

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
I.S.S.S.T.E.  
SUBDIRECCION GENERAL MEDICA  
CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"

**EFFECTOS DE BIOESTIMULACION DE RADIACION  
LASER DE BAJA POTENCIA VARIANDO LA  
DENSIDAD DE RADIACION SOBRE LA  
PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS HUMANOS**

**TRABAJO DE INVESTIGACION  
QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA  
DE ESPECIALISTA EN :  
MEDICINA DE REHABILITACION  
P R E S E N T A :  
DRA. SUSANA ISABEL MARQUEZ ARENAS**



MEXICO, D.F.

OCTUBRE 2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Susana Isabel

Marques Arce

FECHA: 03-12-08

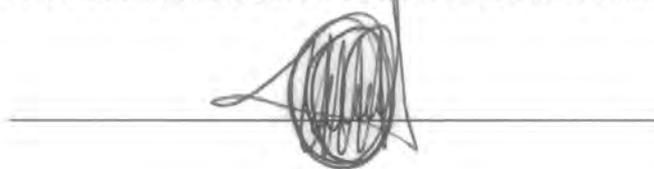
FIRMA: Susana Isabel Marques Arce

**DR. MAURICIO DI SILVIO LÓPEZ**  
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION



A handwritten signature in black ink, consisting of several sweeping, overlapping strokes, positioned above a horizontal line.

**DR. ALVARO LOMELI RIVAS**  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE MEDICINA DE REHABILITACION



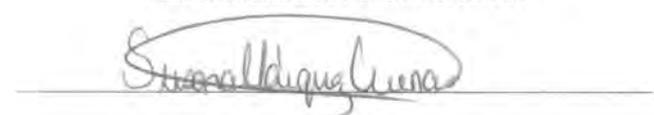
A handwritten signature in black ink, featuring a dense, circular scribble with a long tail extending to the left, positioned above a horizontal line.

**DR. ALVARO LOMELI RIVAS**  
ASESOR DE TESIS



A handwritten signature in black ink, identical to the one above, featuring a dense, circular scribble with a long tail extending to the left, positioned above a horizontal line.

**DRA. SUSANA ISABEL MARQUEZ ARENAS**  
MEDICO RESIDENTE DE LA ESPECIALIDAD DE  
MEDICINA DE REHABILITACION



A handwritten signature in black ink, written in a cursive style, positioned above a horizontal line.

## **RESUMEN:**

En esta investigación se estudio el efecto de la radiación LASER de 650 nm en las siguientes biodosis: 0.5, 1, 3, 5 y 7 J/cm<sup>2</sup> y variando la altura de estimulación a 0, 0.4, 1, 3 y 5 cm en una sola radiación, en cultivos de fibroblastos humanos. A estos se les aplicó la incorporación de <sup>3</sup>H timidina para medir la proliferación celular. Posterior a la radiación se tomaron mediciones a las 24, 48 y 72 horas. Los resultados obtenidos mostraron un incremento en la proliferación de fibroblastos a las 48 horas a dosis de 3 y 5 J/cm<sup>2</sup>. Sin embargo, este trabajo se considera como un estudio preliminar, el cual permitirá continuar con esta línea de investigación.

## **ABSTRACT:**

The effect of 650 nm LASER radiation was studied at next biodosis: 0.5, 1, 3, 5 and 7 J/cm<sup>2</sup> and modifying the distance of stimulation at 0, 0.4, 1, 3 and 5 cm, in only one radiation, in human fibroblasts cultures. The <sup>3</sup>H timidine incorporation method was applied to the fibroblasts and later to radiation measurements were taken at 24, 48 and 72 hours. The results obtained show an increase on the cell proliferation of fibroblasts at 48 hours and at biodosis of 3 and 5 J/cm<sup>2</sup>. However, this work is considered as a preliminary study and it will let go on with this investigation.

## INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
METODOLOGÍA .....	7
Preparación de células .....	7
Radiación LASER .....	8
Cuantificación .....	9
PARTICIPACIÓN PERSONAL .....	10
RESULTADOS .....	11
DISCUSIÓN .....	11
CONCLUSIONES .....	12
BIBLIOGRAFIA .....	13

## EFFECTOS DE BIOESTIMULACION DE RADIACIÓN LASER DE BAJA POTENCIA VARIANDO LA DENSIDAD DE RADIACIÓN SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASTOS HUMANOS

### INTRODUCCIÓN

Durante la última década, el LASER de baja potencia ha sido utilizado como una herramienta de terapia física para estimular la cicatrización de heridas <sup>1</sup>.

Este es usado clínicamente en Europa, Asia y Canadá y estudio recientes de la práctica clínica en Irlanda del Norte, Australia y Bélgica, sugieren, que en estos países es frecuentemente la modalidad terapéutica de elección para el tratamiento de heridas crónicas <sup>2</sup>.

Se sabe que el LASER acelera el proceso de reparación en úlceras y cicatrices y mejora la calidad de la misma.

Los fibroblastos, conjuntamente con los macrófagos y otras células, guardan un papel principal en la reparación tisular, acelerando o inhibiendo el proceso de cicatrización a través de la producción de ciertas sustancias <sup>3</sup>.

Los fibroblastos son células derivadas de células primitivas mesenquimales pluripotenciales que se originan de progenitores adherentes llamados UFC-F (unidad formadora de colonias de fibroblastos), bajo la acción de citoquinas como la interleucina 2 (IL-2), interferón gamma (INF) y la interleucina 3 (IL-3). La fina estructura de los fibroblastos es característica de las células que secretan proteínas de manera muy

activa. Una de sus funciones ampliamente conocida es la de formador de colágena (tipo I, III, y V).

Se cree que el papel del LASER sobre los fibroblastos puede ser en la proliferación celular y / o la producción de sustancias que induzcan la síntesis de colágena.

A pesar de que hay estudios que han mostrado que la radiación LASER de baja potencia incrementa la proliferación de fibroblastos en cultivos celulares, el mecanismo de acción es desconocido. El factor de crecimiento básico de fibroblastos (FCBF) es un polipéptido que ha sido detectado en muchos estudios y el cual actúa en la proliferación y diferenciación celular <sup>4</sup>.

Los factores de crecimiento, sintetizados y secretados por macrófagos han demostrado su papel en la inhibición o estimulación de la actividad de muchos tipos de células. También se ha visto que la luz de diferentes longitudes de onda, densidades de energía y densidades de potencia, pueden aumentar o inhibir a las células U-937 de los macrófagos que liberan factores solubles para estimular la producción de fibroblastos <sup>5</sup>.

Estudios realizados en humanos y animales han demostrado que el LASER de Ga-As-Al (arsenuro de galio y aluminio) actúa en los mecanismos de la cascada de la cicatrización, estos mecanismos incluyen el incremento de la actividad de los neutrófilos, síntesis de colágena y matriz extracelular, proliferación de leucocitos, estimulación de la degranulación de células cebadas y promoción de la acción de macrófagos dando como resultado un incremento en el depósito de colágena, aumenta la fuerza tensil de la herida, incrementa el cierre de la misma y mejora la contracción de la misma <sup>6</sup>.

Se ha encontrado también que el LASER de baja potencia modula varios procesos biológicos en cultivos de tejidos y modelos animales. Incrementa la respiración mitocondrial y síntesis de ATP, acelera la cicatrización y promueve el proceso de regeneración muscular esquelética y la neoformación de vasos sanguíneos en la zona lesionada del músculo esquelético <sup>7</sup>.

A pesar del conocimiento de los efectos terapéuticos que posee el LASER de baja potencia, existen muy pocas referencias en cuanto a los efectos celulares y moleculares. Así mismo, otro de los problemas encontrados en la literatura es que no se comenta la biodosis óptima de aplicación ni se reportan curvas de intensidad efecto, por otra parte, tampoco se comenta que tipo de colágena es la que se sintetiza con la estimulación LASER.

He aquí, la importancia de diseñar un estudio que nos permita conocer los efectos de bioestimulación con LASER de baja potencia variando la densidad de radiación sobre la proliferación de fibroblastos humanos *in vitro*. Al mismo tiempo, conoceríamos la curva de estimulación / proliferación para saber dosis óptima, así como la síntesis de colágena y diferenciarla en I y III y que cantidad de células fibroblásticas se reproducen con y sin estimulación LASER.

