

Estudio Morfométrico del Efecto de Láser Infrarrojo 16 J/cm² sobre Hepatocitos de Rata

Morphometric Study of Effect 16 J/cm² Infrared Laser in Rat Hepatocytes

Ricardo Cornejo Uribe; Fernando Matamala Vargas; Héctor Silva Mella;
Orlando Garrido Oñate; Yasna Abarzúa Bastías & Natalia Balboa Ponce

CORNEJO U. R.; MATAMALA V. F.; SILVA M. H.; GARRIDO O. O.; ABARZÚA B. Y. & BALBOA, P. N. PONCE. Estudio morfométrico del efecto de láser infrarrojo 16 J/cm² sobre hepatocitos de rata. *Int. J. Morphol.*, 29(2):650-655, 2011.

RESUMEN: Hígados de ratas Sprague Dawley fueron irradiados durante 15 días con dosis diarias de 8 y 16 J/cm² proveniente del láser AsGa equivalente a 904 nm. De estos animales previamente anestesiados, fueron quirúrgicamente obtenidas muestras de hígado y posteriormente procesadas para microscopía electrónica de transmisión, siendo estudiadas y sometidas a técnicas morfométricas utilizando aumentos de 8.500 X con especial énfasis en cuantificar fracciones volumétricas de componentes celulares. El análisis de los resultados entre hepatocitos irradiados con dosis de 8 y 16 J/cm² revela que existen marcadas diferencias entre las fracciones volumétricas de componentes celulares determinantes de funcionalidad celular e involucrados en síntesis proteica, cuantificación que demuestra claramente que dosis de 8 J/cm² logra un óptimo de estimulación para lograr alta funcionalidad, mientras que 16 J/cm² evidencia notable inhibición de dicha funcionalidad, concluyéndose entonces que los efectos de dosis específicas de radiación infrarroja provoca en los hepatocitos una drástica transformación en sus componentes y por ende en su funcionalidad representando el efecto de estas estimulaciones sobre este tipo celular de elevado metabolismo.

PALABRAS CLAVE: Láser infrarrojo; Hepatocitos; Morfometría.

INTRODUCCIÓN

El uso de las emisiones infrarrojas generadas por el diodo láser Arsenurio de Galio induce a nivel celular una acentuada síntesis proteica (Hawkins & Abrahamse, 2006; Hu *et al.*, 2007), de DNA (Loevschall & Arenholt-Bindslev, 1994; Karu, 2008), de ATP mitocondrial (Stadler *et al.*, 2000; Gavish *et al.*, 2004) y de colágeno (Gomez-Villamandos *et al.*, 1995; Cornejo *et al.*, 2009) como así mismo modulando la proliferación celular (Kreisler *et al.*, 2003; Khadra *et al.*, 2005) las concentraciones de calcio citosólico (Cohen *et al.*, 1998; Koutná *et al.*, 2003) y la actividad de variadas enzimas (Cieslar *et al.*, 1995; Kao & Sheen, 2003).

A pesar de las múltiples demostraciones del efecto de las irradiaciones sobre diferentes tejidos, no se tiene real evidencia a nivel subcelular. El estudio de la biología celular demuestra que en medida que células son estimuladas, sus constituyentes sufren modificaciones cualitativas, cuan-

titativas y topográficas. Es importante precisar mediante un análisis cuantitativo de microfotografías electrónicas con datos obtenidos de análisis morfométricos ultraestructurales, que es posible evidenciar de que manera los cambios morfológicos en componentes celulares se traducen en función celular, básicamente los involucrados en síntesis proteica, en estos tipos celulares (Junqueira & Salles, 1975).

En base a lo planteado, el objetivo fundamental de este trabajo consiste en precisar los efectos derivados del uso del láser infrarrojo describiendo las respuestas celulares a nivel ultraestructural, relacionando estructuras celulares asociadas a síntesis proteica en hepatocitos de ratas irradiados con dosis infrarrojas de 8 y 16 J/cm² por espacio de 15 días consecutivos, y verificar si las modificaciones que se efectúan conllevan a una alteración en su expresión génica.

