



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS APÓS IRRADIAÇÃO
SEQUENCIAL EM BAIXA INTENSIDADE POR DOIS COMPRIMENTOS DE
ONDA (660 E 780 nm)**

ANADÉLIA ALVES DE LIMA RISO

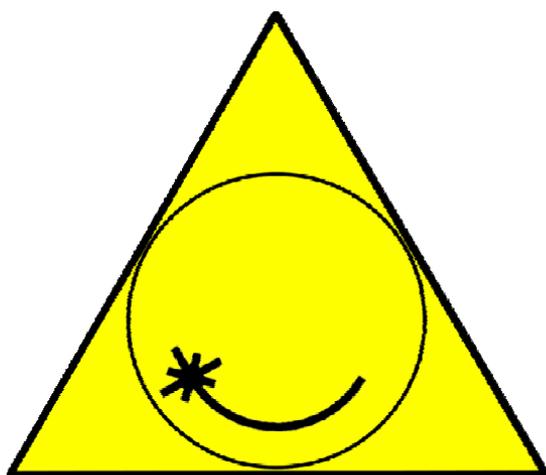
**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre Profissional em Lasers em
Odontologia**

**Orientadora:
Profa. Dra. Fernanda de Paula Eduardo**

**Co-orientadora:
Profa. Dra. Martha Marques Ferreira
Vieira**

**SÃO PAULO
2009**





MESTRADO PROFISSIONALIZANTE DE *LASER* EM
ODONTOLOGIA

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS APÓS IRRADIAÇÃO
SEQUENCIAL EM BAIXA INTENSIDADE POR DOIS COMPRIMENTOS DE
ONDA (660 E 780 nm)**

ANADÉLIA ALVES DE LIMA RISO

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre Profissional em Lasers em
Odontologia**

**Orientadora:
Profa. Dra. Fernanda de Paula Eduardo**

**Co-orientadora:
Profa. Dra. Martha Marques Ferreira
Vieira**

**SÃO PAULO
2009**

Dedico esse trabalho aos meus pais e em especial a minha mãe Raquel pelo o incentivo. Da mesma forma dedico ao Thiago (@tecnopedagogia.com) pelo apoio e conhecimento transmitido.

AGRADECIMENTOS

A todo corpo docente do curso que através da transmissão dos conhecimentos específicos tornaram possível esse trabalho.

Ao IPEN e FOUSP que disponibilizaram a infraestrutura necessária para a execução dos experimentos.

A Profa. Dra. Fernanda de Paula Eduardo pelo companheirismo e proatividade na orientação das atividades.

A Profa. Dra. Martha Marques Ferreira Vieira pelo auxílio na escrita e leitura crítica do trabalho.

A Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro pela disposição na discussão das ideias.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Bombana e Profa. Dra. Márcia M. Marques pela autorização do uso dos equipamentos do laboratório.

Ao laboratório de pesquisa básica Prof. Edmir Matson e toda a sua equipe.

A Profa. Dra. Luciane Hiramatsu Azevedo na execução do experimento.

Ao GAB/FOUSP- Grupo de Apoio em Bioestatística da Faculdade de Odontologia da USP e a Profa. Dra. Miriam Lacalle Turbino pela ajuda na análise dos resultados obtidos através dos experimentos.

Obrigada.

PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS APÓS IRRADIAÇÃO SEQUENCIAL EM BAIXA INTENSIDADE POR DOIS COMPRIMENTOS DE ONDA (660 E 780 nm)

ANADÉLIA ALVES DE LIMA RISO

RESUMO

O efeito bioestimulante da fototerapia com laser em baixa intensidade sobre as células de fibroblastos está evidente na literatura, baseado na realização de vários estudos *in vitro* utilizando diferentes parâmetros com comprimentos de onda localizados na região do vermelho ou infravermelho do espectro eletromagnético. O objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos da biomodulação em cultura de fibroblastos (FMM1) utilizando radiação em dois comprimentos de onda diferentes, separadamente e de forma seqüencial imediata. Os grupos experimentais foram: G1 (660 nm/ 3 J/cm²), G2 (780 nm/ 3 J/cm²), G3 (660 nm/ 3 J/cm²+780 nm/ 3 J/cm²), G4 (780 nm/ 3 J/cm²+660 nm/ 3 J/cm²), C SFB (soro fetal bovino) 10% e C SFB 5%. As irradiações foram realizadas com o laser de GaAlAs (modo pontual e 4,0 mm²). Duas irradiações foram realizadas com intervalo de 6 horas. A viabilidade celular foi obtida pelo teste de redução do MTT. Após 20 horas da última irradiação, a viabilidade celular de culturas irradiadas crescidas em déficit nutricional foi significativamente maior que aquela de culturas não irradiadas e crescidas nas mesmas condições (SFB 5%). Com base nos parâmetros utilizados pudemos observar que a curva de crescimento de células irradiadas foi similar às culturas mantidas sob condição nutricional ideal (SFB 10%). Comparando os parâmetros utilizados, somente no primeiro tempo experimental houve maior proliferação celular quando utilizado 660+780nm; após 20 horas todos os grupos irradiados tiveram curvas de crescimento similares. A fototerapia estimula a proliferação de fibroblastos mantidos em déficit nutricional, independente do comprimento de onda utilizado, sendo este efeito mais pronunciado nas primeiras 14 horas quando associados os comprimentos de onda 660+780nm.

FIBROBLASTS VIABILITY AND PROLIFERATION FOLLOWING LOW INTENSITY SEQUENTIAL IRRADIATION BY TWO WAVELENGTHS (660 AND 780 nm)

ANADÉLIA ALVES DE LIMA RISO

ABSTRACT

Low intensity phototherapy biomodulation effects on fibroblasts cells are evident in the literature, based on several *in vitro* studies employing distinct wavelengths in the red and infrared region. The purpose of this work was to compare the biomodulation effect on fibroblasts culture (FMM1) using two different wavelengths, separately and in a sequential mode, without interval. The experimental groups were: G1 (660 nm/ 3 J/cm²), G2 (780 nm/ 3 J/cm²), G3 (660 nm/ 3 J/cm²+780 nm/ 3 J/cm²), G4 (780 nm/ 3 J/cm²+660 nm/ 3 J/cm²), C+ and C-. The irradiations were done applying the GaAlAs laser in the punctual mode, spot area 4.0 mm². Two irradiations were done with six hours interval. The cell viability was obtained employing the MTT reduction test. Twenty hours after the final irradiation, the cell viability of the irradiated culture grown under nutritional deficit condition was significantly higher than for the ones not irradiated and grown under the same conditions (FBS 5%). It was also observed that depending on the applied parameters the irradiated cells growth was similar to the ones for the cultures kept under ideal nutritional conditions (FBS 10%). Comparing the employed parameters, only for the first experimental time there was higher cell proliferation when using 660+780nm; after twenty hours all irradiated groups presented similar growth curves. These results evidence that phototherapy promotes the fibroblasts proliferation when kept under nutritional deficit, no matter the applied wavelength, being this effect more pronounced during the first fourteen hours when associated to the sequential irradiation 660+780nm.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVO.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 Comprimento de Onda.....	16
3.2 Fluência.....	19
3.3 Reparação Tecidual.....	20
3.4 Fibroblasto X FLBI.....	24
4 METODOLOGIA.....	25
4.1 Cultura de Células.....	25
4.2 Laser.....	27
4.3 Experimentos.....	28
4.4 Grupos Experimentais.....	29
4.5 Análise de Crescimento Celular.....	31
4.6 Análise Estatística.....	32
5 RESULTADOS.....	33
6 DISCUSSÃO.....	37
7 CONCLUSÃO.....	40
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Parâmetros da irradiação.....	28
TABELA 2	Disposição das amostras na placa de cultivo celular.....	30

