

# ANÁLISIS MORFOMÉTRICO Y ULTRAESTRUCTURAL DEL EFECTO DEL LÁSER INFRARROJO 10 J/cm<sup>2</sup> SOBRE FIBROBLASTOS DE CONEJO

## Ultrastructural and Morphometrical Analysis of the Laser Irradiation 10 J/cm<sup>2</sup> Effect in Rabbit Fibroblasts

Ricardo Cornejo Uribe<sup>1</sup>, Fernando Matamala Vargas<sup>1</sup>, Héctor Silva Mella<sup>1</sup> y Orlando Garrido Oñate<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera.

<sup>2</sup> Instituto de Embriología, Facultad de Ciencias Universidad Austral de Chile.

E-mail: rcornejo@ufro.cl

### RESUMEN

De la articulación temporo mandibular de conejo se extrajeron muestras de tejido normal-control e irradiado con dosis diarias de 10 Joules/cm<sup>2</sup> emitidas por el láser AsGa equivalente a 904 nm por periodos de 5 minutos durante 15 días consecutivos. Posteriormente fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión. De los fibroblastos normales e irradiados se obtuvieron microfotografías electrónicas de transmisión con aumentos finales de 11.500 X, las cuales fueron sometidas a estudios morfométricos para determinar fracciones volumétricas de los siguientes componentes celulares: núcleo, citoplasma, retículo endoplasmático rugoso, eu y heterocromatina. De igual manera se cuantificó la relación núcleo- citoplasmática y el área de cada tipo celular. Del análisis de los resultados entre fibroblastos normales e irradiados se visualiza que existen diferencias significativas en las fracciones volumétricas de todos los componentes celulares cuantificados. Se concluye que los efectos de esta dosis de radiación infrarroja provoca en los fibroblastos una drástica transformación, tanto en su ultraestructura y por ende en su morfología, traducida en una notable disminución de tamaño como en su funcionalidad, principalmente en lo relativo a la síntesis y secreción de colágeno y representando el efecto que estas estimulaciones provocan en los fibroblastos.

**Palabras clave:** Fibroblastos, láser, morfometría.

### ABSTRACT

Rabbit temporo-mandibular joint sample tissue for control and AsGa laser exposition were obtained. The irradiation protocol consisted on doses of 10 J/cm<sup>2</sup> emitted at 904 nm for periods of 5 minutes on daily basic through 15 consecutive days. Later these samples were processed for Transmission Electron Microscopy (TEM). Micrographs from control and irradiated fibroblasts were obtained at 11,500 X magnification. These micrographs were submitted to morphometric measurements in order to investigate nuclear, cytoplasmic, RER and eu-heterochromatin fraction volume. Their surface and nuclear-cytoplasmic ratio was also quantified. A significant difference was found between volumes of quantified cell components from normal and irradiated fibroblasts. On this basis it is possible to conclude that irradiated fibroblasts suffer a dose dependant drastic transformation on their ultrastructure, especially on their morphology and functionality which is related to the process of collagen synthesis and secretion.

**Key words:** Fibroblasts, laser, morphometry.

### INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años se ha demostrado que la aplicación de emisiones infrarrojas generadas por el diodo láser Arsenuro de Galio (AsGa) modelo (CEC IR 10), Argentina, provoca un sostenido alivio en lesiones articulares de una amplia gama de animales debido a su probada acción analgésica [8, 14], antiinflamatoria y cicatrizante [15, 21], induciendo a nivel celular una acentuada síntesis de ATP mitocondrial [13, 17], modulación de canales de calcio [1, 24], incremento en la síntesis de ADN [20, 22], activación de la mitosis [16, 23] y síntesis de colágeno [5, 21].

En este contexto, sin embargo, el resultado de los efectos subcelulares de estas estimuciones son poco descriptivas y considerando que en la medida que las células son estimuladas, sus componentes sufren modificaciones cualitativas, cuantitativas y topográficas, por ello sería posible suponer que mediante un análisis cuantitativo de microfotografías electrónicas pudiese evidenciarse como el eventual desarrollo de sus componentes podría traducirse en determinar una función celular específica producto de esta estimulación por radiación infrarroja en este modelo biológico [11].

