

El Retículo Endoplasmático Liso en Hepatocitos Estimulados con Distintas Dosis de Láser Infrarrojo

The Smooth Endoplasmic Reticulum in Hepatocytes Stimulated with Different Doses of Infrared Laser

Cornejo, R.*; Garrido, O.**; Bustamante, C.* & Muñoz, M.*

CORNEJO, R.; GARRIDO, O.; BUSTAMANTE, C. & MUÑOZ, M. El retículo endoplasmático liso en hepatocitos estimulados con distintas dosis de láser infrarrojo. *Int. J. Morphol.*, 32(3):1009-1014, 2014.

RESUMEN: Veinticuatro ratas hembras Sprague Dawley de 4 meses de vida con peso aproximado de 250 g, fueron divididas en cuatro grupos (A, B, C y D), donde el grupo A (control) no recibió estimulación infrarroja, B se irradió con láser infrarrojo 4 J/cm², C con dosis de 8 J/cm² y D con 16 J/cm². La estimulación infrarroja se realizó diariamente, por 15 días ininterrumpidos. Las ratas fueron sacrificadas y se extrajeron muestras tanto de hígado normal (control) como estimulado con las distintas dosis infrarrojas, las que fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión. De los hepatocitos normales y estimulados, se obtuvieron microfotografías con aumentos finales de hasta 36.500 X, que fueron sometidas a estudios morfométricos para determinar fracciones volumétricas con especial énfasis en el retículo endoplasmático liso (REL) y de los siguientes componentes celulares: retículo endoplasmático rugoso (RER), mitocondrias, glicógeno, eu y heterocromatina. De igual manera se cuantificaron las áreas celulares y nucleares. Del análisis de los resultados entre hepatocitos normales y estimulados con diferentes dosis infrarrojas, se visualiza que existen notables diferencias en todos los componentes celulares cuantificados particularmente el REL. Se concluye que las estimulaciones infrarrojas provocan una drástica transformación en la ultraestructura y morfología de los hepatocitos, lo que provocaría una variación funcional, representando de esta manera el efecto que estas estimulaciones provocan en este tipo celular.

PALABRAS CLAVE: Láser infrarrojo; Hepatocitos; Morfometría; Retículo endoplasmático liso; REL.

INTRODUCCIÓN

El advenimiento de la Medicina Física en la década de los ochenta, permitió abrir múltiples proposiciones y soluciones a la ciencia médica mediante la instauración de un conjunto de técnicas para procurar una óptima rehabilitación de los pacientes mediante el uso de novedosos y ciertos tratamientos relativos a procesos de cicatrización, problemas músculo-esqueléticos y consolidación de fracturas (Schindl *et al.*, 2000). En esta perspectiva, la utilización del láser infrarrojo de baja potencia ofrece una terapia fundamentalmente estéril, indolora, sin cirugía y libre de drogas para el tratamiento de lesiones que incluyen heridas, fracturas, enfermedades neurológicas, dermatológicas y dolorosas de pacientes en general (Millis *et al.*, 2004).

El uso de las emisiones infrarrojas generadas por el diodo láser Arsenurio de Galio (modelo CEC IR 10, Argentina) induce un sostenido alivio en una amplia gama de lesiones y afecciones articulares basado en su eficaz acción analgésica (Novoselova *et al.*, 2006; Castano *et al.*, 2007),

antiinflamatoria (Fikácková *et al.*, 2006) y cicatrizante (Kreisler *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2004) como a nivel celular una acentuada síntesis proteica (Shefer *et al.*, 2003; Simões *et al.*, 2009), de DNA (Rizzi *et al.*, 2006; Karu, 2008), de ATP mitocondrial (Hu *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008) y de colágeno (Pereira *et al.*, 2002; Cornejo *et al.*, 2013) como así mismo modulando la proliferación celular (Vinck *et al.*, 2003) las concentraciones de calcio citosólico (Lavi *et al.*, 2003) y la actividad de variadas enzimas (Pastore *et al.*, 2000; Kao & Sheen, 2003).

