



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

EFFECTO METABOLICO CELULAR INMEDIATO PRODUCIDO POR UN LÁSER TERAPÉUTICO INFRARROJO, MEDIDO POR LA FLUORESCENCIA DE LA MOLECULA NADH.

J. T. Hernández Jaime, M. A. Aceves Pacheco, R. Godínez Fernández,
M. Fernández-Guasti.

Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa.

RESUMEN

A la terapia láser se le atribuyen muchas bondades en el área médica por los efectos producidos en diversos padecimientos. Dichos efectos pueden ser anti inflamatorios, anti edematosos y muchas veces ayudan a la reparación de tejido provocadas por enfermedades, heridas y traumatismos. Estos efectos se han explicado por diversos mecanismos celulares como: 1) Inducen la liberación de sustancias como la Histamina, Serotonina y Bradicina, 2) Aumentan la síntesis de Trifosfato de Adenosina (ATP), 3) Estimulan la síntesis de ADN y proteínas, 4) Estimulan la actividad enzimática. Estos mecanismos tienen un requerimiento energético en forma de ATP. Para la síntesis de esta molécula energética (ATP), el NADH juega un papel fundamental ya que es el portador de electrones de alta energía a la cadena respiratoria necesarios para la formación de ATP. El NADH es una molécula que puede ser analizada mediante técnicas de fluorescencia presentando absorción en 355nm y emisión máxima en 460nm. En este trabajo analizamos el efecto del láser terapéutico infrarrojo (790nm, 90mW), sobre el metabolismo energético medido por la fluorescencia del NADH intracelular en ratas de la cepa Wistar de 22 a 30 días de nacidas. Para la excitación de las moléculas se utilizó un láser pulsado de Nd-YAG triplicado en frecuencia, cuya longitud de onda de emisión a 355nm coincide con uno de los picos de absorción de la molécula de NADH. El trabajo se realizó bajo 2 condiciones, células radiadas de rata Wistar con infrarrojo a las cuales denominaremos (Radiadas) y células a las cuales no se les aplicó radiación infrarroja a las que denominaremos (Control). Se realizó un registro de 40 minutos de la amplitud de la fluorescencia en 3 distintas longitudes de onda 440, 460 y 470nm en control y radiadas, obteniendo que la fluorescencia intracelular máxima se da en 440nm en todas las ratas. La fluorescencia inicial decae con el tiempo (en alrededor de un 30%) y se estabiliza a los 10 minutos en control y radiadas. Una marcada diferencia en las células radiadas con respecto al control se da por un incremento de la amplitud de la fluorescencia en el tiempo a partir del minuto 30 en longitudes de onda de 460 y 470nm, la amplitud de la fluorescencia en la longitud de onda de 440nm permanece estable. En las células control solo se presenta un decremento de amplitud de fluorescencia en el tiempo en las 3 longitudes de onda antes mencionadas. Descartamos que este efecto tenga un origen térmico debido a la energía que el haz terapéutico infrarrojo produce en la muestra celular (no existe un aumento de temperatura durante la radiación infrarroja en nuestra muestra celular). Así mismo analizando las formas de los espectros de fluorescencia que van de los 380 a 520nm en nuestras células radiadas encontramos un desplazamiento en la longitud de onda, la cual pasa de los 440nm a los 470nm en el transcurso del tiempo.



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

INTRODUCCIÓN:

A la terapia láser se le atribuyen muchas bondades en el área médica por los efectos producidos en diversos padecimientos. Dichos efectos pueden ser anti inflamatorios, anti edematosos y muchas veces ayudan a la reparación de tejido provocadas por enfermedades, heridas y traumatismos. Estos efectos se han explicado por diversos mecanismos celulares como: 1) Inducen la liberación de sustancias como la Histamina, Serotonina y Bradicinina, 2) Aumentan la síntesis de Trifosfato de Adenosina (ATP), 3) Estimulan la síntesis de ADN y proteínas, 4) Estimulan la actividad enzimática. Estos mecanismos tienen un requerimiento energético en forma de ATP [1]. Para la síntesis de esta molécula energética, el NADH juega un papel fundamental ya que es el portador de electrones de alta energía a la cadena respiratoria necesarios para la formación de ATP. El NADH es una molécula que puede ser analizada mediante técnicas de fluorescencia presentando absorción en 355nm y emisión máxima en 460nm [2]. En este trabajo veremos el efecto del láser terapéutico infrarrojo (790nm, 90mW), sobre el metabolismo energético medido por la fluorescencia del NADH intracelular en ratas de la cepa Wistar

TEORÍA:

Dosis del láser terapéutico infrarrojo.

