

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL

**EFEITO DA FOTOTERAPIA LASER NO REPARO IN VITRO DE
QUERATINÓCITOS BUCAIS**

ANA CAROLINA AMORIM PELLICOLI

Porto Alegre

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL**

Linha de pesquisa:
Diagnóstico de Afecções Buco-Faciais

Dissertação:

**EFEITO DA FOTOTERAPIA LASER NO REPARO IN VITRO DE
QUERATINÓCITOS BUCAIS**

por
ANA CAROLINA AMORIM PELLICOLI

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Manoela Domingues Martins

Porto Alegre
2013

ANA CAROLINA AMORIM PELLICOLI

**EFEITO DA FOTOTERAPIA LASER NO REPARO IN VITRO DE
QUERATINÓCITOS BUCAIS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, nível Mestrado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para a obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de concentração em Patologia Bucal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Manoela Domingues Martins

Porto Alegre

2013

“Somente quando temos coragem para enfrentar as coisas exatamente como elas são, sem qualquer auto engano ou ilusão, é que uma luz surgirá dos acontecimentos, pela qual o caminho do sucesso poderá ser reconhecido.”

-- I Ching --

DEDICATÓRIA

A toda a minha **família** que sempre me apoiou e esteve presente nos bons e nos maus momentos. Em especial dedico essa dissertação a minha mãe **Lilian** e a minha irmã **Maria Fernanda** que são meus exemplos de vida e de caráter, minhas principais incentivadoras, estão sempre ao meu lado e apoiam incondicionalmente minhas decisões. Além disso, agradeço as conversas, os conselhos e as críticas, pois tudo isso sempre foi pensando no meu bem estar e crescimento pessoal. Sem elas não seria possível ir além.

Ao **Charles** pela paciência, carinho e compreensão durante todo esse tempo. Obrigada por tornar os meus dias mais leves e felizes. Além disso, agradeço também aos seus pais **Seno** e a **Ana Sueli** pela acolhida e pelos momentos de descontração.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora **Manoela Domingues Martins**, por ser uma grande pessoa, uma enorme mulher, um exemplo de mestre e de vida e por saber, sempre na medida certa, como dizer as coisas. Obrigada por ter participado da minha formação acadêmica e pessoal. É difícil encontrar palavras para descrever a intensidade da nossa relação nesses últimos anos e o carinho que sinto por ti. Você foi bem mais do que uma orientadora, foi minha amiga, minha conselheira, minha incentivadora, um exemplo a ser seguido e admirado.

Aos professores da Patologia, Estomatologia e Biologia dos Tecidos: **Pantelis Varvaki Rados, Manoel Sant'ana Filho, Anna Christina Medeiros Fossati, Vinícius Coelho Carrard, Márcia Gaiger de Oliveira, Marco Antônio Trevizani Martins, Maria Cristina Munerato, Marcelo Lazzaron Lamers, Fernanda Visioli e Laura Campos Hildebrand** pelos ensinamentos, pela paciência em ensinar e pelas discussões durante todo o mestrado. Em especial ao professor **Pantelis** pelo exemplo de mestre e de pessoa. Obrigada por acreditar em mim desde o princípio e por sempre me incentivar a seguir em frente. A professora **Fernanda** por acompanhar minha trajetória, por me apoiar nos momentos difíceis, por saber me ouvir, pelos conselhos, carinho e amizade.

À minha “família” patológica: **Julianna, Adriana, Artur, Alessandra, Grasieli, Thaíse, Lisiane, Ana Luísa, Paula Matheus, Bárbara, Bernardo, Bruna, Caroline, Viviane, Felipe, Lucas, Francine, Marina, Fernanda, Gabriela Salvadori, Isadora, Liana, Vivian, Paula Rodrigues, Natália,**

Nicole, Gabriela Luz, Raíssa, Júlia, Gabriela Meyer, Bianca, Kelly. Muito obrigada pelo convívio diário, pelas conversas, pelo apoio, pelos momentos felizes. Nossos laços foram se estreitando com o passar do tempo e realmente passamos a conviver como uma família.

Aos professores **Rogério Moraes Castilho e Cristiane Helena Squarize** pela acolhida, pelos ensinamentos e por tornarem possível a realização desse projeto. À **Luciana Kauer e Chiara Zagni** pelos ensinamentos e auxílio com o desenvolvimento deste trabalho.

A **Isabel Lauxen, Alessandra Magnusson, Chris Krebs e Thaniele Ramos** pela amizade, pelos momentos de descontração no café e, principalmente, pelos ensinamentos no laboratório, por viabilizar e auxiliar na execução dos projetos. Sem vocês minha formação não seria a mesma.

À **Adriana Aguar** agradeço a receptividade e a prestatividade, além dos bons momentos de lazer.

Ao **Centro de Pesquisa Experimental, à Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas, ao Centro de Terapia Gênica e a Unidade de Experimentação Animal** pelo auxílio no desenvolvimento de projetos. Em especial a **Dra. Úrsula Matte, Dra. Patrícia Köehler, Carolina Uribe, Marta Cioatto e Fabíola Meyer** pela disponibilidade e ensinamentos.

Às minhas amigas **Thiana Bernardi, Marina Mendez, Fernanda Gatti e Mariella Cabeda.** Apesar da distância estiveram sempre presentes para tornar minha vida mais feliz. Muito obrigada pela amizade e por entenderem meus momentos de ausência durante esse período.

À **UFRGS** por tornarem possível a realização dos meus cursos de Graduação e Pós-Graduação.

À **CAPES, UFRGS, FIPE/HCPA e UMICH** pelo apoio financeiro ao longo do mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Reparo de feridas	13
1.2. Fototerapia laser	18
1.3. Ação da FTL no reparo de feridas em modelos <i>in vitro</i>	22
2. OBJETIVO	31
2.1 Objetivo Geral	31
2.2 Objetivos Específicos	31
ARTIGO CIENTÍFICO	32
Introduction	33
Material and Methods	34
Results	39
Discussion	42
References	48
Supplementary	56
CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXO	

RESUMO

A fototerapia laser (FTL) tem sido usada clinicamente para auxiliar na cicatrização de inúmeras doenças bucais, especialmente no tratamento de lesões ulceradas. Os mecanismos celulares através dos quais o laser é capaz de promover a bioestimulação não são completamente compreendidos. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* o efeito da FTL no comportamento de queratinócitos bucais no processo de cicatrização. Células epiteliais bucais (NOK-SI) foram cultivadas sob duas condições nutricionais: suplementadas com 10% de soro fetal bovino (FBS) e sob déficit nutricional (2% FBS) seguido de irradiação com laser de diodo InGaAlP (660nm, 40mW, 4 e 20J/cm², 4 e 20s), através da técnica pontual e em contato. Foram realizados ensaio de viabilidade celular (MTT), migração celular (cicatrização) e análise proteica (Western Blotting e Fluorescência). Os resultados obtidos indicaram que a FTL influencia diretamente a migração epitelial evidenciado pelo fechamento acelerado das feridas irradiadas e polarização do citoesqueleto celular (F-actina). Conclui-se que os efeitos clínicos da FTL estão associados, entre outros fatores, ao aumento da migração epitelial.

Palavras-chave: fototerapia laser, cicatrização de feridas, queratinócitos, úlceras bucais

ABSTRACT

Laser phototherapy (LPT) has been used clinically to accelerate wound healing in a variety of oral diseases. The cell mechanisms by which LPT can promote biostimulation have not yet been fully elucidated. Epithelial cells play an important role in the reparative process since its proliferation and migration from the wound margin is crucial for restoring epithelial continuity. It is unclear whether LPT has an effect on epithelial cell migration. Based on this, the aim of this study was to investigate the effect of LPT in the oral wound healing process using oral keratinocytes. Oral keratinocytes were maintained under two nutritional conditions supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) and in nutritional deficit (2% FBS). Laser irradiation was delivered with an InGaAlP laser (660nm, 40mW, 4 e 20J/cm², 4 e 20s). Irradiations were performed in contact, using the punctual irradiation mode. The following tests were performed: cell viability, cell migration and protein analysis. Results obtained suggest that LPT influences epithelial migration and cytoskeleton polarization. Interestingly, LPT effect under epithelial cell migration occurs independently of cell viability. In conclusion, clinical LPT effects are associated with an increase in epithelial cell migration.

Keywords: Laser phototherapy, wound healing, keratinocytes, oral ulcers

1 INTRODUÇÃO

Na clínica odontológica lesões ulceradas de origem traumática ou imunológica/inflamatória podem ser observadas frequentemente e se caracterizam pela perda do revestimento epitelial associada à exposição do tecido conjuntivo. O tratamento destas lesões visa acelerar o reparo e aliviar a sintomatologia dolorosa, no entanto, nenhum tratamento específico foi estabelecido, e diversos protocolos vem sendo utilizados. Entre estes podemos citar o uso de antisépticos, analgésicos, corticoesteróides, antibióticos, imunomoduladores e antiinflamatórios, fitoterápicos, além de tratamentos locais específicos como remoção cirúrgica, debridamento, ultrassom de baixa densidade, cauterização química e FTL (MARTINS et al. 2011; FERNANDES et al. 2010; MARTINS et al. 2009; MIZIARA, 2009; LEÃO, GOMES, PORTER 2007; JURGE et al. 2005; FIELD, ALLAN 2003; SCULLY, SHOTTS 2000).

Estudos *in vivo* utilizando modelos animais (MEDRADO et al. 2008; CORAZZA et al. 2007; VIEGAS et al. 2007; GAL et al. 2006; NASCIMENTO et al. 2004) assim como modelos *in vitro* (BASSO et al. 2012; FERREIRA et al. 2009; DAMANTE et al. 2009; EDUARDO et al. 2007; HAWKINS E ABAHAMSE 2006; MARQUES et al. 2004; PUGLIESE et al. 2003; MEDRADO et al. 2003) vem sendo realizados com o intuito de estudar os diferentes recursos terapêuticos, dentre eles a FTL no reparo tecidual. Estes modelos tem sido fonte de importantes investigações para compreender a resposta biológica dos componentes celulares de forma conjunta (modelo *in vivo*) e individualizada (modelo *in vitro*) durante o reparo.

A seguir abordaremos os tópicos mais relevantes envolvidos no processo de reparo de feridas *in vitro* utilizando a FTL.

1.1 REPARO DE FERIDAS

O processo de reparo de lesões envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que buscam a restauração tecidual (MANDELBAUM, SANTIS, MANDELBAUM 2003). Este processo pode ser dividido em três fases dinâmicas e interrelacionadas denominadas de inflamatória, proliferativa e de remodelamento, que se sobrepõem de forma contínua e temporal. Nestas fases ocorrem eventos como migração celular, vasodilatação, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de matriz extracelular (ARAÚJO et al. 2010; MENDONÇA, COUTINHO-NETTO 2009).

Fase Inflamatória:

A fase inflamatória é uma fase essencial para o reparo de feridas que se inicia após a ação do agente agressor e é caracterizada pela liberação de mediadores químicos (histamina, citocinas, complemento, etc) que promovem alterações vasculares e exsudativas no sítio inflamatório.