A pesar de que estas y muchas otras funcionalidades del láser infrarrojo se encuentran absolutamente demostradas, en forma creciente se recopilan mas antecedentes y conocimientos relativos al rol que ejercen las inducciones infrarrojas sobre los componentes subcelulares y que son capaces de generar modificaciones de estos organelos, originando variaciones en la funcionalidad de células y por ende en determinados tejidos (Junqueira & Salles, 1975).

* Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

** Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Estudios sobre hepatocitos de rata muestran dosis óptimas con las cuales se consigue generar una notable activación (8 J/cm^2) o una notoria inhibición (16 J/cm^2) de su función celular, como el tiempo durante el cual permanece activa la estimulación infrarroja en estas células de alto metabolismo (Cornejo *et al.*, 2012). Sin embargo, en el contexto del estudio sobre componentes subcelulares, parece importante realizar un análisis cuantitativo en microfotografías electrónicas con datos morfométricos ultraestructurales correspondientes al retículo endoplásmico liso (REL) de los hepatocitos estimulados durante 15 días consecutivos con dosis infrarrojas de 4, 8 y 16 J/cm^2 , determinando su volumen y su eventual participación en la función celular del hepatocito.

Considerando que los hepatocitos son particularmente ricos en retículo endoplasmático debido a que realizan una activa síntesis de proteínas y lípidos, en las microfotografías electrónicas se pueden distinguir cisternas de retículo con ribosomas adosados a sus paredes, cisternas agranulares y además poliribosomas, mitocondrias y otros organelos libres por todo el citoplasma (Koolman & Röhm, 2004).

Es frecuente observar una alta incidencia de zonas de continuidad entre los retículos endoplasmático liso y rugoso, los cuales presentan proteínas tales como la reductasa NADH, la nucleótido difosfatasa y los citocromos B5 y P450 (Paniagua *et al.*, 2007). Las diversas funciones que presenta el REL, tienen relación con sus enzimas, destacando la síntesis lipídica, glucogenolisis y detoxificación. En concordancia a esta última función, la presencia de sustancias tóxicas liposolubles (barbitúricos, etanol, insecticidas, herbicidas, medicamentos, desechos industriales, etc.) hace que sean degradados en la membrana del REL, debido a la acción de oxigenasas sobre dichas sustancias tóxicas, oxidando a los compuestos hidrófobos, convirtiéndolos en hidrófilos y, por tanto, más fáciles de excretar. Sin embargo, la reacción enzimática de detoxificación más importante se realiza mediante el sistema del citocromo P450, el cual desempeña un papel importante en el catabolismo de los fármacos y de otros compuestos exógenos potencialmente tóxicos, siendo una función de supervivencia importante del hepatocito, después de sufrir un daño o intoxicación (Lodish *et al.*, 2009). Además, en su membrana se encuentra la enzima glucosa 6 fosfatasa, implicada en la degradación del glucógeno.

En base a lo planteado, el objetivo de este trabajo fue precisar los efectos que produce en células hepáticas, la aplicación de distintas dosis de estimulaciones infrarrojas durante 15 días consecutivos, evaluando cuantitativamente los componentes del hepatocito a nivel ultraestructural en microfotografías electrónicas, determinando su patrón de modificación, con énfasis en el REL y relacionando las estructuras celulares con una eventual funcionalidad celular.

MATERIAL Y MÉTODO

Un total de 24 ratas hembras de 4 meses de vida, con un peso de aproximadamente 250 g fueron divididas en cuatro grupos de animales cada uno rotulados como A, B, C y D; donde A se mantuvo sin recibir estimulación infrarroja, permaneciendo como control, mientras que B recibió estimulación de láser infrarroja con dosis de 4 J/cm^2 , C dosis de 8 J/cm^2 y D dosis de 16 J/cm^2 durante 15 días consecutivos. Posteriormente, las ratas fueron sacrificadas y se extrajeron muestras tanto de hígado normal como de los estimulados, para enseguida ser procesadas para microscopía electrónica de transmisión, donde a las muestras se le adicionó una solución de glutaraldehído 2% en tampón fosfato 0,15 M, pH 7,2 y se mantuvo a temperatura ambiente por 2 h. Luego, fueron sometidas a un lavado en solución de 6 g de NaCl y 73 g de sacarosa, disuelto en 1 litro de agua destilada.

