# Persistencia de los Efectos del Láser Infrarrojo 6 J/cm<sup>2</sup> en Hepatocitos de Rata

Persistence of the Effects of 6 J/cm<sup>2</sup> Infrared Laser in Rat Hepatocytes

\*Cornejo, R.; \*Matamala, F.; \*Silva, H.; \*\*Garrido, O. & \*Saéz, L.

CORNEJO, R.; MATAMALA, F.; SILVA, H.; GARRIDO, O. & SAÉZ, L. Persistencia de los efectos del láser infrarrojo 6 J/cm<sup>2</sup> en hepatocitos de rata. *Int. J. Morphol.*, *30*(*2*):467-472, 2012.

**RESUMEN:** Hígados de ratas Sprague Dawley fueron irradiados con dosis diarias de 6 J/cm<sup>2</sup> emitida por el láser AsGa equivalente a 904 nm durante 15 días De estos animales previamente anestesiados fueron sacrificados transcurridos 5, 10, 30, 45 y 60 días post irradiación para posteriormente obtener quirúrgicamente muestras de hígado y ser procesadas para microscopía electrónica de transmisión, aplicando técnicas morfométricas utilizando aumentos de 8.500 X con especial énfasis en cuantificar fracciones volumétricas de componentes celulares con el objetivo de precisar la duración de las estimulaciones infrarrojas. El análisis de los resultados entre hepatocitos controles e irradiados con dosis de 6 J/cm<sup>2</sup> y tiempo de estimulación infrarroja 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 el efecto del láser infrarrojo persiste hasta los 30 días post estimulación, evidenciándose modificaciones de organelos que revelan alta funcionalidad, mientras que sobre este tiempo es observada una notable inhibición de dicha funcionalidad, concluyéndose entonces que los efectos de radiación infrarroja persisten en tiempos precisos provocando en los hepatocitos una drástica transformación en sus componentes y por ende en su funcionalidad. en estas células de elevado metabolismo.

PALABRAS CLAVE: Láser infrarrojo; Hepatocitos; Morfometría; Ratas

## INTRODUCCIÓN

Es ya de público conocimiento que gracias a la Medicina Física se han instaurado un conjunto de técnicas para lograr una mejor rehabilitación del paciente puesto que en los años 80 se comenzó su uso logrando óptimos resultados en los tratamientos relativos a procesos de cicatrización, problemas músculo-esqueléticos y consolidación de fracturas.

Por tanto estamos en presencia de una terapia con láser infrarrojo de baja potencia que ofrece una posibilidad 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).

En este sentido, 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 gran gama de lesiones y afecciones articulares basado en su eficaz acción analgésica (Novoselova *et al.*, 2006; Castaño *et al.*, 2007), antiinflamatoria (Fikácková *et al.*, 2006) y cicatrizante (Reddy *et al.*, 2004; Kreisler *et al.*, 2003), como a

nivel celular una acentuada síntesis proteica (Hawkins *et al.*, 2006; Simões *et al.*, 2009), de DNA (Zhang *et al.*, 2003; Karu, 2008), de ATP mitocondrial (Butow & Avadhani, 2004; Schroeder *et al.*, 2007) y de colágeno (Pereira *et al.*, 2002; Cornejo *et al.*, 2009a), como así mismo modulando la proliferación celular, concentraciones de calcio citosólico (Krizaj & Copenhagen, 2002; Lavi et al., 2003) y la actividad de variadas enzimas (Cieslar *et al.*, 1995; Kao & Sheen, 2003).

