

COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA E DO ULTRASSOM DE BAIXA INTENSIDADE ASSOCIADO AO BIOSILICATO® NO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO EM TÍBIAS DE RATOS

COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECTS OF LOW-LEVEL LASER AND LOW-INTENSITY ULTRASOUND ASSOCIATED WITH BIOSILICATE® ON THE PROCESS OF BONE REPAIR IN THE RAT TIBIA

Poliani de Oliveira¹, Kelly Rosseti Fernandes², Evandro Fornias Sperandio³, Fabio Alexandre Casarin Pastor⁴, Keico Okino Nonaka⁵, Nivaldo Antonio Parizotto⁵, Ana Claudia Muniz Renno⁶

RESUMO

Objetivo: Verificar os efeitos da associação do Biosilicato® com o US e com o LLLT no processo de consolidação óssea em ratos, a partir da análise biomecânica e histológica. **Métodos:** Foram utilizados 40 ratos machos distribuídos em quatro grupos (n = 10): grupo controle fratura sem tratamento (GCF); grupo tratado com Biosilicato® (GB); grupo tratado com Biosilicato® + laser (GBL); grupo tratado com Biosilicato® + US (GBUS). **Resultados:** A análise biomecânica não apresentou diferença estatisticamente significativa nos grupos após o período experimental de 14 dias. Na análise morfométrica, o grupo controle apresentou presença moderada de tecido ósseo neoformado no interior dos defeitos e o grupo tratado com Biosilicato® apresentou resultados semelhantes. No entanto, foi observado o potencial osteogênico do biomaterial, uma vez que houve grande presença de células e tecido ósseo ao redor das partículas. Interessantemente, os grupos Biosilicato® associado ao laser terapêutico e ao US demonstraram quantidades menores de deposição de tecido ósseo quando comparados aos grupos controle fratura e Biosilicato®. **Conclusão:** A partir dos dados deste estudo podemos concluir que o Biosilicato® foi capaz de acelerar e potencializar a recuperação óssea, através da modulação do processo inflamatório e da estimulação da formação de tecido ósseo novo. No entanto, quando a LLLT ou o US foram associados, não foram encontrados resultados positivos.

Descritores – Tecido Ósseo; Ultrassom; Laser; Materiais Biocompatíveis; Ratos

ABSTRACT

Objective: Verify the effects of the association between Biosilicate® and ultrasound and, Biosilicate® and laser in bone consolidation process of rats, through the biomechanical and histological analysis. **Methods:** Forty male rats were used. The animals were randomized into four groups (n=10): control group fracture no treated (CGF); group treated with Biosilicate® (BG); group treated with Biosilicate® and laser (BLG); group treated with Biosilicate® and ultrasound (BUG). **Results:** The biomechanical analysis showed no significant difference among any groups after 14 days post-surgery. In the morphometric analysis, the control group showed moderate presence of new formed bone tissue inside the defects areas and the Biosilicate® group showed similar results. Despite those facts, the biomaterial osteogenic potential was demonstrated by the great amount of cells and bone tissue around the particles. Curiously, the Biosilicate® plus laser or ultrasound groups showed lower amounts of bone tissue deposition when compared with control fracture and Biosilicate® groups. **Conclusion:** The data from this study can conclude that Biosilicate® was able to accelerate and optimized the bone consolidation, through the modulation of the inflammatory process and the stimulation of new bone formation. However, when resources were associated, there are no positive results.

Keywords – Bone Tissue; Ultrasound; Laser; Biocompatible Materials; Rats

1 – Doutoranda do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos – São Carlos, SP, Brasil.

2 – Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de São Paulo – Santos, SP, Brasil.

3 – Fisioterapeuta, Universidade Federal de São Paulo – Santos, SP, Brasil.

4 – Doutorando do Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos – São Carlos, SP, Brasil.

5 – Professor Titular da Universidade Federal de São Carlos – São Carlos, SP, Brasil.

6 – Professor Adjunto da Universidade Federal de São Paulo – Santos, SP, Brasil.

Trabalho realizado na Universidade Federal de São Carlos, SP.

Correspondência: Ana Claudia Muniz Renno - Av. Ana Costa, 95, Vila Mathias – 11050-240 – Santos, SP. E-mails: a.renno@unifesp.br / polifisio@hotmail.com

Trabalho recebido para publicação: 23/03/2011, aceite para publicação: 13/07/2011.

