

**Revista Mexicana de
Medicina Física y Rehabilitación**

Volumen 15
Volume

Número 3-4
Number

Julio-Diciembre 2003
July-December

Artículo:




Efecto de la estimulación láser de $\lambda = 650$ nm, utilizando dosis de uso clínico, sobre la proliferación de fibroblastos humanos cultivados

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Sociedad Mexicana de Medicina Física y Rehabilitación, AC

**Otras secciones de
este sitio:**

-  **Índice de este número**
-  **Más revistas**
-  **Búsqueda**

***Others sections in
this web site:***

-  ***Contents of this number***
-  ***More journals***
-  ***Search***



Medigraphic.com

Efecto de la estimulación láser de $\lambda = 650$ nm, utilizando dosis de uso clínico, sobre la proliferación de fibroblastos humanos cultivados

Álvaro Lomelí-Rivas, * Edgar Krötzsch, ** Alexandre Michtchenko***

RESUMEN

La bioestimulación con láser de baja potencia ha demostrado utilidad práctica en el manejo de úlceras cutáneas, así como de otros padecimientos. Los fibroblastos son las células principales involucradas en la reparación tisular, para estimularlos mediante el láser de baja potencia, en cultivos humanos, es necesario tener parámetros de dosificación adecuados a las condiciones de los cultivos. En este estudio se tiene como finalidad ver el efecto del láser de $\lambda = 650$ nm en la proliferación de fibroblastos humanos cultivados, utilizando dosis de uso clínico. Se emplearon fibroblastos humanos cultivados sincronizados en fase G_0 , a los cuales se les irradió con láser de 650 nm, onda continua con dosis de 0.5, 1, 3, 5 y 7 J/cm², con densidad de potencia de 30 mW/cm². La proliferación de fibroblastos se cuantificó mediante el método de incorporación de [³H]-timidina. Se realizaron lecturas a las 24, 48, 72 y 96 horas. Los resultados mostraron que la proliferación fibroblástica no fue diferente de los controles en ninguna de las dosis empleadas, aunque se observaron algunos cambios estructurales en los fibroblastos. Es probable que las dosis empleadas en la terapéutica no sean las adecuadas a los cultivos, o tal vez se requiera otra densidad de potencia.

Palabras clave: Láser de baja potencia, cultivo de fibroblastos, incorporación de timidina, cicatrización de heridas.

ABSTRACT

Low-level laser stimulation has been used successfully in the treatment of wound healing, and other diseases. Fibroblasts are cells involved in tissue repair, it is needed adequate laser doses for fibroblasts stimulation. The objective of this study is to know the effects of $\lambda = 650$ nm laser in proliferation of human cultivated fibroblasts, utilizing clinical doses. Human fibroblasts were synchronized in G_0 stage, and irradiated with continuous wave of a 650 nm low-level laser at doses of 0.5, 1, 3, 5 and 7 J/cm², with power density of 30 mW/cm². Fibroblast proliferation was measured with a [³H]-thymidine incorporation method. The results were measured at 24, 48, 72 and 96 hours. Fibroblast proliferation showed no statistical differences between controls, but it was observed some structure changes. It is probably that clinical doses are not appropriated for culture stimulation, or maybe, it is needed another power density.

Key words: Low-level laser, fibroblasts cultures, thymidine incorporated method, wound healing.

INTRODUCCIÓN

El láser de baja potencia es un medio de tratamiento comúnmente utilizado en la medicina de rehabilitación, tanto en el manejo terapéutico de úlceras y heridas, acelerando la reparación tisular¹, como en otras aplicaciones, como es en el manejo del dolor², en el tratamiento de la inflamación y en

algunos trastornos de la inmunocompetencia³. Las investigaciones realizadas en el campo de la biodosis ha arrojado resultados favorables, lo cual hace que la prescripción del láser de baja potencia como bioestimulante sea cada vez más adecuada en la práctica médica rehabilitatoria.

