

EFEITO DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO DE BAIXA INTENSIDADE EM FRATURA INDUZIDA EM TÍBIA DE RATOS

THE EFFECT OF LOW-INTENSITY THERAPEUTIC ULTRASOUND IN INDUCED FRACTURE OF RAT TIBIAE

ALDO JOSÉ FONTES-PEREIRA¹, RENATO DA COSTA TEIXEIRA², ANTÔNIO JORGE BARBOSA DE OLIVEIRA², ROBERTO WALDESMAND FARIAS PONTES², RUI SÉRGIO MONTEIRO DE BARROS², JOSÉ NAZARENO CUNHA NEGRÃO²

RESUMO

Objetivo: Averiguar os possíveis efeitos do ultrassom de baixa intensidade, utilizado em tratamentos fisioterapêuticos de rotina, em fratura induzida em tibia de ratos. **Métodos:** Foram utilizados 20 ratos machos *Wistar*, distribuídos em 2 grupos, com 10 animais, cada. No grupo ultrassom (GUS), os animais sofreram fratura óssea e tratamento com ultrassom terapêutico (UST) a 1,0 MHz e intensidade de 0,2 W/cm², no modo pulsado a 20%, aplicado de forma estacionária, por 10 minutos, na região da fratura, durante cinco semanas. O grupo controle (GC) sofreu fratura óssea e não foi tratado com UST. **Resultados:** Nas radiografias, observou-se melhor consolidação no GUS em relação ao GC. Já na análise de fosfatase alcalina (FALC) e cálcio sérico (CS), não se evidenciou efeito estatisticamente significativo. **Conclusão:** De acordo com o presente estudo, o UST aplicado conforme esses parâmetros promoveu aceleração da consolidação, comprovada por radiografia, entretanto a análise bioquímica não foi conclusiva. Um dos motivos para essa divergência pode ter sido alguma inadequação do protocolo bioquímico, atualmente em investigação. **Nível de Evidência II, Estudo prospectivo comparativo.**

Descritores: Consolidação da fratura. Terapia por ultrassom. Fisioterapia. Tibia. Ratos.

ABSTRACT

Objective: To analyze the possible effects of low-intensity ultrasound on induced tibia fracture of rats in a dose commonly used in physical therapy treatments. **Methods:** Twenty male *Wistar* rats were divided into two groups with 10 animals each. In the ultrasound group (USG), the animals were submitted to bone fracture and treatment with therapeutic ultrasound (TUS). Ultrasonic parameters are: frequency of 1.0 MHz, intensity of 0.2 W/cm², pulsed mode at 20%, applied in stationary form during 10 minutes on the fracture region, for five weeks. The control group (CG) was submitted to bone fracture but not treated with ultrasound. **Results:** The radiographies showed better consolidation in USG compared to CG. The statistical tests for alkaline phosphatase and serum calcium did not show significant difference between groups. **Conclusion:** According to this study, TUS, applied with these parameters (not commonly used for bone therapy) accelerates bone healing, confirmed by radiography, yet the biochemical analysis was not conclusive. One reason for this inconsistency may have been some inadequacy of the biochemical protocol, currently under investigation. **Level of Evidence II, Prospective comparative study.**

Keywords: Fracture healing. Ultrasonic therapy. Physical therapy. Tibia. Rats.

Citação: Fontes-Pereira AJ, Teixeira RC, Oliveira AJB, Pontes RWF, Barros RSM, Negrão JNC. Efeito do ultrassom terapêutico de baixa intensidade em fratura induzida em tibia de ratos. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2013;21(1):18-22. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Fontes-Pereira AJ, Teixeira RC, Oliveira AJB, Pontes RWF, Barros RSM, Negrão JNC. The effect of low-intensity therapeutic ultrasound in induced fracture of rats tibiae. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2013;21(1):18-22. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