De esta manera, se sabrían algunos de los procesos íntimos del efecto del LASER en fibroblastos humanos *in vitro* y los datos obtenidos pueden ser de importancia y contribuir al conocimiento del efecto del LASER en tejidos humanos para así traspasarlos a la aplicación del mismo en pacientes *in vivo*.

## ANTECEDENTES

Aunque la mayoría de los estudios están enfocados a nivel celular in vitro, hay pocos reportes en modelos animales y observaciones clínicas las cuales han mostrado tener efectos benéficos de la terapia LASER en la cicatrización de heridas <sup>8</sup>.

Lubart y cols. de la Universidad de Israel, estudiaron los posibles mecanismos por los cuales el LASER estimula la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena. Se cree que la acción estimulante de la luz visible es por una excitación electrónica de fotosensibilizantes endógenos, porfirinas o citocromos en la cadena respiratoria mitocondrial, aumentando la producción de ATP, acompañado por cambios en el transporte de calcio en el citoplasma, por lo tanto, promueve la mitosis <sup>9</sup>.

Los mismos autores en un estudio previo, irradiaron fibroblastos con varias fuentes de luz y se encontró que a una dosis de energía, relativamente baja, hay una mitosis celular acelerada, mientras a dosis mayores la proliferación se inhibe. Sin embargo, se encontró que el efecto no es solamente dependiente de la dosis, sino también depende de la intensidad <sup>10</sup>.

Esto coincide con el estudio realizado por Houghton y cols en Canadá, en el cual, los resultados sugieren que la energía LASER depositada a una densidad de energía apropiada es capaz de actuar directamente sobre la herida para alterar las actividades de los componentes celulares y tisulares y resultar en un aumento en el depósito de colágena y cierre acelerado de la herida; sin embargo, si la energía LASER es proporcionada a niveles excesivos, esto puede afectar la función celular y dañar la cicatrización de la herida <sup>2</sup>.

Por lo tanto, es importante mencionar el concepto de bioestimulación, que puede ser definido como una reacción fotoquímica o fotofísica causada por la interacción LASER tejido la cual genera un grupo de fenómenos biológicos sin involucrar un aumento en la temperatura del tejido <sup>11</sup>.

Calcular la dosis de aplicación a un punto es relativamente fácil, pero cuando se trata de un área mayor, es necesario calcular joules /cm<sup>2</sup>, lo cual requiere del conocimiento de que tan grande es el área a tratar y esto puede ser difícil de determinar. Este es un parámetro importante, para asegurar un contexto científico, pero es difícil de calcular en situaciones clínicas ordinarias. La pregunta entonces, no es saber cuantos joules son depositados en un tratamiento, sino cuantos joules alcanzan el tejido enfermo.

Cuando se trata de una herida abierta, casi toda la energía alcanza el tejido dañado y la luz LASER va directamente al tejido sin pasar a través de las capas de la piel, las cuales a través de absorción, difusión y reflexión absorben gran porcentaje de la luz.

Cuando se trata de un punto anatómico conocido, localizado justo por debajo de la piel, hay una gran diferencia de dosis, dependiendo si la luz se deposita a distancia, en contacto con la piel o en contacto con presión.

De esta manera, se muestra claramente, que un joule es un concepto muy relativo <sup>12</sup>.

La falla en el efecto LASER puede ser debida a que no se da a una densidad de energía apropiada y por otra parte se han involucrado mediadores químicos que

podieran ser liberados sistemáticamente, ejerciendo sus efectos en las heridas tratadas con LASER <sup>13</sup>.

La efectividad de esta modalidad es determinada por muchos factores, como el tipo de LASER, la longitud de onda de la luz, la dosimetría, las técnicas de tratamiento y esquemas del mismo.

