

Estandarización de un protocolo para irradiar cultivos celulares con laser de baja intensidad

Standardization of a protocol to irradiate cell cultures with low level laser

Ángela DOMÍNGUEZ¹, William CRIOLLO-GÓMEZ²

1. Odontóloga, Ortodoncista, Profesora Postgrado de Ortodoncia, Universidad del Valle (Cali, Colombia). 2. Bacteriólogo, Especialista en Cultivos Celulares, Profesional Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle (Cali, Colombia).

RESUMEN

Introducción: No es posible aplicar láser terapéutico durante los tratamientos de Ortodoncia y seleccionar diferentes tiempos, frecuencia o intensidad para cada célula. Se irradia toda el área de interés con las mismas características en segundos, julios y vatios. Esto podría tener un potencial proliferativo en algunas células y nocivo en otras. Es importante entonces, evaluar los efectos de una misma dosis de irradiación en todas células que participan durante el movimiento dental para conocer su reacción individual ante el láser terapéutico de uso clínico.

Objetivo: Estandarizar un protocolo para irradiar cultivos celulares de las células implicadas en el movimiento dental inducido (Fibroblastos, Osteoblastos y Pre-Osteoclastos humanos) para entender la fundamentación básica de su efecto clínico.

Materiales y métodos: Con un laser de As-Ga-Al se irradiaron Fibroblastos gingivales y periodontales, Osteoblastos humanos normales (NHOst) y células progenitoras de osteoclastos humanos. Se empleó una longitud de Onda de 832.79nm, 36.73mW de potencia, 3.75 J/cm² y 32,40 segundos por pozo.

Conclusiones: Las pruebas de citotoxicidad demostraron que este protocolo de irradiación es seguro para los cuatro grupos de cultivos celulares.

Palabras clave: Laser de baja intensidad, fibroblastos, osteoblastos, pre-osteoclastos, movimiento de ortodoncia.

SUMMARY

Introduction: It is impossible to apply orthodontic therapeutic laser during the orthodontic treatment and to select different times of exposure, frequency or intensity for every single cell. The whole area gets irradiated in seconds according to the laser type. This could have a proliferation effect in some cells and a harmful effect in others cells. So, it's very important to asses the effects of a laser application on the cells involved in dental movement, to verify the effect and reaction after laser therapy.

Objective: To create and standardized a clinical protocol to irradiate culture cells involved in dental movement (Human fibroblasts, osteoblasts and pre-osteoclasts in order to understand the basics of it's clinical effect.

Materials and methods: Gingival and periodontal fibroblasts, normal human osteoblasts (NHOst) and human osteoclast progenitor cells in culture were irradiated using a low energy level laser (As-Ga-Al), operated at 36.73mW, 832.79nm nm wavelength 3.75 J/cm² and 32.40 seconds per well.

Conclusions: The cytotoxicity tests

showed that irradiation is safe protocol for the four groups of cell cultures.

Key words: Low level laser, periodontal and cell culture fibroblasts, osteoblasts, pre- osteoclasts, orthodontic movement.

INTRODUCCIÓN

Son varias las reacciones a nivel celular que tienen que desencadenarse para facilitar un movimiento dental inducido (1-4) y se ha reportado que la aplicación del láser de baja intensidad permite no sólo estimular estos cambios celulares acelerando movimiento ortodóncico tanto en animales (5-10), como en humanos (11-16), sino también controlando el dolor en diferentes etapas del tratamiento.(15-21). Los reportes de sus efectos en diferentes células que participan en el movimiento ortodóncico: fibroblastos (22-26), osteoblastos (27-30), osteoclastos (31) no muestran estandarización en cuanto a distancias, equipo láser, longitud de onda y tiempo de irradiación y pocos son en células humanas normales. Timberlake (32) resalta la importancia de homogenizar los parámetros que regulen estas variables al irradiar células cultivadas.

El propósito de esta investigación es estandarizar un protocolo de irradiación para cultivos celulares, Recopilando tres estudios realizados en fibroblastos gingivales, periodontales, osteoblastos y pre osteoclastos normales humanos con láser de baja intensidad, en el Post grado de ortodoncia de la Universidad del valle.

