Análisis Morfométrico del Efecto del Láser Infrarrojo sobre Hepatocitos de Rata

Morphometric Analysis of Infrared Laser Effect on Rat Hepatocyte

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

CORNEJO, R.; MATAMALA, F.; SILVA, H. & GARRIDO, O. Análisis morfométrico del efecto del láser infrarrojo sobre hepatocitos de rata. *Int. J. Morphol.*, 27(3):831-836, 2009.

RESUMEN: El láser infrarrojo emitido por el diodo Arsenurio de Galio (904 nm) proporciona terapia a lesiones articulares por su acción analgésica, cicatrizante y antiinflamatoria, promoviendo a nivel celular síntesis de ATP mitocondrial, modulación de canales de calcio, activando el proceso mitótico e incremento en la síntesis de DNA y de proteínas. Para determinar las dosis que estimulen componentes celulares involucrados en síntesis proteica, del hígado de ratas fueron tomadas muestras de tejido normal e irradiado mediante láser infrarrojo con 1, 2, 4, 8 y 16 Joules/cm² durante 15 días consecutivos. Fueron tratadas para microscopía electrónica de transmisión y se obtuvieron micrografías con aumentos de 10.000 X. Se realizaron estudios morfométricos, cuantificándose las fracciones volumétricas de núcleos, citoplasma, retículo endoplasmático rugoso (RER), inclusiones de glicógeno, nucleolos, eucromatina y heterocromatina, relación núcleo- citoplasmática y las áreas celulares y nucleares. Los resultados del presente estudio que compara hepatocitos normales e irradiados, indican que existen diferencias significativas en todos los parámetros evaluados. Se concluye que los hepatocitos estimulados alteran su morfología y por ende sus componentes celulares, modificando la función celular determinándose con exactitud la dosis de estimulación infrarroja donde estas células presentan un mayor desarrollo de su maquinaria citoplasmática involucrada en síntesis de proteínas.

PALABRAS CLAVE: Hepatocitos; Láser; Morfometría; Ultraestructura.

INTRODUCCIÓN

La utilización del láser infrarrojo corresponde tanto a una óptima terapia en el tratamiento articular consiguiendo un efecto analgésico (Kim & Lee, 1992), cicatrizante y antiinflamatorio exitoso (Pinheiro *et al.*, 1988; Lilge *et al.*, 2000), como a nivel celular induciendo una acentuada síntesis de ATP (Olson *et al.*, 1981; Manteifel *et al.*, 1999) induciendo proliferación celular (Breitbart *et al.*, 1996) como así mismo, variaciones en el metabolismo del colágeno (Gómez Villamandos *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 2002), incremento en las concentraciones de calcio citoplasmático (Breitbart *et al.*) y síntesis de DNA (Loevschall, 1994).

Con el objetivo de precisar el rol ejercido por las emisiones del láser infrarrojo y describir las respuestas celulares a nivel ultraestructural, se estableció un sistema biológico susceptible de ser estimulado con esta energía y deter-

minar un patrón de comparación entre hepatocitos de rata normales versus aquellos estimulados con intensidades crecientes de: 1, 2, 4, 8 y 16 Joules/cm² por espacio de 15 días consecutivos y cuantificándose las variaciones morfológicas y morfométricas resultantes.

Considerando que el estudio de la Biología Celular muestra que, en medida que las células son estimuladas, sus componentes sufren modificaciones cualitativas, cuantitativas y topográficas, el análisis de micrografías electrónicas revelará como la particularidad de los distintos componentes se traducen en función celular. Las modificaciones en los aspectos morfológicos y morfométricos permitirán evaluar y comparar células normales y estimuladas, determinando el patrón de modificación ultraestructural que caracteriza la estimulación por radiación, en este modelo biológico (Junqueira & Salles, 1975).

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

** Instituto de Embriología, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

MATERIAL Y MÉTODO

Microscopía Electrónica de Transmisión. A partir del hígado de 18 ratas Sprague-Dawley se obtuvieron muestras de tejido normal e irradiado con dosis de láser infrarrojo equivalente a 1, 2, 4, 8 y 16 J/cm² por espacio de 15 días. A ellas se le adicionó solución de glutaraldehído 2%, en tampón fosfato 0,15 M, pH 7,2, y se mantuvo a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, fue sometido a un lavado en solución de 6 g de NaCl y 73 g de sacarosa, disueltos en 1 litro de agua destilada.

La post-fijación se realizó en solución de tetróxido de osmio 1%, disuelto en la solución de lavado 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 estudiadas y fotografiadas en un microscopio electrónico Phillips EM 300.

