

DEPARTAMENTO DE ENFERMERÍA.
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD.



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO BIOESTIMULANTE
DEL LÁSER DE DIODO DE 940 nm SOBRE EL TEJIDO:
EL OSTEOLASTO.

ROSA MEDINA HUERTAS
Universidad de Granada, 2015

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Rosa María Medina Huertas
ISBN: 978-84-9125-871-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/43690>

ÍNDICE

MARCO TEÓRICO	2
1.- Láser	3
1.1 Historia del láser.	3
1.2 Principios básicos.	5
1.3 Modo de emisión.	8
1.4 Tipos de láser.	9
1.5 Efecto del láser sobre los tejidos.	11
1.6 Bioestimulación.	15
2.- Tejido óseo: El osteoblasto.	18
2.1 Células del tejido óseo.	18
2.2 Matriz ósea.	20
2.3 Organización ósea macroscópica.	20
2.4 Formación y crecimiento del hueso.	21
2.5 Modelado y remodelado óseo.	21
2.6 Reparación del tejido óseo.	23
3.- Osteoblasto	24
3.1 Diferenciación.	24
3.2 Identificación.	25
3.3 Funciones del osteoblasto.	28
4.- Utilidad clínica del láser.	31
5.- Referencias bibliográficas	33
JUSTIFICACIÓN	48
HIPÓTESIS	50
OBJETIVOS	52
CONCLUSIONES	75

MARCO TEÓRICO

1. LÁSER

1.1. HISTORIA DEL LÁSER

La utilización de la luz como instrumento médico data de las más antiguas civilizaciones, se usaba tanto como elemento diagnóstico, como elemento terapéutico. Los griegos practicaban la helioterapia, los romanos recomendaban tomar baños de sol a diario y en la Europa medieval los médicos de la época practicaban la fototerapia con luz solar y artificial para tratar el raquitismo, la psoriasis y los eccemas cutáneos, entre otras afecciones. Estos antecedentes junto con los avances científicos ha hecho posible la invención y utilización de los láseres en muchos ámbitos de la vida cotidiana¹.

Son muchas las teorías desarrolladas sobre la naturaleza de la luz, Epicúreo ya desarrolló su teoría atomista del universo en el 270 a. C., pero no sería hasta 1900 con el planteamiento de la teoría cuántica cuando se empezó a vislumbrar el comportamiento y la composición de la luz².

Esta teoría fue desarrollada por el físico alemán Max Planck, en ella describía que la luz estaba formada por paquetes indivisibles de energía radiante a los que denominó *cuantos*. Más tarde, Rutherford contribuyó al desarrollo de esta teoría al postular un modelo atómico basado en la teoría de Planck, según el cual el átomo estaba formado por una carga central y otras que orbitan alrededor de la primera dentro de una esfera³.

Posteriormente en 1913, Bohr sintetizó ambas teorías y describió el átomo y los electrones tal y como los conocemos ahora. Bohr también describió la teoría del movimiento de los electrones dentro del átomo, de tal manera que debían ganar energía para moverse a orbitales superiores y perderla para moverse a niveles energéticos más bajos. Esto se traduce en que un electrón puede desplazarse a través de los orbitales del átomo absorbiendo o emitiendo energía radiante o luz⁴.

Aunque no será hasta 1915 cuando Einstein hable por primera vez de la emisión estimulada o inducida de la luz, procesos fundamentales relacionados con la luz y la materia:

1. *Absorción estimulada*: proceso por el que un átomo puede ser excitado hasta un estado superior de energía mediante, calentamiento, interacción lumínica o interacción de partículas.
2. *Emisión espontánea*: proceso por el que un átomo excitado, decae a un nivel energético inferior de manera espontánea.

3. *Emisión estimulada*: al aplicar una radiación externa de la misma frecuencia sobre un átomo, éste realiza una transición a un orbital inferior, lo que se traduce en una liberación de energía lumínica idéntica a la entrante.

Esta última situación, se produce cuando existen más átomos excitados (en niveles energéticos superiores) que no excitados (en orbitales inferiores) y se le conoce con el nombre de ***inversión de la población***.

Será a partir de estas teorías de donde surja la física cuántica, que aportará numerosos avances en todos los ámbitos de la vida desde el militar al sanitario.

Las teorías de estos tres científicos fueron estudiadas ampliamente, aunque no tuvieron una experimentación práctica hasta que comenzó la Segunda Guerra Mundial. En esta época, por motivos bélicos se desarrolló un especial interés por crear dispositivos que fuesen capaces de ampliar las microondas por medio de emisión de radiaciones, para poder crear así radares más potentes y lo suficientemente pequeños como para poder instalarlos en una aeronave.

Como resultado de estas investigaciones nació el primer **MASER** acrónimo de *Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (amplificación de las microondas por medio de la emisión estimulada de radiaciones) creado por C. Townes y Weber^{5,6} es el antecesor del **LASER**.

Este primer MASER estaba formado por moléculas de amonio que eran estimuladas para conseguir que se produjesen ondas electromagnéticas. Posteriormente se desarrolla la técnica del *bombeo óptico*, proceso en el que la luz se utiliza para pasar electrones de un nivel energético más bajo a otro más alto, lo que hizo posible que Townes y Shawlow ampliaran los principios del MASER a la región infrarroja y visible del espectro electromagnético, de esta manera se crearon los primeros MASERES en estado sólido⁵, compuestos por rubí para Bells Lab, con el objetivo de ampliar la capacidad de transmisión de la red de comunicaciones de Bell.

En 1957, Gould aplica el bombeo óptico para excitar la emisión de luz y escribe un borrador titulado "*Algunos cálculos aproximados sobre la viabilidad de un LASER: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (amplificación de la luz por emisión estimulada de radiación)*"⁷.

Los primeros láseres se desarrollaron en el ámbito armamentístico, aunque a partir de 1960 Maiman inicia el desarrollo de láseres destinados a ámbitos civiles, identificando cinco posibles utilidades del láser⁸:

1. Amplificación de la luz.
2. Herramienta para investigar la materia en la investigación básica.
3. Haz de alta potencia para las comunicaciones espaciales.
4. Amplificador del número de canales de comunicación disponibles.
5. Concentrador de luz para la industria, la química y la medicina.

Sobre esta última utilización ya se estaba trabajando, en 1963 ya se estaban realizando estudios para la utilización del láser en el campo odontológico; los primeros en usarse fueron los de rubí, aunque no con muy buenos resultados por su alto efecto térmico.

En los años posteriores se desarrollaron diferentes láseres con fines médicos, en 1964 se fabricó el primer láser de CO₂, en 1974 se comenzó a utilizar láser YAG, sobre todo el Nd:YAG. Hasta que a finales de los 80 se produjo el mayor avance en el campo del LASER con la creación del Er:YAG⁹.

En el campo de la odontología, el primer láser desarrollado exclusivamente para cirugía dental fue creado por los hermanos Myers, que idearon un dispositivo fácil y seguro de usar, portátil, con un sistema de enfriamiento interno, con componentes que se pudieran esterilizar en autoclaves y con un sistema de aplicación de fibra óptica flexible para facilitar el acceso intraoral y la retroalimentación táctil necesaria para los profesionales dentales^{10,11}.

Actualmente en este campo se utilizan diferentes longitudes de onda incluyendo CO₂, Nd:YAG, argón, varias longitudes de onda de diodo y dos longitudes de Er:YAG.

1.2. PRINCIPIOS BÁSICOS

Láser es el acrónimo de ***Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*** y hace referencia a cualquier dispositivo capaz de producir o amplificar la radiación electromagnética (en el caso del láser, ***luz***) en un rango de longitud de onda comprendido entre los 180 nm y 1mm, a través de un proceso de emisión controlado y estimulado de dicha radiación¹².

Para comprender el correcto funcionamiento de un dispositivo láser es necesario explicar los términos a los que se refiere la definición anterior.

A . RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA, LUZ VISIBLE Y LÁSER:

La radiación electromagnética está formada por la combinación de campos eléctricos y magnéticos, perpendiculares entre sí, que se propagan por el espacio en forma de ondas portadoras de energía.

Su unidad básica es el *fotón*. Éste se define como “El cuanto de energía electromagnética, considerado como una partícula diferenciada que tiene una masa cero, sin carga eléctrica y un tiempo de vida indefinidamente largo”¹³. Los fotones se encuentran agrupados formando ondas que viajan en el vacío a una velocidad constante, que en este caso es la velocidad de la luz.

Hay una serie de propiedades físicas que caracterizan este tipo de ondas electromagnéticas¹⁴:

- **Amplitud:** altura vertical de la onda desde el eje cero alrededor del que se mueve hasta su pico máximo de altitud. La amplitud está relacionada con la intensidad de la radiación (brillo). A mayor amplitud, mayor es la cantidad de trabajo potencial que se podría llevar a cabo. Para una onda de sonido, la amplitud guarda relación con el *volumen*. Para una onda que emite luz (láser) la amplitud guarda relación con el brillo o intensidad y su unidad de medida es el Julio (J).
- **Longitud de onda (λ):** es la característica más importante ya que influirá en la interacción del láser con el tejido y se refiere a la distancia horizontal entre dos puntos de la onda. Se mide en metros, o en nuestro caso en nanómetros (nm).
- **Frecuencia:** nos indica el número de pulsos de energía emitidos por segundo. Se mide en hercios (Hz) y es igual a una oscilación por segundo, entendiendo por oscilación la rotación que hace la onda electromagnética alrededor del eje por el que se mueve. La frecuencia es inversamente proporcional a la longitud de onda, por lo que cuanto mayor es la longitud de onda, menor es la frecuencia y viceversa.

El comportamiento de la radiación electromagnética depende de su longitud de onda. El *espectro electromagnético* es toda la colección de ondas de energía, que comprende desde los rayos gamma (λ 10 a 10^{-12} m) hasta las ondas largas de radio (10 Km) pasando por los Rx, ultravioleta extremo y cercano, luz visible, infrarrojos cercanos, medios y lejanos, microondas, alta frecuencia, onda corta y media de radio.

La luz visible es, por tanto, un tipo radiación electromagnética cuya longitud de onda se encuentra comprendida entre los 380 y los 780 nm. Los dispositivos láser que se utilizan en odontología, emiten en el espectro comprendido entre la luz visible y el infrarrojo. Como características básicas que diferencian la luz láser de la luz visible, encontramos¹⁵:

- **Monocromatismo:** a diferencia de la luz ordinaria que es policromática, la luz láser es monocromática, es decir, genera un haz de un solo color que será visible o invisible dependiendo de la franja del espectro electromagnético en la que emita la longitud de onda del dispositivo láser (en el caso de los láseres odontológicos, franja infrarroja o visible).
- **Coherencia:** un haz de luz es coherente cuando todas las ondas que lo componen son idénticas, tanto en amplitud, frecuencia y sincronización.
- **Unidireccionalidad o coherencia espacial:** hace referencia a que la divergencia de del haz láser es baja.
- **Alta brillantez o intensidad:** es posible gracias a las características anteriores, y es la que permite el uso terapéutico de los láseres, ya que la intensidad hace referencia a la posibilidad de focalizar la radiación en un punto, aumentando así la energía en dicho punto.
- **Polarización:** los fotones emitidos oscilan en el mismo plano y dirección, es decir son paralelos. Esta característica, desaparece cuando el láser interacciona con los tejidos.

B . AMPLIFICACIÓN:

El fenómeno de la amplificación, se da dentro de la cavidad del láser gracias a sus tres componentes¹⁶:

- **Medio activo:** da el nombre al láser y genera fotones, puede ser:
 - Gaseoso: como en el caso de los láseres de CO₂.
 - Sólido: formado por cristales de itrio, aluminio o granate (YAG).
 - Semiconductor: láseres de diodo.
 - Líquido.
- **Mecanismo de bombeo:** es la fuente de excitación del medio activo, puede presentarse en forma de circuito eléctrico, bobina eléctrica o cualquier mecanismo capaz de impulsar energía dentro de dicho medio, mediante una reacción físico-química.

Cuando esto ocurre, la energía es absorbida por los electrones que se encuentran en los orbitales externos de los átomos del medio activo. Estos electrones cargados de energía, saltarán a un orbital superior más alejado del núcleo del átomo y con un nivel de energía mayor, produciéndose lo que se conoce como **“inversión de la población”** es decir, que hay más electrones excitados que en reposo. En este punto, si se aplica una radiación externa sobre el átomo, tal y como explicaba Einstein, se producirá una **emisión estimulada de energía** en forma de fotón, como consecuencia de la vuelta del electrón a su orbital de reposo. La energía liberada será igual que la que absorbió el electrón al pasar a su estado excitado.

- Resonador óptico: lo forman el medio activo y dos espejos que se sitúan en los extremos de la cavidad del láser que ayudan a colimar y amplificar el haz láser. Una de estas superficies es totalmente reflectante y la otra es parcialmente transmisora, para permitir que el haz láser pueda ser transmitido.

Hay otros dos componentes externos a la cavidad del láser, que ayudan a la amplificación y posterior transmisión del haz láser:

- Sistema de enfriamiento para dispersar el calor que se genere durante el proceso de la amplificación y la emisión.
- Pieza de mano: su objetivo es vehicular la luz láser, hay dos mecanismos para hacerlo:
 - Brazos articulados: formados por unos tubos intercalados por espejos colocados a 45° que van reflejando la luz para conducirla desde la fuente al tip de salida (fibra de vidrio que ponemos en contacto con los tejidos).
 - Fibras ópticas: serán el mecanismo elegido siempre que el láser emita por debajo de los 2000 nm y tienen un calibre variable dependiendo de las necesidades de utilización que se tengan.

1.3. MODO DE EMISIÓN

La emisión de energía láser por los diferentes dispositivos, se puede llevar a cabo en diferentes formas, con diferentes parámetros y con varias modalidades de uso de la pieza de mano en función del efecto que queramos alcanzar.

Los parámetros que se pueden modificar para cada tratamiento son:

- Energía: potencia propia del láser, se expresa en watios (W).
- Energía aplicada: se expresa en julios (J) y hacer referencia a la potencia (W) multiplicada por el tiempo de exposición, medido en segundos.
- Densidad de potencia: potencia dividida por el área de aplicación (cm²).
- Densidad de energía (**fluencia**): es la medida más usada, se refiere a la energía aplicada (J) dividida por el área de aplicación (cm²) y es la que establece los parámetros de utilización del láser en su relación con los tejidos biológicos.

Las formas en las que podemos emitir dicha energía son^{9,17-19}:

1. Modo continuo: se emite energía de manera continua mientras el láser esté activo, lo que puede provocar una elevación de la temperatura en el tejido irradiado.
2. Modo alterno: se produce luz alterna mediante la apertura y cierre de un obturador mecánico controlado por un software. Este obturador, modula la emisión durante el tiempo que se necesite, según el tratamiento que se vaya a realizar.
3. Modo pulsado: un sistema electrónico hace posible que se emita el haz láser de alta potencia, durante un tiempo determinado evitando que se eleve la temperatura de manera inadecuada.

Con respecto al spot o punto focal donde se deposita la energía, hay dos posibilidades²⁰:

1. Enfocado: la distancia entre láser y tejido es pequeña, el spot es más pequeño y se disipa menos energía. Este tipo de emisión es la adecuada cuando se quieren realizar tratamientos quirúrgicos con el haz láser.
2. Desenfocado: la distancia entre láser y tejido es amplia, el spot es más grande y en consecuencia se tiene un área de trabajo mayor, pero con una densidad de energía más pequeña, ideal si se quiere conseguir hemostasia o fenómenos bioestimuladores en la zona.

1.4. TIPOS DE LÁSER

Los láseres pueden clasificarse de distintas maneras. La clasificación puede hacer referencia al medio activo, al modo de emisión o a la longitud de onda entre otros criterios. Pero la clasificación más extendida es la establecida en función de la potencia, de tal modo que podemos dividir los láseres en¹².

A. Láseres de baja potencia, terapéuticos o blandos: son aquellos que emiten en la región del espectro rojo o del infrarrojo cercano, tienen una potencia media de salida que va desde 50mW a 1W. Se caracterizan porque no producen efectos térmicos en los tejidos irradiados ya que la potencia de utilización es baja y el área sobre la que se actúa suele ser amplia, por lo que el calor tiende a dispersarse, esto se traduce en que son láseres poco o nada adecuados para efectuar tratamientos quirúrgicos, pero muy eficientes como bioestimuladores celulares²¹. Los más comunes son:

- AsGa: arseniuro de galio.
- AsGaAl: arseniuro de galio y aluminio.
- HeNe: helio-neón.

También se pueden usar como láseres de baja potencia los láseres de diodo, estos láseres de alta potencia, producen efectos terapéuticos siempre que se utilicen con una potencia de salida inferior a 1W y con la pieza de mano usada para la realización del blanqueamiento dental, para que el haz láser se disperse²¹.

B. Láseres de alta potencia, quirúrgicos o duros: se utilizan como alternativa al bisturí frío o al instrumental rotatorio convencional (turbinas y micromotores). Producen efectos físicos visibles y su acción depende en gran medida del efecto fototérmico que provocan. En el campo de la odontología se utilizan en terapéutica dental, en la realización de cirugías preprotésicas y sobre todo en cirugía oral tanto de tejidos blandos como de tejidos duros. Los láseres de alta potencia más utilizados son^{12,17,22-27}:

- Argón.
- Nd:YAG/ Nd:YAP.
- Ho:YAG.
- Er:YAG.
- ErCr:YSGG
- Co₂.
- Diodo.

1.5. EFECTOS DEL LÁSER SOBRE LOS TEJIDOS

Según sean las propiedades ópticas del tejido diana, la energía aplicada, la superficie a tratar y el tiempo de exposición, el haz láser podrá interactuar con dicho tejido de maneras diferentes:

1) Atendiendo a las propiedades ópticas de los tejidos:

Estas propiedades son las que van a establecer la respuesta del tejido a la irradiación, además provocarán que se desarrollen fenómenos fisiológicos dentro del mismo por la captación y transformación de energía en su interior^{28,29}.

La interacción del láser y el tejido, viene determinada principalmente por dos parámetros: la longitud de onda del dispositivo láser y las características propias del tejido diana. Además, hay otros factores influyentes que dependen del operador, que son: el nivel de potencia aplicada, la energía total dada al área a tratar, el tiempo de exposición y la forma de emisión. El conocimiento y control de todas estas variables hará posible el correcto uso del láser, permitiendo que se dé el efecto deseado sobre los tejidos que se van a irradiar^{16,30,31}.

Una vez tenidas en cuenta todas las variables anteriores, la relación que se puede establecer entre el láser y el tejido puede manifestarse de cuatro formas concretas que pueden darse de manera aislada o combinada dentro del tejido^{32,33}:

- a. **Reflexión:** el haz entra en contacto con la superficie del tejido y una parte de la energía se refleja sin producir ningún efecto en él. Esto se produce cuando la superficie sobre la que incide el haz láser no presenta ninguna irregularidad, es lo que se llama una imagen especular. En el caso de los tejidos, como sus superficies son irregulares, la reflexión no es total. Este modo de interacción es importante sobre todo desde el punto de vista de la seguridad a la hora de manejar el láser, ya que esa radiación que se dispersa puede incidir sobre otros tejidos que no queramos tratar del paciente o del propio operador³⁴.
- b. **Transmisión:** la energía atraviesa el tejido sin provocar ningún efecto, como si el tejido fuese transparente. Esta interacción está relacionada con la longitud de onda del láser que empleemos.

- c. **Dispersión o scattering:** cuando el haz láser entra en contacto con el tejido, éste deja de ser coherente y los fotones cambian su dirección, provocando una mayor absorción de energía de los tejidos adyacentes respecto al tejido diana, y por tanto un menor efecto en la zona deseada.
- d. **Absorción:** es el efecto que se pretende conseguir y consiste en que la energía sea absorbida en su mayor parte por el tejido diana.

Cuando el haz láser es absorbido por dicho tejido, la intensidad del rayo comienza a disminuir a la vez que se empieza a generar calor, por medio de la vibración de los fotones que forman la onda electromagnética. La capacidad de absorción de una determinada longitud de onda se denomina absorbancia y va a depender de varios factores inherentes al tejido a irradiar como son³⁵:

- I. Constitución molecular.
- II. Espesor de la superficie a irradiar.
- III. Temperatura.
- IV. Presencia de cromóforos en la superficie o en el interior del tejido diana. Estos cromóforos, son distintas moléculas presentes en los tejidos, como por ejemplo la melanina, la hemoglobina, la hidroxapatita, el agua, entre otras, o colorantes exógenos que se inoculan en el tejido. Todos ellos son específicos para cada longitud de onda que captan y absorben la energía emitida por el láser³⁶.

2) Atendiendo al modo de aplicación de la luz láser:

La luz láser se puede aplicar fundamentalmente de dos maneras^{20,33}:

- 1. En contacto pieza de mano y tejido: en este caso el terminal roza el tejido sobre el que se quiere actuar.
- 2. No contacto: la pieza de mano se pone a distancia del tejido.

La elección de una u otra manera, va a influir en el modo en que interacciona láser y tejido, ya que se puede variar la distancia focal de la luz, de tal manera que cuanto más distancia haya entre el tip y el tejido, más se desenfocará el haz. Esto quiere decir, que con la misma cantidad de energía, aplicando la pieza de mano sin contacto, se afecta a una superficie mayor, lo que supone una menor penetración del rayo y una acción más superficial que la que se obtendría con el haz láser focalizado (en contacto)^{20,33,37}.

Una vez que la energía ha sido absorbida por el tejido, los efectos que se pueden producir son variables, siendo los principales³⁸.

- Efecto fototérmico.

El efecto fototérmico se origina cuando la energía radiante es transformada en calor, provocando un aumento local de la temperatura en la zona radiada³⁸. Este efecto es el más frecuente, sobre todo si se usan láseres de alta potencia y dependerá de factores como: la longitud de onda, los parámetros que se usen durante el tratamiento, la duración y frecuencia del pulso si es que se está emitiendo en modo pulsado y las propiedades del tejido: como la cantidad de agua que contenga, la vascularización, o la profundidad de la zona a irradiar^{14,15,39,40}.

Los efectos derivados de la acción del calor en el tejido se producen de manera instantánea, provocados por una serie de acontecimientos termodinámicos que se inician con la absorción de la energía fotónica. Una vez que esto sucede, las estructuras tisulares sufren una excitación electrónica o molecular que provoca la conversión de la energía absorbida en calor. A continuación, las estructuras adyacentes al área radiada comienzan un proceso de dispersión y conducción del calor, para evitar que se aumente demasiado la temperatura en la zona a tratar y se lesionen zonas cercanas que no requieren tratamiento^{20,29,41}.

