



Revista da Saúde e Biotecnologia

V. 1, N. 2, 2018
ISSN 2527-1636

<https://repositorio.unp.br/index.php/saudebiotecnologia>

Revista da Saúde
& Biotecnologia



Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos e da produção de colágeno após a aplicação do laser vermelho de baixa intensidade

In vitro analysis of fibroblast cell proliferation and collagen production after low intensity red laser application

Cristiane Ribeiro de Souza^a, Patrícia Ribeiro Ferreira^b, Mariana Merida Carillo Negrão^c, Carlos Rocha Oliveira^d, Daniel Moreno Garcia^e

^a Cirurgiã-dentista e esteticista. Professora do curso de Graduação em Estética da Universidade Anhembi Morumbi. cristiane70@gmail.com

^b Graduanda do Curso de Estética da Universidade Anhembi Morumbi. jpcell01@hotmail.com

^c Mestre e docente dos cursos de Graduação em Estética e de Fisioterapia da Universidade Anhembi Morumbi. profmarinegrao@gmail.com

^d Doutor e docente da Universidade Anhembi Morumbi. croliveira@anhembi.br

^e Docente da Universidade Anhembi Morumbi. danielgarvia@anhembi.br

Resumo

O presente estudo teve por objetivo analisar in vitro a resposta dos fibroblastos em relação à exposição à luz de Laser Vermelho de Baixa Intensidade, observando se há crescimento ou não quando expostos a irradiação, e se há aumento na produção de colágeno, com diferentes intensidades. Foi utilizado o método de redução do MTT à Formazan para análise da viabilidade dos fibroblastos e utilizado o corante ácido Sirius Red para quantificação de colágeno total sintetizado. Foram testadas três intensidades: 3J/cm², 4J/cm² e 6J/cm². 24h após a exposição pode-se verificar aumento na proliferação de fibroblastos e aumento no teor de colágeno total apenas com a intensidade de 6J/cm². Durante a leitura de 48h, observou-se também aumento de colágeno na exposição de 4J/cm².

Palavras-chave: Laser; Fatores de crescimento de fibroblastos; Grupo citocromo c.

Abstract

The aim of the present study was to analyze, in vitro, fibroblasts response to the exposure to Low Red Light Laser, observing its growth after exposing them to irradiation, and if there is an increase in collagen production, with different intensities. To analyse the fibroblast viability was used the Formazan MTT reduction method and the Sirius Red acid dye was used for the quantification of total synthesized collagen. Three intensities were tested: 3J/cm², 4J/cm² and 6J/cm². 24 hours after exposure, it was observed that there is an increase in fibroblast proliferation and in total collagen content after using 6J/cm². During the 48h reading, an increase in collagen was also observed after the 4J/cm² exposure.

Keywords: Laser; Fibroblast growth factors; Cytochrome c Group.

1. Introdução

A terapia com laser (*light amplification by stimulated emission of radiation* – amplificação da luz por emissão estimulada de radiação) utiliza luz altamente organizada para estimular alterações fisiológicas. Os lasers em baixa intensidade ou em fotobiomodulação são agentes terapêuticos sem potencial destrutivo, com eficiente ação anti-inflamatória e analgésica, fatores esses que ajudam no reparo dos tecidos biológicos traumatizados. Também atuam na cicatrização pelo aumento do metabolismo, da proliferação e da maturação celular, aumento da quantidade de tecido de granulação e diminuição dos mediadores inflamatórios [1].

Segundo Guirro, Guirro [2], o laser é uma emissão de luz coerente, monocromática, com grande concentração de energia, capaz de promover alterações físicas e biológicas. A monocromaticidade se dá porque a luz emitida possui um único comprimento de onda que oscila na mesma frequência e consequentemente apresenta uma única cor. A coerência da emissão se dá devido ao alinhamento das ondas eletromagnéticas no tempo e no espaço. A direcionalidade dos fótons em um só sentido e a coerência de emissão é que possibilitam a elevada concentração de energia, base para utilização da radiação laser como instrumento terapêutico ou cirúrgico.