Por tanto, esta investigación tuvo como objetivo observar el efecto ejercido por estimuciones infrarrojas emitidas por el diodo láser Ga-As equivalentes a una longitud de onda de 904 nm sobre fibroblastos y describir las respuestas celulares a nivel ultraestructural, determinando un patrón de comparación entre células normales y estimuladas en sus aspectos morfológicos y morfométricos, resultado de tal inducción.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microscopía electrónica de transmisión

A partir de la articulación témporo-mandibular de conejos (*Lepus timidus*) normales-controles e irradiados diariamente con láser infrarrojo por espacio de 15 días, fueron obtenidas muestras para el estudio de fibroblastos. A ellas 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, disueltos en 1 L de agua destilada (Water Purification Barnstead, Mod Diamond, EUA).

La post-fijación se realizó con tetróxido de osmio 1%, disuelto en la solución de lavado antes descrita durante una hora a 40°C (Polysciences, EUA) 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 (Ultramicrotomo MT1, Sorval, Dupont Instrument, EUA) los cuales fueron tratados con acetato de uranilo 2%, durante 40 minutos y citrato de plomo 0,5%, por 10 minutos [4, 6]. Las muestras fueron estudiadas y fotografiadas en un microscopio electrónico Philips EM 300, EUA.

### Método estereológico

A partir de los bloques para microscopía electrónica, fueron obtenidos cortes ultrafinos, desde los cuales se microfotografiaron fibroblastos normales e irradiados con un aumento de 11.500 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 [28]:

$$F_v = \frac{P \wedge}{Pt}$$

donde:

Fv= Fracción volumétrica del componente celular

P∧= Puntos incidentes sobre el componente en estudio

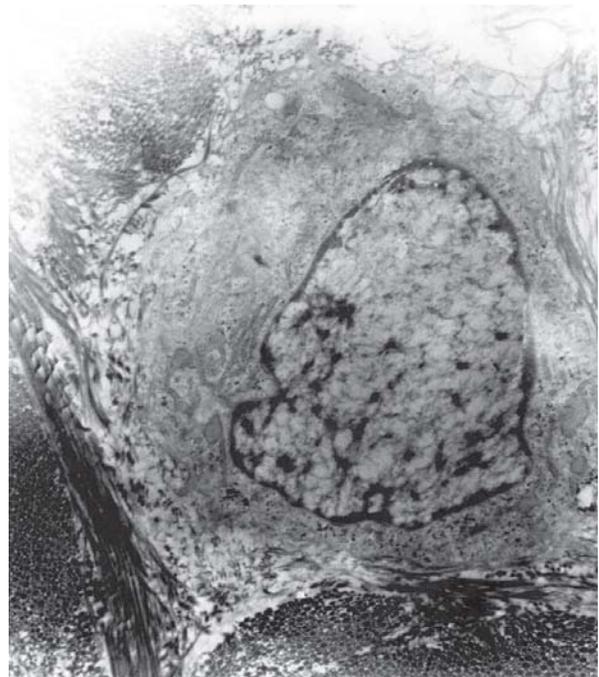
Pt= Puntos totales incidentes en la célula estudiada

Para el cálculo del área celular fue utilizado el software Sigma Scan Pro 5.0. [12]. Los resultados cuantitativos fueron analizados mediante el software estadístico SPSS15.0 aplicándose la prueba estadística de Wilcoxon para muestras no paramétricas [27].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis morfométrico

En las microfotografías electrónicas obtenidas de los fibroblastos normales (FIG. 1) e irradiados con dosis de 10 J/cm<sup>2</sup> (FIG. 2) se realizaron los análisis morfométricos, sometiéndose los resultados a la prueba estadística de Wilcoxon para las diferentes variables, resultando estadísticamente significativa para un P= 0,05 y determinándose entonces que el efecto de esta estimulación con láser infrarrojo puede representarse a nivel celular considerando los siguientes hechos:

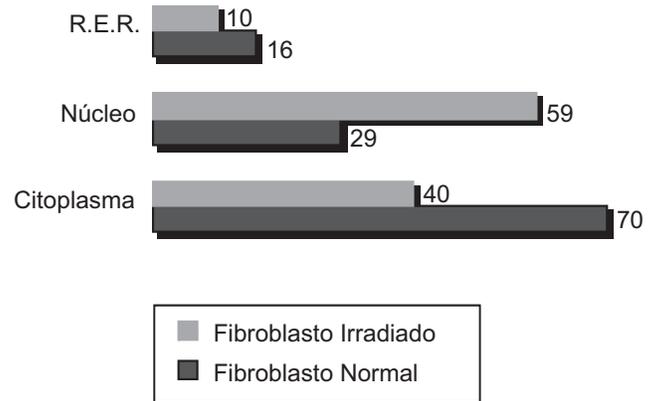


**FIGURA 1. MICROFOTOGRAFÍA ELECTRÓNICA DE FIBROBLASTO NORMAL PERTENECIENTE AL DISCO DE LA ARTICULACIÓN TÉMPORO MANDIBULAR DE CONEJO. 11.500 X / ELECTRON MICROGRAPHY FROM NORMAL FIBROBLAST BELONGING TO RABBIT TEMPORO-MANDIBULAR DISK JOINT.**

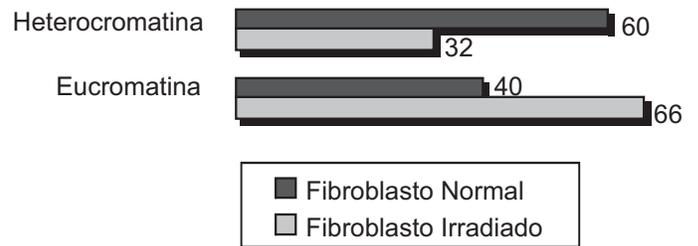


**FIGURA 2. MICROFOTOGRAFÍA ELECTRÓNICA DE FIBROBLASTO IRRADIADO CON 10 J/CM<sup>2</sup> PERTENECIENTE AL DISCO DE LA ARTICULACIÓN TÉMPORO MANDIBULAR DE CONEJO. 11.500 X / ELECTRON MICROGRAPHY FROM IRRADIATED FIBROBLAST 10 J/CM<sup>2</sup> BELONGING TO RABBIT TEMPORO-MANDIBULAR DISK JOINT.**

1. Las fracciones volumétricas ocupadas por el citoplasma y por el retículo endoplasmático rugoso (RER), manifestado en grandes cisternas dilatadas, disminuyen en la medida que se aplica la estimulación.
2. Por el contrario, esta dosis de irradiación determina un notable aumento en las fracciones volumétricas perteneciente al núcleo de los fibroblastos irradiados. Los datos referentes a estos componentes celulares se describen en la FIG. 3.
3. Se observa que la relación núcleo-citoplasmática cuantificada en fibroblastos normales equivale a 0,4 mientras que en los irradiados con 10 J/cm<sup>2</sup> se eleva a 1,4.
4. Con respecto a las fracciones volumétricas de eucromatina se observa que aumentan considerablemente en fibroblastos irradiados y la heterocromatina disminuye desde los fibroblastos normales hasta los irradiados. Estos resultados se evidencian en la FIG. 4.
5. En cortes transversales se observa claramente que los fibroblastos normales sintetizan y secretan filamentos de dos diámetros diferentes, por el contrario en el caso del fibroblasto irradiado solo es posible visualizar filamentos de diámetro único.



**FIGURA 3. FRACCIONES VOLUMÉTRICAS (%) CORRESPONDIENTES A LOS COMPONENTES DE LOS FIBROBLASTOS NORMALES E IRRADIADOS CON 10 J/CM<sup>2</sup> DURANTE 5 MINUTOS PERTENECIENTES AL DISCO DE LA ARTICULACIÓN TÉMPORO-MANDIBULAR DE CONEJO / VOLUMETRIC FRACTIONS (%) OF NORMAL AND IRRADIATED FIBROBLASTS COMPONENTS BY A DOSES OF 10 J/CM<sup>2</sup> FOR 5 MINUTES FROM RABBIT TEMPORO-MANDIBULAR DISK JOINT.**