Los factores que influyen en que haya una mayor o menor dispersión del calor, y por lo tanto, un mayor o menor daño tisular son tres principalmente^{33,42}:

1. Forma de emisión: el modo continuo puede resultar más lesivo que el modo pulsado, ya que este último entre pulso y pulso (ciclo de trabajo) permite que se produzca una dispersión de calor que hace que la temperatura se mantenga baja en la zona de tratamiento.
2. Composición del tejido diana: los tejidos con un alto contenido en agua y bien vascularizados, son menos susceptibles de sufrir daños térmicos.
3. Tiempo de exposición: a más tiempo de exposición, más posibilidades hay de lesionar los tejidos.

Dependiendo de la temperatura alcanzada tendrán lugar diferentes efectos histológicos que van desde la hipertermia, cuando la temperatura del tejido aumenta a 50°, hasta la carbonización, cuando se alcanzan los 200°. Algunos de estos efectos son¹²:

- 45°: vasodilatación, daño epitelial, muerte celular e hipertemia transitoria.
- 50°: cese de la actividad enzimática.
- 60°: desnaturalización de las proteínas, coagulación sanguínea y pérdida de integridad de las membranas.
- 70°: desnaturalización del colágeno y permeabilidad de las membranas.
- 80°: contracción de las fibras colágenas y necrosis.
- 100°: deshidratación del tejido por evaporación de todo el contenido acuoso y pérdida de coloración del tejido.
- >100°: volatilización de los componentes orgánicos produciéndose una rápida ablación del tejido.
- 100°-200°: carbonización.
- 200°-300°: combustión.

Como consecuencia de la degradación del haz láser a medida que se absorbe en el tejido y de la dispersión gaussiana de la energía, no sólo se pueden producir daños en el área central donde se esté depositando la energía, sino que también habrá daños en las zonas adyacentes, que se irán haciendo más leves conforme nos alejemos de la zona diana.

Las interacciones fototérmicas más usuales en el campo médico son: incisión/escisión, ablación/vaporización y hemostasia/coagulación. La producción de una u otra dependerá de la regulación de los distintos parámetros del láser³⁹.

- Efecto fotoquímico.

El proceso fotoquímico se desarrolla por la absorción de la energía radiante por un cromóforo, dando como resultado que se desencadenen reacciones de tipo bioquímico y celular en el tejido. El cromóforo puede ser endógeno o exógeno (aportado por el operador^{15,36,38}).

Este efecto se produce con una baja densidad de potencia y una exposición prolongada al láser. Hay tres fenómenos asociados a este efecto⁴³⁻⁴⁷:

1. Bioestimulación/fotobioestimulación: es un efecto no quirúrgico cuyo objetivo o finalidad es el restablecimiento de la salud del tejido diana sobre el que aplicamos el láser, se genera con muy bajos niveles de energía y actúa estimulando determinadas moléculas presentes en las células y/o tejidos. En este caso se prefiere la utilización de los Low Level Laser (LLL).

2. Terapia fotodinámica: se inyecta un cromóforo concreto en el interior del tejido diana que actuará como catalizador de la energía que provocará distintas reacciones tisulares
3. Fluorescencia: este tipo de fenómeno se produce cuando al incidir el haz láser sobre las moléculas o los componentes del tejido (cromóforos), éstos liberan momentáneamente una pequeña cantidad de energía en forma de luz. A este proceso se le denomina composición fotoquímica y es muy utilizado como herramienta diagnóstica.

- Efecto fotoacústico:

Se puede definir como un efecto fotomecánico o incluso fotodestructor, se produce cuando pulsaciones muy breves del láser provocan numerosas ondas acústicas dentro del tejido que elevan la presión y en última instancia producen compresiones y tensiones que llevan a la disgregación y destrucción de dicho tejido^{15,16}.

- Efecto fotoeléctrico:

El efecto fotoeléctrico es imperceptible por el operador y se produce por medio de un intercambio iónico entre la pieza de mano y la superficie irradiada, no posee importancia desde el punto de vista clínico^{15,16}.

1.6. BIOESTIMULACIÓN

Se define como la acción que promueve, acelera o hace posible procesos bioquímicos y celulares que tienen como fin restablecer la salud del órgano que estamos tratando. Cuando este proceso lo realizamos ayudándonos de un láser, hablamos de fotobioestimulación, definida por la NAALT (North American Association for Laser Therapy) como: “tratamiento de los tejidos por medio de moléculas específicas (fotoaceptores cromóforos) que interactúan con unas longitudes de onda determinadas desencadenando los eventos necesarios para que se produzca el fenómeno bioestimulante”(North American Associatio Photobiomodulation Therapy [homepage on the internet]. [Update 2015 sept 18]. Available from: <http://www.naalt.org>)⁴⁸.

A. Mecanismos de acción:

La fotobioestimulación, es un efecto fotoquímico no quirúrgico y no térmico (la temperatura en este tipo de terapia no debe elevarse más de 1°), que se produce por la generación de reacciones químicas y biológicas a nivel celular, que van encaminadas a conseguir una mayor disponibilidad de energía⁴⁹⁻⁵².

Esta mayor disposición de energía se consigue con un aumento del ATP generado durante el proceso de respiración celular, proceso catabólico que tiene como resultado la producción de moléculas de ATP y de agua.

Este proceso se desarrolla en varias fases, siendo en la fosforilación oxidativa donde la acción de la luz láser va a intervenir, cuando es captada por la NADP-oxidasa y por el citocromo c, favoreciendo que aumente la transferencia de electrones y en consecuencia una mayor síntesis de ATP que facilitará la reparación y regeneración de la célula⁵³⁻⁵⁷.

El citocromo-c es activado de manera específica por los láseres de diodo, ya que contiene un grupo ferroprotoporfínico similar al de la hemoglobina; la cual se comporta como un cromóforo ideal para las longitudes de onda de este tipo de dispositivo⁵⁸⁻⁶¹.

El otro proceso en el que la fotobioestimulación se hace patente es en la fase de proliferación celular acontecida en los mecanismos de regeneración celular tras una lesión en el tejido, debido a un aumento de la producción de los factores de crecimiento como *fibroblast growth factor (FGF)* y *vascular endothelial growth factor-A*, factor de crecimiento relacionado con la angiogénesis^{62,63}.

En relación con la fotobioestimulación del tejido óseo, hay estudios que muestran que la irradiación con láseres de baja potencia se presenta como coadyuvante en la aceleración de la regeneración ósea^{49,64-70}.

B. Parámetros clínicos de la fotobioestimulación

Al igual que para cualquier otra aplicación, hay una serie de parámetros que van a influir en la acción fotobioestimuladora del láser, estos parámetros pueden ser de dos tipos^{14,15,71,72}:

- Inherentes y atribuibles al láser⁷³:
 - **Longitud de onda**⁷²: determinará la profundidad que va a alcanzar la energía fotónica.

Es mayor conforme vamos acercándonos al espectro infrarrojo, por lo que se deberán elegir dispositivos que emitan entre los 400nm y los 1000nm, como los de He-Ne, Nd:YAG y diodos, que son capaces de atravesar los tejidos por no tener ninguna absorción por parte del agua que suele encontrarse en las capas más superficiales y sí una gran apetencia por la hemoglobina que es su cromóforo diana.

- **Potencia:** el rango terapéutico oscila entre los 200mW y los 500 mW, de pico de potencia. Tanto el exceso como el defecto de potencia nos llevará a no conseguir el efecto deseado⁷².
 - **Modo de emisión:** podemos emitir tanto en modo continuo como en pulsado, en caso de que se haga de esta última manera es necesario conocer la energía media suministrada al tejido para no sobreexponerlo a la irradiación, para calcularla se multiplica la potencia pico del láser (mW) por la duración del pulso (ns) y la frecuencia del mismo.
 - **Tiempo de exposición:** no suele ser inferior a 1 minuto, aunque podemos calcularlo multiplicando la densidad de energía (J/cm²) tomada como dosis, por el área irradiada (cm²) y dividiéndolo por la potencia (W).
 - **Absorción:** cuando se realiza fotobioestimulación lo que se pretende es favorecer los fenómenos de absorción de la energía, minimizando la reflexión, para ellos la pieza de mano debe posicionarse en un ángulo de 90° con respecto al tejido y la superficie de éste tiene que estar totalmente limpia, para que no haya otros cromóforos que absorban parte del haz láser.
- Inherentes al tejido:
- Propiedades ópticas de los tejidos.
 - Reacción del tejido al estímulo.
 - Conducción tisular del calor.
 - Dispersión del calor.
 - Respuesta inflamatoria del tejido.
 - Vascularización del tejido.
 - Capacidad de reparación celular.

2. TEJIDO ÓSEO: EL OSTEOLASTO

El tejido óseo constituye uno de los grandes sistemas del organismo y es el principal componente del esqueleto humano, consta de un componente celular y una matriz orgánica calcificada. Sus funciones son: proteger los órganos vitales, servir de apoyo estructural para los músculos, tendones y ligamentos, actuar como reservorio de iones, ofrecer un lugar de apoyo para la hematopoyesis y regular el metabolismo^{74,75}. Los huesos que componen el esqueleto humano difieren en forma y tamaño, pero todos tienen una estructura común, compuesta por una corteza de mayor densidad que compone la cortical ósea y una superficie interna que forma el hueso esponjoso o trabecular⁷⁶.

2.1. CÉLULAS DEL TEJIDO ÓSEO

Existen tres poblaciones celulares:

- Osteoblastos: responsables de la formación de tejido.
- Osteocitos: principales células del tejido adulto.
- Osteoclastos: responsables de la reabsorción del tejido óseo.

Todas ellas derivan de células madres mesenquimatosas indiferenciadas y pluripotenciales, que se multiplican y diferencian en las poblaciones anteriores, estas células se organizan en *unidades óseas multicelulares* (Bone Multicellular Units; BMUs)⁷⁷⁻⁸⁰ cuya función principal es favorecer la remodelación ósea, manteniendo en equilibrio los ciclos de aposición y reabsorción de hueso, de manera que no se altere la integridad del esqueleto humano⁷⁶⁻⁸¹.

a) Osteoblastos:

Son las células responsables de la síntesis y secreción de la matriz ósea, localizándose en la superficie activa del hueso⁸²⁻⁸⁴. El cuerpo celular de los osteoblastos es cúbico o prismático del que parten una serie de prolongaciones citoplasmáticas. El núcleo, es redondeado con un nucléolo de gran volumen. En su citoplasma abundan los ribosomas y las mitocondrias, posee numerosas cisternas de retículo endoplásmico rugoso y un aparato de Golgi próximo al núcleo⁸⁵. Estas características son propias de las células capaces de segregar proteínas⁸⁶.

Al terminar con la fase de formación ósea, los osteoblastos pueden quedarse en la superficie formando un revestimiento óseo o diferenciarse a osteocitos⁸⁰.

En caso de que actuasen como revestimiento, su función es la de formar y secretar las enzimas que eliminan la capa osteoide que cubre la matriz mineralizada, permitiendo así que los osteoclastos se adhieran al hueso y comience el proceso de reabsorción⁸⁷.

b) Osteocitos:

Este tipo de células, constituyen casi la totalidad del hueso maduro⁸⁰, su función principal es mantener la integridad estructural de la matriz mineralizada. Además, colaboran en el mantenimiento de la homeostasis del calcio en el organismo liberándolo o depositándolo. Estas células expresan moléculas como la proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP-1), el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) o la esclerosina. Dichas moléculas son importantes para la formación del hueso y el metabolismo del fosfato^{80,88}.

En cuanto a su morfología, se caracterizan por ser fusiformes o estrellados con numerosas prolongaciones que se conectan entre sí o bien con células superficiales (osteoblastos), a las que mandan señales sobre el estrés mecánico y lesiones de la matriz y que éstas utilizan, para coordinar la remodelación ósea^{84,89}.

La muerte por microfisura de los osteocitos, se podría interpretar como el evento principal en el inicio de la reabsorción osteoclástica del tejido óseo^{80,90}.

El citoplasma del osteocito contiene los mismos orgánulos que el de los osteoblastos, pero en menor número, un retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi menos desarrollado que se disponen alrededor de un núcleo ovalado.

El cuerpo del osteocito se encuentra en unas cavidades de la matriz ósea llamadas lagunas osteocitarias, mientras que sus prolongaciones son albergadas por los conductos calcóforos⁹¹.

c) Osteoclastos:

Son células voluminosas y redondeadas, que se caracterizan por tener varios núcleos, abundantes organelas, mitocondrias, lisosomas, vesículas y microvellosidades.

Proceden de células madre hematopoyéticas extraesqueléticas, localizadas en la superficie del hueso que va a reabsorberse. Para llevar a cabo la reabsorción, los osteoclastos unidos a la superficie ósea, segregan enzimas y protones que vuelven ácido el medio y produce la ruptura de los enlaces entre los cristales de hidroxiapatita y la degeneración del colágeno^{92,93}.

2.2. MATRIZ ÓSEA

Alberga las células óseas y se compone de una matriz orgánica impregnada por sales minerales.

Componentes:

- Colágeno tipo I en un 90%.
- Proteínas no colagénicas, que constituyen el 10% restante, participan en la maduración y mineralización de la matriz, además de regular la actividad de las células óseas⁷⁸.
- Sales minerales, componente inorgánico del hueso. La más abundante es el fosfato cálcico cristalino, en menor medida encontramos fosfato cálcico amorfo y otros iones como magnesio, potasio, citrato, sodio, carbonato, plomo, oro y otros minerales pesados, depositados en la superficie de los cristales de hidroxiapatita⁹⁴.

La matriz ósea está recorrida por unas cavidades llamadas osteoplastos que recogen al cuerpo celular del osteocito, de ellas parten unos canaliculos que albergan las prolongaciones del mismo, estos canaliculos se comunican entre sí formando una pared canalicular anastomótica⁸⁰.

2.3. ORGANIZACIÓN ÓSEA MACROSCÓPICA

Se pueden encontrar dos tipos de organización, ósea macroscópica, tejido compacto o cortical y tejido esponjoso o trabecular:

- I. Tejido compacto o cortical: masa compacta recorrida por los conductos de Havers (canales longitudinales) y los de Volkmann (canales transversales), conductos por los que transcurre la inervación y la irrigación que posibilita la nutrición del tejido. El hueso cortical lo encontramos principalmente en el esqueleto apendicular. Resiste adecuadamente la flexión, torsión y cizallamiento^{95,96}.
- II. Tejido esponjoso o trabecular: formado por trabéculas dispuestas de forma irregular, que se entrecruzan dejando unos espacios por donde discurre la médula ósea^{95,96}. Se encuentra principalmente en el esqueleto axial y está preparado para soportar fuerzas compresivas y de tensión⁹⁷.

En todos los huesos, adherida a la superficie, encontramos una capa vascularizada de tejido conectivo, llamada periostio, que sirve de recubrimiento, además de ser el lugar en el que se van a insertar músculos, tendones y ligamentos⁹⁶.

En los huesos distinguimos⁹⁶:

- Epífisis: extremos largos.
- Diáfisis: tallo o parte media.
- Matáfisis: cartílago que se encuentra entre la diáfisis y la epífisis y que permite el crecimiento de los huesos en la edad temprana.

2.4. FORMACIÓN Y CRECIMIENTO DEL HUESO:

Se diferencian cuatro etapas en la formación ósea:

- 1) Diferenciación de los osteoblastos a partir de las células madre.
- 2) Secreción de la matriz orgánica por medio de los osteoblastos.
- 3) Mineralización de la matriz.
- 4) Aparición de los osteoclastos.

Al fenómeno de formación y crecimiento del tejido óseo se le denomina osificación y consiste en la sustitución progresiva de un tejido no óseo por otro óseo. Hay dos tipos de osificación según sea la naturaleza del tejido no óseo sustituido:

- Endoconjuntiva (directa): las células mesenquimatosas indiferenciadas se transforman en osteoblastos dentro del tejido conjuntivo y se lleva a cabo la osteogénesis; a continuación, alrededor de esta zona de tejido óseo, se van colocando otras células mesenquimales que se diferencian en osteoblastos y forman así una hilera osteoide (matriz ósea no calcificada)^{96,98}.
- Endocondral (indirecta): se produce en el cartílago, que es reemplazado por tejido óseo seguido de un crecimiento longitudinal del hueso. Es el proceso más común en el desarrollo de los huesos en los vertebrados^{98,99}.

2.5. MODELADO Y REMODELADO ÓSEO

Aunque el esqueleto parece ser un órgano totalmente estático, resulta ser muy dinámico ya que está sometido a un continuo proceso de desarrollo y crecimiento, que viene determinado por un constante remodelado, consecuencia de los procesos de aposición y reabsorción ósea, provocando así cambios en la geometría y la masa del hueso^{74,79,100}.

El modelado se prolonga hasta la adolescencia, es el responsable del crecimiento longitudinal del hueso, se realiza por crecimiento endocondral y depende de la actividad osteoblástica y osteoclástica⁷⁷.

La remodelación es un proceso continuo de reabsorción y aposición ósea, con el fin de reemplazar poblaciones óseas envejecidas por otras nuevas que procuren la integridad del hueso. Esta tasa de recambio disminuye con la edad y conlleva: que se liberen minerales en el momento de la destrucción ósea (función metabólica del hueso) y una continua adaptación del tejido óseo a las constantes condiciones mecánicas^{80,101}.

En el proceso de remodelación los osteoclastos producen la reabsorción ósea y los osteoblastos que se encargan de ocupar los espacios dejados por los anteriores, provocan la formación de nuevo hueso^{84,102}. Podemos diferenciar varias etapas en el remodelado óseo^{74,103,104}:

- Cese de la actividad osteoclástica.
- Desaparición de los osteoclastos de la zona de reabsorción.
- Aparición de los precursores de osteoblastos en la zona.
- Proliferación de los precursores de los osteoblastos.
- Diferenciación a osteoblastos maduros, capaces de segregar colágeno.
- Formación de la matriz mineralizada.
- Cese de la actividad osteoblástica.

La remodelación del hueso se inicia cuando los osteoclastos realizan osteólisis, para ello segregan minerales que degradan la sustancia osteoide, dando lugar a las lagunas que posteriormente los osteoblastos repararán por medio de la osteogénesis, para ello primero reparan la sustancia osteoide y luego la mineralizan.

Al finalizar este proceso de síntesis de la matriz ósea, los osteoblastos pueden quedar inactivos o bien ser atrapados en el frente de calcificación diferenciándose en osteocitos, los cuáles se ocupan de la nutrición del hueso y que además, pueden realizar actividades de desmineralización.

Los fenómenos de reabsorción y regeneración ósea se repiten de manera cíclica, están equilibrados y acoplados. No obstante, la remodelación no es totalmente perfecta ya que al final del proceso siempre hay un pequeño déficit de masa ósea, como consecuencia de esto se produce una pérdida paulatina de hueso, que se acentúa a partir de los 30 y 40 años^{105,106}.

En los casos de enfermedades como la osteoporosis, el problema principal es que los osteoblastos no son capaces de llenar el vacío provocado por la reabsorción^{74,107}.

Por otro lado, los osteoblastos sufren apoptosis en las zonas de remodelación, observándose en mayor medida en las zonas de reabsorción como consecuencia de la actividad osteoclástica, con un aumento de los niveles de calcio¹⁰⁸ y fosfato¹⁰⁹.

2.6. REPARACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO

La reparación del tejido óseo tiene lugar después de un trauma óseo y se produce en tres fases diferenciadas:

- a. Fase de inflamación: en la zona afectada se produce un hematoma que es reabsorbido por los macrófagos. De manera simultánea migran a la herida todas las células involucradas en el proceso inflamatorio (linfocitos, granulocitos y monocitos) y células pluripotenciales que producen un exudado con un alto contenido en citoquinas y mediadores inflamatorios que hacen que acudan más células inflamatorias y factores de crecimiento a la zona dañada¹¹⁰, dichas células migrarán, proliferará y se diferenciarán según el estímulo recibido en células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos que se encargarán de la producción de nuevos vasos y de tejido conectivo que sustituya al coágulo formado como consecuencia de la hemorragia posterior al trauma. Por último los macrófagos digerirán los productos de desecho¹¹¹.
- b. Fase de reparación inicial: se producen puentes de tejido óseo inmaduro, sin orientación definida, cuya función es unir los extremos del hueso fracturado (callo de fractura).
- c. Remodelación: el tejido óseo inmaduro se sustituye por un tejido laminar que se orienta según las líneas de fuerza que actúan en la zona^{111,112}.

Además, en el hueso también se dan microfracturas a nivel trabecular, las cuales no modifican la estructura externa del hueso y suelen causarse por fatiga mecánica de la zona. El proceso de reparación se hace a través de microcallos de fractura que se originan igual que los descritos anteriormente¹¹¹.

3. OSTEOBLASTO

El osteoblasto es la célula responsable de la formación del tejido óseo, se origina a partir de células mesenquimales primitivas. La inducción del proceso de diferenciación de estas células en osteoblastos no se conoce bien, aunque se ha demostrado que algunos factores de tipo hormonal y de crecimiento, los glucocorticoides y algunas citoquinas, actúan como reguladoras de la diferenciación temprana en algunas líneas celulares^{79,106,113}.

3.1. DIFERENCIACIÓN

La diferenciación hace referencia a la especialización de la estructura y función celular, y al parecer es un proceso progresivo e irreversible¹¹⁴.

La secuencia del desarrollo del osteoblasto se divide en varias fases: proliferación, síntesis de la matriz ósea también llamado maduración y mineralización^{115,116}. A su vez, las células osteoblásticas se dividen en una sucesión lineal que comprende osteoprogenitoras a preosteoblastos, osteoblastos y osteocitos.

Las células osteoprogenitoras o células madre, son células indiferenciadas de morfología fibroblástica. En el proceso de formación ósea, sufren una división y diferenciación a células formadoras de hueso. En reposo son capaces de transformarse en osteoblastos y secretar matriz ósea. Se localizan en las superficies internas y externas de los huesos (células endósticas y periósticas) y se pueden dividir y proliferar, y se diferencian además de en osteoblastos, como se ha mencionado anteriormente, en: adipocitos¹¹⁷, condroblastos y fibroblastos¹¹⁸.

Los preosteoblastos son células con aspecto fibroblástico, derivan de células madres estromales, se sitúan cercanas a la superficie ósea, pero separadas de ésta por otras células como las del endostio⁸⁶. Su función, es asegurar la proliferación del linaje osteoblástico.

Los osteoblastos son células fusiformes con un citoplasma basófilo y con abundantes isoenzimas específicas de la fosfatasa alcalina (AP). Se suele considerar que son incapaces de dividirse, aunque hay datos que afirman que conservan en parte su capacidad proliferativa⁸⁶.

Los que son totalmente maduros, se encuentran en contacto con la superficie ósea, formando una sola capa con capacidad de sintetizar la matriz mineralizada, controlar el depósito de sales minerales, formar el componente orgánico de la matriz ósea, sintetizar colágeno tipo I (COL-I), osteonectina, osteopontina, osteopontina, AP, factores de crecimiento, el ligando del

receptor kB (RANKL) necesario para la diferenciación de los osteoclastos y el receptor de la hormona paratiroidea (PTH). La expresión de estas moléculas depende de los distintos grados de maduración y desarrollo de los osteoblastos^{78,80,88,119}.

