

Avaliação do efeito do laser não cirúrgico (LLLT) no crescimento e aderência celular de fibroblastos cultivados sobre implantes de titânio: um estudo *in vitro*

Evaluation of non-surgical laser (LLLT) on the growth and cell adherence of fibroblasts cultivated on titanium implants: in vitro study

Aurelício Novaes Silva Júnior*

Denise Cantarelli Machado**

Marília Gerhardt de Oliveira***

Taís Somacal Novaes Silva****

Resumo

Recentemente, a laserterapia tem sido utilizada em odontologia visando aos seus efeitos terapêuticos e biomodulatórios sobre o aumento da velocidade e qualidade da integração entre os implantes dentais e os tecidos ósseo e periodontal. Entretanto, permanece incerto se é possível haver bioestimulação do crescimento celular pelo laser na presença de implantes de titânio. O objetivo do presente estudo foi examinar o crescimento, a proliferação e aderência sobre a superfície de titânio de uma linhagem de fibroblastos (NIH-3T3) submetida à irradiação com laser diodo ($\lambda=685\text{nm}$). Dois grupos com quatro culturas cada foram cultivados sobre discos de titânio previamente polidos e colocados numa placa de 24 poços. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após o cultivo, um grupo foi irradiado localmente por três sessões (24, 48 e 72 horas) (laser diodo $\lambda=685\text{nm}$, 0,7mW, $\varnothing\sim 0,60\text{mm}$), com uma dose de $0,8\text{ J.cm}^{-2}$ por sessão, e o outro foi mantido sem qualquer tratamento. Um grupo de controle de células cultivadas sobre a placa também foi conduzido. A aderência celular foi avaliada pela técnica de coloração com um agente

intercalante de DNA (iodeto de propídio) e o crescimento celular, pela contagem em hemocítmetro. De acordo com a contagem do número de células observadas em cada grupo, foi possível determinar nos grupos experimentais um aumento estatisticamente significativo no número médio de células nos períodos de 72 ($p=0,010$) e 96 horas ($p=0,007$) após o cultivo quando comparados com seus respectivos controles. Este estudo sugere que o laser, nas condições descritas, pode afetar positivamente a proliferação celular *in vitro* e, assim, pode desempenhar uma importante função na integração entre os implantes dentais e o tecido periodontal.

Palavras-chave: bioestimulação, laserterapia, proliferação celular, implantes dentais.

Introdução

A reabilitação de perdas dentais utilizando implantes de titânio tem sido uma técnica bem aceita em cirurgias dentais e ortopédicas (OZAWA e KASUGAI, 1996). Entretanto, a nova idéia de que a laserterapia melhora a adesão, o crescimento e a diferenciação celular sobre a interface célula-titânio tem sido proposta recentemente (PINHEIRO et al., 2001).

A utilização do laser operando em baixa potência tem sido estudada desde os anos 1970, sendo Endre Mester (1971) o pioneiro em demonstrar seus efeitos em tecidos moles. Achados científicos importantes indicam um efeito positivo do laser sobre a cicatrização de feridas em tecidos moles (MESTER, MESTER e MESTER, 1985), sobre o reparo ósseo (SILVA JÚNIOR et al., 2002; TRELLES e MAYAYO, 1987) e sobre o reparo ósseo após a inserção

* Mestre e Doutor em Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial. Professor Adjunto da Faculdade de Odontologia e do Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em CTBMF da FO/Ulbra.

** PhD em Biologia. Professora do Departamento de Medicina Interna - FM/PUCRS.

*** Doutora em Odontologia. Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em CTBMF - FO/PUCRS.

**** Mestre em C.T.B.M.F. Aluna do Programa de Pós-Graduação (Doutorado) em Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial - FO/PUCRS.

Recebido: 29.09.2004 Aceito: 28.02.2005

de implantes (PINHEIRO et al., 2001; Dörtbudak, Haas e Mailath-Pokorny, 2002).

O efeito da laserterapia sobre os tecidos permanece ainda controverso em razão dos relatos prévios demonstrando resultados diferentes ou conflitantes. É possível que o efeito do *laser* sobre a bioestimulação tecidual dependa não somente da dose total, mas também do tempo e do protocolo de irradiação (SILVA JÚNIOR et al., 2002). Mais importante ainda, estudos recentes têm sugerido que os parâmetros mínimos (*threshold*) de densidade de energia e intensidade são biologicamente independentes um do outro (SOMMER et al., 2001). Essa interdependência pode contribuir para o sucesso e a falha alcançados pela laserterapia nos baixos níveis de intensidade e fluência.