Após a agressão, dentro da fase inflamatória, ocorre a hemostasia (COLLIER 2003), através da vasoconstrição, agregação plaquetária e deposição de fibrina levando a formação da crosta, cuja composição principal são fibrina, plaquetas e células sanguíneas (MARTIN 1997). Essa crosta além de impedir a perda de eletrólitos e fluidos do local da ferida, também limita a contaminação secundária (MONACO e LAWRENCE 2003). Após a homeostasia ocorre a liberação de mediadores químicos responsáveis por

aumentar a permeabilidade vascular (COLLIER 2003), recrutar células inflamatórias (leucócitos, especialmente neutrófilos e monócitos) (MARTIN 1997) e proteínas plasmáticas para o local da ferida (O'LEARY et al. 2002; ADZICK 1999). Esse fenômeno é denominado de exsudação. A migração de células inflamatórias para o tecido intersticial tem como papel principal eliminar agentes agressores e fagocitar componentes do tecido conjuntivo danificados, além de preparar o tecido para a próxima fase através da liberação de fatores de crescimento. (MENDONÇA, COUTINHO-NETO 2009).

Os neutrófilos são responsáveis por remover do local injuriado restos celulares, materiais contaminados e bactérias; e os monócitos se diferenciam em macrófagos e são responsáveis por orquestrar a restauração da integridade tecidual (ADZICK 1999), degradar a matriz extracelular, promover a angiogênese e a fibroplasia resultando na cicatrização da ferida (SCHAFFER e NANNEY 1996). Já as células plasmáticas produzem anticorpos específicos para antígenos externos presentes no local inflamado (SCHILLING 1976).

Muitos dos efeitos teciduais observados durante a fase inflamatória são atribuídos as citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-1 β . A IL-1 β é uma citocina pleiotrópica produzida por macrófagos, células T, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais e ativada pela ação da caspase1. Ela é responsável pela geração de respostas na fase aguda da inflamação (MCFARLAN-MANCINI et al. 2012) e por iniciar a resposta inflamatória resultando em aumento da vascularização subepitelial (SONIS 1998). Também está relacionada à destruição tecidual, reabsorção óssea e indução de proteinases (BISWAS, LEWIS 2010). O TNF- α , por sua vez, está relacionado

ao dano inicial causado no endotélio e no tecido conjuntivo. Ele promove sinalizações epitélio-mesenquimais e reduz a oxigenação tecidual, resultando em morte e dano das células basais do epitélio (Yeoh AS, *et al.* 2005). Além disso, desempenha um papel importante na defesa antimicrobiana, reparo de feridas (ZHANG *et al.* 2012), resposta imune, angiogênese, remodelação tecidual e proliferação e diferenciação celular (SIMUNOVIĆ-SOSKIĆ *et al.* 2010).

Fase Proliferativa:

A fase proliferativa é uma fase predominantemente celular que se caracteriza por fenômenos como reepitelização, fibroplasia e angiogênese, sendo estes dois últimos os responsáveis pela formação do tecido de granulação. Este tecido representa o arcabouço do reparo tecidual, pois ocupa a área da lesão e é responsável pelo seu fechamento (MENDONÇA, COUTINHO-NETO 2009). A formação de uma rede vascular no tecido de granulação contribui para que o processo de reparo ocorra de forma mais eficaz e mais rápida, permitindo um maior fluxo de nutrientes para a região e a saída de metabólitos da ferida (GONÇALVES *et al.* 2010). Nesta fase são observados inúmeros fatores de crescimento tais como: fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador (TGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fator de crescimento epidermal (EGF) (BARRIENTOS *et al.* 2008).

Outro importante evento da fase proliferativa é a síntese de fibroblastos, pois estas células vão produzir o colágeno, substância que vai conferir

tenacidade e integridade ao tecido, sustentando a nova rede de capilares e o tecido de granulação (MODOLIN e KAMAKURA 1981).

Paralelamente, o epitélio cicatriza de forma mais rápida reassumindo sua função de barreira contra a penetração de agentes secundários no local da ferida. Esse processo se inicia com a proliferação das células basais do revestimento epitelial, seguida da migração dos queratinócitos. Essa migração termina no momento em que as células de ambos os lados da ferida entram em contato. Após, segue-se a fase de diferenciação, estratificação e maturação epitelial (CRUSE e MCPHEDRAN 1991).

Fase de Remodelamento:

A fase de remodelamento é marcada pela maturação dos elementos teciduais e alterações na matriz extracelular, com a deposição de proteoglicanas e colágeno, na tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal. Durante esta fase a maioria dos vasos, fibroblastos e células inflamatórias desaparecem por processos de emigração, apoptose ou processos de morte celular desconhecidos (MENDONÇA; COUTINHO-NETO 2009).

A formação de uma nova matriz extracelular requer a substituição do tecido de granulação por uma rede de fibras colágenas e elásticas que sofrerão saturação por proteoglicanas e glicoproteínas. Esse processo é seguido pela síntese de um novo colágeno guiado pelo TGF- β , enquanto que o colágeno antigo é removido via ação de PDGF (BARRIENTOS et al. 2008). Nesta fase há diferenciação de miofibroblastos a partir de fibroblastos locais via PDGF e

TGF- β . Estas células por sua vez, serão responsáveis pela contração da ferida (BARRIENTOS et al. 2008).

O sucesso do processo de reparo tecidual depende da ação coordenada de fatores de crescimento e mediadores químicos envolvidos numa complexa rede de sinais que coordenam o processo inflamatório (BARRIENTOS et al. 2008; MONACO e LAWRENCE 2003).

Recentemente, foi descoberto que diversas vias de sinalização molecular que sabidamente estão envolvidas na progressão tumoral também desempenham importante papel na cicatrização de feridas (SCHAFER e WERNER 2008). A ativação do complexo HGF/c-Met leva a ativação de uma cascata de sinalização incluindo PI3K (phosphoinositide-3-kinase)/AKT (LIU et al. 2011). Squarize *et al* (2010) observaram que inúmeras vias moleculares estão envolvidas no reparo tecidual. Além disso, observaram que a ativação da via PI3K/Akt acelera o fechamento de feridas na dependência da ativação do mTOR (mammalian target of rapamycin). (SQUARIZE et al. 2010).

PI3K é uma molécula lipídica que regula diversas funções celulares, dentre elas proliferação, migração e sobrevivência (ALGHAMDI et al 2012), além disso é responsável por regular a expressão de Akt (HENNESSY et al 2005). A ativação do complexo PI3K/Akt representa um componente importante do processo fisiológico de cicatrização de feridas (SQUARIZE et al. 2010).

1.2 FOTOTERAPIA LASER

Historicamente, em 1917, Albert Einstein apresentou os princípios teóricos sobre a amplificação da luz pela emissão de radiação (CARVALHO et al. 2001). Em 1950, Townes, Gordon e Zeiger desenvolveram o primeiro aparelho oscilador que operava na faixa das microondas (SILVA et al. 1998). Em 1961, foi desenvolvido o laser em baixa intensidade de hélio-neônio (HeNe), emitindo radiação vermelha com comprimento de onda de 632,8nm (BAXTER 1997). Na década de 70, os lasers da faixa infravermelha Arsenato de Gálio (AsGa) e Arsenato de Gálio e Alumínio (AsGaAl) foram desenvolvidos (TUNÉR e HODE 1999). Na odontologia, o primeiro relato de uso do laser data do ano de 1965 quando Leon Goldman utilizou um laser de rubi em um dente desvitalizado (BASFORD 1995).

O laser (*light amplification by stimulated emission of radiation*) consiste de um feixe de luz monocromático com coerência espacial e direcional (ZEZELL 2004). O laser em baixa intensidade (LBI) corresponde à emissão de luz laser com potência abaixo de 500mW, onde a irradiação propriamente dita vai gerar um efeito biológico no tecido sem aquecimento, uma vez que a energia absorvida pelos fótons não vai ser transformada em calor e sim em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos (LINS et al. 2010; BAPTISTA et al. 2010) sendo este último denominado de fotobioestimulação (RIBEIRO et al. 2009; REDDY et al. 2004).

A fotobioestimulação tem por objetivo promover o aumento do metabolismo celular, podendo assim induzir diversos efeitos teciduais, tais como efeito analgésico, antiinflamatório e reparador (BOURGUIGNON-FILHO et al. 2005). Conhecendo estes efeitos, a FTL aparece como uma alternativa na

área da saúde para prevenir, modular e/ ou tratar doenças que possuam na sua fisiopatologia o desenvolvimento de um processo inflamatório/imunológico (EDUARDO et al. 2007; BAPTISTA et al. 2010).

As baixas densidades de energia e comprimentos de onda dos LBI fazem com que a luz laser seja capaz de penetrar em profundidade nos tecidos (HENRIQUES, CAZAL, CASTRO 2010). A dose de irradiação ionizante à qual o indivíduo está exposto depende de inúmeros parâmetros e tem um papel muito importante na FTL, uma vez que existem respostas distintas entre as células de acordo com cada padrão de irradiação por laser, e estas respostas vão depender do comprimento de onda, energia, potência, densidade de potência, densidade de energia, tempo de irradiação, frequência de irradiação, intervalo entre as irradiações, área do feixe e modo de irradiação. Entretanto, até o presente momento, a relevância destes parâmetros no reparo não está totalmente esclarecida. Estudos prévios mostram resultados contraditórios que podem ser explicados em parte pela variedade na combinação de parâmetros assim como, na dificuldade de medir de forma objetiva os possíveis efeitos do tratamento (PEPLOW, CHUNG, BAXTER 2010).

Endre Mester *et al.* (1971) foram os primeiros a demonstrar que quantidades de baixa intensidade de luz são capazes de produzir reparo no tecido e alívio da dor. Desde então, foram desenvolvidos estudos no intuito de entender o mecanismo de interação da FTL com as células. Karu (1988) apontou que o efeito do FTL seria resultado da absorção da luz por flavinas e citocromos da cadeia respiratória mitocondrial, que através de alterações na transferência de elétrons geraria espécies reativas de oxigênio. Estas levariam

à modificação da permeabilidade da membrana celular, aumentando o fluxo de cátions Ca^{2+} e por consequência aumentando a proliferação celular.

Smith (1991) propôs que a radiação infravermelha poderia ativar diretamente os canais de Ca^{2+} através de modificações fotofísicas, iniciando sua ação diretamente na membrana celular. De acordo com este autor outro aspecto importante é que a resposta celular a FTL depende do estado fisiológico em que a célula irradiada se encontra. O LBI tem a capacidade de induzir a proliferação tecidual apenas em células que estejam com a taxa de proliferação diminuída no momento da irradiação, ou seja, é importante considerar o fato de que a FTL não trará efeitos terapêuticos se a célula irradiada estiver em seu nível normal máximo de funcionamento (SMITH 1991; KARU 1989).

A resposta biológica adequada frente a FTL depende da aplicação de um tipo específico de laser com uma dose ótima de radiação. Para tanto, os seguintes parâmetros devem ser levados em consideração: comprimento de onda, energia, potência, densidade de potência, densidade de energia, tempo de irradiação, frequência de irradiação, intervalo entre as irradiações, área do feixe e modo de irradiação. A grande variabilidade nos resultados descritos na literatura frente a FTL devem-se, em parte, a falta de padrões específicos nos parâmetros utilizados em cada estudo (BAXTER e ALLEN 1994; BASFORD 1995). Da mesma forma, a possibilidade de que diferentes células respondam de maneiras distintas a FTL tem sido pouco discutida (CONLAN, RAPLEY, COBB 1996).

Na literatura um dos parâmetros mais importantes citados é a densidade de energia, pois modificações neste parâmetro resultam em alterações na dose de FTL que podem estimular, inibir ou não manifestar os efeitos terapêuticos esperados (RIBEIRO, ZECELL 2004). Pereira *et al.* (2002) avaliaram o efeito da FTL em fibroblastos utilizando o laser de diodo com densidades de energia de 3, 4 e 5J/cm². Os resultados mostraram que irradiações com doses de 3 e 4J/cm² promoveram aumento no crescimento celular, enquanto que doses de 5J/cm² não provocaram alterações no crescimento celular.

