

## Avaliação in vitro do metabolismo de células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 submetidas à aplicação do laser de baixa potência

Giovanni Antonio NÍCOLI<sup>a</sup>, Luciana Almeida LOPES<sup>b</sup>,  
Pedro Paulo Chaves de SOUZA<sup>a</sup>, Lorena Brito de SOUZA<sup>a</sup>,  
Josimeri HEBLING<sup>c</sup>, Carlos Alberto de Souza COSTA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia,  
UNESP, 14801-903 Araraquara - SP

<sup>b</sup>Laboratório de EletroTermoFototerapia, UFSCar, 13565-905 São Carlos - SP

<sup>c</sup>Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia,  
UNESP, 14801-903 Araraquara - SP

Nícoli GA, Lopes LA, Souza PPC, Souza LB, Hebling J, Costa CAS. In vitro evaluation of the metabolism of the immortalized odontoblast-like cells MDPC-23 submitted to the low power laser therapy. Rev Odontol UNESP. 2006; 35(2): 151-56.

**Resumo:** Desde que o laser interage com os tecidos, agindo como biomodulador e bioestimulador do processo de reparação, é de se esperar que a terapia com a luz laser possa, de alguma maneira, estimular o metabolismo dos odontoblastos, ativando a síntese de proteínas específicas. **Objetivo:** avaliar a atividade metabólica das células odontoblastóides MDPC-23 ante à estimulação com laser de baixa intensidade. **Material e Método:** Células MDPC-23 foram cultivadas em situação normal ou associadas à deficiência nutricional parcial (baixas concentrações de soro fetal bovino - 2,5 e 5%), e, então, foram submetidas à aplicação de luz laser com comprimentos de onda de 830 nm no infravermelho (AsGaAl) e de 685 nm na luz visível (InGaAlP), ambos emitindo radiação contínua e pontual. Finalmente, o metabolismo dessas células foi avaliado pelo teste de MTT, sendo os valores numéricos obtidos submetidos à análise estatística. **Resultado:** Foi demonstrado que, de acordo com os padrões de irradiação utilizados para este experimento, não houve um aumento significativo no metabolismo celular. **Conclusão:** Foi possível concluir, dentro das condições experimentais, que o metabolismo das células odontoblastóides MDPC-23 é biomodulado pelo laser vermelho e infravermelho próximo quando essas células são colocadas em estado de estresse por deficiência nutricional.

**Palavras-chave:** Laser de baixa potência; bioestimulação; cultura de células; odontoblastos; metabolismo celular.

**Abstract:** Since the laser light acts as bio-modulator and bio-stimulator of the healing process, one may expect that a specific laser therapy could also stimulate the odontoblasts to synthesize and deposit dentinal matrix in order to prevent in vivo dentinal sensitivity. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the metabolic activity of an odontoblast-cell line (MDPC-23) submitted to the low power laser therapy. **Material and Methods:** MDPC-23 cells were plated ( $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) and incubated with complete medium (10% fetal bovine serum – FBS) or with nutritional deficiency (2.5% FBS or 5% FBS) in order to simulate stress conditions for the MDPC-23 cells. The cells were submitted to the laser irradiation by using wave lengths of 830 nm in the infra-red ray (AsGaAl) or 685 nm in the visible light (InGaAlP), both emitting continuous and punctual radiation. Finally, the cell metabolism was evaluated by the MTT assay and the numerical scores obtained were submitted to the statistical analysis. **Results:** It was demonstrated that the standardized experimental techniques of irradiation employed in this experiment caused no significant increase in the cell metabolism. **Conclusion:** According to the experimental

conditions, it was possible to conclude the metabolism of the MDPC-23 odontoblastic-like cells is bio-modulated by the red laser and next infra-red ray when these cells are in stress condition induced by nutritional deficiency.

**Keywords:** *Low power laser; bioestimulation; cell culture; odontoblasts; cell metabolism.*

## Introdução

Os efeitos biológicos resultantes da utilização do laser de baixa potência dependem principalmente do efeito monocromático<sup>1</sup> e da fluência<sup>2</sup>, assim como da fase de crescimento celular em que as células recebem a irradiação<sup>3</sup>.