O uso de culturas de fibroblastos para demonstrar os efeitos proliferativos de alguns lasers foi descrito anteriormente (PINHEIRO et al., 2002; PEREIRA et al., 2002; KREISLER et al., 2002; ALEXANDRATOU et al., 2002; GROESSNER-SCHEREIBER et al., 2003). A adesão direta é o primeiro fator responsável pela relação entre a resposta celular e a morfologia e química de superfície (GUIZZARDI et al., 2004). Nesse contexto, Almeida-Lopes et al. (2001) relataram aumento da proliferação de células de fibroblastos gengivais submetidas à irradiação com *laser* de $\lambda=680\text{nm}$, $\lambda=692\text{nm}$, $\lambda=780$ e $\lambda=786\text{nm}$ ($10\text{-}50\text{mW}$ e 2 J.cm^{-2}). Outros estudos *in vitro* (GROSSMAN et al., 1998) demonstrando efeitos igualmente positivos sobre a proliferação celular em ceratinócitos de humanos com um *laser* diodo 780nm ($3,6\text{ J.cm}^{-2}$, $6,5\text{ mW}$) também foram relatados. O efeito da superfície do titânio em culturas celulares (OZAWA et al., 1998) e o efeito biomodulatório do *laser* sobre culturas de osteoblastos (DÖRTBUDAK et al., 2000) também já foram evidenciados isoladamente em outros estudos. Entretanto, o comportamento de células aderidas a implantes de titânio e irradiadas com *laser*, permanece ausente na literatura.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi examinar o crescimento, a proliferação e a aderência sobre a superfície de titânio de uma linhagem de fibroblastos (NIH-3T3) submetida à irradiação com *laser* diodo ($\lambda=685\text{nm}$).

Materiais e método

Materiais de implantes

O material de implante utilizado neste estudo foi o titânio disponível comercialmente (TiCP) (PROMM Indústria e Comércio de Materiais Cirúrgicos – Porto Alegre/RS – Brasil), que é 99,9% puro. Este material foi cortado em discos de $15,7\text{ mm}$ de diâmetro e 1mm de espessura e polido até se obter uma rugosidade de superfície menor que $1\mu\text{m}$, aferida por meio de um rugosímetro (SJ-201 – Surface Roughness Tester; Mitutoyo, CO, Japan), com o objetivo de remover o efeito da rugosidade sobre o crescimento e aderência celular. Feito isso, os discos foram limpos numa máquina de ultrassom contendo álcool a 70° a 35°C por 15 minutos, submetidos a processo de secagem sobre toalhas de papel estéreis até completa secagem à temperatura ambiente e, por fim, autoclavados a 121°C durante 15 minutos. Na sequência, as amostras foram checadas quanto ao seu polimento e regularidade de superfície com o auxílio de microscopia eletrônica de varredura (Fig. 1). O material esterilizado foi então colocado sobre uma placa de 24 poços utilizando uma pinça de titânio.

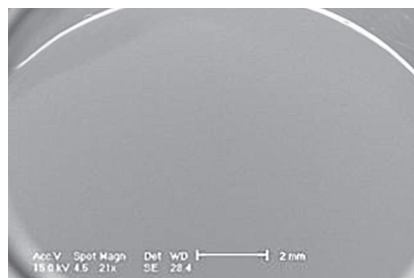


Figura 1 - Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura da caracterização da superfície lisa do titânio. Aumento 21x. Magnificação 2mm

Cultura celular

Células NIH-3T3 foram obti-

das da American Type Culture Collection (Rockville, MD) e cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Chemical Co) suplementado com soro fetal bovino (FBS) a 10% (Cultilab, Campinas, SP), 1% de solução antibiótica-antimicótica contendo penicilina/ estreptomicina (10.000 g/mL , 10.000 U/mL , invitrogen, USA) e 0,1% de gentamicina. As culturas foram, então, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 . Quando a população celular alcançou 80% de confluência, foram subcultivadas por dissociação com solução contendo tripsina (0,5%) e EDTA $2,3\text{ mM}$ (invitrogen). Um volume igual de meio DMEM foi adicionado para inibir a ação da tripsina, e as células foram então centrifugadas a 1.500 rpm (MSE Mistral 2000) durante três minutos. O sobrenadante foi removido e a viabilidade celular foi determinada por exclusão com azul de Tripán de acordo com a fórmula: viabilidade = número de células coradas $\times 100/\text{número de células mortas}$. Esse teste é essencial para prevenir resultados falsos positivos.

