Duarte (20) sugeriu a investigação do efeito piezoelétrico com o objetivo de esclarecer se este efeito em ossos *in vivo* é apenas devido ao material como transdutor ou se as células também se comportam como um transdutor num fenômeno cooperativo.

LASER

A aceleração do reparo ósseo causada pela terapia laser de baixa intensidade (LLLT – *Low level Laser Therapy*) é freqüentemente citada na literatura (36-46), principalmente em casos de fraturas experimentais, mas seu uso em humanos ainda não foi aprovado pela FDA.

Silva Júnior e cols. (41) estudaram a ação do LLLT em um modelo de defeito ósseo em fêmur de ratos, e a morfometria computadorizada demonstrou maior mineralização 7 dias após a cirurgia no grupo tratado. A aplicação diária de LLLT por mais de sete dias acelera a neoformação trabecular de acordo com estudo feito com fratura de tíbia de ratos (38). Em outra investigação com ratos, os animais com fratura transversal total no terço médio da tíbia (fixação interna com fio de Kirschner) que receberam LLLT apresentaram carga máxima e rigidez do calo da tíbia significativamente maiores que no grupo controle (37). Além disso, em um estudo feito com fraturas de tíbia em 292 ratos, Barushka e cols. (39) demonstraram que a LLLT pode aumentar a atividade e o número de osteoblastos e osteoclastos, como observado no incremento da atividade de fosfatase alcalina e fosfatase ácida tartrato-resistente.

Lirani (32) demonstrou que, em fraturas de tíbia de ratos, a terapia laser é capaz de acelerar o processo de reparo. Tíbias de ratos com osteotomia parcial submetidas à LLLT apresentaram significância estatística quanto à resistência à carga em ensaio mecânico de flexão (44) e maiores número e superfície de osteoblastos e volume e superfície de osteóide na análise histomorfométrica (32), indicando aceleração do processo de reparo ósseo com predomínio de formação óssea no 19º dia pós-cirúrgico.

De acordo com Nicolau e cols. (43), a LLLT aumenta a atividade de reabsorção e formação óssea em fraturas de fêmures de ratos. Cinco dias após a cirurgia, o volume ósseo e a superfície de osteoclastos

do grupo tratado eram maiores que o controle, e em quinze dias pós-cirúrgicos a superfície de osteoblastos e a taxa de aposição mineral eram também estatisticamente maiores no grupo tratado com laser. A LLLT estimula o crescimento da área trabecular e a concomitante invasão de osteoclastos durante a primeira semana de tratamento pós-osteotomia experimental de tibia, e acelera a organização de colágeno da matriz ao final da segunda semana (42).

Um trabalho que avaliou os efeitos da LLLT em células osteoblásticas humanas utilizou doses diárias de laser GaAlAs (830nm, 90mW, densidades de energia de 1,7 a 25,1J/cm²) por até 10 dias, e o aumento do cálcio intracelular indicou que estas células respondem à LLLT (47). A radiação laser em estágios precoces da cultura estimula significativamente a proliferação celular, a atividade da fosfatase alcalina e a expressão gênica de osteocalcina (48), o que não ocorreu em datas posteriores (além de 21 dias) na cultura de *osteoblast-like cells* isoladas da calvária de fetos de ratos que foram irradiados com laser Ga-Al-As (830nm, 500mW, 3,82J/cm²). Isto sugere que o estímulo à formação óssea decorrente da LLLT atue apenas em estágios proliferativos e precoces da diferenciação de precursores imaturos, e não em estágios tardios.