**FIGURA 4. FRACCIONES VOLUMÉTRICAS DE LA CROMATINA EVALUADA EN LOS FIBROBLASTOS NORMALES-CONTROLES E IRRADIADOS CON 10 J/CM<sup>2</sup> DURANTE 5 MINUTOS PERTENECIENTES A LA ARTICULACIÓN TÉMPORO-MANDIBULAR DE CONEJO / CHROMATIN VOLUMETRIC FRACTION ASSESED ON NORMAL AND IRRADIATED FIBROBLASTS BY A DOSES OF 10 J/CM<sup>2</sup> FOR 5 MINUTES 98.FROM RABBIT TEMPORO-MANDIBULAR DISK JOINT.**

Como se evidencia en la TABLA I, el área celular perteneciente a los fibroblastos irradiados con esta dosis infrarroja experimenta una drástica disminución en comparación con el fibroblasto normal. Del análisis de los resultados se concluye que la aplicación de esta alta densidad de energía determina cambios drásticos, tanto en la morfología como en ultraestructura y por ende, en la funcionalidad de los fibroblastos.

**TABLA I**  
**ÁREA CELULAR ( $\mu^2$ ) CORRESPONDIENTE A**  
**FIBROBLASTOS NORMALES E IRRADIADOS CON DOSIS**  
**10 J/cm<sup>2</sup> PERTENECIENTES AL DISCO DE LA**  
**ARTICULACIÓN TÉMPORO-MANDIBULAR DE CONEJO /**  
**CELLULAR AREA CORRESPONDING TO NORMAL AND IRRADIATED**  
**FIBROBLASTS BY A DOSES OF 10 J/cm<sup>2</sup> ON RABBIT**  
**TEMPORO-MANDIBULAR DISK JOINT.**

Fibroblasto normal	Fibroblasto irradiado 10 J/cm <sup>2</sup>
82 micrones cuadrados	35 micrones cuadrados

En este sentido, se demostró mediante métodos morfo-métricos y ultraestructurales que, cuando estas células son estimuladas con dosis de 2 J/cm<sup>2</sup> sus constituyentes celulares varían significativamente [3]. En este mismo contexto, se podría argumentar que el sostenido aumento en el volumen nuclear es producto de las estimulaciones infrarrojas y además, considerando que las fracciones volumétricas correspondiente a la euromatina en las células irradiadas aumentan considerablemente respecto al fibroblasto normal, indicaría que la tasa de expresión génica se mantendría constante para cuando la maquinaria celular lo requiriera.

Sin embargo, la notoria disminución en las fracciones volumétricas correspondiente al citoplasma y a las del RER, desde el fibroblasto normal a los estimulados, demuestra que este aumento en las inducciones están determinando que la función celular, sobre todo lo relativo a la síntesis de colágeno, está deprimida, hecho que se confirma en las propias microfotografías electrónicas.

Del mismo modo y sin lugar a dudas, la acentuada disminución en el área celular cuantificada en los fibroblastos estudiados, constituye una óptima representación del efecto nocivo que esta dosis de láser infrarrojo genera en este tipo celular produciendo un verdadero estado de involución en su morfofunción.

Los parámetros descritos son coincidentes con los hallazgos comunicados por varios investigadores [7, 9, 10], en el sentido que han determinado que altas densidades de energía básicamente sobre 5 J/cm<sup>2</sup> corresponden a dosis nocivas para la viabilidad y funcionalidad de fibroblastos, mientras que el óptimo en la densidad de energía aplicada corresponde a 3 J/cm<sup>2</sup> situación en donde se percibe alta tasa de síntesis y secreción de colágeno, aumento en la densidad de estas fibras y proliferación de estas células [23, 26].

En este contexto, otras investigaciones [18] han demostrado histológicamente que, el tejido fibrocartilaginoso de la articulación témporo-mandibular de conejos presenta una disposición desordenada del colágeno secretado y una notable variación en las dimensiones de la articulación luego de ser irradiada con dosis de 2 J/cm<sup>2</sup> de láser infrarrojo.