Os estudos até então conduzidos mostram que os resultados obtidos com a FTL em nível tecidual e celular estão baseados no aumento da proliferação de diversos tipos celulares (PEPLOW *et al.* 2010; RIBEIRO *et al.* 2009; PEREIRA *et al.* 2002), promoção da síntese de pré-colágeno e colágeno (de SOUZA *et al.* 2011; PEREIRA *et al.* 2002), potencial antiinflamatório (LIM *et al.* 2007; AIMBIRE *et al.* 2006), aumento da neo-vascularização (CORAZZA *et al.* 2007; PEREIRA *et al.* 2010), redução da expressão de espécies reativas de oxigênio (LIM *et al.* 2007), liberação de fatores de crescimento (DAMANTE *et al.* 2009), citocinas pró-inflamatórias (FERNANDES *et al.* 2012) e mediadores químicos algícos (SAKURAI, YAMAGUCHI, ABIKO 2000). Porém, alguns estudos mostram que a FTL não promove modificação no metabolismo celular (MESQUITA-FERRARI *et al.* 2011; FERREIRA *et al.* 2009). Estes efeitos podem estar relacionados com os parâmetros do laser utilizado assim como, com o tipo de células que foram irradiadas. Vários estudos vem demonstrando que mioblastos tanto *in vitro* (MESQUITA-FERRARI *et al.* 2011; FERREIRA *et*

al. 2009) como *in vivo* (de SOUZA et al. 2011; BAPTISTA et al. 2011) não respondem a FTL.

Baseado nos efeitos acima descritos a FTL vem sendo muito utilizada na prática clínica diária para tratamento de diversos processos patológicos, especialmente em reparo e em condições inflamatórias como a mucosite e úlceras em geral (SCHUBERT et al. 2007). Os principais efeitos descritos são: ação moduladora da inflamação, redução da severidade de lesões ulceradas (SANDOVAL 2003; BARASH et al. 1995), acelerar o reparo de feridas e diminuir a sintomatologia dolorosa (SACONO et al. 2008).

1.3 AÇÃO DA FTL NO REPARO DE FERIDAS EM MODELOS *IN VITRO*

O modelo de reparo de feridas *in vitro* se baseia na utilização da cultura celular. Este método se caracteriza pelo crescimento e cultivo de células sobre um suporte plano e liso, quer seja um plástico ou vidro de cultura, contendo uma quantidade definida de meio e mantido a uma temperatura de 37°C mimetizando a temperatura corporal (MASTERS 2000).

As células em cultura precisam ser monitoradas periodicamente, uma vez que após preencherem toda a placa, ou seja atingirem a confluência celular, é necessário a realização de sub-culturas ou passagem celular. Células confluentes podem entrar em senescência ou então em sofrimento por falta de nutrição. Para o procedimento de sub-culturas as células precisam ser enzimaticamente desprendidas do fundo das placas de cultura quando atingirem um estágio de semiconfluência celular (70% de confluência) seguido

pelo replaqueamento (ressemeadas) em novas placas de cultura para continuarem proliferando (BRESLIN e O'DRISCOLL 2012). Na grande maioria dos experimentos linhagens celulares são utilizadas para mimetizar um tecido do organismo (BISSELL e RADISKY 2001).

A cultura celular vem sendo amplamente utilizada como ferramenta para avaliar os efeitos bioestimuladores da FTL bem como, para compreender os mecanismos através dos quais esse efeito é alcançado e estabelecer o protocolo ideal de utilização deste recurso terapêutico. Porém, a FTL só será efetiva em culturas nas quais as células apresentem crescimento reduzido (PELPOW et al. 2011) ou estejam em condições de déficit nutricional (ALMEIDA-LOPES 2001) no momento da irradiação. O déficit nutricional não inativa totalmente os mecanismos de crescimento celular, porém reduz a taxa de crescimento. Essa situação de estresse criada *in vitro* reproduz situações similares de estresse *in vivo* onde a FTL tem se mostrado eficaz. Segundo alguns autores a taxa de crescimento celular de células estressadas por falta de nutrientes é diminuída em comparação a células em condições normais (FUJIHARA et al. 2006; AZEVEDO et al. 2006; KARU et al. 1987).

No estudo de Almeida-Lopes et al (2001) foi avaliado o efeito da concentração de soro fetal bovino (SFB) sobre o crescimento celular de fibroblastos gengivais. Foram estabelecidos três grupos, as células foram semeadas em placas de 96 poços contendo 2, 5 e 10% de SFB. Os resultados obtidos mostraram que culturas de células não irradiadas suplementadas com SFB à 10% apresentaram taxa de crescimento maior quando comparada a culturas suplementadas com 2 e 5% de SFB irradiadas ou não.

Abaixo serão descritos alguns estudos realizados em modelos *in vitro* em ordem cronológica descendente e na Tabela 1 estão listados os estudos de acordo com o tipo celular.

Basso *et al.* (2012) avaliaram o efeito da FTL em queratinócitos de pele (HaCaT), utilizando o laser de InGaAsP, com comprimento de onda de 780nm, 40mW de potência, com doses distintas: 0.5, 1.5, 3, 5 e 7J/cm². A irradiação foi realizada em três momentos com intervalos de 24h entre cada aplicação. Os resultados obtidos mostraram que houve aumento na taxa de proliferação e na contagem celular com doses mais baixas de irradiação (0.5, 1.5, 3 e 5J/cm²). Além disso, a FTL aumentou a síntese de colágeno e a expressão de VEGF.

Mesquita-Ferrari *et al.* (2011) avaliaram o efeito da FTL na proliferação de mioblastos sob diferentes condições nutricionais. O laser utilizado foi o GaAlAs (780nm com 3.8, 6.3 e 10J/cm²) e InGaAlP (660nm com 3.8, 10 e 17.5J/cm²). Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença na proliferação celular entre mioblastos irradiados e controle

Ferreira *et al.* (2009) estudaram o efeito da FTL na viabilidade de mioblastos cultivados em diferentes condições nutricionais. Os lasers utilizados foram os de InGaAlP e de GaAlAs com comprimento de onda de 660 e 780nm e distintas densidades de energia para cada comprimento de onda avaliado. Foi realizada uma única aplicação e a proliferação celular foi analisada 24h após a irradiação através do teste da atividade mitocondrial. Os resultados obtidos não mostraram diferenças entre os grupos tratados quando comparados ao controle.

Damante *et al.* (2009) avaliaram o efeito bioestimulador do laser em fibroblastos gengivais, utilizando o laser de GaAlAs, com comprimento de onda de 780nm, e o laser de InGaAlP, com comprimento de onda de 660nm. A irradiação foi realizada em dois momentos com 6h de intervalo e foram utilizadas duas doses distintas: $3\text{J}/\text{cm}^2$ e $5\text{J}/\text{cm}^2$. Os grupos tratados com laser apresentaram aumento na expressão de diversos fatores de crescimento envolvidos no reparo de lesões, dentre eles fator de crescimento fibroblástico (FGF).

Eduardo *et al.* (2007) em seu estudo avaliaram os efeitos do LBI sobre células epiteliais renais (Vero). O laser utilizado foi o de diodo nos comprimentos de onda de 660nm e 780nm, potências de 40 e 70mW, e doses de 3 e $5\text{J}/\text{cm}^2$, três irradiação foram aplicadas. Nos grupos tratados com LBI, especialmente o grupo tratado com comprimento de onda de 780nm houve aumento na proliferação celular.

Hawkins e Abahamse (2006) realizaram um estudo para avaliar os efeitos da FTL no comportamento de fibroblastos humanos. O protocolo utilizado foi irradiação com laser HeNe com comprimento de onda de 632,8nm, com doses de 2.5, 5 e $16\text{J}/\text{cm}^2$, foi realizada uma irradiação diária durante dois dias. A análise dos resultados mostrou que uma única irradiação de $5\text{J}/\text{cm}^2$ ou duas ou três com doses de $2.5\text{J}/\text{cm}^2$ apresentam efeitos positivos sobre essas células aumentando a proliferação e migração celular, mantendo a viabilidade celular, sem causar danos adicionais as células. Por outro lado, múltiplas irradiações de $16\text{J}/\text{cm}^2$ levaram a uma redução na migração, na viabilidade celular e inibiram a proliferação celular. Com isso os autores concluíram que o efeito

cumulativo de baixas doses levam a bioestimulação, enquanto que múltiplas exposições a altas doses resultam em efeito inibitório e dano celular.

Marques *et al.* (2004) conduziram um estudo em fibroblastos gengivais para avaliar o efeito da FTL na morfologia e síntese proteica dessas células. O protocolo utilizado foi irradiação com laser GaAIAs com comprimento de onda de 904nm, com energia de 120mW numa dose de 3J/cm². A irradiação foi feita através da técnica pontual e em contato durante 24 segundos. Através da análise dos resultados os autores concluíram que o LBI foi capaz de induzir mudanças estruturais nas células avaliadas.

Schindl *et al.* (2003) estudaram o efeito da FTL em células endoteliais utilizando o laser de diodo, com comprimento de onda de 670nm, densidade de energia de 2-8J/cm², durante 6 dias. Os resultados do estudo mostraram que a FTL estimulou a proliferação dessas células.

Kipshidze *et al.* (2001) avaliaram o efeito do LBI na síntese de VEGF e na proliferação de células endoteliais humanas utilizando o laser HeNe. O protocolo de irradiação utilizado foi 632nm, 0.10 a 6.3J/cm². Os resultados obtidos indicaram que a FTL aumentou a síntese de VEGF, bem como estimulou o crescimento de células endoteliais em cultura.

Sakurai, Yamaguchi e Abiko (2000) avaliaram o efeito do laser GaAIAs (830nm) na produção de prostaglandina (PGE) por fibroblastos gengivais humanos. O laser foi aplicado com doses de 0.95 a 6.32J/cm². Após 10min de aplicação houve inibição de 90% da produção de PGE, e após 20min a produção de PGE estava em nível controle. O mecanismo sugerido pelos

autores para a alteração na produção de PGE foi o de redução na expressão gênica da cicloxigenase² responsável por regular a síntese de PGEs.

Loevschall e Arenholt-Bindsel (1994) estudaram o efeito da FTL em fibroblastos de mucosa bucal humana utilizando o laser GaAlAs, com comprimento de onda de 812nm e densidade de energia de 0,0004 a 4.5J/cm². Os resultados mostraram que não houve alteração morfológica nas células, a viabilidade celular foi mantida e houve aumento na síntese de DNA.

Breugel e Bär (1992) testaram a proliferação celular e síntese de colágeno tipo I, variando a potência e tempo de aplicação do LBI. A irradiação foi feita com laser HeNe, 630nm, 0.55 a 5.98mW de potência, durante três dias em períodos de 30s a 10min. Os resultados mostraram que potências mais baixas (<2.91mW) intensificaram a proliferação celular, ao passo que potências mais elevadas não produzem efeito. Já a síntese de colágeno mostrou resultado inversamente proporcional à proliferação celular.

Pourreau-Schneider *et al.* (1989) avaliaram os efeitos da FTL em fibroblastos gengivais humanos utilizando o laser de HeNe, cujos parâmetros eram: densidade de energia de 1.2J/cm², durante 10min. Os grupos receberam 0, 1, 2 e 3 aplicações de lases nos dias 4, 7 e 11. Os resultados deste estudo mostraram que a FTL aumentou a proliferação celular e induziu mudanças estruturais nessas células.

Soudry *et al.* (1988) realizaram um estudo para avaliar os efeitos da FTL em fibroblastos gengivais humanos. Foi utilizado o laser de HeNe, com comprimento de onda de 632,8nm e dose de 1.2J/cm². Os resultados obtidos

mostraram aceleração no crescimento celular em relação ao grupo controle e o melhor efeito ocorreu com 4 dias de tratamento.