A consolidação da fratura é um processo complexo, que envolve a proliferação e diferenciação celular, quimiotaxia e síntese de matriz extracelular,¹ responsável pelo restabelecimento da integridade mecânica, e conseqüentemente funcional, do tecido ósseo.^{1,2} No entanto, este processo de reparo ósseo pode ocorrer lentamente (retardo de consolidação) ou até não se desenvolver (pseudoartrose), resultando em deficiência ou incapacidade dos indivíduos.³ A propriedade elétrica do tecido ósseo, particularmente a pie-

zeletricidade, motivou diversos pesquisadores a desenvolverem técnicas que repercutissem na alteração do metabolismo ósseo, caso a consolidação não ocorresse no tempo esperado ou até mesmo para acelerar esse metabolismo em fraturas recentes.^{1,4-7} A aceleração do processo de consolidação de fraturas por ultrassom (US) de baixa intensidade, de forma pulsada, encontra-se bem documentada na literatura científica.^{1,4,5,8} Porém, os mecanismos celulares e moleculares, desencadeados em tratamento com o ultrassom terapêutico (UST), ainda são pouco compreendidos, assim como

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

1. Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
2. Universidade do Estado do Pará – Belém, PA, Brasil.

Trabalho realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade do Estado do Pará - Belém, PA, Brasil.
Correspondência: Universidade Federal do Rio de Janeiro. Programa de Engenharia Biomédica - COPPE/UFRJ - Cx. Postal 68510. Ilha do Fundão; Rio de Janeiro, RJ – Brasil.
E-mail: aldo.fontes@gmail.com

os parâmetros usados no equipamento durante o tratamento.^{1,3,7,9,10} O UST de baixa intensidade de forma pulsada, ao se propagar como energia mecânica, atinge a superfície óssea e gera sinais elétricos que estimulam o metabolismo ósseo.^{1,9,10} A ação direta do UST de baixa intensidade em mecanorreceptores é provável, mas também pode atuar pela liberação de agonistas de osteoblasto, induzindo sua proliferação e diferenciação¹ e a liberação de prostaglandinas, através da ativação do receptor P2X₇ em células ósseas, permitindo o influxo de íons, como o cálcio.¹

Frequentemente, em estudos em animais, utilizam-se equipamentos específicos de ultrassom de baixa intensidade (30mW/cm²) de modo pulsado, que custam cerca de 4 vezes mais que os equipamentos de ultrassom terapêutico.^{4,7}

Deste modo, o objetivo deste trabalho é averiguar os possíveis efeitos do US de baixa intensidade, utilizado em tratamentos fisioterapêuticos, em fratura induzida em tibia de ratos. A originalidade do presente trabalho está em investigar uma intensidade que é comum nos equipamentos comerciais de ultrassom em Fisioterapia, já que os equipamentos específicos usam 30mW/cm².

MATERIAIS E MÉTODOS

Normativas éticas

O estudo foi realizado, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Pará, sob o protocolo n.13/2009, sendo realizado em conformidade com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a Legislação Nacional de Viviseção Animal em vigor (Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008).

Amostras

Foram utilizados 20 ratos machos *Wistar (Rattus norvegicus albinus)*, provenientes do Biotério da UFPa (Universidade Federal do Pará), pesando entre 300 a 350g ou idade mínima de 90 dias. Depois de adaptados ao Laboratório de Cirurgia Experimental (LCE) da Universidade do Estado do Pará (UEPA), por um período de 15 dias, foram acomodados em gaiolas medindo 45 x 15 x 30cm, com o fundo recoberto com palha de arroz autoclavável, trocada em dias alternados, em ambiente controlado e recebendo água e ração *ad libitum*. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 2 grupos, com 10 animais cada. (Figura 1)

No grupo ultrassom (GUS), os animais sofreram lesão óssea e tratamento com UST de baixa intensidade. No grupo controle (GC), os animais sofreram lesão óssea e não foram tratados com UST.

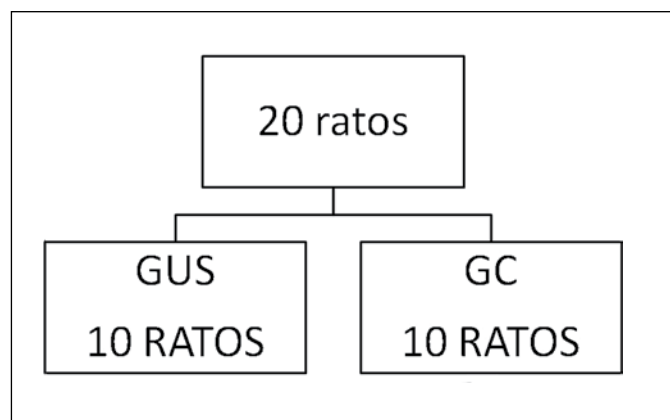


Figura 1. Organograma dos grupos.