Son tres los estados funcionales por los que pasan los osteoblastos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos estados son^{120,121}:

- Proliferación celular y síntesis del componente orgánico de la matriz mineralizada.
- Maduración de la matriz ósea.
- Depósito mineral.

Los osteoblastos pueden quedarse en superficie, en este caso, terminan con la síntesis de la matriz y al finalizar, se aplanan y funcionan como células de revestimiento (lining cell). Estas células producen interleuquinas (IL) como la IL-6 y IL-11 que influyen en el remodelado óseo⁸³. La otra opción, es que los osteoblastos se queden en el espesor de la matriz, en este caso se diferenciarán en osteocitos¹²⁰.

En conclusión, cuando el osteoblasto ha finalizado la formación de hueso y no hay necesidad de sintetizar más matriz mineralizada, se inactiva y puede quedar como célula de revestimiento en la superficie ósea o como osteocito, dentro del frente de calcificación⁸⁰.

3.2. IDENTIFICACIÓN

Clásicamente, la identificación del osteoblasto se ha hecho en función de su localización en el hueso, aunque actualmente, se realiza en función de cuatro parámetros diferentes: morfológicos, bioquímicos, antigénicos y genéticos.

a. Parámetros morfológicos

El osteoblasto se caracteriza por tener una forma cúbica o prismática. Contiene un núcleo redondeado con un solo nucléolo muy desarrollado, que se sitúa en el extremo de la célula más distante de la superficie ósea. El citoplasma contiene numerosos ribosomas y mitocondrias, lo que indica que tienen un metabolismo muy activo. Además, entre el núcleo y la membrana celular, se sitúan el aparato de Golgi y las cisternas del retículo endoplasmático rugoso⁸⁶. Podemos encontrar también en el citoplasma, vacuolas de contenido amorfo y lisosomas¹²².

Los osteoblastos, por su función formadora de hueso, se sitúan en el frente de avance del hueso, disponiéndose en una capa epiteloidal de células cuboideas conectadas entre sí, por medio de expansiones finas y cortas.

b. Identificación bioquímica

Bioquímicamente, los osteoblastos se caracterizan por la secreción de proteínas como osteopontina, osteocalcina, COL-1 y AP.

Síntesis de osteopontina: la osteopontina es una glicoproteína hidrofílica y fosforilada, compuesta por 314 aminoácidos aproximadamente. El 20% de su peso concierne al ácido siálico. La producen varios tipos celulares, entre los que se encuentra el osteoblasto, estimulado por la 1- α -1,25-dihidroxitamina D. La osteopontina se une a la hidroxiapatita y a las células, favoreciendo la reabsorción ósea, mediante la fijación de los osteoclastos a la superficie de la fase mineral¹²³.

Esta molécula se expresa en zonas donde hay inflamación y se liga a múltiples receptores de la superficie celular como integrinas y el CD44.

Su principal función es proinflamatoria; igualmente tiene funciones quimiotácticas, inductoras de proliferación de células B, de colaboración en la producción de anticuerpos y aumentando la supervivencia de las células inflamatorias. Además, también tiene funciones reparadoras, que actúan en la regeneración de los tejidos y antiinflamatorias, inhibiendo la producción de óxido nítrico.

Síntesis de osteocalcina: Es una proteína morfogenética sintetizada por los osteoblastos, que representa un porcentaje muy bajo de las proteínas no colagénicas de la matriz extracelular, y se encuentra en el hueso¹²⁴.

Su síntesis, indica que nos encontramos en la fase intermedia de la diferenciación del osteoblasto y ayuda en la mineralización inhibiendo la formación de cartílago¹²⁵.

Síntesis de AP: La AP es un enzima hidrolítica o hidrolasa que se encarga de eliminar los grupos fosfatos de las moléculas. Suele estar elevada en los tejidos mineralizados, por lo que el hueso resulta ser una de las principales fuentes de AP, la cual se expresa en la membrana citoplasmática de los osteoblastos, para posteriormente ser secretada al exterior. Por ello esta enzima tiene la propiedad de crear fosfato orgánico extracelular¹²⁴.

Los niveles de AP están relacionados con la actividad osteoblástica y osteolítica y su grado de expresión se relaciona con el grado de maduración del tejido¹⁰⁵. Para localizarla tanto en poblaciones de osteoblastos como de preosteoblastos, se utilizan técnicas citoquímicas¹²⁶.

Síntesis y secreción de colágeno: el COL-1, es una proteína que se sintetiza en las últimas fases de la proliferación y las primeras de la maduración de la matriz ósea, por medio de los osteoblastos^{121,127}. Es el mayor componente proteico del hueso. También, se observa en altas concentraciones en otros tejidos como piel, tendones, ligamentos, esclerótica, dentina y aponeurosis.

Morfológicay estructuralmente, el COL-1 es una molécula triple helicoidal compuesta por dos cadenas polipeptídicas, α -1 y α -2¹²⁴.

c. Identificación antigénica

El perfil antigénico del osteoblastos se caracteriza en ser un perfil en el que se combinan diferentes antígenos que son coexpresados por otras células que tienen su origen en la médula ósea.

Entre los antígenos expresados en células hematopoyéticas, es reseñable la expresión de CD34, su expresión es variable según la línea celular y el anticuerpo monoclonal (Abmo) utilizado. Detectándose solo con un Abmo que es un "pool" frente a distintos epítomos de CD34 y no detectándose el CD54, antígeno propio del linaje leucocítico. Con relación a los antígenos de células B, los osteoblastos son positivos para los antígenos CD20 y CD23 y negativos para el CD19. En el osteoblasto, se pueden indentificar marcadores para la línea celular mielomonocítica como el CD11b, CD13 y CD16; sin embargo, no identificaremos los antígenos CD14, CD15, CD33 y CD68. También se muestra expresión positiva para células presentadoras de antígenos como CD44, CD54, CD80, CD86 y HLA-DR, para el marcador de células Natural Killer (NK), CD56 y una serie de antígenos cuya expresión no es específica de ninguna población celular como CD10, CD25, CD38 y CD69. Por último, cabe señalar la expresión positiva del antígeno de las células foliculares dendríticas (FCD y DRC-1)¹²⁸⁻¹³¹.

Los marcadores descritos anteriormente, no se expresan siempre en el 100% de la población analizada, de tal manera que los antígenos CD10, CD13, CD44 y el de células dendríticas, se expresan en el 100% de los osteoblastos y no sufren cambios al tratarlos con citoquinas y/o factores de crecimiento. Por otro parte, CD54, CD80, CD86 y HLA-DR se expresan en parte de la población, y la expresión se ve modificada en respuesta a distintos tratamientos¹³⁰⁻¹³¹.

Los antígenos de membrana CD10, CD13, CD44, CD54, CD80, CD86 y HLA-DR, han sido descritos en:

- Osteoblastos humanos en cultivos primarios aislados a partir de muestras de tejido óseo^{130,131}.
- Osteoblastos presentes en cortes de hueso humano¹³⁴.
- Osteoblastos transformados, como en el caso de los obtenidos a partir de la línea MG63¹³⁵.

Esto, unido a la modulación del perfil antigénico producida por la acción de distintos tratamientos, tanto de los osteoblastos humanos en cultivo, como de los de la línea MG63, ha llevado a algunos autores a sugerir que el osteoblasto posee dos clases de antígenos: unos constitutivos y otros modulables^{132,133,136}.

d. Identificación genética

Además de los genes expresados en fibroblastos y condrocitos, los osteoblastos poseen dos genes transcritores específicos que son^{105,137}:

- La osteocalcina: inhibidora de la función osteoblástica y expresada por los osteoblastos totalmente diferenciados.
- El factor de transcripción Cbfa1: éste factor, es importante en la diferenciación osteoblástica, de lo que se deduce que desempeña un papel preponderante en la regeneración ósea e induce un ambiente embrionario adecuado en los tejidos dañados, por lo que el Cbfa 1 reúne todas las propiedades necesarias como factor de diferenciación de los osteoblastos. Durante el desarrollo embrionario el Cbfa 1, se expresa antes de la diferenciación de los osteoblastos y en células mesenquimales que se convertirán en osteoblastos o en condrocitos¹³⁸. Se considera el marcador más temprano y específico de la osteogénesis⁹⁵ e induce la expresión de gen específico de osteoblastos en fibroblastos y mioblastos. La regulación de la expresión del Cbfa 1 depende de distintos factores como las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs)¹³⁸ o el propio gen⁸².

3.3. FUNCIONES DEL OSTEOLASTO

Aunque la función principal del osteoblasto es sintetizar los componentes de la matriz ósea y controlar la actividad osteoclástica, posee asociadas otras funciones como:

- Función inmunológica: sintetizando citoquinas, estimulando y/o presentando antígenos a los linfocitos T y fagocitando distintas sustancias de diferente naturaleza y tamaño^{139,140}.
- Secreción de citoquinas proinflamatorias como: IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, factor de necrosis tumoral (TNF- α), factor estimulante de colonias de granulocitos y mastocitos (GM-CS/FM), quimioquinas como la proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP-1) y la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)¹⁴¹⁻¹⁴³.
- Secreción de factores de crecimiento como el TGF β 1, que puede actuar como factor inflamatorio^{131,144}.
- Expresión positiva a nivel intracitoplasmático para citoquinas expresadas y/o sintetizadas por células presentadoras de antígeno como IL-4, IL-12, IL-15, IL-18 o Interferón gamma (IFN γ). La expresión, está modulada por factores de crecimiento como FGF, TGF β 1 y PDGF o por citoquinas como IL-1 y IFN γ ¹⁴⁵.
- Expresión de receptores para distintas citoquinas. Estos receptores hacen posible la respuesta necesaria para la secreción de otras citoquinas y factores de crecimiento sintetizados por el osteoblasto^{139,146,147}.

La expresión de antígenos propios de células inmunocompetentes, se ha documentado tanto en osteoblastos humanos en cultivo como en osteoblastos en cortes de tejido óseo intacto^{129-131,134,148-151}. La presencia de estos marcadores de superficie en el osteoblasto, sugiere que estas células son capaces de actuar como presentadoras de antígenos¹⁵² y que interaccionan de manera bidireccional con los linfocitos T¹⁴⁰.

Con respecto a la capacidad fagocítica del osteoblasto, hay estudios realizados *in vitro* con células de origen humano y de rata, que han ratificado dicha capacidad, al confirmar la incorporación al citoplasma celular de distintas partículas diana, de pequeño tamaño (1-3 μ m), tales como polímeros sintéticos y partículas de desecho de material protésico de distinta composición¹⁵³⁻¹⁵⁵. Estudios posteriores demostraron que los osteoblastos también son capaces de fagocitar material sintético no degradable, como las bolitas de látex y microorganismos como *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Klebsiella*¹⁵².

Las partículas fagocitadas se almacenan en el citoplasma de la célula y en algunos casos, como en el de las partículas de material protésico, se incuban durante periodos largos de tiempo provocando la apoptosis o necrosis celular^{153,154}. En el caso de que las partículas fagocitadas sean microorganismos, no se observan signos de deterioro en el osteoblasto,

aunque sí cambios a nivel de la membrana, que se vuelve irregular y con múltiples extensiones citoplasmáticas, además, se observa un aumento de lisosomas e inclusiones granulares¹⁵².

Estudios como los de Heineman y col.¹⁵⁵, mostraron que los osteoblastos incubados durante largo tiempo después de fagocitar las partículas diana expresaban el factor CD68, marcador propio de los macrófagos. La expresión de este marcador dependía del periodo de incubación y no de la naturaleza de la partícula, por lo que se podría pensar que el osteoblasto tiene un fenotipo mixto en relación con el macrófago.

Otras investigaciones han sugerido que durante la diferenciación osteoblástica, una subpoblación celular podría desarrollar funciones inmunes como la fagocitosis o la activación de las células T. De tal manera, que cuando los osteoblastos se encuentran en contacto con microorganismos y materiales protésicos, desencadenan funciones inmunológicas para suprimirlos. Esta actividad podría dar lugar a cambios morfológicos, antigénicos y bioquímicos y podría ser importante en procesos inflamatorios en los que se liberen citoquinas, que actuarían como reguladoras y estimuladoras del fenotipo antigénico del osteoblasto y en consecuencia de su función inmunológica como célula presentadora de antígenos y/o célula con capacidad fagocítica. Esto podría dar lugar a una interrupción parcial del proceso de diferenciación y maduración de la formación ósea. Este proceso se propone por Ruiz y col.¹⁵² como un mecanismo de emergencia y no como un proceso fisiológico.

Esta propuesta está avalada por varios estudios como los de Schrum y col.^{156,157}, en los que se exponían osteoblastos murinos y humanos a patógenos como *Salmonella* y *Staphilococcus aureus*. Tras la exposición a dichos microorganismos, los autores observan un aumento de la expresión de moléculas de clase II (HLA-DR) y de la molécula coestimulante CD40. Estas dos moléculas están muy relacionadas con la activación de los linfocitos T y su expresión es propia de macrófagos y células dendríticas, dos células presentadoras de antígenos.

Además, los osteoblastos en cultivo expuestos a estos microorganismos, liberan citoquinas proinflamatorias y mediadores de la inflamación que ayudarían a movilizar macrófagos, neutrófilos y linfocitos T al tejido óseo^{141,158,159}.

Los resultados de todos estos estudios apuntarían a que los osteoblastos desempeñan un papel importante en la activación de los linfocitos T en aquellas zonas en las que existe una infección ósea, por lo que parece claro que los osteoblastos desempeñan un papel importante en el comienzo de la respuesta inmune del huésped en procesos en los que existe una infección

bacteriana del hueso^{156,157}. Si bien, en circunstancias normales, el osteoblasto desempeñaría su función clásica de formación y regeneración del tejido óseo.

4. UTILIDAD CLÍNICA DEL LÁSER

Actualmente, uno de los láseres más usados en clínica por su facilidad de uso y su versatilidad son los diodos. Estos láseres pertenecen como se ha reseñado anteriormente al grupo de alta potencia, aunque la imposibilidad de interactuar con el tejido duro, ha hecho que su uso se centre principalmente en la cirugía y tratamiento de tejidos blandos, terapia fotodinámica y fotobioestimulación, ya que bien utilizado no provoca daño térmico en el tejido, a la vez que produce efectos analgésicos y antiinflamatorios de la zona irradiada^{73,160-162}.

Son muchas las utilidades clínicas que poseen estos dispositivos láser en el ámbito de la clínica odontológica, como por ejemplo: tratamiento de las lesiones orales provocadas por el virus herpes simple tipo I¹⁶³, liquen plano¹⁶⁴, granulomatosis orofaciales¹⁶⁵, mucositis^{166,167}, parestesias¹⁶⁸, parálisis faciales¹⁶⁹, control de la hiperestesia dentinaria¹⁷⁰⁻¹⁷².

Por su capacidad bactericida y viricida, son efectivos en los tratamientos endodónticos^{173,174} y no quirúrgicos periodontales, disminuyendo el recuento bacteriano y favoreciendo una mayor tasa de éxito en la limpieza de los conductos pulpares y bolsas periodontales¹⁷⁵.

La incorporación en la periodoncia es de suma importancia ya que la periodontitis es una enfermedad que cursa con la pérdida tanto de tejido blando como de tejido duro, lo que provoca en los pacientes graves alteraciones estéticas y funcionales consecuencia de la pérdida de piezas dentales. Es por esto, por lo que se está avanzando en el uso del láser como coadyuvante en la regeneración de los tejidos, actuando sobre el fibroblasto, célula responsable de la formación del tejido blando y la cicatrización^{17,31,49,65,176} y el osteoblasto responsable de la formación y regeneración ósea¹⁷⁷⁻¹⁸⁰.

En referencia al osteoblasto, encontramos varios trabajos de investigación tanto *in vivo*¹⁸¹ como *in vitro*, que muestran que la fotobioestimulación con láser de baja potencia, favorece el crecimiento celular después de la irradiación, sugiriéndose como mecanismo de acción el aumento de varios factores de crecimiento (TGF- β y IGF-1)¹⁸² a consecuencia del tratamiento. Además, se ha descrito que el láser posee propiedades osteogénicas, aumentando la capacidad proliferativa del osteoblasto^{64,66,67,70,183,184} incrementando los depósitos de calcio¹⁸⁵ y modulando la actividad de la ciclo-oxigenasa 2¹⁸⁶.

La necesidad de regeneración de los tejidos, junto con la búsqueda de nuevas terapias menos invasivas y más confortables para el paciente, hacen del láser una herramienta de gran utilidad en la clínica que puede ser aplicada de manera individual o en combinación con otras terapias como el ácido hialurónico^{187,188}, el plasma rico en plaquetas¹⁸⁸⁻¹⁹⁰, sustitutivos óseos¹⁹¹ y uso de células madre^{65,192}.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Daniel MD, Hill JS. A history of photodynamic therapy. *Aus N Z J Surg.* 1991; 61(5): 340-348.
2. Graudenz K, Raulin C. Von Einsteins quantentheorie zur modernen laser therapie. *Historie des lasers in dermatologie und ästhetischen medizin. Hautarzt.* 2003; 54: 575-582.
3. Planck M. The theory of heat radiation. New York: Dover Publications Inc.; 1959.
4. Bohr N. Can quantum-mechanical description of physical reality be considered complete?. *Physical Review.* 1935; 48: 696-702.
5. Schawlow AL, Townes CH. Infrared and optical masers. *Physical Review.* 1958; 112(6): 1940-1949.
6. Hecht J. Beam the race to make the laser. *Optics & Photonics News.* 2005; 16(7): 24-29.
7. Gould G. Apparatus for generating radiation of frequencies higher than those of light. United States. 3388314, June 1968.
8. Mainman TH. Stimulated optical radiation in rubi. *Nature.* 1960; 187: 493-494.
9. Rossman JA, Cobbs CM. Lasers in periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 1995; 9(1): 150-164.
10. Cobb CM. Lasers in periodontics: a review of the literature. *J Periodontol.* 2006; 77(4): 545-564.
11. White JM. Lasers for use in dentistry. *J Esthet Restor Dent.* 2005; 17(1): 60-66.
12. España-Tost, A, Arnabat-Domínguez J, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Aplicaciones del láser en odontología. *RCOE.* 2004; 9(5): 497-511.
13. American Heritage Dictionary of the English language. 4^a ed. Boston: Houghton Mifflin; 2006.
14. Maggiono M, Attanasio T, Scarpelli F. Láser en odontología. Venezuela: AMOLCA; 2010.
15. Cisneros JL, Camacho FM, Trelles MA. Láser en dermatología y dermocosmética. Madrid: Aula Médica Ediciones; 2008.
16. Coluzzi DJ. Fundamentals of lasers in dentistry: basic science, tissue interaction and instrumentation. *J Laser Dent.* 2008; 16: 4-10.
17. Aoki A, Miyuki K, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2004; 36: 59-97.

18. Hashmi J, Huang YY, Sharma SK, Balachadran DB, De Taboada L, Carroll J, Hamblin MR: Effect of pulsing in low-level light therapy. *Lasers Surg Med.* 2010; 42(6): 450-466.
19. Karu TI, Ryabykh TP, Letokhov VS: Different sensitivity of cells from tumor-bearing organisms to continuous-wave and pulsed laser radiation (632,8nm) evaluated by chemiluminescence test. III. Effect of dark period between pulsed. *Lasers life Sci* 1996; 7: 141-155
20. Convissar RA. Láser en odontología. Principios y práctica. Barcelona: Elsevier; 2012.
21. Oltra-Arimon D, España-Tost AJ, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Aplicaciones del láser de baja potencia en odontología. *RCOE.* 2004;9(5): 517-524.
22. Antolín-Bowen A, Arlandi Garrido M, Ariño B, Fernández S D. Láser y terapia fotodinámica en el tratamiento de la periimplantitis. *RCOE.* 2014;19(4): 325-333.
23. Guinot-Moya R, España-Tost AJ, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Utilización de otros láseres en odontología: Argón, Nd:YAP y Ho:YAG. *RCOE.* 2004; 9(5): 581-586.
24. Zavaleta-de la Huerta D, España-Tost AJ, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Aplicaciones del láser de Nd:YAG en odontología. *RCOE.* 2004; 9(5): 539-545.
25. Revilla-Gutiérrez V, Arnabat-Dominguez J, España-Tost AJ, Gay-Escoda C. Aplicaciones de los láseres de Er:YAG y de Er:YSGG en odontología. *RCOE.* 2004; 9(5): 551-562.
26. García-Ortiz de Zárate F, España-Tost AJ, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Aplicaciones del láser de CO₂ en odontología. *RCOE.* 2004; 9(5): 567-576.
27. Larrea-Oyarbide N, España-Tost AJ, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Aplicaciones del láser de diodo en odontología. *RCOE.* 2004; 9(5): 529-534.
28. Kalarova H, Ditrichova D, Wagner J. Penetration of the laser light into the skin *in vitro*. *Lasers Surg Med* 1999; 24: 231-135.
29. Jacques SL, Prahl SA. Modeling optical and thermal distributions in tissue during laser irradiation. *Lasers Surg Med* 1987; 6: 494-593.
30. Vélez M, Colls J. Comportamiento de la luz en la interacción con los tejidos, en especial el láser de baja potencia. *Bol CDL,* 1987; 15/16: 6-21.
31. Coluzzi DJ. Fundamentals of dental lasers: science and instruments. *Dent Clin N Am.* 2004; 48: 751-770.
32. Wan S, Anderson RR, Parrish JA. Analytical modeling for the optical properties of the skin with *in vitro* and *in vivo* applications. *Photochem Photobiol* 1981; 34: 493-499.
33. Túner J, Hode L. The new laser therapy handbook. Suecia: Prima Books; 2010.
34. Anderson RR, Parrish JA. The optics of human skin. *J Invest Dermatol* 1981; 77(1): 13-19.

