

Comparação dos efeitos do laser de baixa potência e do ultrassom de baixa intensidade no processo de reparo ósseo em tíbia de rato

Comparison of the effects of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound on the process of bone repair in the rat tibia

Poliani Oliveira¹, Evandro Sperandio², Kelly R. Fernandes², Fabio A. C. Pastor³, Keico O. Nonaka⁴, Ana C. M. Renno⁵

Resumo

Contextualização: Recursos eletrofísicos, como o ultrassom (US) e a terapia laser de baixa potência (LLLT), vêm sendo cada vez mais utilizados na prática fisioterapêutica. Estudos sugerem que esses recursos são capazes de estimular a proliferação de osteoblastos e a osteogênese no local da fratura, promovendo maior deposição de massa óssea e acelerando o processo de consolidação. **Objetivo:** Analisar os efeitos do US e da LLLT no processo de consolidação óssea por meio das análises biomecânica e histológica do calo ósseo. **Métodos:** Foram utilizados 30 ratos machos, distribuídos aleatoriamente em três grupos: grupo controle fratura, sem tratamento (GC); grupo fratura tratado com US pulsado com *burst* de 1,5 MHz, 200us, 1KHz, 30 mW/cm² (GUS) e grupo fratura tratado com laser 830nm, 100mW, 120J/cm² (GL). Foram realizados defeitos ósseos circulares com broca de 2 mm de diâmetro nas tíbias dos animais. Os tratamentos foram realizados a cada 48 horas, totalizando sete aplicações e, no 14º dia, os animais foram sacrificados. A tíbia direita foi designada para análise biomecânica, enquanto a esquerda, para análise histológica. **Resultados:** A análise biomecânica não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as propriedades biomecânicas do GC, GL e GUS. Na análise morfométrica, tanto GUS quanto GL apresentaram área de osso neoformado estatisticamente maior em relação ao GC. No entanto, quando as duas modalidades de tratamento foram comparadas, não foram encontradas diferenças estatísticas entre elas. **Conclusão:** Ambos os recursos utilizados neste estudo foram capazes de acelerar o processo de reparo ósseo em ratos.

Palavras-chave: laser; ultrassom; tecido ósseo; rato.

Abstract

Background: Electrophysical agents such as Ultrasound (US) and low-level laser therapy (LLLT) have been increasingly used in physical therapy practice. Studies suggest that these devices are able to stimulate osteoblast proliferation and osteogenesis at the fracture site, resulting in a greater deposition of bone mass and speeding up the consolidation process. **Objective:** The aim of this study was to analyze the effects of US and LLLT on the bone healing process, through biomechanical and histological analysis of the bone callus. **Methods:** A total of 30 rats were randomly allocated into three groups: control group fracture without treatment (GC); fracture group treated with pulsed US, *burst* 1.5 MHz, 200us, 1KHz, 30 mW/cm² (GUS) and fracture group treated with laser 830nm, 100mW, 120J/cm² (GL). Bone defects were performed with a circular drill of 2mm in diameter in the animal's tibias. The treatments were carried out after surgery consisting of 7 applications every 48 hours. After 14 days the animals were sacrificed and the tibias were removed to perform the analysis, being the right tibia designated for biomechanical analysis, while the left tibia for histological analysis. **Results:** The biomechanical analysis showed no statistically significant difference between biomechanical properties of the CG, CL and GUS. In morphometric analysis, both GUS and GL showed a significantly higher woven bone tissue area compared to the control group. However, when the two treatment modalities were compared, there were no statistical differences between them. **Conclusion:** Both devices used in this study were able to accelerate the bone healing process in rats.

Keywords: laser; ultrasound; bone; rat.

Recebido: 03/12/2009 – **Revisado:** 05/08/2010 – **Aceito:** 14/02/2011

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil

² Fisioterapeuta

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, UFSCar

⁴ Departamento de Ciências Fisiológicas, UFSCar

⁵ Departamento de Biociências, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Santos, SP, Brasil

Correspondência para: Ana Claudia Muniz Renno, Av. Ana Costa, 95, Vila Mathias, CEP 11050-240, Santos, SP, Brasil, e-mail: a.renno@unifesp.br

Introdução

O reparo ósseo é um processo regenerativo altamente complexo que inclui a interação de uma série de eventos biológicos, como a síntese ativa de genes e a ação de um grande número de células e proteínas, que determinarão a restauração da integridade do tecido ósseo¹. No entanto, no decorrer desse processo, podem ocorrer alterações que irão culminar na deficiência da regeneração e, conseqüentemente, no atraso da consolidação e mesmo na não-união óssea. 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 pseudoartrose¹.

