

# Potenciação da Regeneração Fibroblástica com Laser

Sandra Isabel Lopes Pereira da Silva

Dissertação conducente ao Grau de Mestre em Medicina Dentária (Ciclo Integrado)

Gandra, Junho de 2020

Sandra Isabel Lopes Pereira da Silva

Dissertação conducente ao Grau de Mestre em Medicina Dentária (Ciclo Integrado)

# Potenciação da Regeneração Fibroblástica com Laser

Trabalho realizado sob a Orientação de Professor Doutor Luís Monteiro e Co-orientadores Dr. Nuno Sampaio e Mestre Joel Pedrosa

## DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Eu, acima identificado, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste trabalho, confirmo que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri a qualquer forma de falsificação de resultados ou à prática de plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria do trabalho intelectual pertencente a outrem, na sua totalidade ou em partes dele).

Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores foram referenciadas ou redigidas com novas palavras, tendo neste caso colocado a citação da fonte bibliográfica.

Gandra, 05 de Junho de 2020



## ACEITAÇÃO DO ORIENTADOR

Eu, **Luís Miguel Moutinho da Silva Monteiro**, com a categoria profissional de **Professor auxiliar** do Instituto Universitário de Ciências da Saúde, tendo assumido o papel de Orientador da Dissertação intitulada *“Potenciação da Regeneração Fibroblástica com Laser”*, da Aluna do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, **Sandra Isabel Lopes Pereira da Silva**, declaro que sou de parecer favorável para que a Dissertação possa ser depositada para análise do Arguente do Júri nomeado para o efeito para Admissão a provas públicas conducentes à obtenção do Grau de Mestre.

Gandra, 05 de Maio de 2020

O Orientador,



*“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.”*

Eduardo Galeano



## AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente aos meus tios Joaquim, Manuela, Lurdes e Casimiro que junto a mim fizeram e os impossíveis, com todo o respeito, amor e apoio, para que este objetivo se concretizasse.

À Mafalda por ser a melhor amiga do mundo.

Ao Gonçalo, que ao longo destes (quase) 5 anos, foi sem dúvida o meu grande pilar. Por todo o suporte, paciência e resiliência, por ter estado sempre do meu lado sem nunca me deixar desistir e por todo o carinho, incentivo, conselhos e palavras certas.

Aos amigos de sempre, que comigo cresceram e ainda hoje me acompanham.

Ao Diogo, um agradecimento especial por tudo, desde sempre.

Aos amigos que levo desta jornada, em especial ao Francisco, ao Guido, à Rita, à Joana e ao meu padrinho André, que viveram esta etapa comigo e sem dúvida conquistaram um lugar muito especial no meu coração.

À Vera e à mãe Cristina, por me fazerem sempre tão feliz com o mimo e toda a força.

Ao Joel, que foi incansável neste projeto e, graças a ele, tudo foi possível.

Ao professor Luís Santos, por tão bem saber ouvir, por todas as lições e palavras de sabedoria que me fez chegar quando mais precisei. Guardo com estima a sua marca no meu percurso.

Aos meus orientadores, Prof. Doutor Luís Monteiro e Doutor Nuno Sampaio, pela oportunidade que me deram e por toda a disponibilidade e extraordinário apoio nesta dissertação.

E a todos aqueles que fizeram de mim uma pessoa melhor, o meu mais sincero Obrigada.

Aos meus Avós, Álvaro e Manuela, eu quero dedicar este projeto. É o culminar de um sonho nosso. A Eles, que com a dedicação e esforço de verdadeiros pais, me amaram, criaram e lutaram por mim como ninguém, eu devo todos os meus valores e o que hoje posso ser. Com todo o meu amor e apertada saudade, espero que possam sentir o orgulho e felicidade que com eles partilho.



## RESUMO

Atualmente, a comunidade científica estuda de modo cada vez mais frequente os efeitos positivos dos lasers, visto a conseguir transpô-los para mais variadas modalidades terapêuticas. O crescente interesse provém dos variados estudos publicados que demonstram a capacidade da fotodinâmica de potenciar os processos de divisão e regeneração celular.

As membranas mucosas são tecidos epiteliais que revestem internamente cavidades do corpo que contactam o meio externo. Esses tecidos são constituídos por tecido conjuntivo, sendo este composto maioritariamente por fibroblastos. Os fibroblastos têm um papel essencial na cicatrização dos tecidos. Estudos sobre o aumento das suas funções na cicatrização têm vindo a ocupar uma comunidade científica.

Esta monografia pretende compreender como, e de que forma, a laserterapia poderá potenciar a atividade fibroblástica e, conseqüentemente, a regeneração tecidual.

Será testada, *in vitro*, uma linha celular fibroblástica (*L-929*) com laserterapia de dois componentes distintos (laser Diiodo e Neodímio) por forma a entender como, e de que modo, a fotodinâmica influenciará a regeneração das células acima referenciadas. Esta linha celular foi selecionada devido à sua replicabilidade do tecido mucoso. Na investigação será fundamental a técnica *MTT* como método de avaliação da viabilidade e crescimento celular. A investigação terá lugar no laboratório *Cancer Research – IINFACTS CESPU* e a aplicação da laserterapia na Clínica Universitária da CESPU Dr. Filinto Baptista.

### PALAVRAS-CHAVE:

*“Mouth Fibroblast”; “Low Level Laser”; “In Vitro”; “Nd-Yag”; “Diode”; “Tissue Regeneration”;  
“Wound Healing”.*



**CESPU**

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO  
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

## ABSTRACT

Currently, the scientific community gained increased interest in evaluating the positive effects of lasers in order to use them in a therapeutic manner. This increased interest resides in several studies demonstrating the capacity of photodynamics to potentiate cellular and tissue regeneration.

Mucous membranes are epithelial tissues that cover cavities of the body exposed to the external environment. These membranes are constituted by conjunctive tissue majorly composed of fibroblasts, which play an essential role in tissue healing. Studies on the increase of its functions in healing have been occupying the scientific community.

This research project aim is to understand how, and to which extent, laser therapy can positively enhance fibroblastic activity and improve tissue regeneration.

For that purpose, a fibroblast cell line (L-929) will be subjected to two-component laser therapy (diode and neodymium-pumped lasers) for different periods of time. Mtt assay will be applied in order to ascertain cell growth and viability. L-929 cell line was selected due to its reliability as a replica of the mucous tissue. This research will be conducted at the Cancer Research Laboratory- IINFACTS CESPU and laser therapy application at the Clínica Universitária of CESPU by Dr. Filinto Baptista.

### KEYWORDS:

“Mouth Fibroblast”; “Low Level Laser”; “In Vitro”; “Nd-Yag”; “Diode”; “Tissue Regeneration”;  
“Wound Healing”.