35. McKenzie AL. Physics of thermal processes in lasers-tissue interaction. *Phys Med Biol.* 1990; 35(9): 1175-1209.
36. Goldman L. Chromophores in tissue for laser medicine and laser surgery. *Laser Med Sci.* 1990;5: 289-292.
37. Kolari PJ. Penetration of unfocused laser light into the skin. *Arch Dermatol Res.* 1985; 277: 342-344.
38. Jacques SL. Lasers-tissue interactions. Photochemical, photothermal, and photomechanical. *Surg Clin North Am.* 1992; 72(3): 531-558.
39. Thomsen S. Pathologic of photothermal and photomechanical effects of laser-tissue interaction. *Photochem Photobiol.* 1991; 53(6): 825-835.
40. Goharkhay K, Moritz A, Wilder-Smith P, Schoop U, Kluger W, Jakolitsch S, Sperr W. Effect on oral soft tissue produced by a diode laser in vitro. *Lasers Surg Med.* 1999; 25: 401-406.
41. Carroll L, Humphreys TR. LASER- tissue interactions. *Clin Dermatol.* 2006; 24: 2-7.
42. Altschuler GB, Anderson RR, Manstein D, Zenzie HH, Smirnov MZ. Extended theory of selective photothermolysis. *Lasers Surg Med.* 2001; 29: 416-132.
43. López-Castro G. Láser en periodoncia. *RCOE.* 2014; 19(4): 271-275.
44. Babilas P, Karrer K, Sidoroff A, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology- an update. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2005; 21:142-149.
45. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000.* 2011; 55: 143-166.
46. Bujaldón-Daza A, Cabello-Domínguez G. Terapia fotodinámica en odontología: periodontitis, mucositis y peri-implantitis. *RCOE.* 2015; 20(1): 53-61.
47. Panssanezi E, Andreotti-Damante C, Rybo de Rezende ML, Aguilar-Gregghi SL. Lasers in periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2015; 67: 268-291.
48. North American Association Photobiomodulation Therapy [homepage on the internet]. [Update 2015 sept 18]. Available from: <http://www.naalt.org>.
49. Smith K. The Photobiological basis of low-level laser radiation therapy. *Laser Ther.* 1991; 3:19-24.
50. Farival S, Malekshahi T, Shiari R. Biological effects of low level laser therapy. *Lasers Med Sci.* 2014; 5(2): 58-62.
51. Yu W, Naim JO, McGowan M, Ippolito K, Lamafame RJ. Photomodulation of Oxidative Metabolism and Electron Chain Enzymes in Rat Liver Mitochondria. *J Photochem Photobiol.* 66(6): 866-871.

52. Karu TI. Molecular mechanisms of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers Life Sci.* 1988; 2(1): 53-74.
53. Karu TI. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B.* 1999; 49: 1-17.
54. Amat A, Rigau J, Wyinant RW, Ilev IK, Tomas J, Anders JJ. Modification of the intrinsic fluorescence and the biochemical behavior of ATP after irradiation with visible and near-infrared laser light. *J Photochem Photobiol B.* 2005; 81:26-32.
55. Amat A, Rigau J, Nicolau R, Aalders M, Fenoll MR, van Gemert M, Tomas J. Effect of red and near-infrared laser light on adenosine triphosphate (ATP) in the luciferine–luciferase reaction. *J Photochem Photobiol A.* 2004; 168: 59-65.
56. Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. Studies into the action specific of a pulsed GaAlAs laser (820nm) on a cell culture. I. Reduction of the intracellular ATP concentration: dependence on initial ATP amount. *Laser Life Sci.* 2001; 9: 203.
57. Karu TI, Pyatibrat LV, Kolyakov SF, Afanasyeva NI. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: Reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *J Photochem Photobiol B.* 2005; 98-106.
58. Karu TI. Multiple Roles of Cytochrome c Oxidase in Mammalian Cells Under Action of Red and IR-A Radiation. *IUBMB Life.* 2010; 62(8): 607-610.
59. Pastore D, Grecco M, Passarella S. Specific He-Ne laser sensitivity of the purified cytochrome-c oxidase. *J Radiant Biol.* 2000; 76(6): 863-870.
60. Silveira PCL, Streck EL, Pinho RA. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol.* 2007; 279-282
61. Damante CA, De Micheli G, Miyagi SPH, Feist IS, Marques MM. Effect of laser therapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblast. *Lasers Med Sci.* 2009; 24: 885-891.
62. Silva TC, Oliveira TM, Sakai VT, Dionisio TJ, Santos CF, Bagnato VS, Machado MAAM. In vivo effects on the expression of vascular endothelial growth factor-165 messenger ribonucleic acid of an infrared diode laser associated or not with a visible red diode laser. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28:63-68.
63. Corazza VA, Kurachi C JJ, Bagnato VS. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg.* 2007; 25(2): 102-106.
64. Fujihara Na, Hiraki KR, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Laser Surg Med.* 2006; 38(4): 332-336.

65. Xu M, Deng T, Mo F, Deng B, Lam W, Deng P, Zhang X, Liu S. Low-intensity pulsed laser irradiation affects RANKL and OPG mRNA expression in rat calvarian cells. *Photomed Laser Surg* 2009; 27(2): 309-315.
66. Guzzardella GA, Fini M, Torricelli P, Giarvaresi G, Giardino R. Laser stimulation on bone defect healing: an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2002; 17(3): 216-220.
67. Khadra M, Kassem N, Haanaes HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarian bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Endod.* 2004; 97: 693-700
68. Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblastic-like cells culture on titanium implant material. *Biomaterials.* 2005; 26: 3503-3509.
69. Ozelik O, Cenk-Haytac M, Seidaoglu G. Enamel matrix derivative and low-level laser therapy in the treatment of infra-bony defects: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2008; 35(2): 147-156.
70. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblast in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2005; 232: 161-166.
71. Azevedo LH, Eduardo FP, Moreira MS, Eduardo CP, Marque MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth. A pilot study. *Lasers Med Sci.* 2006; 21: 86-89.
72. Mendez TM, Pinheiro AL, Pacheco MT y col. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair on the cutaneous wounds. *J Clin Laser Med Surg* 2004; 22(1): 19-25.
73. Almeida-Lopez L, Rigau J, Nicolau R, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Martins Marques Jaeger M. Comparison of the low-level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblast proliferation using different irradiance and same fluency. *Laser Surg Med* 2001; 29: 179-184.
74. Ksiezopolska-Orlowka K. Change in bone mechanical strength in response to physical therapy. *Pol Arch Med Wewn.* 2010; 120(9): 368-373.
75. McGee-Lawrence ME, Westendorf JJ. Histone deacetylases in skeletal development and bone mass maintenance. *Gene.* 2011; 474:1-11.
76. Bostrom MPG, Yang X, Koutras I. Biologics in bone healing. *Curr Op Orthop.* 2000; 11: 403-412.
77. Frost HM. *Musculoskeletal. Neuronal Interact.* 2001; 2: 121-130.

78. Kassen M, Abdallah BM, Saeed H. Osteoblasts cells: Differentiation and trans-differentiation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008; 473: 183-187.
79. Papachroni KK, Karatzas DN, Papavassiliou KA, Basdra EK, Papacassiliou GP. Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends Mol Med*. 2009; 15(5): 208-216.
80. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010; 11: 219-227.
81. Parfitt AM. In *Bone, The Osteoblast and Osteocyte*. Londres: B.K Hall; 1991.
82. Ducy P, Karsenty G. Genetic control of cell differentiation in the skeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 1998; 10: 614-619.
83. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000; 21: 115-137.
84. Yonezawa T, Lee JW, Hibino A, Asai M, Hojo H, Chan BY, Teruya T, Nagai K, Chung UI, Yagasaki K, Woo JT. Harmin promotes osteoblasts differentiation through bone morphogenetic protein signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 409(2): 260-265.
85. Lian JB, Stein GS, Canalis E, Gehron-Robey p, Boskey AL. *Bone formation: osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins, and the mineralization process*. 4^o Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.
86. Puzas JE. Osteoblasts cell biology: lineage and functions. In *Primer of the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 1^o Ed. New York: Lippincott- Raven Press; 1996.
87. Buckwalter JA, Cooper RR. Bone structure and function. *Intr Course Lect*. 1987; 36:27-48.
88. Bonewald L. Osteocytes as multifunctional cells. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2006;6: 331-333.
89. Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*. 1995; 17(2): 77s-83s.
90. Cardoso L, Herman BC, Verborgt O, Laudier D, Majeska RJ, Schaffler MB. Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. *J Bone Miner Res*. 2009; 24: 597-605.
91. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: Structure, Function and Factors that influence bone cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015: 421746.

92. Peck WA, Woods WL. The cells of bone. In Osteoporosis: etiology, diagnosis and management. 1ª Ed. New York: Raven Press; 1998.
93. Khan K, McKay H, Kannus P, Bailey D, Wark J, Bennell K. Physical activity and bone health. 1ª Ed. Champaign: Human Kinetics; 2001.
94. Geneser F. Histología. 1ª Ed. Buenos Aires: Panorámica; 2000.
95. Fernández-Tresguerres-Hernandez-Gil I, Alobera Gracia MA, del Canto-Pingarron M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodelling process. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006; 11(2): E151-157.
96. Cui D. Histología con correlaciones funcionales y clínicas. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
97. Stevens A, Lowe J. Histología humana. 3ª Ed. Elsevier; 2007.
98. Poirier J. Histología. Madrid: Masson; 2002.
99. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. Nature. 2003; 423: 332-336.
100. Einhorn TA. The bone organ system: form function. Osteoporosis. San Diego: Academic Press; 1996.
101. Gallagher JC. Advances in bone biology and new treatment for bone loss. Maturitas. 2008; 60:65-69.
102. Seeman E. Pathogenesis on bone fragility in women and men. Lancet. 2002; 359:1841-1850.
103. Smith TH, Burger EH, Huyghe JM. A case for strain-induced fluid flow as a regular of BMU-Coupling and osteonal alignment. J Bone Miner Res. 2002; 17: 2021-2029.
104. Brandi ML. Microarchitecture, the key to bone quality. Rheumatology. 2009; 48(4):iv3-iv8.
105. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. Science. 2000; 289: 1501-1504.
106. Robling AG, Castillo AB, Turner CH: Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. Annu Rev Biomed Eng. 2006; 8: 445-498.
107. Eriksen EF, Hodgson SF, Eastell R, Cedel SL, O'Fallon WM, Riggs BL. Cancellous bone remodelling in type I (postmenopausal) osteoporosis: Quantitative assesment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and celular levels. J Bone Miner Res. 1990; 5: 311-319.
108. Zaidi M. Calcium receptor son eukaryotic cell with especial reference to the osteoclast. Bioci Rep. 1990; 10(6): 493-507.

109. Yates AJ, Oreffo RO, Mayor K, Mundy GR. Inhibition of bone resorption by inorganic phosphate is mediated by both reduced osteoclast formation and decreased activity of matured osteoclast. *J Bone Miner Res.* 1991; 6(5): 472-478.
110. Boursino LA, Karachalios T, Poultsides L, Malizos KN. Do steroids, conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs and selective Cox-2 inhibitors adversely affect fracture healing?. *J Musculoskelet Neuronal Internact.* 2009; 9(1):44-52.
111. LaStayo PC, Winters KM, Hardy M. Fracture healing: bone healing, fracture management, and current concepts related to the hand. *J Hand Ther.* 2003; 16(2): 81-93.
112. Van Gaalen S, Kruyt M, Maijer G, Mistry A, Mikos A, Van de Beuken J, Jansen J, de Groot K, Cancedda R, Olivo C, Yaszemski M, Dhert D. Tissue engineering of bone. *Tissue engineering.* Londres: Academic Press; 2008.
113. Mott DA, Mailhot J, Cuenin MF, Sharawy M, Borke J. Enhancement of osteoblast proliferation in vitro by selective enrichment of demineralized freeze-dried bone allograft with specific growth factors. *J Oral Implantol.* 2002; 28(2): 57-66.
114. Becker WM, Kleinsmith LJ, Hardin J, Bertoni GP. *The world of the cell.* 17ª Ed. Londres: Pearson Education Inc; 2009.
115. Liu F, Malaval L, Gupta AK, Aubin JE: Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation: polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. *Dev Biol.* 1994; 166(1): 220-234.
116. Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol.* 1994; 158(3): 555-572.
117. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone.* 1996; 19(5): 421-428.
118. Hall FL, Han B, Kundu RK, Yee A, Nimmi ME, Gordon EM. Phenotypic differentiation of TGF-beta 1 responsive pluripotent pre-mesenchymal pre-hematopoietic progenitor (P4 stem) cells from murine bone marrow. *J Hematother Stem Cell Res.* 2001; 10(2): 261-271.
119. Murshed M, Harmey D, Millan JL, McKee MD, Karsenty G. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restrictions of ECM mineralization to bone. *Genes Dev.* 2005; 19: 1093-1104.

120. Lian JB, Stein GS. Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1992; 3(3): 269-305.
121. Lian JB, Stein GS. The developmental stage of osteoblast growth and differentiation exhibit selective responses of genes to growth factors (TGF-beta1) and hormones (vitamin D and Glucocorticoids). *J Oral Implantol.* 1993; 19: 95-105.
122. Tulberg-Reinert H, Jundt G. In situ measurement of collagen synthesis by human bone cell with a sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor beta2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochem Cell Biol.* 1999; 112(4): 271-276.
123. Reinholt FP, Hulthén MJ, Heinegård D. Osteopontin: a possible anchor of osteoclast to bone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87(12): 4473-4475.
124. Coulibaly MO, Sietsema DL, Burgers TA, Mason J, Williams BO, Jones CB. Recent advances in the use of serological bone formation markers to monitor callus development and fracture healing. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010; 20(2): 105-127.
125. Yang L, Tianzun T, Fengchen L y col. Experimental study: the effect of desamethasone on adult osteoblast proliferation and differentiation. *Chin J Orthop (Chin).* 2001; 21: 493-497.
126. Doods DM, Merry K, Littlewood A, Gowen M. Expression of mRNA for IL1 beta, IL6 and TGF-beta1 in developing human bone and cartilage. *J Histochem Cytochem.* 1994; 42(6): 733-744.
127. Stein GS, Lian JB, Van Wijnen AJ, Montecino MT. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev.* 1996; 76: 593-629.
128. Reyes-Botella C, Montes MJ, Abadía-Molina AC, Vallecillos-Capilla MF, Ruiz C. CD10 expression in cultured human osteoblast-like cells. *Folia Biologica (Praha).* 1997; 45: 257-260.
129. Reyes-Botella C, Montes MJ, Vallecillos-Capilla MF, Olivares EG, Ruiz C. Expression of molecules involved in antigen presentation and T cell activation (HLA-DR, CD80, CD86, CD44 and CD54) by cultured human osteoblast. *J Periodontol.* 2000; 71: 614-617.
130. Reyes-Botella C, Montes MJ, Abadía-Molina AC, Vallecillos-Capilla MF, Ruiz C. Antigenic phenotype of cultured human osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem.* 2002a; 12: 359-364.
131. Reyes-Botella C, Montes MJ, Abadía-Molina AC, Vallecillos-Capilla MF, Ruiz C. Effect of different growth factors on human cultured osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem.* 2002b; 12: 353-358.

132. Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, Arroyo-Morales M, Rodríguez- Pérez L, Rubio-Ruíz B, Ruiz C. Effects of indomethacin, nimesulide and diclofenac on human MG-63 osteosarcoma cell line. *Biol Res Nurs.* 2012; 14(1): 99-108.
133. Pérez E, García-Martínez O, Arroyo-Morales M, Reyes-Botella C, Ruiz C. Modulation of antigenic phenotype in cultured human osteoblast-like cells by FGFb, FGFbeta1, PDGF-BB, IL-2, IL-1beta. LPS and IFNgamma. *Biosci Rep.* 2006; 26(4): 281-289.
134. García-Martínez O, Reyes-Botella C, Aguilera-Castillo O, Vallecillo-Capilla MF, Ruíz C. Antigenic profile os osteoblast present in human bone tissue sections. *Biosci Rep.* 2006; 26(1): 39-43.
135. Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, Arroyo-Morales M, Reyes-Botella, Ruiz C. Antigenic phenotype and phagocytic capacity of MG-63 osteosarcoma line. *Annals of the New York Academy os Sciences.* 2009; 1173: E46-E54.
136. Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, Arroyo-Morales M, Rubio-Ruíz B, Ruiz C. Effect of paracetamol on human MG63 osteosarcoma celular line. *Acta Pharmacol Sin.* 2010; 31(11): 1495-1499.
137. Karsenty G. Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. *Semin Cell Dev Biol.* 2000; 11(5): 343-346.
138. Ducy P, Zhang V, Georoffroy A, Ridall L, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activatoros osteoblast differentiation. *Cell.* 1997; 89: 747-754.
139. Rifas L, Arackal S, Wietzman MN. Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human marrow stromal cells into mature osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2003; 88(4): 650-659.
140. Stanley KT, Vandort C, Endres J, Fox DA. Immunocompetent properties of human osteoblast: interactions with T Lymphocytes. *J Bone Miner Res.* 2006; 21(1): 29-36.
141. Bost KL, Bento JL, Ellington JK, Mariott I, Hudson MC. Monocyte chemoattractant protein-1 expression by osteoblasts following infection with *Staphylococcus aureus* or *Salmonella*. *J Interferon Cytokine Res.* 2001; 21: 297-304.
142. Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2008; 423: 201-209.
143. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. BOne remodeling during fracture repair: the celular picture. *Seminars in Cells & Developmental Biology.* 2008; 19: 459-466.
144. Robey PG, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddi AH, Termine JD, Sporn MB, Roberts AB. Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) in vitro. *J Cell Biol.* 1987; 105(1): 457-463.

145. Ruiz C, Pérez G, García-Martínez O, Díaz L, Arroyo-Morales M, Reyes-Botella C. Expression of cytokins IL-4, IL-12, IL-18, IFN and modulation by different growth factors in cultured human osteoblasts-like cells. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2007; 25(5):286-292.
146. Takeuchi Y, Fukumoto S, Matsumoto T. Relationship between actions of transforming growth factor (TGF)-beta and cell surface expression of its receptors in clonal osteoblastic cells. *J Cell Physiol*. 1995; 162(3): 315-321.
147. Ishibashi H, Karube S, Yamakawa A, Koshihara Y. Interleukin-4 stimulates pro-alpha 1(VI) collagen gene expression in cultured human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 211(3): 727-734.
148. Nelissen JM, Tosensma R, Pluyter M, Adema GJ, Raymakers RA, van Kooyk Y, Figdor CG. Molecular analysis of the hematopoiesis supporting osteoblastic cell line U2-OS. *Exp Hematol*. 2000; 28(4): 422-432.
149. Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Mitani A, Tanaka S, Matsuoka M, Yamamoto G, Hishikawa T, Noguchi T, Yoshikai Y. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J Immunol*. 2001; 166 (5): 3574-3579.
150. Okada Y, Morimoto I, Ura K, Watanabe K, Eto S, Kumegawa M, Raisz L, Pilbeam C, Tanaka Y. Cell-to-cell adhesion via intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte function-associated antigen-1 pathway is involved in 1alpha,25(OH)2D3, PTH and IL-1alpha induced osteoclast differentiation and bone resorption. *Endocr J*. 2002;49(4):483-495.
151. Lisignoli G, Toneguzzi S, Piacenti A, Cristino S, Cattini L, Grassi yFacchini A. Recruitment and proliferation of T lymphocytes is supported by IFN γ - and TNF α -activated human osteoblast: involvement of CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) adhesion molecules and CXCR3 chemokine receptor. *J Cell Physiol*. 2004; 198: 388-398.
152. Ruiz C, Pérez E, Vallecillo-Capilla M, Reyes-Botella C. Phagocytosis and allogeneic T cell stimulation by cultured human osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem*. 2003; 13(5): 309-314.
153. Pioletti DP, Takei H, Kwon SY, Wood D, Sung KL. The cytotoxic effects of titanium particles phagocytosed by osteoblasts. *J Biomed Mater Res*. 1999; 46(3): 399-407.

154. Lohmann CH, Schwartz Z, Koster G, Janh U, Buchhorn GH, McDougall MJ, Casasolo D, Liu Y, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD. Phagocytosis of wear debris by osteoblasts affects differentiation and local factor production in a manner dependent on particle composition. *Biomaterials*. 2000; 21(6): 551-561.
155. Heinemann DE; Lohmann C, Siggelkow H, Alves F, Engel I, Koster G. Human osteoblast-like cells phagocytose mineral particles and express the macrophage marker CD68 in vitro. *J Bone Joint Surg Br*. 2000a; 82(2): 283-289.
156. Schrum LW, Bost KL, Hudson MC, Marriot I. Bacterial infection induces expression of functional MHC class II molecules in murine and human osteoblasts. *Bone*. 2003a; 33(5): 812-821.
157. Schrum LW, Marriot I, Butler BR, Thomas EK, Hudson MC, Bost KL. Functional CD40 expression induced following bacterial infection of mouse and human osteoblasts. *Infect Immun*. 2003b; 71(3): 1209-1216.
158. Bost KL, Bento JL, Petty CC, Schrum LW, Hudson MC. Induction of colony stimulating factor expression following Staphylococcus or Salmonella interaction with mouse or human osteoblast. *Infect Immun*. 2000; 68: 5075-5083.
159. Gasper NA, Petty CC, Schrum LW, Marriot I, Bost KL. Bacteria induced CXCL10 secretion by osteoblasts can be mediated, in part, through TLR4. *Infect Immun*. 2002; 70: 4075-4082.
160. Nes AG, Posso MB. Patient with moderate chemotherapy-induced mucositis: pain therapy using low intensity lasers. *Int Nurs Rev*. 2005; 52(1): 68-72.
161. Özdemir F, Birtane M, Kokino S. The clinical efficacy of low-power laser therapy on pain and function in cervical osteoarthritis. *Clinical Rheumatology*. 2001; 20 (3): 181-184.
162. Nuñez SC, Silva-Garcés A, Suzuki SS, Simoes-Ribeiro M. Management of mouth opening in patients with temporomandibular disorders through low level laser therapy and transcutaneous electrical neural stimulation. *Photomed and Laser Surg*. 2006; 24(1): 45-49.
163. Muñoz-Sánchez PJ, Capote-Jemenías JL, Díaz-Tejada A, Tunér J. The effect of 670 nm low laser therapy on herpes simple type I. *Photomed and Laser Surg*. 2012; 30(1): 37-40.
164. Agha-Hosseini F, Moslemi E, Mirzaii-Dizgah I. Comparative evaluation of low level laser therapy and CO₂ laser in treatment of patients with lichen planus. *Int J of Oral and Maxillofac Surg*. 2012; 41(10): 1265-1269.