Investigando os efeitos do laser de baixa potência em cultura de células de osteoblastos em vários estágios de proliferação, Ozawa et al.<sup>4</sup> demonstraram ocorrer maior proliferação celular, formação de nódulo ósseo, aumento da atividade de fosfatase alcalina e expressão de gene de osteoglicina. Mais recentemente, em um experimento realizado por Hamajima et al.<sup>5</sup> em linhagem de células osteoblástica MC3T3-E1, foi observado que a irradiação com laser de baixa potência promove aumento na expressão do gene de osteoglicina. Quando aplicada sobre tecido periodontal, Zhu et al.<sup>6</sup> demonstraram que a laserterapia promove aumento na expressão de bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico) e estimula a remodelação óssea. Por outro lado, Marques et al.<sup>7</sup> demonstraram que a aplicação do laser de baixa potência (Ga-Al-As), nos parâmetros de 904 nm, 120 W e na densidade de energia de 3 J/cm<sup>2</sup>, sobre células de linhagem fibroblásticas FMM1 resultou em notável redução na expressão de proteínas e significativa alteração na morfologia ultra-estrutural das células. Desta maneira, parece claro que o laser pode agir como “balanceador e normalizador de funções”<sup>8</sup>, pois a luz laser pode ser utilizada tanto como estimulador<sup>9</sup> quanto inibidor do metabolismo celular<sup>10</sup>.

Na clínica odontológica contemporânea, existe grande número de aplicações possíveis do laser, e o uso dessa terapia já se faz rotineira para bioestimulação óssea, em casos de implantes<sup>11</sup>. A laserterapia também tem sido aplicada em cirurgia oral menor com o objetivo de diminuir a dor e o edema nos casos de pós-operatórios diversos, úlcera aftosa recorrente, herpes, nevralgias e hipersensibilidade<sup>12</sup>. Quando o laser He-Ne foi aplicado sobre tecido pulpar em dentes de ratos, foi demonstrado neoformação dentinária<sup>13</sup>. Por este estudo, também foi demonstrado que a reação inflamatória das polpas tratadas com laser era de menor intensidade quando comparadas com aquelas que não foram submetidas ao tratamento com laser<sup>13</sup>. Assim, apesar do possível efeito estimulador do laser de baixa potência sobre células pulpares, o mecanismo de resposta em nível molecular dessas células perante a este estímulo permanece indefinido. Por esse motivo, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar o efeito da aplicação do laser de baixa potência sobre a linhagem imortalizada de células odontoblastóides

MDPC-23 através da análise da proliferação e do metabolismo celular (MTT).

## Material e método

### *Manutenção das células em cultura*

As células foram cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm<sup>2</sup> (Costar Corp., Cambridge, MA, USA), seguindo-se o regime de subcultivo 3T6 (subcultivo a cada 3 dias na concentração de 3 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>). Para esse cultivo celular, foi utilizado um meio de cultura (DMEM, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP), 100 IU/mL e 100 [g/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY). As células foram mantidas em incubadora numa atmosfera umedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar, na temperatura de 37°C.

### *Curva de crescimento das células MDPC-23 em condições de estresse*

As células odontoblastóides MDPC-23 foram semeadas em garrafas plásticas de 25 cm<sup>2</sup>, na densidade de 3 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>, e incubadas em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub> na temperatura de 37°C e 95% de ar. Os grupos experimentais (duas garrafas por grupo para cada dia de experimento) variaram quanto à concentração de SFB do meio de cultura, sendo estabelecidos como demonstrado no Quadro 1.

As células foram contadas diariamente, até o sétimo dia, a partir da distribuição dos grupos experimentais. Para esse procedimento, o meio de cultura foi aspirado, as garrafas foram lavadas com 5 mL de PBS 1X e as células foram destacadas do substrato de plástico com 5 mL de PBS 1X + EDTA 0,01M. A contagem celular foi realizada diretamente desta suspensão e a média obtida, sendo gráficos representativos preparados para caracterizar a manutenção das células em cultura.

**Quadro 1.** Divisão dos grupos para o experimento de curva de crescimento sem aplicação do laser

Grupos	1	2	3
Concentração de SFB	2,5%	5%	10%

### Protocolo de aplicação do laser de baixa potência

O aparelho de laser utilizado foi o THERA-LASE (DMC - Equipamentos Ltda, São Carlos, Brasil), com comprimentos de onda de 685 nm na luz visível L1 (InGaAlP) e 830 nm no infravermelho próximo L2 (GaAlAs), ambos emitindo radiação contínua, pontual e de mesma potência (Quadro 2).