MATERIAL Y MÉTODO

A partir de hígados de ratas irradiados mediante láser infrarrojo con dosis de 8 y 16 Joules/cm² por espacio de 15 días consecutivos, fueron obtenidas muestras a las cuales se le adicionó solución de glutaraldehído 2% en tampón fosfato 0,15 M, pH 7,2 y se mantuvieron a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, 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 una hora a 40° C y acetato de uranilo 0,5% por 18 horas. 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.

Método estereológico. A partir de los bloques para microscopia electrónica fueron obtenidos cortes ultrafinos desde los cuales se micrografieron hepatocitos irradiados con distintas dosis con un aumento final de 8.500 X.

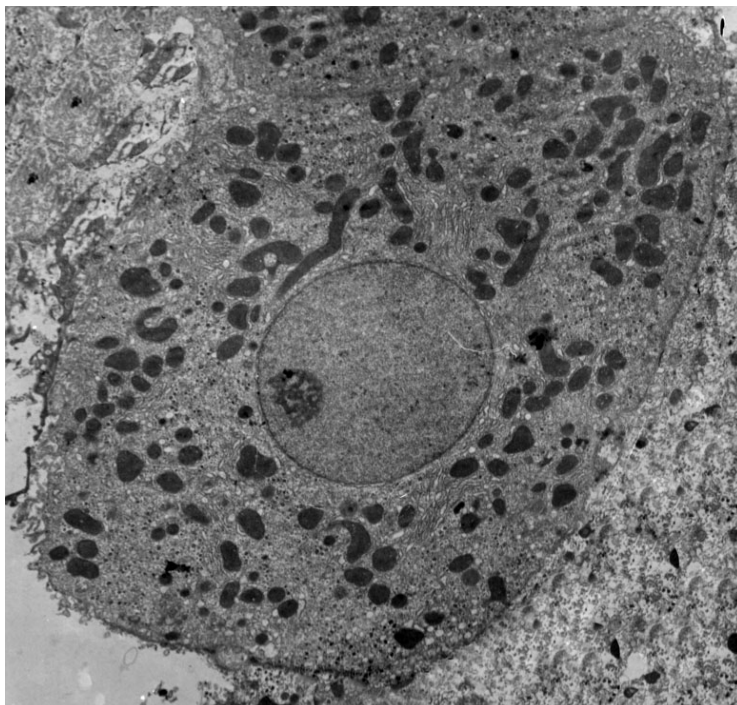


Fig. 1: Microfotografía electrónica de hepatocito de rata estimulado con dosis de láser infrarrojo correspondiente a 8 J/cm². 8.500 X

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). Donde:

$$F_v = \frac{P_i}{P_t}$$

F_v = Fracción volumétrica del componente celular.

P_i = Puntos incidentes sobre el componente en estudio.

P_t = Puntos totales incidentes en la célula estudiada.

RESULTADOS

Las estimulaciones con láser infrarrojo sobre hepatocitos de rata con dosis correspondiente a 8 y 16 Joules/cm² se evidencian en las Figuras 1 y 2, respectivamente, y el análisis mediante microscopía electrónica de transmisión generan los siguientes datos morfométricos en relación a estructuras celulares asociadas a síntesis proteica.

1. Considerando los datos derivados de la morfometría y cuantificando las fracciones volumétricas de retículo endoplásmico rugoso (RER), mitocondrias e inclusiones de glicógeno se evidencia claramente que la dosis óptima de estimulación infrarroja corresponde a 8 J/cm² con la cual se observa una notable activación de la función celular.

2. Por el contrario, es observable con claridad que la dosis de 16 J/cm² utilizada, genera en el hepatocito una notable disminución y variadas modificaciones en las estructuras celulares asociadas a síntesis proteica, manifestadas a nivel nuclear en una disminución del área nucleolar, mientras que a nivel citosólico se visualiza disminución de las fracciones volumétricas de retículo endoplásmico rugoso y mitocondrial, además, de un aumento del glicógeno. Todo lo cual se traduciría en una evidente inhibición de la actividad celular generada por estas estimulaciones infrarrojas.

Estas evaluaciones se observan en Fig. 1.