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1	Espectro de absorção de monocamadas de fibroblastos humanos..... 17
FIGURA 2	Esquema da organela mitocôndria..... 17
FIGURA 3	Processo de reparação tecidual..... 22
FIGURA 4	Fibroblastos na margem da incisão..... 23
FIGURA 5	Processo de organização do exsudato..... 23
FIGURA 6	Diferenciação dos fibroblastos..... 24
FIGURA 7	Cultivo celular..... 26
FIGURA 8	Incubadora CO₂..... 26
FIGURA 9	Laser de diodo..... 27
FIGURA 10	Padronização dos experimentos..... 29
FIGURA 11	Placas com poços..... 30
FIGURA 12	Espectrofotômetro ELISA..... 32
FIGURA 13	Curvas de crescimento das culturas de FMM1 submetidos ou não à irradiação, mantidas em déficit nutricional (SFB 5%), exceto Controle + (SFB 10%)..... 34
FIGURA 14	Atividade mitocondrial das culturas de FMM1 mantidas em DME suplementado por duas concentrações diferentes de SFB..... 35
FIGURA 15	Atividade mitocondrial das culturas de FMM1 mantidas sob condição nutricional regular (SFB 10%) não irradiadas em relação às culturas crescidas sob déficit nutricional (SFB 5%) irradiadas..... 35
FIGURA 16	Atividade mitocondrial das culturas de FMM1 mantidas em déficit nutricional (SFB 5%) submetidas à irradiação laser em relação às culturas crescidas sob as mesmas condições nutricionais e irradiadas..... 36
FIGURA 17	Atividade mitocondrial das culturas de FMM1 mantidas em déficit nutricional (SFB 5%) e irradiadas com diferentes comprimentos de onda..... 36

LISTA DE SIGLAS

ATP - Trifosfato de adenosina

ADP - Difosfato de adenosina

DME - Meio de cultura mínimo Dubelco

EDTA - Ácido etilenodiano tetra-acético

FLBI - Fototerapia com Laser em Baixa Intensidade

PBSA - Solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio

SFB - Soro Fetal Bovino

1 INTRODUÇÃO

Laser é um acrônimo de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, ou Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação, sendo uma fonte de radiação eletromagnética com características peculiares (monocromaticidade, coerência e unidirecionalidade) que a diferenciam das demais fontes de luz.

Os fótons emitidos pelo laser interagem com os átomos e moléculas do tecido alvo e reações biológicas são desencadeadas. Dentre estas reações pode-se observar uma fotodestruição ou fotoativação tecidual, determinadas pelo efeito fotoquímico, fototérmico e fotomecânico do laser. De acordo com o efeito podemos classificar a terapia laser em baixa ou alta intensidade.

A radiação emitida por um laser de alta potência normalmente causa a fotodestruição celular devido à elevação de temperatura do alvo irradiado.

O efeito térmico não ocorre quando o tecido humano é exposto à radiação em baixa intensidade, com uma taxa de fluência de alguns mW/cm^2 . Nesta situação, observam-se os efeitos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos, os quais são responsáveis pela biomodulação, ou seja, pelo aumento ou diminuição da atividade metabólica da área irradiada.¹⁻⁴

A fototerapia com laser em baixa intensidade (FLBI) é atualmente muito utilizada em várias áreas da Odontologia.

Certas funções celulares podem ser estimuladas quando a luz interage com as células ou tecidos, se administrada na dose adequada.¹⁻¹¹ Este efeito é mais pronunciado sobre órgãos ou tecidos enfraquecidos, tais como em pacientes que sofrem algum tipo de desordem funcional ou de injúrias ao

tecido.^{6,7,12} Acredita-se que a energia da luz laser é melhor aproveitada onde é mais necessária.¹³

A FLBI tem efeito bioestimulante em cultura de células *in vitro*^{6,8,9}, e *in vivo* acelera a reparação tecidual.^{10,11}

A biomodulação *in vitro* pela FLBI depende dos parâmetros de irradiação,^{1,5,14} tais como o comprimento de onda, a fluência⁵ e a potência.^{5,9,15} Parâmetros similares podem ter efeitos diferentes em cultura de células. Parâmetros que estimulam o crescimento celular podem inibir a síntese protéica.^{16,17} Por essa razão, é importante que seja realizada a correta combinação de parâmetros (como comprimento de onda, energia, potência, fluência e taxa de fluência) para se alcançar o efeito desejado no paciente.

Várias pesquisas estão sendo realizadas *in vitro*, apresentando como vantagem a possibilidade de se isolar uma parte específica do processo da interação do laser em baixa intensidade com o tecido biológico.¹⁸

Diferentes comprimentos de onda podem produzir diferentes efeitos nos fibroblastos. Na literatura, estudos comparam os efeitos do laser quando usado no infravermelho próximo e no visível, porém há controvérsias. Alguns estudos apontam que a proliferação dos fibroblastos é mais efetiva quando essas células são irradiadas com comprimento de onda no visível;^{19,20} outros apontam melhores resultados se usada a radiação no infravermelho.^{6,21} Existe estudo, utilizando a mesma fluência para ambos comprimentos de onda, que não aponta diferença significativa entre os grupos estudados.¹⁴

Não existe relato na literatura quanto à associação de dois comprimentos de onda utilizados sequencialmente no crescimento celular, o que levou ao objetivo deste trabalho, que é tentar estabelecer se há uma diferença entre

culturas de fibroblastos irradiadas com baixas intensidades por dois comprimentos de onda (660 e 780nm) sequenciais e verificar a proliferação e viabilidade celular.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo *in vitro* é analisar a proliferação e a viabilidade de fibroblastos de gengiva humana submetidos à FLBI e irradiados separadamente e de forma sequencial imediata por dois diferentes comprimentos de onda (660 e 780nm).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Comprimento de onda

Os lasers em baixa intensidade, GaAIAs e InGaAl, do tipo semicondutores, são os mais utilizados na Odontologia, pela possibilidade de emissão de forma contínua em temperatura ambiente. Esses lasers têm comprimentos de onda que variam na faixa do vermelho até o infravermelho do espectro eletromagnético.

A monocromaticidade do laser determina a absorção seletiva por parte dos cromóforos; este fenômeno é conhecido como ressonância à uma determinada frequência. Logo, cada comprimento de onda terá um tipo de interação de acordo com o tecido irradiado, sendo que diferentes comprimentos de onda apresentam diferentes coeficientes de absorção para um mesmo tecido.¹⁸

A ação do laser sobre as células varia de acordo com a posição que sua emissão ocupa no espectro eletromagnético, sendo diferenciada conforme os comprimentos de onda (infravermelho e visível) utilizados.²²

O gráfico (FIG.1) ilustra a ressonância existente entre as células de fibroblastos e os comprimentos de onda. Nota-se que existe absorção dos comprimentos de onda 660 e 780 nm pelos fibroblastos.

As mitocôndrias (FIG.2) são organelas que produzem a energia necessária para o funcionamento da célula. A matriz da mitocôndria tem enzimas essenciais para as reações usadas na geração de energia e partículas de síntese do trifosfato de adenosina (ATP). A energia fica armazenada sob

forma de ATP; sendo necessário, este se converte em difosfato de adenosina (ADP), alterando o ciclo de Krebs, produzindo fosforização oxidativa e a liberação de energia para a célula. ²