El agua absorbe fuertemente la luz infrarroja en longitudes de onda mayores de 1100nm, el cuerpo humano tiene un 75 % de agua al nacer y cerca del 60 % en la edad adulta. Aproximadamente el 60 % de este agua se encuentra en el interior de las células (agua intracelular), el resto (agua extracelular) es la que circula en la sangre y baña los tejidos. Por lo tanto, el uso de la terapia laser infrarroja en animales y pacientes utiliza casi exclusivamente luz en el rojo y el infrarrojo cercano (600-1100nm), por lo que a diferencia de otros procedimientos con láser médico, la terapia laser con infrarrojo no tiene un efecto ablativo o mecanismo térmico, sino más bien un efecto fotoquímico lo que significa que la luz absorbida produce un cambio en una sustancia química que la absorbe [3]. La dosis de la terapia laser en la clínica debe ajustarse y mantenerse de acuerdo a la penetración y al estado del proceso patológico en animales y humanos, algunos autores en fisioterapia reportan dosis en tratamientos en humanos entre 2 y 40 J/cm² dependiendo la patología [4 y 5]. Dosis reportadas en células hepáticas de ratón sugieren que radiación infrarroja entre 4 y 8 J activan la función metabólica, mientras que dosis superiores la inhiben, esto por la medida de núcleos y nucléolos de las células, donde se evidencia una directa relación entre dosis crecientes de láser infrarrojo se asocia a una sostenida disminución en el área nuclear, y de igual manera se observa una relación directa entre el aumento de dosis infrarrojas con un evidente aumento de las áreas nucleolares, ambas observaciones logradas con una irradiación máxima de 8 J/cm² aplicadas diariamente durante 15 días [2 y 6].



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

PARTE EXPERIMENTAL:

La estructura para poder medir la fluorescencia de la muestra celular de ratas de la cepa Wistar se basa en un arreglo conocido como 2f, en donde la muestra y la imagen se ubican 2 veces la distancia focal de la lente y en lados opuestos de la misma. Para la excitación de las moléculas se utilizó un láser pulsado de Nd-YAG a una frecuencia de 20 Hz con una potencia en el uv de 235mW, triplicado en frecuencia, cuya longitud de onda de emisión a 355 nm coincide con uno de los picos de absorción de la molécula de NADH, para radiar las células se utilizó un láser terapéutico infrarrojo continuo a 790nm, 90mW, en la figura 1 se presenta un diagrama a bloques del arreglo experimental completo, para obtener fluorescencia de la molécula NADH intracelular, las flechas indican el camino del haz láser: en azul claro 355nm longitud de onda necesaria para provocar fluorescencia en la molécula NADH, en azul turquesa 350-600nm longitud donde se encuentra el espectro del NADH, en rojo láser a 790nm longitud de onda para estimular el metabolismo celular, en el plano de la imagen se coloca una fibra óptica que conduce la señal a un monocromador el cual contiene un arreglo de fotodiodos para captar varias longitudes de onda, programado para un tiempo de integración de 500 ms, a 1 promediación por segundo, la señal digital que nos entrega el monocromador la procesamos mediante un software comercial (Matlab).