Os autores declaram inexistência de conflito de interesses na realização deste trabalho / The authors declare that there was no conflict of interest in conducting this work

Este artigo está disponível online nas versões Português e Inglês nos sites: www.rbo.org.br e www.scielo.br/rbort
This article is available online in Portuguese and English at the websites: www.rbo.org.br and www.scielo.br/rbort

INTRODUÇÃO

Quando ocorre lesão no tecido ósseo, o organismo desencadeia uma série de eventos a fim de promover o reparo ósseo. Este, por sua vez, é um complexo processo fisiológico regenerativo onde uma série de eventos celulares e moleculares está envolvida⁽¹⁾. Devido a sua complexidade, qualquer déficit ocorrido em algum ponto da etapa altera a sequência fisiológica, que pode culminar na deficiência da regeneração e, conseqüentemente, no atraso da consolidação e mesmo na não-união óssea. É estimado que, ocorram somente nos Estados Unidos, cerca de 6,2 milhões de fraturas, sendo que destas, aproximadamente 5-10% desenvolvem problemas no processo de reparo⁽¹⁾.

Dentro desse contexto, vários métodos vêm sendo utilizados, a fim de melhorar e acelerar o processo de consolidação⁽²⁾. Dentre estes, podem ser citados os efeitos de tratamentos como a aplicação de materiais bioativos, a utilização do ultrassom de baixa intensidade (US) e do laser terapêutico de baixa potência (LLLT)⁽³⁾.

Materiais bioativos ou biomateriais são definidos como um material capaz de produzir uma resposta biológica específica na interface entre o material e o tecido, formando uma ligação entre esses, sem ser tóxico ou promover respostas imunológicas^(4,5). Nosso grupo de pesquisa desenvolveu, na década de 90, uma vitrocerâmica altamente bioativa e com elevadas propriedades mecânicas denominada Biosilicato®⁽⁶⁾. Alguns estudos vêm demonstrando os potenciais osteogênicos do Biosilicato® tanto *in vitro* como *in vivo*^(5,7).

Além disso, o LLLT e o US também têm se destacado por seu potencial osteogênico. Os efeitos desta terapia são relatados por diversos autores. Renno *et al*⁽⁸⁾ e Stein *et al*⁽⁹⁾ mostraram um aumento significativo na proliferação de osteoblastos após irradiação com laser 830nm, 20J/cm². Além disso, o laser parece acelerar o processo de reparo da fratura e causar aumento no volume do calo e densidade mineral óssea⁽¹⁰⁾. Pinheiro *et al*⁽¹¹⁾ mostraram que o laser (830nm, 40mW, 4.8J/cm²) foi capaz de aumentar a quantidade de tecido ósseo mineralizado em fraturas induzidas em fêmures de ratos. Da mesma forma, o US apresenta resultados positivos no aumento da proliferação celular e na aceleração da consolidação óssea após uma fratura, bem como no aumento das propriedades biomecânicas do calo ósseo em ratos e coelhos^(12,13). Takikawa *et al*⁽¹²⁾ observaram, em um estudo experimental, que após seis semanas de tratamento, o US aumentou significativamente o índice de consolidação

em fraturas com não-união óssea comparado com o grupo controle. Estes mesmos resultados foram encontrados por Sun *et al*⁽¹⁴⁾ e Lirani-Galvão *et al*⁽¹⁵⁾.

Conforme o exposto acima, os biomateriais, o US e o LLLT vêm surgindo como alternativas promissoras no tratamento de fraturas ósseas, pois além de apresentarem um grande potencial osteogênico, constituem métodos de tratamento não-invasivos e apresentam um custo relativamente baixo. No entanto, existe uma grande lacuna na literatura em estudos investigando os efeitos da associação desses recursos no processo de consolidação. Dentro deste contexto, este trabalho tem como objetivo verificar os efeitos da associação do Biosilicato® com o US e com LLLT no processo de consolidação óssea em tibia de ratos.

METODOLOGIA

Foram utilizados, neste estudo, 40 ratos machos Wistar, com peso entre 280 e 320g. Os animais permaneceram em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, ambiente higienizado, temperatura de 24 ± 2°C e ventilação adequada), nas quais receberam ração comum e água a vontade. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (parecer nº. 023/2006).