Dentro desse contexto, vários avanços biofísicos e bioquímicos 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 regeneração². Dentre eles, podem ser citados os efeitos de tratamentos, como a aplicação de proteínas ósseas morfogenéticas, materiais bioativos e o uso de campos eletromagnéticos. Mais recentemente, vem se destacando a utilização do ultrassom (US) de baixa intensidade e do laser terapêutico de baixa potência (LLLT)³.

A LLLT tem se destacado pelos seus efeitos positivos no metabolismo ósseo e na consolidação de fraturas^{4,6}. Os efeitos dessa terapia são relatados por diversos autores. Renno et al.⁴ e Stein et al.⁷ mostraram um aumento significativo na proliferação de osteoblastos após irradiação com laser 830 nm, 20 J/cm². Além disso, o laser parece acelerar o processo de reparo da fratura e causar aumento no volume do calo e densidade mineral óssea^{8,9}. Pinheiro et al.¹⁰ mostraram que o laser (830 nm, 40 mW, 4,8 J/cm²) foi capaz de aumentar a quantidade de tecido ósseo mineralizado em fraturas induzidas em fêmures de ratos.

O US de baixa intensidade também é um recurso que vem se destacando devido a seu grande potencial osteogênico¹¹. Vários autores demonstraram a eficiência do US 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 em comparação com o grupo controle. Esses mesmos resultados foram encontrados por Sun et al.¹⁴ e Lirani-Galvão et al.⁹.

De acordo com o exposto acima, o US e a LLLT vêm surgindo como alternativas promissoras no tratamento de fraturas ósseas. Tais recursos, além de apresentarem um grande potencial osteogênico, constituem métodos de tratamento não-invasivos e apresentam um custo relativamente baixo. No entanto, existem controvérsias em relação aos melhores parâmetros a serem utilizados para a obtenção de um resultado eficaz no tecido ósseo após a aplicação do US e da LLLT. Além

disso, estudos que comparam os efeitos dos dois recursos no processo de consolidação são escassos na literatura. Dentro desse contexto, este trabalho tem como objetivo verificar os efeitos do US e da LLLT no processo de consolidação óssea em ratos a partir da análise biomecânica e da histológica.

Materiais e métodos

Foram utilizados, neste estudo, 30 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), onde receberam ração comum e água à vontade. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil (Parecer 023/2006).

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em três grupos (n=10): grupo controle com fratura (GC), os ratos foram submetidos ao defeito ósseo, porém sem tratamento; grupo laser (GL), os ratos foram submetidos ao defeito ósseo e foram tratados com laser de 120 J/cm², e grupo US (GUS), os ratos foram submetidos ao defeito ósseo e foram tratados com US.

Para a realização dos defeitos ósseos, os ratos foram anestesiados, de acordo com o peso corporal, com uma mistura de Ketamina (União Química Farmacêutica Nacional S/A, Brasil) e Xilasina (Laboratórios Calier S.A, Brasil) (80/10 mg/Kg). Tanto a tíbia direita quanto a esquerda foram submetidas ao procedimento cirúrgico. Após anestesia, tricotomia e assepsia da área a ser operada, realizou-se uma incisão na pele, na região medial, para expor a tíbia. Com a ajuda de uma minifuradeira, com broca de 2,0 mm de diâmetro, irrigada com soro fisiológico, foram realizados defeitos ósseos no terço médio da tíbia (10 mm abaixo da articulação do joelho) (Figura 1). Finalizando, o músculo e a pele foram suturados com fio de náilon monofilamentar 4.0 e distância de 1 cm entre os pontos,