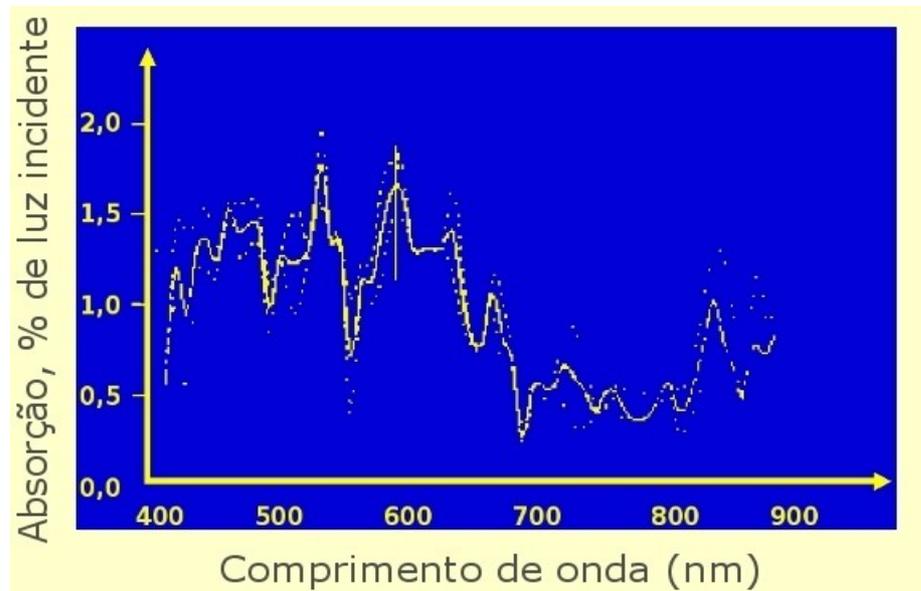


FIGURA 1 - Espectro de absorção de monocamadas de fibroblastos humanos. ¹

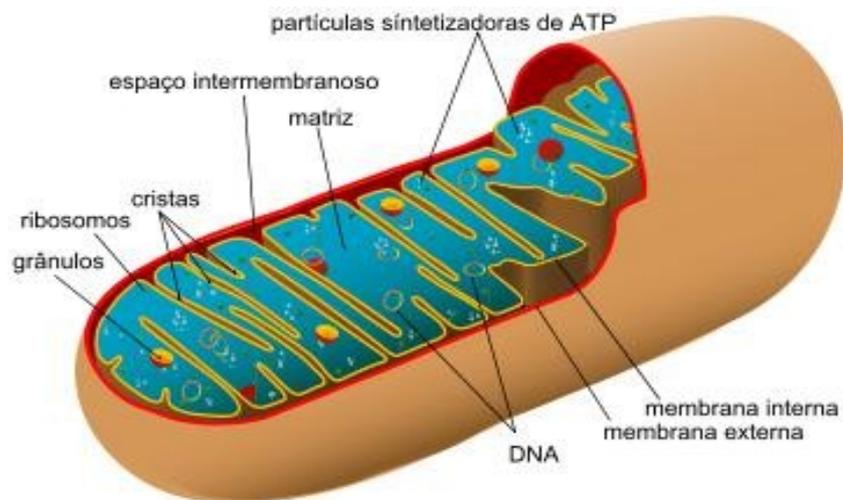


FIGURA 2 - Esquema da organela mitocôndria.

¹ van Breugel, 1992

Entre as várias hipóteses sobre o mecanismo de ação da FLBI, podemos citar o modelo de Karu,²³ no qual a luz visível causa mudanças fotoquímicas nos fotorreceptores das mitocôndrias, que alteram o metabolismo, conduzindo à transdução e amplificação do sinal a outras partes da célula (incluindo membranas) e como resultado final a fotorresposta.

A absorção da radiação visível por um sistema biológico causa reação fotoquímica.²³ Entretanto, a radiação emitida na região do infravermelho do espectro eletromagnético não é absorvida por organelas; apenas as membranas respondem a este estímulo, o qual resulta em rotações e vibrações moleculares. Assim, não se espera que este tipo de radiação cause mudanças químicas nas moléculas.^{1,24} Os efeitos fotofísicos provenientes da interação da membrana com a energia dos fótons no infravermelho, causam choques entre as células que se traduzem intracelularmente por um incremento de síntese de ATP.^{18,24}

Smith sugere que a radiação infravermelha através dos efeitos fotofísicos nas membranas (provavelmente nos canais de Ca^{++}) desencadeie uma cascata de eventos metabólicos, resultando na mesma resposta final: a biomodulação.^{1, 25}

Karu discutiu a enzima citocromo C oxidase como possível fotoaceitador, quando as células são irradiadas com luz laser no intervalo do visível ao infravermelho próximo. Foram propostos cinco mecanismos primários, relacionados ao estado redox celular:

- Mudanças nas propriedades redox dos componentes da cadeia respiratória após excitação dos seus estados eletrônicos.

- Liberação de óxido nítrico (NO) do centro catalítico do citocromo c oxidase,
- Formação de oxigênio singlete,
- Aquecimento transitório local de cromóforos absorvedores,
- Aumento da produção de ânion superóxido com aumento subsequente na concentração dos produtos de sua dismutação, H_2O_2 .

A oxidação foi associada à estimulação da vitalidade celular e a redução à inibição. Isto talvez explique o porquê do efeito laser ser mais pronunciado em células injuriadas. Estas células possuem o pH mais baixo que o normal, onde o estado redox é alterado em direção reduzida e foram consideradas mais sensíveis à ação estimuladora da radiação laser. ^{1, 26, 27}

A energia dos fótons emitida por um laser, se absorvida por uma célula provoca mudanças físicas ou químicas, as quais desencadeiam uma cascata bioquímica de reações, que não precisam de posterior ativação de luz e que ocorrem no escuro (transdução), tendo como consequência a fotorresposta celular, caracterizada pela proliferação ou diferenciação celular ou síntese de proteína. ^{1, 23}

3.2 Fluência

A irradiação laser pode modificar o processo celular dependendo da fluência utilizada; portanto, a fluência é um parâmetro relevante para a biomodulação celular.

Estudos relatam que uma fluência entre 1 - 5 J/cm² estimula a atividade mitocondrial, proliferação, viabilidade e a normalização da função celular.^{5, 28-32} Em contra partida, altas fluências (10 e 16 J/cm²)²⁸⁻³¹ são caracterizadas pela redução da viabilidade celular com dano significativo à membrana celular e ao DNA.

O efeito estimulante da irradiação laser sobre os fibroblastos injuriados pode ser observado com as seguintes fluências: uma única irradiação com 5 J/cm²; duas ou três irradiações de 2,5 J/cm² com intervalo entre elas. Porém, múltiplas exposições de 16 J/cm² resultam em estresse adicional com redução da migração, da viabilidade celular e da atividade de ATP e inibição da proliferação dos fibroblastos.³³

Uma única irradiação com fluência de 3 J/cm² tem influência significativa sobre a proliferação de células epiteliais e troncos.¹² Melhores resultados foram observados na biomodulação das fibras colágenas quando utilizadas fluências de 4 J/cm² em relação a 8 J/cm².³⁵

3.3 Reparação Tecidual

A reparação tecidual é um processo complexo que envolve atividade local e sistêmica do organismo. As células perdidas ou destruídas são substituídas por células vitais. Estas células novas podem ser derivadas ou do parênquima (regeneração) ou do estroma do tecido conetivo lesado (cicatrização).³ Os eventos da cicatrização tecidual podem ser classicamente divididos em três fases: a fase da inflamação, fase de formação de tecido de granulação com depósito de matriz extracelular e a

remodelação tecidual. ^{18,36} Essas fases não são mutuamente exclusivas, e sim sobrepostas no tempo. (FIG. 3)

A cicatrização pode ser considerada como primária, isto é, aquela que ocorre quando as margens da ferida são tecnicamente coaptadas por suturas, ou secundária, quando ocorre perda do tecido impedindo a coaptação. Os fibroblastos são uma das células diretamente envolvidas nesse complexo processo. ²⁴

O plano básico do processo de cicatrização, de uma maneira geral, é sempre o mesmo: preencher espaço lesionado e selá-lo com uma cicatriz. Os detalhes a respeito da forma como isso irá evoluir, entretanto, variam segundo a presença ou ausência de bactérias, a natureza da ferida, o grau de suprimento sanguíneo, a quantidade de tecido morto para ser eliminado, o tipo de tecido lesado, entre outros fatores. ²¹

No primeiro dia pós-operatório de uma cicatrização por primeira intenção, há formação de uma crosta na linha incisional, devido ao acúmulo e ressecamento do coágulo e presença de infiltrado inflamatório agudo nas margens da lesão.

No segundo dia, ocorrem a reepitelização da superfície e formação de pontes fibrosas subepiteliais. Os fibroblastos da margem da incisão se hipertrofiam e desenvolvem aumento de basofilia. (FIG. 4)

A partir do terceiro dia, inicia-se o processo de organização do exsudato. A resposta inflamatória aguda minimiza e os neutrófilos são substituídos por macrófagos, que debridam a margem cirúrgica de células destruídas. (FIG.5)

O espaço da incisão é preenchido por tecido conetivo fibroblástico, frouxo e altamente vascularizado. Os fibroblastos ativados estão em plena diferenciação. Em resposta aos fatores de crescimento eles se multiplicam e produzem fibras colágenas, primeiramente colágeno do tipo III. Eles também secretam proteoglicanas e fibras elásticas. Ao fim da primeira semana, a região está coberta com um tecido superficial e a fenda subepitelial é atravessada por pontes de tecido conetivo vascularizado, o que torna possível a formação de fibrilas colágenas.

Ocorre uma contínua proliferação de fibroblastos e vasos sanguíneos e um acúmulo progressivo de colágeno, (FIG. 6) além do declínio do processo inflamatório agudo e da presença de macrófagos, gerando a hemostasia da região.