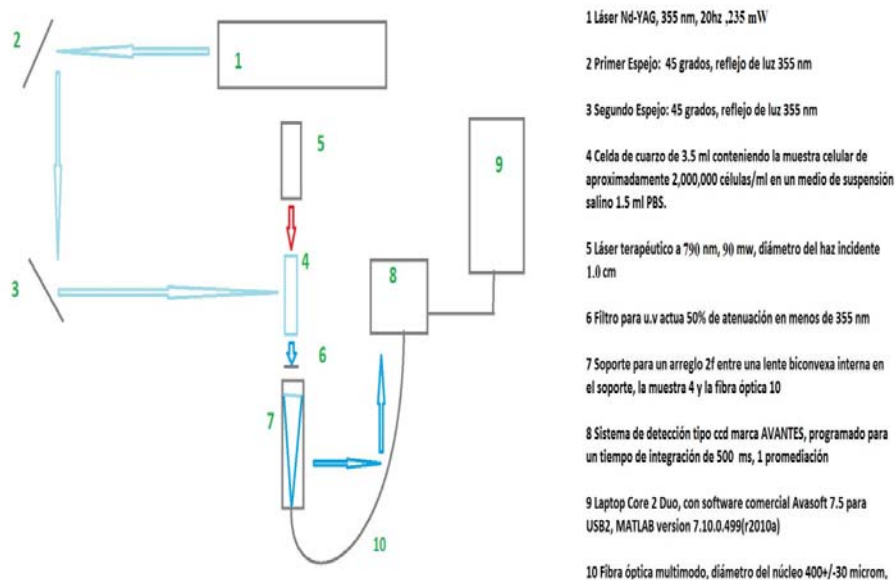


Figura 1. Diagrama a bloques del arreglo experimental para obtener fluorescencia de la molécula NADH intracelular, las flechas indican el camino del haz láser, en azul claro 355 nm longitud de onda necesaria para provocar fluorescencia en la molécula NADH, en azul turquesa 350-600 nm longitud donde se encuentra el espectro del NADH, en rojo láser a 790 nm longitud de onda para estimular el metabolismo celular.



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

La muestra que contiene el NADH consiste en células mononucleares de rata entre 22 y 30 días de nacidas de la cepa Wistar extraídas por punción cardiaca, se extraen 2.5 ml de sangre por cada rata, el volumen obtenido de células en esos 2.5 ml de sangre es diluido en 1.5 ml de una solución de mamífero conocida como Solución Salina Amortiguada por Fosfato (PBS) la cual es isotónica y no-tóxica para las células de los mamíferos ver figura 2. El total de ratas para este experimento fue de 10, de las cuales 5 fueron control y 5 radiadas.

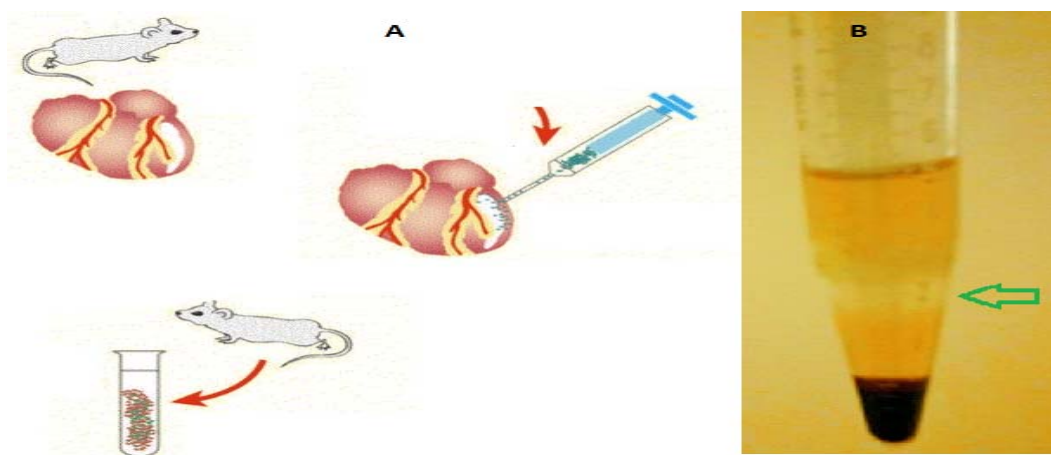


Figura 2.

2.A Extracción de muestra de sangre de rata Wistar ; 2.B se muestran las capas obtenidas después de procesar la sangre para la obtención de células mononucleares la cual es indicada con una flecha verde.

En la figura 3 mostramos las células en solución en una cubeta de cuarzo de 3.5 ml la cual se utiliza porque no ofrece absorción en la zona del UV y en la zona del IR y aunque la foto (3A) muestra una solución de 2.5 ml, en nuestro experimento solo se ocuparon 1.5 ml de solución PBS para tener una mayor densidad celular y por tanto una mayor fluorescencia, La figura (3B) presenta nuestro arreglo experimental, y la figura (3C) muestra las células mononucleares de rata al microscopio donde la parte brillante es la parte radiada con el láser terapéutico infrarrojo.