## LISTA DE ABREVIATURAS

(v/v) – Fração volúmica

*ANOVA* – Análise De Variância

ATP – Adenosina Trifosfato

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

CTR (–) – Controlo negativo

CRT (+) – Controlo positivo

Er:YAG – *Erbium-doped Yttrium Aluminium Garnet*

EUA – Estados Unidos da América

H - Horas

HCL – Ácido Clorídrico

Hz - Hertz

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

InGaAsP-*Indium Gallium Arsenide Phosphide*

J/cm<sup>2</sup> – *Joules* por centímetro quadrado

LED - *Light-Emitting Diode*

LLLTT – *Low Level Laser Therapy*

MEM – Meio Essencial Mínimo

mL – Mililitros

mm – Milímetros

MSP – Micro Short Pulse

MTT-3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

Nd:YAG – *Neodymium-doped Yttrium Aluminum Garnet*

Nm – Nanómetro

W - *Watt*

°C – Graus *Celcius*

P1 - Parâmetro 1

P2 – Parâmetro 2

s – Segundos

T0 – *Time point 0*

T1 – *Time point 1*

T2 – *Time point 2*

T3 – *Time point 3*

TNF- $\alpha$  - *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*



## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO .....	3
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	3
3.1 PESQUISA DE DADOS BIBLIOGRÁFICOS.....	3
3.2 CULTURA CELULAR .....	4
3.3 PARÂMETROS DE IRADIAÇÃO LASER.....	4
3.4 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....	5
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	5
4. RESULTADOS.....	7
5. DISCUSSÃO .....	11
6. CONCLUSÃO.....	16
7. BIBLIOGRAFIA.....	17



## 1. INTRODUÇÃO

A década de 60 marcou uma era promissora com a descoberta da laserterapia<sup>(1,2,3)</sup>, pela mão de Endre Mester, “O Pai da Fotobiomodulação”<sup>(4)</sup>. Mester descobriu acidentalmente o poder regenerativo do laser durante uma experiência que realizou para reduzir tumores em ratos. Mester verificou que nas zonas tumorais de aplicação do laser, ao invés de verificar regressão tumoral, provocou um crescimento do pelo nessas zonas. Isto suscitou a curiosidade da comunidade científica, que prontamente questionou a sua aplicabilidade noutras áreas, nomeadamente na terapia de regeneração tecidual<sup>(4)</sup>.

A *Low Level Laser Therapy (LLLT)* - em português, Terapia Laser de Baixa Intensidade – foi introduzida em medicina dentária como modalidade terapêutica<sup>(5)</sup>. Com visio a otimizar terapias convencionais e minimizar as consequências dos procedimentos mais invasivos e agressivos para o paciente<sup>(6)</sup>, o objetivo principal desta técnica é aprimorar ou até substituir as terapias pré-existentes<sup>(1)</sup>. Tal conduz-nos à necessidade de estudos e investigações constantes para que o seu sucesso e evolução sejam exponencialmente eficazes.

A *LLLT* destaca-se pelo seu efeito bioestimulador e fotobiomulador da atividade celular<sup>(7-9)</sup> que provoca alterações térmicas minimamente perceptíveis<sup>(3,5,7,10)</sup>. A absorção dos feixes da luz laser são o pré-requisito para qualquer efeito celular adjacente<sup>(10)</sup>. Deste modo, tem sido comprovado por diferentes estudos<sup>(1,5,-7,9,12)</sup> que a *LLLT* constitui um potencial método para a concretização de novos e melhores resultados no âmbito da regeneração tecidual<sup>(5-7,12)</sup>, nomeadamente os da mucosa oral. A preferência por esta fototerapia destaca-se ainda pelas melhorias relatadas ao longo dos anos, nomeadamente o potencial analgésico e anti-inflamatório, diminuição de edema, intervenção na cadeia mitocondrial (com direta influência na libertação de fatores de crescimento e interleucinas), aumento da produção fibroblástica, síntese de colagénio e atividade angiogénica, eventos cruciais para o processo de regeneração dos tecidos lesados<sup>(1-3,5-7,9,11,13)</sup>.

Um dos principais desafios da laserterapia é determinar a dosagem ideal de energia<sup>(6,11)</sup>. Acredita-se que o seu efeito bioestimulador ocorre num período de tempo limitado pelo que é recomendada a fototerapia de curta duração e com intervalos entre sessões, de modo a permitir a recuperação fisiológica das células – já que estas não têm capacidade infinita nem imediata de reorganização<sup>(6)</sup>. É também importante referir que doses elevadas de radiação laser levam à

inversão da atividade positiva, regra geral, provocando a inibição de processos vitais de atividade<sup>(5,8,14)</sup>.

A mucosa oral é constituída por epitélio oral, submucosa (tecido adiposo) e tecido conjuntivo composto maioritariamente por fibroblastos<sup>(15)</sup>. O epitélio oral é constituído por quatro camadas, da menos à mais profunda: córnea, granomatolosa, espinhosa e basal<sup>(1,7,15)</sup>. Pode ser queratinizado (palato e gengiva), não queratinizado (tecidos moles) e paraqueratinizado (língua), dependendo das zonas da cavidade oral<sup>(11)</sup>.

*Glim J E et al* (2013), afirma que a cicatrização é um processo complexo que envolve um amplo espectro de células e moléculas, compreendido em três fases: hemostasia, inflamação, proliferação e regeneração<sup>(15)</sup>. Os fibroblastos da mucosa oral desempenham um papel fundamental na cicatrização pelo que a potenciação do seu efeito pode ter inúmeros benefícios associados à aceleração dos processos de regeneração<sup>(11)</sup>.

Para que a regeneração fibroblástica seja estimulada é, então, importante compreender o modo de ação da laserterapia e quais os parâmetros/ condições que apresentam maior benefício na recuperação e proliferação celular, bem como avaliar a sua aplicabilidade no cenário clínico para potenciar e diminuir o tempo de cicatrização de mucosas orais lesadas. É nesse âmbito que se desenvolve o presente estudo.

## 2. OBJETIVO

Este projeto de investigação ambiciona compreender e comprovar se a utilização de laserterapia sobre células da mucosa oral influenciará positivamente a regeneração fibroblástica das células do tecido mucoso e diminuirá o período de cicatrização, melhorando os resultados da regeneração tecidular. Pretende clarificar o mecanismo de ação da Laser Terapia de Baixa Intensidade assim como averiguar qual das condições (P1 ou P2) apresenta maior benefício na cicatrização tendo, por isso, maior propensão para aplicabilidade na prática clínica dentária futura.