Tabela 1. Estudos *in vitro* com células envolvidas no processo de cicatrização tecidual.

	Ano	Tipo Celular	Laser	Metodologia	Resultado
Basso <i>et al.</i>	2012	queratinócitos de pele (HaCaT)	InGaAsP	780nm 40mW 0.5, 1.5, 3, 5 e 7J/cm ²	aumento no metabolismo, na contagem celular, na síntese de colágeno e na expressão de VEGF
Eduardo <i>et al.</i>	2007	queratinócitos renais (Vero)	Diodo	660 e 780nm 40 e 70mW 3 e 5J/cm ²	aumento na proliferação celular
Damante <i>et al.</i>	2009	fibroblastos gengivais	GaAIAs e InGaAlP	660 e 780nm 3J/cm ² e 5J/cm ²	aumento na expressão de FGF e KGF
Hawkins e Abahamse	2006	fibroblastos	HeNe	632.8nm 2.5, 5 e 16J/cm ²	aumento na proliferação e migração celular
Marques <i>et al.</i>	2004	fibroblastos gengivais	GaAIAs	904nm 120mW 3J/cm ²	mudanças estruturais nas células
Sakurai, Yamaguchi e Abiko	2000	fibroblastos gengivais	GaAIAs	830nm 0.95 a 6.32J/cm ²	alteração na produção de PGE
Loevschall e Arenholt-Bindsel	1994	fibroblastos de mucosa	GaAIAs	812nm 0.0004 a 4.5J/cm ²	alteração morfológica nas células, manutenção da viabilidade celular e aumento na síntese de DNA
Breugel e Bär	1992	fibroblastos	HeNe	630nm 0.55 a 5.98mW	aumento na proliferação celular
Pourreau-Schneider <i>et al.</i>	1989	fibroblastos gengivais	HeNe	1.2J/cm ²	aumento na proliferação celular
Soudry <i>et al.</i>	1988	fibroblastos gengivais	HeNe	632.8nm 1.2J/cm ²	aumento no crescimento celular

Schindl <i>et al.</i>	2003	células endoteliais	Diodo	670nm 2-8J/cm ²	aumento na proliferação celular
Kipshidze <i>et al.</i>	2001	células endoteliais	HeNe	632nm 0.10 a 6.3J/cm ²	aumento na síntese de VEGF e no crescimento celular
Mesquita-Ferrari <i>et al.</i>	2011	mioblastos	GaAIAs e InGaAIP	660 e 780nm 3.8, 6.3 e 10 J/cm ² 3.8, 10 e 17.5 J/cm ²	não houve alteração na proliferação celular
Ferreira <i>et al.</i>	2009	mioblastos	GaAIAs e InGaAIP	660 e 780nm	não houve alteração na proliferação celular

De acordo com os estudos supracitados a FTL apresenta diferentes efeitos nos diferentes tipos celulares envolvidos no reparo. Os estudos envolvendo células epiteliais são escassos e indicam que a FTL leva ao aumento do metabolismo (BASSO *et al.* 2012) e proliferação celular (BASSO *et al.* 2012; EDUARDO *et al.* 2007), síntese de colágeno e de VEGF (BASSO *et al.* 2012). Os trabalhos envolvendo fibroblastos são os mais encontrados na literatura e demonstram aumento na expressão de fatores de crescimento (DAMANTE *et al.* 2009), aumento da proliferação (HAWKINS E ABRAHAMSE 2006; BURGEL e BÄR 1992; POURREAU-SCHNEIDER *et al.* 1989; SOUDRY *et al.* 1988) e viabilidade (LOEVSCHELL e ARENHOLT-BINDSEL 1994) celular, alteração na produção de prostaglandinas (SAKURAI, YAMAGUCHI, ABIKO 2000), alterações estruturais (MARQUES *et al.* 2006; POURREAU-SCHNEIDER *et al.* 1989), assim como, aumento na síntese de DNA (LOEVSCHELL e ARENHOLT-BINDSEL 1994). Estudos em células endoteliais tem mostrado que a FTL causa aumento da proliferação celular (SCHINDL *et*

al. 2003) e síntese de VEGF (KIPSHIDZE et al. 2001). Por outro lado, em células musculares a FTL não tem sido capaz de produzir efeitos relacionados ao aumento do metabolismo e proliferação celular (MESQUITA-FERREIRA et al. 2011; FERREIRA et al. 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar *in vitro* o efeito da FTL no epitélio bucal durante o processo de reparo de feridas.

2.2 Objetivos Específicos

Estudar *in vitro* o efeito da FTL na viabilidade celular de queratinócitos bucais.

Estudar *in vitro* o efeito da FTL na migração celular de queratinócitos bucais.

Estudar *in vitro* o efeito da FTL na polarização do citoesqueleto de queratinócitos bucais.

Estudar *in vitro* o efeito da FTL na via de sinalização do AKT/PI3K de queratinócitos bucais.

Laser phototherapy induces oral keratinocyte migration and improves *in vitro* wound healing

Ana Carolina Amorim Pellicoli¹, Manoela Domingues Martins², Chiara Zagni³, Cristiane Helena Squarize⁴, Rogério Moraes Castilho⁴

¹ DDS, Master Degree student, Department of Oral Pathology, Dental School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

² DDS, PhD, Assistant Professor, Department of Oral Pathology, Dental School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

³ PhD, Department of Periodontics and Oral Medicine, School of Dentistry, University of Michigan, Ann Arbor, MI, United States of America

⁴ DDS, PhD, Assistant Professor, Department of Periodontics and Oral Medicine, School of Dentistry, University of Michigan, Ann Arbor, MI, United States of America

Corresponding author:

Manoela Domingues Martins

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Odontologia

Rua Ramiro Barcelos, 2492, sala 503

CEP: 90035-003

Santana, Porto Alegre RS

Brazil

Phone: 55-51-33085011

manomartins@gmail.com

*** A ser submetido ao *Journal of Biomedical Optics* - fator de impacto 3.480 - Qualis

Odontologia 2012 - A1

Introduction

Laser phototherapy (LPT) has been used clinically to accelerate wound healing in a variety of oral diseases¹. Several studies demonstrated the activity of LPT in diverse cell types *in vitro*, including fibroblast^{2, 3, 4}, osteoblast⁵, endothelial^{6, 7} and epithelial⁸ cells. The cell mechanisms by which LPT can promote biostimulation have not yet been fully elucidated⁸. It has been suggested that LPT might induce the activation of signaling pathways that control cell proliferation and migration, as well as the regulation of several genes, which are intimately involved in wound healing process⁹.

Tissue healing is a complex interaction between many cell types and the extracellular matrix that involves cell proliferation, revascularization, synthesis and deposition of collagen and wound contraction¹⁰. It can be divided into three phases: inflammatory, proliferative and remodeling phase. In the first phase occurs migration of inflammatory cells into the interstitial tissue to eliminate aggressive agents and phagocyte components of damaged tissue. During the second phase, fibroplasia and neovascularization associated to re-epithelization increases while the amount of acute-phase mediators decreases. Finally, during the remodeling phase formation of new extracellular matrix and tissue remodeling occur⁹.

Epithelial cells play an important role in the reparative process since its proliferation and migration from the wound margin is crucial for restore epithelial continuity¹¹. Several molecular pathways could be activated during the wound healing^{12, 13}. According to Squarize *et al.* (2010) PI3K/Akt pathway enhances wound healing dependent on the activation of mammalian target of rapamycin

(mTOR) in epithelial cells¹⁴. Phospho-S6 (pS6) is downstream of mTOR, which acts as one of the central regulators of cell growth and cell size^{15, 16, 17}. Furthermore mTOR plays pivotal roles in establishing cell shape, polarity, migration and proliferation^{18, 19, 20, 21}.

The wound healing process relies on the rapid migration and proliferation of epithelial cells located in the basal layer of the epithelium adjacent to the injured area. Also important is the epithelial ability to activate differentiation signaling pathways that result in the replacement of epithelial layers^{22, 23}. One of the most important events of re-epithelization is migration, since defects in this process are associated with the clinical phenotype of chronic non-healing wounds²⁴.

It is unclear whether LPT has an effect on oral epithelial cell migration and proliferation. Based on this, the aim of this study was to investigate the effect of LPT in oral wound healing process using oral keratinocytes.

Materials and Methods

Cell Lineage and Cell Culture

Normal Oral Keratinocytes Spontaneously Immortalized Keratinocytes (NOK-SI cell line, PMID: 20463891) were maintained in DMEN (Dulbecco's-modified Eagle's medium, Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and

250 ng/ml anfotericyn B (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. To simulate *in vitro* stress situation that could be comparable with *in vivo* stress condition where LPT have effects the cells were grown in nutritional deficit as previously described by Almeida-Lopes *et al.* (2001) and Eduardo *et al.* (2007)^{25, 26}.

All experiments, cells were plated in a 6, 12 and 96-well plastic dishes (i.e. 70% confluence), a situation of cell stress was carried out by culturing the cells on DMEM supplemented by 2% FBS (nutritional deficit). Cell culture was performed in laminar flow (biosafety class II), monitored daily by a phase contrast microscope (AO Biostar, American Optical) and the media was changed each 2-3 days.

Laser Irradiation

Laser irradiation was delivered with InGaAlP laser (MM Optics Ltd., São Carlos, SP, Brazil). Irradiations were performed in contact, using the punctual irradiation mode in a 0,04cm² area. The 660nm laser was applied with output powers of 40mW. The energy densities used were 4J/cm² and 20J/cm² with 4 and 20 seconds exposure time respectively (Table 1).

Table 1. Irradiation patterns of LPT.

	Wave length (nm)	Output power (mW)	Power density (mW/cm ²)	Energy density (J/cm ²)	Irradiation time (s)	Beam spot (cm ²)
Group 1 and 2	660	40	1	4	4	0,04
Group 3 and 4	660	40	1	20	20	0,04

Since the distance between the laser source and the surface of application is critical, the LPT was performed through the bottom of the optically clear

plates. The irradiation was carried out in partial darkness without influence of other light. The Laser Check powermeter (Coherent, Inc., Santa Clara, CA) were used to verify the output power of the laser equipment. The control groups were treated under identical conditions except that the laser equipment was kept off.

Experimental Groups

Positive Control: cells were plated with DMEM supplemented with 10% FBS and no laser irradiation ($0\text{J}/\text{cm}^2$)

Negative Control: cells were plated with DMEM supplemented with 2% FBS and no laser irradiation ($0\text{J}/\text{cm}^2$)

Group 1: cells were plated with DMEM supplemented with 10% FBS and with laser irradiation ($4\text{J}/\text{cm}^2$)

Group 2: cells were plated with DMEM supplemented with 2% FBS and with laser irradiation ($4\text{J}/\text{cm}^2$)

Group 3: cells were plated with DMEM supplemented with 10% FBS and with laser irradiation ($20\text{J}/\text{cm}^2$)

Group 4: cells were plated with DMEM supplemented with 2% FBS and with laser irradiation ($20\text{J}/\text{cm}^2$)

Cell Growth

For cell growth analysis, cells were plated on 96-well plates. The cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 with DMEM supplemented with 10% FBS. Before irradiation, the culture medium was replaced by the nutritional deficient culture medium supplemented with 2% FBS in control and treated groups. Then three irradiations were applied with 6-hour

intervals. Samples from each group were taken for mitochondrial activity analysis (MTT) 24 hours after the first irradiation. All the experiments were performed in octuplicate.