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

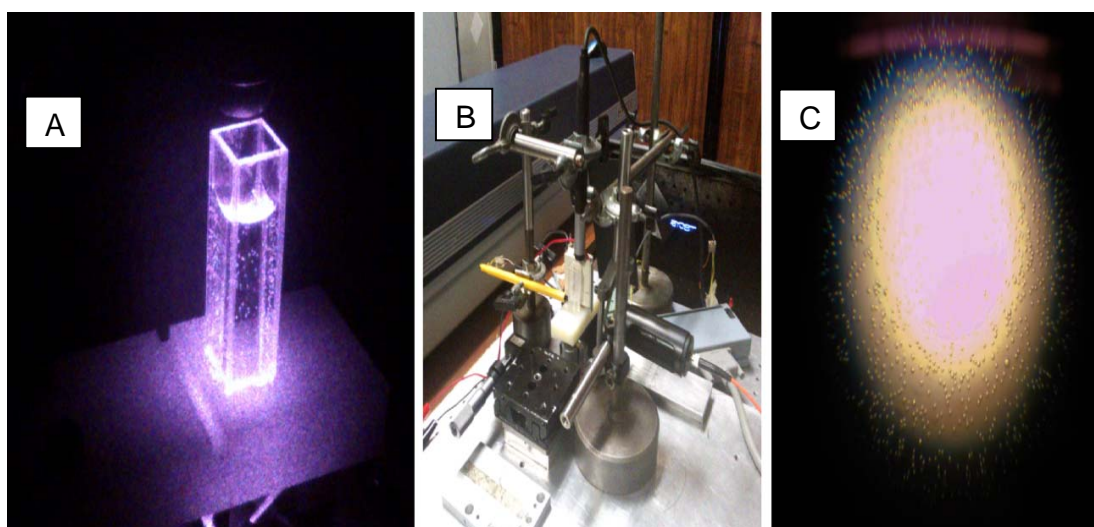


Figura 3. 3.A Células de rata Wistar en solución PBS 2.5 ml ; 3.B Arreglo experimental para obtener fluorescencia; 3.C Se muestran las células mientras se radian con láser terapéutico infrarrojo en el microscopio con objetivo 60 X.

RESULTADOS:

Del registro espectral de la fluorescencia del NADH intracelular de rata experimental y control durante 40 minutos a 1 espectro por segundo, se obtuvo el comportamiento de estos en el tiempo. Se realizó una promediación de espectros cada 5 minutos los cuales son mostrados en la figura 4 y los cuales son representativos de 5 controles y de 5 radiados, En el lado izquierdo de la figura 4 mostramos los espectros promediados de fluorescencia intracelular del NADH de células control los cuales tienen una tendencia a decaer conforme pasa el tiempo y durante los 40 minutos de nuestro registro. En el lado derecho de la figura 4 mostramos los espectros promediados de fluorescencia intracelular del NADH de células radiadas los cuales decaen y luego recuperan su fluorescencia, presentando un espectro desplazado alrededor de 30nm hacia la derecha apareciendo entre el minuto 20 y 30 de radiación continua de infrarrojo .