Estabelecimento da fratura

Os 20 ratos foram pesados em balança digital e, posteriormente, anestesiados com Ketamina® (0,9 mL/kg) e Xilasina® (0,5 mL/kg), por via intraperitoneal. Após a comprovação clínica de anestesia, os animais foram posicionados em decúbito lateral direito e tiveram a tibia direita fraturada no terço médio, com o equipamento de fratura adaptado¹¹ do sistema descrito por Matheus *et al.*¹², (Figura 2) que provocou fratura fechada. Não houve, posteriormente, nenhum tipo de imobilização do segmento ou tratamento farmacológico.¹³

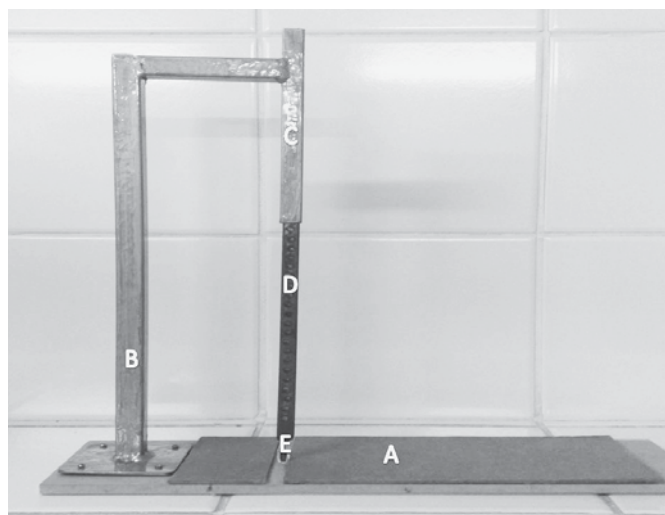


Figura 2. Equipamento de lesão traumática em pequenos roedores, composto por uma base de madeira (A), haste de metal de 40 cm de altura (B), dispositivo que gradua a energia a ser liberada para a lesão (C), barra de metal maciço de 460g (D) e ponta romba (E).

Tratamento com ultrassom

Antes do início do tratamento, o equipamento de UST foi aferido e calibrado pelo setor de Engenharia Elétrica da Universidade Federal do Pará. O tratamento com ultrassom terapêutico teve início 24 horas após a indução da lesão óssea. Foi utilizado o aparelho de ultrassom BIOSET, modelo SONACEL PLUS®, aplicado no local da fratura, com frequência de 1 MHz, intensidade de 0,2W/cm² (SATA), pulsado, ciclo de trabalho de 20%, ERA (*Effective Radiating Area*) de 0,8cm². Como material de contato, foi utilizado o gel hidrossolúvel comercial para ultrassom. O tratamento foi realizado durante 10 minutos, uma vez ao dia, durante cinco dias consecutivos e dois dias de intervalo, até se completarem 25 sessões, simulando o tratamento fisioterapêutico.

Procedimento pós-tratamento

No 34º dia, os animais foram novamente anestesiados com Ketamina® (0,9 mL/kg) e Xilasina® (0,5 mL/kg), por via intraperitoneal. Após a anestesia, os animais foram submetidos ao dessangramento por punção cardíaca (5 mL) e, em seguida, decapitados. O membro traseiro de cada animal foi cuidadosamente removido e submetido à análise radiológica e bioquímica.

Análise radiológica

A avaliação da lesão óssea foi realizada com a mesma técnica radiográfica (40kV x 2mAs) e sempre na mesma distância da ampola de raios X (1m).