As doses utilizadas nesta pesquisa foram similares às aquelas encontradas na maioria dos estudos, nos quais é recomendada uma dose entre 1 e 5 J/cm<sup>2</sup> para proporcionar efeitos positivos sobre células<sup>14</sup>.

Para os experimentos, foi montado um sistema de irradiação no qual a ponteira, previamente desinfetada, foi posicionada verticalmente, fixada a uma distância de 2 cm da parte inferior da placa de Petri. Essa condição proporcionou uma área de irradiação de 2 cm<sup>2</sup>, visto que o raio do feixe, após o distanciamento, era de 0,799 cm. O aparelho de laser era adequadamente calibrado previamente aos procedimentos práticos de aplicação da luz sobre as células em cultura. Essa aplicação foi efetuada sempre de baixo para cima, atingindo diretamente a monocamada celular, de modo a evitar qualquer tipo de desvio ou perda de potência por interferência do meio de cultura celular (DMEM). Com o objetivo de eliminar variados fatores que pudessem interferir nos resultados, tais como outras fontes de luz secundárias provenientes do próprio ambiente laboratorial, a aplicação da luz laser foi realizada dentro de um compartimento

escuro fechado, que proporcionava uma condição de semi-obscuridade.

Nos cuidados prévios à irradiação, para calibração, foi utilizado um sistema de monitoramento duplo, tanto dos lasers quanto da fibra óptica condutora. Ainda assim, esse equipamento foi previamente calibrado utilizando-se um *power meter* modelo Field Master, da marca Coherent.

Os parâmetros para a aplicação do laser de baixa potência foram cuidadosamente determinados através do desenvolvimento de um estudo piloto (Quadro 3).

O tempo de irradiação foi calculado através da Equação 1:

$$T (s) = DE (J/cm^2) \cdot S (cm^2) / P (W) \quad (1)$$

### Avaliação do metabolismo celular (MTT assay) com as células na fase logarítmica

Após tratamento com PBS + EDTA 0,01M, as células foram semeadas em placas de Petri de 35 mm x 10 mm, na densidade de 3 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> (total de 24 x 10<sup>4</sup> células/placa), em 2 mL de meio de cultura DMEM contendo diferentes concentrações de SFB, e incubadas em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar e na temperatura de 37°C. Estabelecidos os grupos experimentais (Quadro 4), as células submetidas ou não às condições de estresse foram mantidas na incubadora por 24 horas e então irradiadas com os tipos específicos de laser nos padrões definidos nesta pesquisa. Essas células em cultura foram

**Quadro 2.** Relação dos tipos de laser utilizados, comprimento de onda, área do feixe, potência e densidade de potência

Laser	Diiodo laser	Comprimento de onda	Área do feixe	Potência (P)	Densidade potência
Laser (1)	Vermelho (luz visível)	685 nm	0,01 cm <sup>2</sup>	35 mw	17,5 mW/cm <sup>2</sup>
Laser (2)	Infravermelho	830 nm	0,01 cm <sup>2</sup>	35 mw	17,5 mW/cm <sup>2</sup>

**Quadro 3.** Relação dos parâmetros definidos para os dois tipos de laser avaliados

Densidade de energia (DE)	Energia	Área de irradiação (S)	Tempo de irradiação (t)
2,03 J/cm <sup>2</sup>	4 J	2 cm <sup>2</sup>	116 s

**Quadro 4.** Divisão dos grupos experimentais e controle de acordo com a concentração de SFB

Grupos	SFB (%)	Placas	Laser	Tempo de aplicação (s)	Área de irradiação
Grupo 1	2,5	12	L1	116	2 cm <sup>2</sup>
		12	L2	116	2 cm <sup>2</sup>
		12	Controle	-	-
Grupo 2	5	12	L1	116	2 cm <sup>2</sup>
		12	L2	116	2 cm <sup>2</sup>
		12	Controle	-	-
Grupo 3	10	12	L1	116	2 cm <sup>2</sup>
		12	L2	116	2 cm <sup>2</sup>
		12	Controle	-	-

submetidas a irradiações periódicas a cada 12 horas, num total de quatro aplicações. O experimento de MTT foi realizado 4 horas após a última irradiação com laser.