165. Merigo E, Fornaini C, Manfredi M, Meleti M, Alberici F, Corcione L, Buzio C, Rocca JP, Ferri T, Vescovi P. Orofacial granulomatosis treated with low level laser therapy a case report. *Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol.* 2012; 113(6): e25-e29.
166. Fraça CM, Núñez SC, Prates RA, Noborikawa E, Faria MR, Ribeiro Ms. Low- intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters. *J Photchem Photobiol B.* 2009; 94(1): 25-31.
167. Cruz LB, Ribeiro AS, Rech A, Rosa LG, Castro CG Jr, Brunetto AL. Influence of low level laser therapy in the prevention of oral mucositis in children with cancer receiving chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer.* 2007; 48(4): 435-440.
168. Ozen T, Orhan K; Gorur I, Ozturk A. Efficacy of low level laser therapy on neurosensory recovery after injury to the inferior alveolar nerve. *Head Face Med.* 2006; 15(2): 3.
169. Bernal G. Helium Neon and Diode Laser Therapy is an effective adjunctive therapy for facial paralysis. *Laser Therapy.* 1993; 5(2): 79-87.
170. Corona SA, Nascimento TN, Catirse AB, Lizarelli RFZ, Dinelli W, Palma-Dibb RG. Clinical evaluation of low-level laser therapy and fluoride varnish for treating cervical dentinal hypersensitivity. *J Oral Rehabil.* 2003; 30(12): 1183-1189.
171. Pesevska S, Nakova M, Ivanovski K, Angelov N, Kesic L, Obradovic R, Mindova S, Nares S. Dentinal hypersensitivity following scaling and root planing: comparison of low-level laser and topical fluoride treatment. *Lasers Med Sci.* 2010; 25: 647-650.
172. Hashim NT, Gasmall BK, Sabahelkheir AH, Awooda AM. Effect of the clinical application of the diode laser (810nm) in the treatment of dentine hypersensitivity. *BMC Res Notes.* 2014; 7:31.
173. Kimura Y, Wilder-Smith P, Matsumoto K. Lasers in endodontics: a review. *Int Endod J.* 2000; 33: 173-185.
174. Kreisler MB, Al Haj H, Noroozi N, Willershausen B, D'hoedt B. Efficacy of low level laser therapy in reducing postoperative pain after endodontic surgery. A randomized double blind clinical study. *Int J Maxillofac Surg.* 2004; 33: 38-41.
175. Schwarz F, Aoki A, Becker J, Sculean A. Laser application in non-surgical periodontal therapy: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(8): 29-44.
176. Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Bioestimulation of wound healing low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol.* 1996; 23(5): 492-496.
177. da Silva JP, da Silva MA, Almeida AP, Lombardi Jr. I, Matos AP. Laser Therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomed Laser and Surg.* 2010; 28(1): 17-21.

178. Abramovitch-Gottilib L, Gross T, Naveh D, Geresh S, Rosenwaks S, Bar I, Vago R. Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix. *Lasers Med Sci.* 2005; 20(3-4): 138-146.
179. Barber A, Luger JE, Karpf A, Salame KH, Shlomi B, Kogan G, Nissan M, Alon M, Rochkind S. Advances in laser therapy for bone repair. *Laser Therapy.* 2002; 13:80-85.
180. Pires-Oliveira DA, Oliveira RF, Amadei SU, Pacheco-Soares C, Rocha RF. Laser 904nm action on bone repair in rats with osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2010; 21(12): 2109-2114.
181. Bouvet-Gerbettaz S, Merigo E, Roca JP, Carle GF, Rochet N. Effects of low level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Lasers Surg Med.* 2009; 41: 291-297.
182. Dörtbudak O, Haas R, Mailates-Pokorny G. Biostimulation with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res.* 2000; 11(6):540-545.
183. Coombe AR, Ho CT, Darendeliler MA, Hunter N, Philips JR, Chapple CC, Yum LW. The effects of low level laser irradiation on osteoblasts cells. *Clin Orthod Res.* 2001;4: 3-14.
184. Robling AC, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006; 8: 455-498.
185. Saracino S, Mozzati M, Martinasso G, Pol R, Canuto RA, Muzio G. Superpulsed laser irradiation increases osteoblast activity via modulation of bone morphogenetic factors. *Lasers Surg Med.* 2009; 41(4):298-304.
186. Matsumoto MA, Ferino RV, Monteleone GF, Ribeiro DA. Low level laser therapy modulates cyclo-oxygenase 2 expression during bone repair in rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24: 195-201.
187. Ramos-Torrecillas J, De Luna-Bertos E, Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, Rodríguez-Pérez L, Ruiz C. Hyaluronic acid as a treatment option for pressure ulcers. *Wounds.* 2013; 25(12): 328-332.
188. Ramos-Torrecillas J, García-Martínez O, De Luna-Bertos E, Ocaña-Peinado FM, Ruiz C. Effectiveness of platelet-rich plasma and hyaluronic acid for the treatment and care of pressure ulcers. *Biol Res Nurs.* 2015;17(2): 152-158.
189. Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J, Ayerdi E, Cabezas AL, Orive G, Andia I. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *Mater Res B Appl Biomater.* 2008; 84(2):415-421.

190. Ramos-Torrecillas J, De Luna-Bertos E, García-Martínez O, Ruiz C. Clinical utility of growth factors and platelet-rich plasma in tissue regeneration: a review. *Wounds*. 2014;26(7):207-213.
191. Weber JBB, Pinheiro ALB, de Oliveira MG, Oliveira FAM, Ramalho LMP. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. *Photomed and Laser Surg*. 2006; 24(1): 38-44.
192. Eduardo FP, Bueno DF, de Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo CP, Zatz M. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Laser Surg Med*. 2008; 40(6): 433-438.

JUSTIFICACIÓN

De un tiempo a esta parte, el láser se ha introducido como herramienta útil en muchas disciplinas médicas. Mientras que en el campo de la óptica su incorporación fue muy temprana, en el caso de la odontología ha sido más tardía. En un principio, su uso en el ámbito odontológico fue principalmente quirúrgico, pero con el desarrollo de nuevos láseres, sus aplicaciones se han ido ampliando gradualmente, siendo sin duda, la fotobioestimulación o fotobiomodulación, una de las aplicaciones que más importancia está cobrando a nivel clínico y de investigación.

A tenor de esto, se ha referenciado anteriormente una serie de estudios que muestran que los láseres de baja potencia producen un efecto fotobioestimulador sobre distintas poblaciones celulares.

Son escasos y contradictorios los estudios que han analizado la utilidad del láser de diodo de baja energía en la regeneración del tejido óseo; no encontrándose evidencias claras sobre los parámetros dosimétricos, las consecuencias celulares y moleculares del tratamiento con el láser. Por todo ellos consideramos de interés profundizar sobre la acción bioestimulante del láser de diodo de baja energía y su mecanismo de acción sobre el osteoblasto.

De tal manera que los resultados obtenidos fundamentarán la utilidad clínica del láser en el tratamiento de las lesiones óseas, acotando los parámetros óptimos para que se produzca bioestimulación ósea en aquellas situaciones clínicas que así lo requieran.

HIPÓTESIS

El láser de diodo de baja energía posee un efecto fotobioestimulador sobre el osteoblasto, el cual se traduce en un incremento del crecimiento, estimulación de la diferenciación celular y modulación del perfil antigénico y la capacidad fagocítica. Esos cambios son consecuencia de un aumento de la expresión génica de los marcadores de diferenciación y de los factores de crecimiento (proteínas morfogenéticas y TGF β y sus receptores) del osteoblasto.

OBJETIVOS

Para dar respuesta a nuestra hipótesis de trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto bioestimulante del láser de diodo de 940 nm sobre osteoblastos humanos en cultivo, utilizando la línea MG63 como modelo de osteoblasto.


OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto del láser de diodo sobre la proliferación del osteoblasto, determinándose mediante *screening* las dosis óptimas de tratamiento.
2. Identificar el efecto del tratamiento del láser de diodo sobre distintos parámetros celulares del osteoblasto: diferenciación, expresión antigénica y capacidad fagocítica.
3. Determinar la modulación que ejerce el láser de diodo de baja energía sobre la expresión génica de diferentes marcadores de diferenciación del osteoblasto tales como: colágeno tipo 1, osteocalcina, fosfatasa alcalina, osterix, y RUNX-2.
4. Identificar el mecanismo de acción por el cual se produce el efecto bioestimulante del láser de baja energía, mediante el estudio de la expresión génica de los marcadores principalmente implicados en el proceso de reparación ósea (BMP-2, BMP-7 y TGF- β 1); así como los receptores del TGF- β (TGF β -R1, TGF β -R2, TGF β -R3).

OBJETIVO 1

Determinar el efecto del láser de diodo sobre la proliferación del osteoblasto, determinándose mediante *screening* las dosis óptimas de tratamiento.

Effect and Clinical Implications of the Low-Energy Diode Laser on Bone Cell Proliferation

Biological Research for Nursing
00(0) 1-6
© The Author(s) 2013
Reprints and permission:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1099800413482695
brn.sagepub.com


Rosa Medina Huertas, MS^{1,2}, Elvira De Luna-Bertos, PhD¹,
Javier Ramos-Torrecillas, MS¹, Francisco Medina Leyva, PhD¹,
Concepción Ruiz, PhD^{1,3}, and Olga García-Martínez, PhD¹

Abstract

Laser is a simple, noninvasive technique that has proven useful for treating damaged tissue. However, its effects on bone regeneration and the mechanisms involved are poorly understood. The objective of this study was to evaluate the effects on MG-63 cell proliferation of application of a pulsed diode laser (Ezlase) of 940 nm at low energy levels. After 24 hr of culture, osteoblasts underwent pulsed laser radiation at 0.5, 1, 1.5, and 2 W and fluences of 1–5 J. A control group was not irradiated. After the treatment, cells were incubated for 24 hr, and cell proliferation was analyzed using a spectrophotometric measure of cell respiration (MTT assay). Results were expressed as percentage proliferation versus controls. At 24-hr culture, cell proliferation was increased in laser-treated cells at intensities of 0.5, 1, and 1.5 W/cm² versus controls; the energy density was positively correlated with cell growth, which reached a peak at 3 J and decreased at higher fluences. The use of pulsed low-level laser with low-energy density range thus appears to exert a biostimulatory effect on bone tissue. Although the data on cell proliferation are robust, in-depth investigation is required into the effect of these irradiation doses on other cell parameters. The present findings demonstrate that laser therapy could be highly useful in tissue regeneration in different clinical settings, including nursing, physical therapy, dentistry, and traumatology.

Keywords

diode laser, osteoblasts, cell proliferation, cell growth, bone

Over the past few years, laser has proved to be a simple and noninvasive technique highly useful in different fields of medicine, including dentistry and orthopedics (Cobb, 2006). Among the various types of laser employed for clinical purposes, diode laser is one of the most widely used. High- and low-energy lasers serve different clinical purposes (Pearson & Schuckert, 2003). High-energy laser has a thermal effect and can be used to cut, coagulate, and vaporize, making it useful for surgical and antibacterial applications. Low-energy laser has no thermal effect, but clinicians make wide use of its biostimulatory effects to aid in the healing and regeneration of tissue in implantology and periodontics (Bouvet-Gerbetaz, Merigo, Rocca, Carle, & Rochet, 2009). Low-level laser therapy (LLLT) also has anti-inflammatory (De Paula Eduardo et al., 2010; Pejčić, Kojović, Kesic, & Obradović, 2010) and analgesic effects (De Paula Eduardo et al., 2010).

Some researchers have also suggested that LLLT has a stimulatory effect on bone regeneration. Bone is a highly complex tissue formed by organic matrix and specific bone cells. Osteoblasts are functionally the most important cells in bone and are characterized by their localization in bone, ability to form mineralized matrix, and capacity to synthesize bone

proteins. They play a fundamental role in bone formation and repair, processes regulated by various growth and/or hormone factors (Bostrom, Yang, & Koutras, 2000). Bone tissue can be compromised by trauma or fracture or by the application of orthopedic material as a repair technique. The main clinical objective in these situations is to allow the regenerative process of the bone by rapid formation of the bone callus with osseointegration of prosthetic materials. Osteoblasts are the bone cells involved in the formation and regeneration of this tissue

¹ Biomedical Group (BIO277), Department of Nursing, Faculty of Health Sciences, University of Granada, Granada, Spain

² Department of Stomatology, University of Granada, Granada, Spain

³ Institute of Neuroscience, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, University of Granada, Armilla (Granada), Spain

Corresponding Author:

Olga García-Martínez, PhD, Biomedical Group (BIO277), Department of Nursing, Faculty of Health Sciences, University of Granada, Avda. Madrid s/n, Granada 18071, Spain.
Email: ogm@ugr.es

(Robling, Castillo, & Thurner, 2006), and strategies to favor their growth, such as LLLT, are of major clinical relevance.

The biostimulatory effect of LLLT on osteoblasts is a controversial issue, with some authors reporting a favorable effect on bone regeneration (Ozawa, Shimizu, Kariya, & Abiko, 1998) and others observing no significant impact (Coombe et al., 2001). Jakse et al. (2007) observed no effect of LLLT on the regenerative capacity of bone but did detect a positive impact on dental implant osseointegration. In in vitro tests, Stein et al. (2008) observed that the proliferation and differentiation of osteoblast-like cells (SaOs-2) were positively affected by laser irradiation at doses of 1 or 2 J/cm², using a diode laser with a 670-nm wave length and output power of 400 nW.

Although it seems clear that LLLT contributes to creating environmental conditions that accelerate healing of bone fractures and defects (Howard & Sturtevant, 1998), researchers do not yet fully understand the mechanism of induction. The objective of the present study was to evaluate the effects of pulsed laser irradiation on human osteoblast growth using a 940-nm diode laser at 0.5–2 W energy and intensities of 1–5 J. We used the human MG-63 osteosarcoma cell line, which is frequently used as an in vitro model to study the effects of treatments on human osteoblasts (Díaz-Rodríguez, García-Martínez, Arroyo-Morales, Rubio Ruiz, & Ruiz, 2010).

Materials and Methods

Cell Culture

We purchased the human MG-63 osteosarcoma cell line from American Type Cultures Collection (ATCC, Manassas, VA) and maintained it in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Invitrogen Gibco Cell Culture Products, Carlsbad, CA) with 100 IU/ml penicillin (Lab Roger SA, Barcelona, Spain), 50 µg/ml gentamicin (Braun Medical SA, Jaen, Spain), 2.5 µg/ml amphotericin B (Sigma, St. Louis, MO), 1% glutamine (Sigma), and 2% HEPES [(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)] (Sigma), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Paisley, UK). Cultures were kept at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. Cells were detached from the culture flasks with a solution of 0.05% trypsin (Sigma) and 0.02% ethylene diamine tetraacetic acid (Sigma) and then washed and suspended in complete culture medium with 10% FBS (Díaz-Rodríguez, García-Martínez, Arroyo-Morales, & Ruiz, 2012). We then divided the cells into two groups, treating one with the laser irradiation technique and using the other as a control.

Laser Irradiation

We used a gallium–aluminum–arsenide diode laser (ezLase™, Biolase Technology, Inc., Irvine, CA), which operates in the near infrared spectrum at a wavelength of 940 nm, has a power output of 70 mW, and a spot diameter of 400 µm. Cells were seeded in 24-well plates at an adequate distance from each other to avoid overlapping or scattered irradiation. After 24 hr, we pulse-irradiated the cultures at doses of 1, 2, 3, 4, or 5

J and intensities of 0.5, 1, 1.5, or 2 W/cm², with the probe tip held at a distance of 1 cm from the cell layer. The plates were not covered during the irradiation procedure that was performed at room temperature.

Cell Proliferation Assay

After laser treatment, we incubated cells for 24 hr and measured cell proliferation by MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] assay. We replaced the media with DMEM without phenol red, containing 0.5 mg/ml MTT (Sigma), and incubated the cells for 4 hr. Cellular reduction of the MTT tetrazolium ring resulted in the formation of a dark purple water-insoluble deposit of formazan crystals. After incubation, we aspirated the medium and added dimethyl sulfoxide to dissolve the formazan crystals. We measured absorbance at 570 nm with a spectrophotometer (Sunrise™, Tecan, Mannedorf, Switzerland). Results were expressed as the percentage of cell proliferation with respect to the control group and were calculated according to the following formula:

$$\text{Percentage proliferation} = (\text{treated group OD}_{570} / \text{control group OD}_{570}) \times 100.$$

We conducted at least three experiments for each treatment and used the mean value in the analysis.

Statistical Analysis

We used Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v 15.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL) for the statistical analysis. Data were reported as mean ± standard deviation. We performed a two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) to examine the effects on proliferation, considering intensities (0.5, 1, 1.5, and 2 W/cm²), doses (1, 2, 3, 4, and 5 J), and the interaction between these two factors. We evaluated differences between means using the Games-Howell test. We considered differences between experimental groups to be statistically significant at $p < .05$.

Results

Figures 1–3 illustrate the increase in cell proliferation in MG63 cells cultured for 24 hr after irradiation by diode laser at intensities of 0.5, 1, and 1.5 W/cm² with fluences of 1–5 J relative to the control culture, which was not irradiated. We observed increased proliferation at intensities of 0.5, 1, and 1.5 W/cm² and fluences of 2–5 J. In all cases, we observed a positive correlation between energy density and cell growth, with peak growth occurring at 3 J of fluence. Irradiation with the diode laser set at an intensity of 1.5 W/cm² and a fluence of 3 J produced the greatest effect on cell proliferation ($p < .001$), with an increase of >30% compared to the control culture. Irradiation at the same intensity and fluences of 4 and 5 J produced similar increases in cell growth ($p < .001$). While irradiation with the diode laser at an intensity of 2 W/cm² increased cell proliferation versus control at all fluencies after 24 hr of culture, the difference was not significant.

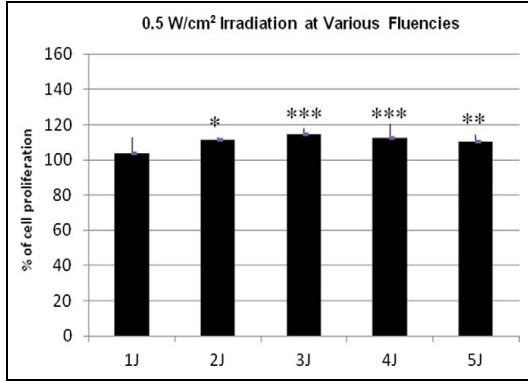


Figure 1. Effects of the 0.5 W/cm² laser irradiation at doses of 1–5 J on the proliferation of the MG63 cells relative to the control culture after 24 hr of incubation. Data were expressed as $M \pm SD$. * $p = .002$, ** $p = .007$, and *** $p = .0001$ versus the control culture.

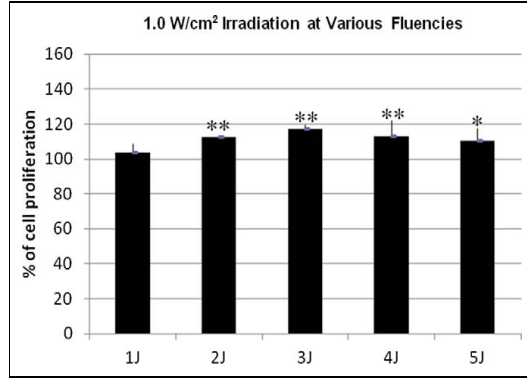


Figure 2. Effects of the 1 W/cm² laser irradiation at doses of 1–5 J on the proliferation of the MG63 cells relative to the control culture after 24 hr of incubation. Data were expressed as $M \pm SD$. * $p = .002$, ** $p = .0001$.

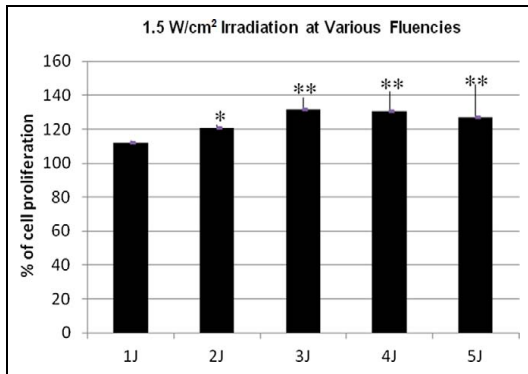


Figure 3. Effects of the 1.5 W/cm² laser irradiation at doses of 1–5 J on the proliferation of the MG63 cells relative to the control culture after 24 hr of incubation. Data were expressed as $M \pm SD$. * $p = .002$, ** $p = .0001$.

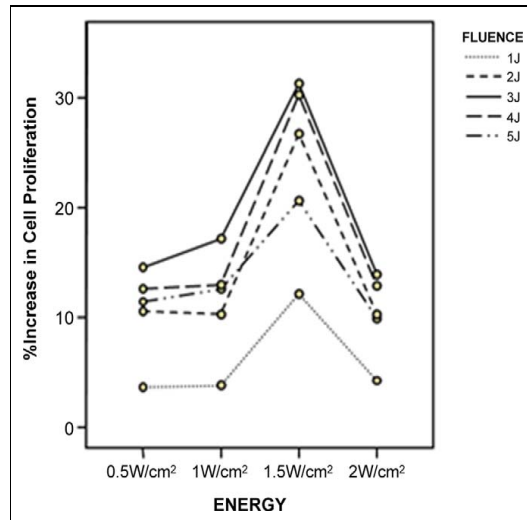


Figure 4. Percentage increase in MG-63 cell proliferation (by flow cytometry) after irradiation with 0.5, 1, 1.5, and 2 W/cm² diode laser at 1, 2, 3, 4, and 5 J, relative to the control culture.

Energy and fluence were both clearly significant in a factorial model that included the effect of both variables together on cell proliferation (Figure 4). The R^2 value was .362, indicating that power and fluence jointly explained 36.2% of the variability of proliferation.

There was no interaction between power and fluence ($p = .914$), which indicates that the differences in proliferation between the different energy levels is the same at different fluence levels (Table 1). After applying the Games-Howell test and conducting multiple comparisons between different energy levels, we determine that irradiation with a diode laser at 1.5 W/cm² exerts a greater effect on bone cell proliferation than the other modalities studied ($p < .0001$).

Discussion

The effect of LLLT on bone regeneration has recently become a focus of research. Although there have been encouraging

findings in both in vivo and in vitro studies, the effect of LLLT on bone healing remains controversial (Bouvet-Gerbetz et al., 2009). Data in the literature confirm that LLLT can stimulate the osseointegration of biomaterials and enhance the growth and functional recovery of bone. However, differences in experimental model and execution between studies make comparison of the results difficult and could explain the controversy.

In the present study, we observed a significant increase in cell proliferation after irradiation of the bone cell culture by laser at energy levels of 0.5, 1, and 1.5 W, with a positive correlation between the fluence applied and the percentage

Table 1. Analysis of Variance for Cell Proliferation After Irradiation With Diode Laser.

Source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F statistic	p Value
Corrected model	9336.976 ^a	19	491.420	5.750	.000
Intercept	2083260.628	1	2083260.628	24375.973	.000
Energy	5530.744	3	1843.581	21.572	.000
Fluence	3297.794	4	824.448	9.647	.000
Energy × Fluence	508.438	12	42.370	496	.914
Error	11964.917	140	85.464		
Total	2104562.520	160			
Corrected total	21301.893	159			

^aR² = .438 (corrected R² = .362).

increase in growth versus the control culture, which was not irradiated. We observed a peak in cell proliferation at a fluence of 3 J. Our results are in agreement with those of previous researchers, such as Ozawa, Shimizu, Kariya, and Abiko (1998), who found that a low-level laser applied at 0.5–3 J/cm² doses for three consecutive days had a positive effect on bone cell proliferation. They concluded that laser has a beneficial effect on bone cell growth after a number of applications but not after only a single application using the same parameters. Bouvet-Gerbettaz, Merigo, Rocca, Carle, and Rochet (2009) obtained similar results. In the present study, however, we found a significant increase in proliferation in cells cultured for 24 hr after a single application of pulsed laser.