Análise bioquímica

Foram determinados os níveis de fosfatase alcalina (FALC) e cálcio sérico (CS) no sangue dos animais, em jejum de 12 horas, ao 34º dia após o estabelecimento da fratura. Depois da coagulação, o soro foi separado por centrifugação em tubos Eppendorf a 1000G. A dosagem sérica da FALC foi realizada com kit laboratorial (Labtest) e a atividade enzimática estimada através da absorbância a 590 nm. O CS foi dosado utilizando-se o kit laboratorial (Labtest) e sua concentração estimada através da absorbância a 570 nm. Ambas as análises foram realizadas no sistema Labtest automatizado - VITALAB SELECTRA E® (Vital Scientific N.V) e analisadas no laboratório de bioquímica da UEPA.

Análise estatística

A análise estatística consistiu da aplicação do teste *t* de Student, considerando-se um nível de significância $\alpha=0,05$, realizada com o software Bioestat 5.0.

RESULTADOS

Foram utilizados 20 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com idade média de 150 dias e peso corporal de $284,95 \pm 48g$, (Tabela 1) tendo, como amostra final, 18 ratos: GC ($n= 8$) e GUS ($n=10$). No GC ocorreu a morte súbita de 2 animais antes de iniciar o tratamento.

Tabela 1. Dados do peso de cada rato da amostra ($n = 20$), em gramas.

Ratos	Peso (em gramas)
1	250
2	269
3	330
4	350
5	340
6	220
7	270
8	370
9	245
10	350
11	335
12	250
13	250
14	310
15	240
16	240
17	250
18	260
19	240
20	330

Nas radiografias, observou-se fratura no terço médio diafisário da tibia, do tipo transversa e ausência de sinais de osteomielite em ambos os grupos. Observa-se calo ósseo em formação no GUS, (Figura 3) enquanto no GC exibe-se interpenetração de fragmentos, o que as caracterizam como fraturas impactadas. (Figura 4) Portanto, caracteriza-se a aceleração da consolidação no GUS



Figura 3. Radiografia do GUS, evidenciando fratura em terço médio diafisário da tibia do tipo transversa.



Figura 4. Radiografia do GC, evidenciando fratura em terço médio diafisário da tibia.

em relação ao GC. Quanto aos dados da análise bioquímica, foi possível avaliar dois marcadores para a remodelação óssea: a FALC e o CS. (Tabela 2) Em relação à análise de FALC e CS, não se evidenciou efeito estatisticamente significativo. (Tabela 3)

Tabela 2. Resultados de CS e FALC da amostra, GUS (n = 9), GC (n= 8).

Grupo/ratos	Cálcio sérico (mg/dL)	Fosfatase alcalina (U/L)
GUS 1	14,59	353
GUS 3	14,93	335
GUS 4	16,73	419
GUS 5	14,41	630
GUS 6	14,20	775
GUS 7	14,39	343
GUS 8	14,53	306
GUS 9	14,73	354
GUS 10	14,31	312
GC 1	13,74	290
GC 2	14,39	649
GC 3	14,34	322
GC 4	14,71	228
GC 5	15,08	220
GC 6	15,13	468
GC 7	14,90	612
GC 8	14,98	533

Tabela 3. Dados comparativos do GUS (n=9) e do GC (n=8), em relação às variáveis CS e FALC.

Análise bioquímica	GUS		GC		p*
	Média	dp	Média	dp	
Cálcio sérico	14,76	0,77	14,66	0,48	0,76
Fosfatase alcalina	425,22	164,52	415,25	172,20	0,91

p ≥ 0,05 (Teste t de Student).

DISCUSSÃO

O tratamento com ultrassom tem sido amplamente utilizado em reparo ósseo. No entanto, ainda existem controvérsias em relação aos seus potenciais biológicos e seus efeitos sobre o reparo tecidual, sendo, seu uso, muitas vezes negligenciado ou fundamentado na experiência prática, o que resulta em procedimentos errôneos.³ O pequeno aumento de temperatura realizado pelo UST repercute na ação de algumas enzimas, a saber, a matriz metaloproteínase-1 e a colagenase.^{1,14} Assim, o UST pode servir para restabelecer ou normalizar eficazmente as temperaturas metabólicas nas regiões de cicatrização do tecido.