Es un hecho concreto que en forma creciente se recopilan mas antecedentes y conocimientos relativos al rol que ejercen las estimulaciones derivadas del láser infrarrojo sobre los componentes subcelulares y que son capaces de generar modificaciones de estos organelos dando origen a variaciones en la funcionalidad de células y por ende a determinados tejidos. Igualmente, resultado de las diferentes investigaciones se posee información certera relativa a las dosis óptimas con las cuales se consigue generar tanto una notable activación como una notoria inhibición de la función celular, sin embargo, continúa faltando determinar cuan-

<sup>\*</sup> Departamento de Ciencias Básicas. Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

<sup>\*\*</sup> Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

to es el tiempo durante el cual permanece activa la estimulación infrarroja en células de alto metabolismo como por ejemplo el hepatocito. Por tanto, pareció importante realizar un estudio relativo a develar mediante un análisis cuantitativo de microfotografías electrónicas con datos obtenidos de análisis morfométricos ultraestructurales como y cuanto persisten los efectos de estas estimulaciones infrarrojas que generan variaciones en los volúmenes de componentes celulares y que determinan una cierta función celular Junqueira & Salles (1975).

En base a lo planteado, el objetivo fundamental de este trabajo consiste en precisar el tiempo de persistencia de los efectos de las estimulaciones infrarrojas describiendo las respuestas celulares a nivel ultraestructural, relacionando estructuras celulares asociados a síntesis proteica en hepatocitos de ratas irradiados con dosis infrarrojas de 6 J/ cm<sup>2</sup> por espacio de 15 días consecutivos y sacrificadas a los 5, 10, 30, 45 y 60 días post irradiación.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

A partir de hígados de ratas irradiados mediante láser infrarrojo con dosis de 6 Joules/cm2 por espacio de 15 días consecutivos, fueron obtenidas muestras de animales sacrificados a los 5, 10, 30, 45, y 60 días post irradiación a las cuales se le adicionó solución de glutaraldehído 2% en tampón fosfato 0,2 M, pH 7,2 y se mantuvo a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, fueron sometidas a un lavado en la misma solución del buffer.

La post-fijación se realizó con tetróxido de osmio 1% disuelto en la solución antes descrita durante dos horas a 4° C. Luego de lavado el material fue deshidratado en concentraciones crecientes de acetona (30 a 100%) e incluído en Araldita 6005. Se obtuvieron cortes ultrafinos de aproximadamente 70 nm de grosor los que fueron montados en grillas de cobre descubiertas teñidas con acetato de uranilo 2% durante 5 minutos y citrato de plomo 0,5% por 10 minutos.

Las muestras fueron finalmente estudiadas y microfotografiadas en un microscopio electrónico Hitachi H-700.

**Método Estereológico**. A partir de los bloques para microscopía electrónica fueron obtenidos cortes ultrafinos desde los cuales se micrografiaron hepatocitos irradiados con dosis de  $6 \text{ J/cm}^2$  con un aumento final de 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)

$$Fv = \frac{Pi}{Pt}$$

Donde:

Fv = Fracción volumétrica del componente celular. Pi = Puntos incidentes sobre el componente en estudio. Pt = Puntos totales incidentes en la célula estudiada.

Los resultados morfométricos cuantitativos obtenidos fueron sometidos a un análisis mediante el paquete estadístico SPSS versión 17.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago IL, USA) realizando un análisis descriptivo e inferencial con la Prueba T para muestras pareadas (p=0,05).

#### RESULTADOS

En este estudio, los hepatocitos fueron irradiados con dosis infrarrojas correspondiente a 6 Joules/cm<sup>2</sup> y posteriormente sacrificados a los 5, 10, 30, 45 y 60 días post estimulación, y analizados en este estudio mediante microscopía electrónica de transmisión cuantificándose en cada uno de ellos (mas un control sin irradiar), las fracciones volumétricas expresadas en porcentaje correspondiente a estructuras celulares tales como: citoplasma, núcleo, mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso (RER), gránulos de glicógeno, eu y heterocromatina, situación que se describe en la Tabla I.

Interpretando los datos numéricos obtenidos de los análisis morfométricos cuantificando los componentes celulares presentados en la Tabla I correspondiente a los hepatocitos evidenciados en las Figuras 1, 2 y 3, es posible determinar las siguientes precisiones:

1.- En relación a las fracciones volumétricas correspondiente a las mitocondrias y el RER, ambos componentes directamente ligados a síntesis proteica y por ende a función celular se observa en forma creciente que sus mayores volúmenes se sitúan en el día 30 post-irradiación.