Recibido para publicación: Septiembre 02 de 2012.

Aceptado para publicación: Octubre 01 de 2012.

Correspondencia:

A. Domínguez, Universidad del Valle
angela.dominguezc@gmail.com

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares

Fibroblastos gingivales y de Ligamento periodontal suministrados por el laboratorio de cultivos celulares de la Asociación In-Vitro de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, los cuales fueron mantenidos en medio de cultivo Dulbecco Modificado Eagle Medio (DMEM) (GIBCO) suplementado con GA-500, Suero Fetal Bovino (SFB) (SIGMA-2442) L-glutamina (200 mM) 1%, Aminoácidos no Esenciales (GIBCO) 1%, Piruvato de Sodio (100 mM) (SIGMA P-5280) 1%. Factor Básico para crecimiento de Fibroblastos (bFGF) (SIGMA F-5895), en botellas de cultivo T-25 Falcon®.

Osteoblastos humanos normales (NHOb) y células progenitoras de osteoclastos humanos Poietics™ Human Osteoclast Precursors Cat No. 2T-110 Cambrex-Lonza Inc. (Walkersville, USA), almacenados en termos con Nitrógeno Líquido en el laboratorio. Ser utilizaron el medio para crecimiento de Osteoblastos (OGM BulletKit) CC-3207 y el medio para crecimiento de Osteoclastos (OCP Bullet Kit) PT 8001, Cambrex-Lonza.

Todas las células se sembraron en microplacas de cultivo celular de 96 pozos, de fondo plano con un volumen de 200 microlitros de medio de cultivo fresco de cultivo respectivo. Después del tiempo de tratamiento con el Láser se retira el medio y se lavan las células con solución de lavado 3 veces por 5 minutos. Posteriormente se adiciona a cada pozo 50 microlitros de la mezcla de XTT y 100 microlitros del medio de crecimiento, generando una concentración final de 0.3 mg/mL de XTT. Las placas son incubadas de 24 a 148 h en atmósfera humidificada (37°C, 5% CO₂).

Características del laser de baja intensidad

Equipo Photon LASEII (As-Ga-Al DMC Equipamentos; Brasil) (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de irradiación

Longitud de onda	Potencia	Densidad de energía	Tiempo
832.79nm	36.73mW	3.75J/cm ²	32,40 Seg pozo

Protocolo de irradiación

La irradiación se hace sobre un soporte de cuatro ruedas que permita al unirse a una circunferencia mediante un conector metálico, para ejecutar un movimiento oscilatorio que se describe con la siguiente fórmula:

$x(t) = 7.332 \cos[360(0.496)t]$ donde la amplitud es de 7.332cm y el periodo es de 2.02s. El comportamiento de la velocidad es de:

$$v(t) = -7.274\pi \sin[360(0.496)t]$$

Entre cm y cm se tiene una serie de velocidades similares por lo que se trabaja con una velocidad promedio de 22.25 cm/s (aproximación a movimiento lineal uniforme).

El tiempo que el láser irradia cada uno de los pozos por ciclo debe ser de: $t = 0.0574$ s El cual se obtuvo con: $t = 2d/V$ donde V es el diámetro de un pozo y es la velocidad promedio.

Para mejorar el campo del haz se le adapta al láser una lente positiva con distancia focal de 3cm a la salida del dispositivo a 1.5cm de la superficie del cultivo celular. La salida de potencia se mantuvo a 36.73 mW en modo continuo. La fibra se posiciona a 15 mm de la monocapa de manera perpendicular asegurando una exposición igual en todo el cultivo. Antes de la aplicación del láser a los cultivos, la energía resultante fue determinada por medio de un medidor de energía. El Tiempo total de Irradiación por pozo es de 32.40 segundos. En función del tiempo de irradiación, el flujo de energía es de 3.75 julios/cm².

La irradiación de los cultivos se hace en su fase de proliferación logarítmica. 24 horas después de sembrados.

Después de la aplicación del láser los cultivos se deben incubar para la posterior evaluación.

