

11222



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
I.S.S.S.T.E.
SUBDIRECCIÓN GENERAL MEDICA
CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"**

**EFFECTOS DE BIOESTIMULACION DE RADIACIÓN
LASER DE BAJA POTENCIA VARIANDO LA
DENSIDAD DE RADIACIÓN SOBRE LA
PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASTOS HUMANOS**

**TRABAJO DE INVESTIGACION
QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE :
ESPECIALISTA EN MEDICINA DE
REHABILITACION**

P R E S E N T A :

DRA. LAURA EUNICE FLORES MACEDO



MÉXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

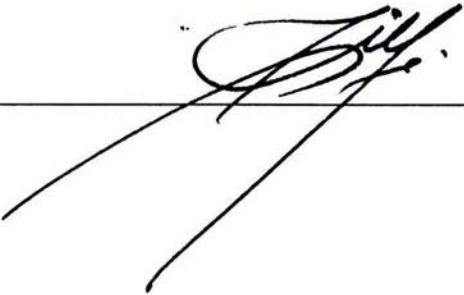
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

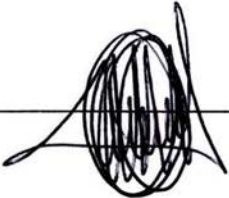
ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

DR. MAURICIO DI SILVIO LÓPEZ
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION



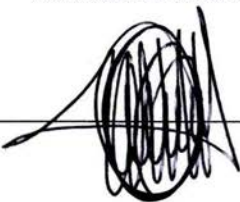


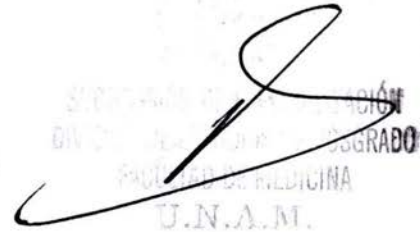
DR. ALVARO LOMELI RIVAS
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE MEDICINA DE REHABILITACION





DR. ALVARO LOMELI RIVAS
ASESOR DE TESIS





DRA. LAURA EUNICE FLORES MACEDO
MEDICO RESIDENTE DE LA ESPECIALIDAD DE
MEDICINA DE REHABILITACION



EFFECTOS DE BIOESTIMULACION DE RADIACIÓN LASER DE BAJA POTENCIA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASTOS HUMANOS.

RESUMEN

El propósito de este estudio preliminar fue determinar el efecto de la radiación LASER de 650 nm sobre la proliferación de fibroblastos a diferentes biodosis (0.5, 1, 3, 5 y 7 J cm²) en una sola radiación en cultivos de fibroblastos a los cuales se les aplicó el método de incorporación de ³H-timidina para medir la proliferación celular. Se tomaron mediciones a 24, 48 y 72 horas. Los resultados obtenidos mostraron un incremento en la proliferación celular a las 72 horas a 3 y 5 J/cm² y en el control si se encontró un incremento en la proliferación, como era de esperarse, ya que las células se encontraban en presencia de suero bovino fetal.

ABSTRACT:

The purpose of this preliminary study was to determine the effect of 650 nm laser radiation on the proliferation of fibroblasts, was studied at different biodosis (0.5, 1, 3, 5 y 7J/ cm²) in only one radiation, in human fibroblasts cultures, to witch the ³H-timidine incorporation method was applied. Measurements were taken al 24, 48 and 72 hours. The results obtained show an increase in the cell proliferation at 3 and 5 J/cm² and in the control with did find an increase in the proliferation, as expected, as- long-as the cells was encounter in presence of fetal calf serum.

INDICE

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
METODOLOGIA	5
RESULTADOS	8
CONCLUSION	9
BIBLIOGRAFIA	10

EFFECTOS DE BIOESTIMULACIÓN DE RADIACIÓN LASER DE BAJA POTENCIA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASTOS HUMANOS.