Método Estereológico. A partir de los bloques para microscopía electrónica, fueron obtenidos cortes ultrafinos, en los cuales se micrografiaron cada uno de los tipos celulares con un aumento de 10.00 X.

Para la evaluación de las fracciones volumétricas de los componentes celulares, fue sobrepuesto un retículo de puntos en las micrografías electrónicas y se procedió al conteo diferencial de los puntos que incidían sobre los perfiles de los componentes, calculándose la fracción volumétrica que ellos ocupan, mediante la siguiente ecuación (Weibel, 1969):

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

F_v = Fracción volumétrica del componente celular.

P_A = Puntos incidentes sobre el componente en estudio.

P_t = Puntos totales incidentes en la célula estudiada.

Para el cálculo de áreas celulares y nucleares fue utilizado el software Sigma Scan Pro 5.0

RESULTADOS

Las estimulaciones con láser infrarrojo sobre hepatocitos con dosis correspondiente a: 1, 2, 4, 8 y 16 Joules/cm² en comparación con células controles, generan los siguientes datos morfométricos-ultraestructurales:

Existe una clara y constante relación entre dosis crecientes de láser infrarrojo asociado con un sostenido aumento en el área celular y paralelamente una disminución sostenida del área nuclear (Figs. 1, 2 y 3).

Es observable que los hepatocitos irradiados con dosis correspondiente a 4 y 8 J/cm² presentan fracciones volumétricas de componentes celulares en porcentaje adecuado para realizar una activa función celular, básicamente los relacionados con síntesis proteica. Paralelamente se observa una reducción notoria en relación a las inclusiones de glicógeno en estas células de alto metabolismo (Fig. 4).

Las estimulaciones con dosis elevadas de 16 J/cm², generan una disminución en las respectivas fracciones volumétricas de los componentes celulares involucrados en síntesis proteica (RER y mitocondrias).

En lo relativo a la eucromatina, las fracciones volumétricas evaluadas en hepatocitos irradiados con 8 J/cm² corresponden a 90%, el mayor volumen evaluado con las dosis señaladas, muy superior a la cuantificada en hepatocitos normales, indicando una elevada expresión génica producto de las estimulaciones (Fig. 5).

Finalmente, el volumen ocupado por el nucleolo disminuye sutilmente producto de las estimulaciones infrarrojas respecto al evaluado en el hepatocito normal.

DISCUSIÓN

Existen escasas evidencias experimentales respecto al comportamiento de hepatocitos irradiados con láser infrarrojo o de baja intensidad y, mas aún, estas comunicaciones emitidas son antagónicas en lo relativo a la cantidad de energía empleada en la estimulación utilizada.

Tabla I. Áreas celulares y nucleares (u²) correspondientes a hepatocitos de rata estimuladas con dosis crecientes de láser infrarrojo.

	Normal	1J/cm ²	2J/cm ²	4J/cm ²	8J/cm ²	16J/cm ²
Área Celular	150	155	159	150	170	191
Área Nuclear	33	30	22	20	18	30

Fig. 1. Micrografía electrónica de hepatocito de rata normal- control. 10.000X.

Fig. 2. Micrografía electrónica de hepatocito de rata irradiado con 4 J/cm². 10.000X.

En este contexto, nuestros resultados son disímiles en cuanto a la energía utilizada puesto que Greco *et al.* (1996, 2001) y Vacca *et al.* (1997) utilizan 0.24 J/cm² como energía activadora sobre hepatocitos probando grandes modificaciones de la función celular producto de dicha estimulación.

Sin embargo, en este mismo contexto, hemos constatado referencias coincidente en relación a la cantidad de energía utilizada en nuestro trabajo constatando que Vacca *et al.* (1993) y Streeter (2004) demuestran variaciones en la actividad celular utilizando dosis de 5 y 8 J/cm² respectivamente en sus experimentos.

En las citadas referencias como en los resultados obtenidos en nuestro estudio, aparece claramente establecido que las estimulaciones con láser infrarrojo provocan modificaciones morfológicas y morfométricas en los hepatocitos y que, por ende, inducen una modificación severa de la función celular de las células irradiadas activando determinados mecanismos. Así, Vacca *et al.* (1993) comprueban activación en la replicación de DNA mitocondrial; Cieslar *et al.* (1995) determinaron un notable incremento en las actividades enzimáticas tanto de membranas plasmáticas como mitocondriales. Vacca *et al.* (1997) comunicaron que la irradiaciones infrarrojas generan aumentos considerables del calcio citoplasmático libre en relación con el potencial de membrana plasmática; del mismo modo, Greco *et al.* (2001) precisaron que la estimulación con esta energía produce incremento en la concentración de calcio mitocondrial generando de este modo una hiperpolarización de membrana del organelo generador de energía.