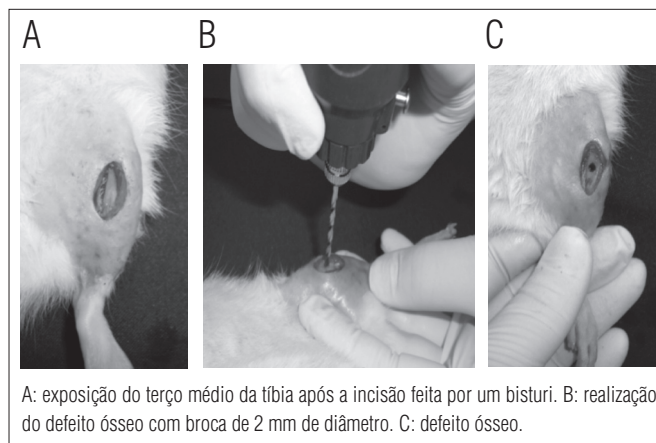


Figura 1. Fotos da cirurgia.

e foi feita a limpeza local. Os animais foram mantidos com livre acesso a água e comida até o momento do sacrifício.

Tratamentos

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 830 nm, emissão contínua, potência de saída de 100 mW, densidade de potência de 3,57 W/cm², área do feixe de 0,028 cm², divergência de 1,5°. A aplicação foi realizada em ambas as tíbias, utilizando a técnica pontual em apenas um ponto sobre a fratura, sendo a caneta do equipamento posicionada perpendicularmente ao tecido. A fluência utilizada foi de 120 J/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 1,5 MHz, com largura de pulso de 200us, frequência de repetição de pulso de 1 KHz e intensidade de 30 mW/cm², durante 20 minutos.

Ambos 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. A aplicação foi realizada em ambas as tíbias.

Eutanásia

No décimo quarto dias após o procedimento experimental, os animais sofreram eutanásia por meio de uma dose letal de anestésico, injetado por via intraperitoneal. As tíbias foram retiradas, e o tecido mole foi removido para posteriores análises. A tíbia direita foi designada para análise biomecânica, enquanto a esquerda, para a análise histológica. As análises foram realizadas com dez amostras de cada grupo.

Análise biomecânica

A análise biomecânica foi realizada por meio do teste de flexão de três pontos, o qual 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 1 KN e pré-carga de 5 N. Foi utilizado um suporte de metal de 3,8 cm de comprimento, expondo somente 1,8 cm do corpo de prova. As tíbias foram posicionadas com a região do

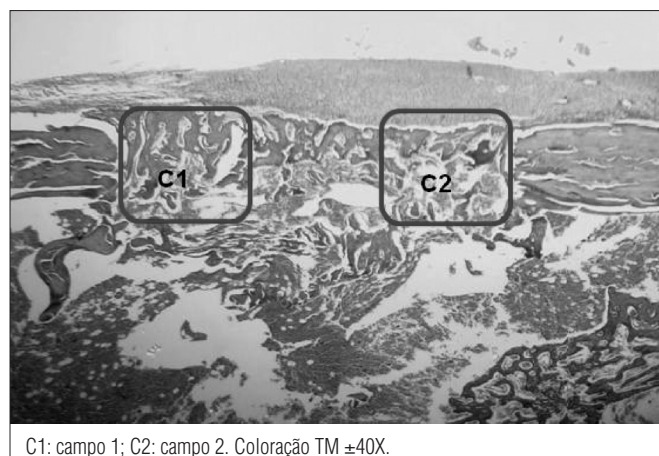
defeito voltada para baixo, de modo a submeter essa região a uma tração de acordo com o modelo utilizado no trabalho de Lirani-Galvão et al.⁹. A partir desse teste, foram obtidas as seguintes variáveis: carga máxima (KN), resiliência (J) e tenacidade (J).

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 processadas em parafina. Os blocos de parafina foram cortados longitudinalmente com espessura padronizada de 5,0 µm, e lâminas histológicas foram confeccionadas. Os cortes foram então corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para a análise qualitativa e com Tricômio 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 histológica qualitativa foi realizada por meio de um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan). 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 com as lâminas coradas com TM utilizando um sistema de análise de imagem Motican 5.0. As lâminas foram observadas em duas áreas da região cortical do defeito, as quais foram selecionadas e nomeadas C1 e C2, correspondendo às regiões próximas à parede do defeito, localizadas na área cortical superior e inferior dele (Figura 2). Nessa coloração, o tecido ósseo neoformado cora em azul, sendo possível mensurar toda a área de osso neoformado. As áreas foram registradas na objetiva de 10X. Depois de registradas, elas foram somadas, resultando no total da área de tecido ósseo neoformado do defeito.