CONCLUSÃO

Existem muitas evidências científicas que demonstram os efeitos biológicos positivos do laser, ultra-som e do campo elétrico, todos de baixa intensidade, sobre o tecido ósseo. No entanto, comparar os efeitos destas diferentes modalidades terapêuticas no osso tem sido uma tarefa árdua, pois os parâmetros, tempos de tratamento e doses de energia utilizados em cada estudo são muito distintos. Além disso, é difícil saber qual a dose de energia necessária para estimular a osteogênese em diferentes estados biológicos como, por exemplo, no osso normal, naquele com atraso de consolidação ou no osteoporótico. Apesar dos comprovados efeitos positivos destas modalidades na promoção da osteogênese, estudos precisam ser realizados a fim de definir os melhores parâmetros como tempos de tratamento e doses de energia, além de dados de segurança e possíveis maneiras de sensibilizar a resposta biológica à estimulação mecânica e elétrica sobre as várias qualidades de osso.

A energia eletromagnética pode ser uma forma econômica de tratar uma série de alterações ósseas de maneira eficiente. Para que isto ocorra, é fundamental a disseminação destes conhecimentos já amplamente

comprovados em ensaios experimentais e em *anima nobile*. As questões que abordem segurança para seu uso crônico na espécie humana, entretanto, necessitam ser melhor estabelecidas em estudos a longo prazo.

REFERÊNCIAS

1. Charman RA. Bioelectricity and electrotherapy – towards a new paradigm? Introduction. **Physiotherapy** 1990;76:502-3.
2. Lind M, Bunger C. Factors stimulating bone formation. **Eur Spine J** 2001;10:S102-9.
3. Fukada E, Yasuda I. On the piezoelectric effect of bone. **J Phys Soc Japan** 1957;12:1158-62.
4. Duarte LR, Xavier CAM. Estimulação ultrassônica do calo ósseo. Aplicação clínica. **Rev Bras Ortop** 1983; 18:73-80.
5. Rubin CT, McLeod KJ. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editors. **Osteoporosis**. Academic press, 1996. p.351-71.
6. Pilla AA. Low intensity electromagnetic and mechanical modulation of bone growth and repair: are they equivalent? **J Orthop Sci** 2002;7:420-8.
7. Brighton et al. Uspto patent full-text and image database, United States patent number 4,467,808 United States Patent 1984. Acesso a <http://patft.uspto.gov/> em janeiro de 2005.
8. Bassett CA. Fundamental and practical aspects of therapeutic uses of pulsed electromagnetic fields (PEMFs). **Crit Rev Biomed Eng** 1989;17:451-529.
9. Smith TL, Wong-Gibbons D, Maultsby J. Microcirculatory effects of pulsed electromagnetic fields. **J Orthop Res** 2004;22:80-4.
10. Canè V, Zaffe D, Cavani F, Botti P, Soana S. PEMFs modulate the enzymatic activity during the bone repair process. **Bone** 1996;19:133S.
11. Inoue N, Ohnishi I, Chen D, Deitz LW, Schwardt JD, Chao EYS. Effect of pulsed electromagnetic fields (PEMF) on late-phase osteotomy gap healing in a canine tibial model. **J Orthop Res** 2002;20:1106-14.
12. Ibiwoye MO, et al. Bone mass is preserved in a critical-sized osteotomy by low energy pulsed electromagnetic fields as quantitated by in vivo micro-computed tomography. **J Orthop Res** 2004;22:1086-93.
13. Hsu RW, Tai C, Chen CY, Hsu W, Hsueh S. Enhancing mechanical strength during early fracture healing via shockwave treatment: an animal study. **Clin Biomech** 2003;18:S33-9.
14. Wiesmann HP, Hartig M, Stratmann U, Meyer U, Joos U. Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells in vitro. **Biochim Biophys Acta** 2001;1538:28-37.
15. Chang WH, Chen LT, Sun JS, Lin FH. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. **Bioelectromagnetics** 2004;25:457-65.
16. Diniz P, Soejima K, Ito G. Nitric oxide mediates the effects of pulsed electromagnetic field stimulation on the osteoblast proliferation and differentiation. **Nitric Oxide** 2002;7:18-23.