Los fibroblastos, los macrófagos y otras células del sistema inmune, guardan un papel principal en la reparación tisular, produciendo sustancias que favorecen, aceleran o inhiben el proceso de cicatrización como son las citocinas⁴. Se tienen reportes de que el láser influye en la transformación de fibroblastos en miofibroblastos en cultivos celulares expuestos a una radiación de 1.2 J/cm²; ⁵ Weiss y Oron han reportado trabajos donde se comprueba que el láser influye en la regeneración de fibras musculares⁶. Asimismo, se han aplicado radiaciones de 1 J/cm², sobre tendones de conejo, observando un incremento del proceso de reparación⁷. Las dosis habituales de la aplicación del láser en la reparación

* Servicio de Medicina Física, Laboratorio de Láser, Unidad de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE.

** Laboratorio de Tejido Conectivo. Unidad de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE.

*** ESIME-SEPI, Instituto Politécnico Nacional.

Unidad de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE.

tisular van desde 1 hasta 10 J/cm². La pregunta es si estas dosis utilizadas normalmente en la terapéutica, son efectivas en cultivos celulares de monocapas de fibroblastos, ya que se pudiera estar aplicando una bioestimulación más intensa que no produjera un crecimiento fibroblástico. Asimismo, existen también algunos estudios que reportan que no hay crecimiento fibroblástico con irradiación láser, sino por el contrario, un efecto inhibitorio⁸. Por todo ello, es preciso incrementar la investigación en torno a los procesos íntimos que ocurren en el fibroblasto, y en otras células, para entender mejor los mecanismos mediante los cuales actúa el láser de baja potencia.

El objetivo de este estudio es saber si la estimulación con radiación láser de $\lambda = 650$ nm en las dosis aplicadas comúnmente en la clínica estimulan la proliferación de fibroblastos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos celulares. Se obtuvieron cultivos primarios de fibroblastos a partir de dos líneas celulares de adultos normales. Los cultivos fueron mantenidos con D-MEM suplementados con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 2 mM de glutamina (D-MEM 10% SBF, 2mM Gln). Los cultivos en cuarta generación fueron utilizados para realizar los ensayos de proliferación.

Ensayos de proliferación celular en fibroblastos. En una placa de 96 pozos se sembraron 5.0 por 10⁴ células/cm² (1.6 x 10⁴ células/pozo) y se cultivaron con 200 μ L de D-MEM 10% SBF 2 mM Gln, por 48 horas a 37°C y 5% de CO₂. Los pozos con células se distribuyeron de manera alternada en la placa para evitar la sobre-estimulación de la radiación láser al momento de realizar la prueba. Con el fin de sincronizar a todas las células y permitir que éstas quedaran en la fase G₀ de proliferación, es decir, en el momento previo a la formación de una nueva generación; después del periodo indicado se eliminó el medio de los cultivos y se sustituyó por 100 μ L de D-MEM 2 mM Gln y las placas se volvieron a incubar en las condiciones ambientales mencionadas, ahora por 18 horas. Posteriormente se eliminó el medio de cultivo y las células fueron sometidas a los diferentes tratamientos, donde los controles, negativo y positivo, fueron aquellas células incubadas con 100 μ L de D-MEM 2 mM Gln o D-MEM 10% SBF 2 mM Gln, respectivamente. Por otra parte, a los fibroblastos para irradiación se les adicionaron 100 μ L de D-MEM 2 mM Gln y fueron tratados con diferentes dosis de radiación de láser de baja potencia; siendo éstas de 0.5, 1, 3, 5 y 7 J/cm². Todos los cultivos, controles y experimentales, fueron incubados por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo nuevamente y se adicionaron por cada pozo 100 μ L de D-MEM 2 mM Gln, 1 μ Ci de [³H]Timidina y se volvieron a incubar por otro periodo de 18 horas en las condiciones mencionadas.

Una vez que transcurrió el periodo de incorporación de la [³H]Timidina, se eliminó el medio de cultivo de las placas y todos los pozos con células fueron lavados tres veces con 200 μ L de solución amortiguadora de fosfato salina (PBS) fría. Después de los lavados se agregaron 100 μ L de metanol frío y se fijaron las capas celulares a 4°C, durante 15 a 30 minutos. Al final del tiempo, se eliminó el metanol y las placas se dejaron secar en refrigeración. Finalmente, se resuspendieron todas las monocapas secas en 100 μ L de NaOH 1 N y de ahí se tomaron 50 μ L para cuantificación de radiactividad en un contador de centelleo líquido.