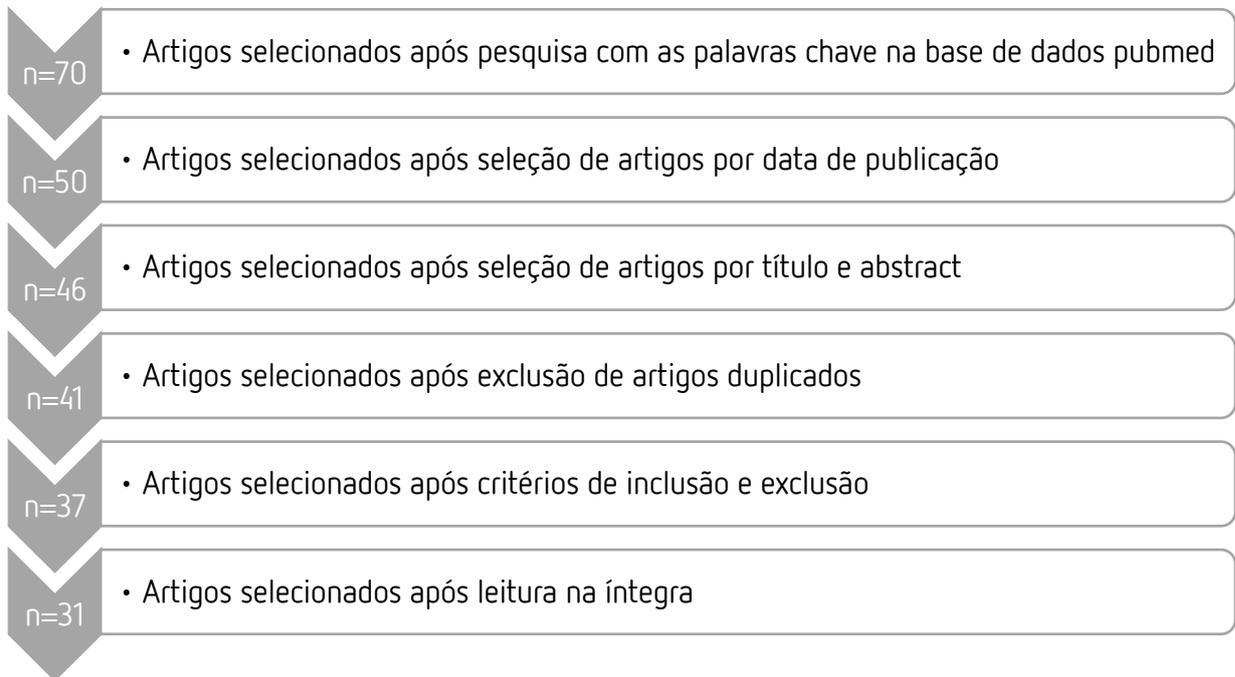
Nesse sentido, foi testada *in vitro* a bioestimulação de uma linha celular fibroblástica (L-929) com dois diferentes parâmetros de laser - Parâmetro 1: 1064nm 0.5W, 8mm, MSP, 30' (*LightWalker, Fotona®, Slovenia*), Parâmetro 2: 635nm, 0,3 W, 8mm, 7', 8 J/cm<sup>2</sup> (*Lasotronix MPro, Lasotronix Marcin Pokora®, Poland*).

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Pesquisa de dados bibliográficos

Foi realizada uma pesquisa na base de dados *Pubmed* com diversas combinações das palavras-chave "*Mouth Fibroblast*"; "*Low Level Laser*"; "*In Vitro*"; "*Nd-Yag*"; "*Diode*"; "*Tissue Regeneration*"; "*Wound Healing*". Os critérios de inclusão selecionaram artigos publicados em português e inglês, após o ano 2000 e até dezembro de 2019. Os critérios de exclusão abrangeram artigos que não realizaram testes em fibroblastos, artigos cujos procedimentos foram executados *in vivo* e artigos publicados em anos anteriores a 2000 (à exceção de *Loevschall H et al (1994)*<sup>(5)</sup> devido à pertinência dos resultados neste estudo). Foram avaliados os títulos e os *abstracts* de artigos potencialmente relevantes. Os artigos selecionados foram lidos e analisados tendo em conta o propósito desta investigação.

**Figura 1. Diagrama de fluxo de dados.** A Figura 1 representa, esquematicamente, o desenvolvimento de pesquisa de dados bibliográficos para elaboração da presente investigação.



### 3.2 Cultura Celular

Como réplica do tecido mucoso oral, recorreremos a uma linha celular de fibroblastos murino *L-929 (Sigma-Aldrich, EUA)*. Cultivamos as células em MEM (meio essencial mínimo, *Gibco, Life Technologies, EUA*), suplementado com soro de cavalo a 10% (*Gibco, Life Technologies, EUA*) em atmosfera humidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, com a finalidade de replicar as condições oferecidas pelo corpo humano. A linha celular *L-929* foi usada neste trabalho como modelo de fibroblastos humanos. Foram semeadas em placas de 96 poços a uma concentração final de 5x10<sup>4</sup> células/mL. O meio foi renovado a cada 3 dias. A experiência foi realizada em triplicados e repetida pelo menos 2 vezes.

### 3.3 Parâmetros de Irradiação Laser

Este ensaio clínico contou com a aplicação de dois parâmetros de lasers distintos, sendo:

- Parâmetro 1 (P1) Figura.1: Laser *Nd: Yag* (Neodímio, *LightWalker, Fotona®, Slovenia*), a um comprimento de onda de 1064nm, potência de 0,5W, feixe de 8mm de diâmetro, *MSP*, durante 30 segundos a uma frequência de 10 Hz;

- Parâmetro 2 (P2) Figura.2: Laser Diodo (*Lasotronix MPro, Lasotronix Marcin Pokora®, Poland*), a um comprimento de onda de 635nm, potência de 300mW, feixe de 8mm de diâmetro, durante 7 segundos, a uma fluência de 8 J/cm<sup>2</sup>.

As placas foram irradiadas por 4 dias consecutivos a cada 24H (dias 0, 1, 2 e 3).

Figura 2. Laser Neodímio (*LightWalker, Fotona®, Slovenia*).



Fonte: (<https://www.spectrumed.com.ph/products/lightwalker/>)

Figura 3. Lase Diodo (*Lasotronix MPro, Lasotronix Marcin Pokora®, Poland*)