Los hepatocitos pertenecen a células ubicadas en el rango de una alta actividad metabólica caracterizadas por una síntesis proteica elevada. Nuestro estudio, como ya fue descrito, estuvo centrado en determinar las variaciones provocadas por la estimulación con láser infrarrojo sobre componentes celulares involucrados en dicha síntesis y en este contexto, nuestros re-

Fig. 3. Micrografía electrónica de hepatocito de rata irradiado con 8 J/cm². 10.000X.

Fig. 4. Fracciones volumétricas (%) de R.E.R., mitocondrias y glicógeno evaluados en hepatocitos de ratas normales e irradiados con láser infrarrojo de 4 y 8 Joules/cm².

sultados mostraron alto desarrollo del RER, mitocondrias, activa depleción del glicógeno, alto porcentaje de eucromatina, y aumento en el área celular describen una acentuada activación del mecanismo traduccional y por tanto, son coincidentes con los descritos por Greco *et al.* (1996) quienes observaron una acentuada síntesis proteica tanto citoplasmática como mitocondrial como resultado de estimulaciones infrarrojas.

Del mismo modo, Kao & Sheen (2003), demuestran que hepatocitos irradiados con esta energía muestran un apreciable aumento tanto en la síntesis de proteínas, como en la actividad de enzimas citosólicas. Finalmente, Streeter precisa que en medida que los hepatocitos son irradiados con 8 J/cm² (dosis semejante a la utilizada en este estudio) responden con un incremento sostenido en síntesis de albúmina de sobre 115% con respecto a los hepatocitos no irradiados.

Los resultados del estudio morfológico y morfométrico realizado apuntan al hecho que la irradiación con láser infrarrojo en dosis entre 4 y 8 J/cm² sobre hepatocitos de rata induce un notable cambio en la expresión génica asociada con un nuevo estado de diferenciación celular en el cual estructuras y componentes celulares involucrados en síntesis proteica de hepatocitos de rata están en máximo desarrollo, mostrando de manera indiscutible los efectos positivos de la irradiación con láser infrarrojo sobre la funcionalidad celular en este sistema biológico se estimula con la dosis infrarroja adecuada.

Fig. 5. Fracciones volumétricas (%) correspondientes a tipo de cromatinas evaluadas en hepatocitos de rata normales e irradiados con dosis de láser infrarrojo correspondiente a 4 y 8 Joules/cm².

El análisis de nuestros resultados muestra que las estimulaciones con láser infrarrojo en este tipo celular generan un aumento sostenido en el área celular debido tal vez a un incremento en la tasa de incorporación tanto de nutrientes como fundamentalmente en la neogénesis de componentes celulares. Concomitantemente, se observa disminución sostenida de las áreas nucleares situación que determinan cambios tanto en la morfología como en la ultraestructura y funcionalidad de los hepatocitos de rata irradiados.

En este mismo contexto, se observa que las dosis de láser infrarrojo con las cuales los hepatocitos presentan un

mayor desarrollo de componentes celulares, básicamente los involucrados en síntesis proteica, RER y mitocondrias, corresponden a las que se sitúan entre 4 y 8 J/cm². Paralelamente, es necesario considerar que los volúmenes de glicógeno disminuyen con las dosis crecientes de láser indicando una constante degradación a glucosas citoplasmáticas para realizar procesos de glicólisis y posterior síntesis de ATP mitocondrial.

Más aún, entre estas dosis, las fracciones volumétricas de euromatina son los de mayor valor (90%), indicando que la expresión génica y la eventual síntesis proteica es alta respecto al hepatocito normal.

El estudio cumple el objetivo central definiendo con claridad que las dosis de emisiones infrarrojas para una terapia con láser de baja potencia corresponde a estimulaciones entre 4 y 8 J/cm² y que, por el contrario, dosis mayores como 16 J/cm² generan disminución de constituyentes citoplasmáticos en procesos semejantes a los de involución celular, en este sistema biológico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es resultado de las actividades de investigación realizadas en el proyecto DIUFRO 08-0022.

CORNEJO, R.; MATAMALA, F.; SILVA, H. & GARRIDO, O. Morphometric analysis of infrared laser effect on rat hepatocyte. *Int. J. Morphol.*, 27(3):831-836, 2009.