2.- En este mismo contexto, la notable y paulatina disminución en la fracción volumétrica correspondiente a la inclusión de gránulos de glicógeno obtenida igualmente al día 30 post-irradiación argumenta en el sentido de una mayor actividad celular.

Fracciones volumétricas	Hepatocito normal	5 días post irradiación	10 días post irradiación	30 días post irradiación	45 días post irradiación	60 días post irradiación
Citoplasma	83	84	88	81	90	89
Nucleo	16	17	12	18	10	11
Mitocondrias	14	15	20	23	15	14
RER	9	11	12	13	5	7
Glicógeno	16	9	7	2	18	12
Eucromatina	57	69	73	76	54	55
Heterocromatina	43	31	27	24	46	25

Tabla I. Persistencia de la irradiación infrarroja 6 J/cm<sup>2</sup> en hepatocitos de rata. Fracciones volumétricas expresadas en porcentaje pertenecientes a los diferentes componentes celulares de hepatocitos de rata control e irradiados con dosis infrarrojas de 6 J/cm<sup>2</sup> y sacrificados en día 5, 10, 30, 45 y 60 post estimulación.



Fig. 1. Microfotografía electrónica de transmisión correspondiente a hepatocito de rata normal –control. 8500 X.

3.- De igual manera, observando las fracciones volumétricas de eucromatina se concluye que al día 30 post-irradiación se consigue su mayor valor, situación que apunta a mantener una elevada tasa de expresión génica en esta célula.

4.- Además, considerando el 18% correspondiente al volumen nuclear precisado al día 30 post-irradiación se puede interpretar como sinónimo de elevada actividad nuclear tanto de replicación como relativo a transcripción del material genético.

5.- Por otra parte, observadas las fracciones



Fig. 2. Microfotografia electrónica de transmisión perteneciente a hepatocito de rata 30 días post estimulación con dosis de láser infrarrojo equivalente a 6 J/cm2. 8.500 X

volumétricas correspondiente a los componentes celulares de hepatocitos estimulados a 45 y 60 días post-irradiación se concluye que estos volúmenes indican una drástica disminución en la actividad celular.

Por lo tanto, en consideración a los datos derivados de la morfometría cuantificándose las fracciones volumétricas de los componentes celulares involucrados en síntesis proteica es posible argumentar que las estimulaciones infrarrojas persisten aun hasta el día 30 post-irradiación, situación en la cual claramente los hepatocitos adquieren un notable incremento en su funcionalidad, producto de las estimulaciones generadas por el láser infrarrojo.



Fig. 3. Microfotografia electrónica de transmisión correspondiente a hepatocito de rata 45 días post estimulación con dosis de láser infrarrojo equivalente a 6 J/cm<sup>2</sup>. 8.500 X.

## DISCUSIÓN

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

De igual modo y tomando como base los volúmenes de componentes celulares aquí presentados se describe con claridad que en lo relativo al tiempo de duración o persistencia de los efectos de las estimulaciones infrarrojas ellos se mantiene hasta los 30 días luego de efectuada dicha estimulación.

En este contexto, a nivel del compartimento nuclear esta dosis de estimulación infrarroja mantiene sus efectos los cuales se traducen en un ligero aumento de su volumen, situación que se interpreta como un aumento en la tasa de

470

replicación y transcripción del DNA y por lógica consecuencia en un aumento tanto de la expresión génica como de una creciente actividad en la síntesis proteica y de la funcionalidad del hepatocito. Estos resultados son coincidentes con los descritos por distintos investigadores, así Baibekov *et al.* (1992) los cuales evidencian incremento en los volúmenes tanto nucleares como nucleolares, igualmente Marques *et al.* (2004) idénticos hallazgos en fibroblastos, Koutna *et al.* (2003) comunicando activa síntesis de RNA producto de activa transcripción y Tamietti *et al.* (2007) quienes informan además de una acentuada condensación de la cromatina.

Del mismo modo, aun en relación al compartimento nuclear este hepatocito cuantificado a los 30 días post estimulación presenta una fracción volumétrica de 76 por ciento en su eucromatina, es decir, el máximo valor y/o valor óptimo que indicaría claramente junto con los resultados anteriores que la expresión génica y la síntesis proteica alcanza su mayor expresión (Cornejo *et al.*, 2009b).