Evaluación del efecto en proliferación celular para fibroblastos gingivales y periodontales, osteoblastos y pre-osteoclastos

Se empleo el kit de proliferación celular (XTT) de Roche® que mide la actividad metabólica de las células viables. Es una prueba no radiactiva a sustancia marcadoras radioactivas como la [3H]-timidina, o la liberación de radioisótopos como [51Cr] y puede ser desarrollada completamente en microplacas.

La prueba se fundamenta en la reducción de sal de tetrazolium XTT por células viables en presencia de un reactivo de unión a electrones. Se basa en la conversión de la sal de tetrazolium XTT amarilla hasta producir el formazán una tinción de color anaranjada por la actividad metabólica de las células, por consiguiente esta conversión solo ocurre en células viables. EL formazán es soluble en solución acuosa y es directamente cuantificado usando un lector de microplacas para ELISA.

Las células, se crecieron en placas de cultivo celular de 96 pozos, e incubadas a 37°C en ambiente de humedad al 5% con CO₂, posterior al tratamiento con el láser, se incubaron con la solución de XTT, de 4 a 164 horas. Después de 24 horas de incubación se evalúa la producción de formazán de color naranja, y fue cuantificada usando el lector de microplacas Stat Fax 2100 (Awareness). Un incremento en el número de células vivas resulta en un incremento en la actividad general de la dehidrogenasa mitocondrial en la muestra. Este aumento esta directamente correlacionado a la cantidad de formazán formado, el cual es interpretado de acuerdo a la absorbancia.

Prueba para evaluación de proliferación en Osteoblastos

Método Marcaje Enzimático:

Algunos anticuerpos se utilizan conjugados con enzimas. El método incluyó el revelado de la enzima para visualizarlo al microscopio óptico. Las muestras celulares obtenidas por cultivo celular se fijaron por inmersión en Formol buffer al 10% por 10 minutos, luego se lavaron durante 5 minutos en Buffer Fosfato Salino (PBS) 0.01 Molar. La peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrogeno al 0.3 % por 5 minutos, posteriormente se lavó en PBS que contenía 5% de suero normal y 1% suero albúmina bovina por 30 minutos.

Método Complejo Avidina - Biotina (ABC):

Método indirecto muy sensible. Se procedió a través de tres incubaciones y el revelado de la enzima: se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C en cámara de humedad, se lavó en PBS seguido de una incubación con el anticuerpo secundario biotinilado (2 microgramos/mL.) y una dilución de 50X del complejo avidina-biotina-peroxidasa en cámara de humedad por 30 minutos a temperatura ambiente.

Revelados:

El revelado de la Peroxidasa de Rábano (horseradish peroxidase, HRP) se realiza mediante una reacción histoquímica con 3,3'-diaminobenzidina tetra clórica, agua oxigenada y diaminobenzidina (DAB). El revelado de la Fosfatasa Alcalina se desarrolla normalmente utilizando naftol AS-MX fosfato en combinación con el colorante Fast Red que dio como resultado, un producto de reacción rojo brillante e insoluble. Posteriormente se contrastó con hematoxilina y se monta en Permout.

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva para hallar la media, la mediana la desviación típica, el coeficiente de variación y el rango mínimo y máximo de cada una de las líneas celulares observadas y una prueba U de Mann

Whitney para realizar las comparaciones entre los grupos de células. El nivel de significancia para el estudio se fijó en una probabilidad < 0.05 , es decir, solo sería significativa la diferencia si $p < 0.05$

RESULTADOS

Fibroblastos Gingivales y Periodontales

La estadística descriptiva mostró en resultados de absorbancia, un promedio de $1,21 \pm 0.036$ unidades de densidad óptica (U.F.O) para los fibroblastos gingivales control y 1.29 ± 0.057 unidades de densidad óptica para los fibroblastos gingivales irradiados. Mostrando que las células gingivales expuestas a radiación no presentan diferencias significativas comparadas con las células gingivales control. Su comportamiento es muy similar.

Para los Fibroblastos periodontales se encontró un valor medio de 1.11 ± 0.18 unidades de densidad óptica para los fibroblastos periodontales control y 1.02 ± 0.31 unidades de densidad óptica para los fibroblastos periodontales irradiados, se observó que entre el promedio del grupo control y el promedio del grupo irradiado no se presentan diferencias significativas (Tabla 2).