La post-fijación se realizó con tetróxido de osmio 1% disuelto en la solución antes descrita durante 1 h a 40°C y acetato de uranilo 0,5% por 18 h. Luego de lavado el material, fue deshidratado en concentraciones crecientes de acetona (30 a 100%) e incluido en Araldita 6005. Se obtuvieron cortes ultrafinos de aproximadamente 70 nm de grosor, los que fueron tratados con acetato de uranilo 2% durante 40 minutos y citrato de plomo 0,5% por 10 minutos. Las muestras fueron finalmente estudiadas y microfotografiadas en un microscopio electrónico Phillips EM 300.

A partir de los bloques para microscopía electrónica fueron obtenidos cortes ultrafinos desde los cuales se micrografiaron hepatocitos normales e irradiados con distintas dosis con un aumento final de hasta 36.500 X.

Para la evaluación de las fracciones volumétricas de los componentes celulares, fue sobrepuesto un retículo de puntos sobre las microfotografías electrónicas y se procedió al conteo diferencial de los puntos que incidían sobre los perfiles de los componentes, calculándose la fracción volumétrica que ellos ocupan, mediante la siguiente ecuación (Weibel, 1969): $F_v = P_i/P_t$, donde F_v : Fracción volumétrica del componente celular; P_i : Puntos incidentes sobre el componente en estudio y P_t : Puntos totales incidentes en la célula estudiada.

Análisis estadístico. Todos los datos cuantitativos obtenidos fueron sometidos a la prueba de Wilcoxon mediante el paquete estadístico SPSS versión 15 para Windows (Chicago, USA) para muestras no paramétricas, estableciendo diferencias con un valor de $Z=2,023$ y un $p= 0,043$ indicando entonces que existen diferencias significativas entre ellos.

RESULTADOS

A medida que esta célula normal evidenciada en la Figura 1 y en las Figuras 2–4 sometidas a estimuciones con dosis de láser infrarrojo de 4, 8 y 16 J/cm², respectivamente, desde quienes se logró cuantificar los volúmenes de sus componentes celulares mediante técnicas morfométricas.

En relación al nivel citosólico del hepatocito, se observa con claridad una relación directa entre dosis crecientes de estimulación infrarroja versus fracciones volumétricas correspondientes al REL, representado por un constante aumento en su volumen hasta prácticamente duplicarlo con dosis de 16 J/cm² (Fig. 5), pudiendo interpretarse como un aumento en su función, específicamente en lo relacionado con el proceso de detoxificación utilizado en la inactivación de sustancias nocivas, tal como la irradiación exacerbada de luz infrarroja a la que fue expuesta este tipo celular.

En este mismo contexto, en relación a los volúmenes obtenidos para la inclusión de glicógeno (Fig. 6), un notorio incremento con irradiación correspondiente a dosis de 16 J/cm², indicando que el REL priorizaría fundamentalmente su función a la de detoxificación, inhibiendo

de esta manera otras funciones, especialmente la que tiene relación con glicogenolisis.

Como ha sido descrito en investigaciones anteriores sobre este tipo celular, las fracciones volumétricas tanto mitocondriales como las correspondientes al RER, presentan una relación inversa con respecto a las dosis crecientes con las cuales se estimulan los hepatocitos, cuantificándose que con dosis correspondientes a 16 J/cm², se obtienen los menores volúmenes pertenecientes a estos componentes celulares (Fig. 6). Es tentador interpretar estos datos morfométricos considerando que esta célula se encuentra básicamente realizando mecanismos de detoxificación en su REL, dicho proceso requiere sólo de un exiguo aporte energético y su síntesis proteica deprimida.

A nivel nuclear, en relación al aumento de la eucromatina en la célula estimulada con 16 J/cm² (Tabla I), se puede inferir una elevada tasa de expresión génica, la cual generaría en los ribosomas libres la síntesis de aquellas enzimas propias de la detoxificación, específicamente la citocromo P450.