INTRODUCCION

La bioestimulación se puede definir como una reacción fotoquímica causada por la interacción del LASER con el tejido, el cual genera un número de fenómenos biológicos sin involucrar un aumento de la temperatura.¹ El LASER de baja potencia probablemente sea el más utilizado ya que se ha visto que causa una respuesta fotoquímica de bioestimulación induciendo alteraciones bioquímicas en las células principalmente en fibroblastos, sin embargo no hay una teoría universalmente aceptada para explicar el mecanismo de acción.² Pero autores como Rajaratnam, et al, mencionan que los factores de crecimiento sintetizados por macrófagos han mostrado inhibir o aumentar la actividad de muchos tipos de células, también observaron que la luz de diferentes longitudes de onda, densidades de radiación y de potencia puede aumentar o inhibir a las células U-937 de los macrófagos que liberan factores que estimulan la proliferación de fibroblastos.³ También se ha reportado el efecto de la radiación con LASER de baja potencia (0.9 mW) en la proliferación de fibroblastos en el cual no se encontraron efectos estimulantes ni inhibitorios.⁴ En otro estudio se comprueba que con radiaciones de 2 y 12 J/cm² incrementa la proliferación a largo plazo de fibroblastos de piel.⁵ Además se han hecho estudios de los efectos de la radiación con LASER de baja potencia en términos ultra estructurales encontraron que el LASER estimula la proliferación de fibroblastos tanto

in vivo como in vitro.⁶ La finalidad de realizar este protocolo es investigar los efectos que ejerce la bioestimulación de radiación LASER de baja potencia (30mW) con una longitud de onda de 650 nm sobre la proliferación de fibroblastos humanos in vitro, a diferentes densidades de radiación y el objetivo es realizar la curva de estimulación-proliferación de fibroblastos humanos in vitro así como la cantidad de células fibroblásticas que se producen con y sin estimulación. Ya que uno de los problemas encontrados en la literatura existente es que son muy pocos los reportes de LASER de baja potencia y proliferación fibroblástica, además de que no se comenta la dosis óptima de aplicación.

ANTECEDENTES.

Cuando la terapia LASER estaba iniciando en los años setenta algunos investigadores como Mester utilizaban dosis de 0.5 a 1.5 J para tratamientos de heridas. A pesar de estudios que han demostrado que la radiación con LASER de baja potencia incrementa la proliferación de fibroblastos en cultivos celulares el mecanismo de acción es desconocido.⁷ Balboni, et al, evaluaron los efectos de la radiación con LASER de baja potencia en la producción de colágena, obtuvieron que la radiación con LASER puede tener un efecto positivo en la producción de colágena por los fibroblastos in vitro, este efecto va a depender del tiempo de exposición y de la frecuencia de impulsos infrarrojos.⁸ En otro estudio su objetivo fue determinar si la radiación LASER (660 nm) puede estimular la proliferación del factor de crecimiento (gF) de fibroblastos en cultivos celulares en donde se demostró que los fibroblastos irradiados con LASER a 2.16 J/cm² daban proliferación celular y aumento de la producción del factor de crecimiento, mientras los fibroblastos irradiados con LASER a 3.24 J/cm² no incrementaron la proliferación celular ni liberación del factor de crecimiento concluyendo que la proliferación de fibroblastos puede estar asociada con la producción autocrina de factor de crecimiento de los fibroblastos.⁹ En otro artículo hacen referencia acerca de la densidad de potencia y tiempo de exposición de la radiación con LASER de He-Ne, factores que son más importantes que la dosis total de energía. Los resultados mostraron que la potencia de LASER por debajo de 2.9 mW puede aumentar la proliferación celular mientras que a mayor potencia de LASER (5.98 mW) no tuvo proliferación celular por lo