Cell Mitochondrial Activity Analysis (MTT Assay)

Cell mitochondrial activity was analyzed using the MTT-based cytotoxicity assay. The MTT assay involves the conversion of the water soluble 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to an insoluble formazan. The formazan is then solubilized and the concentration determined by optical density at 450-540nm. A MTT reduction analysis kit (Promega, Fitchburg, Wisconsin - USA) was used. Right after the end of the assay the absorbance was read in a microplate reader (Promega, Fitchburg, Wisconsin - USA) using a 595nm filter. The absorbance data were used to plot the cell growth curves.

***In vitro* Scratch Wound Assay**

NOK-SI cells were seeded in confluence on 35mm tissue culture dishes maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ with DMEM supplemented with 10% FBS. Three groups were established: Control (0J/cm²), LPT (4J/cm²) and LPT (20J/cm²). Two hour before the scratch culture medium was substituted by DMEM supplemented with 2% FBS in all groups. A wound was made in the monolayer of cells by completely scratching the cells in a line with a pipette tip (200µl). The time of scratching wound was designated as time zero. Three irradiations were applied. Cells were allowed to proliferate and migrate into the wound for the next 48h. Migration of the cells into the wound

was photographed at 0, 12, 24, 36 and 48h under a phase contrast microscope. Relative wound closure (%) was measured by means of a computerized image analyzer system (AxioVision 4.8.1, Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA). Scratch assay was performed in duplicate.

Western Blotting

NOK-SI cells were seeded in confluence on 35mm tissue culture dishes maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ with DMEM supplemented with 10% FBS. Three groups were established: Control (0J/cm²), LPT (4J/cm²) and LPT (20J/cm²). The medium was substituted by DMEM supplemented with 2% FBS 6 hour before the western blot analysis in all groups.

Cells were washed with ice-cold TBS-Tween and lysed with RIPA buffer. Protein lysates were cleared of cellular debris by centrifugation at 4°C for 10min, resolved in 10% SDS-PAGE gels, and transferred to nitrocellulose membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). After the transfer of proteins, the membranes were blocked at room temperature for 1h with 5% milk solution, washed three times with TBS-Tween and then incubated overnight with the appropriate primary antibodies (pS6 and GAPDH as control). The membranes were washed three times for 5min each with TBS-Tween and then incubated for 1h at room temperature with secondary antibodies. The proteins were visualized by exposing the membrane to an autoradiographic Hyperfilm ECL.

Rhodamine-Phalloidin Fluorescence

Cells were plated in a 6-well plastic dish and after cell adhesion the

medium was substituted by DMEM supplemented with 2% FBS during 18h. Two groups were established: Control ($0\text{J}/\text{cm}^2$) and LPT ($4\text{J}/\text{cm}^2$). The LPT group received two irradiations, one at time 0 and the second 12h later. After 10min, 3 and 6h after the second irradiation the medium was removed and cells were fixed with paraformaldehyde 3,7% (PFA) for 10min and washed 3 times with PBS. Cells were incubated with rhodamine-phalloidin (Molecular Probes) for 30min, then 5min with DAPI, washed three times with PBS, 5min each wash and examined in the microscope.

Statistical Analysis

The data corresponding to the cell viability are presented as mean and standard deviation of the mean (SD). The data obtained from MTT test were compared by ANOVA test followed by the Tukey's test. The level of significance was 5% ($p \leq 0.05$). The data corresponding to the cell migration are presented as mean and standard deviation of the mean (SD). The data obtained from cell migration were compared by Generalized Equatorial Equation (GEE) test followed by the Bonferroni's test. The level of significance was 5% ($p \leq 0.05$).

Results

Effect of Laser Irradiation on Cell Viability

Cell viability of control and irradiated groups are presented in Figure 1. Analysis of MTT data demonstrate that cells under stress culture conditions (2%FBS) irradiated with $4\text{J}/\text{cm}^2$ or $20\text{J}/\text{cm}^2$ present no significant difference ($p > 0.05$) between the analyzed groups. By the way, cells under normal conditions, supplemented with 10% FBS irradiated with $4\text{J}/\text{cm}^2$ or $20\text{J}/\text{cm}^2$ also

present no significant difference ($p < 0.05$) between the analyzed groups (Supplementary 1).

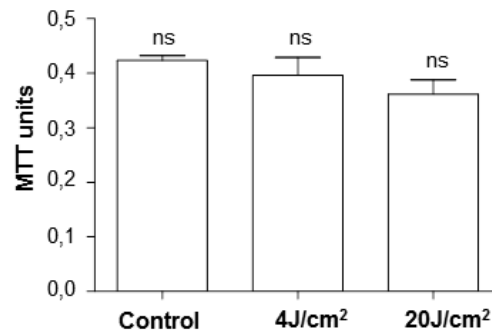


Fig1. MTT data showing no differences in cell viability between control and LPT groups under 2%FBS.

Analysis of LPT effect in migratory pathway

To test whether LPT activate a migratory pathway and induce cell migration the expression of pS6 were performed in control and laser groups. Similar expression for pS6 in all groups were observed as illustrated in Fig.2.

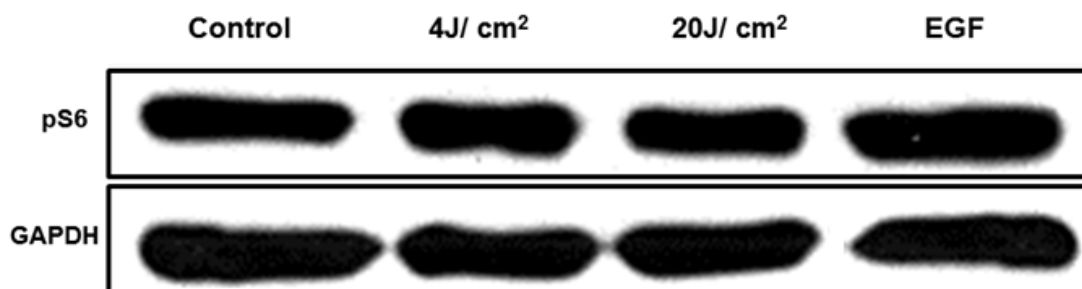


Fig 2. Western blotting analysis data showing similar protein expression pattern between control and LPT groups.

Effect of Laser Irradiation on Cell Migration

To explore whether LPT affect the epithelial wound healing closure *in vitro*

a scratch-induced wound model was performed (Fig.3). The LPT groups exhibited gap closure after 24h. Interestingly, wound of control cells remains unhealed after 48h. The difference between control and laser groups was statistically different ($p < 0.001$), whereas comparing different laser parameters there was no difference ($p > 0.05$).

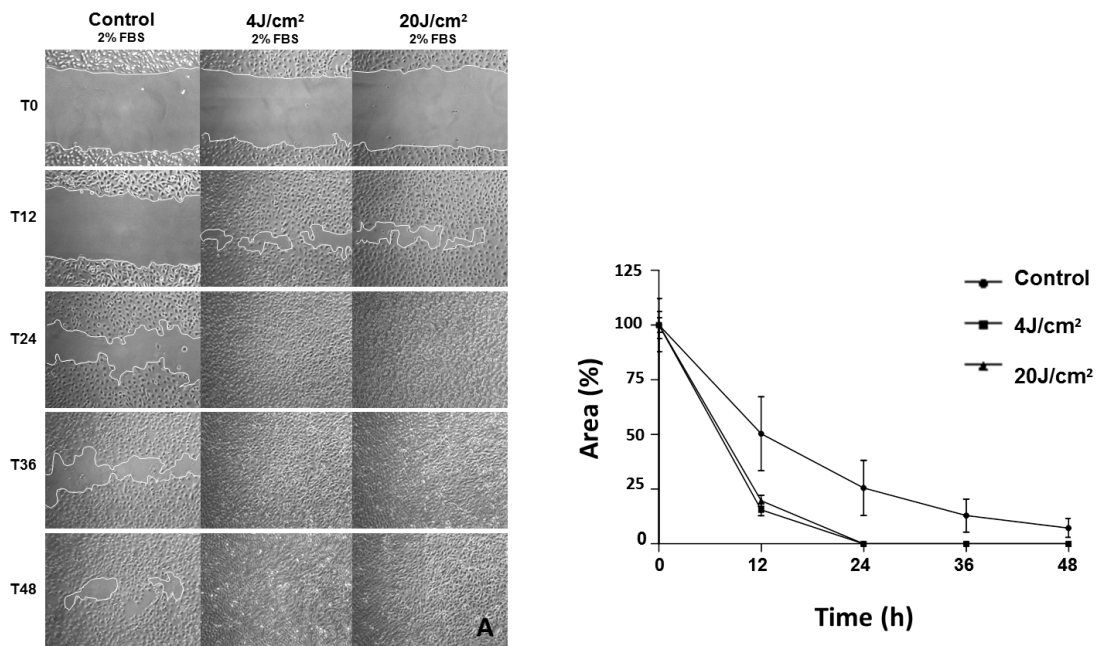


Fig 3. The LPT groups exhibited gap closure within 24h. Interestingly, control cells remains open after 48h. The difference between control and laser groups was statistically different ($P < 0.01$), whereas comparison between different laser parameters present no statistical differences ($P > 0.05$).

Fluorescence Rhodamine-Phalloidin

To test whether LPT alters cell polarization, immunofluorescence assay using rhodamine-phalloidin was performed in control and laser groups. The pattern of fluorescence distribution was different in control and LPT (4J/cm²) groups. In the former, the F-actin observed by phalloidin staining was located

especially at cell edge, while in irradiated cells the cytoskeleton filaments were organized as numerous actin stress fibers traversing the cytoplasm suggesting that cells are polarized.

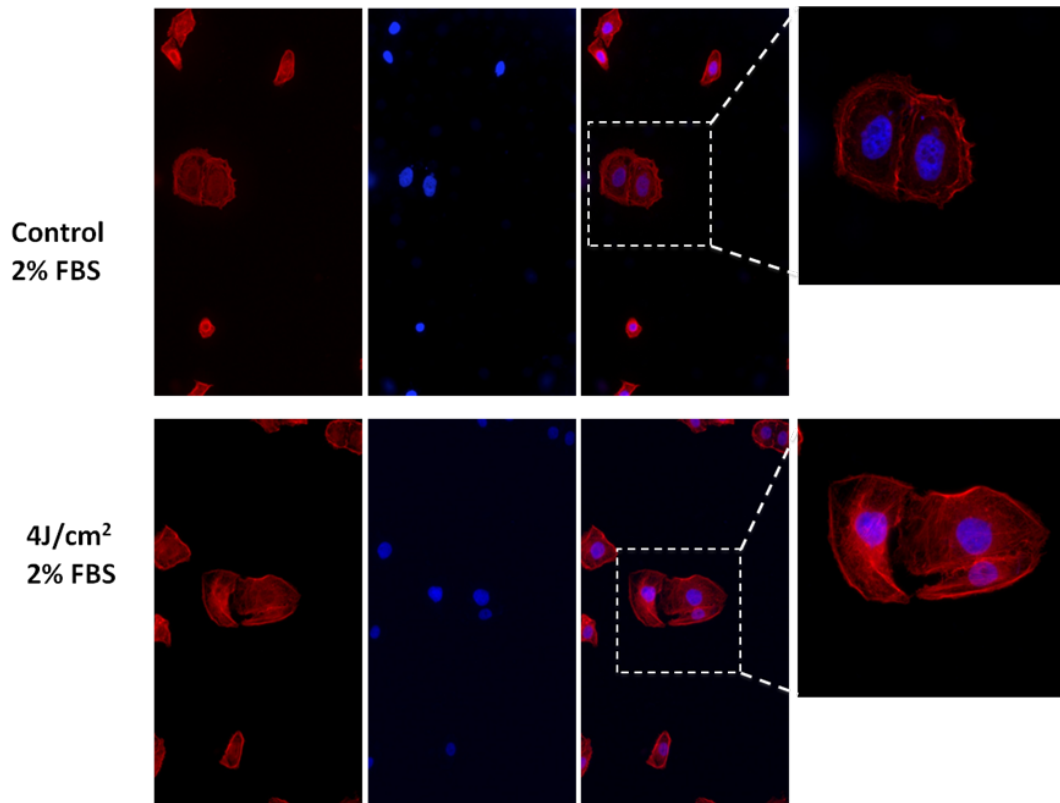


Fig 4. Fluorescence data demonstrate different cellular polarization pattern between control and LPT groups.