Na laserterapia de baixa intensidade a ênfase é por definição nas reações não-térmicas (ou atérmicas) da luz com o tecido. A luz monocromática pode interagir com o tecido irradiado de duas formas: Dispersão da luz incidente e absorção da luz incidente por um cromóforo. A absorção é considerada a mais importante no que diz respeito à base fotobiológica da laserterapia, já que sem absorção não seriam possíveis efeitos fotobiológicos nem clínicos [3].

Os aparelhos monocromáticos emitem uma única luz, visível ou não, sendo absorvida por uma célula específica. A especificidade de absorção da luz por uma célula é conhecida de cromóforo. Também se pode definir como uma substância que tem muitos elétrons capazes de absorver energia. Logo, um cromóforo é uma molécula capaz de absorver uma luz específica [4].

As reações fotobiológicas envolvem a absorção de um comprimento de onda específico da luz pelo funcionamento da molécula fotorreceptor. A natureza fotobiológica dos efeitos laser de baixa potência significa que alguma molécula (fotorreceptor) deve primeiro absorver a luz utilizada para a irradiação. Após a promoção eletronicamente dos estados excitados, os processos moleculares primários desses estados podem levar a um efeito biológico mensurável no nível celular. Todos os efeitos biológicos induzidos pela luz dependem dos parâmetros da irradiação (comprimento de onda, dose, intensidade, tempo de radiação, modo Contínuo ou pulsado, parâmetros de pulso) [5].

Os espectros de ação na região do infravermelho visível para o próximo (IR) medido para respostas biológicas de células cultivadas, mostrou que a luz vermelha a 632,8 nm não era o único comprimento de onda adequado para biostimulação laser. Esses espectros, juntamente com os resultados de experiências de irradiação dicromática de células e modificações de efeitos de luz com produtos químicos, mostraram que a “bioestimulação a laser” é um fenômeno fotobiológico. Esses dados também sugeriu que o fotoreceptor para estimulação do metabolismo celular é a enzima terminal da cadeia respiratória (isto é, o citocromo c oxidase (localizada na mitocôndria celular) para células eucarióticas e citocromo bd em complexo para *Escherichia coli* [6].

Pensa-se que a luz vermelha é absorvida pelos citocromos nas mitocôndrias das células. Todas as células têm esses citocromos, de maneira que todos podem ser estimulados pela luz vermelha. Isso, por sua vez, possivelmente afeta a permeabilidade da membrana das células, afetando a membrana a partir do seu

interior [7].

Várias linhas de evidência mostram que as mitocôndrias são sensíveis à irradiação com luz visível monocromática. A irradiação com luz em comprimento de onda de 633 nm de mitocôndrias isoladas de fígado de rato aumenta a síntese de adenosina trifosfato (ATP), ativa o consumo de O_2 , aumenta a atividade de NADH (redução de forma de nicotinamida adenina dinucleótida) desidrogenase e citocromo c oxidase [8].

Inúmeras investigações têm confirmado que a radiação laser exerce um estímulo na produção de ATP no interior das células, originando e promovendo a aceleração das mitoses, podendo também aumentar o AMPc. A sua ação bioestimulante deve-se à fotossensibilidade da célula, e o efeito fotodinâmico se processa pela ativação do núcleo celular e do sistema DNA-RNA, nos quais há um aumento da síntese de frações de RNAm, que codificam diferentes proteínas. A multiplicação e a maturação dos fibroblastos se intensificam, assim como a formação de novas fibras de colágeno. Da mesma forma, nos processos de reparação, há neoformação de vasos [2].

A absorção molecular da luz laser permite um aumento do metabolismo celular, caracterizado pela estimulação de fotorreceptores na cadeia respiratória mitocondrial, alterações nos níveis de ATP celular, liberação de fatores de crescimento e síntese de colágeno[9].