As células foram então diluídas a uma densidade de $0,5 \times 10^4$ células/mL em meio DMEM. Feito isso, 500 mL da suspensão foram adicionados em cada poço de uma placa de 24 poços contendo os discos de titânio, suspensas e contadas. As células foram cultivadas com intervalos de dois poços entre si objetivando dispersar o efeito da luz *laser* entre as culturas. As células foram cultivadas em três condições experimentais diferentes:

Grupo I: fibroblastos sobre titânio: três aplicações de $0,8\text{ J.cm}^{-2}$ cada, com intervalos de 24 horas (total: $2,4\text{ J.cm}^{-2}$);

Grupo II: fibroblastos sobre titânio: sem aplicação de *laser*;

Grupo III: fibroblastos somente (controle).

As irradiações com *laser* iniciaram-se 24 horas após o cultivo, visando aguardar o período de adaptação e aderência celular inicial, e seguiram-se nos períodos de 48 e 72 horas. Os períodos de observação foram definidos em 48, 72 e 96 horas após o cultivo.

Irradiação com *laser*

Vinte e quatro horas após o início do cultivo, irradiações foram efetuadas utilizando-se um *laser* diodo, $\lambda=685\text{nm}$, $\varnothing=0,60\text{mm}$ (DMC Equipamentos Ltda., São Carlos, SP, Brasil). Com uma potência determinada em 7 mW e dosagem fixada em $0,8\text{ J.cm}^{-2}$, o aparelho determinou automaticamente o tempo de exposição, que foi de 117 segundos.

A ponteira foi posicionada perpendicularmente sobre as culturas abertas em ambiente estéril (capela de fluxo vertical), e irradiadas a partir de uma distância constante (1,5cm), considerando-se a importância crítica entre a distância de emissão do *laser* pela fibra óptica e a monocamada celular sobre a superfície do titânio (Fig. 2).

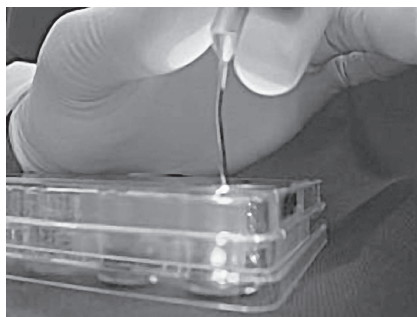


Figura 2 – Procedimentos de irradiação. Aspecto lateral do laser incidindo sobre a monocamada celular aderida ao titânio

Método de aferição e curva de crescimento

A contagem celular foi determinada nos períodos de 48, 72 e 96 horas após o cultivo utilizando um hemocitômetro. O número total de células foi determinado de acordo com a equação $(NQ1+NQ2+NQ3+NQ4)/4 \times d \times 10^4 = x \text{ células/mL}$, onde NQ=número total de células nos quadrados do hemocitômetro, d= fator de diluição e x=número total de células.

Análise da aderência celular sobre o titânio

As células foram coradas utilizando-se um agente intercalante de DNA (iodeto de propídio

- DNAcon Propidium Iodide) com o objetivo de permitir a visualização do crescimento celular sobre a superfície do titânio. Os discos de titânio foram coletados da placa de cultura e lavados com solução tampão fosfato (PBS). As células aderentes foram fixadas com etanol a 70° durante 30 minutos no gelo (com o objetivo de manter a aderência celular sobre os discos), seguindo-se a adição de 100mL de solução de iodeto de propídio (400mg/mL), conforme a rotina laboratorial para essa técnica. Após 30 minutos de incubação em estufa a 37°C , as células aderidas sobre os discos foram observadas em microscópio óptico de fluorescência equipado com luz ultravioleta.