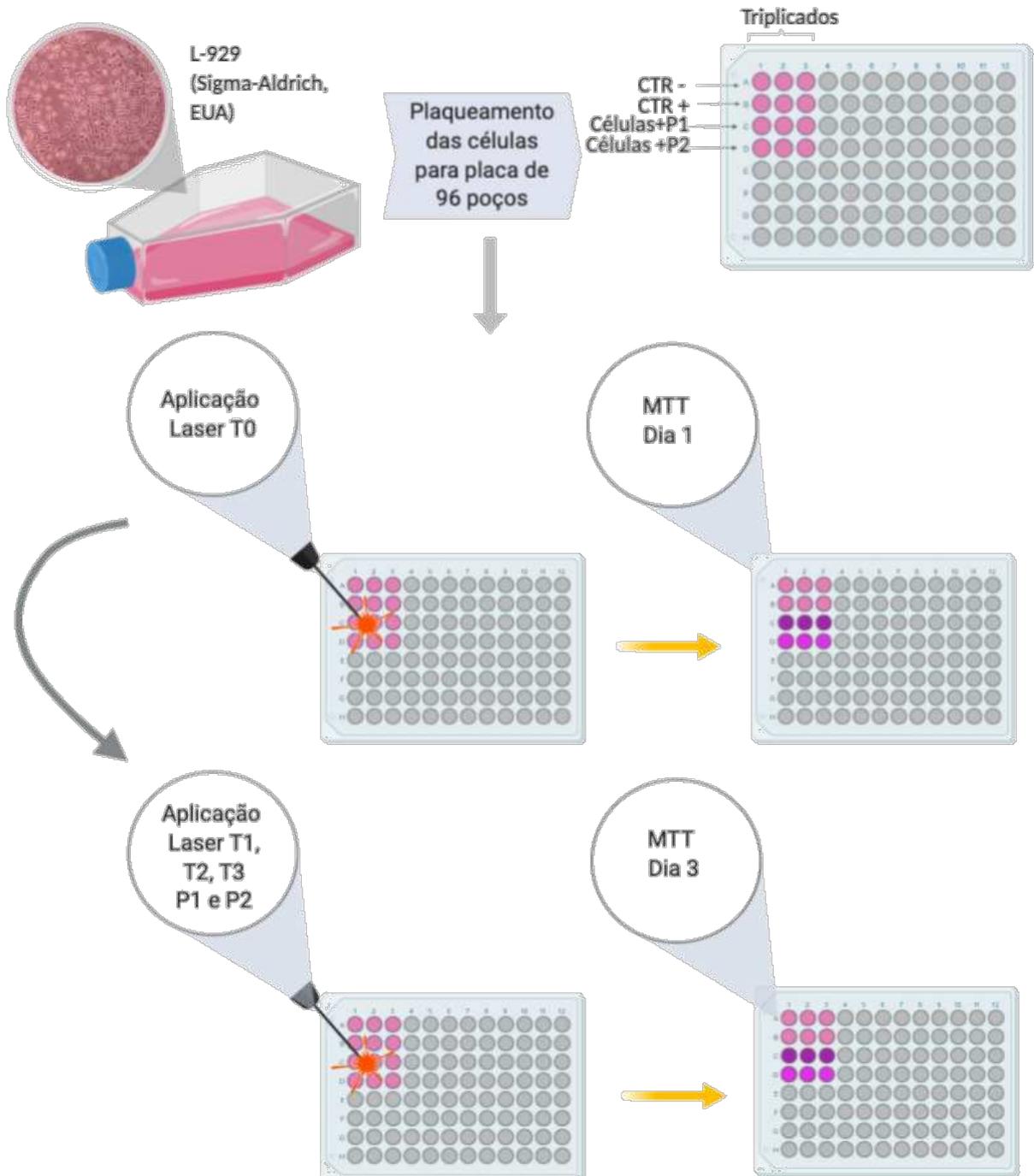
Fonte: (<http://www.lasotronix.com/eng>)

### 3.4 Ensaios de viabilidade celular

Com recurso ao *MTT* (brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio) durante 1, 3 e 7 dias de cultura celular, foi possível determinar a viabilidade celular. As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 4 H. Os cristais roxos de formazan foram solubilizados em solução detergente com 89% (v/v) 2-Propanol, 10% (v/v) Triton X-100 e 1% (v/v) HCl por 2 H. Por fim, a densidade óptica foi medida a 570 nm num leitor de microplacas (*Biotek Synergy 2, Winooski, VT, EUA*) e os dados foram recolhidos usando o software Gen5 (versão 1.07.5, *Biotek, Winooski, VT, EUA*).

### 3.5 Análise Estatística

A análise estatística da viabilidade celular foi realizada usando uma análise fatorial dupla de variância (*ANOVA*) seguida do teste de múltiplas comparações de *Tukey* para avaliar as interações significativas entre os grupos e, posteriormente, os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram realizadas usando o programa *GraphPad Prism 6* (*GraphPad Software, San Diego, EUA*).



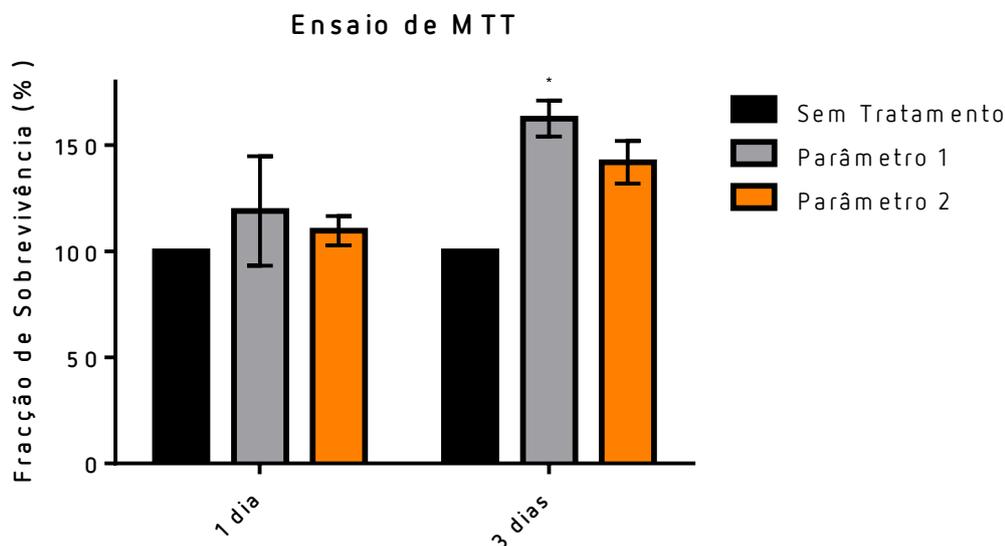
**Figura 4. Resumo gráfico do presente projeto.** A Figura 1 representa a planificação prática deste projeto. Primeiro, as células serão cultivadas em placas de 96 poços. De seguida dá-se a aplicação de ambos os parâmetros laser, por períodos de 24 horas, durante 4 dias. Entretanto, MTT para 1 e 3 dias, após a primeira aplicação dos lasers, será realizado para determinar a viabilidade e proliferação celular.

#### 4. RESULTADOS

O Gráfico 1 apresenta os resultados de viabilidade celular obtidos através do ensaio de *MTT* sob a forma de percentagem (%), para as diferentes condições testadas (Sem tratamento, Parâmetro 1 e Parâmetro 2) e para os diferentes tempos testados (1 e 3 dias).

Após uma análise mais detalhada, podemos verificar que 1 dia após a aplicação da laserterapia, existe um aumento da viabilidade celular tanto no parâmetro 1 como no parâmetro 2 comparativamente ao controlo (19,02% e 9,79% respetivamente). Apesar disso, nenhum dos resultados apresenta ser estatisticamente significativo. Quando analisamos a viabilidade celular 3 dias após a primeira irradiação, verificamos que existe um aumento significativo em ambos os parâmetros testados (62,53% e 41,97% respetivamente), com maior pendor para o parâmetro 1. Tendo em conta estes valores, apenas o parâmetro 1 demonstrou ser estatisticamente significativo ( $p \leq 0.05$ ).

**Gráfico 1. Representação gráfica da viabilidade celular obtida no ensaio de MTT.** Os resultados são apresentados em percentagem (%) para as diferentes condições testadas (sem tratamento, Parâmetro 1 e Parâmetro 2) para os diferentes



**Tabela 1. Valores de viabilidade celular obtidos no ensaio de MTT.** Os valores estão expressos em percentagem (%) e como *média ± desvio padrão*

	FRACÇÃO DE SOBREVIVÊNCIA (%)		
	SEM TRATAMENTO	PARÂMETRO 1	PARÂMETRO 2
1 DIA	100%	119,02 ± 25,82	109,79 ± 6,90
3 DIAS		162,53 ± 8,47	141,97 ± 10,11

**QUADRO 1 – Quadro de resultados.** Revisão sistemática da literatura sobre os diferentes estudos do efeito da laserterapia.