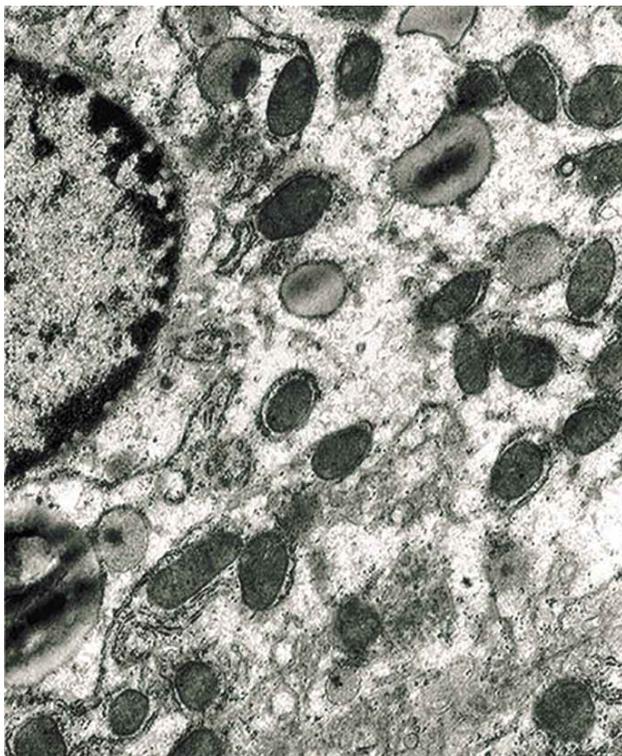


Fig. 1. Microfotografía electrónica de transmisión perteneciente a una sección de hepatocito de rata normal. 36500 X.

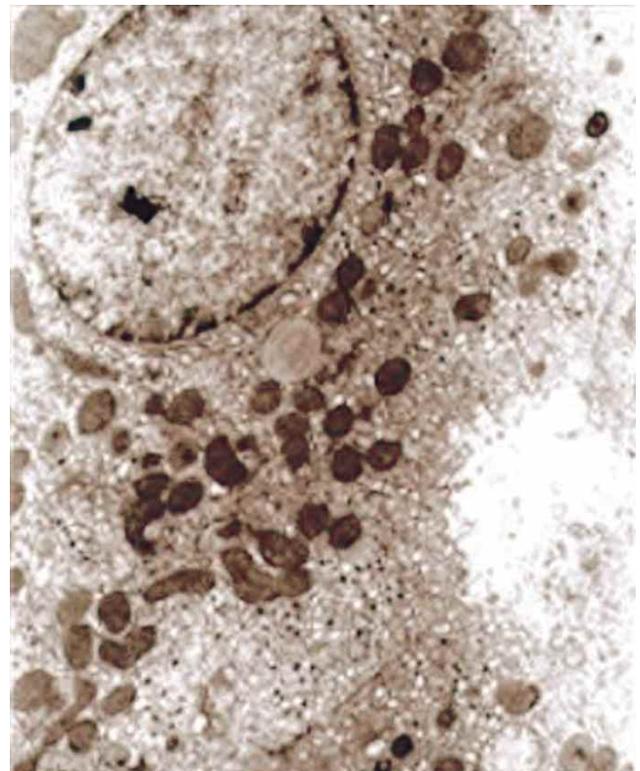


Fig. 2. Microfotografía electrónica de transmisión perteneciente a una sección de hepatocito de rata estimulado durante 15 días con dosis de láser infrarrojo correspondiente a 4 J/cm². 21300 X