Além disso, o tratamento com UST pulsado de baixa intensidade é um bom estimulador das diferentes células do sistema ósseo,¹ acelerando a cicatrização da fratura clínica e aumentando a formação óssea através da atividade dos osteoblastos.^{1,15} Adicionalmente, aumenta a atividade da FALC e CS.^{1,8,16} Deste modo, essas ações possibilitam o uso de ultrassom pulsado em aplicações terapêuticas.¹ Neste estudo, o osso utilizado foi a tíbia,

por ser o osso longo mais frequentemente fraturado e associado com uma alta incidência de retardo de consolidação e não união óssea.² Foi realizada inicialmente a fratura em um estudo piloto, em que se realizou um corte transversal na tíbia com bisturi. Confirmada a osteotomia, foram realizadas a redução do foco da fratura e a sutura da pele. Findada a cirurgia, foi realizada a desinfecção da área com agente bactericida.

Cinco dias após a osteotomia, percebeu-se que os animais evoluíram para infecção na área seccionada e para síndrome compartimental, o que também foi descrito em outros estudos.¹³ Na tentativa de se evitar esta síndrome, foi realizado, posteriormente, um novo modelo de estudo, com a imobilização com tala gessada. No entanto, o experimento não auferiu êxito, pois os animais também evoluíram para a síndrome compartimental, corroborando os achados de outros autores.^{13,17} Outro problema identificado foi a presença de infecção no local onde foi realizada a incisão cirúrgica, o que alteraria o processo de consolidação óssea.¹³ Por isso, o modelo de fratura fechada justifica-se por diminuir bastante os riscos de infecção, além de causar mínimos danos em tecidos moles.^{13,18} Zacharias *et al.*¹⁷ afirmam que modelos de produção de fraturas por meios invasivos podem complicar-se com deiscência de sutura e, conseqüente, infecção profunda, como ocorreu em sua pesquisa. Devido às controvérsias a respeito do modo de fraturar, foi proposta a criação de um equipamento adaptado¹¹ do sistema descrito por Matheus *et al.*¹², obtendo-se um equipamento artesanal, de baixo custo e de fácil reprodução, que padroniza a fratura. O mesmo foi previamente testado, com sucesso, em 16 ratos fêmeas e 18 ratos machos, ambos *Wistar (Rattus norvegicus albinus)*, com idade média de 90 dias e peso médio corporal de 250g. Este equipamento foi utilizado para obtenção das fraturas neste estudo. Métodos de estabilização da fratura por meios invasivos também podem resultar em complicações, como ocorreu com Pelker e Friedlaender¹⁹, que utilizaram fios de Kirschner e excluíram 87 animais do experimento, devido a diversas complicações, dentre elas, mortes no per-operatório e fratura femoral, durante a montagem dos fios.

Complicações podem ocorrer também, quando meios não invasivos são empregados para estabilização da fratura.¹³ Esses fatos, juntamente com a diversidade de descrição de modelos de fratura que não empregam qualquer tipo de imobilização, justificam a opção dos pesquisadores em não utilizá-los.^{13,17,18}

Após a distribuição aleatória dos grupos, o GUS foi tratado com UST. De acordo com o postulado da lei de Wolff, a estimulação ultrassônica em reparo ósseo, transmite forças micromecânicas e tensão ao local da fratura, repercutindo em formação óssea. Devido a isso, encontram-se, na literatura, vários estudos com o UST para reparação de tecidos ósseos lesados.^{1,2,12} Foi utilizado o ultrassom terapêutico pulsado de baixa intensidade, pois, ao se propagar como energia mecânica, estimula o metabolismo ósseo.^{1,9,10}

A intensidade de 0,2W/cm² foi utilizada por ser comumente encontrada em equipamentos comerciais de ultrassom em Fisioterapia, já que os equipamentos específicos usam 30mW/cm² e custam cerca de 3 a 4 vezes mais. A demonstração da viabilidade do uso de um equipamento mais acessível permitiria a melhor difusão do tratamento para acelerar a consolidação óssea.

Albertin²⁰ comparou diferentes tempos de tratamento (5, 10, 20 e 40 minutos) por ultrassom de baixa intensidade na falha óssea de coelhos e concluiu que, com exceção do tempo de 5 minutos, os demais provocaram aumento da ossificação. Devido a isto e buscando similaridades com o tratamento fisioterapêutico, foi escolhido o tempo de 10 minutos.