tanto el tiempo de exposición y la densidad de potencia determina los efectos de radiación.¹⁰ Además se ha reportado el efecto de diferentes lasers en la cicatrización de la herida en ratas evaluando el posible rol de la transmisión del LASER en la piel siendo la dosis optima $20\text{J}/\text{cm}^2$ y el LASER más efectivo fue el de He-Ne (632 nm) obteniendo como resultados un incremento en la síntesis de DNA y RNA así como proliferación de fibroblastos y síntesis de colágeno.¹¹ En otro estudio se observó el efecto de LASER He- Ne en la cicatrización de úlceras de la mucosa faringea en caballos, dichas lesiones radiadas cicatrizaron a los 11.5 días y las no radiadas a los 18 días; histológicamente en las lesiones radiadas se observó actividad fibroblástica por lo que se concluye que el LASER acelera la cicatrización.¹² En otro reporte se observó que en células HeLa radiadas con LASER Helio-Neón (632.8 nm a $10\text{J}/\text{cm}^2$) hubo un incremento de ATP a los 20 minutos concluyendo que va a depender de la fase de crecimiento en que se encuentre la célula siendo más elevado en la fase logarítmica. Webb, et al, realizó un estudio con dos líneas de fibroblastos humanos radiados con LASER de 660 nm a dosis de 2.4 y $4\text{J}/\text{cm}^2$ observaron incremento de la cuenta celular después de la radiación.

METODOLOGIA.

Para la realización de este protocolo se utilizó un LASER de GaAlAs de 650 nm y 30 mW de potencia de salida, con radiación de onda continua.

PREPARACIÓN DE LAS CELULAS.

Se obtuvieron muestras de fibroblastos de piel sana se mantuvieron en medio de Dulbecco-Tagle modificado CD- MEM con glutamina y alta concentración de glucosa, complementando con 10 % de suero bovino fetal inactivado a 56 % por 30 minutos y antibiótico (100 U/ml de penicilina y 5 ug/ml de estreptomina).

CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LAS CELULAS.

Posteriormente los fibroblastos fueron sembrados en una placa de 24 pozos con 5×10^4 células/cm² con 1 ml de D-MEM 10% SBF, se incubaron por 48 horas. Los pozos con células se distribuyeron de manera de que se dejó una poza vacía alrededor de la que tenga cultivo con la finalidad de que no se corra el riesgo de irradiación por reflexión o difracción.

PROCEDIMIENTO

Se irradiaron los cultivos con las siguientes biodosis: 0, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 y 7.0 J/cm² con una densidad de radiación de 60 mW /cm².

Posteriormente se tomaron mediciones a 24, 48 y 72 horas.

APLICACIÓN DEL LASER.

Se realizó de la siguiente manera.

La bioestimulación se realizó por debajo de la caja de cultivos utilizando un protector de plástico negro con una perforación con el fin de que no se irradiara otra zona. Se mantuvo sostenido el LASER mediante un soporte movable y posteriormente se procedió a aplicar las diferentes densidades de radiación para saber que ocurre con un día de radiación, el control no fue radiado. El experimento se realizó por triplicado con el fin de tener mayor seguridad en los datos obtenidos. Una vez que se ha terminado de irradiar todos los cultivos controles y experimentales fueron incubados por 24 horas a 37° y 5% de CO₂ y posteriormente se eliminó el medio de cultivo y se adicionó por cada pozo 100 µl de DEMEM y timidina y se volvieron a incubar por 18 horas. Finalmente se resuspendieron todas las monocapas en 100 µl de NaOH 1 N y de ahí se tomaron 50 µl para cuantificación de radiactividad en un contador de centello líquido.

COLABORACIÓN PERSONAL DENTRO DEL PROTOCOLO.

Una de las actividades que llevé a cabo fue la recopilación de artículos referentes a LASER de baja potencia de que manera interviene en la proliferación de fibroblastos así como los posibles mecanismos de acción y como puede influir la biodosis aplicada a diferentes densidades de radiación. Además colabore en la aplicación del LASER de la siguiente manera se realizó por debajo de la caja de Petri en donde cada pozo contenía 5×10^4 células se utilizó un protector de acrílico con una perforación para evitar que se irradiara otra zona, se colocó el LASER de baja potencia en un soporte móvil el cual se mantuvo a una altura fija (0 cm) y antes de la aplicación del LASER se hizo el cálculo del tiempo que corresponde a 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, y 7 J/cm² siendo los siguientes 16 s, 30 s, 60 s, 120 s y 300 segundos respectivamente, después de cada radiación se colocaban las cajas de Petri en una incubadora a 37°C y 5% de CO₂ para mantener a los fibroblastos en buenas condiciones y además evitar contaminación de las mismas.