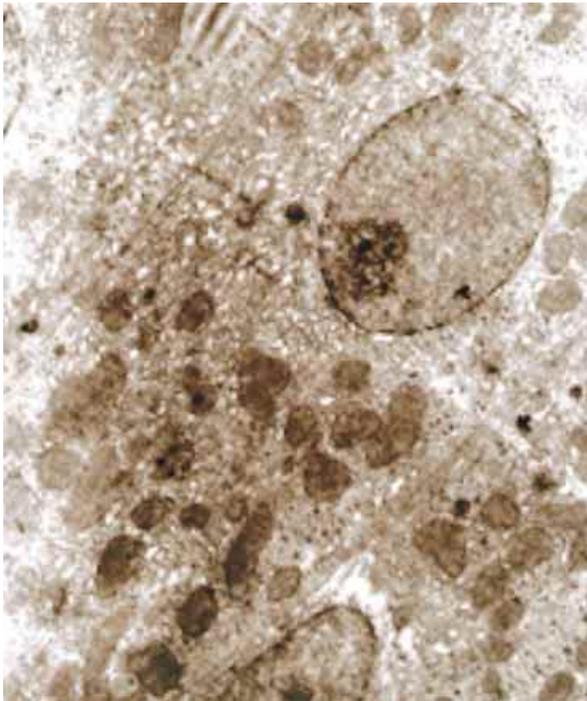


Fig. 3. Microfotografía electrónica de transmisión perteneciente a una sección de hepatocito de rata estimulado durante 15 días con dosis de láser infrarrojo correspondiente a 8 J/cm² .21300 X.

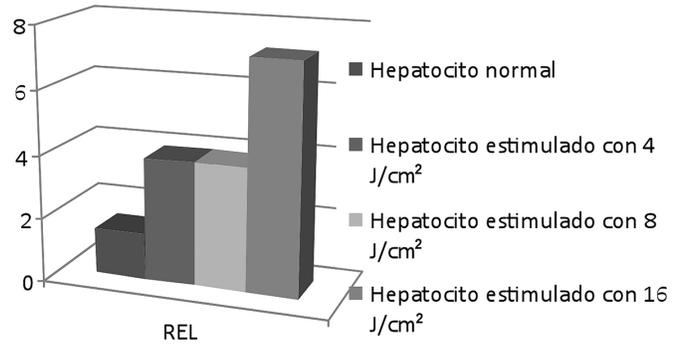


Fig. 5. Fracciones volumétricas correspondientes a REL de hepatocitos normales y estimulados con dosis de 4, 8 y 16 J/cm² durante 15 días.

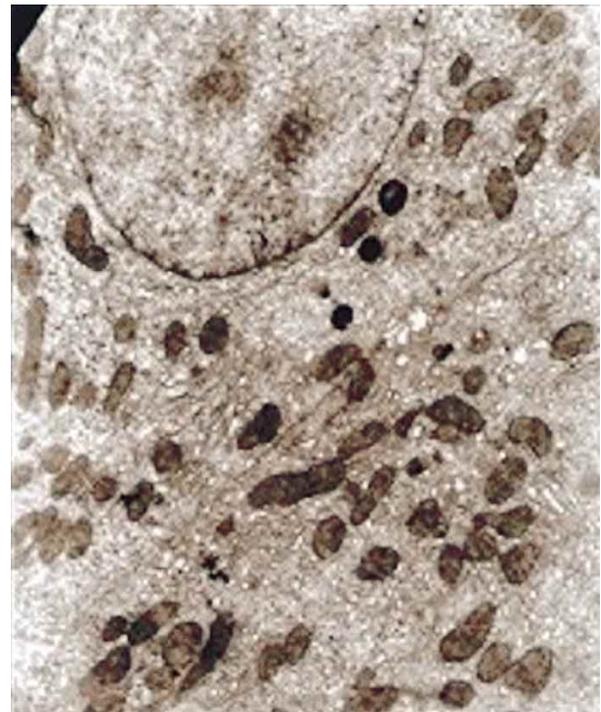


Fig. 4. Microfotografía electrónica de transmisión perteneciente a una sección de hepatocito de rata estimulado durante 15 días con dosis de láser infrarrojo correspondiente a 16 J/cm² .21300 X.