C1: campo 1; C2: campo 2. Coloração TM ±40X.

Figura 2. Esquema da padronização dos campos selecionados nos cortes histológicos para a morfometria.

Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas, tais como tabelas e gráficos, na forma de médias e desvios-padrão. O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi utilizado para todas as variáveis e, na comparação entre os grupos, o teste 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

Na Tabela 1, apresentam-se as médias e desvios-padrão das propriedades biomecânicas de todos os grupos experimentais. Pela análise estatística, não se observou nenhuma diferença significativa entre os três grupos após o período de 14 dias.

Análise histológica qualitativa

No GC, observou-se presença moderada de tecido ósseo neoformado no interior dos defeitos. Não se observou presença de processo inflamatório (Figura 3A). Nos grupos tratados com LLLT e US, resultados semelhantes foram encontrados. Em ambos os grupos, observou-se grande quantidade de tecido ósseo neoformado, além da presença de união extensa de trabéculas grossas definidas na maior parte da região da lesão (Figura 3B e 3C). Não se observou presença de processo inflamatório. Além disso, os grupos tratados apresentaram organização tecidual superior ao GC.

Análise morfométrica

Pode-se observar, na Figura 4, que o GL e o GUS apresentaram valores estatisticamente significativos da área de tecido ósseo neoformado quando comparados com o GC sem tratamento. No entanto, não se encontrou nenhuma diferença na comparação entre esses grupos.

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

Grupo	Carga máxima (KN)	Resiliência (J)	Tenacidade (J)
GC	0,064±0,020	0,029±0,012	0,057±0,011
GUS	0,056±0,012	0,022±0,010	0,034±0,013
GL	0,056±0,009	0,018±0,007	0,055±0,019

GC=controle fratura; GUS=ultrassom; GL=laser; n=10/grupo.

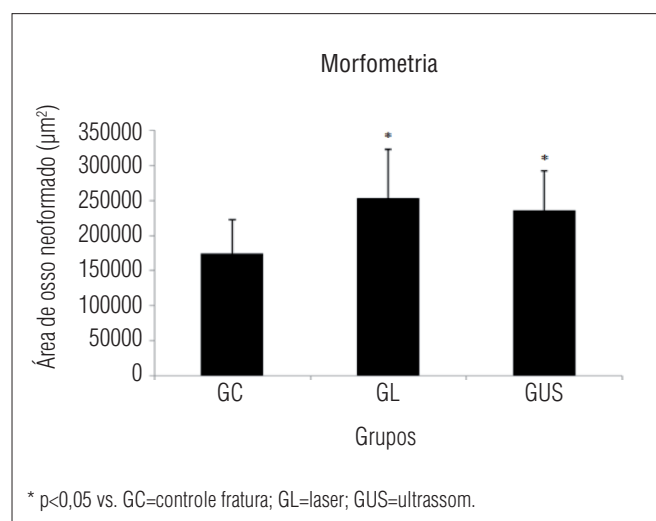
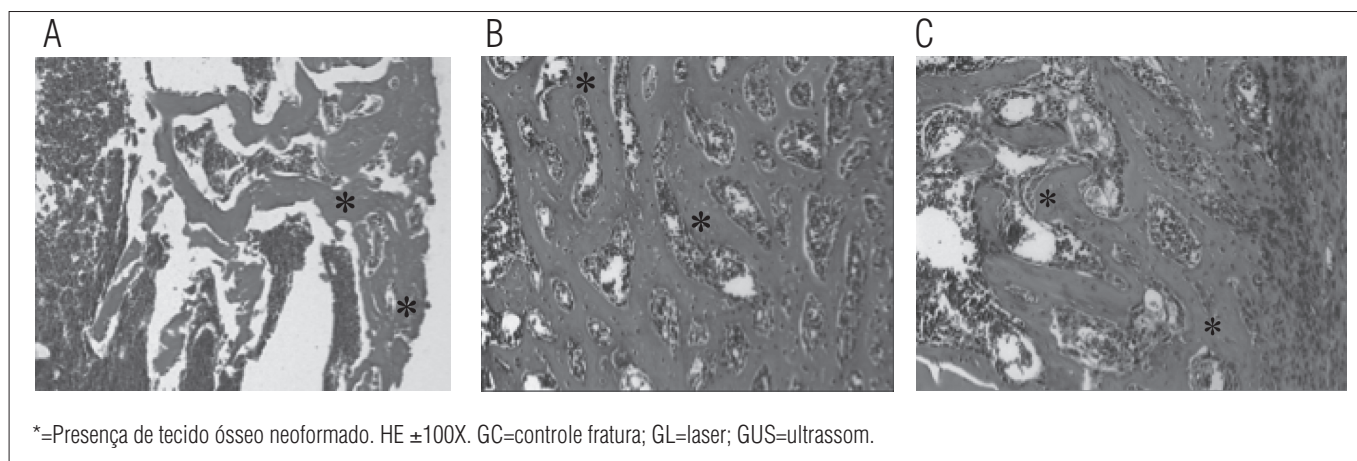