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

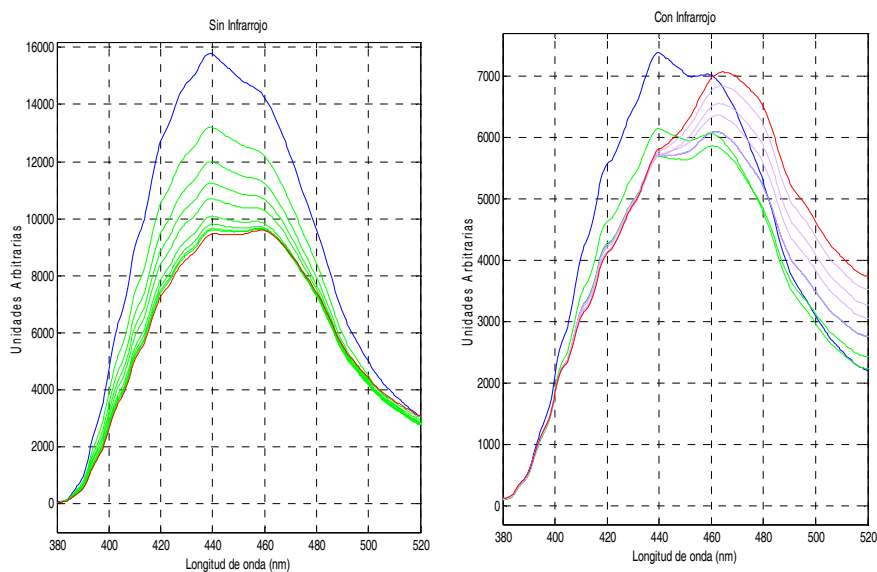


Figura 4. Grafica de espectros promediados cada 5 minutos durante 40 minutos, del lado izquierdo tenemos un decaimiento del espectro de fluorescencia en las células control, del lado derecho las células radiadas presentando un desplazamiento de alrededor de 30 nm, en ambos casos los espectros de color azul marcan el inicio de los primeros 5 minutos, los de color verde indican decaimiento, los de morado indican un incremento, los de color rojo representan la fluorescencia de los últimos 5 minutos. Esto es representativo de 10 casos, cinco controles y 5 experimentales.

Para tener un mejor entendimiento de la señal en el tiempo, a partir de los espectros se obtuvo la amplitud máxima de la fluorescencia intracelular segundo a segundo durante 40 minutos en 3 longitudes de onda 440, 460 y 470nm. Los resultados representados en la figura 5 nos muestran que existe un decaimiento de la amplitud en los 10 primeros minutos para ambos casos radiados y control, en las 3 longitudes de onda. En el caso de los controles la amplitud se estabiliza a partir del minuto 10 existiendo un muy ligero decaimiento de la fluorescencia. En el caso radiadas se ve una elevación en la amplitud de fluorescencia en las longitudes de onda de 360 y 370nm, manteniéndose la amplitud de 340nm (representativo de 10 ratas 5 control y 5 experimental).



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

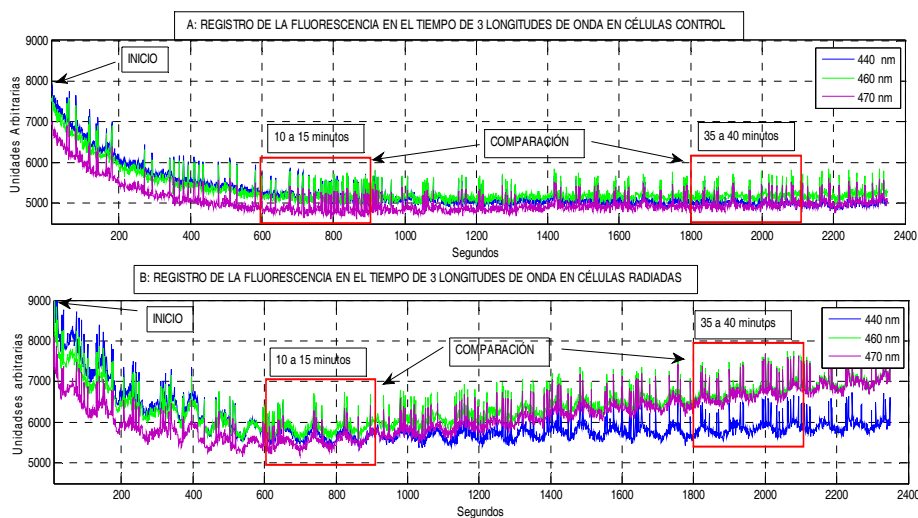


Figura 5. Comparación del registro de la amplitud de la fluorescencia en 3 longitudes de onda 440, 460 Y 470 nm, células control (A) y células radiadas (B).

Se realizó un comparativo del cambio de amplitud de la fluorescencia como función del tiempo, la amplitud inicial vario en cada muestra celular (distintas ratas) en un rango de 5000 a 17,000 unidades arbitrarias de intensidad: 1 por no tener siempre la misma densidad celular y 2 por tener variabilidad en la obtención de la muestra. Por dichos motivos, se evaluaron los cambios en distintos tiempos en cada muestra celular, calculando un porcentaje del cambio de amplitud. Se tomó el promedio de la amplitud durante 5 minutos en 2 intervalos de tiempo, el primero intervalo (minuto 10 al 15) que es cuando se estabiliza la señal y el segundo intervalo (minuto 30 al 35) que es cuando ya es notable el aumento de la fluorescencia en nuestras células radiadas (ver figura 5). En la tabla 1 se muestran los porcentajes de decaimiento en ambos control y radiadas, se puede ver que el mayor decaimiento se ve en la fluorescencia de las células control 15 % en la longitud de onda 440nm y el mayor aumento lo tienen las células experimentales 33.8% en la longitud de onda de 470nm. Así mismo representamos la diferencia de los 2 intervalos de tiempo anteriormente mencionados en un mini grafico en la tabla1, donde se puede ver que en las células control solo se ve un aumento en el decremento de la fluorescencia color azul, y en las radiadas se ve un decremento negativo lo que se traduce en un aumento de la fluorescencia color rojo.