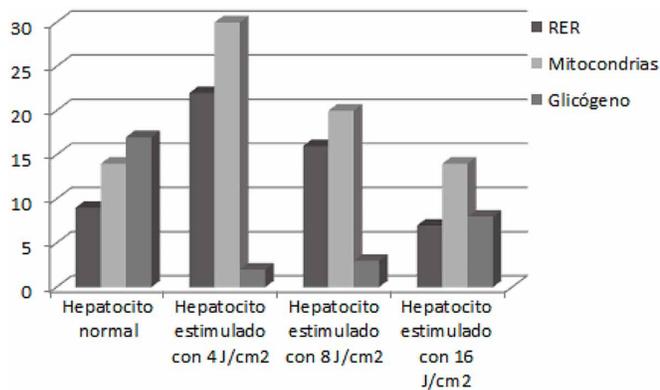


Fig. 6. Fracciones volumétricas correspondientes a componentes celulares de hepatocitos normales y estimulados con dosis de 4, 8 y 16 J/cm² durante 15 días.

Tabla I. Fracciones volumétricas (%) correspondientes a eu y heterocromatina evaluada en hepatocitos de rata normal y estimulados con láser infrarrojo de 4, 8 y 16 J/cm²

	Hepatocito normal	Hepatocito estimulado con dosis de 4 J/cm ²	Hepatocito estimulado con dosis de 8 J/cm ²	Hepatocito estimulado con dosis de 16 J/cm ²
Euromatina	55	84,4	80	88
Heterocromatina	45	15,6	19,6	11,9

DISCUSIÓN

La presente investigación tuvo por objetivo precisar el comportamiento del REL en medida que los hepatocitos son estimulados con dosis crecientes de inducciones infrarrojas, pudiendo concluir que existe entonces una relación directa entre el volumen cuantificado de dicho componente y las dosis utilizadas en la activación celular, como fue mostrado en los resultados, precisándose que en la medida que se utiliza 16 J/cm² el volumen del REL se duplica.

Este resultado es coincidente con variadas publicaciones en las cuales los autores describen tanto incrementos como hipertrofia del REL en hepatocitos, así Cieslar *et al.* (2009), informa que estimulando este tipo celular mediante láser infrarrojo por 15 días consecutivos, se genera un notable incremento tanto en procesos de oxidación celular como en la actividad de numerosas enzimas hepáticas.

Concordamos con Nevorotin *et al.* (1991), quienes describen que cuando estimulan hepatocitos de rata con dosis correspondiente a 40 J/mm² se generan incrementos y vesiculación del REL, evidenciados mediante microscopía electrónica de transmisión y visualización histoquímica marcando la glucosa 6 fosfatasa en sus membranas.

En tipos celulares distintos al hepatocito, nuestros resultados muestran similitud con diversas investigaciones relativas a este tema, como la de Zayed *et al.* (2000), en donde describe que tras la estimulación por 15 días consecutivos con láser infrarrojo a células intersticiales de testículo de mono, se evidencia tras el estudio mediante microscopía electrónica de transmisión, un notable incremento del REL, relacionando este aumento de volumen con una estimulación del láser sobre la síntesis y secreción de testosterona. En este mismo contexto, estudiando la estimulación infrarroja con dosis de 6 J/cm² sobre fibroblastos, Oliveira *et al.* (2009), logran determinar por medio análisis de microscopía de fluorescencia un incremento tanto en volúmenes como en la actividad del REL.

Agregaremos un dato significativo para la temática que tratamos en relación específicamente al rol del REL en los mecanismos de detoxificación celular. Tutunaru *et al.* (2010) evidencian con microscopía electrónica de transmisión, un drástico incremento tanto en la proliferación del REL como una notable activación de procesos oxidativos evidenciados en hepatocitos esteatósicos de rata.

Finalmente, coincidimos con Vázquez (1990), en relación a las inclusiones de glicógeno en células hepáticas

afectadas con cirrosis crónica, donde sus resultados como los nuestros muestran crecientes depósitos de glicógeno, generando gránulos densos a nivel de todo el citoplasma de este tipo celular y del mismo modo, se describe una alta hipertrofia del REL.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es el resultado de las actividades de investigación realizadas en el proyecto DI-UFRO 14-0103.

CORNEJO, R.; GARRIDO, O.; BUSTAMANTE, C. & MUÑOZ, M. The smooth endoplasmic reticulum in hepatocytes stimulated with different doses of infrared laser. *Int. J. Morphol.*, 32(3):1009-1014, 2014.