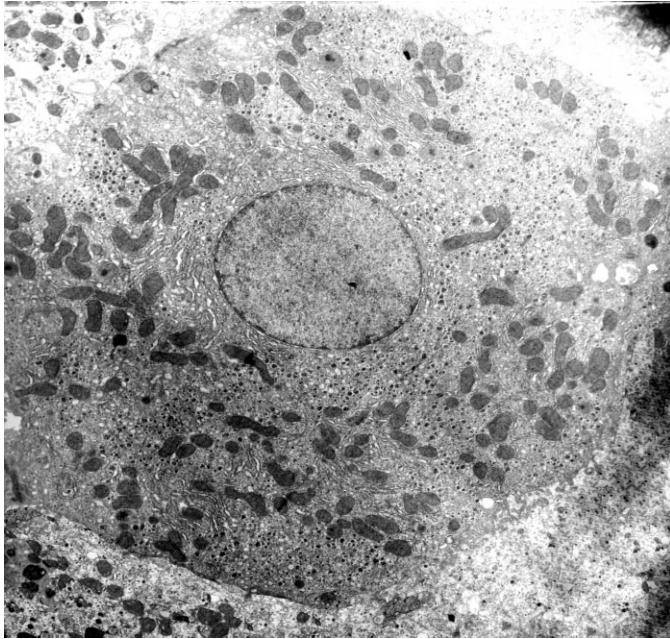


Fig. 2. Microfotografía electrónica de hepatocito de rata estimulado con dosis de láser infrarrojo correspondiente a 16 J/cm². 8.500 X

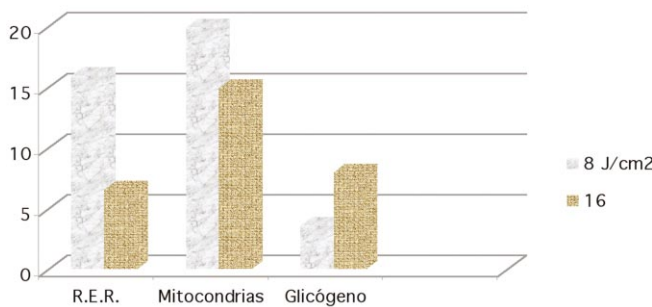


Fig. 3. Fracciones volumétricas (%) de R.E.R., mitocondrias y glicógeno evaluados en hepatocitos de rata irradiados con dosis de láser infrarrojo correspondiente a 8 y 16 Joules/cm².

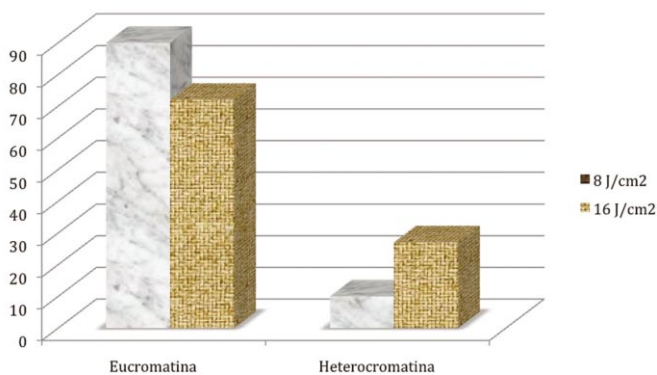


Fig. 4. Fracciones volumétricas (%) de Eucromatina y Heterocromatina evaluados en hepatocitos de rata irradiados con dosis de láser infrarrojo de 8 J/cm² y 16 J/cm².

3. Del mismo modo, producto de esta dosis alta de irradiación infrarroja (16 J/cm²) se observa una disminución en el área ocupada por el nucléolo en relación a la descrita para la cuantificada con la dosis óptima de 8 J/cm². Las áreas nucleares correspondientes a hepatocitos de ratas estimulada con láser infrarrojo de 8 y 16 J/cm² fueron 12 y 8, respectivamente.

4. Existe concordancia entre los componentes celulares citoplasmáticos descritos y las fracciones volumétricas de eucromatina puesto que, con la dosis óptima de irradiación se cuantificó 90 % representando alta expresión génica que decrece significativamente a 72 % con alta dosis infrarroja (Fig. 2).

DISCUSIÓN

El análisis de los resultados obtenidos evidencia que el efecto de altas dosis de estimulaciones con láser infrarrojo sobre hepatocitos de rata generan notables variaciones en los componentes celulares tanto nucleares como citosólicas las cuales provocan lógicas modificaciones a nivel morfológico, ultraestructural y de funcionalidad celular.