Discussion

Wound healing is the process that allows injured tissues to restore its integrity after several conditions specially those involving ulcerated lesion that constitutes a significant clinical challenge. For example, burn ulcers, mucositis, diabetes with slow or non-healing ulcers, pressure and chronic venous ulcers^{23, 27, 28}.

In wound healing the re-epithelialization of the wound site play an important role and can be described as the result of three keratinocyte functions: migration, proliferation and differentiation. The first event of re-epithelialization is the dissolution of cell-cell and cell-substratum contacts. This is followed by the polarization and migration of basal and suprabasal cells. Also, several keratinocytes adjacent to the wound site undergo mitosis. Finally, the newly formed epithelium undergoes differentiation to restore its functionality and architecture²⁹. As previous described, one of the most important events of re-epithelization is migration, since defects in this process are associated with the clinical phenotype of chronic non-healing wounds²⁴.

LPT is known to modulate several biological processes, a phenomenon known as photobiomodulation^{30, 31}. Several factors have an influence on LPT results once exists distinct responses between cells according to the protocol used. The epithelial cells play an important role on wound healing however, only two studies analyzed the effects of LPT on epithelial cells and the molecular mechanisms by which LPT can promote biostimulation in these cells^{8, 26}. Yet, none used oral keratinocytes. In the present study the aim was investigate the LPT effect in wound healing process using oral keratinocytes *in vitro*. Our results suggest that LPT seems to accelerate oral keratinocyte migration *in vitro*.

In the present investigation, 660nm diode laser, 40mW with two different energy densities ($4\text{J}/\text{cm}^2$ and $20\text{J}/\text{cm}^2$) were tested with the same frequency of irradiation and interval between irradiations. The choice to vary only the energy density was based on a study by van Breughel and Dop Bär³² that indicates

that this parameter appears to be more important than total dose in wound healing. Previous researches have also shown that small doses demonstrated better results in *in vitro* studies when compared to higher doses^{33, 34, 35, 36, 37}. These results can be well described by the Arndt-Schultz (A.S.) curve. This curve shows that a small stimulus excites physiological activity, whereas a higher stimulus inhibits it³⁸. Based on these, we used 4J/cm² as a small energy density and chose 20J/cm² as a high energy density. Our results revealed that independent of the energy density tested the laser irradiation did not affect the cell viability because the results of control and irradiated groups were similar. Different results were described by Basso *et al.* (2012) and Eduardo *et al.* (2007), which observed an increase on cell viability and proliferation after LPT. Nevertheless, these authors used different epithelial cell types and laser irradiation parameters.

Basso *et al.* (2012) studied the effects of LPT on skin keratinocytes (HaCaT) *in vitro* with 780nm laser, using 0.5, 1.5, 3, 5, and 7J/cm² energy doses. Irradiations were done every 24h totaling three applications. The results showed that cell metabolism increased with all energy doses, especially for 0.5, 1.5, and 3 J/cm². The highest cell counts were observed with 0.5, 3, and 5J/cm². Total protein synthesis showed no statistically difference. Cell morphology analysis revealed that LPT did not promote morphological alterations on skin keratinocytes. Comparing with the results of the present study it is possible to infer that the higher wavelength laser such as 780nm may influence the epithelial cell response. In the same way, Eduardo *et al.* (2007) analyzed LPT effects using Vero cells, which are a lineage isolated from kidney

epithelial cells. They used 660nm and 780nm laser, 40 and 70mW, respectively, with 3 or 5J/cm². Cells were irradiated from one to three times. They concluded that both types of LPT increased epithelial cell growth rate. Different from these authors our study used oral keratinocytes that could exhibit different proliferative pattern and cell behavior after laser irradiation than kidney and skin epithelial cells^{39, 40}.

The mechanism by which LPT induces proliferation in different cell types is explained mainly by the activation of mitochondrial respiratory chain and initiation of cellular signaling⁴¹. Low-intensity lasers absorbed by cellular photosensitizers such as cytochromes and flavins that promote a cascade event that result in Ca²⁺ flux, which affects the levels of cyclic nucleotides interfering on DNA and RNA synthesis, modulating cell proliferation⁴². Considering that oral keratinocytes are high proliferative cells it is possible to understand why LPT does not affect the cell viability.

The influence of LPT in a wide number of cells involved in wound healing needs to consider that laser irradiation usually stimulates cells that present slow growing rates. Cells that are growing in a serum-rich environment or are fully functional at the moment of irradiation could not present therapeutic benefit⁴¹. Additionally, the irradiation does not influence the proliferation of different cell types to an equal degree. The stimulative effect of LPT is most evident in cell that presents slow proliferative activity⁴³. In the present study, we try to decrease the cell metabolism using low FBS percentage. The nutritional deficit conditions used in this study was based on the study performed by Eduardo *et al.* (2007) where they observed that 2% FBS promoted epithelial cells starve.

However, our results were different from Eduardo *et al.* (2007) showing no cell viability alteration. This data could be explained by the fact that in this study we used an epithelial cells that exhibit a more proliferative profile whereas Eduardo *et al.* (2007) used kidney epithelial cells which present a lower proliferative behavior compared to oral keratinocytes. Based on this result is possible to infer that the same conditions used to starve kidney cells are not enough to stress oral keratinocytes. On the other hand, with the same 2% FBS, LPT enhanced the wound closure of oral keratinocytes by activation of migratory mechanisms.

Cell migration is a multi-step process that involves lamellipodial extension at the membrane edge, adhesion to an underlying substrate, and contraction at the rear. This entire process involves the turnover of adhesion sites, formed at the front and broken at the rear, to facilitate forward movement⁴⁴. In this study a scratch assay to analyze the oral epithelial keratinocytes cell migration was done. The LPT groups exhibited gap closure after 24h. Interestingly, wound of control cells remains unhealed after 48h. These results demonstrated that LPT independent of the energy density used can influence the *in vitro* oral wound healing. Corroborating the results obtained in the scratch assay a fluorescence to study the cytoskeleton was performed and a migratory profile by irradiated cells was observed. They exhibited actin filaments organized as numerous stress fibers suggesting that cells are polarized which could be associated to migration behavior.

In conclusion, in the present study LPT accelerates oral keratinocytes wound healing especially by the activation of migratory mechanisms. Several mechanisms are involved in the ability of oral keratinocytes to migrate from the

wound edge to efficiently re-epithelialize the injured area. All these mechanisms need to be synchronized to properly accomplish the healing process. The complexity of cellular interactions involved in this process is not fully elucidated. More studies are required to better understand all the steps that leads to the replenishment of epithelium integrity and completeness of the wound healing process. Two important proteins that could helps us in understanding this process are Rac1 and CDC42 (cell division control), both are involved in the control of cell migration mechanisms. Further studies should be conducted to better understand the pathways involved in the oral keratinocytes migration during wound healing and how they are affected by laser biostimulation.

References

1. PV Peplow, TY Chung, GD Baxter. Laser photobiomodulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. *Photomed Laser Surg.* 28(3), 291-325 (2010)
2. FG Basso, TN Pansani, AP Turrioni, VS Bagnato, J Hebling, CA de Souza Costa. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. *Int J Dent.* 2012.
3. CA Damante, G de Micheli, SP Miyagi, IS Feist, MM Marques. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 24(6), 885-891 (2009)
4. MM Marques, AN Pereira, NA Fujihara, FN Nogueira, CP Eduardo. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 34(3), 260-265 (2004)
5. NA Fujihara, KRN Hiraki, MM Marques. Irradiation at 780nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med.* 38(4), 332–336 (2006)

6. A Schindl, H Merwald, L Schindl, C Kaun, J Wojta. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br J Dermatol.* 148(2), 334-336 (2003)
7. N Kipshidze, V Nikolaychik, MH Keelan, LR Shankar, A Khanna, R Kornowski, M Leon, J Moses. Low-power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers Surg Med.* 28(4), 355-364 (2001)
8. FG Basso, CF Oliveira, C Kurachi, J Hebling, CA Costa. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci.* (2012)
9. W Posten, DA Wrone, JS Dover, KA Arndt, S Silapunt, M Alam. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg.* 31(3), 334-40 (2005)
10. F Fahimipour, M Mahdian, B Houshmand, M Asnaashari, AN Sadrabadi, SE Farashah, SM Mousavifard, A Khojasteh. The effect of He-Ne and Ga-Al-As laser light on the healing of hard palate mucosa of mice. *Lasers Med Sci.* (2012)

11. YW Kim, WH Lee, SM Choi, YY Seo, BO Ahn, SH Kim, SG Kim. DA6034 promotes gastric epithelial cell migration and wound-healing through the mTOR pathway. *J Gastroenterol Hepatol.* (2012)
12. N Ben-Dov, G Shefer, A Irintchev, A Wernig, U Oron, O Halevy. Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1448(3), 372-380 (1999)
13. G Shefer, U Oron, A Irintchev, A Wernig, O Halevy. Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway. *J Cell Physiol.* 187(1), 73-80 (2001)
14. CH Squarize, RM Castilho, TH Bugge, JS Gutkind. Accelerated wound healing by mTOR activation in genetically defined mouse models. *PLoS One.* 5(5), e10643 (2010)
15. T Schmelzle, MN Hall. TOR, a central controller of cell growth. *Cell.* 103(2), 253-262 (2000)
16. TE Harris, JC Lawrence Jr. TOR signaling. *Sci STKE.* 2003(212), re15 (2003)
17. Y Li, MN Corradetti, K Inoki, KL Guan. TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem Sci.* 29(1), 32-38 (2004)

18. TP Neufeld. Body building: regulation of shape and size by PI3K/TOR signaling during development. *Mech Dev.* 120(11), 1283-1296 (2003)
19. LA Berven, FS Willard, MF Crouch. Role of the p70(S6K) pathway in regulating the actin cytoskeleton and cell migration. *Exp Cell Res.* 296(2), 183-195 (2004)
20. E Jacinto, R Loewith, A Schmidt, S Lin, MA Rüegg, A Hall, MN Hall. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 6(11), 1122-1128 (2004)
21. C de Virgilio, R Loewith. The TOR signalling network from yeast to man. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(9), 1476-1481 (2006)
22. E Proksch, JM Brandner, JM Jensen. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 17(12), 1063-1072 (2008)
23. AJ Singer, RA Clark. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 341(10), 738-746 (1999)
24. Raja, K Sivamani, MS Garcia, RR Isseroff. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci.* 12:2849-2868 (2007)