Na cicatrização por segunda intenção, a fenda é preenchida primeiramente por um tecido de granulação com intensa infusão de macrófagos e neutrófilos o qual se contrai e torna-se uma cicatriz. ³

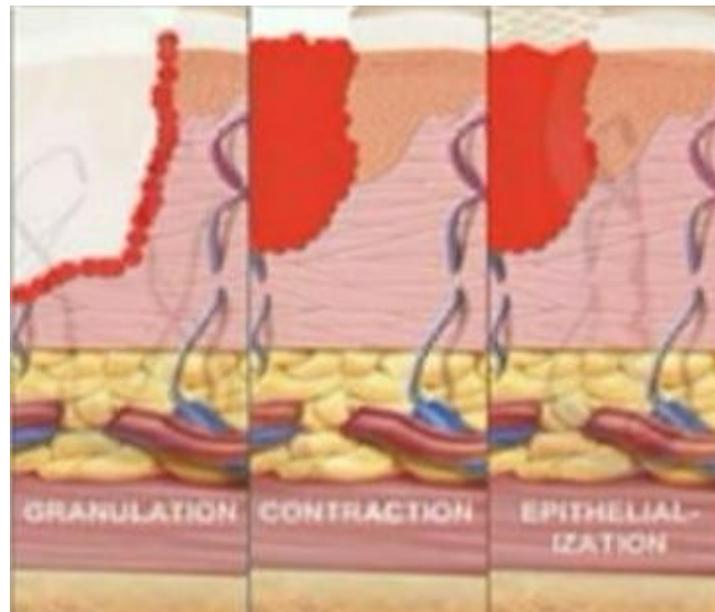


FIGURA 3 – Processo de reparação tecidual

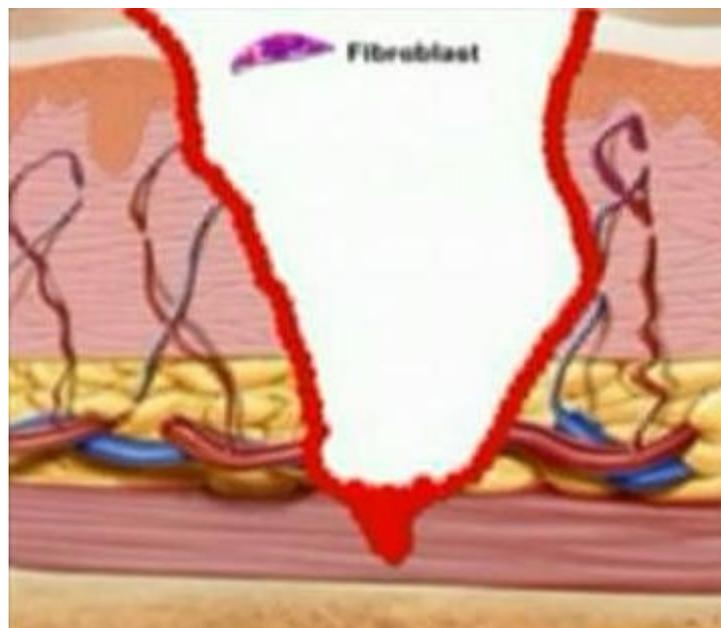


FIGURA 4 – Fibroblastos na margem da incisão

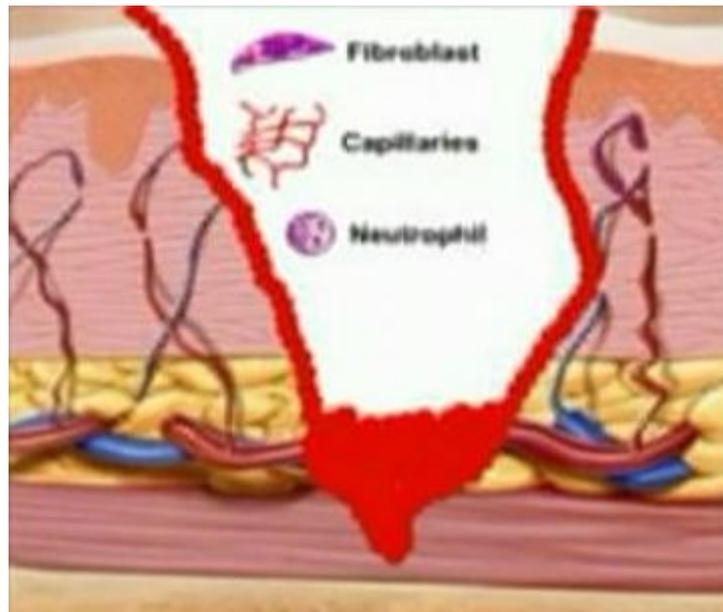


FIGURA 5 – Processo de organização do exsudato.

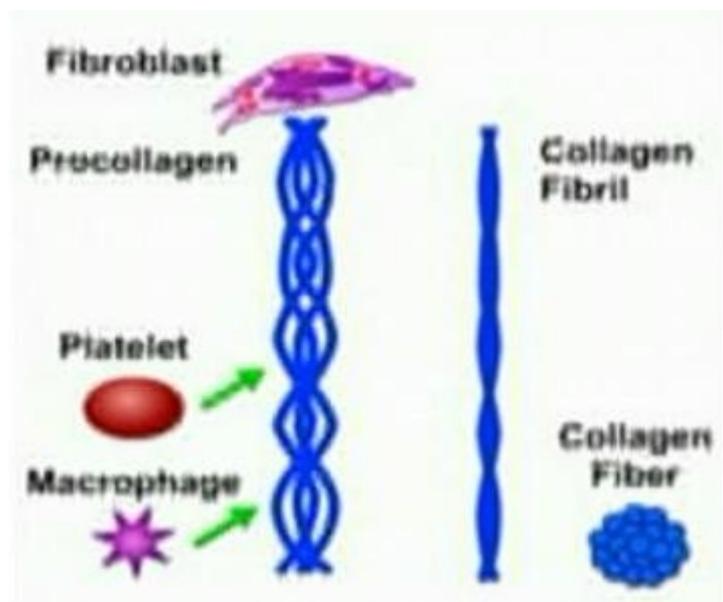


FIGURA 6 – Diferenciação dos fibroblastos²

² <http://www.youtube.com/watch?v=u7Ryg9nVFLI> em 26/11/08

3.4 Fibroblastos X FLBI

A FLBI estimula, através do aumento na concentração de ATP, a proliferação de fibroblastos, com conseqüente aumento na produção de fibras colágenas; estimula, também, a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, que se relacionam diretamente ao fechamento da ferida e a liberação de fatores de crescimento celular é favorecida. ^{6,8,16,22,32,34,37} Esta modalidade terapêutica pode proporcionar efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e bioestimulantes (ou biomoduladores), aumentando a microcirculação da área irradiada, promovendo melhores condições de reparação. ²²

Os efeitos terapêuticos da FLBI poderiam ser explicados por um aumento da proliferação de células, ou por mudanças na atividade fisiológica de células excitáveis. ²⁹

4. METODOLOGIA

4.1 Cultura de Células

O material para o cultivo celular foi obtido a partir de linhagem celular FMM1 (células de fibroblastos de gengiva humana).

As células de fibroblastos foram crescidas a 37°C em meio de cultura mínimo Dubelco (DME, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e suplementadas por 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (Penicilina G cristalina 100 U/ml e Estreptomicina 0,1 mg/ml). (FIG.7) As células foram mantidas em semi-confluência, a fim de se prevenir a diferenciação, em atmosfera umidificada a 5% CO₂.^{12,35} (FIG.8)

O cultivo celular foi realizado durante 5 dias. Para a subcultura, o meio de crescimento foi decantado e, a seguir, a monocamada celular foi lavada com solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA) e colocada solução de tripsina (1:250, Difco) a 0,25% associada com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,02% pH 8,0, para o desprendimento das células. Quando as células apresentavam-se desprendidas, foram centrifugadas. Após a centrifugação foi formado o *pellet* e as células foram ressuspendidas em 3 ml de DME de crescimento, igual ao DME de manutenção, porém com 10% SFB e distribuídas em novas garrafas e tubos de cultura. As culturas foram mantidas em posição estacionária em estufa a 37°C.

Depois de cultivados, os fibroblastos foram plaqueados, utilizando DME com SFB a 5% em todas as amostras, exceto controle positivo. Esta

concentração foi escolhida, pois os efeitos da FLBI sobre o crescimento da cultura celular são perceptíveis quando as culturas são crescidas em déficit nutricional. ^{6,8,9,12} Esta situação *in vitro* é comparável com as condições de stress *in vivo*, nas quais a FLBI se mostra mais efetiva.