AUTOR/ANO	Modelo de estudo	Tipo de LASER	Comprimento de onda	Potência	Intensidade	Intervalo de irradiação	Tempo de exposição	Tipo de feixe	Principais resultados
P1	L-929 (fibroblastos de rato)	Nd:YAG	1064nm	0,5 W	-	3 irradiações, uma a cada 24H	30 s	Contínuo	Potenciação da proliferação fibroblástica
P2	L-929 (fibroblastos de rato)	Diiodo	635 nm	0,3 W	8 J/cm <sup>2</sup>	3 irradiações, uma a cada 24H	7s	Contínuo	Potenciação da proliferação fibroblástica
Loevschall, H. et al. (1994) <sup>(5)</sup>	Fibroblastos humanos	Diiodo	812 nm	0,084 W	4,5 13,5 45 144 450 1422 4500 J/cm <sup>2</sup>	-	1 3 10 32 100 316 1000 s	-	Resultados não são estatisticamente significativos
Pansani, T.N., et al. (2016) <sup>(9)</sup>	Fibroblastos humanos	LASERtable device (InGaAsP type)	780 ± 3 nm	0,025 W	3,0 J/cm <sup>2</sup>	3 irradiações, uma a cada 24H	240 s	Contínuo	Potenciação da proliferação fibroblástica. Promovem ainda proliferação, metabolismo e expressão gênica de diferentes tipos de células.
Kreisler, M., et al. (2002) <sup>(11)</sup>	Fibroblastos humanos	GaAl+IAs-diode laser	809 nm	0,01 W	1,96 3,92 7,84 J/cm <sup>2</sup>	3 irradiações com intervalos de 24H	75 150 300 s	Contínuo	Potenciação da proliferação fibroblástica
Chen, Y., et al (2005) <sup>(14)</sup>	Fibroblastos humanos	Nd:YAG	1064 nm	0,5 W	3,125 – 12,5 J/cm <sup>2</sup>	5 dias	60 120 180 240 s	Pulsátil	Induziu perda parcial da viabilidade celular e do conteúdo de colágeno. Verificou-se retração dos processos celulares, perda da arquitetura normal e lise de algumas células e deterioração progressiva de células danificadas

AUTOR/ANO	Modelo de estudo	Tipo de LASER	Comprimento de onda	Potência	Intensidade	Intervalo de irradiação	Tempo de exposição	Tipo de feixe	Principais resultados	
Roncati, M. et al. (2016) <sup>(16)</sup>	Fibroblastos humanos	LED E-Light	835±5 nm	-	155 J/cm <sup>2</sup>	2 irradiações, uma a cada 24H	900 s	-	Há potenciação da proliferação fibroblástica. Resultados mostram um aumento da produção de elastina, principalmente nos fibroblastos extraídos de indivíduos mais velhos.	
Harorli, O, T. et al. (2019) <sup>(17)</sup>	Fibroblastos humanos	Diiodo	940 nm	0,3 0,5 0,7	W J/cm <sup>2</sup>	0,84 1,4 1,97	3 irradiações, uma a cada 24H	20 s	Contínuo	Secreções de IL-6 e IL-8 amplificadas por 0,84-1,4 J/cm <sup>2</sup> , enquanto 1,97 J/cm <sup>2</sup> suprimiram a liberação de IL-6 e IL-8
Saygun, I. et al (2008) <sup>(18)</sup>	Fibroblastos humanos	Diiodo	685 nm	0,025 W	2 J/cm <sup>2</sup>	Dose única no grupo 1 Duas irradiações com intervalo de 24H no grupo 2.	140 s	Contínuo	Potenciação da proliferação fibroblástica. O grupo que recebeu dupla irradiação mostrou aumento mais significativo no aumento de fatores de crescimento.	
Ogita, M., et al. (2014) <sup>(19)</sup>	Fibroblastos humanos	Erbium-doped yttrium aluminum garnet (Er:YAG)	2,94 µm	-	J/cm <sup>2</sup>	1,84, 2,35 2,90	-	30 s	Pulsátil	Potenciação da proliferação fibroblástica
Azevedo, L. et al. (2006) <sup>(20)</sup>	Fibroblastos humanos	GaAl+IAs-diode laser	680 nm	0,01 0,029	W 2J/cm <sup>2</sup>	2 irradiações com intervalos de 12H	14 4,8	s	Contacto e pontual	Resultados estatisticamente mais significativos na potência de 0,01 W
Pourzarandian, A. et al. (2005) <sup>(21)</sup>	Fibroblastos humanos	Er:YAG	-	-	3,37 J/cm <sup>2</sup>	-	-	-	Pulsátil	Potenciação da proliferação fibroblástica
Chellini, F., et al. (2010) <sup>(22)</sup>	Fibroblastos humanos	Nd:YAG	1064 nm	1,4 W	1,5 J/cm <sup>2</sup>	3 irradiações, uma a cada 24H	10 s	Pulsátil	Potenciação da proliferação fibroblástica	
Basso, F. et al. (2016) <sup>(23)</sup>	Modelo 3D cultura celular de fibroblastos humanos	LASERtable device (InGaAsP type)	780 nm	0,025 W	3 J/cm <sup>2</sup>	3 irradiações, uma a cada 24H	240 s	Contínua	Potenciação da proliferação fibroblástica	

AUTOR/ANO	Modelo de estudo	Tipo de LASER	Comprimento de onda	Potência	Intensidade		Intervalo de irradiação	Tempo de exposição		Tipo de feixe	Principais resultados
Gkogkos, A. S. et al. (2015) <sup>(24)</sup>	Fibroblastos humanos	Nd:YAG	1064 nm	0,5W	2,6	J/cm <sup>2</sup>	1 aplicação ao Dia 0	20	s	Pulsátil	Potenciação da regeneração fibroblástica. Resultados com maior relevância estatística para irradiação com 15,8 J/cm <sup>2</sup>
					5,3			40			
					7,9			60			
					15,8			120			
Basso, F. et al. (2012) <sup>(25)</sup>	Fibroblastos humanos	LASERtable device (InGaAsP type)	780 ± 3 nm	0,025W	0,5	J/cm <sup>2</sup>	3 irradiações, uma a cada 24H	40	s	-	Potenciação da regeneração fibroblástica. Resultados com maior relevância estatística para irradiação com 0,5 e 3 J/cm <sup>2</sup>
					1,5			120			
					3			240			
					5			400			
					7			560			

## 5. DISCUSSÃO

O epitélio da mucosa oral é, como já mencionado, composto por quatro distintas camadas: estrato basal (camada basal), estrato espinhoso (camada espinhosa), estrato granulomatoso (camada granular) e estrato córneo (camada córnea)<sup>(1,10,26)</sup>. Os seus tecidos estão em contínua remodelação. A taxa da atividade mitótica tem influência direta sobre o turnover celular das distintas áreas da mucosa oral e, conseqüentemente, na divisão das suas células. Este fenómeno traduz que a velocidade de cicatrização da mucosa oral é, então, dependente do local que o epitélio integra<sup>(1,10)</sup>.