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos (n = 10): grupo controle com fratura (GCF) – os ratos deste grupo foram submetidos à fratura, porém sem tratamento; grupo Biosilicato® (GB) – os ratos foram submetidos à fratura e tratados com Biosilicato®; grupo Biosilicato® + laser (GBL) – ratos submetidos à fratura e tratados com a associação de Biosilicato® + laser; grupo Biosilicato® + US (GBUS) – ratos submetidos à fratura e tratados com a associação de Biosilicato® + US.

Para a realização dos defeitos ósseos, os ratos foram anestesiados de acordo com o peso corporal, com uma mistura de ketamina e xilazina (80/10mg/kg). Após anestesia, tricotomia e assepsia, foi realizada uma incisão tibial em ambas as tíbias. Com a ajuda de uma minifuradeira, com fresa de 2,0mm de diâmetro, irrigada com soro fisiológico, foram realizados defeitos ósseos no terço médio da tibia (10mm abaixo da articulação do joelho). Finalizando, o músculo e a pele foram suturados com fio de náilon monofilamentar 4.0 e distância de 1cm entre os pontos e foi feita a limpeza local. Os animais foram mantidos com livre acesso a água e comida até o momento do sacrifício.

TRATAMENTOS

Biomaterial

O material bioativo utilizado foi o Biosilicato[®]. O Biosilicato[®] é uma vitrocerâmica altamente bioativa, apresentando os elementos químicos silício, oxigênio, sódio, cálcio e fósforo (Si, O, Na, Ca e P), sendo liberados em solução na forma de $\text{Si}(\text{OH})_4$, Na^+ , Ca^{2+} e PO_4^{2-} . O Biosilicato[®] foi empregado neste estudo através de grãos de aproximadamente 180-212 μm . Este foi introduzido no defeito logo após a realização do mesmo, através de uma espátula apropriada até o preenchimento completo da fratura circular. Os detalhes da composição e do tratamento térmico estão descritos na patente WO 2004/074199.

Laser de baixa intensidade

O aparelho utilizado foi um modelo portátil de Laser DMC, THERALASE versão 24, classe 3B, Ga-Al-As diodo, com comprimento de onda de 830nm, emissão contínua, potência de saída de 100mW, densidade de potência de 3,57W/cm², área do feixe de 0,028cm², divergência de 1,5°. A aplicação foi realizada em apenas um ponto com fluência de 120J/cm², por 34 segundos, fornecendo 3,4J de energia.

Ultrassom de baixa intensidade

Foi utilizado um modelo portátil de US (marca Exogen, Estados Unidos), modo pulsado com *burst* de 1,5MHz, com largura de pulso de 200us, frequência de repetição de pulso de 1KHz e intensidade de 30mW/cm², durante 20 minutos.

Os tratamentos se iniciaram imediatamente após o procedimento operatório e no segundo, quarto, sexto, oitavo, décimo e décimo segundo dias de pós-operatório, totalizando sete aplicações em 14 dias.

No 14º dia após o procedimento experimental, os animais sofreram eutanásia através de uma dose letal de anestésico, injetado por via intraperitoneal. As tíbias foram retiradas e o tecido mole foi removido para posteriores análises.

Análise biomecânica

A análise biomecânica foi realizada através do teste de flexão de três pontos. O teste foi realizado na tíbia direita dos animais de todos os grupos. Os ensaios biomecânicos foram realizados na 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 1KN e pré-carga de 5N. Foi uti-

lizado um suporte de metal de 3,8cm de comprimento, expondo somente 1,8cm do corpo de prova. As tíbias foram posicionadas com a região do defeito voltada para baixo, de modo a submeter esta região a uma tração. A partir deste teste foram obtidas as seguintes variáveis: carga máxima (KN), resiliência (J) e tenacidade (J).

Análise histológica

As tíbias foram submetidas à descalcificação em solução descalcificadora de MORSE (citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 50% em partes iguais) e posteriormente processado em parafina. Os blocos de parafina foram cortados longitudinalmente com espessura padronizada de 5,0 μm e as lâminas histológicas foram confeccionadas. Os cortes foram então corados com hematoxilina e eosina (HE), para a análise qualitativa, e com tricômico de Masson (TM) para a morfometria. Cada animal foi representado por duas lâminas histológicas, cada uma com uma série de no mínimo três cortes consecutivos.