Em estudos anteriores foi demonstrado que quando as células são crescidas em DME suplementado com concentração reduzida de SFB, o índice de crescimento é reduzido. ^{6,8,9,12}

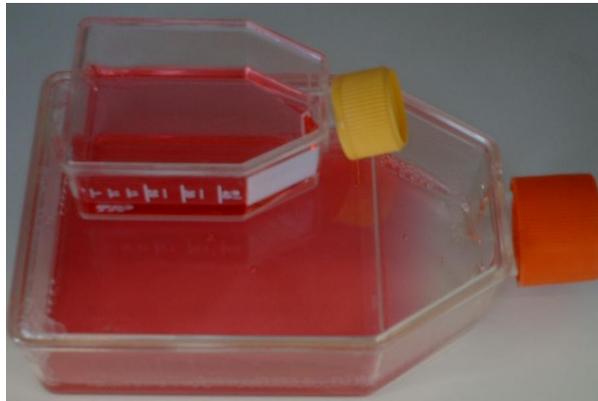


FIGURA 7 – Cultivo celular



FIGURA 8 – Incubadora CO₂

4.2 Laser

O equipamento utilizado foi o laser de diodo (MMOPTICS Ltda, São Carlos, S.P. Brasil) composto por duas ponteiros, sendo uma responsável por emissão vermelha - 660nm (AlGaInP) com até 40 mW de potência e, outra por emissão infravermelho - 780 nm (GaAlAs) com até 70 mW de potência. A área de emissão em ambas as ponteiros é 0,04 cm². (FIG. 9)



FIGURA 9 – Laser de diodo

Antes e após cada irradiação, a emissão laser teve sua potência aferida por um medidor de potência (*powermeter* da marca Coherent). O valor da emissão foi ajustado para os valores desejados por meio do medidor de

potência e não pelo valor apresentado no painel de controle do equipamento.

Todos os procedimentos com o laser foram realizados seguindo todas as normas de segurança NBR/IEC 601.2.22 e IEC 60825-1/2001-8.³⁸

4.3 Experimentos

Os experimentos foram desenhados de maneira padronizada (FIG.10). Sabendo-se que a distância entre o laser e a superfície de irradiação é crítica, essa distância entre o feixe laser e as células foi mantida constante. A irradiação com o laser seguiu os parâmetros descritos na TAB.1, e foi feita através da base das placas de cultivo celular, portanto, o feixe laser foi irradiado diretamente na monocamada celular. As placas são compostas por poliestireno transparente e têm menos de 1 mm de espessura. A área cultivável das placas é de 3 mm². A placa foi acomodada dentro de uma máscara escura, deixando exposta somente a área a ser irradiada. Todos os grupos experimentais foram submetidos às mesmas condições de estresse ambiental, tais como: temperatura, umidade e luz.

A primeira irradiação foi realizada após 4 horas do plaqueamento, tempo hábil para a formação do tapete e aderência celular. Foram realizadas duas irradiações para cada grupo experimental. O intervalo entre as irradiações foi de 6 horas.⁹

TABELA 1. Parâmetros da irradiação

Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Modo de irradiação	Área de irradiação (mm ²)	Tempo de irradiação (s)	Exposição radiante (J/cm ²)
660	40	Contato e pontual	4	3	3
780	40	Contato e pontual	4	3	3

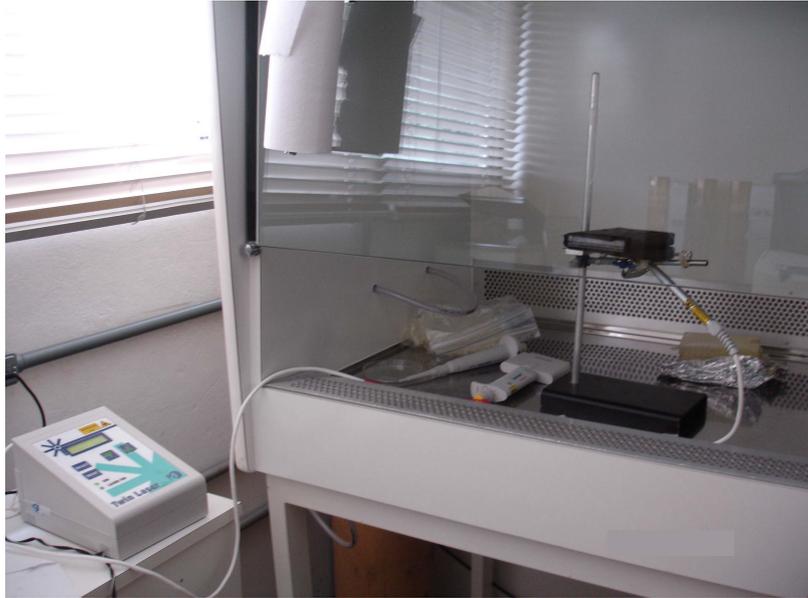


FIGURA 10 – Padronização dos experimentos.

4.4 Grupos Experimentais

Os grupos experimentais são:

- **Controle SFB 10%**
- **Controle SFB 5%**
- **Grupo 1:** 660 nm/ 3 J/cm²
- **Grupo 2:** 780 nm/ 3 J/cm²
- **Grupo 3:** 660 nm/ 3 J/cm² + 780 nm/ 3 J/cm² - As células foram irradiadas de forma seqüencial imediata por esses dois comprimentos de onda.
- **Grupo 4:** 780 nm/ 3 J/cm² + 660 nm/ 3 J/cm² - As células foram irradiadas de forma seqüencial imediata por esses dois comprimentos de onda

Foram plaqueadas 1 x 10⁴ células por poço de placas de 96 poços.

(FIG.11)

Foram utilizadas 4 placas de 96 poços, sendo que 24 poços de cada placa receberam 1×10^4 células em meio fresco. Esse número de poços foi suficiente para analisar em quadruplicata a atividade mitocondrial das células dos 6 grupos experimentais, em 4 tempos (14, 20, 26 e 38 horas) após a última irradiação.

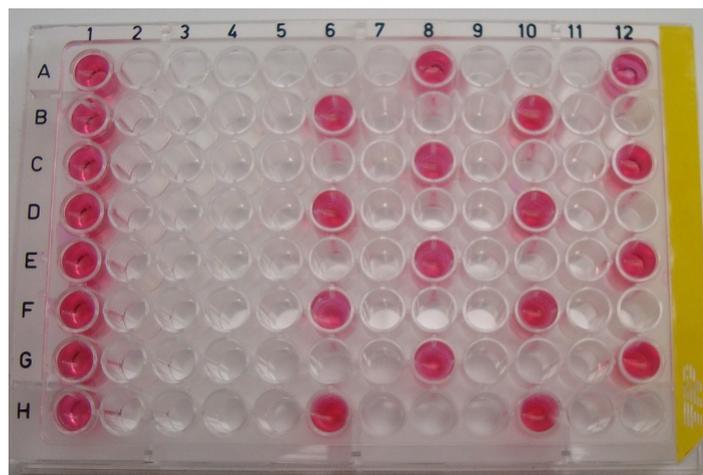


FIGURA 11 – Placas com poços.

As amostras foram distribuídas conforme TAB.2 sendo mantida a distância de um poço entre as amostras irradiadas, a fim de se evitar irradiação secundária.

TABELA 2. Disposição das amostras na placa de cultivo celular

	Coluna 1	Coluna 6	Coluna 8	Coluna 10	Coluna 12
4 poços	SFB 10%		780 nm		780 + 660 nm
4 poços	SFB 5%	660 nm		660 + 780 nm	
Grupo	Controle	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4

4.5 Análise do Crescimento Celular

Os dados do crescimento celular foram obtidos através da análise da viabilidade celular. Essa análise se baseia no teste de atividade mitocondrial das células pelo método da redução do MTT (brometo de 3- (dimetiltiazol-2-yl) 2,5-difeniltetrazólio). Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é insolúvel em água, em um formazan solúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado e então, sua concentração é determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de 562 nm. Para a realização do teste foram preparados os reagentes A e B. O reagente A é composto por 0,05 g de MTT (CalBioChem, Canadá) em 10 ml de PBSA e o reagente B, constituído por 1 g de SDS (dodecil sulfato de sódio; QBioGene, EUA) em 10 ml de 0,01 M de HCl (ácido clorídrico).

Os meios de cultura dos poços foram aspirados e substituídos por 100 µl de meio DME fresco. Foi adicionado 10 µl do reagente A em cada poço, incluindo os poços sem células, que serviram de controle negativo para a leitura no espectrofotômetro, bem como de espaços entre os poços que serão irradiados ou não. Depois de 4 h de incubação com o reagente A, em estufa a 37°C e protegido da luz com folha de papel alumínio, 100 µl do reagente B foi adicionado a cada poço. Usando pipetador multicanal essa solução foi gentilmente homogeneizada.