Entende-se que o aumento da produção de colágeno ocorre através de mecanismos de fotoestimulação, sobre os quais certas frequências/doses podem atuar, modulando assim a proliferação celular e elevando a quantidade de fatores de crescimento de fibroblastos. Outra possível explicação para este fato, seria a melhor absorção desse tipo de energia por parte das mitocôndrias e conseqüentemente, maior produção de ATP e ácido nucleico, cujo resultado é o incremento na produção de colágeno, aceleração do reparo epitelial e facilitação do crescimento de tecidos de granulação [10].

Lins et al. [9] citam em seu estudo que existem vários mecanismos pelos quais o laser de baixa potência pode induzir a atividade mitótica dos fibroblastos. Ele estimula a produção do fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb), que constitui um polipeptídeo multifuncional, secretado pelos próprios fibroblastos, com capacidade para induzir não somente a proliferação, mas também a diferenciação fibroblástica, afetando as células imunes que secretam citocinas e outros fatores regulatórios do crescimento para fibroblastos. A maturação dos fibroblastos e a sua locomoção através da matriz também são influenciadas pelo referido laser.

A fototerapia com laser (LPT) é utilizada em muitas aplicações para promover a regeneração tecidual e demonstrou possuir várias vantagens, incluindo controle de dor, estimulação do processo de cicatrização, ação antiinflamatória, aumento da produção de colágeno, aumento da proliferação fibroblástica e aumento da microvascularização local [11].

Portanto o objetivo deste trabalho foi analisar a ação do laser vermelho em diferentes doses, na proliferação de fibroblastos e na atividade destes, verificando se há incremento na produção de colágeno após a irradiação.

2. Métodos

O equipamento emissor de luz vermelha foi utilizado, *in vitro*, para verificação da possível atividade proliferativa/citotóxica sobre fibroblastos humanos (CCD-1072Sk; ATCC), através do método de redução do MTT à formazan e da quantificação de colágeno total sintetizado utilizando o corante ácido Sirius Red. Foram testados 3 intensidades: $3J/cm^2$, $4J/cm^2$ e $6J/cm^2$ e o tempo de exposição foi determinado pelo próprio timer do equipamento. As leituras foram realizadas em 24h e 48h.

O presente estudo foi desenvolvido no laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células da Escola de Ciências da Saúde da Universidade Anhembi. A linhagem de fibroblastos CCD1072Sk, que corresponde a fibroblastos humanos de recém-nascido do sexo masculino, fornecida pela organização ATCC (<http://www.atcc.org>), foi submetida ao tratamento com diferentes intensidades de exposição ao laser vermelho. Após a irradiação foi realizada a avaliação da viabilidade celular do composto testado frente à linhagem CCD - 1072Sk e análise da síntese de colágeno.

As células da linhagem CCD-1072Sk foram cultivadas em meio ISCOVE'S com 10% de soro fetal bovino, 0,292 g/l de L-glutamina, 1,0 g/l de D-glicose, 2,2 g/l de NaHCO₃, 10.000UI de Penicilina e 0,060 g/l de Estreptomicina. As células foram mantidas em frascos de 25 cm² (1 × 10⁵ cells/mL) em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Em todos os experimentos as culturas de fibroblastos foram submetidas ao teste de viabilidade celular utilizando o corante azul de tripano e foi realizada a leitura em câmara hemocitométrica por microscopia óptica. Todos os experimentos descritos foram realizados quando a viabilidade celular for igual ou superior a 95%.

As placas com as células da linhagem CCD-1072Sk foram submetidas à aplicação do LASER vermelho, utilizando-se o equipamento da Linha Therapy, da empresa DMC®, com comprimento de onda de 660 nm +- 10 nm e emissão máxima de 100 mW +- 20%. A peça de mão utilizada para aplicação foi a caneta com ponteira, utilizada de forma pontual de 2 em 2cm².

Para este estudo, foram utilizadas 02 placas de cultura com 12 poços, sendo realizados diferentes doses de aplicação, seguindo-se os seguintes critérios para cada placa: (Figura 1).