A análise histopatológica qualitativa foi realizada através de um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tóquio, Japão). Foram consideradas as modificações como presença de osso neoformado, tecido medular, presença de infiltrado inflamatório e de tecido de granulação.

A morfometria da área de osso neoformado na região do defeito de cada animal foi mensurada utilizando um sistema de análise de imagem Motican 5.0. As lâminas foram observadas em duas áreas da região cortical do defeito. As duas áreas foram selecionadas e nomeadas C1 e C2 correspondendo à área cortical superior e inferior do defeito. O tecido ósseo neoformado presente nessas regiões foi mensurado e a área registrada na objetiva de 10X. Depois de registradas, as áreas foram somadas, resultando no total da área de tecido neoformado do defeito.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente através de técnicas descritivas, tais como tabelas e gráficos, na forma de médias e desvios padrão. O teste de normalidade *Shapiro-Wilk's W test* foi utilizado para todas as variáveis. Nos casos em que houve distribuição normal da amostra, as comparações foram feitas usando *one-way* (ANOVA) com *post hoc* Tukey-HSD. Nos casos em que houve distribuição anormal da amostra, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado. As análises foram realizadas no *software Statistica* versão 7.0. O nível de significância foi de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Análise biomecânica

A Tabela 1 apresenta as médias e desvios padrão das propriedades mecânicas de todos os grupos experimentais. A análise estatística não demonstrou nenhuma diferença significativa entre nenhum dos grupos após o período experimental de 14 dias.

Tabela 1 – Propriedades biomecânicas das tíbias dos grupos experimentais (média ± DP).

| Grupo | Carga máxima (KN) | Tenacidade (J) | Resiliência (J) |
|-------|-------------------|----------------|-----------------|
| GCF | 0,064 ± 0,020 | 0,057 ± 0,011 | 0,029 ± 0,012 |
| GB | 0,063 ± 0,014 | 0,069 ± 0,018 | 0,033 ± 0,010 |
| GBUS | 0,053 ± 0,012 | 0,049 ± 0,018 | 0,027 ± 0,010 |
| GBL | 0,049 ± 0,014 | 0,057 ± 0,020 | 0,028 ± 0,007 |

GCF: controle fratura; GB: Biosilicato®; GBUS: Biosilicato® + ultrassom; GBL: Biosilicato® + laser.

Análise histológica qualitativa

Pode ser observado na Figura 1A que o grupo controle apresentou presença moderada de tecido ósseo neoformado no interior dos defeitos e presença moderada de infiltrado inflamatório. Nos animais tratados somente com Biosilicato® foram observados achados histopatológicos semelhantes aos animais do grupo controle, com quantidade moderada de tecido ósseo neoformado (Figura 1B). No entanto, foi observado o potencial osteogênico do biomaterial, uma vez que houve grande presença de células e tecido ósseo ao redor das partículas. Interessantemente, os grupos Biosilicato® associado ao laser terapêutico e ao US demonstraram presença de infiltrado celular, porém com quantidades menores de deposição de tecido ósseo neoformado quando comparados aos grupos controle fratura e Biosilicato® (Figura 1C e 1D).