De este modo, se describe con claridad que en lo relativo al compartimento nuclear, altas dosis de estimulación infrarroja se traducen en una disminución del área nucleolar producto de una baja tasa de transcripción sintetizando ARN ribosomal, situación que apunta entonces, tanto a una notable disminución de ribonucleoproteínas, como a la biogénesis ribosomal con la consiguiente merma en la síntesis proteica del hepatocito sometido a las estimulaciones de 16 J/cm².

En este mismo contexto, es decir, con estimulación correspondientes a 16 J/cm², se observa con claridad que las fracciones volumétricas de eucromatina con dosis infrarrojas óptimas alcanza a una fracción volumétrica de 90%, valor óptimo que indicaría que la expresión génica y la síntesis proteica es mayor, decrece a valores de 72% indicando menor expresión génica como disminución en síntesis proteica (Cornejo *et al.*, 2009).

Las informaciones relativas a explicar las variaciones del metabolismo de diferentes tipos celulares generados por estimulaciones de láser infrarrojo basado en aspectos cuali y cuantitativos de sus componentes celulares son absolutamente escasas y mas bien solo existen referencias destinadas a mostrar los resultados de estimulaciones infrarrojas manifestados en la observa-

ción de tratamientos terapéuticos musculoesqueléticos. En este sentido, Fikáčková *et al.*, (2007) aplicando dosis de 16 J/cm² en la articulación temporomandibular humana demuestra la obtención de un método útil para reducir en elevado porcentaje el dolor de la afección.

En este mismo contexto, es decir, comprobar variaciones inhibitorias de funcionalidad celular sin basarse en el comportamiento cuali y cuantitativo de sus organelos y por tanto coincidentes con nuestros resultados son los expresados por Hawkins & Abrahamse los cuales informan que la irradiación de fibroblastos de piel con dosis de 16 J/cm² se traduce en una notable y persistente reducción tanto de la migración, proliferación como de la viabilidad celular, generando además, una significativa disminución de la síntesis de ATP mitocondrial, daño en la constitución de las membranas celulares y ruptura del DNA. De igual manera, Hourelid & Abrahamse (2007) en este mismo tipo celular expresan que mientras con dosis infrarrojas de 5 J/cm² logran una acentuada migración del fibroblasto, con 16 J/cm² esta migración se inhibe drásticamente, mas aún, ellos plantean que estas altas dosis inducen un intenso daño genético.

De igual forma, Sroka *et al.*, (1999) experimentando con estimulaciones de dosis infrarrojas equivalentes a 20 J/cm² sobre células musculares de rata visualizaron un notable efecto inhibitorio en lo relativo a la proliferación celular.

Sin embargo, tal vez, la demostración más clara de los efectos nocivos de dosis infrarrojas elevadas sobre células de elevado metabolismo, lo constituye lo visualizado por Cornejo *et al.*, (2010) quienes al estimular fibroblastos pertenecientes a la articulación temporomandibular de conejos con dosis de 10 J/cm² visualizaron que dichas células disminuyeron drásticamente su área celular desde 70 u² cuantificados en fibroblastos controles (lógicamente sin irradiar), hasta 40 u² en los irradiados, siendo, por ende, estos 30 u² de diferencia responsabilidad de las estimulaciones infrarrojas elevadas. Mas aún, observadas las micrografías electrónicas de transmisión de ambos tipos de fibroblastos se aprecia claramente una notable disminución de la cantidad de fibras colágenas sintetizadas y secretadas.

Estas informaciones que son producto de investigaciones científicas rigurosas y muy atinentes al tema en desarrollo, debieran servir de base concreta a los distintos especialistas que ejercen su labor interactuando con pacientes animales, incluidos los de la especie humana, que procuran mediante el uso de irradiaciones infrarrojas mitigar el dolor y episodios inflamatorios en tratamientos de afecciones básicamente musculoesqueléticas, a considerar las drásticas consecuencias que significa irradiar diversos tejidos con estimulaciones infrarrojas dañinas para la vitalidad y

funcionalidad celular y que, por tanto, será necesario precisar con fineza la dosis de láser infrarrojo adecuada para ser utilizado en el tratamiento de distintas afecciones y tejidos.