De igual manera, otros estudios [19, 25] comunican que los fibroblastos estudiados y estimulados con dosis de 4 J/cm<sup>2</sup> se caracterizan por presentar un notable incremento en la síntesis y secreción, tanto de fibras colágenas como de elásticas

y que por tanto, mayores dosis infrarrojas pueden determinar, como en este informe, ausencia en síntesis y secreción de fibras elásticas.

La drástica disminución en el área de los fibroblastos irradiados evaluada en este estudio presenta semejanza con los datos obtenidos por Chen y col. [2], los cuales describen que fibroblastos irradiados con altas dosis de láser se traducen en una acentuada disminución de la función celular y síntesis de colágeno y sobre todo, generando la pérdida de la arquitectura normal del fibroblasto, incluso llegando a la lisis de las células.

El análisis de los datos morfológicos obtenidos con la microscopía electrónica de transmisión traducidos en resultados, considerando los relativos a las fracciones volumétricas disminuidas, tanto del RER como del citoplasma, pero sobre todo la drástica disminución en el área de las células irradiadas y más aún, el cambio en la electrodensidad del citoplasma en los fibroblastos estimulados, constituyen una óptima representación del efecto que estas emisiones infrarrojas generan en estas células, mostrando entonces un activo proceso de cambio en la expresión génica modulada por esta densidad de energía utilizada.

## CONCLUSIONES

En respuesta al aumento desmesurado en la utilización de las emisiones infrarrojas en el tratamiento de diversas afecciones, basado principalmente en sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias, los resultados obtenidos sugieren que, altas dosis de estimulaciones infrarrojas son nocivas para la función de las células y por ende, de los tejidos.

En la presente investigación se muestra con claridad que el fibroblasto perteneciente a la articulación témporo-mandibular evidencia una notable disminución de su área celular y un progresivo decrecimiento en la síntesis de proteínas considerando la sostenida baja en las fracciones volumétricas de retículo endoplasmático rugoso cuantificada en estas células.

De acuerdo a lo descrito, se concluye que para el uso terapéutico del láser infrarrojo es necesario determinar las dosis óptimas de potencia para conseguir una acción eficaz del instrumento y evitar el deterioro o inhibición de la función celular con estas estimulaciones.

## AGRADECIMIENTO

Este estudio fue financiado por la Dirección de Investigación de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile; Proyecto DI 08-0022.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BREITBART, H.; LEVINSHAL, T.; COHEN, N.; FRIEDMANN, H.; LUBART, R. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane

- irradiated at 633 nm HeNe laser. **J Photochem Photobiol B.** 34(2-3):117-121. 1996.
- [2] CHEN, YJ.; JENG, JH.; JANE, CC.; CHEN, MH.; HOU, LT.; LAN, WH. Long-term effect of pulsed Nd:YAG laser irradiation on cultured human periodontal fibroblasts. **Lasers Surg Méd.** 36(3):225-233. 2005.
- [3] CORNEJO, R.; MATAMALA, F.; SILVA, H.; GARRIDO, O. Morphometric and ultrastructural studies of effect infrared laser on rabbit temporo mandibular joint fibroblasts. **Bras Arch of Biol and Tech.** 52(3):611-616. 2009.
- [4] GLAUERT, A. Biological specimen preparation. **Practical methods in electron microscopy.** North-Holland American Elsevier. 10-154 Pp. 1980.
- [5] GÓMEZ-VILLAMANDOS, RJ.; VALENZUELA, JMS.; CALATRAVA, IR. He-Ne laser therapy by fibroendoscopy in the mucosa of the equine upper airway. **Lasers Surg Med.** 16:184-188. 1995.
- [6] HAGGIS, G. Simple preparation for electron microscopy of internal cell structure. **Microsc Res Tech.** 22:151-159. 1992.
- [7] HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. **Photomed Laser Surg** 24(6):705-714. 2006.
- [8] HONMURA, A.; ISHII, A.; YANASE, M.; OBATA, J.; HARUKI, E. Analgesic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. **Lasers Surg Med.** 13(4): 463-469. 2005.
- [9] HOURELD, N.; ABRAHAMSE, H. In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm<sup>2</sup>. **Photomed Laser Surg.** 25(2):78-84. 2007.
- [10] HOURELD, N.; ABRAHAMSE, H. Laser light influences cellular viability and proliferation in diabetic-wounded fibroblast cells in a dose-and wavelength-dependent manner. **Lasers Méd Sci.** 23(1):11-18. 2008.
- [11] JUNQUEIRA, LCU.; SALLES, LMM. Organelos en diferenciación celular; Ultraestructura del fibroblasto. **Ultraestructura e função celular.** Ed. Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro. 58pp. 1975.
- [12] JURGAI TIENE, R; PAUZIENE, N; AZELIS, V; ZURAUŠKAS, E. Morphometric study of age-related changes in the human intracardiac ganglia. **Medicina** 40(6):574-581, 2004.
- [13] KARU, T.; PYATIBRAT, L; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **J. Photochem Photobiol. B.** 27:219-223. 1995.
- [14] KIM, KS.; LEE, DHK. Effects of low incident energy levels of infrared laser irradiation on the proliferation of *Streptococcus mutans*. **Laser Ther.** 4:81-85. 1992.
- [15] LILGE, L.; TIERNEY, K.; NUSSBAUM, E. Low-level laser therapy for wound healing: Feasibility of wound dressing transillumination. **J Clin Laser Med Surg.** 18(5): 235-240. 2000.
- [16] LIU, H.; WANG, Z.; CHAI, X., REN, O. Laser induced collagen remodelling: a comparative study in vivo on mouse model. **Lasers Surg Med.** 40(1):13-19. 2008.
- [17] MANTEIFEL, L.; BAKEEVA, T.; KARU, T. Irradiation of yeast *Torulopsis sphaerica* with He-La laser causes changes in ultrastructure organisation of mitochondria cells of next generations. **Dok Akadem Nauk .** 366:702-704. 1999.
- [18] MATAMALA, F.; CORNEJO, R.; VASCONCELLOS, A.; SILVA, H. Laser AsGa effect on the normal anatomy on the temporo mandibular joint on the rabbit. **Rev Cientif FCV-LUZ XIX** (1):31-37. 2009.
- [19] MEDRANO, A.; PUGLIESE, L.; REIS, S.; ANDRADE, Z. Influence of low level Laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers Surg Med.** 32(3):239-244. 2003.
- [20] PEREIRA, NA.; EDUARDO, CP.; MATSON, E.; MARQUES, MM. Effect of low power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers Surg Med.** 31(4):263-267. 2002.
- [21] PINHEIRO, AL.; CAVALCANTI, ET.; PINHEIRO, TI.; ALVES, MJ.; MANZI, CT. Low-level laser therapy in the management of disorders of the maxillofacial region. **J Clin Laser Méd Surg.** 15 (4):181-183. 1998.
- [22] POURZARANDIAN, A.; WATANABE, H.; RUWANPURA, SM.; AOKI, A.; ISHIKAWA, I. Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. **Periodontol.** 76(2):187-193. 2005.
- [23] SILVA, E.; FILHO, A. Radiação laser. **Manual de Recursos Terapêuticos.** Ed. Revinter. Rio de Janeiro. Pp. 17-35. 2004.
- [24] SMITH, N.; FUJITA, K.; KANECO, T.; KATO, O.; NAKAMURA, O.; TAKAMATSU, T.; KAWATA, S. Generation of calcium waves in living cells by pulsed-induced photodisruption. **Appl. Phys Lett.** 79(8):1208-1210. 2001.
- [25] SOUZA, L.; MEDRANO, A.; ALMEIDA, S.; ARAÚJO, Z. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui Odontol Brás.** 17(4):307-313. 2003.
- [26] SKINNER, S.; GAGE, J.; WILCE, P.; SHAW, R. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture **Aust. Dent. J.** 41(3):188-192. 1996.
- [27] VISAUTA, B. Análisis Estadístico con Spss para Windows. 1ª Ed. Mc Graw-Hill, España. 265pp. 1997.
- [28] WEIBEL, E. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. **Int. Ver. Cytol.** 26:235-302. 1996.