As culturas retornaram para incubação em estufa a 37°C onde permaneceram durante a noite, também protegidas de luz. Decorrido esse período as culturas foram misturadas gentilmente novamente com auxílio de pipetador multicanal e levadas para leitura de sua absorbância em espectrofotômetro ELISA (Amersham Biosciences, Biotrak II, Ing). (FIG.12)



FIGURA 12 – Espectrofotômetro ELISA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da FOUSP (Parecer nº45/2008).

4.6 Análise Estatística

Os dados de densidade óptica, ou seja, de viabilidade celular, obtidos em quadruplicata foram apresentados como média \pm o erro do desvio padrão (SEM). Os dados foram tratados pelo teste Kolmogorov-Smirnov para análise da normalidade, e pelo teste paramétrico ANOVA. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

Todos os grupos, irradiados ou não, independente da condição nutricional, apresentaram aumento da atividade mitocondrial nos tempos 14 e 20 horas. Porém, esse mesmo comportamento não foi observado nos tempos 26 e 38 horas. (FIG. 13), o que pode ser explicado por uma confluência celular, caracterizada pela redução da atividade mitocondrial. ⁹

Por esse motivo, foram analisados os resultados apenas dos tempos experimentais 14 e 20 horas.

As células FMM1 foram mantidas em DME suplementado por diferentes concentrações de SFB (5 e 10%), com a finalidade de verificar a influência da condição nutricional no processo de proliferação celular e determinar a concentração sorológica apropriada para os experimentos com o laser. As curvas de crescimento estão representadas na FIG.14. A atividade mitocondrial foi significativamente maior ($p \leq 0,05$) em culturas suplementadas com SFB 10%.

Na FIG.15, comparamos a atividade mitocondrial das células cultivadas em condição nutricional ideal (SFB 10%) com as células submetidas à irradiação (SFB 5%). No tempo 14 horas, observamos que as células irradiadas pelos comprimentos de ondas 780nm (G2) e 660+780nm (G3) tiveram atividade mitocondrial similar às culturas mantidas em condições ideais. No tempo 20 horas, esse mesmo comportamento continua ocorrendo com o G3 e G1 (660nm).

Mantendo-se o déficit nutricional em todas as amostras (FIG.16), observamos que nas primeiras 14 horas, as culturas de FMM1 submetidas à irradiação com comprimentos de onda 780 nm (G2), 660+780nm (G3) e 780+660nm (G4) tiveram um aumento da atividade mitocondrial estatisticamente significativa quando relacionado ao Controle SFB 5%. Após 20 horas todos os grupos irradiados tiveram curvas de crescimento significativamente maiores que as do Controle SFB 5%.

Na FIG.17 observamos o comportamento das culturas de FMM1 irradiadas. No tempo 14 horas, notamos uma atividade mitocondrial significativamente maior quando as células são submetidas à irradiação com os comprimentos de onda 660+780nm (G3) em relação ao 660nm (G1) e 780+660nm (G4). No tempo 20 horas, não houve diferença na proliferação entre as culturas irradiadas por comprimentos de onda diferentes.

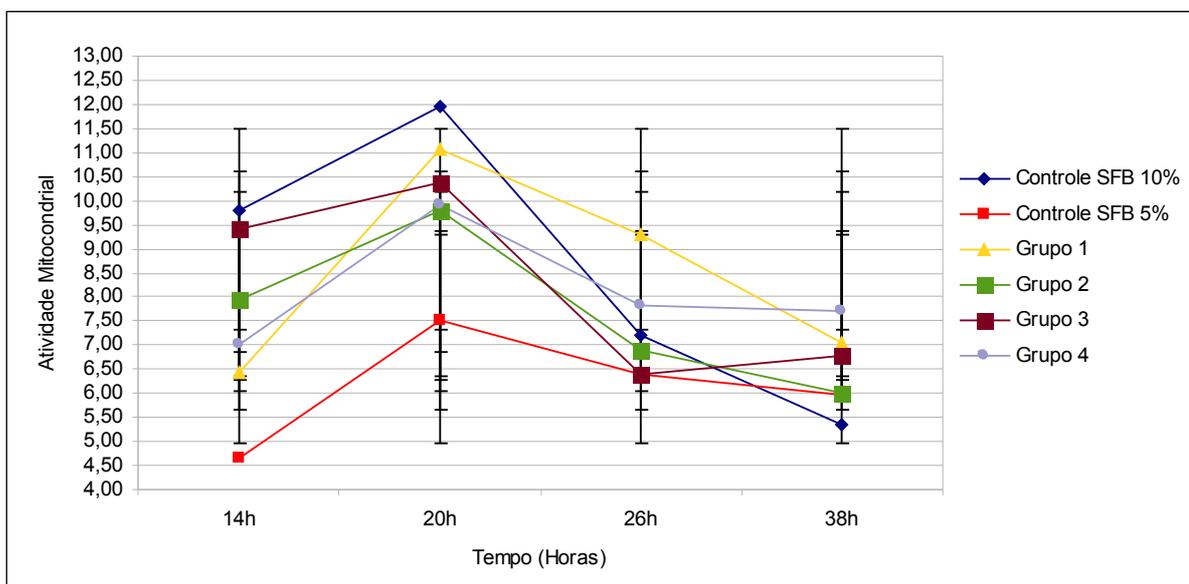


FIGURA 13 – Curvas de crescimento das culturas de FMM1 submetidos ou não à irradiação, mantidas em déficit nutricional (SFB 5%), exceto Controle + (SFB 10%)

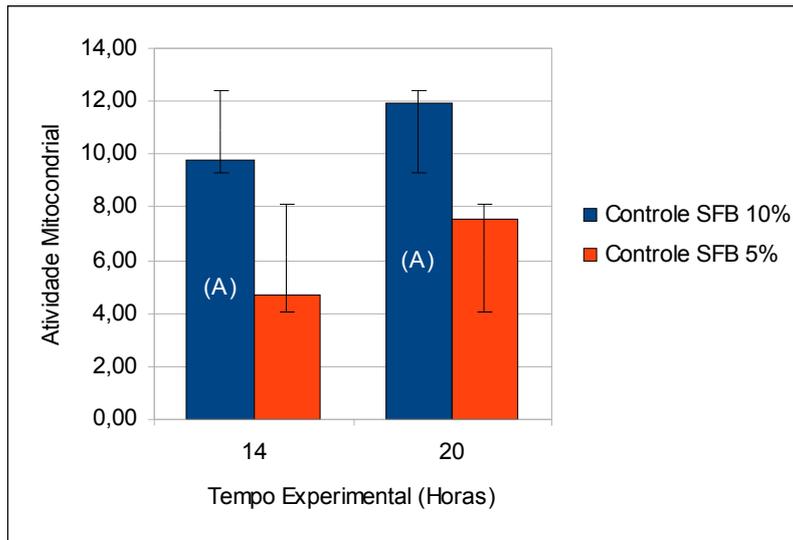


FIGURA 14 – As colunas representam a atividade mitocondrial das culturas de FMM1 mantidas em DME suplementado por duas concentrações diferentes de SFB. (A) indica a diferença estatística significativa entre os grupos no mesmo tempo experimental.

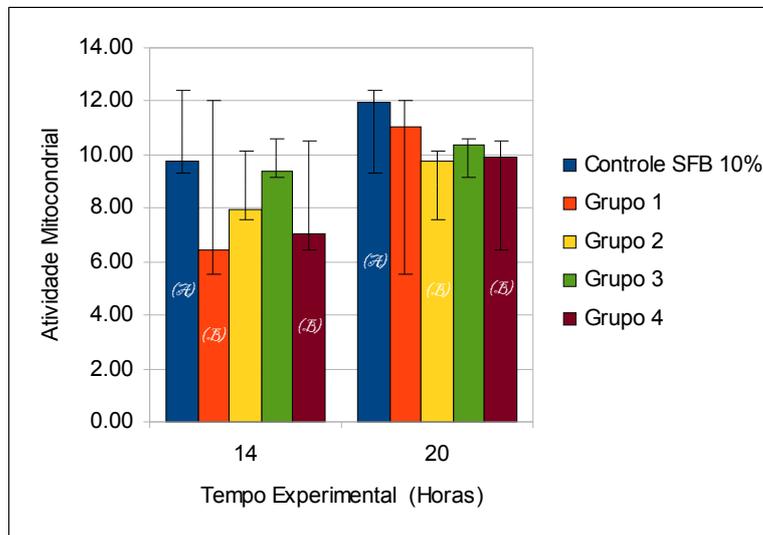


FIGURA 15 – Atividade mitocondrial das culturas de FMM1 mantidas sob condição nutricional regular (SFB 10%) não irradiadas em relação às culturas crescidas sob déficit nutricional (SFB 5%) irradiadas. Letras diferentes representam a diferença estatística entre os outros grupos no mesmo tempo experimental.