- 03 poços receberam a aplicação do LASER vermelho na faixa de 660 nm, modo contínuo, potência de 100 mW, dose de 3J/cm² de forma pontual, durante 30 segundos por poço.
- 03 poços receberam a aplicação do LASER vermelho na faixa de 660 nm, modo contínuo, potência de 100 mW, dose de 4J/cm² de forma pontual, durante 40 segundos por poço.
- 03 poços receberam a aplicação do LASER vermelho na faixa de 660 nm, modo contínuo, potência de 100 mW, dose de 6J/cm² de forma pontual, durante 60 segundos por poço.
- 03 poços foram submetidas à aplicação com a luz desligada, para serem as placas controle.

Em seguida, as placas foram submetidas ao ensaio de redução MTT à Formazan, para estudo da atividade metabólica e ao método Sirius Red, para verificar se houve incremento na produção de colágeno e elastina.



Figura 1: Irradiação dos poços com laser vermelho de baixa intensidade
Fonte: o autor

O teste de redução MTT ([3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio]) é usado com grande sucesso para estimar o número de células viáveis em um screening inicial de fármacos. Sua interpretação serve de indicativo da atividade metabólica celular, e o local de ocorrência das reações redox inclui tanto mitocôndrias como o citosol. A redução do sal de MTT à formazan é realizada principalmente pela enzima succinato-desidrogenase, e resulta em cristais de formazan insolúveis na cor violeta. A intensidade da coloração é utilizada para medir a atividade mitocondrial e conseqüentemente a viabilidade celular (MOSMANN *et al.*, 1983) ^[12]. Assim, as células irradiadas com diferentes intensidades de laser vermelho, foram adicionados a 10µl da solução de MTT 5mg/ml (Sigma-Aldrich) em cada poço. Após 4 horas, a placa foi centrifugada, o sobrenadante de cada poço descartado e o pellet com os cristais formado no fundo da placa dissolvido com 100µL de etanol puro e em seguida homogeneizado em agitador de placas por 15 minutos. A densidade óptica foi medida pelo leitor de microplacas (FlexStation® 3 multimode benchtop reader) em 660 nm. A percentagem de sobrevivência celular na presença dos compostos em estudo foi calculada da seguinte maneira:

$$\% \text{ Células viáveis} = \frac{\text{Absorbância por poço (com droga)} \times 100}{\text{Absorbância do controle (sem droga)}}$$

As células foram cultivadas e tratadas conforme descrito anteriormente. Após cultivo, o meio foi retirado e os poços lavados três vezes com PBS 0,1M. Foram adicionados 100µL de Flúido de Bouin (ácido pícrico, formaldeído e ácido acético glacial) para fixação durante 1 hora. As amostras foram lavadas com PBS, em seguida, adicionado o corante Sirius Red. Após o tempo de 1 h, foi removido o máximo do corante e procedendo-se a lavagem com 150µL de solução de ácido hidrolórico 0,01M por 30 segundos para remoção do corante que não se ligou ao colágeno. Em seguida, o corante foi retirado das camadas celulares com a adição de solução de NaOH 0,1M durante 30 min. Aliquotas de 100µL das soluções contidas nos poços foram transferidas para uma nova placa. A absorbância será medida em um leitor de microplacas Elx-800-UV (Bio-Tek Instruments, EUA) a 660 nm.

Os resultados foram apresentados como média + EPM (erro padrão da média). Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido de teste a posteriori de Tukey. As semi-quantificações foram analisadas por teste t de Student. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativamente diferentes. As análises foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 5.0.

3. Resultado

Através do teste MTT (redução do MTT à formazan), verificou-se a indução de proliferação da luz vermelha frente à linhagem de fibroblastos (CCD-1072Sk). Deste modo, a figura 2A mostra os resultados com os diferentes joules (J) aplicados nas células. Os resultados que apresentaram significância estatística ($P < 0,05$) foram encontrados 24h após exposição, na maior intensidade estudada ($6J/cm^2$). Após 48 horas de exposição, os resultados mostraram uma tendência de aumento na proliferação de fibroblastos quando expostos à 4J, mas os resultados não foram estatisticamente significativos (Figura 2B). Todos os resultados foram comparados às células controle (células que não foram expostas ao LASER).