Radiación láser. Se utilizó un láser de AsAlGa de $\lambda = 650$ nanómetros, de 30 mW de potencia de salida, con aplicación de una densidad de radiación de 30 mW/cm², con radiación de onda continua. El experimento se efectuó con un mínimo de luz ambiental para evitar efecto adverso sobre la bioestimulación del láser. Como se mencionó anteriormente las dosis utilizadas en la irradiación de los fibroblastos cultivados fueron de 0.5, 1, 3, 5 y 7 J/cm². La incorporación de [³H]Timidina fue cuantificada a las 24, 48, 72 y 96 horas.

Manejo estadístico. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y la asociación entre variables fue determinada a través de la prueba de comparaciones múltiples HSD de Tukey, donde una diferencia significativa fue aquella con una P < 0.05. Este protocolo fue autorizado por la Comisión de Investigación de este Hospital.

RESULTADOS

Se realizaron ensayos de proliferación de fibroblastos estimulados con diferentes dosis de radiación láser de $\lambda = 650$ nanómetros con una densidad de potencia de 30 mW/cm². Los resultados mostraron que las dosis únicas entre 0.5 y 7 J/cm² no estimularon la duplicación celular en ninguno de los cultivos de las dos líneas de fibroblastos. Los controles, negativo y positivo, se comportaron como lo esperado, ya que las células que se encontraban en presencia de suero de bovino fetal (SBF) (control positivo, D-MEM 10% SBF, 2mM Gln) presentaron una incorporación definitiva radiactiva mucho mayores que aquellas que se mantuvieron en las mismas condiciones pero sin suero. En cuanto al efecto de la radiación láser, los resultados se aprecian en la *figura 1*. Los cultivos de fibroblastos que tuvieron 3 y 5 J/cm² tenían células con menor vacuolización que aquellos que pertenecían al grupo control negativo para los mismos tiempos de estudio.

DISCUSIÓN

Los efectos de la radiación láser de baja potencia han sido evaluados por sus reacciones biológicas sobre distintos modelos, ya sea fototoxicidad, morfogénesis o estimulación metabólica, donde en esta última, la proliferación celular es

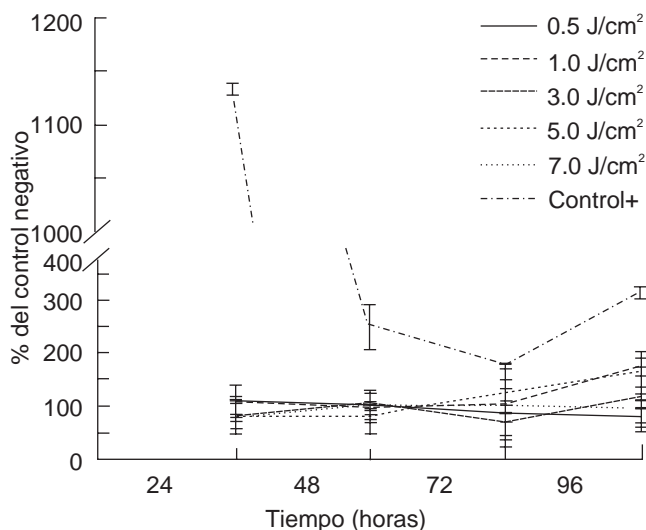


Figura 1. Proliferación de fibroblastos humanos estimulados con láser de $\lambda = 650$ nm. Los cultivos de fibroblastos fueron irradiados a diferentes dosis (0.5-7.0 J/cm²) y la proliferación fue evaluada a 24, 48, 72 y 96 h.

un factor importante para conocer las posibles aplicaciones y restricciones del láser de baja potencia sobre tejidos tumorales o en reparación⁹.