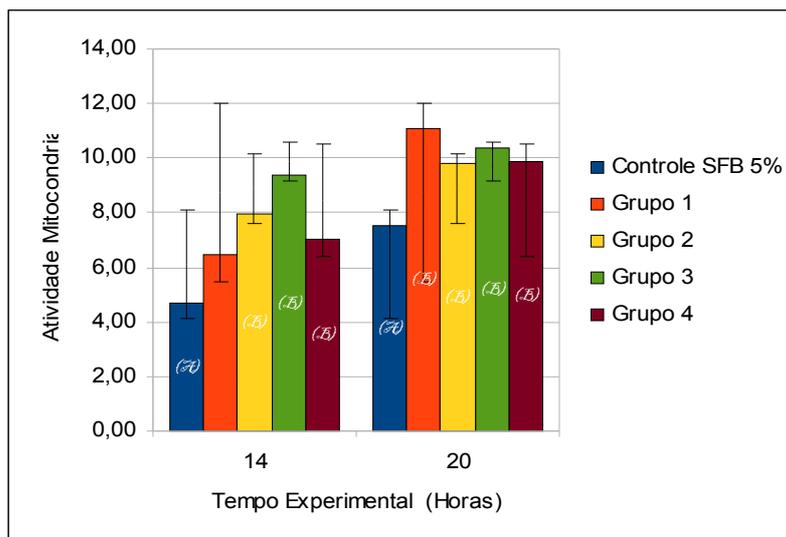


FIGURA 16 – Atividade mitocondrial das culturas de FMM1 mantidas em déficit nutricional (SFB 5%) submetidas à irradiação laser em relação às culturas crescidas sob as mesmas condições nutricionais e irradiadas. Letras diferentes representam a diferença estatística entre os grupos no mesmo tempo experimental.

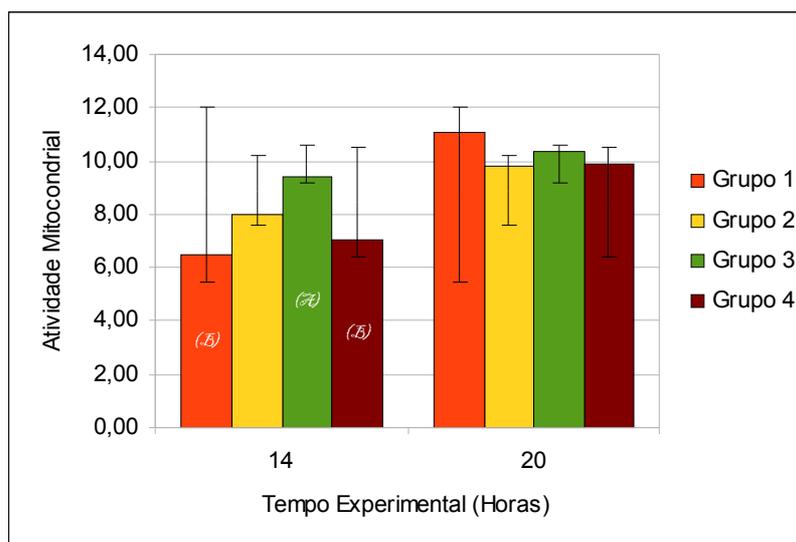


FIGURA 17 – Atividade mitocondrial das culturas de FMM1 mantidas em déficit nutricional (SFB 5%) e irradiadas com diferentes comprimentos de onda. Letras diferentes representam a diferença significativa do G3 em relação aos outros grupos no mesmo tempo experimental.

6. DISCUSSÃO

Existem limites biológicos para os efeitos da FLBI: a proliferação não pode ser estimulada em células que estão com crescimento rápido; nem todas as funções celulares podem ser ativadas; nem todas as células dos tecidos ou em culturas respondem à irradiação exatamente da mesma forma.¹⁴

Porém, a ação da FLBI sobre as células mesenquimais, em especial os fibroblastos, está bem estabelecida. Ela tem efeito de estimular o crescimento destas células. Nos estudos *in vitro* a energia laser estimula as células que estão em condições de crescimento precário no momento da irradiação,⁷ portanto esse efeito é particularmente evidente se a células estiverem com suas funções debilitadas. Em cultivo celular isso é conseguido quando se utiliza células em déficit nutricional.^{6,8,9,12}

Pretendendo simular a condição de uma célula normal e de uma debilitada, comparou-se a atividade mitocondrial das células mantidas em DME suplementado com SFB 10% e 5%, respectivamente. Observou-se que, nos dois tempos analisados, as culturas de FMM1 crescidas em SFB 5% tiveram menor proliferação estatisticamente significativa do que aquelas crescidas sob condições ideais de nutrição (SFB 10%), resultado que concorda com a Literatura.^{6,8,9,12,35}

Foram realizadas duas irradiações para cada parâmetro estabelecido, uma vez que o efeito benéfico desejado ocorre de maneira mais evidente quando as irradiações são repetidas.⁹ Nos estudos *in vivo*, normalmente o intervalo entre as irradiações é de 24 horas. No entanto, células em cultura apresentam um índice de divisão celular muito mais rápido que aquele observado no corpo

humano e para simular a repetição das irradiações *in vivo* foi utilizado (*in vitro*) o tempo de 6 horas, o qual já havia sido determinado em estudos anteriores.⁹

23

A FLBI é capaz de aumentar a atividade mitocondrial e conseqüentemente o crescimento de células de fibroblastos em culturas crescidas em déficit nutricional. Neste estudo, verificou-se este efeito da FLBI nos dois tempos experimentais; no tempo 14 horas foi possível obter um crescimento das células do G3 e G4 (SFB 5% e irradiadas) similar àquele das células crescidas nas condições ideais de cultivo (SFB 10%). O mesmo comportamento ocorreu com as células do G1 e G3 no tempo 20 horas

Comparando as curvas de crescimento de células FMM1 irradiadas nos quatro parâmetros utilizados foi possível, no tempo experimental 20 horas, observar diferenças significativas com relação ao controle não irradiado e mantido, também, em déficit nutricional. No tempo 14 horas não houve diferença relacionando o controle (SFB 5%) com o G1 (660nm), mas para os demais grupos o crescimento foi evidente. Estes resultados concordam com a literatura, tendo sido observado o efeito da FLBI intensificando as funções celulares quando estas se encontram sob condições de estresse.^{5,10}

Alguns estudos identificaram uma maior atividade mitocondrial quando as culturas são irradiadas com comprimento de onda infravermelho,^{6, 21} enquanto outros apontaram esse resultado quando as mesmas são irradiadas com o vermelho.^{19,20} E ainda há aquele que, considerado somente este parâmetro, não apresentou diferenças significantes entre os grupos irradiados.

¹⁴ No tempo 20 horas, quando utilizadas as irradiações com comprimentos de onda no vermelho, infravermelho ou com a combinação dos dois

comprimentos, os grupos irradiados não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Entretanto, neste estudo, células irradiadas com 660+780nm (G3) no tempo 14 horas apresentaram maior atividade mitocondrial do que aquelas irradiadas com 660nm (G1) e 780+660nm (G4). Poderia se argumentar que o G3 apresentou maior crescimento que o G1 devido ao número duplicado de irradiações; porém o G4 teve o mesmo número de irradiações que o G3, sendo alterada somente a ordem dos comprimentos de onda.

Sabe-se que a irradiação no comprimento de onda do visível é absorvida pelos fotorreceptores das mitocôndrias resultando em efeitos fotoquímicos, enquanto que a irradiação infravermelha é absorvida pelas membranas celulares causando os efeitos fotofísicos. Ambos efeitos desencadeiam uma cascata de eventos metabólicos, que têm como resposta final a biomodulação. Neste contexto surge uma dúvida: Se as membranas celulares forem estimuladas pela irradiação laser antes das mitocôndrias, a produção e conversão de ATP mitocondrial ficariam comprometidas?

Novos estudos precisam ser realizados a fim de esclarecer a diferença dos resultados, principalmente no que se refere à ordem de aplicação dos comprimentos de onda utilizados.

7 CONCLUSÃO

Tendo por base os resultados da presente pesquisa, dentro das condições e parâmetros laser utilizados, e na metodologia de avaliação, podemos concluir que:

A FLBI estimula a proliferação de células de fibroblastos mantidas em déficit nutricional, independente do comprimento de onda utilizado.