Se observó que el tiempo afectó positivamente la tasa de proliferación de los fibroblastos gingivales control e irradiados, encontrándose un incremento en los valores de las lecturas con los días. Los Fibroblastos periodontales irradiados mostraron una gran variabilidad en su respuesta al ser comparados con el grupo control, como se puede observar en la Tabla 3.

Osteoblastos

En los grupos control, tanto el Bajo, como el Medio y Alto, se observa un aumento progresivo de absorbancia a partir del día 1 hasta el final de los días de lectura, es decir, la tendencia fue en aumento a través del tiempo. Para el grupo Experimental o Ensayo la tendencia hasta el día 5 fue a

aumentar, al igual que los grupos control, pero al llegar al último día de lecturas, el día 6, se observa una caída en los valores de absorbancia (Tabla 4).

Al realizar la prueba de Bonferroni se estableció un nivel de significancia de $p < 0,001$ debido al gran número de comparaciones posibles entre los promedios. Se asume que en general las varianzas son homogéneas, pero estas siempre fueron más altas en el grupo experimental que en los controles. El mayor aumento en crecimiento para el control bajo se presentó entre los días 1 y 2. Para los controles medio y alto, este pico de crecimiento se presentó entre los días 5 y 6. En el grupo experimental el cambio máximo en la proliferación estaba ubicado entre los días 2 y 3.

Informe Inmuno histológico para Osteoblastos

Proliferación celular – Anticuerpos anti-proteína:

Se observó bajo microscopia de luz, cuatro (4) placas con varios tipos de coloración y un método validado para tal fin, utilizando un anticuerpo anti-proteínas de la mitosis (tipo Ki-67, Dacko®) el cual garantiza la presencia de las mismas durante todo el proceso mitótico (fases G1, S, G2 y mitosis). A la observación bajo microscopia de luz, de forma cualitativa, se apreció un abundante crecimiento en la monocapa de los osteoblastos con buena morfología celular y la presencia de núcleos o centros celulares de proliferación.

Pre Osteoclastos

Citotoxicidad celular:

La determinación de la citotoxicidad por la técnica de LDH, se realizó con mediciones a las 6 y 24 horas, en el Stat Fax -2100 a una longitud de onda de 492 nm.

Las células irradiadas con láser de baja intensidad mostraban un 0.22% de citotoxicidad a las 6 horas, lo cual indica que de 20000 células sembradas 44 se habían lisado en este periodo de tiempo.

El grupo tritón (Tritón X-100 al 100%) presentó un porcentaje del 6.6%, es decir, 1320 células lisadas a las 6 horas.

A las 24 horas el Láser presentó un 0.543% de citotoxicidad frente a un 48.37% que presentaba el Tritón X-100, esto quiere decir, que a las 24 horas de las 20.000 células que se sembraron un promedio de 108 células se habían lisado, mientras que con la solución de Tritón X-100 se habían lisado 9674 células.

Al comparar los promedios de citotoxicidad, se encontraron diferencias estadísticamente significativas a las 6 Vs 24 hrs ($P < 0.001$) (Tabla 5).

Debido a que se encontró que el láser no tiene ningún efecto citotóxico sobre los pre osteoclastos, se realizaron pruebas de proliferación celular, para evaluar el efecto en la densidad de las células.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo irradiado y el grupo control en los días de prueba. Se observó que ambos grupos presentaron el mismo comportamiento biológico, acorde con el ciclo celular investigado.

Debido a que la muestra se comportó de una forma no paramétrica se aplicó la prueba de Kruskal – Wallis, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los días evaluados ($p < 0.0001$).

La prueba de Mann-Whitney encontró diferencias estadísticamente significativas entre el día 1, 2 y 3 con cada uno de los días evaluados, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los días 4, 5 y 6.