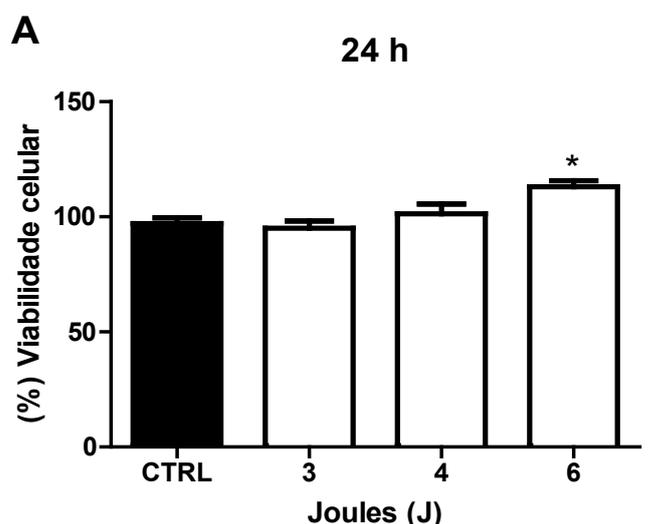


Figura 2: Viabilidade Celular: Teste de redução do MTT à formazan. A (24 horas após) e B (48 horas após).

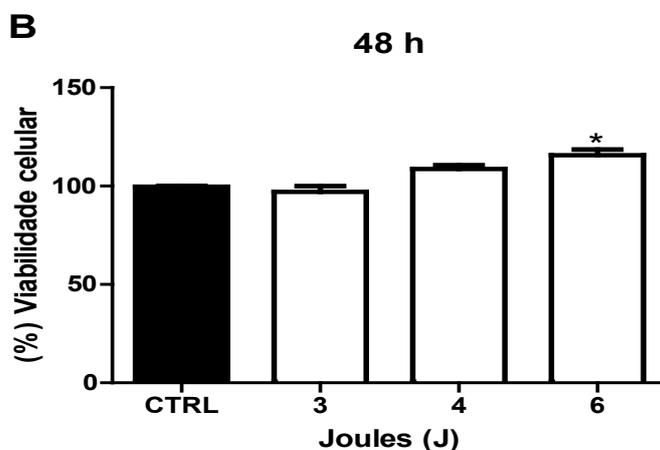


Figura 2: Teste de redução do MTT à formazan. Efeitos da exposição da luz vermelha sobre os fibroblastos humanos CCD-1072SK. Os fibroblastos foram expostos à 3J, 4J e 6J, pelo tempo determinado pelo equipamento. Leituras realizadas após 24 e 48 horas da exposição inicial. Durante as 24h anteriores, as culturas de fibroblastos foram carenciadas de soro bovino fetal. (A) leitura realizada após 24h de incubação. (B) leitura realizada após 48h de incubação. (*) $P < 0,05$ ANOVA, tukey.

A quantificação do colágeno produzido pelos fibroblastos CCD-1072SK foi realizada pela técnica do corante Sirius Red. Os resultados apresentaram o padrão de resultados obtidos no teste de proliferação mostrado na figura 1. Durante as primeiras 24h, apenas a maior intensidade de joule ($6\text{J}/\text{cm}^2$) foi capaz de aumentar significativamente o teor de colágeno total. Já durante a leitura de 48h verificou-se que a exposição de $4\text{J}/\text{cm}^2$ aumentou a síntese total colágeno de modo significativo, além da concentração de $6\text{J}/\text{cm}^2$ (Figuras 3A e 3B).