En otro reporte, se comprueba que la transmisión cutánea del LASER aumenta conforme la longitud de onda del láser incrementa en el rango del espectro de 442 nm a 830 nm. Estos resultados tocan otro punto importante y ponen de manifiesto que la transmisión cutánea no es proporcional a la cantidad de bioestimulación LASER. Por lo tanto, la aceleración de la cicatrización no puede ser atribuida a la transmisión cutánea; el mecanismo estimulante debe ser el resultado de las propiedades únicas del LASER, como la mínima divergencia, la coherencia y la monocromaticidad. Las técnicas de laboratorio han demostrado que la terapia con LASER de baja potencia aumenta la síntesis de DNA y RNA, la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena <sup>1</sup>.

Van Breugel reportó que el espectro de absorción de fibroblastos humanos mostró varios picos de absorción entre ellos, a una longitud de onda de 630 nm al radiar cultivos de fibroblastos con LASER He-Ne (Helio-Neón) de 632.8 nm, con varias dosis de energía variado la densidad de potencia y el tiempo de exposición; la potencia de salida del LASER varió de 0.55 a 5.98 mW. Para cada irradiación, se determinó la producción de colágena tipo I y el número de células. Los resultados mostraron que la potencia del LASER por debajo de 2.91 mW aumentó la proliferación celular, mientras que con potencias de LASER mayores (5.98 mW) no tuvo efecto.

Por otra parte, cuando la proliferación celular incrementó, la producción de colágena tipo I disminuyó. De estos experimentos, es claro que el tiempo de exposición y la densidad de potencia determinan los efectos de la radiación LASER <sup>14</sup>.

También se tienen reportes, de que el LASER de baja potencia influye en la transformación de fibroblastos en miofibroblastos en cultivos celulares expuestos a una radiación de  $1.2 \text{ J/cm}^2$  <sup>8</sup>.

Hallman y cols en su estudio con fibroblastos humanos cultivados irradiaron con LASER He-Ne de baja potencia reportaron que en sus resultados no tuvieron efecto estimulante ni inhibitorio significativo <sup>15</sup>.

## **METODOLOGÍA**

### ***Preparación de células***

Se obtuvieron fibroblastos cultivados de piel sana, los cuales se pusieron en medio D-MEM (medio de Dulbecco-Eagle modificado) con 10% de suero bovino fetal (SBF) inactivado, penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (5 $\mu$ g/ml) glutamina y alta concentración de glucosa. El cultivo se mantuvo a una atmósfera húmeda a 56°C por 30 minutos.

Los cultivos de fibroblastos de piel normal se generaron a partir de biopsia lavada 3 veces con D-MEM con antibióticos, se cortaron en trozos de 2 mm<sup>3</sup> y se incubó a una atmósfera húmeda con 5% de CO<sup>2</sup> a 37°C. La suspensión celular se repartió en

una a dos botellas. Las líneas de fibroblastos fueron sembradas en placas de 24 pozos ( $2\text{cm}^2$  c/u) con  $5 \times 10^4$  células /  $\text{cm}^2$ , con 1 ml de D-MEM 10% SBF y se incubó por 48 hrs, posteriormente se agregaron  $500\mu\text{l}$  de colágena tipo I (Pentapharm) en concentraciones de 1,5 y 10% en D\_MEM, los cultivos se incubaron por 18 hrs.

### ***Radiación LASER***

Los cultivos de fibroblastos ya preparados se depositaron en charolas con 96 pozas de 7 mm de diámetro y 10 mm de profundidad. Se dejó una poza vacía alrededor de la que tenía el cultivo con la finalidad de que no se irradiara por reflexión o difracción de la luz.

Se aplicó radiación con un LASER diódico de Ga-Al-As con potencia de salida de 30mW y longitud de onda de 650 nm, de onda continua.

El tiempo de aplicación fue de 120 segundos, se modificó la distancia del aplicador a la superficie bioestimulada a 0, 0.4, 1, 3 y 5 cm. Con este procedimiento se irradiaron los fibroblastos a diferentes dosis en diferentes cantidades, depositando así dosis de 0, 0.5, 1, 3, 5 y  $7 \text{ J}/\text{cm}^2$ , para poder saber que ocurre a las 24, 48 y 72 hrs de la irradiación. El control no recibió irradiación.