DISCUSIÓN

El presente protocolo de irradiación mostró que los fibroblastos gingivales y periodontales no presentan un aumento en la proliferación estadísticamente significativa al ser comparados con un grupo control (33). Esto difiere de lo encontrado por Almeida López

Tabla 2. Estadística descriptiva para Fibroblastos gingivales y periodontales

Estadísticos	Fibroblastos gingivales		Fibroblastos periodontales	
	Control	Irradiado	Control	Irradiado
Media	1,21	1,29	1,11	1,02
Mediana	1,24	1,3	1,1	0,96
Desviación estándar	0,036	0,057	0,18	0,12
Mínimo	0,72	0,78	0,59	0,43
Máximo	1,67	1,74	1,79	1,91

Tabla 3. Resultados de absorbancia (U.F.O) por grupos y tiempo

Día	Fibroblastos Gingivales		Fibroblastos Periodontales	
	Control	Irradiado	Control	Irradiado
1	0.862	0.912	0.713	0.656
2	0.968	1.037	0.839	0.793
3	1.087	1.162	0.975	0.937
4	1.217	1.297	1.121	0.100
5	1.335	1.426	1.260	1.108
6	1.456	1.553	1.399	1.216
7	1.558	1.650	1.503	1.324

Tabla 4. Resultados de absorbancia por grupos y tiempo en U.F.O

Nivel	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Bajo						
Promedio	0,6296	0,832	0,978	1,153	1,197	1,216
Desviación estándar	0,03825	0,05594	0,0771	0,3752	0,3552	0,2019
Medio						
Promedio	0,648	0,937	1,109	1,213	1,378	1,686
Desviación estándar	0,04665	0,10924	0,1442	0,1633	0,3668	0,6281
Alto						
Promedio	0,67929	1,173	1,38	1,591	1,988	2,534
Desviación estándar	0,05667	0,1725	0,21	0,355	0,5852	0,485
Ensayo						
Promedio	0,593	0,96	1,568	1,837	1,929	1,746
Desviación estándar	0,0809	0,4598	0,7135	0,8157	0,7048	0,644

en el 2001 (22) quien reportó que al irradiar fibroblastos gingivales a 2 J/cm² se obtiene una mayor proliferación al compararlos con un grupo control. Pereira *et al* (23) habían evaluado la síntesis de pro-colágeno

después de irradiar fibroblastos gingivales cultivados, con un láser de Ga-As en variaciones de 3 a 5 J/cm² analizando curvas de crecimiento e inmunoprecipitación de pro-colágeno. Los autores concluyeron que

el láser produce un efecto de proliferación sin efecto en la síntesis de pro-colágeno.

Kreisler en el 2003(24) realizó otro estudio con el objetivo de evaluar el potencial de estimulación de la irradiación con láser de baja intensidad en fibroblastos del ligamento periodontal, encontrando también una proliferación considerablemente mayor en los fibroblastos irradiados que en el grupo control, determinada por medio de la actividad de fluorescencia mediante un indicador de oxidación-reducción (REDOX).

Las diferencias en relación a estos resultados pueden deberse a las diferentes potencias de los equipos y protocolos de irradiación.

Al reproducir el protocolo de irradiación en Osteoblastos humanos normales, se encontró con la aplicación de éste protocolo, un aumento en la proliferación estadísticamente significativa al comparar el grupo irradiado con los controles (34).

El resultado difiere de lo publicado por Coombe y Darendeliler (23), quienes investigando los efectos de la irradiación con láser en una línea de células Osteoblásticas de Osteosarcoma, encontraron que la activación o proliferación celular no era significativamente afectada con la aplicación de diferentes niveles de energía, pero observaron un incremento en la concentración de calcio intracelular y concluyeron que estos efectos deben ser estudiados más a fondo antes de considerar que la terapia láser es un acelerador potencial del movimiento de ortodoncia.

Hasta el 2012 no se habían publicado estudios experimentales in-vitro que evaluaran los efectos bioestimuladores de la irradiación con laser de baja intensidad sobre pre osteoclastos humanos que permitan ser comparados con lo encontrado por la aplicación del protocolo aquí descrito(35), y correlacionando sus resultados con los estudios previos en osteoblastos, se puede considerar que la estimulación osteoclástica se origina por la interacción celular

Horas	Láser	Triton
6	0,22	6,6
24	0,543	48,37

osteoblastos-osteoclastos más que por el aumento de la actividad celular de los pre Osteoclastos, por lo tanto, la irradiación con láser de baja intensidad beneficia el proceso de remodelado óseo durante el movimiento dental ortodóncico.