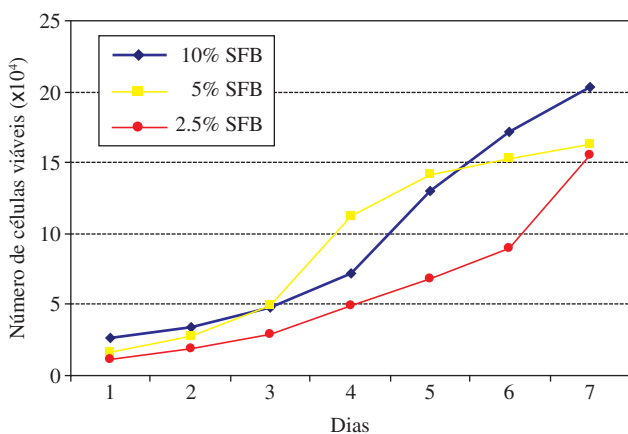
## Resultado

### Curva de crescimento celular

As curvas de crescimento celular obtidas pela contagem de células MDPC-23, entre o primeiro e o sétimo dias após seu cultivo, em função da concentração de soro fetal bovino presente no meio de cultura, estão apresentadas na Figura 1. Com algumas variações durante esse período, ao final do mesmo, o grupo 3 (10% SFB) apresentou o maior número de células aderidas ao substrato plástico.

### Avaliação do metabolismo celular (MTT)

Dados relativos ao número de células viáveis após a aplicação ou não de laser e em função da concentração de SFB no meio de cultura estão apresentados na Tabela 1. Na concentração de 2,5% de SFB, independente da aplicação ou não do laser, foi observado um número significativamente maior de células ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao número obtido para as concentrações de 5 e 10%, sem diferença entre elas ( $p > 0,05$ ).



**Figura 1.** Curvas do crescimento de células odontoblastóides MDPC-23 de acordo com a concentração de soro fetal bovino (SFB).

Quando meio de cultura contendo 10% de SFB foi utilizado como substrato para o metabolismo celular, a utilização de laser, seja ele vermelho ou infravermelho, não exerceu efeito significativo sobre o número de células MDPC-23 viáveis, uma vez que contagens não diferentes do controle foram obtidas ( $p > 0,05$ ). Quando 2,5% de SFB foi acrescentado ao meio, um número significativamente menor de células foi observado após a irradiação com laser vermelho quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ ), enquanto, na concentração de 5%, a irradiação das células com laser infravermelho resultou em aumento significativo do número celular ( $p < 0,05$ ). Quando os tipos de laser foram comparados entre si, ausência de diferença estatística foi observada ( $p > 0,05$ ) para todas as concentrações de SFB.

## Discussão

No experimento realizado de curva de crescimento, os resultados mostraram que, nessa linhagem celular em questão, houve menor proliferação celular quando as células foram cultivadas em meio de cultura com reduzida concentração de SFB. Então, de acordo com os resultados do crescimento celular, durante o qual o estresse sobre as células em cultura foi causado pela limitada adição de SFB ao DMEM, foi possível caracterizar que o Grupo 1 (2,5% SFB) seria o mais adequado para a realização da pesquisa de crescimento celular, pela aplicação do laser de baixa potência sobre células com significativo estresse. Tem sido demonstrado que o efeito estimulador do laser de baixa potência na proliferação de células *in vitro* e na cicatrização tecidual *in vivo* pode não ser significativo quando células e tecidos encontram-se em condições normais (fisiológicas) de crescimento e manutenção, já que o tempo fisiológico do ciclo celular é respeitado<sup>15</sup>. Todavia, trabalhos *in vitro*, nas quais foram utilizadas células em cultura submetidas a algum tipo de condição de estresse, tal como restrições nutricionais, evidenciaram um aumento significativo na proliferação celular para os grupos irradiados com um tipo específico de laser de baixa potência<sup>12</sup>. Na presente pesquisa, para o grupo em que o meio de cultura foi suplementado com 5% de SFB, o metabolismo das células tratadas com o laser infravermelho (L2) apresentou tendência a ser superior