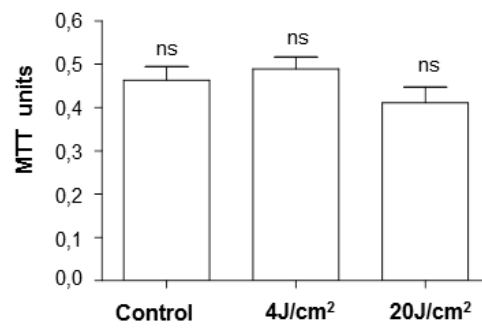
25. L Almeida-Lopes, J Rigau, RA Zangaro, J Guidugli-Neto, MM Jaeger. Comparison of the low level laser therapy effectson cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med.* 29(2), 179–184 (2001)
26. FP Eduardo, DU Mehnert, TA Monezi, DM Zezell, MM Schubert, CP Eduardo, MM Marques. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg Med.* 39(4), 365-372 (2007)
27. M Ehrenreich, Z Ruszczak. Update on tissue-engineered biological dressings. *Tissue Eng.* 12(9), 2407–2424 (2006)
28. GS Ashcroft, SJ Mills, JJ Ashworth. Ageing and wound healing. *Biogerontology.* 3(6), 337–345 (2002)
29. MM Santoro & G Gaudino. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res.* 304(1), 274-286 (2005)
30. MAG Ribeiro, LC Albuquerque, LMP Ramalho, AL Pinheiro, LR Bonjardim, SS da Cunha. Immunohistochemical assessment of myofibroblasts and lymphoid cells during woung healing in rats subjected to laser photobiomodulation at 600nm. *Photomed. Laser Surg.* 27(1), 49-55 (2009)

31. GK Reddy. Review photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J. Clinic. Laser Med. Surg.* 22(2), 141-150 (2004)
32. HHFI van Breugel, PR Dop Bär. 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 Surg. Med.* 12(5), 528-537 (1992)
33. AN Pereira, CP Eduardo, E Maston, MM Marques. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg. Med.* 31(4), 263-267 (2002)
34. AV Corazza, J Jorge, C Kurachi, VS Bagnato. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed. Laser Surg.* 25(2), 102-106 (2007)
35. AP Medrado, LS Pugliese, SRA Reis, ZA Andrade. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg. Med.* 32(3), 239-244 (2003)
36. LS Pugliese, AP Medrado, SRA Reis, Z de A Andrade. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui. Odontol. Bras.* 17(4), 307-313 (2003)

37. LJ Walsh. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. *Aust. Dent. J.* 42(4), 247-254 (1997)
38. R Lubart, R Lavi, H Friedmann, S Rochkind. Photochemistry and photobiology of light absorption by living cells. *Photomed. Laser Surg.* 24(2), 179-185 (2006)
39. H Iizuka. Epidermal turnover time. *J Dermatol Sci.* 8(3), 215-217 (1994)
40. GM Ledda-Columbano, A Columbano, P Coni, M Curto, G Faa, P Pani. Cell proliferation in rat kidney induced by 1,2-dibromoethane. *Toxicol Lett* 37(1), 85–90 (1987)
41. PV Peplow, T Chung, D Baxter. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. *Photomed. Laser Surg.* 28(1), s3-s40 (2010)
42. TI Karu. Molecular mechanisms of therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Laser Life Sci.* 49(2), 53-74 (1988)
43. TI Karu. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. *J Photochem Photobio B.* 3(4), 638-640 (1989)

44. L Chen, JJ Zhang, XY Huang. cAMP Inhibits Cell Migration by Interfering with Rac-induced Lamellipodium Formation. *J Biol Chem.* 283(20), 13799–13805 (2008)

Supplementary 1



Sup1. MTT data showing no differences in cell viability between control and LPT groups under 10%FBS.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A FTL é uma prática recente e existem na literatura diversos estudos *in vitro* e *in vivo* mostrando a sua eficácia no processo de reparo de feridas. No entanto, os mecanismos exatos através dos quais a FTL promove a bioestimulação tecidual ainda não estão completamente esclarecidos.

É de extrema importância compreender como a FTL atua nas diferentes células envolvidas no reparo tecidual, visto que lesões ulceradas de origem inflamatória/imunológica causam dor, desconforto e interferem na qualidade de vida do indivíduo.

É primordial estabelecer os parâmetros de utilização do LBI para cada tipo celular, uma vez que diferentes células respondem de modo distinto a FTL.

No presente estudo avaliamos o efeito da FTL em queratinócitos bucais. Este foi um dos primeiros estudos realizados neste modelo celular e os resultados obtidos nos permitem concluir que a FTL acelera o processo de reparo em queratinócitos bucais através da ativação de vias migratórias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adzick NS. Cicatrização da ferida: características biológicas e clínicas. In: Jr Sabiston DC, Lyerly HK. Sabiston – Tratado de cirurgia - As bases biológicas da prática cirúrgica moderna. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro-RJ. v. 1, 15ª edição, 1999.

Aimbire F, Albertini R, Pacheco MTT, Castro-Faria-Neto HC, Leonardo PSLM, Iversen VV, Lopes-Martins RAB, Bjordal JM. Low-Level Laser Therapy Induces Dose-Dependent Reduction of TNF- α Levels in Acute Inflammation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 1, p. 33-37, 2006.

AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 1, p. 237-249, 2012.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effect on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Surg Med**, v. 29, n. 2, p. 179–184, 2001.

Araújo LU, Grabe-Guimarães A, Mosqueira VCF et al. Profile of wound healing process induced by allantoin. **Acta Cir Bras**, v. 25, n.5, p. 460-466, 2010.

Azevedo LH, Eduardo FP, Moreira MS, Eduardo CP, Marques MM. Influence of Different Power Densities of LPT on Cultured Human Fibroblasts Growth. A pilot study. **Lasers Med Sci**, v. 21, n. 2, p. 86–89, 2006.

Baptista J, Martins MD, Pavesi VCS, Bussadori SK, Fernandes KPS, Pinto Júnior DS, Ferrari RAM. Influence of Laser Photobiomodulation on Collagen IV During Skeletal Muscle Tissue Remodeling After Injury in Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 00, n. 00, p. 1-7, 2010.

Barasch A, Peterson DE, Tanzer JM, D'ambrosio JA, Nuki K, Schubert MM, Franquin JC, Clive J, Tutschka P. Helium-neon laser effects on conditioning-induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients. **Cancer**, v. 76, n. 12, p. 2550-2556, 1995.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair Regen**, v. 16, n. 5, p. 585-601, 2008.

Basford JR. Low intensity laser therapy: Still not an established clinical tool. **Lasers Surg Med**, v. 16, n. 4, p. 331–342, 1995.

Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CA. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. **Lasers Med Sci**, 2012. [Epub ahead of print]

Basso FG, Pansani TN, Turrioni AP, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa CA. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. **Int J Dent**, 2012. [Epub 15 Jul 2012]

Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CA. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. **Lasers Med Sci**, 2012. [Epub ahead of print]

Baxter GD. Therapeutic Laser: Theory and Practice. United States of America: Ed. Churchill Livingstone, 1997.

Baxter GD and Allen J. Therapeutic lasers: theory and practice. Edinburgh (UK): Churchill Livingstone. 1994.

Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. **Nat Rev Cancer**, n. 1, p. 46-54, 2001.

Biswas SK, Lewis CE. NF- κ B as a central regulator of macrophage function in tumors. **J Leukoc Biol**, v. 88, n. 5, p. 877-884, 2010.

Bourguignon-Filho AM et al. Utilização do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização tecidual. Revisão de literatura. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 46, n.1, p. 37-43, 2005.

Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug Discov Today**, 2012.

Carvalho PTC, Mazzer N, Siqueira JF, Ferreira VJ, Silva IS. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos à irradiação do laser HeNe. **Fisoter Bras**, v. 4, n. 4, p. 253-258, 2003.

Collier M. Understanding wound inflammation. **Nurs Times**, v. 99, n. 25, p. 63-64, 2003.

Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation: A review. **J Clin Periodontol**, v. 23, n. 5, p. 492-496, 1996.

Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the Angiogenesis of Skin Wounds in Rats Using Different Light Sources, **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 2, p. 102-106, 2007.

Cruse PJE, Mcphedran NT. Cura e Tratamento das Feridas. In: JR. Sabiston DC. Fundamentos de Cirurgia de Sabiston. Editora Manole. São Paulo-SP. v. 1, p. 143-148, 1991.

Damante CA, De Micheli G, Miyagi SP, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. **Lasers Med Sci**, v. 24, no. 6, p. 885-891, 2009.

de Souza TO, Mesquita DA, Ferrari RA, Dos Santos Pinto D Jr, Correa L, Bussadori SK, Fernandes KP, Martins MD. Phototherapy with low-level laser affects the remodeling of types I and III collagen in skeletal muscle repair. **Lasers Med Sci**, v. 26, n. 6, p. 803-814, 2011.

Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP, Marques MM. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. **Lasers Surg Med**, v. 39, n. 4, p. 365-372, 2007.

Fernandes KP, Alves AN, Nunes FD, Souza NH, Silva JA Jr, Bussadori SK, Ferrari RA. Effect of photobiomodulation on expression of IL-1 β in skeletal muscle following acute injury. **Lasers Med Sci**, 2012. [Epub ahead of print]

Fernandes KPS, Bussadori SK, Pavesi VCS, Santos EM, Marques MM, Bach E, Wadt N, Martins MD. Healing and cytotoxic effects of *Psidium guajava* (Myrtaceae) leaf extracts. **Braz J Oral Sci**, v. 9, n. 4, p. 449-454, 2010.

Ferreira MP, Ferrari RA, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Gonzalez DA, Fernandes KP. Effect of low-energy gallium-aluminum-arsenide and aluminium-gallium-indium-phosphide laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. **Photomed Laser Surg**, v. 27, n. 6, p. 901-906, 2009.

Field EA, Allan RB. Review article: oral ulceration – etiopathogenesis, clinical diagnosis and management in the gastrointestinal clinic. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 15, n. 10, p. 949-962, 2003.

Fujihara NA, Hiraki KRN, Marques MM. Irradiation at 780nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. **Lasers Surg Med**, v. 38, n. 4, p. 332–336, 2006.

Gál P, Vidinky B, Toporcer T, Mokry M, Mozes T, Longauer F, Sabo J. Histological Assessment of the Effect of Laser Irradiation on Skin Wound Healing in Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 4, p. 480-488, 2006.

Gonçalves RV, Novaes RD, Matta SLP, Benevides GP, Faria FR, Pinto MVM. Comparative Study of the Effects of Gallium- Aluminum-Arsenide Laser Photobiomodulation and Healing Oil on Skin Wounds in Wistar Rats: A Histomorphometric Study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 5, p. 597-602, 2010.

Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**. v. 4, n. 12, p. 988-1004, 2005.

Hawkins D, Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 6, p. 705-714, 2006.

Henriques ACG, Casal C, Castro JFL. Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular. Revisão da literatura. **Ver Col Bras**, v. 37, p. 295-302, 2010.

Jurge S, Kuffer R, Scully C, Porter SR. Recurrent aphthous stomatitis. **Oral Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1-21, 2005.

Karu TI. Photobiological fundamentals of low- power laser therapy. **IEEE J Quant Electr**, v. 23, p. 1703–1717, 1987.

Karu TI. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. **J Photochem Photobiol B**, v. 3, n. 4, p. 638-640, 1989.

Karu TI. Molecular mechanisms of therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Laser Life Sci**, v. 2, n. 1, p. 53-74, 1988.

Kipshidze N, Nikolaychik V, Keelan MH, Shankar LR, Khanna A, Kornowski R, Leon M, Moses J. Low-power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. **Lasers Surg Med**, v. 28, n. 4, p. 355-364, 2001.

Leão JC, Gomes VB, Porter S. Ulcerative lesions of the mouth: an update for the general medical practitioner. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 62, n. 6, p. 769-780, 2007.