Este estímulo é mais pronunciado após 14 horas da última irradiação quando associados os comprimentos de onda 660 e 780 nm respectivamente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. RIBEIRO, M. S.; ZECELL, D. M. Laser de baixa intensidade. In: GUTKNECHT, N.; EDUARDO, C. P. A Odontologia e o laser – Atuação do laser na especialidade odontológica. Quintessence editora Ltda, 2004. São Paulo – SP.
2. MELLO, J. B.; MELLO, G. P. S.; MELLO, L. S. Laser de baixa potência. In: MELLO, J. B.; MELLO, G. P. S. Laser em Odontologia. Livraria Santos editora, 1ed, 2001, São Paulo, SP.
3. GENOVESSE, W. J. Laser de Baixa Intensidade – Aplicações Terapêuticas em Odontologia. São Paulo, S.P.: Livraria Santos Editora, 2007.
4. BRUGNERA JÚNIOR, A.; SANTOS, A. E. C. G.; BOLOGNA, E. D.; LADALARDO, T. C. C. G. P. Atlas de Laserterapia Aplicada à Clínica Odontológica. 1. ed. São Paulo, S.P.: Livraria Editora Santos, 2007.
5. AZEVEDO, H. L.; EDUARDO, F. P.; MOREIRA, M. S.; EDUARDO, C. P.; MARQUES, M. M. Influence of different power densities of LILT on cultured human Fibroblast growth - A pilot study. Lasers Med Sci, v.21, p. 86–89, 2006.
6. ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU, J.; ZÂNGARO, R. A.; GUIDUGLI-NETO, J.; JAEGER, M. M. M. Comparison of the Low Level Laser Therapy Effects on Cultured Human Gingival Fibroblasts Proliferation Using Different Irradiance and Same Fluence. Lasers in Surg. and Med., v. 29, p. 179 – 184, 2001.
7. TUNÉR, J.; HODE, L. Low level laser therapy – Clinical practice and scientific background. Prima Books, Sweden, 1999.
8. MARQUES, M. M.; PEREIRA, A. N.; FUJIHARA, N. A.; NOGUEIRA, F. N.; EDUARDO, C.P. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. Lasers in Surgery and Medicine, v. 34, p. 260-265, 2004.
9. PEREIRA, A. N.; EDUARDO, C. P.; MATSON, E.; MARQUES, M. M. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen

- synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg. Med.*, v. 31, p. 263-267, 2002.
10. LONGO, L.; EVANGELISTA, S.; TINACCI, G.; SESTI, A. G. Effect of Diodes-Laser Silver Arsenide-Aluminium (Ga-Ai-As) 904 nm on Healing of Experimental Wounds. *Lasers Surg. Med.*, v. 7, p. 444-447, 1987.
 11. MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg. Med.*, v. 5, p. 31-39, 1985.
 12. EDUARDO, F. P.; BUENO, D. F.; FREITAS, P. M.; MARQUES, M. M.; PASSOS-BUENO, M. R.; EDUARDO, C. P.; ZATZ, M. Stem Cell Proliferation Under Low Intensity Laser Irradiation : A Preliminary Study. *Lasers in Surg. and Med.*, v. 40, p. 433-438, 2008.
 13. TÚNER, J.; HODE, L. It's all in parameters: a critical analysis some well- know negative studies on low-level laser therapy. *J. Clin. Laser Med. Sur.*, v.15, p. 245-248, 1988.
 14. HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Influence of Broad-Spectrum and Infrared Light in Combination with Laser Irradiation on the Proliferation of Wounded Skin Fibroblasts. *Photomedicine and laser surgery*, v.25, n. 3, p. 159 – 169, 2007.
 15. KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, A. B.; WILLERSHAUSEN, B.; HOEDT, B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol* v.30, p.353–358, 2003.
 16. DAMANTE, C. A.; MICHELI, G.; MIYAGI, S. P. H.; FEIST, I. S.; MARQUES, M. M. Effect of phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*, 2008
 17. KUBASOVA, T.; KOVÁCS, L.; SOMOSY, Z.; UNK, P.; KÓKAI, A. Biological Effect of He-Ne Laser: investigation on functional and micromorphological alterations of cell membranes, *in vitro*. *Lasers Surg. Med.*, v. 4, p. 381-388, 1984.
 18. ALMEIDA-LOPES, L. Análise *in vitro* da Proliferação Celular de Fibroblastos de Gengiva Humana Tratados com Laser de Baixa Potência. 1999. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisa e

Desenvolvimento da Universidade Vale do Paraíba, São José dos Campos.

19. LOEVSCHALL, H.; ARENHOLT-BINDSLEV, D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucous fibroblast *in vitro*. *Lasers Surg. Med.*, 14: 347-354, 1994.
20. SCHMALZ, G. Use of cells cultures for toxicity testing of dental materials – advantage and limitations. *J. Dent.*, v. 22, p. 6-11 , 1994.
21. OLIVEIRA, R. F.; OLIVEIRA, D. A. A. P.; MONTEIRO, W.; ZANGARO, R. A.; MAGINI, M.; SOARES, C. P. Comparison Between the Effect of Low-Level Laser Therapy and Low-Intensity Pulsed Ultrasonic Irradiation *In Vitro*. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 26, n. 1, p. 6-9, 2008.
22. KARU, T. I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers Life Sci*, v.2, n.1, p.53-74, 1988.
23. KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.*, 56:691-704, 1989.
24. BRANDÃO, R. J. A. Avaliação do Edema em Exodontia com aplicação de Laser Infra-Vermelho em Baixa Intensidade. 2007. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
25. HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Laboratory Methods for Evaluating the Effect of Low Level Laser Therapy (LLLT) In Wound Healing. *African Journal of Biomedical Research*, v. 8, n. 1, p. 1 –14, 2005.
26. KARU, T. Mechanisms of low-power laser light action on cellular level. In: SIMUNOVIC, Z. *Lasers in Medicine and Dentistry: Basic Science and Up-to-Date Clinical Application of Low-Energy Level laser Therapy – LLLT*, Cap.4. Rijeka- Croácia, Vitagraf, 2000. p 97-125.
27. HAMBLIN, M. R.; DEMIDOVA, T. N. Mechanisms of low level light therapy. *Proc. of SPIE*, v. 6140, 614001, 2006.
28. HAWKINS, D. H.; ABRAHAMSE. The Role of Laser Fluence in Cell Viability, Proliferation, and Membrane Integrity of Wounded Human Skin Fibroblasts Following Helium-Neon Laser Irradiation. *Lasers in Surg and Med.*, v. 38, p. 74 – 83, 2006.

29. HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Time-dependent responses of wounded human skin fibroblasts following phototherapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 88, p. 147 – 155, 2007.

30. HOURELD, N.; ABRAHAMSE, H. In Vitro Exposure of Wounded Diabetic Fibroblast Cells to a Helium-Neon Laser at 5 and 16 J/cm². *Photomedicine and laser surgery*, v. 25, n. 2, p. 78 – 84, 2007.

31. HOURELD, N. N.; ABRAHAMSE, H. Laser light influences cellular viability and proliferation in diabetic-wounded fibroblast cells in a dose- and wavelength-dependent manner. *Lasers Med. Sci.*, v. 23, p. 11-18, 2008.

32. SAYGUN, I.; KARACAY, S. SERDAR, M.; URAL, A. U.; SENCIMEN, M.; KURTIS, B. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblast. *Lasers Med. Sci.*, v. 23, p. 211-215, 2008.

33. HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomedicine and laser surgery*, v. 24, n.6, p. 705 – 714, 2006.

34. EDUARDO, F. P.; MEHNERT, D. U.; MONEZI, T. A.; ZECELL, D. M.; SCHUBERT, M. M.; EDUARDO, C. P.; MARQUES, M. M. Cultured Epithelial Cells Response to Phototherapy With Low Intensity Laser. *Lasers in Surg. and Med.*, v. 39, p. 365-372, 2007.

35. PUGLIESE, L. S.; MEDRADO, A. P.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, Z. A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui. Odontol. Bras.*, v. 17, n. 4, p. 307-13, 2003.

36. CLARK, R. A. F. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. *J Invest Dermatol*, v.11, n.4, p.647-661, Oct. 1993.

37. BREUGEL, H. H. F. I.; DOP BAR, P. R. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts *in vitro*. *Lasers in Surg. Med.*, v. 12, p. 528-537, 1992.

38. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Equipamento eletromédico. Parte 2: Prescrições particulares para a segurança de equipamento terapêutico e de diagnóstico a laser. Rio de Janeiro: ABNT, 1997 (NBR IEC 601-2-22:1997).