**Tabela 1.** Metabolismo de células MDPC-23 em resposta ao tipo de laser aplicado e concentração de soro fetal bovino

Laser	Concentração de soro fetal bovino (SFB)		
	2,5%	5%	10%
Vermelho	0,782 (0,077)* a,A**	0,659 (0,120) b, AB	0,675 (0,112) b,A
Infravermelho	0,867 (0,204) a,AB	0,691 (0,080) b,B	0,669 (0,071) c,A
Sem laser (controle)	0,882 (0,155) a,B	0,667 (0,096) b,A	0,642 (0,109) b,A

\*Metabolismo celular expresso em mediana (variação); \*\*Para o tipo de laser (linha), medianas seguidas de letras minúsculas iguais representam grupos que não diferem estatisticamente (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ). Para a concentração de SFB (coluna), medianas seguidas de letras maiúsculas iguais representam grupos que não diferem estatisticamente (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ )

àquele observado para as células tratadas com o laser vermelho (L1). Todavia, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Quando o metabolismo das células pertencentes ao grupo controle foi comparado com aquele observado para o grupo laser infravermelho próximo (L2), houve diferença estatística significativamente maior para o grupo laser. Porém, quando o meio de cultura estava completo, ou seja, suplementado com 10% de SFB, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados ou não com laser. Estes dados definitivamente determinaram que as células respondem, através de inibição ou estímulo de seu metabolismo, sempre quando são colocadas em condições de estresse, como anteriormente demonstrado na literatura para outras linhagens celulares<sup>12</sup>. Ainda, a comparação da atividade celular e de sua proliferação entre os grupos experimentais e controle, de acordo com as variações da concentração de soro fetal bovino, demonstrou que o laser vermelho e o infravermelho, aplicados nos parâmetros aqui definidos, não causaram efeitos deletérios para as células MDPC-23 em cultura.

Em pesquisa recente, Khadra et al.<sup>16</sup> demonstraram ocorrer bioestimulação significativa quando da aplicação do laser infravermelho, na potência de 84 mW, sobre osteoblastos em cultura. Na presente pesquisa, foi utilizada uma potência previamente definida de 35 mW. Desta maneira, para alcançar a mesma dose final utilizada por Khadra et al.<sup>16</sup>, seria necessário, na presente pesquisa, estender significativamente o tempo de irradiação com o objetivo de alcançar uma dose final de 84 mW. Talvez esta dosagem fosse suficiente para estimular as células MDPC-23, as quais apresentam fenótipo muito semelhante ao dos osteoblastos<sup>17</sup>. Na pesquisa de Khadra et al.<sup>16</sup>, foi demonstrado ocorrer não apenas estimulação na proliferação celular, mas também o aumento da expressão de osteocalcina e TGF- $\beta$ 1 nas células irradiadas, além da síntese de fosfatase alcalina. Assim, novas pesquisas se fazem necessárias para avaliar, de acordo com os parâmetros de aplicação do laser utilizado por Khadra et al.<sup>16</sup>, a possível estimulação na proliferação e no metabolismo das células MDPC-23 e se estas células odontoblastóides também aumentam a expressão de fatores de crescimento e proteínas típicas, tais como sialofosforina da dentina e colágeno tipo I, além de acelerar a síntese de fosfatase alcalina.

A aplicação do laser terapêutico na maioria dos estudos relatados na literatura determinou que dosagens entre 1 e 5 J/cm<sup>2</sup> podem resultar em efeitos positivos sobre células envolvidas em processo de síntese protéica relacionada com reparação tecidual<sup>14</sup>. Todavia, outras pesquisas têm demonstrado que um grande aumento da dosagem poderia reverter os efeitos do laser sobre as células, resultando em inibição<sup>18</sup>.