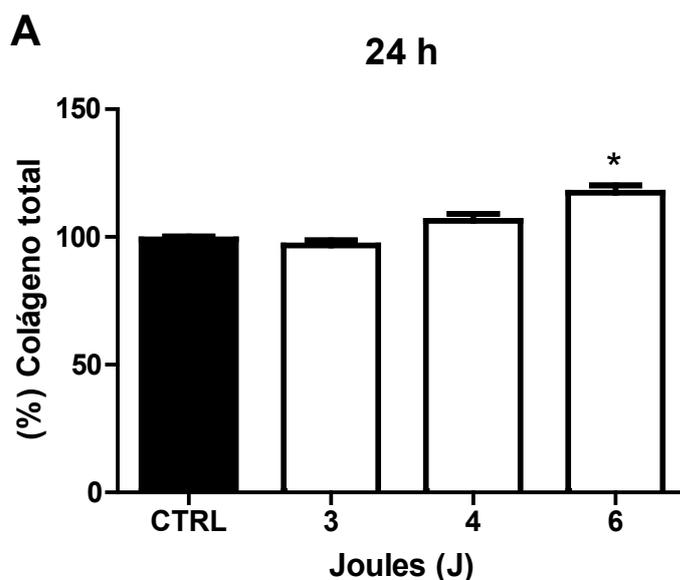


Figura 3: Determinação do teor de colágeno nos fibroblastos. A (24horas após) e B (48 horas após)

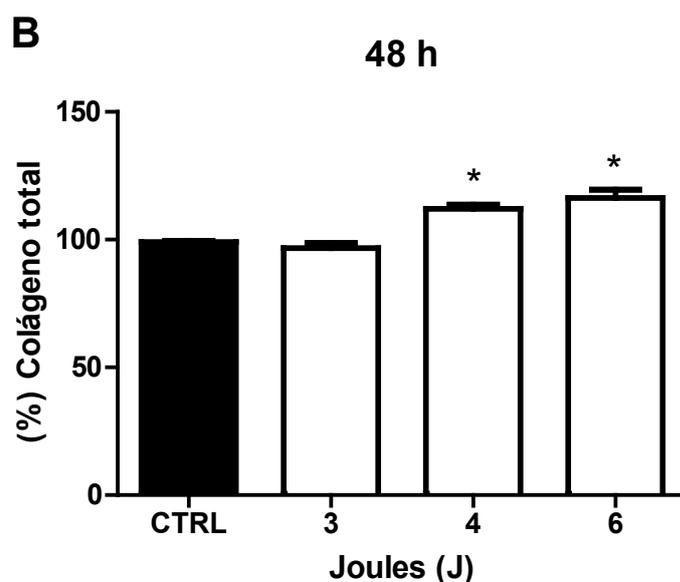


Figura 3: Determinação do teor de colágeno nos fibroblastos. Efeitos da exposição da luz vermelha sobre os fibroblastos humanos CCD-1072SK. Os fibroblastos foram expostos à 3J, 4J e 6J, pelo tempo determinado pelo equipamento. Leitura realizada após 24 e 48 horas da exposição inicial. Durante as 24h anteriores, as culturas de fibroblastos foram carenciadas de soro bovino fetal. (A) leitura realizada após 24h de incubação. (B) leitura realizada após 48h de incubação. (*) $P < 0,05$ ANOVA, tukey.

4. Discussão

O uso da terapia de Laser de baixa intensidade vem crescendo a cada dia mais, devido a diversas vantagens em tratamentos de condições patológicas ou estéticas. Os fibroblastos é uma das células mais estudadas entre os pesquisadores, pois estão envolvidos em síntese de colágeno e elastina, são responsáveis por produzir e depositar componentes na matriz extracelular e seu estímulo ajuda a melhorar os sinais do envelhecimento cutâneo.

Neste estudo houve um significativo aumento na proliferação de fibroblastos após 24 horas da irradiação com $6\text{J}/\text{cm}^2$, mantendo-se o aumento também após 48 horas. Com relação à quantificação de colágeno, notou-se que após 48h da irradiação com $4\text{J}/\text{cm}^2$ houve aumento da síntese de colágeno de modo significativo, e após a irradiação com a intensidade de $6\text{J}/\text{cm}^2$ houve um aumento da síntese de colágeno já nas primeiras 24 horas, aumentando ainda mais esta síntese após 48 horas.