17. Brighton CT, Wang W, Seldes R, Zhang G, Pollack S. Signal transduction in electrically stimulated bone cells. **J Bone Joint Surg** 2001;83-A:1514-23.
18. Bassett CA, Mitchell SN, Schink MM. Treatment of therapeutically resistant non-unions with bone grafts and pulsing electromagnetic fields. **J Bone Joint Surg** 1982;64:1214-20.
19. Giordano N, et al. Effect of electromagnetic fields on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in osteoporosis: a single-blind, randomized pilot study. **Curr Therap Res** 2001;62:187-93.
20. Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. **Arch Orthop Trauma Surg** 1983;101:153-9.
21. Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica**. 7ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1990. p.113-4.
22. Takikawa T. Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. **J Ultrasound Med** 2001;20:197-205.
23. 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. **J Orthop Res** 2002;20:587-92.
24. Azuma Y, Ito M, Harada Y, Takagi H, Ohta T, Jingushi 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;16:671-80.
25. Heckman JD, Sarasohn-Kahn J. The economics of treating tibia fractures. The cost of delayed unions. **Bull Hosp Jt Dis** 1997;56:63-72.
26. 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** 1994;76-A:26-34.
27. Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Roe LR. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **J Bone Joint Surg Am** 1997;79:961-73.
28. Silva OL, Reinbold KA, Pollack SR. In: Martin Blank, editor. **Electricity and Magnetism in Biology and Medicine**. San Francisco Press, 1993;905-8.
29. Duncan RL, Hruska KA. Chronic, intermittent loading alters mechanosensitive channel characteristics in osteoblast-like cells. **Am J Physiol** 1994;267:F909-14.
30. Chen NX, et al. Ca²⁺ regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. **Am J Physiol - Cell Physiol** 2000;278:C989-97.
31. Sun J, et al. Bone defect healing enhanced by ultrasound stimulation: an in vitro tissue culture model. **J Biomed Mater Res** 1999;46:253-61.
32. Lirani APR. **Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tibia 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.
33. Chang WH, et al. Study of thermal effects of ultrasound stimulation on fracture healing. **Bioelectromagnetics** 2002;23:256-63.
34. Leung KS, Lee WS, Tsui HF, Liu PP, Cheung WH. Complex tibial fracture outcomes following treatment with low-intensity pulsed ultrasound. **Ultrasound Med Biol** 2004;30:389-95.
35. Lerner A, Stein H, Soudry M. Compound high-energy limb fractures with delayed union: our experience with adjuvant ultrasound stimulation (exogen). **Ultrasonics** 2004;42:915-7.
36. Trelles MA, Mayayo E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. **Lasers Surg Med** 1987;7:36-45.
37. Luger EJ, et al. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Lasers Surg Med** 1998;22:97-102.
38. Freitas IGF, Baranauskas V, Cruz-Höfling MA. Laser effects on osteogenesis. **Applied Surface Science** 2000;154-155:548-54.
39. 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.
40. Guzzardella GA, et al. Laser technology in orthopedics: preliminary study on low power laser therapy to improve the bone-biomaterial interface. **Int J Artif Organs** 2001;24:898-902.
41. Silva Junior, et al. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. **J Clin Laser Med Surg** 2002;20:83-7.
42. Garavello-Freitas I, et al. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **Photochem Photobiol** 2003;70:81-9.
43. Nicolau RA, et al. Effect of low-power GaAlAs laser (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers Med Sci** 2003;18:89-94.
44. Lirani APR, Silva OL. Propriedades mecânicas de fraturas ósseas submetidas a terapia laser de baixa intensidade. **Rev Bras Biomec** 2004;5:19-24.
45. Rochkind S, et al. Molecular structure of the bony tissue after experimental trauma to the mandibular region followed by laser therapy. **Photomed Laser Surg** 2004;22:249-53.
46. 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 Pathol Oral Radiol Endod** 2004;97:693-700.
47. Coombe AR, et al. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. **Clin Orthop Res** 2001;4:3-14.
48. 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;22:347-54.

Endereço para correspondência:

Ana Paula Rebutti Lirani
Rua Gonçalo da Cunha 130, apto. 74
04140-040 São Paulo, SP
E-mail: analirani@fcr.epm.br