Para elucidar o efeito do UST, foi realizada uma análise bioquímica por meio da atividade de fosfatase alcalina (pois esta enzima indica a atividade de osteoblastos que determina formação ou reabsorção óssea^{1,8,16,21}) e análise de cálcio sérico, pois este indica processo de síntese de matriz óssea.^{1,8,16,21} Foram realizadas radiografias, para ratificar as indicações apontadas pelos outros exames, sendo analisados os parâmetros básicos, como calo ósseo, tipo e localização da fratura.¹³

No presente estudo, a análise bioquímica não revelou efeito estatisticamente significativo entre os grupos. Isto pode ter ocorrido por três fatos: (I) o longo período entre a fratura e a análise bioquímica, pois há tendência de ambos os grupos apresentarem valores equivalentes, após um longo período de pós-fratura; (II) a inadequação do protocolo bioquímico; ou (III) o tamanho da amostra não foi suficiente para revelar diferença significativa.

A persistência do traço de fratura nas radiografias até a quinta semana está de acordo com dados da literatura. Castro *et al.*¹³ verificaram que, em 6 semanas após a fratura, o traço de fratura ainda permanecia nítido. Utvag e Reikerås²² verificaram que, 20 dias após a fratura em ratos, ainda existia uma linha de fratura visível, enquanto que, após 40 dias, o traço era pouco perceptível. A persistência dessa solução de continuidade poderia ser atribuída à ausência de imobilização.

A presença de calo ósseo em formação no GUS mais acelerado que no GC sugere que o UST pode ser utilizado como tratamento adjuvante em fraturas ósseas.¹ Estudo descrito por Chan *et al.*⁴ em fratura de tíbia em 17 coelhos (Nova Zelândia) tratados com UST (30mW/cm², 1,5MHz), em 20 minutos por dia, durante 4 semanas também constataram a eficácia do UST no grupo experimental, ao ser analisado pela radiografia na 2ª e 4ª semanas, sendo mais eficaz na fase inicial do tratamento. De acordo com os achados do

presente estudo, pesquisa realizada por Takikawa *et al.*⁵ com ratos, nos quais foi induzida a pseudoartrose e promovido tratamento com ultrassom de baixa intensidade (30mW/cm²), em 20 minutos diários por 6 semanas, encontraram uma melhora significativa na análise radiográfica do grupo tratado com ultrassom.

Nesta pesquisa não foram observadas complicações, embora se saiba que vários são os fatores capazes de interferir no processo de consolidação óssea, entre os quais se citam: irradiação, forma de imobilização, tipo de fratura, traço de fratura, secção de nervos, presença de tumor ósseo, interposição de tecidos moles, infecção no foco de fratura.¹³

Novos estudos são necessários para ampliar o conhecimento do efeito do ultrassom terapêutico no tecido ósseo. Desse modo, sugere-se que seja adotada a metodologia de análises avaliativas do processo de consolidação óssea durante todo o período de tratamento e utilizar os métodos de análise do processo de consolidação, como a microscopia eletrônica de varredura, análise histopatológica, diagnóstico por ultrassom e histomorfometria.

CONCLUSÃO

A intervenção por meio do UST de baixa intensidade (0,2 W/cm²), pulsado e com ciclo de trabalho de 20%, aplicado de forma estacionária, por 10 minutos na região da fratura, durante 5 semanas, acelerou a consolidação, comprovada por radiografia. A análise bioquímica não revelou diferença significativa entre os grupos, mas os níveis de FALC e CS foram maiores no GUS. Portanto esses dados sugerem que o ultrassom terapêutico (em doses diferentes daquelas dos equipamentos normalmente utilizados para esta terapia) pode acelerar o processo de consolidação óssea.