RESULTADOS

Se realizó la medición de la proliferación de fibroblastos después de la aplicación de LASER de baja potencia (30mW) con una longitud de onda de 650 nm a diferentes biodosis 0.5, 1, 3, 5 y 7 J/cm² en donde los resultados mostraron un incremento en la proliferación de fibroblastos a dosis de 3 y 5 J/cm² e inhibición a los 7J/cm² a las 72 horas y los controles se comportaron como lo esperado ya que las células se encontraban en presencia de suero bovino fetal (ver gráfica). Con los resultados obtenidos no puede confirmar que el LASER de baja potencia no participe en la duplicación celular, hay que tener en cuenta que pudieron influir varios factores entre ellos que la biodosis que se aplicó no fue la suficiente para que pudiera estimular la proliferación de los fibroblastos. También habrá que tomar en cuenta que sólo se realizó una irradiación por biodosis.

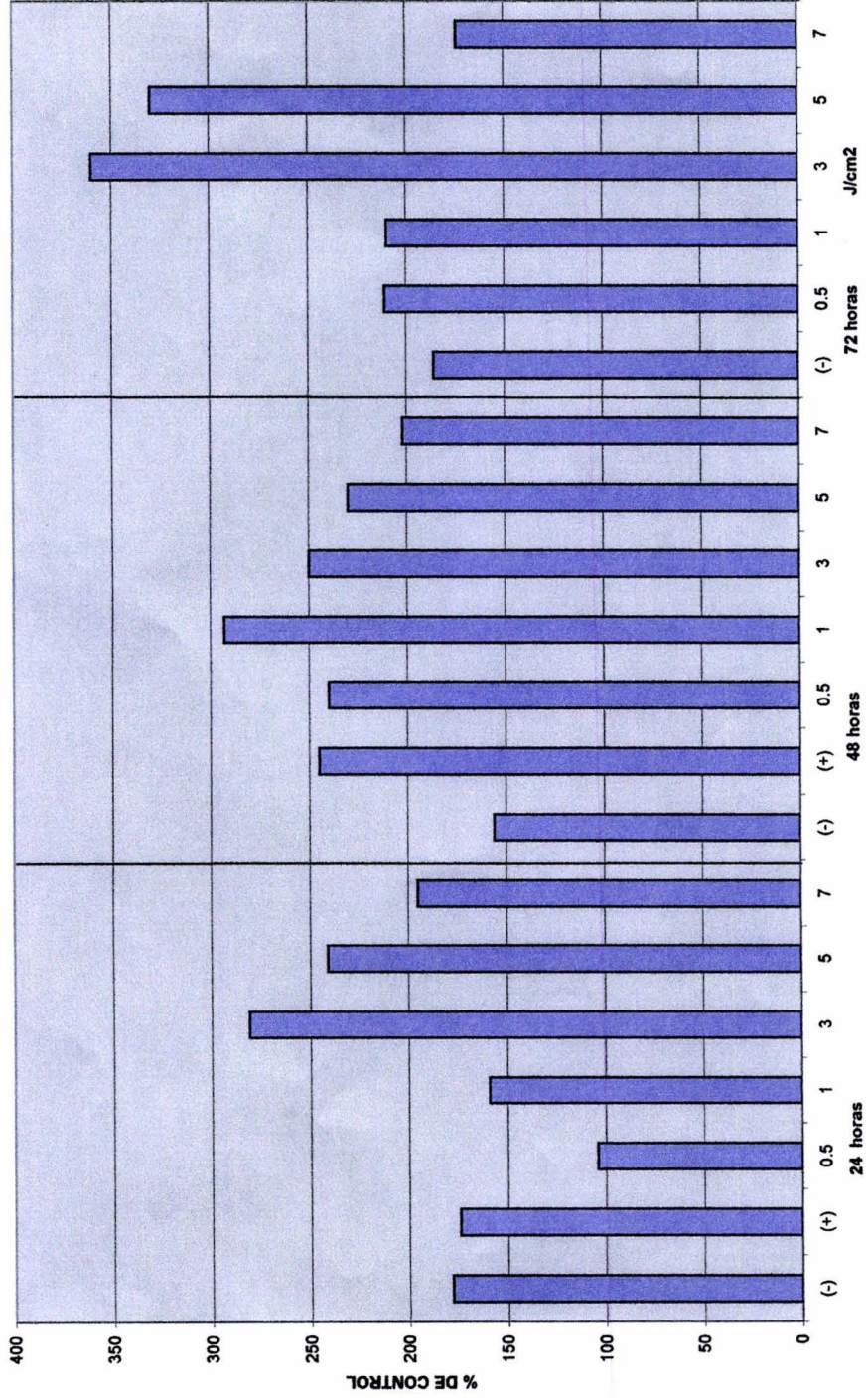
CONCLUSIÓN.