Encontramos que en un mismo protocolo de irradiación, estandarizado en longitud de onda, nivel de energía, intensidad, y tipo de exposición se puede estar proliferando una línea celular sin necesariamente tener igual efecto en otra. Esto es similar a lo que hacemos clínicamente; no podemos independizar las irradiaciones para cada célula, solo podemos exponer áreas limitadas de tejido que, en el caso de laserterapia en ortodoncia, incluye encía, hueso alveolar, ligamento y superficie radicular.

CONCLUSIONES

Las pruebas de citotoxicidad demostraron que este protocolo de irradiación es seguro para los cuatro grupos de cultivos celulares. En fibroblastos gingivales o periodontales no se encontraron diferencias estadísticamente significativa en la proliferación de los grupos control e irradiados. Los cultivos de células Osteoblásticas humanas normales (NHOst) son sensibles a la irradiación con laser de baja intensidad Photon LASE (As-Ga-Al) en estadios tempranos de cultivo, presentando aumento significativo de la proliferación celular a partir del primer día. La irradiación con láser de baja intensidad no tiene efecto citotóxico ni afecta la densidad celular de Pre-osteoclastos humanos normales *In vitro*.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio es una recopilación de 3 estudios ya publicados, realizados en el postgrado de ortodoncia, que permitirán a la

Escuela de Odontología de la Universidad del Valle conservar la estandarización de un protocolo de irradiación para cultivos celulares.

Los autores agradecen al Doctor Efraín Solarte R. del Grupo de Óptica Cuántica del Departamento de Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad del Valle, a la Vicerrectoría de investigaciones de Universidad del Valle y al laboratorio de Cultivos Celulares de la Asociación In-Vitro.

A la doctora Angie Clarckson y el doctor Rodrigo López, Ortodoncistas de la Universidad del Valle por su trabajo en Fibroblastos humanos gingivales y periodontales.

A las doctoras Mónica Morales y Paola Castro, Ortodoncistas de la Universidad del Valle, por su trabajo en Osteoblastos humanos.

A la doctora Ginna Bayona y el Doctor Alejandro Casas, Ortodoncistas de la Universidad del valle, por su trabajo en pre osteoclastos humanos.

Al doctor Luis Rogelio Hernández Máster en ciencias de la Universidad de Southampton por el análisis estadístico de los 3 estudios.

REFERENCIAS

1. Roberts WE, Goodwin WC Jr, Heiner SR. Cellular response to orthodontic force. Dent Clin North Am 1981; 25(1):3-17.
2. Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. Eur J Orthod 2006; 28:221-40.
3. Vinod Krishnan, Ze'ev Davidovitch. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force American