REFERÊNCIAS

1. Alvarenga EC, Rodrigues R, Caricati-Neto A, Silva-Filho FC, Paredes-Gamero EJ, Ferreira AT. Low-intensity pulsed ultrasound-dependent osteoblast proliferation occurs by via activation of the P2Y receptor: role of the P2Y1 receptor. *Bone*. 2010; 46(2):355-362.
2. Lirani APR, Larzaretto-Castro M. Evidências da ação de agentes físicos sobre o metabolismo do tecido ósseo e seus potenciais usos clínicos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2005; 49(6):891-896.
3. Evagelista AR, Furtado CS, Vilardi JR, Alves BMO. Estudo do efeito ultra-sônico na consolidação óssea. *Fisioter Bras*. 2003; 4(2):139-143.
4. Chan CW, Qin L, Lee KM, Zhang M, Cheng JC, Leung KS. Low intensity pulsed ultrasound accelerated bone remodeling during consolidation stage of distraction osteogenesis. *J Orthop Res*. 2006; 24(2):263-70.
5. 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(3):197-205.
6. Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1983; 101(3):153-159.
7. Busse JW, Bhandari M, Kulkarni AV, Tunks E. The effect of low-intensity pulsed ultrasound therapy on time to fracture healing: a meta-analysis. *CMAJ*. 2002; 166(4):437-41.
8. 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(2):276-283.
9. Fréz AR, Ariza D, Ferreira JRL, Alves ÉPB, Breda GR, Centenaro LA, et al. Efeito do ultra-som terapêutico contínuo em placas epifisárias de coelhos. *Rev Bras Med Esporte*. 2006; 12(3):150-152.
10. Sousa VL, Alvarenga J, Padilha Filho JG, Canola JC, Ferrigno CRA, Alves JM, et al. Ultra-som pulsado de baixa intensidade em fraturas diafisárias: aplicação clínica em cães. *Ciênc Rural*. 2008; 38(4):1030-1037.
11. Pereira AJF, Matusin DP, Oliveira AJB, Pontes RWF, Kruger MAV, Pereira WCA. Instrumento para produção de fratura transversa em ossos longos de pequenos roedores. In: XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica. Tiradentes, Minas Gerais, 2010.
12. Matheus JP, Oliveira FB, Gomide LB, Milani JG, Volpon JB, Shimano AC. Effects of therapeutic ultrasound on the mechanical properties of skeletal muscles after contusion. *Rev Bras Fisioter*. 2008; 12(3):241-247.
13. Castro PCF, Hoshino A, Brito RB, Dias J, Leônidas B, Brito JAF, et al. Estudo do processo de consolidação óssea em ratos tratados com acetaminofen: avaliações radiográfica e histológica. *Rev Bras Ortop*. 2005;40(10):614-620.
14. Khanna A, Nelmes RT, Gougoulis N, Maffulli N, Gray J. The effects of LIPUS on soft-tissue healing: a review of literature. *Br Med Bull*. 2009; 89:169-182.
15. Rutten S, Nolte PA, Korstjens CM, van Duin MA, Klein-Nulend J. Low-intensity pulsed ultrasound increases bone volume, osteoid thickness and mineral apposition rate in the area of fracture healing in patients with a delayed union of the osteotomized fibula. *Bone*. 2008; 43(2):348-354.
16. Korstjens CM, Nolte PA, Burger EH, Albers GH, Semeins CM, Aartman IH, et al. Stimulation of bone cell differentiation by low-intensity Ultrasound: a histomorphometric in vitro study. *J Orthop Res*. 2004; 22(3):495-500.
17. Zacharias DPM, Waitzberg DL, Bevilacqua LR, Gonçalves EL. Modelo experimental de traumatismo osteomuscular em ratos. *Acta Cir Bras*. 1990; 5(1):13-16.
18. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998; (355 Suppl):S7-21.
19. Pelker RR, Friedlaender GE. The Nicolas Andry Award-1995. Fracture healing. Radiation induced alterations. *Clin Orthop Relat Res*. 1997; (341):267-282.
20. Albertin LM. The effect of treatment with ultrasound on the repair process in bone. *Rev Bras Fisioter*. 2004; 8(1):1-6.
21. Zhang ZJ, Huckle J, Francomano CA, Spencer RG. The effects of pulsed low-intensity ultrasound on chondrocyte viability, proliferation, gene expression and matrix production. *Ultrasound Med Biol*. 2003; 29(11):1645-1651.
22. Utvåg SE, Reikerås O. Effects of nail rigidity on fracture healing. Strength and mineralisation in rat femoral bone. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1998; 118(1-2):7-13.