Segundo Andrade ^[10], o aumento da produção de colágeno ocorre através de mecanismos de fotoestimulação, sobre os quais certas frequências/doses podem atuar, modulando assim a proliferação celular e elevando a quantidade de fatores de crescimento de fibroblastos. Outra possível explicação para este fato, seria a melhor absorção desse tipo de energia por parte das mitocôndrias e conseqüentemente, maior produção de ATP e ácido nucleico, cujo resultado é o incremento na produção de colágeno, aceleração do reparo epitelial e facilitação do crescimento de tecidos de granulação.

Os resultados obtidos com esta pesquisa estão de acordo com estudo feito por Ayuk et al. ^[13], em fibroblastos de pele humana isolados, em diferentes modelos de células normais e feridas diabéticas, que mostrou que o laser de baixa intensidade estimula a migração e fechamento de feridas e aumenta a viabilidade, proliferação e síntese de colágeno nas células de feridas diabéticas. As células foram irradiadas com $5\text{J}/\text{cm}^2$ com comprimento de onda de 660nm, tendo um aumento significativo após incubação de 72h.

Em estudo realizado por Freitas et al. ^[14], em ratos Wistar, utilizando o laser visível (AlGaInp) na faixa de 660nm, modo contínuo, potência 30mW, dose de $10\text{J}/\text{cm}^2$, investigou-se a diferença entre as terapias associadas e isoladas do laser e microcorrentes na cicatrização de queimadura em ratos. Concluiu-se que após a aplicação das terapias isoladas, o laser e a microcorrentes aceleraram o processo de reparo, no entanto quando associados promoveram melhora somente na angiogênese. Houve diferença significativa entre os grupos no número de fibroblastos ($p=0,0003$), colágeno ($p=0,0153$), neoangiogênese ($p=0,0031$), e anexos cutâneos ($p=0,0004$). Para o aumento da presença de fibroblastos, a aplicação de apenas uma modalidade foi mais eficaz que a terapia associada. Estes resultados estão de acordo com o desta pesquisa, em que o laser vermelho foi aplicado de forma isolada e conseguiu-se aumento na proliferação de fibroblastos e estímulo da produção de colágeno.

Andrade ^[10] conclui em seu estudo que a laserterapia de baixa potência é capaz de promover como principais efeitos fisiológicos a resolução antiinflamatória, neoangiogênese, proliferação epitelial e de fibroblastos, síntese e deposição de colágeno, revascularização e contração da ferida. O autor afirma que doses compreendidas entre $3\text{-}6\text{J}/\text{cm}^2$ parecem ser mais eficazes e que doses acima de $10\text{J}/\text{cm}^2$ estão associadas a efeitos deletérios. Os comprimentos de onda compreendidos entre 632,8 e 1000nm seguem como aqueles que apresentam resultados mais satisfatórios no processo de cicatrização tecidual. No presente estudo, as doses mais baixas foram menos estimulantes na produção de colágeno que as doses mais altas. Porém, a dose mais alta aplicada ($6\text{J}/\text{cm}^2$) ainda está dentro da faixa que o autor considerou como bioestimulante.

Colombo et al ^[15], apesar de terem utilizado uma dose alta, mostraram em seu estudo resultados

estimulantes ao avaliar a angiogênese em feridas cutâneas no dorso de ratos tratados com laser de baixa intensidade (660nm, 16MW, 10J/cm²). O efeito angiogênico do uso de laserterapia demonstrou que um número mais elevado de vasos sanguíneos recém-formados no local da ferida foi maior que no grupo de controle.

Neste estudo verificou-se que o Laser vermelho é capaz de influenciar os processos metabólicos celulares, o aumento da proliferação de fibroblastos, o aumento da síntese de colágeno. Com isso, o laser de baixa intensidade se torna uma terapia importante para todas as alterações estéticas que necessitam de aumento do colágeno, como o envelhecimento, a flacidez tissular e as estrias, sendo também um método eficaz no processo de modulação da reparação tecidual. Por se tratar de uma terapia indolor, não invasiva, de fácil manuseio e de custo não extremamente elevado, ele se torna um equipamento de grande importância para utilização do profissional de estética, podendo inclusive ser empregado na saúde pública.