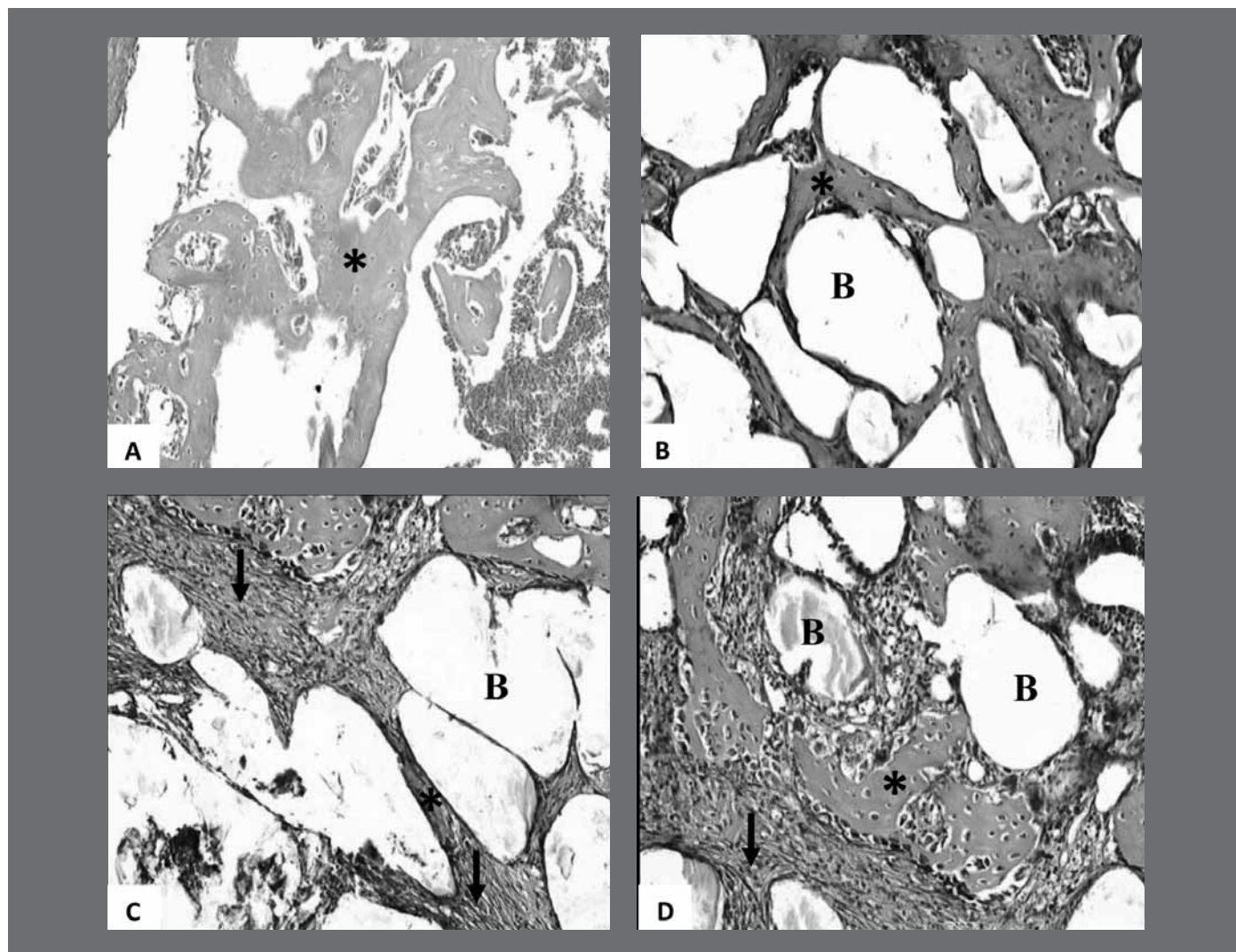


Figura 1 - Fotomicrografias dos achados morfológicos dos diferentes grupos experimentais. Pode ser observado na região do defeito, tecido de granulação (setas), tecido neoformado (*) e nos respectivos grupos a presença do biomaterial (B). (A) GCF: controle fratura; (B) GB: Biosilicato®; (C) GBUS: Biosilicato® + ultrassom; (D) GBL: Biosilicato® + laser. Coloração: H.E.

Análise morfométrica

Pode ser observado na Figura 2 que os grupos tratados com a associação do Biosilicato® e laser e Biosilicato® e US apresentaram valores significativamente menores de área de tecido ósseo neoformado quando comparados com o grupo controle sem tratamento e ao grupo tratado somente com Biosilicato®. No entanto, nenhuma diferença foi encontrada entre esses grupos.