Resultados

As células foram avaliadas 48, 72 e 96 horas após o cultivo (Fig. 3). O número médio final de células obtido em cada período foi submetido à análise estatística

através da análise de variância (fator único) entre grupos, tendo-se adotado como nível de significância 5% ($p<0,05$). A Tabela 1 mostra os resultados obtidos considerando o crescimento celular na presença (Grupo 1) ou ausência (Grupo 2) da irradiação com *laser*. O Grupo 3 representa os dados obtidos pelo crescimento celular na ausência de titânio e sem qualquer tratamento com *laser*. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos 1, 2 e 3 no período de 48 horas ($p=0,678$). Nos períodos de 72 ($p=0,001$) e 96 horas ($p=0,000$) foram observadas diferenças estatisticamente significantes. No período de 72 horas, o número médio de células em cada grupo foi de $16,6 \times 10^4$ (grupo 1), $6,8 \times 10^4$ (grupo 2) e $7,6 \times 10^4$ (grupo 3) células, conforme representado na Tabela 1. Nesse período uma maior densidade celular foi observada microscopicamente no grupo irradiado (Fig. 4) em comparação

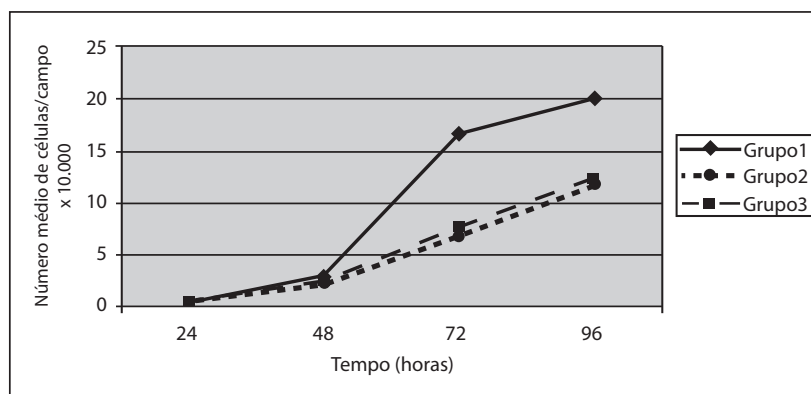


Figura 3 – Representação gráfica em curva de crescimento dos resultados expressos na Tabela 1

Tabela 1 - Comparação entre os grupos para média de células por campo nos três grupos – períodos de 48, 72 e 96 horas. Porto Alegre, 2004

Período de cultura (horas)	Grupo	Média de células por campo por campo x 10 ⁴	Desvio padrão	p
48	1	3	1,58	0,678
	2	2,2	1,30	
	3	2,4	1,51	
72	1	16,6	3,84	0,001*
	2	6,8	1,48	
	3	7,6	2,30	
96	1	20,2	2,28	0,000*
	2	11,6	2,30	
	3	12,2	1,81	

* = significativo ($p<0,05$)
Fonte: dados da pesquisa

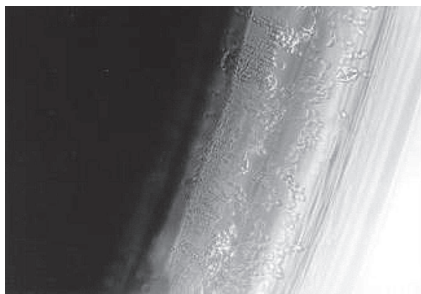


Figura 4 - Cultura de células na presença de titânio 72 horas após o cultivo. Grupo irradiado irradiado com laser. Aumento 50x

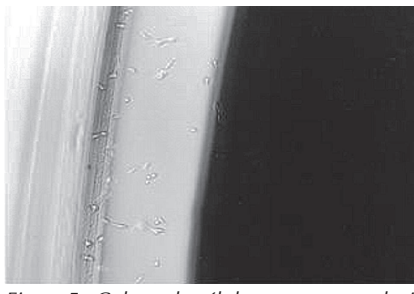


Figura 5 - Cultura de células na presença de titânio 72 horas após o cultivo. Grupo NÃO irradiado irradiado com laser. Aumento 50x