Lim W, Lee SG, Kim I, Chung M, Kim M, Lim H, Park J, Kim O, Choi H. The Anti-Inflammatory Mechanism of 635 nm Light-Emitting-Diode Irradiation Compared With Existing COX Inhibitors. **Lasers Surg Med**, v. 39, p. 614–621, 2007.

Lins RDAU, Dantas EM, Lucena KCR, Catao MHCV, Granville-Garcia AF, Neto LGC. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 6, p. 849-855, 2010.

Liu Y, Wang T, Yan J, Jiagbogu N, Heideman DA, Canfield AE, Alexander MY. HGF/c-Met signalling promotes Notch3 activation and human vascular smooth muscle cell osteogenic differentiation in vitro. **Atherosclerosis**, v. 219, n. 2, p. 440-447, 2011.

Loevschall H, Arenholt-Bindslev D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. **Lasers Surg Med**, v. 14, n. 4, p. 347-354, 1994.

Mandelbaum SH, Santis EPD, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **An Bras Dermatol**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg Med**, v. 34, n. 3, p. 260-265, 2004.

Martin P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75-81, 1997.

Martins MD, Marques MM, Bussadori SK, Martins MA, Pavesi VC, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KP. Comparative analysis between chamomilla recutita and corticosteroids on wound healing. an in vitro and in vivo study. **Phytother Res**, v. 23, n. 2, p. 274–278, 2009.

Martins MD, Fernandes KPS, Pavesi VC, França CM, Mesquita-Ferrari RA, Bussadori SK. Healing properties of papain-based gel on oral ulcers. **Braz J. Oral Sci**, v. 10, n. 2, p. 120-123, 2011.

Masters JR. Human cancer cell lines: fact and fantasy. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 1, n. 3, p. 233–236, 2000.

McFarland-Mancini MM, Funk HM, Paluch AM, Zhou M, Giridhar PV, Mercer CA, Kozma SC, Drew AF. Differences in Wound Healing in Mice with Deficiency of IL-6 versus IL-6 Receptor. **J Immunol**, v. 184, n. 12, p.7219-7228, 2012.

Medrado AP, Pugliese LS, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of Low Level Laser Therapy on Wound Healing and Its Biological Action Upon Myofibroblasts. **Lasers Surg Med**, v. 32, n. 3, p. 239–244, 2003.

Medrado AP, Soares AP, Santos ET, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. **J Photochem Photobiol B**, v. 92, n. 3, p.144–152, 2008.

Mendonça RJD, Coutinho-Netto J. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

Mesquita-Ferrari RA, Ribeiro R, Souza NH, Silva CA, Martins MD, Bussadori SK, Fernandes KP. No effect of low-level lasers on in vitro myoblast culture. **Indian J Exp Biol**, v. 49, n. 6, p. 423-428, 2011.

Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. **Am J Surg**, v. 122, n. 4, p. 532-535, 1971.

Miziara ID. O tratamento da estomatite aftóide recorrente ainda intriga. **Rev Assoc Med Bras**, v. 55, n. 2, p. 96, 2009.

Modolin M, Kamakura L. Aspectos gerais da cicatrização de feridas. In: SUCENA RC. Contribuição para o ensino da especialidade. São Paulo: Fundo Editorial da Sciaedade Brasileira de Cirurgia Plástica. Cap 9, p. 91-102, 1981.

Monaco JL, Lawrence WT. Acute wound healing an overview. **Clin Plast Surg**, v. 30, n. 1, p. 1-12, 2003.

Nascimento PM, Pinheiro ALB, Salgado MAC, Ramalho LMP. A Preliminary Report on the Effect of Laser Therapy on the Healing of Cutaneous Surgical Wounds as a Consequence of an Inversely Proportional Relationship between Wavelength and Intensity: Histological Study in Rats. **Photomed Laser Surg**, v. 22, n. 6, p. 513-518, 2004.

O'Leary R, Wood EJ, Guillou PJ. Pathological scarring: strategic interventions. **Eur J Surg**, v. 168, n. 10, p. 523-34, 2002.

Peplow PV, Chung TY, Ryan B, Baxter GD. Laser photobiostimulation of wound healing: reciprocity of irradiance and exposure time on energy density for splinted wounds in diabetic mice. **Lasers Surg Med**, v. 43, n. 8, p. 843-850, 2011.

Peplow PV, Chung T, Baxter D. Laser Photobiomodulation of Proliferation of Cells in Culture: A Review of Human and Animal Studies. **Photomed Laser Surg**, v. 28, p. s3-s40, 2010.

Pereira AN, Eduardo Cde P, Matson E, Marques MM. 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.

Pereira MC, Pinho CB, Medrado ARP, Andrade ZA, Reis SRA. Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. **J Photochem Photobiol B**, v. 98, n. 3, p.188–192, 2010.

Pourreau-Schneider N, Soudry M, Remusat M, Franquin JC, Martin PM. Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblasts. **Quintessence Int**, v. 20, n. 12, p. 887-893, 1989.

Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui Odontol Bras**, v. 17, n. 4, p. 307-313, 2003.

Reddy GK. Review photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. **J Clin Laser Med Surg**, v. 22, n. 2, p. 141-150, 2004.

Ribeiro MS, Zezell DM. Laser de baixa intensidade. In: Gutknecht N, Eduardo CP. A odontologia e o laser: atuação do laser na especialidade odontológica. São Paulo: **Quintessence**, Cap5, p. 217-240, 2004.

Ribeiro MA, Albuquerque RL Jr, Ramalho LM, Pinheiro AL, Bonjardim LR, Da Cunha SS. Immunohistochemical assessment of myofibroblasts and lymphoid cells during wound healing in rats subjected to laser photobiomodulation at 600nm. **Photomed Laser Surg**, v. 27, n. 1, p. 49-55, 2009.

Sacono NT, Costa CA, Bagnato VS, Abreu-e-Lima FC. Light-emitting diode therapy in chemotherapy-induced mucositis. **Lasers Surg Med**, v. 40, n. 9, p. 625-633, 2008.

Sakurai Y, Yamaguchi M, Abiko Y. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. **Eur J Oral Sci**, v. 108, n. 1, p. 29-34, 2000.

Sandoval RL, Koga DH, Buloto LS, Suzuki R, Dib LL. Management of chemo- and radiotherapy induced oral mucositis with low-energy laser: initial results of A.C. Camargo Hospital. **J Appl Oral Sci**, v. 11, n. 4, p. 337-341, 2003.

Schaffer CJ, Nanney LB. Cell biology of wound healing. **Int Rev Cytol**, v. 169, p. 151-181, 1996.

Schilling JA. Wound healing. **Surg Clin North Am**, v. 56, n. 4, p. 859-874, 1976.

Schindl A, Merwald H, Schindl L, Kaun C, Wojta J. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. **Br J Dermatol**, v. 148, n. 2, p. 334-336, 2003.

Schubert MM, Eduardo FP, Guthrie KA, Franquin JC, Bensadoun RJ, Migliorati CA, Lloid CM, Eduardo CP, Walter NF, Marques MM, Hamdi M. A phase III randomized double-blind placebo-controlled clinical trial to determine the efficacy of low level laser therapy for the prevention of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation. **Support Care Cancer**, v. 15, n. 10, p. 1145-1154, 2007.

Scully C, Shotts R. Mouth ulcers and other causes of orofacial soreness and pain. **BMJ**, v. 321, n. 7254, p. 162-165, 2000.

Silva EC, Haidar Filho A, Musskopf DE. Radiação Laser. In: Rodrigues EM, Guimarães CS. Manual de Recursos Fisioterapêuticos. Editora Revinter, Rio de Janeiro-RJ, 1ª edição, p. 17, 1998.

Simunović-Soskić M, Pezelj-Ribarić S, Brumini G, Glazar I, Grzić R, Miletić I. Salivary Levels of TNF- α and IL-6 in Patients with Denture Stomatitis Before and After Laser Phototherapy. **Photomed Laser Surg**, v. 28, n. 2, p. 189-193, 2010.

Smith KC. The photobiological basis of low level laser irradiation therapy. **Laser Ther**, v. 3, n. 1, p. 19-24, 1991.

Sonis ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. **Oral Oncol**, v. 34, n. 1, p. 39-43, 1998.

Soudry M, Franquin JC, Pourreau-Schreider N, Martin PM. Effect of a helium-neon laser on cellular growth: an in vitro study of human gingival fibroblasts. **J Biol Buccale**, v. 16, n. 3, p. 129-135, 1988.

Tunér J, Hode L. Low level laser therapy. Clinical Practice and Scientific Background. **Spjutvagen**, Suécia: Prima Books, p. 393, 1999.

van Breugel HH, Bär PR. 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 Surg Med**, v. 12, n. 5, p. 528-537, 1992.

Viegas VN, Abreu MER, Viezzer C, Machado DC, Sant'anna Filho M, Silva DN, Pagnocelli RM. Effect of Low-Level Laser Therapy on Inflammatory Reactions during Wound Healing: Comparison with Meloxicam. **Photomed Laser Surg**, v. 25, n. 6, p. 467-473, 2007.

Yeoh ASJ, Bowen JM, Gibson RJ, Keefe DMK. Nuclear factor κ B (nf κ B) and cyclooxygenase-2 (cox-2) expression in the irradiated colorectum is associated with subsequent histopathological changes. **Int J Radiation Oncology Biol Phys**, v. 63, n. 5, p. 1295–1303, 2005.

Zezell DM. Apostila de curso. Workshop: Utilização Clínica do Laser – IPEN/FOUSP, São Paulo, 2004.

Zhang X, Kohli M, Zhou Q, Graves DT, Amar S. Short- and Long-Term Effects of IL-1 and TNF Antagonists on Periodontal Wound Healing. **J Immunol**, v. 173, n. 5, p. 3514-3523, 2012.

ANEXO

APROVAÇÃO COMPESQ ODONTOLOGIA

The screenshot displays a web interface for a research system. At the top, it identifies the user as 'Sistema Pesquisa - Pesquisador: Manoela Domingues Martins'. On the left, there is a navigation menu with the UFRGS logo and several menu items: 'Linhas de Pesquisa', 'Projetos de Pesquisa', 'Áreas de Atuação', 'Bolsas de Pesquisa', 'Programa de Iniciação Científica', 'Voluntário', 'Programa de Fomento à Pesquisa (Lactone)', and 'Pesquisa (Lactone)'. The main content area shows the following details:

- Projeto Nº:** 24114
- Título:** EFEITO DO LASER DE BAIXA POTENCIA NA PROLIFERACAO E MIGRACAO CELULAR DE QUERATINOCITOS BUCAIS IN VITRO
- COMISSAO DE PESQUISA DE ODONTOLOGIA:** Parecer
- Objetivo:** O objetivo deste estudo é investigar o efeito do laser de baixa potência (LBP) durante o processo de cicatrização de feridas, avaliando o comportamento de queratinócitos durante o processo de cicatrização in vitro. Células epiteliais bucais (NOK-S1) serão cultivadas sob duas condições nutricionais: suplementadas com 10% de soro fetal bovino (FBS) e sob déficit nutricional (2% FBS) seguido de irradiação com LBP (660nm, 40mW) utilizando dois parâmetros, 4 e 20J/cm². Serão realizados ensaio de proliferação (MTI), migração (cicatrização), e expressão proteica (Western Blotting e Fluorescência). Os dados obtidos serão analisados estatisticamente pelo teste de Análise da Variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey e pelo teste de Equações de Estimação Generalizadas - EEG seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni com nível de significância de 5% (p <= 0.05). O projeto encontra-se adequadamente descrito e delineado.

At the top right of the interface, there are buttons for 'Retornar', 'Fechar', and 'Imprimir'.