En la mayoría de los artículos se menciona que el LASER de baja potencia estimula la proliferación de fibroblastos pero no se comenta la biodosis optima de aplicación así como los posibles mecanismo de acción, ni se reportan curvas de intensidad-efecto además no se comenta que tipo de colágena es la que se sintetiza con la estimulación del LASER. También se ha mencionado que la proliferación de fibroblastos puede estar asociada con la producción autocrina de factores de crecimiento, lo que llama la atención es que en la mayoría de los artículos refieren que a dosis bajas de radiación con LASER de baja potencia se estimula la proliferación de fibroblastos y a dosis altas se inhibe o bien no hay cambios significativos en la estimulación o inhibición de fibroblastos. Por lo tanto este tipo de estudio preliminar es de mucha utilidad ya que es la base para modificar la densidad de radiación, o la concentración de suero bovino fetal, o la biodosis, en otros protocolos de investigación.

BIBLIOGRAFIA

1. Farouk AH, Watban AL, Zingyang Z: Dosimetry- Related Wound Healing Response in the rat model following Helium Neon Laser LLLT. LASER THERAPY 1994; 0:119-124
2. Inove H, Osada H: Low-Power lasers in medicine. A report by the Australian Health Technology Advisory Committee (AHTAC) June 1994. Dermatologic 1984;168:157-162
3. Rajaratnam S, Bolton P, Dysun M: Macrophage responsiveness to laser therapy with varying pulsing frequencies. LASER THERAPY 1994; 6:107-112
4. Hallman HO, Basford JR: Does low- energy helium-neon laser irradiation alter "in vitro" replication of human fibroblasts? Eur J Oral Sci 2000; 108: 29-34
5. Bednarska K, Rozga B, Kolodziejczyk: Effect of low-power red light laser irradiation on the viability of human skin fibroblast. Laser Surg Med 1988; 8:125-129
6. Bosatra M, Jucci A, Oliano P: In vitro fibroblast and dermis fibroblast activation laser irradiation at low energy. An electron microscopic study. Sheng Wu Gong Chen Xue Bao 2001; 17:336-338
7. Balboni GC, Brandi ML, Zonefrait L: Effect of laser irradiation on collagen production by fibroblasts in vitro. Lasers Surg Med 1998; 22: 294-301
8. Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ: The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. Radiat Environ Biophys 1998; 37: 215-217

CUANTIFICACION DE FIBROBLASTOS POSTERIOR A RADIACION LASER DE BAJA POTENCIA



9. Van B, Bar 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. *Laser in Surgery & Medicine* 1992; 12:528-537
10. Farouk AH, Al Watban Ms: The acceleration of wound healing is not attributed to laser skin transmission. *Laser therapy* 2000; 11:6-10
11. Gomez RJ, Santisteban JM, Ruiz Y: He-Ne laser therapy by fibroendoscopy in the mucosa of the equine upper airway. *Laser in Surgery & Medicine* 1995; 16: 184-188
12. Karu T, Kalendo G: Irradiation with He in laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *Journal of Photochemistry Photobiology- B-Biology* 1995; 27: 219-223
13. Webb C, Dyson M, Lewis WH: Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts: possible mechanisms for increase in cell counts. *Laser Surg Med* 1997; 20: 426-432