Aunque el láser de baja potencia ha demostrado su utilidad práctica en la reparación tisular o en la inducción del proceso cicatrizal en heridas crónicas, los modelos experimentales con células involucradas en el proceso de reparación no han resuelto muchos de los mecanismos íntimos mediante los cuales actúa. Las biodosis utilizadas en la terapéutica cotidiana no aplican para la bioestimulación de cultivos de fibroblastos; esto se puede deber a varias situaciones: una, que las biodosis sean muy altas, lo cual inhibiría el crecimiento celular; otra, que la densidad de potencia no sea la adecuada, ya que hay estudios en los cuales se demuestra que la densidad de potencia es uno de los elementos más importantes en la bioestimulación de los tejidos, conjuntamente con el tiempo de exposición¹⁰. Otra posibilidad, es que en este experimento los fibroblastos irradiados no tuvieron ningún otro estímulo, ya fuese físico o químico, que influyera en el efecto del láser, ya que la mayoría de los estudios publicados utilizan cultivos entre 5% y 10% de SBF, lo cual puede estar influyendo sobre el crecimiento fibroblástico, y en este estudio no se aplica el SBF, dejando a las células privadas de estímulo químico.

Los cambios morfológicos que se observaron en los cultivos a 3 y 5 J/cm² pueden indicar que el láser modifica no sólo el crecimiento celular, sino también los componentes intracelulares o la producción de colágena, aun en ausencia de crecimiento celular. Cabe señalar que si bien en este tra-

bajo no observamos proliferación fibroblástica, no se excluye la posibilidad de que el láser esté actuando en niveles metabólicos de los fibroblastos. En este estudio se utilizó el láser con onda continua, lo cual no debe de modificar los resultados esperados. Con estos resultados también habría que analizar si una sola exposición del láser es suficiente para provocar una respuesta mitótica evidente, lo cual sí se realiza en la práctica terapéutica.

CONCLUSIONES

Las dosis de bioestimulación utilizadas en la práctica clínica no estimularon la proliferación de fibroblastos con el láser de 650 nanómetros, pero, en cambio, se observaron modificaciones en la vacuolización de los fibroblastos cultivados, lo cual puede indicar que el láser no sólo actúa en la proliferación celular sino también en los procesos metabólicos. Es conveniente seguir investigando para encontrar una densidad de potencia adecuada en células cultivadas, para poder así reproducir los fenómenos que ocurren con la bioestimulación láser.

REFERENCIAS

1. Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 492-496.
2. Tunér J, Hode L. *Low Level Laser Therapy: Clinical Practice and Scientific Background*. Prima Books, Grängesberg, Sweden, 1999.
3. Ailioaie C, Lupusoru-Ailioaie LM. Beneficial effects of laser Therapy in the early stages of rheumatoid arthritis onset. *Laser Therapy* 1999; 11: 79-87.
4. Kovacs EJ, DiPietro LA. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J* 1994; 8: 854-861.
5. Pourreau-Schneider N, Ahmed A, Soudry M, Jacquemier J, Kopp F, Franquin JC, Martin PM. Helium-Neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. *Am J Pathology* 1990; 137: 171-178.
6. Weiss N, Oron U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by lower laser irradiation. *Anat Embriol* 1992; 186: 497-503.
7. Enwemeka CS, Reddy GK. The biological effects of laser therapy and other modalities on connective tissue repair processes. *Laser Therapy* 2000; 12: 22-30.
8. Glasborg E, Lask GP, Tan EML, Uitto J. Cellular effects of the pulsed tunable dye laser at 577 nanometers on human endothelial cells, fibroblasts, and erythrocytes: an *in vivo* study. *Lasers Surg Med* 1988; 8: 567-572.
9. Sroka R, Schaffer M, Fuchs C, Pongratz T, Schrader-Reichard U. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. *Lasers Surg Med* 1999; 25: 263-271.
10. van Breugel HHFI, Bär PR. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts *in vitro*. *Lasers Surg Med* 1992; 12: 528-537.

Domicilio para correspondencia:
Dr. Alvaro Lomelí Rivas
Tuxpan 10-RG3, Col. Roma Sur
Tel.: 5264 3247
medreha@prodigy.net.mx