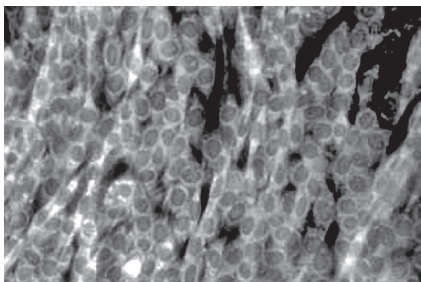


Figura 6 - Fotomicrografia dos fibroblastos 3T3 aderidos sobre a superfície do titânio, visualizados em microscópio óptico. Coloração com iodeto de propídio. Aumento de 400x



Figura 7 - Aspecto da monocamada celular formada pelas células 3T3 sobre a superfície do titânio. Aumento de 100x

com seu respectivo controle (Fig. 5). A perfeita e completa aderência de células NIH 3T3 sobre os discos de titânio pode ser observada nas figuras 6 e 7, onde os fibroblastos dispostos em colônias assumem morfologia fusiforme característica de aderência celular. Na coloração com iodeto de propídio, os núcleos das células são mostrados como pontos vermelhos. Na Figura 3, o comportamento celular pode ser também evidenciado através da disposição da curva de crescimento nos períodos de 48, 72 e 96 horas.

Discussão

Os mecanismos estimulatórios da irradiação com *laser* não estão ainda completamente entendidos (OZAWA e KASUGAI, 1996; PINHEIRO et al., 2002). Contudo, a maioria dos estudos tem repetidamente demonstrado que os efeitos induzidos após a irradiação foram a gradual alcalinização do pH citoplasmático e o aumento do potencial da membrana mitocondrial (KARU, 1989; ALEXANDRATOU et al., 2002). Além disso, fatores reguladores locais da função celular, como citocinas e prostagla-

dinas, podem ser ativados após a irradiação (TRELLES e MAYAYO, 1987; OZAWA et al., 1998). Assim, especula-se que o mecanismo estimulatório do *laser* sobre os fibroblastos pode ser mediado pelos mesmos fatores ou por mudanças intracelulares específicas.

Entretanto, existem ainda controvérsias sobre o efeito da terapia com *laser* não cirúrgico na proliferação celular. Relatos que avaliam os efeitos da luz *laser* visível em culturas de células mostram que o *laser* apresenta algumas vezes ação estimulatória e, em outras, ação inibitória (SOMMER et al., 2001). Também foi proposto recentemente que os parâmetros de densidade de energia e potência são independentes um do outro e que a utilização de uma potência menor que 04 mW não tem nenhum efeito sobre a bioestimulação (SOMMER et al., 2001). De fato, nosso estudo utiliza baixas densidades de energia ($2,4 \text{ J.cm}^{-2}$), estando de acordo com a maioria dos autores (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PINHEIRO et al., 2001; PINHEIRO et al., 2002; DÖRTBUDAK, HAAS E MAILATH-POKORNY, 2002;) e com os estudos pioneiros de Mester (1971).

Neste trabalho foi utilizada uma linhagem celular de origem laboratorial (NIH-3T3 CRL1658). Esse método continuará sendo o método de escolha para pesquisa em razão das dificuldades éticas de experimentos com animais e humanos. O método permite, ainda, avaliar o efeito de diversos agentes sobre as células e do *laser* sobre diferentes linhagens celulares (PINHEIRO et al., 2002; KREISLER et al., 2002).

A integração de bioimplantes com tecidos moles e duros requer citocompatibilidade dos biomateriais (OZAWA e KASUGAI, 1996; SOMMER et al., 2001) visto que a célula forma uma ligação química com uma fina camada de óxido presente na superfície do titânio (MEDEIROS, 1992). Neste estudo foi possível verificar que o *laser* funciona como um indutor do crescimento celular, mas que parece ter seus efeitos otimizados somente a partir do momento em que a célula reconhece e adere ao titânio como um substrato. É provável que o efeito reflexivo da superfície polida do titânio promova alguma variação nos parâmetros de energia, o que deve ser objeto de outros estudos. Isso deverá ser de especial importância quando da irradiação com *laser* em pacientes com implantes dentários ou portadores de próteses ortopédicas.