Os fibroblastos são células de origem mesenquimatosa, dotados de funções fundamentais na manutenção e regeneração do tecido conjuntivo oral<sup>(1,5,7,15)</sup>. À semelhança de tecidos localizados noutros locais do corpo, as células fibroblásticas sintetizam fibras colágenas e elásticas, assim como glicoproteínas e glicosaminoglicanos da substância intercelular amorfa. Têm ainda um papel importante na diminuição da degradação do colágeno<sup>(1,15)</sup>.

O tecido conjuntivo da mucosa oral apresenta uma taxa turnover celular elevada, o que lhe confere uma capacidade de cura e regeneração celular muito eficientes<sup>(1)</sup>. Este é um dos motivos pelo qual as feridas orais cicatrizam mais rapidamente do que as dérmicas, uma vez a taxa de reepitelização e a proliferação fibroblástica oral ocorrem num período de tempo inferior em comparação aos mesmos fenómenos na pele. A mucosa oral tem ainda a singular característica de não apresentar formação de cicatrizes, o que se traduz, à posteriori, num impacto mínimo da ferida na função e estética<sup>(1,7,9,15,26)</sup>.

Estudos sobre a *LLL* concluíram que esta terapia possui ação bioestimuladora em vários tipos de células e tecidos graças à capacidade de afetar a cadeia respiratória mitocondrial<sup>(16)</sup>. Os componentes da cadeia respiratória mitocondrial são sugeridos como fotoacetores primários na faixa de comprimento de onda visível e no infravermelho mais próximo<sup>(5,9,11)</sup>. Dessa forma, é aumentada a produção de adenosina trifosfato (ATP), que por sua vez facilita a proliferação de fibroblastos e secreção de fatores de crescimento e síntese de colagénio<sup>(3,5-7,9,11,16)</sup>. Além disso, os tratos microcirculatórios, vasos sanguíneos e linfáticos, desempenham uma função evidente na drenagem do líquido tecidual e disseminação da inflamação<sup>(1)</sup>. Verificou-se que a aplicação do laser de baixa intensidade melhora a microcirculação local por estimular a angiogénese e vasodilatação, aliviando o edema e a inflamação dos tecidos,<sup>(3,6,13,16)</sup> acelerar o suprimento de

nutrientes e ainda aumentar a depuração de metabolitos e resíduos metabólicos celulares<sup>(18)</sup>. A angiogénese é o processo através do qual ocorre a formação de novos vasos sanguíneos a partir de arborizações vasculares pré-existentes. É um fenómeno de peculiar importância para alguns processos fisiológicos, nomeadamente a cicatrização de feridas<sup>(6)</sup>.

O processo de cicatrização ocorre em três fases distintas: uma fase inflamatória, uma fase proliferativa e uma fase de remodelação<sup>(1,7,27)</sup>. Na fase inflamatória, plaquetas, neutrófilos, macrófagos e linfócitos migram para o local da lesão. Durante a fase proliferativa ocorre um aumento de fibroblastos. Por fim, na fase de remodelação, os fibroblastos são ativados promovendo a síntese de componentes da matriz extracelular e produção de colagénio<sup>(6,7,27)</sup>. Também a saliva mostra um papel relevante durante todo o processo, uma vez que a sua ação biológica proporciona um ambiente condutor favorável ao rápido reparo da mucosa oral danificada<sup>(9)</sup>.

Um importante interveniente no fenómeno da cicatrização são as citocinas. Estas pequenas glicoproteínas são produzidas por vários tipos de células, principalmente leucócitos, e constituem importantes mediadores em diversos episódios fisiológicos e patológicos, onde se incluem a imunidade inata, imunidade adquirida e inúmeras respostas inflamatórias<sup>(28,29)</sup>. Regra geral, exibem variados efeitos na mesma célula-alvo e podem induzir ou inibir a síntese e/ou os efeitos de outras citocinas<sup>(29)</sup>. A ativação do sistema imunológico inato induz a produção de uma série de mediadores pró-inflamatórios nomeadamente necrose tumoral (como *TNF- $\alpha$* ) e interleucinas (como IL-6)<sup>(17)</sup>.

*Basso F G et al* (2016), afirma no seu artigo que o aumento da expressão de citocinas inflamatórias específicas na cavidade oral, desencadeia um atraso significativo na cicatrização da mucosa oral. Essa superexpressão pode traduzir-se em efeitos citotóxicos nas células da mucosa oral, como consequência da diminuição da proliferação, migração e expressão reduzida de fatores de crescimento e outras moléculas relacionadas à homeostasia e cicatrização da mucosa<sup>(30)</sup>.

*Harorli O T et al* (2019) <sup>(QUADRO 1;(17))</sup> procurou “avaliar os efeitos da irradiação com laser de diodo de 940 nm nas secreções pró-inflamatórias de citocinas [interleucina (IL) -6 e IL-8] por fibroblastos gengivais humanos in vitro”. Nesse estudo concluiu que “secreções de IL-6 e IL-8 foram amplificadas por irradiações de 0,84-1,4 J/cm<sup>2</sup>, enquanto que irradiações de intensidade 1,97 J/cm<sup>2</sup> suprimiram a liberação de IL-6 e IL-8”.

De modo a garantir o sucesso do processo de cicatrização, as células da mucosa oral têm obrigatoriamente que migrar para a área lesada de modo a promover seu encerramento. Para tal, há secreção de proteínas da matriz extracelular, como o colágeno tipo I<sup>(29)</sup>. A terapia com laser de baixa intensidade tem capacidade de gerar efeitos bioestimuladores em tipos de células distintos, entre eles o aumento da migração e proliferação celular. Pode também reforçar a expressão de fatores de crescimento e ativar vias celulares envolvidas na proliferação e sobrevivência celular<sup>(1,9,18,29)</sup>.

*Saygun, I. et al* (2008) <sup>(QUADRO 1:(18))</sup> concluiu no seu estudo que o grupo que recebeu dupla irradiação (Laser Diodo contínuo, 685 nm; 0,025W; 2 J/cm<sup>2</sup>, 140 s) obteve um resultado estatisticamente significativo no aumento de fatores de crescimento em comparação ao grupo que recebeu somente uma dose de radiação.

Os lasers têm características diferentes e podem ser usados para diversos fins, dependendo do comprimento de onda. Comprimentos de onda em torno de 800 nm (*LLLT*) têm alta permeabilidade nos tecidos e são comumente utilizados pelas suas particularidades analgésicas e anti-inflamatórias. Já comprimentos de onda próximos a 3000 nm, isto é, laser terapia de alta intensidade, apresentam alta absorção e podem ser utilizados para cortar tecidos duros<sup>(31)</sup>.

Os parâmetros de laser devem ser estabelecidos consoante a textura, composição e densidades da estrutura a irradiar<sup>(1,6)</sup>. Para a sua determinação devemos, ainda, ter em grande consideração a condição de saúde do paciente, doenças sistêmicas associadas, hábitos viciosos, alimentação e rotina de higiene. A idade do paciente é também um fator a ter em importante consideração, já que o processo de envelhecimento pode causar inibição da síntese de fatores de crescimento e proteínas estruturais fundamentais à cicatrização, como colágeno e fibronectina, o que influenciará diretamente a capacidade de adesão das células<sup>(9)</sup>.