Figura 4. Média e desvio-padrão da área de osso neoformado dos diferentes grupos experimentais.



*=Presença de tecido ósseo neoformado. HE ±100X. GC=controle fratura; GL=laser; GUS=ultrassom.

Figura 3. Defeito ósseo do GC (A); GL (B) e GUS (C).

Discussão

O presente estudo demonstrou, por meio das análises histológicas, que tanto o laser terapêutico quanto o US de baixa intensidade foram capazes de estimular o processo de reparo ósseo após a indução do defeito em tíbias de ratos. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre esses dois recursos; ainda, não houve modificações nas propriedades mecânicas do calo ósseo dos animais tratados.

Diversos estudos relatam que o laser é capaz de contribuir para a aceleração do processo de reparação óssea. Merli et al.¹⁵ encontraram resultados positivos após aplicação de laser (Ga-As-Al 670 nm, 15 mW) em defeitos ósseos. Após 14 dias, os autores encontraram um aumento da área de tecido ósseo neoformado no grupo tratado com laser quando comparado ao grupo controle. A aceleração do processo de reparação óssea também foi encontrada em outros estudos, como o realizado por Pretel et al.¹⁶ e Pinheiro et al.¹⁰, utilizando o laser As-Ga-Al (830 nm, contínuo, 40 mW, 57, 6 J/cm²).

Resultado semelhante foi encontrado por Matsumoto et al.¹⁷, que utilizaram o laser Ga-As-Al, 735 nm, contínuo, 16 J/cm², na reparação do defeito ósseo na tíbia de ratos, com tratamento realizado de 48 em 48h por sete, 14 e 21 dias. Obteve-se, como resultado, que o laser foi capaz de aumentar a área de tecido ósseo neoformado na região do defeito ósseo após 14 dias da cirurgia.

Os efeitos do US no processo de consolidação óssea também têm sido amplamente investigados e, de acordo com diversos autores, esse recurso parece estimular o metabolismo ósseo. Freeman et al.¹⁸ utilizaram a tomografia computadorizada para investigar os efeitos do US na remodelação durante o reparo da fratura óssea no fêmur de ratos. Foi encontrado que, no grupo US, houve um aumento significativo na neoformação óssea na região da fratura. Ainda, Gebauer et al.¹⁹ evidenciaram que o US 30 mW/cm², 1,5 MHz foi eficaz para aumentar a resistência óssea em ratos diabéticos.

Apesar dos efeitos positivos do US e do laser, como estimulação do processo de reparo ósseo, encontrados na análise histológica, nenhuma modificação biomecânica foi encontrada. Pode-se sugerir que o tempo pós-cirurgia não tenha

sido suficiente para resultar em modificações nas propriedades biomecânicas. Shakouri et al.²⁰ também não encontraram aumento das propriedades biomecânicas após o uso do US de baixa intensidade, 30 mW/cm², no processo de reparo ósseo em fraturas de tíbias de coelhos. No estudo, foram realizadas osteotomias na tíbia de 30 coelhos, tratados com US por oito semanas. A tomografia computadorizada revelou que houve um aumento da densidade mineral óssea no grupo US comparado com o controle. No entanto, nenhuma diferença estatística foi encontrada nas propriedades biomecânicas. Da mesma forma, Otremski et al.²¹ não encontraram evidências de aumento da rigidez e do torque máximo após irradiação com laser HeNe 632 nm.