SUMMARY: A total of 24 female Sprague-Dawley rats aged 4 months and weighing approximately 250 g, were divided into four groups labeled A, B, C and D. Group A received no infrared stimulation and served as control. Group B was radiated with a dose of 4 J/cm² of infrared laser, Group C with doses of 8 J/cm² and Group D with 16 J/cm². This infrared stimulation was carried out daily for 15 days uninterrupted. The rats were then sacrificed and samples of both normal-control liver and liver stimulated with the different infrared doses were extracted for immediate processing via transmission electron microscopy. Transmission electron microphotographs were obtained at magnifications of 21300X from both normal and stimulated hepatocytes; these were subjected to morphometric studies to determine volumetric fractions with special emphasis on the smooth endoplasmic reticulum (SER) and the following cell components: rough endoplasmic reticulum (RER), mitochondria, glycogen, eu and heterochromatin. Likewise, cell and nuclear areas were quantified. Analysis of the results of normal and stimulated hepatocytes with different infrared doses showed considerable differences in all the quantified cell components and particularly from the SER it is concluded that the effects of these stimulations bring about a drastic transformation in the ultrastructure and morphology of the hepatocytes, which may ultimately translate into a functional variation, thus representing the effect that these stimulations cause in this cell type.

KEY WORDS: Infrared laser; Hepatocytes; Morphometry; Smooth endoplasmic reticulum; SER.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Castano, A. P.; Dai, T.; Yaroslavsky, I.; Cohen, R.; Apruzzese, W. A.; Smotrich, M. H. & Hamblin, M. R. Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: Importance of illumination time. *Lasers Surg. Med.*, 39(6):543-50, 2007.