É concebível que a fase de crescimento linear das células é precedida por uma fase de crescimento latente durante a qual os fibroblastos se adaptam ao respectivo meio. O aumento da proliferação celular ocorre durante a fase de crescimento exponencial, que corresponde ao período no qual os fibroblastos de uma única geração se reduplicam. Os fibroblastos NIH 3T3 são uma linhagem celular com padrão de crescimento diferenciado, cuja fase de replicação inicia-se 17 horas após o subcultivo sob condições normais. O pico de proliferação ocorre em 24 a 48 horas durante a fase exponencial em particular e, obviamente, suportada pela energia da luz *laser*. O fato de o efeito da irradiação ser mais pronunciado na fase exponencial já foi citado experimentalmente por Dörtbudak, Haas e Mailath-

Pokorny, (2000), embora estudos experimentais *in vivo* na cicatrização (SILVA JÚNIOR et al., 2002) já tenham evidenciado claramente que os efeitos mais proeminentes da luz *laser* ocorrem nos períodos iniciais do reparo tecidual.

Em estudos anteriores utilizando fibroblastos gengivais humanos cultivados num meio suplementado por baixa concentração de soro fetal (5%) foi demonstrada uma melhora no crescimento celular utilizando *laser* com dois comprimentos de onda ($\lambda=635\text{nm}$ e $\lambda=785\text{nm}$) (ALMEIDA-LOPES et al., 2001). Por outro lado, esses resultados não foram compartilhados por Hallman et al. (1988), que analisaram os efeitos da irradiação com *laser* (helio-neônio) na replicação de fibroblastos humanos cultivados e suplementados por soro fetal (2%) e não observaram diferenças estatisticamente significativas entre as porções tratadas e não tratadas com *laser*.

Assim, optou-se por manter nessas culturas uma concentração normal de soro fetal (10%), por nos parecer que a otimização do efeito do *laser* independe das concentrações do meio.

Após estudos preliminares, verificou-se que a utilização de densidades de energia entre $0,5\text{ J.cm}^{-2}$ e 5 J.cm^{-2} e potência entre 5 e 30 mW sempre terão algum tipo de efeito biomodulatório sobre essa linhagem celular. Neste estudo, todos os parâmetros de irradiação foram mantidos constantes (comprimento de onda (λ), potência de saída, área irradiada). O comprimento de onda de 685 nm foi escolhido por já ser conhecido como ótimo para cicatrização tecidual. A utilização de baixas potências está de acordo com a maioria dos autores, utilizando entre 05 e 21mW (DÖRTBUDAK, HAAS E MAILATH-POKORNY, 2002; PINHEIRO et al., 2002).

Sugere-se que outros estudos devam ser desenvolvidos para estabelecer quais protocolos são os mais adequados aos diversos tipos de linhagens celulares utilizando diferentes tipos de densidades de energia e potência.

Conclusões

A análise *in vitro* de fibroblas-

tos NIH-3T3 irradiados com uma densidade de energia de $0,8\text{ J.cm}^{-2}$ apresentou aumento do número de células quando comparadas com os respectivos controles. Este estudo sugere que a irradiação com *laser*, usada segundo os protocolos de dose e comprimento de onda descritos aqui, pode ter um efeito positivo na proliferação celular *in vitro* e pode ser utilizada para otimizar o processo de crescimento celular sobre superfícies de titânio. Futuros estudos são necessários para demonstrar se a irradiação *laser* é igualmente benéfica para integração entre implantes e tecido ósseo.

Abstract

Lasertherapy has been currently used due to its therapeutic and biomodulatory effects. It is known that lasertherapy may improve the healing and integration quality between dental implants and bone and periodontal tissues. However, is still uncertain if it is possible to induce *laser* cell biostimulation in the presence of dental titanium implants. The aim of the present study was to examine adherence, proliferation and growth on a titanium surface of NIH-3T3 fibroblasts cell line submitted to diode *laser* irradiation ($\lambda=685\text{ nm}$). Two experimental groups containing four cultures each one were cultured on titanium discs and placed in a 24 well plate. Cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% of fetal calf serum (BFS). After acquiring culture, one group was irradiated three times (24, 48 e 72 hours) with a diode *laser* 7 mW, $\lambda=685\text{ nm}$, $\varnothing\sim0,60\text{ mm}$) with an energy density of $0,8\text{ J.cm}^{-2}$ per session. The other group was maintained without any treatment. Control group was grown under the same conditions, in the absence of titanium and was not irradiated either. Propidium iodide staining and hemocytometer chamber were used to evaluate cell adherence and cell growth respectively. According to average cell counts, it was possible to determine that cells reached an active and significant proliferation

stage 72 ($p=0,010$) and 96 hours ($p=0,007$) after cell cultivation and were able to adhere and grow on titanium surface. Therefore our data indicates that lasertherapy, under conditions described above, may positively affect *in vitro* cell proliferation and probably may play important role on dental implants and periodontal tissues integration.