Estos hallazgos, producto de estimulaciones infrarrojas semejantes a las utilizadas, son coincidentes a los descritos por Bai'bekov *et al.*, (1991) visualizando incremento en los volúmenes nucleolares; Marques *et al.*, (2004) observaron que los fibroblastos estudiados generan crecientes nucleolos; Koutná *et al.*, (2003) comunicando activa síntesis de RNA; y Tamietti *et al.*, 2007 quienes informan de una acentuada condensación de cromatina.

En este mismo contexto, es decir, con estimulación correspondientes a 8 J/cm², se observa con claridad que las fracciones volumétricas de eucromatina corresponde a 90%, valor óptimo que indicaría que la expresión génica y la síntesis proteica es mayor que la efectuada tanto en el hepatocito normal, como en los estimulados con dosis menores (Cornejo *et al.*, 2009).

Por otro lado, es posible visualizar que el mayor desarrollo de componentes celulares, básicamente los involucrados en síntesis proteica: retículo endoplásmico rugoso (RER) y mitocondrias, son producto de las estimulaciones generadas con dosis entre 4 y 8 J/cm². Paralelamente es preciso considerar que los volúmenes de glicógeno disminuyen con dosis crecientes de láser indicando una constante degradación a glucosas citoplasmáticas para realizar procesos de glicólisis y posterior síntesis de ATP mitocondrial, obteniendo la energía necesaria para la correspondiente síntesis de proteínas. Estos resultados son semejantes a los enunciados por Kao & Sheen quienes demostraron que estas estimulaciones infrarrojas generan en hepatocitos de rata un notable incremento en la síntesis proteica, especialmente de glutatión.

Estos resultados aquí presentados definen con claridad que las dosis de emisiones infrarrojas entre 4 y 8 J/cm² son benéficas proclive a estimular el desarrollo de estructuras nucleares y citosólicas asociadas a síntesis proteica, y que, por el contrario, dosis mayores como 16 J/cm² generan disminución de constituyentes nucleares y citoplasmáticos, y por ende disminuye la actividad celular, en este sistema biológico, hallazgos absolutamente coincidentes con los demostrados tanto por Hawkins & Abrahamse como Hourelid & Abrahamse quienes demostraron que en fibroblastos estimulados con dosis entre 2.5 y 5 J/cm² se produce un notable incremento tanto en la migración como en la proliferación de estas células y de igual modo, con dosis equivalente a 16 J/cm² se reduce migración y proliferación llevando a un estado de stress celular disminuyendo igualmente la síntesis de ATP y la viabilidad celular.

CORNEJO U. R.; MATAMALA V. F.; SILVA M. H.; GARRIDO O. O.; ABARZÚA B. Y. & BALBOA, P. N. PONCE. Effect of a 16 J/cm² infrared laser on rat hepatocytes morphometric study. *Int. J. Morphol.*, 29(2):650-655, 2011.

SUMMARY: Sprague Dawley rat livers were irradiated with 8 and 16 J/cm² daily doses during 15 days from the AsGA laser, equivalent to 904 nm. Liver samples were surgically removed from rats previously anesthetized, then processed for electronic microscopic transmission and subsequently studied and subjected to morphometric techniques using 8.500 X enlargements with special emphasis on quantifying cellular component volumetric fractions. The result analysis of the hepatocytes irradiated with 8 and 16 J/cm² doses revealed that there were marked differences between the volumetric fractions of cellular components that determine cellular functionality and protein synthesis, a quantification that clearly demonstrates that with a dose of 8 J/cm², the optimum stimuli is achieved in order to obtain high functionality, while with a dose of 16 J/cm² a notable reduction of that functionality is noted, concluding that the effects of specific infrared radiation doses provoke a drastic transformation of its components in hepatocytes, and therefore its functionality, activating or inhibiting it, and representing the effect of these stimulations over this elevated metabolism cellular type.