Previous researchers have also evaluated LLLT's effect on the proliferative capacity and properties of osteoblasts. Khadra, Lyngstadaas, Haanaes, and Mustafa (2005) reported that attachment, proliferation, and differentiation of human mandibular bone-derived cells cultured on titanium implant material were enhanced after 48 and 72 hr of low-level laser irradiation, with a significant increase in osteocalcin synthesis and transforming growth factor-β1 production. The authors concluded that LLLT induced differentiation of the osteoblast-like cells in a dose-dependent manner. Additional investigators have also reported effects on cell differentiation with an increase in bone nodule formation (Ueda & Shimizu, 2003) and alkaline phosphatase activity (Hamajima et al., 2003; Ozawa et al., 1998) in rat calvaria. Stein, Benayahu, Maltz, and Oron (2005) reported that LLLT with a helium–neon (HeNe) laser set at a 632-nm wavelength increased the in vitro proliferation and differentiation of human osteoblasts after 48 and 72 hr of cell irradiation but not after 24 hr, as in the present study.

The variation in the irradiation parameters used between studies makes it difficult to compare results and to establish clinical guidelines for laser therapy. In the present study, we included a factorial ANOVA for the laser-irradiated samples, with energy and fluence as factors, and observed that the interaction between the variables was not significant.

Moreover, when we applied pulsed laser therapy at higher intensities of radiation (2 W), the proliferation of the cells did not increase significantly versus controls. These results may indicate a direct short-term adverse effect on bone cells at radiation intensities of ≥2 W. It is well documented that high-energy doses applied to bone tissue can produce heat-

induced free radicals or disturb the homeostasis of cellular calcium, resulting in cell and tissue damage (Howard & Sturtevant, 1998), while lower energy treatment can enhance cell growth without producing cell damage (Díaz-Rodríguez, García-Martínez, Arroyo Morales, Ramos Torrecilla, et al., 2012). We observed a similar effect at elevated fluences (4 and 5 J), with fluences above 3 J decreasing the cells' proliferative capacity. It is possible that this finding indicates a direct adverse effect on cell viability, similar to that described for higher energy values.

Based on the biostimulation effects we observed in the present study, LLLT applied at 0.5–1.5 W/cm² may be useful in regenerative therapy in patients with negative predictive factors for osseointegration. Previous findings on the application of laser energy for regenerative purposes support our results, reporting that shock wave energy can either lengthen or shorten cell life span, with a significant negative correlation between cell viability and the flux density of energy (Martini et al., 2003; Ueda & Shimizu, 2003).

The photochemical effects of laser light depend on a combination of at least three parameters: wavelength, energy density/fluence, and irradiation frequency. Researchers initially attributed the biostimulating effect of LLLT on the osteogenic potentiality of bone cells to the formation of small amounts of reactive oxygen species, which would increase mitochondrial activity and adenosine triphosphate formation (Morimoto, Aria, Kikuchi, Nakajima, & Nakamura, 1994). More recently, authors have attributed these effects to an increase in expression of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (Sarcino et al., 2009), a nuclear receptor involved in cell proliferation (Lin, Yang, Tang, Lin, & Fu, 2007) or to the activation of extracellular signal-regulated protein kinase (Biko, Ishikawa, & Izumi, 2010). Investigators have suggested that biostimulation selectively occurs during the proliferative and earlier stages of differentiation of immature precursors (Pinheiro & Gerbi, 2006). Moreover, Ninomiya et al. (2007) reported that osteoblasts and preosteoblasts were activated after 1 and 3 days of laser irradiation, suggesting the induction of active bone formation. Coombe et al.'s (2001) earlier observation that LLLT of fractured bone is most effective during the early period of expansion supports that suggestion.

Researchers have explored laser application as adjuvant therapy in the conventional treatment of periodontal disease and have found positive effects on the regeneration of dental

support tissues leading to higher stability of the affected teeth (Saygun et al., 2008). The growth and differentiation of osteoblasts are key stages in the regenerative process of the bone after dental implants; the biostimulatory effect of LLLT increases the osteogenic capacity of the bone cells and their adhesion to the titanium surfaces of the implants, which may contribute to the success of reparative therapy (Khadra, Lyngstadaas, Haanaes, & Mustafa, 2005).

The results of the present study combined with those of previous research suggest that LLLT may be highly useful for bone regeneration therapy in different clinical settings. LLLT is a simple and inexpensive treatment available to health care professionals in a variety of fields, including nursing, physical therapy, dentistry, and traumatology, for the treatment of pathologies that require tissue regeneration. Further studies are needed to clarify the effects of laser treatment on different parameters involved in the regenerative processes of different tissues.

Acknowledgment

The authors are grateful to lecturer Francisco M. Ocaña-Peinado at the University of Granada for the statistical revision of this research, which improved the article.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship and/or publication of this article: This study was supported by research group BIO277 (Junta de Andalucía) and by the Department of Nursing of the Health Sciences, School of the University of Granada.

References

- Biko, Y., Ishikawa, I., & Izumi, Y. (2010). Low level Er: YAG laser irradiation enhanced osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. *Laser in Medical Science*, 25, 559–569.
- Bostrom, M. P. G., Yang, X., & Koutras, I. (2000). Biologics in bone healing. *Current Opinion in Orthopaedics*, 11, 403–412.
- Bouvet-Gerbetz, S., Merigo, E., Rocca, J. P., Carle, G. F., & Rochet, N. (2009). Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Laser in Surgery and Medicine*, 41, 291–297.
- Cobb, C. M. (2006). Laser in periodontics: A review of the literature. *Journal of Periodontology*, 77, 545–564.
- Coombe, A. R., Ho, C. T., Darendeliler, M. A., Hunter, N., Philips, J. R., Chapple, C. C., & Yum, L. W. (2001). The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clinical Orthodontic and Research*, 4, 3–14.
- De Paula Eduardo, C., Moreira De Freitas, P., Esteves-Oliveira, M., Corrêa Aranha, A. C., Múler Ramalho, K., & Simões, A., . . . Tunér, J., (2010). Laser phototherapy in the treatment of periodontal disease. *Laser in Medical Science*, 25, 781–792.
- Díaz-Rodríguez, C. L., García-Martínez, O., Arroyo-Morales, M., Rubio Ruiz, B., & Ruiz, C. (2010). Effect of paracetamol on human MG63 osteosarcoma cellular line. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31, 1495–1499.
- Díaz-Rodríguez, L., García-Martínez, O., Arroyo Morales, M., Ramos Torrecilla, J., De Luna-Bertos, E., & Ruiz, C. (2012). Effect of radial extracorporeal shock wave therapy (r-ESWT) on different parameters of human osteoblasts (MG63). *Advanced Science Letter*, 5, 1–5.
- Díaz-Rodríguez, L., García-Martínez, O., Arroyo-Morales, M., & Ruiz, C. (2012). Effects of indomethacin, nimesulide and diclofenac on human MG-63 osteosarcoma cell line. *Biological Research for Nursing*, 14, 90–107.
- Hamajima, S., Hiratsuka, K., Kiyama-Kishikawa, M., Tagawa, T., Kawahara, M., & Ohta, M., . . . Abiko, Y. (2003). Effect of low-level laser irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. *Laser in Medical Science*, 18, 78–82.
- Howard, G., & Sturtevant, B. (1998). In vitro study of the mechanical effect of shock-wave lithotripsy. *Ultra Medicine Biology*, 23, 1107–1122.
- Jakse, N., Payer, M., Tangl, S., Berghold, A., Kirmeyer, R., & Lorenzoni, M. (2007). Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implant following sinus augmentation: An experimental study on sheep. *Clinical Oral Implants Research*, 18, 517–524.
- Khadra, M., Lyngstadaas, S. P., Haanaes, H. R., & Mustafa, K. (2005). Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials*, 26, 3503–3509.
- Lin, T. H., Yang, R. S., Tang, C. H., Lin, C. P., & Fu, W. M. (2007). PPARgamma inhibits osteogenesis via the down-regulation of the expression of COX-2 and iNOS in rat. *Bone*, 41, 562–574.
- Martini, L., Giavaresi, G., Fini, M., Torricelli, P., De Pretto, M., & Schaden, W. (2003). Effect of extracorporeal shock wave therapy on osteoblastic-like cells. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 413, 269–280.
- Morimoto, Y., Aria, T., Kikuchi, M., Nakajima, S., & Nakamura, H. (1994). Effect of low-intensity argon laser irradiation on mitochondrial respiration. *Lasers in Surgery and Medicine*, 15, 191–199.
- Ninomiya, T., Hosoya, A., Nakamura, H., Sano, K., Nishisaka, T., & Ozawa, H. (2007). Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblasts. *Bone*, 40, 140–148.
- Ozawa, Y., Shimizu, N., Kariya, G., & Abiko, Y. (1998). Low-energy laser irradiation stimulated bone nodule formation at early stages of cell cultured in rat calvarial cell. *Bone*, 22, 347–354.
- Pearson, G. J., & Schuckert, K. H. (2003). The role of lasers in dentistry: Present and future. *Dental Update*, 30, 70–76.
- Pejčić, A., Kojović, D., Kesic, L., & Obradović, R. (2010). The effects of low level laser irradiation on gingival inflammation. *Photomedicine and Laser Surgery*, 28, 69–74.
- Pinheiro, A. L., & Gerbi, M. E. (2006). Photoengineering of bone repair processes. *Photomedicine and Laser Surgery*, 24, 169–178.
- Robling, A. G., Castillo, A. B., & Thurner, C. H. (2006). Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 6, 455–498.
- Saracino, S., Mozzati, M., Martinasso, G., Pol, R., Canuto, R. A., & Muzio, G. (2009). Superpulsed laser irradiation increases

- osteoblast activity via modulation of bone morphogenetic factors. *Lasers in Surgery and Medicine*, 41, 298–304.
- Saygun, I., Karacay, S., Serdar, M., Ural, A. U., Sencimen, M., & Kurtis, B. (2008). 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 in Medical Science*, 23, 211–215.
- Stein, A., Benayahu, D., Maltz, L., & Oron, U. (2005). Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomedicine and Laser Surgery*, 23, 151–166.
- Stein, E., Sutter, W., Wendtlandt, G., Wanschitz, F., Thurnher, D., Baghestanian, M., & Turhani, D. (2008). Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Med Wochenschr*, 120, 112–117.
- Ueda, Y., & Shimizu, N. (2003). Effects of pulse frequency of low-level laser therapy (LLLT) on bone nodule formation in rat calvarial cells. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*, 21, 271–277.

OBJETIVO 2

Identificar el efecto del tratamiento del láser de diodo sobre distintos parámetros celulares del osteoblasto: diferenciación, expresión antigénica y capacidad fagocítica.

The effects of low-level diode laser irradiation on differentiation, antigenic profile, and phagocytic capacity of osteoblast-like cells (MG-63)

Rosa Medina-Huertas · Francisco Javier Manzano-Moreno ·
Elvira De Luna-Bertos · Javier Ramos-Torrecillas ·
Olga García-Martínez · Concepción Ruiz

Received: 13 November 2013 / Accepted: 21 February 2014 / Published online: 12 March 2014
© Springer-Verlag London 2014

Abstract Previous in vivo and in vitro studies have reported that low-level diode laser therapy induces a biostimulatory effect, such as cell proliferation. The aim of the present study was to evaluate whether the laser irradiation of osteoblast-like cells (MG-63) can modify alkaline phosphatase activity (ALP), antigenic profile, and phagocytic capacity. The MG-63 cell line was exposed to diode laser (ezLase) of 940 nm at 1–1.5 W/cm² and 3–4 J. ALP was evaluated by a spectrophotometric technique and antigenic expression analysis (CD 54, CD80, CD86, HLA-DR), and phagocytic activity was analyzed by flow cytometry. At 24 h, the treated groups showed an increased ALP, and the highest increase versus controls ($P=0.002$) was at the dose of 1 W/cm² and 3 J; this modulation of the antigenic profile translated into a reduced expression of CD54, CD86, and HLA-DR and a slightly decreased phagocytic capacity with respect to the nonirradiated control group at the different intensities and fluencies assayed. These results demonstrate that laser therapy can exert a biostimulatory effect on osteoblastic cells at different levels, which may be clinically useful in the regeneration of bone tissue.

Keywords Alkaline phosphatase · Biostimulatory effect · Low-level laser therapy · Osteoblast · Antigenic expression · Phagocytic capacity

Introduction

Laser therapy has proven highly useful in biomedicine, with the use of different laser types and energies for distinct purposes [1, 2]. Thus, low-level laser can have anti-inflammatory, analgesic, and biostimulatory effects and is therefore used clinically for wound healing and tissue regeneration [3–7].

Various in vivo and in vitro studies have demonstrated the biostimulatory effect of low-level laser energy on cell populations of diverse origin [8–10], but the underlying mechanisms are not fully understood. Numerous studies have suggested that low-level laser therapy increases the regenerative potential of biological tissues by modulating cellular metabolic processes [11], and it has been reported to induce proliferation and differentiation in osteoblasts [12, 13]. In a previous study, we observed a positive correlation between the energy density applied and the growth rate, which reached a maximum value at 3 J and decreased with higher fluency values [14]. Pyo et al. [15] attributed the biostimulatory effect of low-level laser on osteoblasts to an increased expression of type 2 bone morphogenetic protein (BMP-2) and transforming growth factor (TGF)- β 1, among other factors. BMP-2 and TGF- β 1 are autocrine factors that regulate osteoblast proliferation and differentiation [16, 17].

Bone is a complex tissue under continuous remodeling, and osteoblasts are the cells responsible for bone formation and regeneration. Osteoblasts have also been attributed with immunological functions, including the expression of markers of antigen-presenting capacity (CD54,

R. Medina-Huertas · E. De Luna-Bertos · J. Ramos-Torrecillas ·
O. García-Martínez · C. Ruiz (✉)
BIO277 Group, Faculty of Health Sciences, University of Granada,
Granada 18071, Spain
e-mail: crr@ugr.es

R. Medina-Huertas · F. J. Manzano-Moreno · E. De Luna-Bertos ·
J. Ramos-Torrecillas · O. García-Martínez · C. Ruiz
Instituto Investigación Biosanitaria, Granada 18071, Spain

F. J. Manzano-Moreno
BIO277 Group, School of Dentistry, University of Granada,
Granada, Spain

CD80, CD86, HLA-DR), the allogeneic stimulation of T cells, phagocytic activity, and cytokine synthesis [16, 18–20]. It has been found that the presence of certain growth factors, such as TGF- β 1, fibroblast growth factor (FGF)-bb, and platelet-derived growth factor (PDGF), decreases the expression of antigen presentation markers in osteoblasts [21].

The objective of this study was to determine the effect of low-level diode laser on osteoblast differentiation, antigenic expression, and phagocytic capacity, using the osteoblast-like MG-63 cell line for this purpose.

Material and methods

Cell culture

The human MG-63 osteosarcoma cell line was purchased from American Type Cultures Collection (ATCC, Manassas, VA) and maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Invitrogen Gibco Cell Culture Products, Carlsbad, CA) with 100 IU/mL of penicillin (Lab Roger SA, Barcelona, Spain), 50 μ g/mL of gentamicin (Braun Medical SA, Jaen, Spain), 2.5 μ g/mL of amphotericin B (Sigma, St Louis, MO), 1 % glutamine (Sigma, St Louis), and 2 % HEPES (Sigma, St Louis) and supplemented with 10 % of fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Paisley, UK). Cultures were kept at 37 °C in a humidified atmosphere of 95 % air and 5 % CO₂. Cells were detached from the culture flask with a solution of 0.05 % trypsin (Sigma, St Louis) and 0.02 % ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (Sigma, St Louis) and then washed and suspended in a complete culture medium with 10 % of FBS.

Laser irradiation

We used a GaAlAs diode laser (ezLase™, Biolase Technology, Inc. 4 Cromwell Irvine, USA), which operates in the near-infrared spectrum at a wavelength of 940 nm, with power output of 70 mW and spot diameter of 400 μ m. Cells were seeded in 24-well plates at 1×10^4 cells/mL per well and at an adequate distance from each other to avoid overlapping or scattered irradiation. After 24 h, the cultures were pulse-irradiated at doses and intensities of 1 W/cm²-3 J (14.7 s), 1.5 W/cm²-3 J (10.6 s), 1 W/cm²-4 J (19.31 s) or 1.5 W/cm²-4 J (12.96 s), with the probe tip held at 1 cm from the cell layer. The plates were not covered during the irradiation procedure, which was performed at room temperature. All experiments included a control group of cells grown under the same conditions but not irradiated.

Alkaline phosphatase activity

The effect on osteoblast-like cell differentiation was assessed by evaluating the alkaline phosphatase activity (ALP) activity of MG-63 cells cultured in an osteogenic medium [22] and treated with diode laser. ALP activity was quantified by using a colorimetric assay (Diagnostic kit 104-LL, Sigma, St. Louis, MO, USA) to determine early osteoblast differentiation.

This assay measures the conversion by ALP enzyme of the colorless substrate *p*-nitrophenyl phosphate to the yellow product *p*-nitrophenol: the rate of color change corresponds to the amount of enzyme present in the solution. Standard solutions of *p*-nitrophenol (0–250 μ M) were prepared from dilutions of a 1,000- μ M stock solution and assayed in parallel. The ALP assay was performed as described by Sandrini et al. [23]. Cells were seeded into 24-well plates at 1×10^4 cells/mL per well and cultured in the osteogenic medium under standard conditions for 7 days. The culture medium was then replaced by a fresh medium, and the cells were irradiated with diode laser, followed by their culture for 48 h under standard conditions. Untreated cells were used as control group. Finally, the cells were lysed with 0.1 % (*v/v*) Triton X-100, at 37 °C. Samples were then centrifuged at 1,500 rpm, and the supernatants were stored at –70 °C until their use. ALP activity was determined by using *p*-nitrophenol phosphate as substrate, as follows: the cell lysate solution (50 μ L) was added to 50 μ L of ALP substrate (Sigma, St Louis, MO, USA) and incubated at 37 °C for 45 min in darkness.

The enzymatic reaction was stopped by adding 50 μ L of 0.1 M NaOH, and finally, the absorbance was measured at 405 nm with a spectrophotometer (Biotek EL \times 800). The total protein content was also estimated with a protein assay kit from Bio-Rad Laboratories (Nazareth-Eke, Belgium), based on Bradford's method. All samples were run in triplicate, and specific ALP activity was expressed in U/mg cellular protein.

Antigenic phenotype

Antigenic phenotype was studied by flow cytometry at 24 h of culture after diode laser treatment. Untreated cells were used as controls.

Cells were then detached from the cultured flask by treatment with 0.4 % (*w/v*) EDTA solution, washed, and suspended in phosphate-buffered saline (PBS) at 2×10^4 cells/mL. Cells were labeled by direct staining with the monoclonal antibodies (MAbs) CD54, CD80, CD86, and HLA-DR (CD54/IOL1b, CD80, CD86, and OKDR, respectively from Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA). Aliquots of 100 μ L cell suspension were incubated with 10 μ L of the appropriate MAb for 30 min at 4 °C in darkness. Cells were washed, suspended in 1 mL PBS, and immediately analyzed in a flow cytometer with diode laser (FASC Canton II, SE Becton Dickinson, Palo Alto, CA, USA) at a wavelength of 488 nm

to determine the percentage of fluorescent cells. Untreated cells were used as controls. The percentage of antibody-positive cells was calculated from counts of 2,000–3,000 cells. At least three experiments were run for each antigen in all cultures.

Phagocytic activity

Phagocytic activity was studied by flow cytometry at 24 h of culture after diode laser treatment. Untreated cells were used as controls. Human MG-63 osteosarcoma cells were detached from the culture flask by treatment with 0.04 % EDTA solution, washed, and then suspended in a complete culture medium with 10 % FBS at 1×10^6 cells/mL. Cells were labeled by direct staining with labeled latex beads, incubating 100 μ L of cell suspension with 200- μ L carboxylated FICT-labeled latex beads with a diameter of 2 μ m (Sigma, St Louis) for 30 min at 37 °C in darkness. Cells were washed, suspended in 1 mL PBS, and immediately analyzed in a flow cytometer (FASC Canton II, SE Becton Dickinson, Palo Alto, CA). Control assays were carried out at 4 °C. Results were obtained as the percentage of cells positive for phagocytosis.

Statistical analysis

SPSS version 21.0 (IBM, Chicago, IL) was used for the data analysis. Analysis of variance (ANOVA) was performed to examine the effects on ALP synthesis as a function of the energy dose (1 or 1.5 W/cm²) and fluence (3 or 4 J) in comparison to the control group. The antigenic profile and phagocytic activity were compared by using the Student's *t* test. $P < 0.05$ was considered significant in all tests. Before applying the Student's *t* test, we used the Shapiro-Wilk test to calculate the normal distribution of these values ($P > 0.05$ in all groups). At least three experiments were performed in all assays. Data were expressed as means \pm standard deviation (SD).

Results

Effect of diode laser irradiation on ALP of MG-63 cells

All radiation modalities assayed showed an increase in the ALP activity of osteoblast-like cells cultured in the osteogenic medium, although the difference versus controls was not significant at a dose of 1.5 W/cm² in intensity and 4 J.

The dose with the greatest effect on ALP activity was 1 W/cm² and 3 J, which produced a 95.6 % increase in treated cells versus control cells ($P = 0.002$) (Table 1).

Table 1 Alkaline phosphatase activity in MG-63 cell line after 48 h of pulsed laser irradiation at doses of 3 or 4 J and intensities of 1 or 1.5 W/cm². Data are expressed as U/mg protein

	ALP activity	SD	<i>P</i>
Control	1.82	0.06	–
1 W/cm ² -3 J	3.56	0.18	0.002*
1 W/cm ² -4 J	2.79	0.15	0.004*
1.5 W/cm ² -3 J	2.55	0.09	0.001*
1.5 W/cm ² -4 J	1.92	0.07	0.146

SD standard deviation

* $P < 0.05$ significant difference

Effect of diode laser irradiation on antigenic phenotype of MG-63 cell line

The flow cytometry results in Table 2 show that the expression of CD54, CD86, and HLA-DR membrane antigens was reduced versus nonirradiated controls in the MG-63 cells cultured for 24 h after diode laser irradiation at the different intensities and fluencies assayed. However, no effects on CD80 antigens were observed.

Effect of diode laser irradiation on the phagocytic activity of MG-63 cells

Results of flow cytometry with fluorescent latex beads in Table 3 show a slight reduction in phagocytic activity versus nonirradiated controls in cells cultured for 24 h after irradiation with diode laser at the different intensities and fluencies assayed.

Discussion

Therapies that more effectively promote osteoblast growth and maturation would benefit numerous patients who require bone tissue regeneration, including those with periodontal disease, bone necrosis, bone traumatism, or those undergoing repair with implants, among others. The results of this study demonstrate that irradiation with low-level diode laser in pulsed mode not only stimulates osteoblast growth, as recently reported by Medina-Huertas et al. [14], but also exerts an action on other cell parameters. Thus, in regard to cell differentiation, irradiation at doses of 1 W/cm²/3 J, 1 W/cm²/4 J, or 1.5 W/cm²/3 J produced a major and significant increase in ALP activity, suggesting a favorable effect on the maturation process. The most effective irradiation dose in this respect was 1 W/cm²/3 J.