En directa concordancia con estos hallazgos morfométricos y considerando ahora volúmenes de componentes citoplasmáticos directamente relacionados con síntesis proteica observados en estos 30 días post irradiación infrarroja, adquieren

en forma creciente su mayor volumen tanto mitocondrias como el RER, directamente relacionados con la activa persistencia de los efectos de estas estimulaciones, hallazgos concordantes con los enunciados por Hrazdira & Mornstein (2001), Koutna *et al.* y Gavish *et al.*(2004).

Paralelamente es preciso considerar que los volúmenes de glicógeno en estos 30 días post irradiación disminuyen constante y drásticamente 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 y Hawkins & Abrahamse, los cuales demuestran que estas estimulaciones infrarrojas generan en hepatocitos de rata un notable incremento en la síntesis proteica.

De acuerdo a los hechos descritos aparece claramente demostrado que los efectos de las estimulaciones infrarrojas permanecen hasta los 30 días post irradiación donde se logra el óptimo de actividad celular y del mismo modo puede apreciarse que sobre este lapso de tiempo (45 y 90 días) los volúmenes de los constituyentes celulares indican una notable disminución tanto en los procesos celulares y por consecuencia en la funcionalidad del hepatocito. Baste en este sentido apreciar a nivel citosólico la disminución de los volúmenes correspondiente tanto a mitocondrias como del RER y un considerable aumento en el volumen de glicógeno, mientras que a nivel nuclear una drástica disminución de su volumen como de la eucromatina, todo lo cual se traduce en una creciente inhibición de la óptima funcionalidad celular generada por las estimulaciones infrarrojas de 6 J/cm2 mantenida hasta el día 30 post irradiación y donde posteriormente el hepatocito retoma su funcionalidad normal (Cornejo *et al.*, 2009b). En base a todo lo anteriormente expresado es posible concluir que el presente trabajo describe con claridad los efectos generados por las emisiones infrarrojas equivalente a dosis de 6 J/cm2 sobre componentes celulares de hepatocitos con la cual se logra una notable actividad de la función de esta célula y en este mismo contexto se precisa que dichas estimulaciones infrarrojas se mantienen activas por hasta 30 días post irradiación.

AGRADECIMIENTOS, Este trabajo es el resultado de las actividades de investigación realizadas en el proyecto DI-UFRO 10-102.

CORNEJO, R.; MATAMALA, F.; SILVA, H.; GARRIDO, O. & SAÉZ, L. Persistence of the effects of 6 J/cm<sup>2</sup> infrared laser in rat hepatocytes. *Int. J. Morphol.*, *30*(2):467-472, 2012.

**SUMMARY:** Livers of Sprague Dawley rats were irradiated with daily doses of 6 J/cm<sup>2</sup> emitted by a laser AsGa, equivalent to 904 nm during 15 days. Experiment animals were anaesthetised and killed after 5, 10, 30, 45 and 60 days post irradiation, in order to obtain samples of liver by surgery. These were processed for transmission electron microscopy, and morphometric techniques were applied using 8,500 X magnification with special emphasis on measuring the volumetric fractions of cell components in order to determine the duration of infrared stimulation. Analysis of the results between control hepatocytes and those irradiated with doses of 6 J/cm<sup>2</sup> and by period after infra-red stimulation revealed the existence of marked differences between the volumetric fractions of cell components which determine cell function or are involved in protein synthesis. The measurements show clearly that the effect of the infrared laser persists up to 30 days post stimulation, with evidence of modifications of organelles revealing high functioning, while after 30 days a notable inhibition of this functioning is observed. It is therefore concluded that the effects of infrared radiation persist for precise times, provoking a drastic transformation in hepatocyte components, and thus the functioning of these high-metabolism cells.