KEY WORDS: Infrared laser; Hepatocyte; Morphometry

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bai`bekov, I. M.; Vorozhei`kin, V. M. & Artykov, Sh. N. Effect of low-intensity infra-red laser radiation on ultrastructure and proliferation of liver cells in experimental hepatitis and cirrhosis. *Biull. Eksp. Biol. Med.*, 113(4):571-4, 1991.
- 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.
- Cohen, N.; Lubart, R.; Rubinstein, S. & Breitbart, H. Light irradiation of mouse spermatozoa: stimulation of *in vitro* fertilization and calcium signals. *Photochem. Photobiol.*, 68:407-13, 1998.
- Cornejo, R.; Matamala, F.; Silva, H. & Garrido, O. Morphometric and ultrastructural studies of effect infrared laser on rabbit temporomandibular joint fibroblasts. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 52(3):611-6, 2009.
- Cornejo, R.; Matamala, F.; Silva, H. & Garrido, O. Analisis morfométrico y ultraestructural del efecto del láser infrarrojo 10 J/cm² sobre fibroblastos de conejo. *Rev. Cient FCV-LUZ* 20(5):480-4, 2010.
- Fikáčková, H.; Dostálová, T.; Vosčická, R.; Peterová, V.; Navrátil, L. & Lesák, J. Arthralgia of the temporomandibular joint and low-level laser therapy. *Photomed. Laser Surg.*, 25(4):297-303, 2007.
- Gavish, L.; Asher, Y.; Becker, Y. & Kleinman, Y. Low level laser irradiation stimulated mitochondrial membrane potential and disperses subnuclear promyelocytic leukemia protein. *Lasers Surg. Med.*, 35(5):369-76, 2004.
- Gomez-Villamandos, R. J.; Santisteban Valenzuela, J. M.; Ruiz Calatrava, I.; Gomez-Villamandos, J. C. & Avila Jurado, I. He-Ne laser therapy by fibroendoscopy in the mucosa of the equine upper airway. *Laser Surg. Med.*, 16:184-8, 1995.
- Hawkins, D. & Abrahamse, H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers Surg. Med.*, 38:74-83, 2006.
- Hourel, N. & Abrahamse, H. *In vitro* exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm². *Photomed. Laser Surg.*, 25(2):78-84, 2007.
- Hu, W.; Wang, J.; Yu, C.; Lan, C.; Chen, G. & Yu, H. Helium-Neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. *J. Investigat. Dermatol.*, 127:2048-57, 2007.
- Junqueira, L. C. U. & Salles, L. *Ultra-estrutura e função celular*. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1975. pp 44, 58.
- 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.
- Karu, T. Mitochondrial signalling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem Photobiol.*, 84:1091-9, 2008.
- Khadra, M.; Lyngstadaas, S.; Haanaes, H. & Mustafa, K.

Determining optimal dose of laser therapy for attachment and proliferation of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 73:55-62, 2005.

Koutná, M.; Janisch, R. & Veselská R. Effects of low-power laser irradiation on cell proliferation. *Scripta Medica*, 76(3):163-72, 2003.

Kreisler, M.; Christoffers A. B.; Willrshausen, 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.

Marques, M. M.; Pereira, A. N.; Fujihara, N. A.; Nogueira, F. N. & Eduardo, C. P. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg. Med.*, 34:260-5, 2004.

Loevschall, H. & Arenholt-Bindslev, D. Effects of low level diode laser irradiation on fibroblasts of human oral mucosa in vitro. *Lasers Surg. Med.*, 14:347-54, 1994.

Sroka, R.; Schaffer, M.; Fuchs, C.; Pongratz, T.; Schrader-Reichard, U.; Busch, M.; Schaffer, P. M.; Dühmke, E. & Baumgartner, R. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. *Lasers Surg. Med.*, 25:263-71, 1999.

Stadler, I.; Evans, R.; Kolb, B.; Naim, J; Narayan, V.; Buehner, N. & Lanzafame, R. *In vitro* effects of low-level laser irradiation at 660 nm on peripheral blood lymphocytes. *Lasers Surg. Med.*, 27:255-61, 2000.

Tamiatti, B.; Machado, A.; Maftoum-Costa, M.; Da Silva, N.; Tedesco, A.; Pacheco-Soares, C. Analysis of mitochondrial activity related to cell death after PDT with AIPS4. *Photomedicine and Laser Surgery* 25(3):175-179, 2007.

Weibel, E. R. Stereological principles for Morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Rev. Cytol.*, 26: 235-302, 1969.

Dirección para correspondencia:
Prof. Dr. Ricardo Cornejo Uribe
Facultad de Medicina
Universidad de La Frontera
Casilla 54-D
Temuco
CHILE

Email:rcornejo@ufro.cl

Recibido : 19-11-2010
Aceptado: 01-03-2011