5. Conclusão

De acordo com o estudo empregado in vitro conclui-se que a o uso do Laser vermelho de baixa intensidade, com 660nm, quando aplicado diretamente sobre os fibroblastos, é capaz de promover a proliferação dos mesmos e aumentar a síntese de colágeno quando comparado com o grupo de controle que não recebeu irradiação, principalmente quando utilizada a intensidade de 6J/cm².

Sugere-se que mais estudos sejam realizados, com diferentes intensidades e especialmente ensaios clínicos, randomizados e duplos cegos para aumentar a evidência científica da abordagem do laser vermelho na síntese de colágeno.

Agradecimentos

Agradeço à Empresa SLSP por disponibilizar o equipamento de laser para realização deste estudo.

Referências

1. Leal CT, Bezerra AL, Lemos A. A efetividade do laser de HeNe 632,8 nm no reestabelecimento da integridade dos tecidos cutâneos em animais experimentais: revisão sistemática. *Fisioter Pesq.* 2012 Jun; 19(3): 290-6.
2. Guirro ECO, Guirro RRJ. *Fisioterapia dermato-funcional: fundamentos, recursos, patologias.* 3ª edição. São Paulo: Editora Manole; 2004.
3. Kitchen S. *Eletroterapia: prática baseada em evidências.* 11ª edição. São Paulo: Editora Manole; 2003.
4. Agne JE. *Eletrotermofototerapia.* 4ª edição. Santa Maria: Editora Pallotti; 2017.
5. Karu TI. Low-Power Laser Therapy. In: Vo-dinh T, editor. *Biomedical Photonics Handbook. Volume III.* 2ª edição. North Carolina: CRC Press Taylor & Francis group; 2003. p. 187-218.
6. Kary TI, Kolyakov SF. Exact acition spectra for cellular responses relevant to Phototherapy. *Photomed. Laser Surg.* 2005; 23(4): 355-61.
7. Low J, Reed A. *Eletroterapia explicada: princípios e prática.* 3ª edição. São Paulo: Editora Manole; 2001.
8. Karu TI, Pyatibrat L, Kalendo, G. Irradiation with he-ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J. Photochem Photobiol B Biology.* 1995; 27: 219-23.

9. Lins RDAU, Dantas EM, Lucena KCR, Catao MHCV, Garcia AFG, Neto LGC et al. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. *An Bras Dermatol.* 2010; 85(6): 849-55.
10. Andrade FSSD, Clark RMO, Ferreira ML. Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. *Rev Col Bras Cir.* 2014;41(2): 129-33
11. Pinheiro ALB, Meireles GCS, Carvalho MC, Ramalho LMP, Santos JN. Biomodulative effects of visible and IR laser light on the healing of cutaneous wounds of nourished and undernourished wistar rats. *Photomed. Laser Surg.* 2009 Dec; 27: 947-5.
12. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2): 55-63
13. Ayuk M, Houreld NN, Abrahamse H. Collagen Production in Diabetic Wounded Fibroblasts in Response to Low-Intensity Laser Irradiation at 660nm. *Diabetes technol.* 2012; 14(12).
14. Freitas RPA, Barcelos APM, Nóbrega BM, Macedo AB, Oliveira AR, Ramos AMO, Vieira WHB et AL. Laserterapia e microcorrente na cicatrização de queimadura em ratos: terapias associadas ou isoladas? *Fisioter. Pesqui.* 2013; 20 (1): 24-30.
15. Colombo F, Neto AAPV, Sousa APC, Marchionni AMT, Pinheiro ALB, Reis SRAR et al. Effect of low-level laser therapy (1660 nm) on angiogenesis in wound healing: a immunohistochemical study in a rodent model. *Braz Dent J.* 2013; 24(4): 308-12