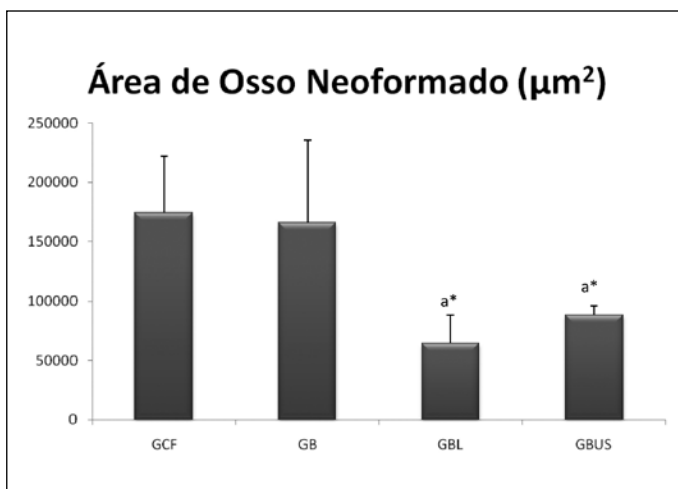


Figura 2 – Média e desvio padrão da área de osso neoformado dos diferentes grupos experimentais. a $p < 0,05$ vs. GCF; * $p < 0,05$ vs. GB. GCF: controle fratura; GB: Biosilicato®; GBL: Biosilicato® + laser; GBUS: Biosilicato® + ultrassom.

DISCUSSÃO

O uso de biomateriais para reparo ósseo tem crescido consideravelmente nos últimos anos⁽¹⁶⁾. O presente estudo evidenciou o potencial osteogênico do Biosilicato®, uma vez que foi possível observar a deposição de tecido ósseo neoformado ao redor das partículas do biomaterial. No entanto, a quantidade de tecido ósseo não foi maior que o grupo controle, possivelmente pelo curto período experimental empregado neste trabalho. Além disso, nenhuma alteração nas propriedades biomecânicas foi observada.

Neste trabalho, utilizamos um material vitrocerâmico altamente bioativo chamado Biosilicato®. É relatado na literatura que quando um material bioativo entra em contato com fluidos corpóreos, uma camada de hidroxicarbonatoapatita é formada na superfície, promovendo assim a osteogênese⁽¹⁷⁾. Estudos prévios, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, demonstraram um alto potencial osteogênico do Biosilicato®. Moura *et al*⁽⁵⁾ demonstraram que o Biosilicato® pode induzir a formação de tecido ósseo em um sistema de cultura de células osteoblásticas.

Em estudo *in vivo*, Granito *et al*⁽⁷⁾, observaram maior formação óssea em defeitos preenchidos com Biosilicato® comparado ao biovidro 45S5®, considerado atualmente o padrão ouro em materiais bioativos.

A partir dos resultados positivos do Biosilicato® no processo de reparo ósseo, foi levantada a hipótese de que o efeito deste material poderia ser potencializado pela irradiação laser e/ou a energia ultrassom. Porém, os resultados do presente estudo demonstraram que os animais que tiveram os defeitos ósseos preenchidos com Biosilicato® e expostos ao LLLT e ao US apresentaram uma diminuição significativa na quantidade de tecido neoformado quando comparados com o grupo controle.

Não é claro o mecanismo pelo qual isso ocorre. Sabe-se que o Biosilicato® é uma vitrocerâmica altamente bioativa⁽⁵⁾ e que tanto o LLLT quanto o US possuem um grande potencial osteogênico^(11,18). Uma hipótese seria que a associação destas modalidades de tratamento poderia ter provocado um excesso de estímulo no local da lesão. Além disso, parâmetros como potência, comprimento de onda e fluência podem ter influenciado nesse processo e poderiam ter inibido a migração e crescimento celular na superfície da vitrocerâmica.

Resultados similares foram encontrados por Renno *et al*⁽¹⁹⁾ que avaliaram *in vitro* os efeitos da terapia laser 830nm, 10J/cm² na proliferação de células osteoblásticas em *scaffolds* de Biosilicato®. Foi demonstrado que as células MC3T3 cresceram com sucesso em *scaffolds* compostos por Biosilicato®, com células osteoblásticas apresentando morfologia normal, e aderiram e proliferaram facilmente através da superfície dos discos. Por outro lado, a irradiação laser produziu uma diminuição em 13% na proliferação de osteoblastos (MC3T3) nos discos de Biosilicato®.