Tem sido descrito na literatura que a aplicação de laser de baixa potência pode resultar em falta de bioestimulação

de osteoblastos<sup>16</sup>, podendo as discrepâncias dos dados científicos obtidos das variadas pesquisas ser atribuídas às variações nos padrões de irradiação e aos modelos experimentais usados, tais como diferentes linhagens celulares. Nos casos de culturas estabelecidas de células imortalizadas, elas apresentam crescimento rápido e não limitado, o que poderia mascarar os efeitos bioestimuladores do laser, mostrando que a bioestimulação parece ser mais efetiva para culturas primárias, para as quais o crescimento celular é lento e limitado<sup>19</sup>. Assim, além do parâmetro de aplicação do laser empregado na presente pesquisa, a possível baixa sensibilidade das células MDPC-23, são células imortalizadas estabelecidas e de crescimento rápido aos tipos de laser utilizados neste experimento, poderia explicar a não-efetiva bioestimulação ocorrida nesta investigação.

## Conclusão

Baseado nos resultados obtidos e de acordo com as condições experimentais aplicadas nesta investigação, foi possível concluir que os lasers com comprimento de onda vermelho e infravermelho próximo podem agir como biomoduladores do metabolismo das células MDPC-23 em cultura, inibindo ou estimulando sua respiração mitocondrial.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo 04/01299-0) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo 302575/2004-9) pelo apoio e relevante incentivo financeiro fornecido para o desenvolvimento da presente pesquisa.

## Referências

1. Kubota J, Ohshiro T. The effects of diode laser low reactive level laser therapy (LLLT) on flap survival in a rat model. *Laser Therapy*. 1989;1:127.
2. Karu TI, Pyatbrat LV, Kalendo GS, Esenaliev RO. Effects of monochromatic low - intensity light and laser irradiation on adhesion of He La cells in vitro. *Lasers Surg Med*. 1996;18:171-7.
3. Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol Biol*. 1995;27:219-23.
4. Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cells culture in rat calvarial cells. *Bone*. 1988;22:347-54.
5. Hamajima K, Hiratsuka M, Kiyama-Kishikawa T, Tagawa M, Kawahara M, Ohta H, et al. Effect of low-level laser irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. *Lasers Med Sci*. 2003;18(2):78-82.

6. Zhu X, Chen Y, Sun X. A study on expression of basic fibroblast growth factors in periodontal tissue following orthodontic tooth movement associated with low power laser irradiation. *Hua Xi Kuo Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2002;20:166-8.
7. 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. *J Oral Sci*. 2004;34:260-5.
8. Oshiro T, Calderhead RG. The development of low reactive-level laser therapy (LLLT) and its present status. *J Clin Laser Med Surg*. 1991;9:267-75.
9. Takeda Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction. Experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1988;17:388-91.
10. Sasaki K, Oshiro T. Role of low reactive-level laser therapy (LLLT) in the treatment of acquired and cicatricial vitiligo. *Laser Therapy*. 1989;1:141-4.
11. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts *in vitro*. *Photomed Laser Surg*. 2005;23:161-6.
12. Lopes LA. Análise *in vitro* da proliferação de fibroblasto de gengiva humana tratado com laser de baixa potência [Tese de Doutorado]. São Carlos: Instituto de Física da USP; 2002.
13. Brugnera JR, Villa RG, Genovese WJ. Laser na odontologia. São Paulo: Pancast; 1991.
14. Kucerova H, Dostalova T, Himmialova L, Bartova J, Mazanek J. Low-level laser therapy after molar extraction. *J. Clin Laser Med Surg*. 2000;18:309-15.
15. Nara Y, Tsukamoto Y, Fukutani S, Yamaguchi I, Mori M, Morioka T. Stimulative effect of He-Ne laser irradiation on cultured fibroblasts derived from human dental pulp. *Laser Life Sci*. 1992;4:249-56.
16. Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials* 2005;26:3503-9.
17. Quin C, Brunn JC, Cadena E, Ridall A, Butler WT. Dentin sialoprotein in bone and dentin sialophosphoprotein gene expressed by osteoblasts. *Connect Tissue Res*. 2003;44(Suppl 1): 179-83.
18. Haas, AF, Isserott RR, Wheeland RG, Rood PA, Graves PJ. Low-energy Helium-Neon laser irradiation increases the motility of cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 1990;94:822-6.
19. Kim KS, Kim JK, Kim SW, Lee JH, Kim YK, Ko SY, et al. Effects of low level laser irradiation (LLLI) with 904 nm pulsed diode laser on osteoblasts a controlled trial with the rat osteoblast model. *Laser Therapy*. 1996;8:223-32.