- Journal of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics 2006; 129(4):469.
4. Masella RS, Meister M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006; 129(4):458-68.
 5. Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1997; 111:525-32.
 6. Kawasaki K, Shimizu N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers Surg Med* 2000; 26:282-91.
 7. King GJ, Keeling SD, Wronski TJ. Histomorphometric study of alveolar bone turnover in orthodontic tooth movement. *Bone* 1991; 12:401-9.
 8. King GJ, Latta L, Rutenberg J, Ossi A, Keeling SD. Alveolar bone turnover and tooth movement in male rats after removal of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1997; 111(3):266-75.
 9. Habib FA, Gama SK, Ramalho LM, Cangussú MC, Santos Neto FP, Lacerda JA, Araújo TM, Pinheiro AL. Laser-induced alveolar bone changes during orthodontic movement: a histological study on rodents. *Photomed Laser Surg* 2010; 28(6):823-30.
 10. Yamaguchi M, Hayashi M, Fujita S, Yoshida T, Utsunomiya T, Yamamoto H, et al. Low-energy laser irradiation facilitates the velocity of tooth movement and the expressions of matrix metalloproteinase-9, cathepsin K, and alpha (v) beta (3) integrin in rats. *The European Journal of Orthodontics. Eur J Orthod* 2010; 32(2):131-9.
 11. Abello M, Valbuena D. Efecto del láser blando (ir) en la velocidad de alineación del tratamiento ortodóncico. Tesis de postgrado Fundación C.I.E.O Bogotá, Colombia 1996.
 12. Cruz DR, Kohara EK, Ribeiro MS, Wetter NU. Effects of low-intensity laser therapy on the orthodontic movement velocity of human teeth: a preliminary study. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2004; 35:117-120
 13. Limpanichkul W, Godfrey K, Srisuk N, Rattanayatikul C. Effects of low-level laser therapy on the rate of orthodontic tooth movement. *Orthodontics and Craniofacial Research*. 2006; 9(1):38-43.
 14. Youssef M, Ashkar S, Hamade E, Gutknecht N, Lampert F, Mir M. The effect of low-level laser therapy during orthodontic movement: a preliminary study. *Lasers Med Sci* 2008; 23(1):27-33
 15. Dominguez A and Velasquez S. Acceleration effect of orthodontic movement by application of low-intensity laser. *J Oral Laser Applications* 2010 (10): 99-105.
 16. Sousa MV, Scanavini MA, Sannomiya EK, Velasco LG, Angelieri F. Influence of low-level laser on the speed of orthodontic movement. *Photomed Laser Surg*. 2011; 29(3):191-6.
 17. Lim HM, Lew KK, Tay DK. A clinical investigation of the low level laser therapy in reducing orthodontic postadjustment pain. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 1995; 108:614-622.
 18. Harazaki M, Takahashi H, Ito A, Isshiki Y. Soft laser irradiation induced pain reduction in orthodontic treatment. *Bull Tokyo Dent Coll*. 1998; 39:95-101.
 19. Tortamano A, Lenzi D, Haddad A, Bottino M, Dominguez G, Vigorito J. Low-level laser therapy for pain caused by placement of the first orthodontic archwire: A randomized clinical trial. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 2009; 136(5):662-7.
 20. Xiaoting L, Yin T, Yangxi C. Interventions for pain during fixed orthodontic appliance therapy. A systematic review. *Angle Orthod* 2010; 80(5):925-32.
 21. Domínguez A, Velásquez SA. Effect of Low-Level Laser Therapy on Pain Following Activation of Orthodontic Final Archwires: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Photomedicine and Laser Surgery*. January 2013; 31(1):36-40.
 22. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med*. 2001; 29(2):179-84.
 23. Pereira AN. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2002; 31(4):263-7.
 24. Kreisler M. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol*. 2003; 30(4):353-8.
 25. Choi EJ, Yim JY, Koo KT, Seol YJ, Lee YM, Ku Y, Rhyu IC, Chung CP, Kim TI. Biological effects of a semiconductor diode laser on human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Implant Sci*. 2010; 40(3):105-10.
 26. Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ural AU. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2008; 23(2):211-5.
 27. Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone* 1998; 22:347-354.
 28. Coombe AR, Darendeliler N. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthod Res*. 2001; 4:3-14.
 29. Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM. Irradiation at 780nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med* 2006; 38:332-336.
 30. Soleimani M, Abbasnia E, Fathi M, Sahraei H, Fathi Y, Kaka G. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts an in vitro study. *Lasers Med Sci* 2012; 27(2):423-30.
 31. Aihara N, Yamaguchi M, Kasai K. Low-energy irradiation stimulates formation of osteoclast-like cells via RANK expression in Vitro. *Lasers Med Sci* 2006; 21(1): 24-33.
 32. Timberlake GT. An inexpensive, automated instrument for laser irradiation of cultured cells. *Photomed Laser Surg* 2004; 22(3):233-9.
 33. Domínguez A, Clarkson A and López R. An in vitro study of the reaction of

- periodontal and gingival fibroblasts to low-level laser irradiation: A pilot study. *J Oral Laser Applications* 2008; 8:235-244.
34. Domínguez A, Castro P, Morales M. An In Vitro Study of the Reaction of Human Osteoblasts to Low-level Laser Irradiation. *Journal of Oral Laser Applications* 2009; 9(1):21-28
 35. Domínguez A, Bayona G, and Casas A. In vitro response of Human Pre-osteoclasts to low intensity Laser irradiation. *Journal of research in Biology* 2012; 2 (8):1-9.