Key words: biostimulation, lasertherapy, cell proliferation, dental implants.

Referências

- ALEXANDRATOU, E. et al. Human fibroblast alterations induced by low-power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy. *Photochem Photobiol Sci*, v. 1, n. 8, p. 547-52, 2002.
- ALMEIDA-LOPES, C. et al. Comparison of the low level therapy effects on cultured gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and fluence. *Lasers Surg Med*, v. 29, n. 5, p. 179-184, 2001.
- DÖRTBUDAK, O. et al. Bioestimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Impl Res*, n. 11, p. 540-545, 2000.
- DÖRTBUDAK, O. et al. Effect of low-power laser irradiation on bony implants sites. *Clin Oral Impl Res*, n. 3, p. 288-292, 2002.
- GROESSNER-SCHREIBER, B. et al. Fibroblast growth on surface-modified dental implants: an *in vivo* study. *J Biomed Mater Res*, v. 64A, n. 4, p. 591-599, 2003.
- GROSSMAN, N. et al. 780nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med*, v. 22, p. 212-218, 1998.
- GUIZZARDI, S. et al. Different titanium surface treatment influences human mandibular osteoblast response. *J Periodontol*, v. 75, p. 273-282, 2004.
- HALLMAN, H. O et al. Does low-energy helium-neon laser irradiation alter "*in vitro*" replication of human fibroblasts? *Lasers Surg Med*, v. 8, p. 125-129, 1988.
- KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Physics Society*, v. 56, n. 5, p. 691-704, 1989.
- KREISLER, M. et al. Low level 809-nm diode laser-induced *in vitro* stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med*, v. 30, n. 5, p. 365-369, 2002.

MEDEIROS, E. B. Estudo do titânio como Material Biocompatível. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1992.

MESTER, E. Effect of rays on wound healing. *Am J Surg*, v. 122, p. 532-535, 1971.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The Biomedical Effects of laser Application. *Lasers Surg and Med*, v. 5, p. 31-39, 1985.

OZAWA, S.; KASUGAI, S. Evaluation of implants materials (hidroxyapatite, glass-ceramics, titânio) in rat bone marrow stromal cell culture. *Biomaterials*, v. 17, n. 1, p. 23-29, 1996.

OZAWA, Y. et al. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat clavalial cells. *Bone*, v. 22, n. 4, p. 347-354, 1998.

PEREIRA, A.N. et al. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med*, v. 31, n. 4, p. 263-267, 2002.

PINHEIRO, A. L. et al. Biomodulation Effects of lllt on bone regeneration. *Laser Therapy (WALT)*, v.13, Special Milenium Edition, p. 73-79, 2001.

PINHEIRO, A. L. et al. Does LLLT Stimulate laryngeal carcinoma cells? An *In vitro* Study. *Braz Dent J*, v. 13, n. 2, 109-112, 2002.

SILVA JÚNIOR, et al. Computerized morphometric assessment of the effect of low level laser therapy (LLLT) on bone repair: experimental study in vivo. *J Clin Laser Med Surg*, v. 20, n. 2, p. 83-87, 2002.

SOMMER, A.P.; et al. Biostimulatory windows in low intensity laser activation: lasers, scanners and nasa's light emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg*, v. 19, p. 29-34, 2001.

TRELLES, M. A.; MAYAYO, E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Laser Surg Med*, v. 7, p. 36-45, 1987.

Endereço para correspondência

Aurelício Novaes Silva Júnior
Universidade Luterana do Brasil - Faculdade de Odontologia – Pós-Graduação
Av. Miguel Tostes, 101
Prédio 20 - Bairro São Luis
92420-280 – CANOAS – RS
Email: novaes.junior@uol.com.br
Fone: (51)477.4000 Ramal: 2340