É ainda de notar que os comprimentos de onda dos lasers diodo e *Nd: YAG* não são absorvidos pela hidroxiapatite e, portanto, não são eficazes para tecidos duros, como cimento, dentina e osso. Desse modo, as suas aplicabilidades são normalmente direcionadas à terapêutica em tecidos moles<sup>(1)</sup>.

A *LLLT*, ao induzir a proliferação e migração das células da mucosa oral e além de diminuir os níveis de citocinas inflamatórias na cavidade oral, promove a potenciação da cicatrização das lesões orais. Deste modo é possível afirmar que criar estratégias que visam controlar e/ou reduzir a reação inflamatória local são muito importantes para alcançar a regeneração mais rápida dos

tecidos<sup>(21)</sup>, favorecendo o pós operatório. Contudo, elevadas doses irradiação podem contrariar os efeitos bioestimuladores que procuramos alcançar com a aplicação *LLL* em prol da cicatrização. *Chen Y et al* (2005) <sup>(QUADRO 1;(14))</sup> irradia fibroblastos humanos in vitro recorrendo ao Laser Nd:Yag com comprimento de onda de 1064 nm. Nesse estudo verificou que, nas células expostas a doses laser de intensidades mais elevadas e maior intervalo de exposição, ocorreu perda parcial da viabilidade celular e do conteúdo de colágeno e ainda a retração dos processos celulares, perda da arquitetura normal, lise de algumas células e deterioração progressiva de células danificadas.

A análise sistemática dos artigos que corroboram as premissas desta investigação (QUADRO 1), permite chegar a conclusões interessantes. Diferentes estudos procuram estimular os mais diversos eventos celulares que, aquando da irradiação laser possam, de alguma forma, manifestar efeitos positivos potenciadores da aceleração/estimulação do processo da regeneração celular. Todos os estudos visaram o encontro dos parâmetros mais adequados para a aplicação da laserterapia em células fibroblásticas gengivais. Entre os experimentos analisados, podemos salientar, a título de exemplo, a abordagem da expressão de proteínas<sup>(19)</sup>, diminuição de eventos inflamatórios, aumento da expressão de fatores de crescimento<sup>(20)</sup>, influência na expressão e secreção de citocinas<sup>(17)</sup> ou até proliferação, metabolismo e expressão gênica de diferentes células e seus agentes<sup>(9)</sup>. Compreendemos ainda que, a escolha do laser a irradiar, assim como a variação dos seus parâmetros (que vai alterando mediante o objeto de estudo), permite chegar a diferentes resultados. De um modo geral, a presente literatura elucida satisfatoriamente o potencial da *LLL* na regeneração celular o que nos leva a poder afirmar que, acordando com a adequada escolha de parâmetros de irradiação, o recurso à laserterapia poderá trazer vantagens à cicatrização em comparação aos processos convencionais.

Os dados obtidos nesta abordagem experimental sugerem uma capacidade eficiente da potenciação da proliferação e regeneração celular por parte de ambos os lasers. Além do mais, verificamos que o Parâmetro 1 (P1, laser *Nd:Yag*) apresenta uma taxa de indução da proliferação superior ao Parâmetro 2 (P2, laser diodo). Uma das explicações para este fenómeno poderá prender-se no padrão de dispersão que cada laser apresenta. Ao passo que o feixe do laser de diodo apresenta um padrão de dispersão relativamente alto, e como tal não é emitido uniformemente, o feixe do laser de *Nd:Yag* apresenta um padrão contínuo e uniforme, o que possivelmente permitiu uma taxa de irradiação eficiente sobre as células e consequentemente maior estimulação de fatores de crescimento celular.

Apesar dos valores satisfatórios obtidos neste trabalho experimental, há pontos que devem ser focados para melhorar o mesmo, entre os quais a necessidade de inclusão de outros períodos de análise, como por exemplo analisar a taxa de proliferação celular ao fim de 7 dias após a primeira irradiação, de modo a constatar o efeito da mesma a longo prazo. Para isso, seria necessário realizar novas experiências, bem como adaptar os materiais à mesma, pois devido ao crescimento em monocamada da linha celular e ao longo período em questão, seria necessário o uso de placas com poços de diâmetro superior para permitir a normal proliferação da mesma.

## 6. CONCLUSÃO

A laser terapia é cada vez mais abordada, hodiernamente, em diversos estudos devidos à sua aplicabilidade ao nível da potenciação da regeneração celular. Ainda assim, há uma inúmera variedade de lasers e seus parâmetros que ainda não foram testados para estes propósitos.

A sistemática dos artigos estabelece que, mesmo com diferentes parâmetros e condições, a *LLLT* é capaz de potenciar a regeneração celular a níveis distintos. Os resultados dos estudos (QUADRO 1) sugerem que a área da fotodinâmica demonstra ser bastante promissora na diminuição do processo de cicatrização e melhoria do pós operatório.

Nesta investigação, avaliamos duas condições de dois lasers distintos, P1 (Laser *Nd: Yag* (Neodímio, *LightWalker, Fotona®*, *Slovenia*), a um comprimento de onda de 1064nm, potência de 0.5W, feixe de 8mm de diâmetro, *MSP*, durante 30 segundos a uma frequência de 10 Hz) e P2 Laser Diodo (*Lasotronix MPro, Lasotronix Marcin Pokora®*, *Poland*), a um comprimento de onda de 635nm, potência de 300mW, feixe de 8mm de diâmetro, durante 7 segundos, a uma fluência de 8 J/cm<sup>2</sup>).

Após a realização do trabalho prático verificamos que ambas as condições de *LLLT* influenciam e potenciam a proliferação e regeneração celular.

A análise dos resultados sugere que P1 apresenta um efeito potenciador mais significativo do que P2, quando avaliados sobre as mesmas condições e num igual intervalo de tempo.

Todos estes resultados sugerem que a *LLLT* poderá constituir uma potencial modalidade terapêutica alternativa no tratamento de lesões em processo de cicatrização pois não só potenciam o crescimento e regeneração celular como também diminuem o intervalo de tempo em que esse fenómeno fisiológico ocorre.

O *Nd:YAG* é, por isso, um laser promissor para esta terapia. Contudo a literatura acerca da sua aplicabilidade e quais os seus parâmetros ideais é ainda um pouco escassa.