La bioestimulación se hizo por debajo de la caja de cultivos utilizando un protector de acrílico con una perforación, a fin de que no se irradiara otra zona. Se mantuvo sostenido el aplicador mediante un soporte móvil el cual fabricamos previamente específicamente para esta función.

El experimento se realizó por triplicado a fin de tener mayor seguridad en los datos obtenidos. Una vez que se terminó de radiar el cultivo se procedió al proceso de cuantificación de ADN.

### ***Cuantificación***

Se incorporó timidina ( $^3\text{H}$ ) con técnica de Miki y se incubaron por 18 hrs. Después de este periodo se eliminó el medio y los pozos se lavaron 3 veces con SBF y después se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de metanol frío y se fijaron las monocapas celulares a 4°C por 15-30 min. Al final se eliminó el metanol y las placas se dejaron secar en refrigeración. Finalmente se resuspendieron las monocapas y se tomaron 50  $\mu\text{l}$  para cuantificación de radiactividad en un contador de centelleo líquido. La asociación entre las variables será determinada a través de la prueba de comparaciones múltiples HSD de Tukey.

## **PARTICIPACIÓN PERSONAL**

En este proyecto mi participación inició con la búsqueda de bibliografía, principalmente aquella en la cual se revisaran aspectos referentes al mecanismo de acción del LASER en la cicatrización de heridas y su papel en la proliferación de fibroblastos humanos. Posteriormente se hizo el diseño del estudio y se estableció la hipótesis, el objetivo principal y los objetivos específicos, el tamaño de la muestra, los criterios de inclusión y se hizo una revisión acerca de la metodología a utilizar. Antes de realizar la radiación se calcularon las dosis de bioestimulación y se decidió mantener el tiempo de irradiación fijo modificando la altura para depositar las dosis correctas. Se diseñó un soporte para el equipo de LASER y para evitar contaminación en los cultivos, tanto el soporte como el equipo láser se protegieron con película transparente. El experimento se llevó a cabo con técnica estéril. Durante la realización del experimento se irradiaron los cultivos de fibroblastos con un LASER diódico de Ga-Al-As con potencia de salida de 30mW, longitud de onda de 650 nm, para esto se utilizaron las lentes de protección LASER. El tiempo de aplicación para depositar dosis de 0.5, 1, 3, 5 y 7 J/cm<sup>2</sup> fue de 120 segundos y para cada dosis se modificó la distancia del aplicador a la superficie bioestimulada siendo estas a 5, 3, 1, 0.4 y 0 cm. La irradiación se hizo por debajo de la caja de cultivos, utilizando un protector de acrílico negro con una perforación con el objetivo de no irradiar otra zona y para evitar contaminación después de irradiar cada dosis, los cultivos se mantenían en refrigeración. El experimento se realizó tres veces para tener mayor seguridad en los datos obtenidos.

## RESULTADOS

Se realizó irradiación de fibroblastos con LASER de 650 nm, con potencia de salida de 30 mW y onda continua. Los resultados mostraron que la proliferación celular de fibroblastos se estimuló a dosis entre 3 y 5 J/cm<sup>2</sup>, mientras que a dosis de 7 J/cm<sup>2</sup> la proliferación se inhibió. Los controles, negativo y positivo, se comportaron como se espera bajo la presencia de suero bovino fetal, con mayor incorporación de timidina radiactiva que las que se mantuvieron en las mismas condiciones pero sin suero. Ver gráfica No. 1.

## DISCUSIÓN

El presente estudio, contribuye al conocimiento del efecto del LASER de baja potencia en la cicatrización de heridas. Como ya se ha mencionado, este ha sido un tema de gran controversia, ya que en la literatura no hay reportes que mencionen el mecanismo íntimo de acción. Nosotros hemos encontrado que el LASER de baja potencia aumenta la proliferación de fibroblastos a dosis entre 3 y 5 J/cm<sup>2</sup> y la inhibe a mayores dosis. También se observó, una mejor morfología de los fibroblastos a las 48, 72 y 96 horas post-irradiación. Sin embargo, se encontraron algunos aspectos que pudieran haber interferido con los resultados del experimento. En estudios clínicos se utilizan frecuencias entre 2 y 30 Hz para obtener una respuesta regeneradora, en este experimento se utilizó la onda continua. Por otra parte, habría que analizar si una sola exposición es suficiente para obtener una proliferación evidente. Todo ello hace que este estudio se considere como un estudio preliminar, el cual permitirá continuar con

esta línea de trabajo, sin excluir la posibilidad de que el LASER actúe sobre otro tipo de células involucradas en el proceso de cicatrización.