SUMMARY: The infrared laser emitted by the Gallium Arsenide diode provides an adequate therapy for articular lesions due to their healing, analgesic, and anti-inflammatory powers. It also promotes at cellular level mitochondrial ATP synthesis, modulates Calcium channels and activate mitotic processes by increasing DNA and protein synthesis. To determine the effective doses which stimulates rat liver protein synthesis, several samples from normal and irradiated tissues to intensities of 1, 2, 4, 8, and 16 Joules/cm² by 15 consecutive days were taken. These samples were later prepared and observed under transmission E.M. (10000X) and analyzed by morphometric studies, where volume and organelle distribution, such as nucleus, cytoplasm, endoplasmic reticulum, glycogen inclusions, nucleolus, eu and heterochromatin were accounted, together at nuclear-cytoplasmic relationships and the cellular and nuclear areas. Under comparison normal and irradiated hepatocytes presented a significative difference in all evaluated parameters. It can be concluded that at certain specific level of infrared irradiation, hepatocytes alter their morphology by modifying those cellular components involved in protein synthesis.

KEY WORDS: Hepatocytes; Laser; Morphometry; Ultrastructure.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 He-Ne laser. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 34(2-3):117-21, 1996.
- Cieslar, G.; Adamek, M.; Sieron, A. & Kaminski, M. Influence of low-power laser irradiation on the activity of some membraneous and mitochondrial enzymes of hepatocytes in rats. *Proc. SPIE.*, 2323:546-50, 1995.

- Gómez-Villamandos, R. J.; Valenzuela, J. M. S. & Calatrava, I. R. He-Ne laser therapy by fibroendoscopy in the mucosa of the equine upper airway. *Laser Surg. Med.*, 16:184-8, 1995.
- Greco, M.; Vacca, R.; Moro, L.; Perlino, E.; Vito, A., Petragallo, V.; Marra, E. & Passarella, S. Helium-Neon laser irradiation of hepatocytes can trigger increase of the mitochondrial membrane potential and can stimulate c-fos expression in a Ca² dependent manner. *Laser Surg. Med.*, 29(5):433-41, 2001.
- Greco, M.; Marra, E.; Passarella, S.; Petragallo, V. & Vacca, R. Increase in cytosolic and mitochondrial protein-synthesis in rat hepatocytes irradiated in vitro by He-Ne laser. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 34(2-3):197-202, 1996.
- Junqueira, L. C. U. & Salles, L. M. M. *Ultra-estrutura e função celular*. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1975. pp.12-48.
- 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. Méd. Assoc.*, 102(79):486-91, 2003.
- Kim, K. S. & Lee, D. H. K. Effects of Low incident energy levels of infrared laser irradiation on the proliferation of *Streptococcus mutans*. *Laser Ther.*, 4:81-5, 1992.
- 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):235-40, 2000.
- Loevschall, H. & Arenholt-Bindslev, D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. *Lasers Surg. Med.*, 14(4):347-54, 1994.
- Manteifel, L. E.; Bakeeva, T. & Karu, T. Irradiation of yeast *Torulopsis sphærica* with He-La laser causes changes in ultrastructure organisation of mitochondria cells of next generations. *Doklady Akademii Nauk.*, 366:702-4, 1999.
- Olson, J. E.; Schimmerling, W. & Tobias, C. A. Laser action spectrum of reduced excitability in nerve cells. *Brain Res.*, 204(2):436-40, 1981.
- Pereira, A. N.; Eduardo, C. 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.
- Pinheiro, A. L.; Cavalcanti, E. T.; Pinheiro, T. I.; Alves, M. J. & Manzi, C. T. Low-level laser therapy in the management of disorders of the maxillofacial region. *J. Clin. Laser. Med. Surg.*, 15(4):181-3, 1988.
- Streeter, J. *Low level light therapy for the enhancement of hepatic functioning*. New York, United States Patent Application 20040220513, 2004. pp.1-8.
- Vacca, R.; Moro, L.; Petragallo, V.; Greco, M.; Fontana, F. & Passarella, S. The irradiation of hepatocytes with He-Ne-laser causes an increase of cytosolic free calcium concentration and an increase of cell membrane potential, correlated with it, both increases taking place in an oscillatory manner. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 43(5):1005-14, 1997.
- Vacca, R.; Marra, E.; Quagliariello, E. & Greco, M. Activation of mitochondrial DNA replication by He-Ne-laser irradiation. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 195(2):704-9, 1993.
- Weibel, E. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Rev. Cytol.*, 26:235-302, 1969.

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

Email: rcornejo@ufro.cl

Recibido : 12-03-2009
 Aceptado: 27-07-2009