- Cieslar, G.; Adamek, M.; Sieron, A. & Kaminski, M. Influence of low-power laser radiation on the activity of some membrane and mitochondrial enzymes of hepatocytes in rats. *Proc. SPIE*, 2323:546-50, 1995.
- Cornejo R, Matamala F, Silva H, Garrido O, Jaramillo, R.; Sáez, L.; Painemil, S. & Loncoñanco, E. Infrared laser effect on alcoholic rat hepatic microvesicular steatosis. *Int. J. Morphol.*, 31(1):307-11, 2013.
- Cornejo, R.; Matamala, F.; Silva, H.; Garrido, O. & Saéz, L. Persistence of the effects of 6 J/cm² infrared laser in rat hepatocytes. *Int. J. Morphol.*, 30(2):467-72, 2012.
- Fikáčková, H.; Dostálová, T.; Vosická, R.; Peterová, V.; Navrátil, L. & Lesák, J. Arthralgia of the temporomandibular joint and low-level laser therapy. *Photomed. Laser Surg.*, 24(4):522-7, 2006.
- Hu, W. P.; Wang, J. J.; Yu, C. L.; Lan, C. C.; Chen, G. S. & Yu, H. S. Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. *J. Invest. Dermatol.*, 127(8):2048-57, 2007.
- Junqueira, L. & Salles, L. *Ultra-estructura e função celular*. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1975, pp.44-58.
- Karu, T. I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem. Photobiol.*, 84(5):1091-9, 2008.
- Kao, M. J. & Sheen, L. Y. Effects of infrared and low-power laser irradiation on cell viability, glutathione and glutathione-related enzyme activities in primary rat hepatocytes. *J. Formos. Med. Assoc.*, 102(7):486-91, 2003.
- Koolman, J. & Röhm, K. H. *Bioquímica: Texto y atlas*. 3a ed. Madrid, Médica Panamericana, 2004.
- Kreisler, M.; Christoffers, A. B.; Willershausen, B. & d'Hoedt, B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an *in vitro* study. *J. Clin. Periodontol.*, 30(4):353-8, 2003.
- Lavi, P.; Koutna, M.; Janisch, R. & Veselska, R. Effects of low-power laser irradiation on cell proliferation. *Scr. Med.*, 76(3):163-72, 2003.
- Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Scott, M. P.; Zipursky, S. L. & Darnell, J. *Biología celular y molecular*. 5a ed. Buenos Aires, Ed. Médica Panamericana, 2009. pp.649.
- Millis, D. *Introduction to Physical Therapy*. In: Millis D.; Levine, D. & Taylor, R. (Eds.). *Canine Rehabilitation and Physical Therapy*. St. Louis, Saunders, 2004. pp.5-20.
- Nevorotin, A.; Kallikorm, A.; Zeltzer, G.; Kull, M. & Mihkelsoo, V. Mechanism of injurious effect of excimer (308 nm) laser on the cell. *Proc. SPIE*, 1427:381-97, 1991.
- Novoselova, E. G.; Glushkova, O. V.; Cherenkov, D. A.; Chudnovsky, V. M. & Fesenko, E. E. Effects of low-power laser radiation on mice immunity. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 22(1):33-8, 2006.
- Pastore, D.; Greco, M. & Passarella, S. Specific helium-neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase. *Int. J. Radiat. Biol.*, 76(6):863-70, 2000.
- Paniagua, R.; Nistal, M.; Sesma, P.; Alvarez-Uría, M.; Fraile, B.; Anadón, R. & Saéz, F. J. *Biología Celular*. 3a ed. Madrid, McGraw Hill Interamericana, 2007.
- Pereira, A. N.; Eduardo, Cde. P.; Matson, E. & Marques, M. M. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg. Med.*, 31(4):263-7, 2002.
- Oliveira, D. A.; De Oliveira, R. F.; Magini, M.; Zangaro, R. A. & Soares, C. P. Assessment of cytoskeleton and endoplasmic reticulum of fibroblast cells subjected to low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound. *Photomed. Laser Surg.*, 27(3):461-6, 2009.
- Reddy, G. K. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, 22(2):141-50, 2004.
- Rizzi, C. F.; Mauriz, J. L.; Freitas Corrêa, D. S.; Moreira, A. J.; Zettler, C. G.; Filippin, L. I.; Marroni, N. P. & González-Gallego, J. Effects of low-level laser therapy (LLL) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg. Med.*, 38(7):704-13, 2006.
- Schindl, A.; Schindl, M.; Pernerstorfer-Schön, H. & Schindl, L. Low-intensity laser therapy: a review. *J. Invest. Med.*, 48(5):312-26, 2000.
- Shefer, G.; Barash, I.; Oron, U. & Halevy, O. Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1593(2-3):131-9, 2003.
- Simões, A.; Siqueira, W. L.; Lamers, M. L.; Santos, M. F.; Eduardo, Cde. P. & Nicolau, J. Laser phototherapy effect on protein metabolism parameters of rat salivary glands. *Lasers Med. Sci.*, 24(2):202-8, 2009.
- Tutunaru, D.; Ciocoiu, M.; Coman, M.; Musat, C.; Nechita, A. & Badescu, M. Ethanol induced hepatic steatosis-morpho-functional aspects. *Ann. Rom. Soc. Cell Biol.*, 15(2):362-7, 2010.
- Vázquez, J. J. Ground-glass hepatocytes: light and electron microscopy. Characterization of the different types. *Histol. Histopathol.*, 5(3):379-86, 1990.
- Vinck, E. M.; Cagnie, B. J.; Cornelissen, M. J.; Declercq, H. A. & Cambier, D. C. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med. Sci.*, 18(2):95-9, 2003.
- Weibel, E. R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Rev. Cytol.*, 26:235-302, 1969.
- Xu, X.; Zhao, X.; Liu, T. C. & Pan, H. Low-intensity laser irradiation improves the mitochondrial dysfunction of C2C12 induced by electrical stimulation. *Photomed. Laser Surg.*, 26(3):197-202, 2008.
- Zayed, A. E.; Gawish, S. M.; Ismail, N. M. & Hakim, A. H. A. Effect of infrared laser irradiation on the testicular intertubular tissue of the adult mice. *Assiut Vet. Med. J.*, 43(86):73-85, 2000.

Dirección para Correspondencia:

Dr. Ricardo Cornejo
Facultad de Medicina
Universidad de La Frontera
Casilla 54-D
Temuco
CHILE

Recibido : 28-02-2013
Aceptado: 11-08-2014

Email: rene.cornejo@ufrontera.cl