Há, na literatura, uma escassez de estudos que comparem essas duas modalidades terapêuticas. Em estudo comparativo, em que foram avaliados os efeitos do laser e do US em culturas de fibroblastos, observou-se que ambos promoveram mudanças celulares²². No entanto, em estudo semelhante realizado por De Oliveira et al.²³, observou-se maior proliferação celular em culturas de fibroblastos irradiados com laser, em que ele pareceu ser mais eficaz.

Diante disso, há a necessidade de novos estudos *in vivo* para analisar os efeitos dessas duas modalidades de tratamento no tecido ósseo. Com isso, nosso trabalho pode ser considerado de grande importância, assim como o estudo realizado por Lirani-Galvão et al.⁹, que comparou os efeitos do LLLT (Ga-Al-As laser, 780 nm, 30 mW, 112,5 J/cm²) e do US pulsado de baixa intensidade (LIPUS) (1,5 MHz, 30 mW/cm²). Nesse estudo, os autores encontraram que ambos os agentes físicos promoveram mudanças na reparação óssea, mas em diferentes fases de reparo. O LIPUS aumentou a reparação promovendo a reabsorção óssea na área fraturada, enquanto o LLLT acelerou esse processo por meio da formação óssea e do aumento da resistência máxima quando comparado aos grupos controle e LIPUS.

Baseado nos resultados deste estudo, pode-se concluir que tanto o laser terapêutico quanto o US de baixa intensidade foram capazes de aumentar a área de tecido ósseo neoformado, acelerando o processo de reparo ósseo após a indução do defeito em tíbias de ratos.

Referências

1. 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.
2. Hadjiargyrou M, McLeod K, Ryaby JP, Rubin C. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;(355 Suppl):S216-29.
3. 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.
4. Renno ACM, 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.
5. 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.
6. 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(4):347-354.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. Pinheiro ALB, Oliveira MG, Martins PPM, Ramalho LMP, Oliveira MAM, Novaes Junior A, et al. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. *Laser Therapy.* 2001;13:73-9.
 11. Gam AN, Johannsen F. Ultrasound therapy in musculoskeletal disorders: a meta-analysis. *Pain.* 1995;63(1):85-91.
 12. 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;20:197-205.
 13. Lia 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.
 14. 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.
 15. Merli LA, Santos MT, Genovese WJ, Faloppa F. Effect of low-intensity laser irradiation on the processo of bone repair. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(2):212-5.
 16. Pretel H, Lizarelli RF, Ramalho LT. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. *Lasers Surg Med.* 2007;39(10):788-96.
 17. Matsumoto MA, Ferino RV, Monteleone GF, Ribeiro DA. Low-level laser therapy modulates cyclooxygenase-2 expression during bone repair in rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24(2):195-201.
 18. Freeman TA, Patel P, Parvizi J, Antoci V Jr, Shapiro IM. Micro-CT analysis with multiple thresholds allows detection of bone formation and resorption during ultrasound-treated fracture healing. *J Orthop Res.* 2009;27(5):673-9.
 19. 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(3):587-92.
 20. Shakouri K, Eftekharsadat B, Oskuie MR, Soleimanpour J, Tarzarni MK, Salekzamani Y, et al. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on fracture callus mineral density and flexural strength in rabbit tibial fresh fracture. *J Orthop Sci.* 2010;15(2):240-4.
 21. Otremski I, Irga D, Edelstein S, Ornoy A, Newman R. Does laser irradiation effect fracture healing? *Med. Laser Appl.* 2004;19(3):146-9.
 22. Oliveira DA, De Oliveira RF, Magini M, Zangaro RA, Soares CP. Assessment of cytoskeleton and endoplasmic reticulum of fibroblast cells subjected to low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(3):461-6.
 23. De Oliveira RF, Oliveira DA, Monteiro W, Zangaro RA, Magini M, Soares CP. Comparison between the effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasonic irradiation *in vitro*. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(1):6-9.