Alguns estudos recentes relatam que há aumento na osteointegração entre o tecido ósseo e os implantes seguidos de laser e do US. Em um estudo avaliando os efeitos da LLLT em implantes de hidroxiapatita, resultados satisfatórios foram encontrados. A LLLT GaAsAl 780nm promoveu maior grau de osteointegração na interface osso-hidroxiapatita, sugerindo que a LLLT pode ser considerada uma boa ferramenta para acentuar a interface osso-implante na cirurgia ortopédica⁽²⁰⁾. AboElsaad *et al*⁽²¹⁾ avaliaram os efeitos da LLLT 830nm e de implantes de vidros bioativos em defeitos

periodontais. Os resultados mostraram efeito positivo da LLLT associado com biomaterial em acelerar o reparo periodontal. Em um estudo avaliando a ação do US no crescimento ósseo em implantes de hidroxiapatita, Iwai *et al*⁽²²⁾ encontraram resultados positivos do US associado ao biomaterial. O US foi capaz de aumentar o número de osteoblastos e a quantidade de osso nos implantes de hidroxiapatita.

CONCLUSÃO

Baseados nos resultados deste estudo, podemos concluir que o Biosilicato® foi capaz de acelerar e potencializar a recuperação óssea, através da modulação do processo inflamatório e da estimulação da formação de tecido ósseo novo. No entanto, quando a LLLT ou o US foram associados, não foram encontrados resultados positivos.

REFERÊNCIAS

- Sena K, Leven RM, Mazhar K, Sumner DR, Viridi AS. Early gene response to low-intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells. *Ultrasound Med Biol*. 2005;31(5):703-8.
- Hadjjargyrou M, McLeod K, Ryaby JP, Rubin C. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;(355 Suppl):S216-29.
- 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(4):567-71.
- Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science*. 2002;295(5557):1014-7.
- Moura J, Teixeira LN, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, Beloti MM, et al. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate). *J Biomed Mater Res A*. 2007;82(3):545-57.
- FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral ailments. *Int. C. C03C10/00*, 20 Feb. 2004, WO2004/074199.
- Granito RN, Ribeiro DA, Rennó AC, Ravagnani C, Bossini PS, Peitl-Filho O, et al. Effects of biosilicate and bioglass 45S5 on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study. *J Mater Sci Mater Med*. 2009;20(12):2521-6.
- 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(4):275-80.
- Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(2):161-6.
- Liu X, Lyon R, Meier HT, Thometz J, Haworth ST. Effect of lower-level laser therapy on rabbit tibial fracture. *Photomed Laser Surg*. 2007;25(6):487-94.
- Pinheiro AL, Oliveira MG, Martins PP, Ramalho LM, Oliveira MA, Novaes Júnior A, et al. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. *Laser therapy*. 2001; 13(1):73-79.
- Takikawa S, Matsui N, Kokubu T, Tsunoda M, Fujioka H, Mizuno K, Azuma Y. Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. *J Ultrasound Med*. 2001;20(3):197-205.
- Li JK, Chang WH, Lin JC, Ruaan RC, Liu HC, Sun JS. Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. *Biomaterials*. 2003;24(13):2379-85.
- Sun JS, Tsuang YH, Lin FH, Liu HC, Tsai CZ, Chang WH. Bone defect healing enhanced by ultrasound stimulation: an in vitro tissue culture model. *J Biomed Mater Res*. 1999;46(2):253-61.
- 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(6):735-40.
- Ratner BD. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2004.
- Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc*. 1991;74(7):1487-510.
- Luger EJ, Rochkind S, Wollman Y, Kogan G, Dekel S. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers Surg Med*. 1998;22(2):97-102.
- Renno AC, McDonnell PA, Crovace MC, Zanotto ED, Laakso L. Effect of 830 nm laser phototherapy on osteoblasts grown in vitro on Biosilicate scaffolds. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(1):131-3.
- Guzzardella GA, Torricelli P, Nicoli Aldini N, Giardino R. Laser technology in orthopedics: preliminary study on low power laser therapy to improve the bone-biomaterial interface. *Int J Artif Organs*. 2001;24(12):898-902.
- AboElsaad NS, Soory M, Gadalla LM, Ragab LI, Dunne S, Zalata KR, et al. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of infra-bony defects (a clinical study). *Lasers Med Sci*. 2009;24(3):387-95.
- Iwai T, Harada Y, Imura K, Iwabuchi S, Murai J, Hiramatsu K, et al. Low-intensity pulsed ultrasound increases bone ingrowth into porous hydroxyapatite ceramic. *J Bone Miner Metab*. 2007;25(6):392-9.