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

Tabla 1. Del lado izquierdo representación del decremento de la amplitud de fluorescencia en células control color azul, Del lado derecho incremento de la señal de fluorescencia en células radiadas color rojo, Diferencia en 2 intervalos de tiempo (minuto 10 a 15) comparado con el intervalo (minuto 30 a 35), en 3 longitudes de onda 440,460 y 470nm.

CÉLULAS CONTROL				CÉLULAS RADIADAS			
% Decaimiento RC1 [(10 A 15)-(30 A 35)]				% Decaimiento RE1 [(10 A 15)-(30 A 35)]			
440 nm	460 nm	470 nm	440 460 470	440 nm	460 nm	470 nm	440 460 470
15.2370862	13.3213859	12		-0.4559004	-6.37029467	-8.82034632	
% Decaimiento RC2				% Decaimiento RE2			
14.4564241	9.62370649	6.45848876		9.01060071	-0.28063611	-4.90463215	
% Decaimiento RC3				% Decaimiento RE3			
9.05790525	3.2103321	0.81123862		-10.8522883	-27.7684564	-33.8556068	
% Decaimiento RC4				% Decaimiento RE4			
3.58744395	1.57068063	0.46244913		0.60962792	-2.38547604	-4.42334414	
% Decaimiento RC5				% Decaimiento RE5			
5.6261343	5.27859238	5.06260207		-2.53485425	-5.10882016	-5.51659654	

CONCLUSIONES.

La técnica utilizada en este trabajo para medir la fluorescencia del NADH intracelular nos permitió evaluar el comportamiento de esta molécula en amplitud de fluorescencia y morfología del espectro de manera continua (segundo a segundo) tanto en células control como radiadas. De los resultados obtenidos presentamos el hecho que la radiación infrarroja si mostró un efecto en las amplitudes y desplazamientos en los espectros de fluorescencia de nuestras células radiadas comparadas con los controles, probablemente por la unión a una proteína. De hecho se utiliza el cambio de fluorescencia del NADH unido a proteínas para medir constantes de disociación, que son útiles en el estudio de la cinética de enzimas. Estos cambios en la fluorescencia se utilizan también para medir variaciones en el estado redox de las células vivas mediante microscopía de fluorescencia. Desconocemos a que proteína pudiera unirse y si la dosis aplicada durante 40 minutos (equivalente a 216J) en vez de tener un efecto benéfico en las células, presente un efecto adverso, dado que en un estudio previo se reporta un efecto inhibitorio en las funciones metabólicas cuando aplicaban 16 J a células hepáticas de ratón durante 15 días equivalente a una dosis total de 240J [1].



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

BIBLIOGRAFÍA:

1. Cornejo Uribe, Ricardo et al. Estudio Morfométrico del Efecto de Láser Infrarrojo 16 J/cm² sobre Hepatocitos de Rata. **Int. J. Morphol.**, Temuco, v. 29, n. 2, jun. 2011 ISSN 0717-9502.
2. A. Silva Pérez, Espectroscopía de Fluorescencia Láser en Leucocitos de Humano, Tesis de Maestría, UAM-Iztapalapa, Mayo 1999.
3. Farivar S, Malekshahabi T, Shiari R. Biological Effects of Low Level Laser Therapy. *J Lasers Med Sci* 2014; 5(2):58-62
4. A. Diez de los Ríos, et al, "Estudio de la absorción de la radiación laser HeNe y GaAs por los tejidos biológicos", *Inv. Clin. Laser* vol. 4(3), pp. 98-101, 1987.
5. Rodríguez Martín JM. Electroterapia en Fisioterapia, Editorial Médica Panamericana, 2000, Cap. XVII. P.569-630.
6. Cornejo, U. R.; Matamala, V. F.; Silva, M. H.; Garrido, O. O.; Buchegger, M. K. & Jarpa, H. A. Análisis morfométrico del efecto de estimulaciones de láser infrarrojo sobre núcleos de hepatocitos de rata. *Int. J. Morphol.*, 28(3):771-775, 2010.