Osteoblast lineage differentiation is a complex process characterized by the sequential and defined expression of tissue-specific genes that permit the identification of three

Table 2 Percentage expression of different antigens in MG-63 cell line after 24 h of treatment with diode laser irradiation. Treatment groups: 1 W/cm²/3 J, 1 W/cm²/4 J, 1.5 W/cm²/3 J, and 1.5 W/cm²/4 J. Control group: not treated with diode laser

	CD54 (%)			CD80 (%)			CD86 (%)			HLA-DR (%)		
	Mean	SD	P ≤	Mean	SD	P ≤	Mean	SD	P ≤	Mean	SD	P ≤
Control	75.83	0.75	–	19.96	2.21	–	12.93	0.28	–	5.26	0.37	–
1 W/cm ² -3 J	56.40	0.62	0.001*	17.33	3.69	0.362	9.86	0.92	0.005*	2.76	1.35	0.037*
1 W/cm ² -4 J	58.10	2.59	0.001*	16.06	1.56	0.074	9.96	0.68	0.002*	3.0	0.26	0.001*
1.5 W/cm ² -3 J	53.80	1.30	0.001*	15.93	3.70	0.196	9.166	0.49	0.001*	2.56	0.25	0.001*
1.5 W/cm ² -4 J	55.76	3.64	0.001*	14.23	3.48	0.085	9.50	0.20	0.000*	2.73	0.20	0.001*

SD standard deviation

*P<0.05 significant differences

phases: proliferation, maturation, and extracellular matrix synthesis/mineralization. Specific genes for the differentiated osteoblast phenotype are expressed in the second phase, including genes that encode for alkaline phosphatase (AP) and osteocalcin, producing a high level of AP synthesis [24].

Osteoblast growth and differentiation are controlled by local and systemic factors, including BMPs, growth factors (FGF, IGF, TGF), hormones, cytokines, and even mechanical forces, which in turn regulate the activity of specific transcription factors. These factors can show different and even opposite effects on the cellular metabolism as a function of the maturation degree and phenotype of the cell [25]. Multiple exogenous factors of a highly diverse nature have been reported to modulate osteoblast differentiation or maturation [26–29].

The ability of laser irradiation to modulate gene expression and release growth factors and cytokines from cells in culture was previously demonstrated [30]; the authors proposed that biomolecules released in response to irradiation may function as autocrine factors on the osteoblasts through mitogenic properties and/or the ability to induce their differentiation or maturation.

Table 3 Flow cytometry results for percentage of phagocytic cells in MG-63 cell line at 24 h of diode laser treatment. Treatment groups: 1 W/cm²/3 J, 1 W/cm²/4 J, 1.5 W/cm²/3 J, and 1.5 W/cm²/4 J. Control group: not treated with diode laser

	Phagocytic cells (%)	SD	P
Control	98.50	0.26	–
1 W/cm ² -3 J	97.63	0.37	0.031*
1 W/cm ² -4 J	96.20	0.10	0.000*
1.5 W/cm ² -3 J	97.50	0.10	0.023*
1.5 W/cm ² -4 J	97.43	0.58	0.045*

SD standard deviation

*P<0.05 significant difference

TGF-β1 plays an important role in regulating and stimulating the differentiation of osteoprogenitors during fracture repair [31]. Numerous authors have described this growth factor, among others, as responsible for the biostimulatory effect observed in osteoblast cells in response to shock waves [32, 33]. It was previously reported that low-level laser therapy induces the expression of BMP-2, osteocalcin, and TGF-β1 [15]. Basic fibroblast growth factor (FGFb) has also been implicated in osteoblast proliferation and differentiation [25, 34, 35]. Saygun et al. [36] observed that the laser irradiation of cultured osteoblasts increased their proliferative capacity and the expression of FGFb, insulin-like growth factor (IGF-I), and IGF-I receptor (IGFBP3); these authors suggested that the biostimulatory effect on the osteoblast may be attributable to increased growth factor synthesis.

Laser irradiation treatment produced a decrease in the expression of CD54, CD86, and HLA-DR antigens in the present study. These markers modulate their expression in the presence of different substances, notably cytokines, growth factors, platelet-rich plasma, bacterial lipopolysaccharide (LPS), and even certain pharmaceuticals [21, 37–39]. In this regard, in vitro treatment with TGF-β1 of human osteoblasts obtained by primary culture from bone samples is known to significantly reduce their expression of CD54 and CD86 without altering their expression of CD80 or HLA-DR. However, treatment with FGFb, PDGF-BB, or IL-2 does not modulate the expression of the molecules involved in antigen presentation. Nonetheless, there is a significant increase in the expression of these markers in response to IL-1β, IFNγ, and LPS [21]. These data, alongside previous findings on cytokine (IL-4, IL-12, IL-15, IL-18, and IFNγ) expression in the osteoblast and their modulation by different factors (FGF, TGF-β1, and PDGF) and cytokines (IL-1 and IFNγ) [21], suggest that the functional capacity of osteoblasts is modulated during their differentiation and maturation, with a gain in their bone-forming function at the expense of their immunological function. The present results support this hypothesis, with observations of an increase in AP activity and a parallel

decrease in the expression of CD54, CD86, and HLA-DR antigens, as well as a slight decrease in phagocytic capacity.

A paper recently published by Davies et al. [40] reported an absorption peak of 560 nm for DMEM with phenol red. Also, these authors recommended investigating the energy loss from other light sources, especially those with a longer wavelength, such as pulsed diode laser with a wavelength of 910 nm. In this sense, we have not yet established whether there is absorption at 940 nm, the wavelength used in the present study.

We do not know the mechanisms underlying the biostimulation produced by laser irradiation. The aim of our study was to determine its effects on different parameters of the osteoblast; however, research on the underlying mechanisms should be subject of future studies. We do not rule out that the thermal effect of laser may be one mechanism of its action. Nevertheless, it should be borne in mind that the maximum temperature reached was below 60 °C in order to prevent the denaturation of proteins and hence cell death; indeed, the laser treatment produced an increase in the number of living cells.

These findings indicate that low-level diode laser irradiation may be useful in the treatment of bone regeneration through a biostimulatory effect on osteoblasts that favors their growth and maturation. This effect appears to be mediated by the autocrine action of growth factors released by the cells themselves in response to the laser treatment, as recently proposed [15].

Acknowledgments This study was supported by the grant CEI2013-MP-20 from CEI-BIOTIC (Ministerio de Ciencia e Innovación), research group BIO277 (Junta de Andalucía), and Department of Nursing (University of Granada).

References

1. Hashmi JT, Huang YY, Sharma SK, Kurup DB, De Taboada L, Carroll JD, Hamblin MR (2010) Effect of pulsing in low-level light therapy. *Lasers Surg Med* 42(6):450–466
2. Babilas P, Landthaler M (2010) New developments in laser therapy. *Hautarzt* 63(suppl1):59–66
3. Bouvet-Gerbetaz S, Merigo E, Rocca JP, Carle GF, Rochet N (2009) Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Lasers Surg Med* 41:291–297
4. Pejčić A, Kojović D, Kesić L, Obradović R (2010) The effects of low level laser irradiation on gingival inflammation. *Photomed Laser Surg* 28:69–74
5. da Silva JP, da Silva MA, Almeida AP, Lombardi Junior I, Matos AP (2010) Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomed Laser Surg* 28(1):17–21
6. De Paula Eduardo C, Moreira De Freitas P, Esteves-Oliveira M, Corrêa Aranha AC, Müller Ramalho K, Simões A, Bello-Silva MS, Tunér J (2010) Laser phototherapy in the treatment of periodontal disease. *Lasers Med Sci* 25:781–792
7. Alves AC, de Carvalho PT, Parente M, Xavier M, Frigo L, Aimbire F, Leal EC Jr, Albertini R (2013) Low-level laser therapy in different stages of rheumatoid arthritis: a histological study. *Lasers Med Sci* 28(2):529–536
8. Garavello I, Baranauskas V, da Cruz-Höfling MA (2004) The effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae. *Histol Histopathol* 19(1):43–48
9. Khadra M, Ronold HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haanaes HR (2004) Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 15(3):325–332
10. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M (2005) Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg* 31(3):334–340
11. Kamali F, Bayat M, Torkaman G, Ebrahimi E, Salavati M (2007) The therapeutic effect of low-level laser on repair of osteochondral defects in rabbit knee. *J Photochem Photobiol B* 88(1):11–15
12. Stein E, Koehn J, Sutter W, Wendtlandt G, Wanschitz F, Thurnher D, Baghestanian M, Turhani D (2008) Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr* 120(3–4):112–117
13. da Silva AP, Petri AD, Crippa GE, Stuani AS, Rosa AL, Stuani MB (2012) Effect of low-level laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *Lasers Med Sci* 27(4):777–783
14. Medina-Huertas R, Luna-Bertos ED, Ramos-Torrecillas J, Medina-Leyva F, Ruiz C, García-Martínez O (2013) Effect and clinical implications of the low-energy diode laser on bone cell proliferation. *Biol Res Nurs*. doi:10.1177/1099800413482695
15. Pyo SJ, Song WW, Kim IR, Park BS, Kim CH, Shin SH, Chung IK, Kim YD (2013) Low-level laser therapy induces the expressions of BMP-2, osteocalcin, and TGF- β 1 in hypoxic-cultured human osteoblasts. *Lasers Med Sci* 28(2):543–550
16. Reyes-Botella C, Montes MJ, Vallecillo-Capilla MF, Olivares EG, Ruiz C (2002) Antigenic phenotype of cultured human osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem* 12:359–364
17. Kasagi S, Chen W (2013) TGF- β 1 on osteoimmunology and the bone component cells. *Cell Biosci* 3(1):4
18. Ruiz C, Pérez E, Vallecillo-Capilla MF, Reyes-Botella C (2003) Phagocytosis and allogeneic T cell stimulation by cultured human osteoblastic-like cells. *Cell Physiol Biochem* 13:309–314
19. Stanley KT, Vandort C, Motyl C, Endres J, Fox DA (2006) Immunocompetent properties of human osteoblasts: interactions with T lymphocytes. *J Bone Miner Res* 21:29–36
20. Ruiz C, Pérez E, García-Martínez O, Díaz-Rodríguez L, Arroyo-Morales M, Reyes-Botella C (2007) Expression of cytokines IL-4, IL-12, IL-15, IL-18, and IFN γ and modulation by different growth factors in cultured human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Metab* 25:286–292
21. Pérez E, García-Martínez O, Arroyo-Morales M, Reyes-Botella C, Ruiz C (2006) Modulation of antigenic phenotype in cultured human osteoblasts-like cells by FGFb, TGF β 1, PDGF-BB, IL-2, IL-1 β , LPS and IFN γ . *Biosci Rep* 26:281–289
22. Manzano-Moreno FJ, Rodríguez-Martínez JB, Ramos-Torrecillas J, Vallecillo-Capilla MF, Ruiz C, García-Martínez O, Reyes-Botella C (2013) Proliferation and osteogenic differentiation of osteoblast-like cells obtained from two techniques for harvesting intraoral bone grafts. *Clin Oral Investig* 17(5):1349–1356
23. Sandrini E, Morris C, Chiesa R, Cigada A, Santin M (2005) In vitro assessment of the osteointegrative potential of a novel multiphase anodic spark deposition coating for orthopaedic and dental implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 73B:392–399
24. Papachroni KK, Karatzas DN, Papavassiliou KA, Basdra EK, Papacassiliou GP (2009) Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends Mol Med* 15:208–216
25. Komori T (2010) Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res* 339:189–195

26. Nogueira GT, Mesquita-Ferrari RA, Souza NHC, Artlheiro PP, Albertini R, Bussadori SK, Fernandes KPS (2012) Effect of low-level laser therapy on proliferation, differentiation, and adhesion of steroid-treated osteoblast. *Lasers Med Sci* 27(6):1189–1193
27. Ing SW, Belury MA (2011) Impact of conjugated linoleic acid on bone physiology: proposed mechanism involving inhibition of adipogenesis. *Nutr Rev* 69(3):123–131
28. Vandrovová M, Bacakova L (2011) Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants. *Physiol Res* 60:403–417
29. De Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A (2007) Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res A* 80:554–564
30. Peplow PV, Chung TY, Ryan B, Baxter GD (2011) Laser photobiomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg* 29:285–304
31. Eingartner C, Coerper S, Fritz J, Gaissmaier C, Koveker G, Weise K (1999) Growth factors in distraction osteogenesis: immunohistological pattern of TGF-beta 1 and IGF-1 in human callus induced by distraction osteogenesis. *Int Orthop* 23:253–259
32. Wang FS, Yang KD, Chen RF, Wang CJ, Sheen-Chen SM (2008) Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF-beta1. *J Bone Joint Surg (Br)* 84(3):457–461
33. Chen YJ, Wurtz T, Wang CJ, Kuo YR, Yang KD, Huang HC, Wang FG (2004) Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGFβ1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rat. *J Orthop* 22:526–534
34. Reyes-Botella C, Vallecillo-Capilla MF, Ruiz C (2002) Effect of different growth factors on human cultured osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem* 12:353–358
35. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E (2003) Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 24:218–235
36. Saygun I, Nizam N, Ural AU, Serdar MA, Avcu F, Tözüm TF (2012) Low-level laser irradiation affects the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I), and receptor of IGF-I (IGFBP3) from osteoblasts. *Photomed Laser Surg* 30:149–154
37. De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, García-Martínez O, Guildford A, Santin M, Ruiz C (2013) Therapeutic doses of non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit osteosarcoma MG-63 osteoblast-like cells maturation, viability and biomineralization potential. *Sci World J*. doi:10.1155/2013/809891
38. Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, Arroyo-Morales M, Rodríguez-Pérez L, Rubio-Ruiz B, Ruiz C (2011) Effects of indomethacin, nimesulide and diclofenac on human MG-63 osteosarcoma cell line. *Biol Res Nurs* 14:99–108
39. García-Martínez O, Reyes-Botella C, Díaz-Rodríguez L, De Luna Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Vallecillo Capilla MF, Ruiz C (2011) Effect of platelet-rich plasma on growth and antigenic profile of human osteoblasts and its Clinical Impact. *J Oral Maxillofac Surg* 70:1558–1564
40. Davies LB, Kieman MN, Bishop JC, Thornton CA, Morgan G (2014) The impact of cell culture equipment on energy loss. *Lasers Med Sci* 29(1):195–202

OBJETIVOS 3 Y 4

- Determinar la modulación que ejerce el láser de diodo de baja energía sobre la expresión génica de diferentes marcadores de diferenciación del osteoblasto tales como: colágeno tipo 1, osteocalcina, fosfatasa alcalina, osterix, y RUNX-2.
- Identificar el mecanismo de acción por el cual se produce el efecto bioestimulante del láser de baja energía, mediante el estudio de la expresión génica de los marcadores principalmente implicados en el proceso de reparación ósea (BMP-2, BMP-7 y TGF- β 1); así como los receptores del TGF- β (TGF β -R1, TGF β -R2, TGF β -R3).



The effect of low-level diode laser therapy on early differentiation of osteoblast via BMP-2/TGF- β 1 and its receptors



Francisco J. Manzano-Moreno^{a, b, c, 1}, Rosa Medina-Huertas^{b, 1},
Javier Ramos-Torrecillas^{b, c}, Olga García-Martínez^{b, c}, Concepción Ruiz^{b, c, d, *}

^a Department of Stomatology (Head: Prof. Pilar Aranda-Ramírez), School of Dentistry, University of Granada, Spain

^b Biomedical Group (BIO277), Department of Nursing (Head: Prof. Pilar Aranda-Ramírez), Faculty of Health Sciences, University of Granada, Spain

^c Instituto Investigación Biosanitaria, ibs.Granada (Head: Prof. Nicolas Olea-Serrano), Spain

^d Institute of Neuroscience (Head: Prof. Pilar Aranda-Ramírez), Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Armilla (Granada), University of Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Paper received 1 July 2015

Accepted 26 August 2015

Available online 9 September 2015

Keywords:

Low-level diode laser therapy

Bioestimulatory effect

Osteoblast

Tissue regeneration

Gene expression

ABSTRACT

Objectives: The objective of this study was to determine the effect of LLDL therapy on the gene expression of osteoblast markers of growth and differentiation.

Materials and methods: The MG-63 cell line was exposed to diode laser (ezLase) of 940 nm at 1–1.5 W and 3–4 J, and gene expressions (Runx-2, alkaline phosphatase [ALP], type I collagen [Col-I], osteix [OSX], osteocalcin [OSC], osteoprotegerin [OPG], bone morphogenetic protein [BMP]-2 and -7, transforming growth factor- β 1 [TGF- β 1], and TGF- β receptors [TGF- β R1, TGF- β R2; TGF- β R3]) were evaluated by quantitative RT-PCR.

Results: LLDL treatment stimulated the expression of osteoblast differentiation markers ALP, Col-I, Runx-2, and OSX in relation to the doses applied ($P < 0.05$), but no changes were detected in OSC, OPG, or BMP-7 at any study dose. This effect may be mediated by TGF- β 1 and BMP-2, given that the treatment increased their expression and that of TGF- β receptors R1, R2, and R3 ($P < 0.001$).

Conclusion: These results suggest that the bioestimulatory effect of laser therapy on osteoblasts may be attributable to the release of autocrine factors in response to the irradiation. A clinical trial is warranted to test its therapeutic usefulness in bone tissue regeneration and to define a treatment protocol.

© 2015 European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Low-level diode laser (LLDL) is attributed with anti-inflammatory, analgesic, and bioestimulatory effects. The combination of these therapeutic properties with its non invasiveness and easy management make it an especially useful clinical technique for tissue wound-healing and regeneration (Bouvet-Gerbetz et al., 2009; da Silva et al., 2010; Pejčić et al., 2010; de Paula Eduardo et al., 2010; Alves et al., 2013). Low level laser therapy is a clinically well accepted tool in regenerative medicine and dentistry. However, the precise mechanisms and effects on bone

regeneration remain unclear, and we are not able to offer a definitive clinical treatment protocol (Amid et al., 2014).

The osteoblast is the cell responsible for bone tissue formation and regeneration and is therefore involved in the repair of bone affected by traumatism or the application of orthopedic material (Robling et al., 2006). It has been reported that the *in vitro* treatment of osteoblast-like cells with LLDL affects their growth and differentiation (Stein et al., 2008; da Silva et al., 2012; Pyo et al., 2013; Medina-Huertas et al., 2014; Huertas et al., 2014). The treatment increases the proliferative capacity of the osteoblast in a dose-dependent manner and favors osteoblast differentiation/maturation by enhancing alkaline phosphatase (ALP) synthesis and reducing the expression of antigens CD54, CD86, and HLA-DR, which have been related to osteoblast differentiation/maturation (Medina-Huertas et al., 2014; Huertas et al., 2014). LLDL treatment also increases the gene expression of the differentiation markers bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and osteocalcin (OSC) (Stein et al., 2008; da Silva et al., 2012; Pyo et al., 2013). Saygun et al. (2012) suggested that the bioestimulatory effect on the osteoblast

* Corresponding author. Faculty of Health Sciences, University of Granada, Avda. De la Ilustración s/n, 18016-Granada, Spain. Tel.: +34 958243497; fax: +34 958242894.

E-mail address: ctr@ugr.es (C. Ruiz).

¹ Authors Manzano-Moreno FJ and Medina-Huertas R contributed equally to this study.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2015.08.026>

1010-5182/© 2015 European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Estudio in vitro del efecto bioestimulante del láser de diodo de 940 nm sobre el tejido: el osteoblasto

Rosa Medina Huertas

F.J. Manzano-Moreno et al. / Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery 43 (2015) 1926–1932

1927

may be attributable to the increased synthesis of growth factors, such as basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I), and IGF-I receptor (IGFBP3). Medina-Huertas et al. (2014) suggested that transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) may be responsible for the biostimulatory effects of LLDL. TGF- β 1 is an autocrine factor that regulates osteoblast proliferation and differentiation (Reyes-Botella et al., 2002; Kasagi and Chen, 2013), and was reported to be the growth factor with the most important role in regulating and stimulating osteoprogenitor differentiation during fracture repair (Chen et al., 2012).

The objective of this study was to determine the effect of LLDL on the gene expression of BMP-2, BMP-7, TGF- β 1, and TGF- β receptors (TGF- β R1, TGF- β R2, TGF- β R3) and on the expression of the main markers of osteoblast differentiation: Runx-2, ALP, type I collagen (Col-I), osterix (OSX), osteoprotegerin (OPG) and OSC.

2. Material and methods

2.1. Cell culture

The human MG-63 osteosarcoma cell line was purchased from American Type Cultures Collection (ATCC, Manassas, VA) and maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco, Paisley, Scotland) without phenol red, with 100 IU/mL penicillin (Lab Roger SA, Barcelona, Spain), 50 μ g/mL gentamicin (Braun Medical SA, Jaen, Spain), 2.5 μ g/mL amphotericin B (Sigma, St Louis, MO), 1% glutamine (Sigma), and 2% HEPES (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Paisley, Scotland). Cultures were kept at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. Cells were detached from the culture flask with a solution of 0.05% trypsin (Sigma) and 0.02% ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (Sigma) and then washed and suspended in complete culture medium with 10% FBS. MG-63 cells are widely used as osteoblast model because they share similar characteristics.

2.2. Laser irradiation

A GaAlAs diode laser (EzLase 940 nm, Biolase Technology, Inc. 4 Cromwell Irvine, CA) was used, which operates in the near-infrared spectrum with a maximum power of 10 W and wavelength of 940 nm. It incorporates a 3 mW laser guide that emits a wavelength between 630 and 670 nm. The cells were irradiated using a dental bleaching hand-piece. A silicone support was fabricated to hold the hand-piece in a reproducible position with an incidence angle of the photon beam on the wells of 90°, allowing the hand-piece to be kept in contact with the upper edge of the well at a distance of 1 cm from the cell layer. Prior to the irradiation, a calibrator (Nova II, Ophir Photonics, Darmstadt Germany) was used to calibrate the power and energy (J) supplied by the laser. The cells were cultured in plates of 24 wells at 1×10^4 cells/ml with a surface area of 1.93 cm². The wells containing cells were surrounded by empty wells to avoid radiation scattering effects. After 24 h, the cultures were irradiated with four different doses (1 W-3 J; 1 W-4 J; 1.5 W-3 J; 1.5 W-4 J) by establishing four groups of three wells each and a fifth group of control wells that received no irradiation. In all cases, the irradiation was emitted in pulsed mode, with cycles of 20 ms pulse interval/20 ms pulse length. The plates were not covered during the irradiation procedure, which was performed at room temperature. All experiments included a control group of cells grown under the same conditions but not irradiated.