## **CONCLUSIONES**

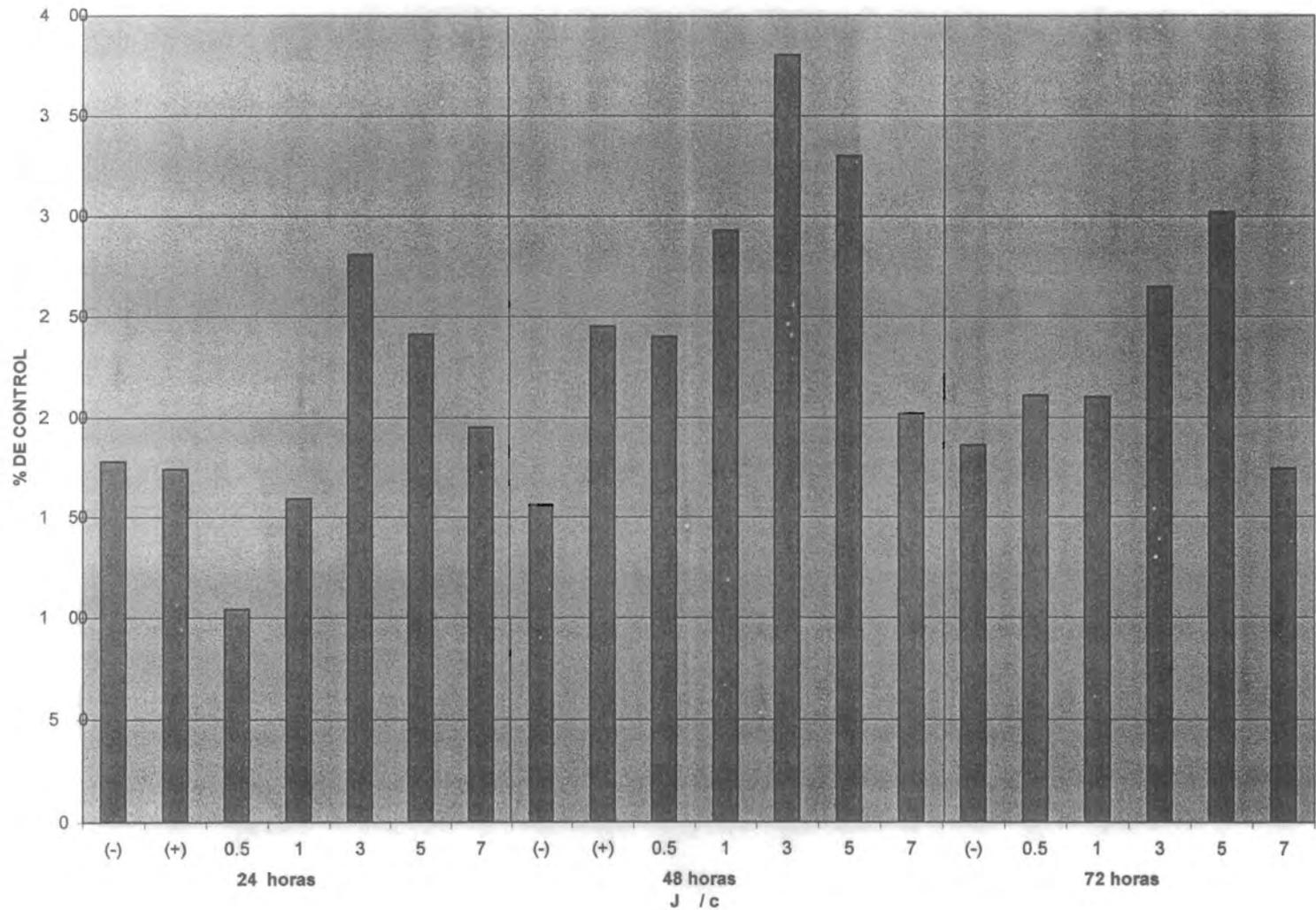
Los efectos de la radiación LASER han sido estudiados desde el punto de vista clínico y en términos ultraestructurales. La modificación producida por el LASER en cultivos de fibroblastos humanos también ha sido investigada.