KEY WORDS: Infrared laser; Hepatocytes; Morphometry; Rats.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Baibekov, I.; Vorozheikin, N. & Artykov Sh. N. Effects of low intensity infra-red laser irradiation on ultrastructure and proliferation of liver cells in experimental hepatitis and cirrhosis. *Biull. Eksp. Biol. Med.*, 113(4):424-7, 1992.
- Butow, R. A. & Avadhani, N. G. Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol. Cell.*, *14*(1):1-15, 2004.
- Castaño, 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 membraneous and mitochondrial enzymes of hepatocytes in rats. *Proc. SPIE*, 2323:546-50,1995.
- Cornejo, R.; Matamala, F.; Silva, H. & Garrido, O. Morphometric and ultrastructural studies of effect infarred laser on rabbit temporo-mandibular joint fibroblasts. *Bras. Arc of Biol and Tech.*, 52(3):611-616, 2009a.

- Cornejo, R.; Matamala, F.; Silva, H. & Garrido, O. Morphometric analysis of infrared laser effect on rat hepatocyte. *Int. J. Morphol.*, 27(3):831-6, 2009b.
- Fikácková, H.; Dostálová, T.; Vosická, R.; Peterová, V.; Navrátil, L. & Lesák, J. Arthalgia of the temporomandibular joint and low-level laser therapy. *Photomed. Laser Surg.*, 24(4):522-7, 2006.
- 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.
- Hawkins, D. H. & Abrahamse, H. The role of laser influence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers Surg. Med.*, 38(1):74-83, 2006.
- Hrazdira I. & Mornstein, V. Lekarska biofyzika a pristrojova technika. Medical Biophysics and Instruments. Brno, Neptun, 2001.

- Junqueira, L. & Salles, L. *Ultra-estrutura e funçao celular*. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1975. pp.44, 58.
- Kao, M. & Sheen, L. 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. I. Mitochondrial signalling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem. Photobiol.*, 84(5):1091-9, 2008.
- Koutna, M.; Janisch, R. & Veselska, R. Effects of low-power laser irradiation on cell proliferation. *Scripta Medica*, 76(3):163-72, 2003.
- Kreisler, M.; Christoffers, A.; Willrshausen, B. & d'Hoedt, B. Effect of lo-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.
- Krizaj, D. & Copenhagen, D. Calcium regulation in photoreceptors. *Front. Biosci.*, 7:d2023-44, 2002.
- Lavi, P.; Koutna, M.; Janisch, R. & Veselska, R. Effects of lowpower laser irradiation on cell proliferation. *Scripta Medica*, 76(3):163-72, 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(3):260-5, 2004.
- 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.
- Novoselova, E. G.; Glushkova, O. V.; Cherenkov, D. A.; Chudnosvsky, V. M. & Fesenko, E. E. Effects of low-power laser radiation on mice immunity. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 22(1):33-8, 2006.
- Pereira, A. N.; Eduardo, C. de 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.
- Reddy, G. Photobiological basic and clinical role of low intensity lasers in biology and medicine. J. Clin. Laser Med. Surg., 22(4):141-50, 2004.
- Schoeder, P.; Pohl, C.; Calles, C.; Marks, C.; Wild, S. & Krutmann, J. Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signalling. *Free Radic. Biol. Med.*, 43(1):128-35, 2007.
- Simões, A.; Siqueira, W. L.; Lamers, M. L.; Santos, M. F.; Eduardo, C. de P. & Nicolau, J. Laser phototerapy effect on protein metabolism parameter of rat salivary glands. *Lasers Med. Sci.*, 24:202-8, 2009.

- Tamietti, B. F.; Machado, A. H.; Maftoum-Costa, M.; Da Silva, N. S.; Tedesco, A. C. & Pacheco-Soares, C. Analysis of mitocondrial activity related to the cell death alter PDT with AIPS4. *Photomed. Laser Surg.*, 25(3):175-9, 2007.
- Zhang, Y.; Song, S.; Fong, C. C.; Tsang, C. H.; Yang, Z. & Yang, M. cDNA microarray analysis of gene expression protein in human fibroblast cells irradiation with red light. *J. Invest. Dermatol.*, 120(5):849-57, 2003.
- Weibel, E. R. Stereological principes 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 : 18-10-2011 Aceptado: 22-02-2012