Ainda assim, e tendo em conta os pontos abordados na discussão, nomeadamente as questões relacionadas com a inclusão de outros períodos de análise, serão necessários mais estudos para comprovar a premissa abordada neste projeto.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- (1) Carranza et al. *Clinical Periodontology*, 13th Edition, Elsevier, 2006
- (2) Zarei, M., Wikramanayake, L. et al. *Low level laser therapy and hair regrowth: an evidence-based review*. *Lasers in Medical Science*, 2016, Vol. 31, pp.363-371. DOI: 10.1007/s10103-015-1818-2
- (3) Ren, C., McGrath, C., Jin, L., Zhang, C., & Yang, Y. *The effectiveness of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a meta-analysis*. *Journal of Periodontal Research*, 2017, Vol. 52, pp. 872-882. DOI:10.1111/jre.12361
- (4) Mester, A. et al. *The History of Photobiomodulation: Endre Mester*. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2017, Vol. 35, pp. 393-394. DOI: 10.1089/pho.2017.4332
- (5) Loevschall, H. et al. *Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro*. *Lasers in surgery and medicine*, 1994, Vol. 14, pp. 347-354. DOI: 10.1002/Ism.1900140407
- (6) Rocha, J. *Terapia Laser, cicatrização tecidual e angiogênese*. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*, 2004, pp. 44-48. DOI: 10.5020/18061230.2004.p44
- (7) Ren, C., MacGrath, C., Jin, L., et al. *Effect of diode low-level lasers in fibroblasts derived from human periodontal tissue: a systematic review of in vitro studies*. *Lasers in medical science*, 2016, Vol. 31, pp. 1493-1510. DOI: 10.1007/s10103-016-2026-4
- (8) Vladimirov, Y., Osipov, A., Klebanov, G. *Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation*. *Biochemistry (Moscow)*, 2004, Vol. 69, pp. 81-90. DOI: 10.1023/B:BIRY.0000016356.93968.7e
- (9) Pansani, T.N., et al. *Effects of low-level laser therapy and epidermal growth factor on the activities of gingival fibroblasts obtained from young or elderly individuals*. *Lasers Med Sci*, 2016. DOI:10.1007/s10103-016-2081-x
- (10) Nadhreen, A. et al. *Low-level Laser Therapy in Dentistry: Extra-oral Applications*. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 2019, pp. 1313-1318. DOI: 10.4103/njcp.njcp\_53\_19
- (11) Kreisler, M., Christoffers, A., Al-Haj, H., et al. *Low level 809-nm diode laser-induced on vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts*. *Lasers in surgery and medicine*, 2002, Vol. 30, pp. 365-369. DOI: 10.1002/Ism.10060
- (12) Chellini, F., Sassoli, C., Nosi, D., et al. *Low pulse energy Nd: YAG laser irradiation exerts a biostimulative effect on different cells of the oral microenvironment: "an in vitro study"*. *Lasers in surgery medicine*, 2010, Vol 42, pp. 527-539. DOI: 10.1002/Ism.20861

- (13) Pamuk, F. et al. *The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of transforming growth factor-beta 1, tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 in smoking and non-smoker.* Journal of Periodontal Research, 2017, Vol. 52, pp. 872–882. DOI:10.1111/jre.12457
- (14) Chen, Y., et al. *Long-Term Effect of Pulsed Nd:YAG Laser Irradiation on Cultured Human Periodontal Fibroblasts.* Lasers in Surgery and Medicine, 2005, 36:225-233. DOI: 10.1002/lsm.20131
- (15) Glim, J. et al. *Detrimental dermal wound healing: what can we learn from the oral mucosa?* Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society, 2013, Vol. 21, pp. 648-660. DOI: 10.1111/wrr.12072
- (16) Roncati, M. et al. *Evaluation of Light-Emitting Diode (LED-835nm) Application Over Human Gingival Fibroblast: An In Vitro Study.* Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents, 2016, Vol.30,no.2(S1),pp.161-167. PMID: 27469564
- (17) Harorli, O. et al. *Effect of Photobiomodulation on Secretion of IL-6 and IL-8 by Human Gingival Fibroblasts in Vitro.* Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery, 2019, Vol.37(8), pp.457-464. DOI: 10.1089/photob.2018.4589
- (18) Sayun, I. et al. *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 fibroblasts.* Lasers Med Sci, 2008, DOI: 10.1007/s10103-007-0477-3
- (19) Ogita, M., et al. *Increased cell proliferation and differential protein expression induced by low-level Er:YAG laser irradiation in human gingival fibroblasts: proteomic analysis.* Lasers Med Sci, 2014. DOI: 10.1007/s10103-014-1691-4
- (20) Azevedo, L. et al. *Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth. A pilot study.* Lasers Med Sci, 2006. 21:86-89. DOI: 10.1007/s10103-006-0379-9
- (21) Pourzarandian, A. et al. *Effect of Low-Level Er:YAG Laser Irradiation on Cultured Human Gingival Fibroblasts.* J Periodontol, 2005. Vol.76(2), pp.187–193. DOI: 10.1902/jop.2005.76.2.187
- (22) Chellini, F., et al. *Low Pulse Energy Nd:YAG Laser Irradiation Exerts a Biostimulative Effect on Different Cells of the Oral Microenvironment: "An In Vitro Study".* Lasers in Surgery and Medicine, 2010. 42:527-539. DOI: 10.1002/lsm.20861
- (23) Basso, F. et al. *Low-level laser therapy in 3D cell culture model using gingival fibroblasts.* Lasers Med Sci, 2016. DOI: 10.1007/s10103-016-1945-4
- (24) Gkogkos, A. S. et al. *Effect of Nd:YAG Low Level Laser Therapy on Human Gingival Fibroblasts.* International Journal of Dentistry, 2015, 1–7. DOI:10.1155/2015/258941

- (25) Basso, F. et al. *In Vitro Wound Healing Improvement by Low-Level Laser Therapy Application in Cultured Gingival Fibroblasts*. International Journal of Dentistry, 2012, 1–6. DOI:10.1155/2012/71945
- (26) Evans, E. *Treating Scars on the Oral Mucosa*. Facial plastic surgery clinics of North America, 2017, Vol. 25(1), pp.89–97. DOI: 10.1016/j.fsc.2016.08.008
- (27) Usumez, A., Cengiz, B., Oztuzcu, S., et al. *Effects of laser irradiation at different wavelengths (660, 810, 980, and 1,064 nm) on mucositis in an animal model of wound healing*. Lasers in Medical Science, 2014, Vol. 29, pp. 1807-1813. DOI: 10.1007/s10103-013-1336-z
- (28) Varella, A., Revankar, A., Patil, A. *Low-level laser therapy increases interleukin-1b in gingival crevicular fluid and enhances the rate of orthodontic tooth movement*. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 2018, Vol. 154, pp. 535-544e.5. DOI: 10.1016/j.ajodo.2018.01.012
- (29) Sinvagala, R., Sumanlatha, G. *Cytokines that mediate and regulate immune responses*. Innovative Immunology, 2015, pp. 1-26.
- (30) Basso, F., Soares, D., Pansani, T. et al. *Proliferation, Migration, and Expression of Oral-Mucosal-Healing-Related Genes by Oral Fibroblasts Receiving Low-Level Laser Therapy After Inflammatory Cytokines Challenge*. Lasers in Surgery and Medicine, 2016, Vol. 18, pp. 1006-1014. DOI: 10.1002/lsm.22553
- (31) Tsuka, Y., Kunimatsu, R., Gunji, H. et al. *Effects of Nd:YAG low-level laser irradiation on cultured human osteoblasts migration and ATP production: in vitro study*. Lasers in Medical Science, 2019, Vol. 34, pp 55-60. DOI: 10.1007/s10103-018-2586-6