Bajo diversas condiciones experimentales y clínicas, el LASER estimula la secreción de fibroblastos, tanto in vivo, como in vitro, por razones que siguen siendo objeto de estudio.

Cabe mencionar, que los resultados de este trabajo se consideran preliminares. De acuerdo a la literatura el LASER tiene una participación importante en la proliferación de fibroblastos, sin embargo, no se excluye la posibilidad de que el LASER actúe a través de la modificación en la síntesis y /o depósito de componentes de la matriz extracelular, en la síntesis de enzimas e inhibidores o incluso en factores moduladores del metabolismo celular como las citosinas.

Este proyecto nos permitirá continuar con esta línea de trabajo, la cual es fundamental para contribuir al conocimiento acerca del uso del LASER de baja potencia en la cicatrización de heridas.

# CUANTIFICACION DE FIBROBLASTOS POSTERIOR A RADIACION LASER DE BAJA POTENCIA



## BIBLIOGRAFIA.

1. Farouk AH, Zhang XY: The Acceleration of Wound Healing is not attributed to Laser Skin Transmission. *Laser Therapy* 1999; 11: 6-10.
2. Houghton PE, Brown JL: Effect of low level Laser on healing in wounded fetal mouse limbs. *Laser Therapy* 1999; 11: 54-68.
3. Kovacs EJ, Di Pietro LA: Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J* 1994; 8: 854-861.
4. Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ: Effect of Laser on liberation of BFGf of fibroblasts 3T3. *Radiat Environ Biophys* 1998; 37 (3): 215-217.
5. Rajaratnam S, Bolton P, Dyson M: Macrophage responsiveness to Laser Therapy with varying pulsing frequencies. *Laser Therapy* 1994; 6: 107-112.
6. Longo L, Evangelista S, Tinacci G, Giulio A: Effect of diodes-laser silver arsenide-aluminium (Ga-Al-As) 904 nm on healing of experimental wounds. *Lasers in Surgery and Medicine* 1987; 7: 444-447.
7. Shefer G, Halevy O, Cullen M, Oron U: Low level laser irradiation shows no histopathological effect on myogenic satellite cells in tissue culture. *Laser Therapy* 1999; 11 (3):114-118.
8. Pourreau-Schneider N, Ahmed A, Soudry M, Jacquemier J, et al: Helium-neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. *Am J Pathol* 1990; 137: 171-178.
9. Lubart R, Friedmann H, Sinykov M, Grossman N: Biostimulation of photosensitized fibroblasts by low incident levels of visible light energy. *Laser Therapy* 1995; 7: 101-106.
10. Lubart R, Wollman Y, Friedman H, Rockhind S, et al: Effects of visible and near-infrared lasers on cell culture. *J Photochem Photobiol B* 1992; 12: 305-310.
11. Farouk AH, Al-Wataban, Zhang Z: Dosimetry- related wound healing response in the rat model following helium neon laser LLLT. *Laser Therapy* 1994; 0: 119-124.

12. Tunér J, Lars H: Low level laser therapy. Clinical Practice and Scientific Background. Prima Books in Sweden AB 1999: 87-90.
13. Braverman B, McCarthy RJ, Ivankovich AD: Effect of helium-neon and infrared laser irradiation of wound healing in rabbits. *Lasers in Surgery and Medicine* 1989; 9:50-58.
14. Van Breugel HH, Bar PR: Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine* 1992; 12(5): 528-537.
15. Hallman HO, Basford JR, O'Brien JF, Cummins LA: Helium-neon laser therapy alters in vitro proliferation of human fibroblasts. *Eur J Oral Sc*; 2000; 108(1): 29-34.