2.3. RNA extraction and cDNA synthesis (reverse transcription)

At 24 h of culture after diode laser treatment (untreated cells were used as controls), osteoblast-like cells were detached from

the culture flask by treatment with 0.05% trypsin–EDTA solution (Sigma) and individually harvested. mRNA was extracted using a silicate gel technique provided by the QiagenRNeasy extraction kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany), which included a DNase digestion step. The amount of extracted mRNA was measured by UV spectrophotometry at 260 nm (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), and contamination with proteins was determined according to the 260/280 ratio. An equal amount of RNA (1 μ g of total RNA in 40 μ L of total volume) was reverse-transcribed to cDNA and amplified by PCR with iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's protocol.

2.4. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

In order to detect mRNA of Runx-2, OSX, OSC, OPG, Col-I, ALP, BMP-2, BMP-7, TGF- β 1, TGF- β R1, TGF- β R2, and TGF- β R3, primers were designed using NCBI-nucleotide library and Primer3-design (Table 1). All primers had been matched to the mRNA sequences of the target genes (NCBI Blast software).

Ubiquitin C (UBC), peptidylprolyl isomerase A (PPIA), and ribosomal protein S13 (RPS13) were evaluated as stable housekeeping genes to normalize the final results (Vandesompele et al., 2002; Ragni et al., 2013).

Quantitative RT-PCR (q-RT-PCR) was performed with EvaGreen® technology using the SsoFast™ EvaGreen® Supermix Kit (Bio-Rad laboratories) and following the manufacturer's protocol. Samples were amplified in 96-well microplates in an IQ5-Cycler (Bio-Rad laboratories) using an annealing temperature (specific for each gene) ranging from 60 °C to 65 °C and an elongation temperature of 72 °C over 40 cycles. PCR reactions were carried out in a final volume of 20 μ L, with 5 μ L of cDNA sample and 2 μ L of each primer. For the negative control, water was used instead of mRNA-samples. Standard curves were constructed for each target gene by plotting Ct values against log cDNA dilution. After each RT-PCR, a melting profile was created and agarose gel electrophoresis of each sample was carried out to rule out nonspecific PCR products and primer dimers. The relative quantification of gene expression was determined using the comparative Ct method. For each gene, the mRNA concentration was expressed in ng of mRNA per average ng of housekeeping mRNAs. The cDNA from individual cell experiments was analyzed in triplicate RT-PCR studies.

2.5. Statistical analysis

SPSS 22.0 (IBM, Chicago, IL) was used for all data analyses. mRNA levels were expressed as means \pm standard deviation (SD). Comparisons were made with a two-tailed unpaired Student's *t* test. *P* < 0.05 was considered statistically significant in all tests. At least three experiments were performed in all assays.

3. Results

3.1. Effect of LLDL therapy on the expression of genes involved in osteoblast differentiation

Quantitative RT-PCR (q-RT-PCR) analysis was utilized to evaluate the expression of different genes involved in osteoblast differentiation (Runx-2, Col-I, ALP, OSX, OPG, and OSC). As shown in Figs. 1 and 2, and Table 2 irradiation of osteoblast-like cells (MG-63) for 24 h increased the expression of osteoblast differentiation genes Runx-2, ALP, Col-I, and OSX as a function of the dose (*P* \leq 0.04) but had no effect on OPG or OSC gene expression.

Estudio in vitro del efecto bioestimulante del láser de diodo de 940 nm sobre el tejido:
el osteoblasto
Rosa Medina Huertas

1928

F.J. Manzano-Moreno et al. / Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery 43 (2015) 1926–1932

Table 1
Primer sequences for the amplification of cDNA by real-time PCR.

Gene	Sense primer	Antisense primer	Amplicon (bp)
TGF-β1	5'-TGAACCGCCTTCTGCTTCTCATG-3'	5'-GCGGAAGTCAATGTACAGCTGCCG-3'	152
TGF-β R1	5'-ACTGGCAGCTGTCATTGCTGGACCAG-3'	5'-CTGAGCCAGAACCTGACGTTGTCATATCA-3'	201
TGF-β R2	5'-GGCTCAACACCAGGGCATCCAGAT-3'	5'-CTCCCGAGAGCCTGCCAGATGCT-3'	139
TGF-β R3	5'-ACCGTATGGGCAATTGCGTTGCA-3'	5'-GTGCTCTGCGTCTGCCAGTGTCT-3'	173
RUNX-2	5'-TGGTTAATCTCCGCAGGTAC-3'	5'-ACTGTGCTGAAGAGGCTGTTG-3'	143
OSX	5'-TGCCTAGAAGCCCTGAGAAA-3'	5'-TTAACTTGGGCTTGAGA-3'	205
BMP-2	5'-TCGAAATCCCGCTGACCAAG-3'	5'-CCACTCCACACCAAGTCCA-3'	142
BMP-7	5'-CTGGTCTTTGCTGCACTGG-3'	5'-GTACCCCTCAACAAGGCTTC-3'	202
ALP	5'-CCAAGCTGGCTAAGAAATGTCATC-3'	5'-TGGGCATTGGTGTGTACGTC-3'	175
COL-1	5'-AGAAGTGTACATCAAGCAAG-3'	5'-GAGTTTACAGGAAGCAGACA-3'	471
OSC	5'-CCATGAGAGCCCTCACACTCC-3'	5'-GGTCAGCCAACTGTCACAGTC-3'	258
OPG	5'-ATGCAACACAGCACAAACATA-3'	5'-GTTCCGTTTTATCCTCTCT-3'	198
UBC	5'-TGGGATGCAAAATCTTCTGGAAGCCCTGAC-3'	5'-ACCAAGTGCAGAGTGGACTCTTCTGGATG-3'	213
PPIA	5'-CCATGGCAATGCTGGACCAACACAAATG-3'	5'-TCTGAGCTACAGAAGGAATGATCTGGTG-3'	256
RPS13	5'-GGTGTTCACAAAGTACGTTTGTGACAGGC-3'	5'-TCATATTTCCAATTGGGAGGAGACTCGC-3'	251

3.2. Effect of LLDL therapy on gene expression of BMP-2, BMP-7, TGF-β1 and receptors (TGF-β R1, TGF-β R2, and TGF-β R3)

Figs. 3 and 4, and Table 3 depict the q-RT-PCR results for gene expression of BMP-2, BMP-7, TGF-β1 and the receptors TGF-β R1, TGF-β R2, and TGF-β R3. After irradiation of osteoblast-like (MG-63) cells with LLDL for 24 h, their TGF-β1 expression was significantly higher than in controls at all doses applied. The expression of TGF-β1 at 24 h was two-fold higher after treatment with LLDL at a dose of 1.5 W and 3 or 4 J ($P \leq 0.006$). As depicted in Fig. 4, this treatment also increased the expression of the three types of TGF-β1 receptor ($P \leq 0.04$). The expression of BMP-2 was increased after 24 h of treatment with doses of 1 W/3 J, 1 W/4 J, and 1.5 W/3 J ($P = 0.005$, $P = 0.001$, and $P < 0.001$, respectively), but no changes in BMP-7 expression were detected at any dose studied.

4. Discussion

The results of this study demonstrate that irradiation with LLDL in pulsed mode has a biostimulatory effect on osteoblasts, suggesting its possible clinical usefulness in diseases that require bone tissue regeneration, including periodontal disease, dental implants, bone necrosis, or bone traumatism, or in patients undergoing repair with implants, among others. LLDL treatment significantly increased the expression of early osteoblast differentiation genes such as Runx-2, ALP, Col-1 and OSX, but did not change the expression of osteoblast mineralization markers OSC or OPG. The treatment produced a parallel increase in the expression of BMP-2, TGF-β1 and TGF-β receptors R1, R2, and R3.

According to these results, LLDL treatment of the MG-63 cell line increases the expression of markers related to early but not late

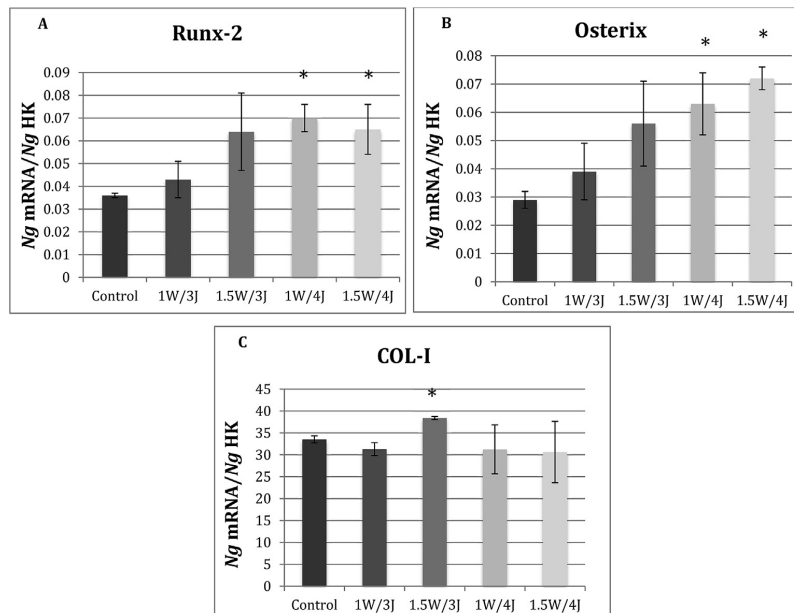


Fig. 1. Expression of osteoblast differentiation genes irradiated at doses of 1 W-3 J, 1.5 W-3 J, 1 W-4 J, or 1.5 W-4 J: A) Runx-2; B) Osterix; C) type I Collagen. Data are expressed as ng of mRNA per average ng of housekeeping mRNAs \pm SD. * Significant differences ($P < 0.05$).

Estudio in vitro del efecto bioestimulante del láser de diodo de 940 nm sobre el tejido:
el osteoblasto
Rosa Medina Huertas

F.J. Manzano-Moreno et al. / Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery 43 (2015) 1926–1932

1929

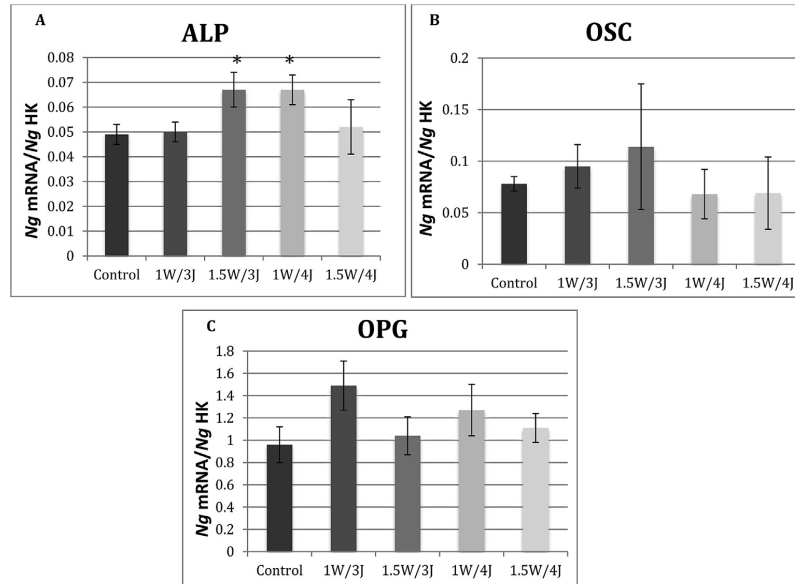


Fig. 2. Expression of osteoblast differentiation genes irradiated at doses of 1 W-3 J, 1.5 W-3 J, 1 W-4 J, or 1.5 W-4 J: A) Alkaline Phosphatase; B) Osteocalcin; C) Osteoprotegerin. Data are expressed as ng of mRNA per average ng of housekeeping mRNAs \pm SD. * Significant differences ($P < 0.05$).

osteoblast differentiation. The MG-63 human osteosarcoma line was selected as osteoblast model in this study because it is the most widely used cell line in studies on the effects of drug or other treatments on the osteoblast, although the limitations of studying a

tumor line should be borne in mind, as the differentiation pattern of MG-63 may differ from that of real osteoblasts.

Table 2
Expression of osteoblast differentiation genes irradiated at doses of 1 W and 3–4 J or 1.5 W and 3–4 J. Data are expressed as ng of mRNA per average ng of housekeeping mRNAs \pm SD.

	Potencia	Mean \pm SD	<i>P</i>
RUNX-2	Control	0.036 \pm 0.001	–
	1 W/3 J	0.043 \pm 0.008	0.354
	1.5 W/3 J	0.064 \pm 0.017	0.123
	1 W/4 J	0.070 \pm 0.006	0.008
	1.5 W/4 J	0.065 \pm 0.011	0.040
ALP	Control	0.049 \pm 0.004	–
	1 W/3 J	0.05 \pm 0.04	0.096
	1.5 W/3 J	0.067 \pm 0.007	0.027
	1 W/4 J	0.067 \pm 0.006	0.017
	1.5 W/4 J	0.051 \pm 0.011	0.075
OSX	Control	0.029 \pm 0.003	–
	1 W/3 J	0.039 \pm 0.010	0.271
	1.5 W/3 J	0.056 \pm 0.015	0.107
	1 W/4 J	0.063 \pm 0.011	0.032
	1.5 W/4 J	0.072 \pm 0.004	0.011
COL-1	Control	33.541 \pm 0.785	–
	1 W/3 J	31.300 \pm 1.465	0.234
	1.5 W/3 J	38.416 \pm 0.359	0.005
	1 W/4 J	31.231 \pm 5.591	0.62
	1.5 W/4 J	30.640 \pm 17.735	0.84
OSC	Control	0.078 \pm 0.007	–
	1 W/3 J	0.094 \pm 0.021	0.48
	1.5 W/3 J	0.114 \pm 0.061	0.49
	1 W/4 J	0.068 \pm 0.024	0.604
	1.5 W/4 J	0.069 \pm 0.035	0.75
OPG	Control	0.96 \pm 0.16	–
	1 W/3 J	1.49 \pm 0.22	0.053
	1.5 W/3 J	1.04 \pm 0.17	0.573
	1 W/4 J	1.27 \pm 0.23	0.138
	1.5 W/4 J	1.11 \pm 0.13	0.265

Values in bold represents statistically significant results.

Osteoblast differentiation and maturation is a complex process, in which osteoblastic cells differentiate following a linear succession from osteoprogenitors to preosteoblasts, osteoblasts, and osteocytes. Thus, osteoblasts pass through three functional stages, both *in vivo* and *in vitro*: proliferation, bone matrix synthesis or maturation, and mineralization (Malaval et al., 1994; Liu et al., 1994). As the precursor cell differentiates, it expresses specific proteins of its function (markers) on its membrane. Runx-2 is the first and most important marker of osteoblast differentiation (Yamaguchi et al., 2000). The expression of Col-1 and ALP begins in the early stage of osteoblast differentiation and persists in early and mature osteoblasts (Sims and Vrahnas, 2014). Osterix is also an essential transcription factor for osteoblast differentiation and bone formation, and its expression implies the loss of bipotentiality from preosteoblast to osteoblast and chondrocyte (Nakashima et al., 2002). For their part, OSC and OPG are osteogenic markers of the final stages of osteoblast differentiation, which appear at the beginning of mineralization (Sims and Vrahnas, 2014). These data suggest that LLDL stimulates osteoblast differentiation in the initial proliferative and matrix synthesizing stages. This explains, at least in part, the stimulating effect of LLDL on osteoblast growth under these treatment conditions (Medina-Huertas et al., 2014; Huertas et al., 2014) given that, in the final differentiation or mineralization stage, growth is detained and OSC and OPG synthesis is increased. In this sense, we previously studied ALP expression on osteoblast-like cells treated with LLDL by a spectrophotometric technique and at 24 h the treated groups showed an increased ALP activity (Medina-Huertas et al., 2014).

Studies in rat bone showed that LLDL stimulates osteoblast growth and increases the mRNA expression of ALP, Runx-2, type 1 collagen, bone sialoprotein, and OSC. The last two markers are characteristic of the mineralization stage (da Silva et al., 2012).

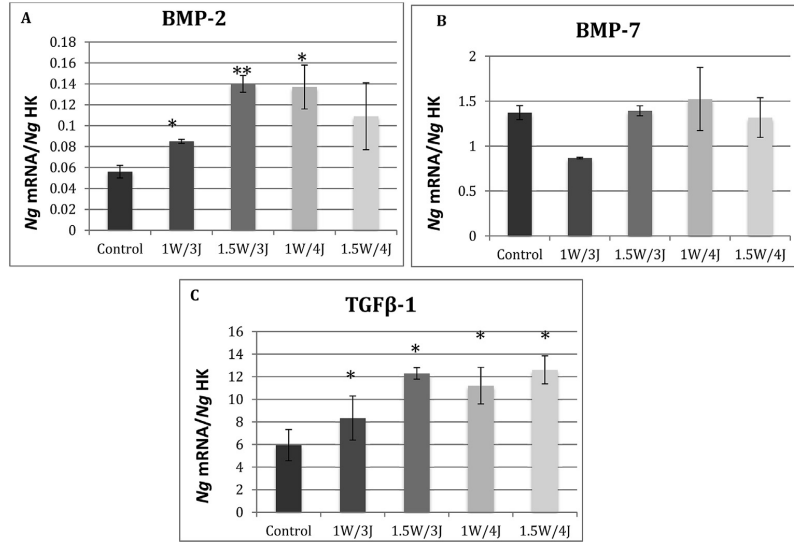


Fig. 3. Expression of osteoblast genes irradiated at doses of 1 W-3 J, 1.5 W-3 J, 1 W-4 J, or 1.5 W-4 J: A) BMP-2; B) BMP-7; C) TGF-β1. Data are expressed as ng of mRNA per average ng of housekeeping mRNAs ± SD. * Significant differences ($P < 0.05$), ** Significant differences ($P < 0.001$).

Osteoblast growth and differentiation are controlled by autocrine and paracrine factors, including growth factors, hormones, cytokines, and even mechanical forces, which in turn regulate the activity of specific transcription factors (Komori, 2010).

The TGF-β superfamily comprises over 40 members (TGF-βs, Nodal, Activin and BMPs) (Guo and Wang, 2009). TGF-β/BMP signaling plays critical regulatory functions in osteoblast

differentiation and bone formation, and the signaling relays in each stage are responsible for the final target gene expression (Chen et al., 2012).

TGF-β isoforms and their receptors, TGF-β R1 and TGF-β R2, play an important role in endochondral and intramembranous ossification. Thus, TGF-β1-deficient mice display reduced bone growth and mineralization (Geiser et al., 2012). TGF-β1 promotes matrix

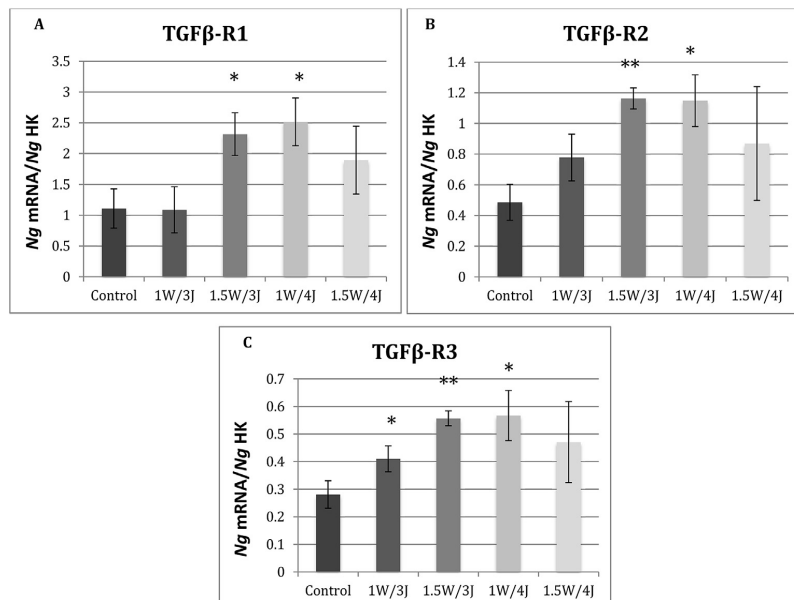


Fig. 4. Expression of TGF-β receptors on osteoblasts irradiated at doses of 1 W-3 J, 1.5 W-3 J, 1 W-4 J, or 1.5 W-4 J: A) TGF-β R1; B) TGF-β R2; C) TGF-β R3. Data are expressed as ng of mRNA per average ng of housekeeping mRNAs ± SD. * Significant differences ($P < 0.05$), ** Significant differences ($P < 0.001$).

- Robling AG, Castillo AB, Turner CH: Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng* 8: 455–498, **2006**
- Saygun I, Nizam N, Ural AU, Serdar MA, Avcu F, Tözüm TF: Low-level laser irradiation affects the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I), and receptor of IGF-I (IGFBP3) from osteoblasts. *Photomed Laser Surg* 30: 149–154, **2012**
- Shen B, Wei A, Whittaker S, Williams LA, Tao H, Ma DD, et al: The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *J Cell Biochem* 109: 406–416, **2010**
- da Silva JP, da Silva MA, Almeida APF, Lombardi Junior I, Matos AP: Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomed Laser Surg* 28: 17–21, **2010**
- da Silva APRB, Petri AD, Crippa GE, Stuani AS, Stuani AS, Rosa AL, et al: Effect of low-level laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *Lasers Med Sci* 27: 777–783, **2012**
- Sims NA, Vrahnas C: Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Arch Biochem Biophys* 561C: 22–28, **2014**
- Stein E, Koehn J, Sutter W, Wendtlandt G, Wanschitz F, Thurnher D, et al: Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr* 120: 112–117, **2008**
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, **2002** RESEARCH0034
- Wang L, Huang Y, Pan K, Jiang X, Liu C: Osteogenic responses to different concentrations/ratios of BMP-2 and bFGF in bone formation. *Ann Biomed Eng* 38: 77–87, **2010**
- Yamaguchi A, Komori T, Suda T: Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 21: 393–411, **2000**

CONCLUSIONES

1. El tratamiento *in vitro* de la línea celular MG63 con láser de diodo de 940 nm a distintas dosis de potencia (0.5, 1, 1.5, 2W) y energía (1 a 5J) estimula la capacidad proliferativa de esta población celular.
2. El láser de diodo, usado a las dosis de 1 y 1.5W de potencia y 3 y 4 J de energía, favorece la maduración de las células osteoblásticas en cultivo al incrementar la actividad fosfatasa alcalina y disminuir tanto la expresión de los marcadores antigénicos CD54, CD86 y HLA-DR, como la actividad fagocítica.
3. El láser de diodo aumenta la expresión génica de los marcadores implicados en la diferenciación osteoblástica (colágeno tipo 1, fosfatasa alcalina, osterix, y RUNX-2) y en la reparación ósea (BMP-2, TGF- β 1). Igualmente, incrementa la expresión de los receptores del TGF- β (TGF β -R1, TGF β -R2, TGF β -R3). Estos resultados muestran que el mecanismo de acción del efecto fotobioestimulante del láser está mediado por el TGF- β 1.