

EFECTO DE LOS LÁSERES DE ASGAAL (655 Y 830 nm) EN MÚSCULO LEVATOR AURIS LONGUS DE RATÓN

R. A. Nicolau^{1,2,3}, M. S. Martínez³, J. Rigau³, J. Tomàs³,
R. A. Zângaro^{1,2}, M. T. T. Pacheco²

¹ Universidade do Vale do Paraíba (Univap), Faculd. Ciências da Saúde, S. J. Campos, Brasil

² Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Univap, S. J. Campos, Brasil

³ Unitat d'Histologia i Neurobiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili,-
Reus, -Espanya
rani@univap.br

Palavras-chave: Potenciales de acción muscular compuestos, láser, AsGaAl, LAL

Área do Conhecimento: III- Engenharias

Resumen: Muchos estudios tienen demostrado los efectos de láseres rojos e infrarrojos acerca del sistema neuromuscular. Con el objetivo de evaluar la interacción del láser AsGaAl (655 y 830 nm, dosis de 92-416,5 J/cm²) con el tejido muscular de ratón, se utilizó la técnica de neurografía motora. Los experimentos se realizaron utilizando 21 ratones *Swiss*. Fueron registrados los potenciales de acción muscular compuestos (PAMC) evocados, evaluando el *peak-to-peak* en músculo *Levator auris longus*. No se observaron cambios significativos en cuanto a la amplitud o morfología dos PAMCs con el empleo de los distintos láseres y dosis, o sea, no existen modificaciones detectables de los PAMCs post-irradiación, en las condiciones testadas por la técnica de análisis empleada.

Introducción

En mediados de los años 60, la manipulación de la energía lumínica apareció como una alternativa terapéutica [1] a partir del desarrollo de la tecnología láser. Desde su inicio, los efectos obtenidos clínicamente apuntaban al láser de baja potencia como una nueva terapia de bajo costo, sin efectos colaterales y bien aceptada por los pacientes. En este sentido podemos encontrar abundante publicación de estudios clínicos desarrollados utilizando esta terapia [2-4]. Sin embargo la falta de estudios y resultados concluyentes sobre la interacción de la energía lumínica con el tejido biológico, condujeron en pocos años a la sociedad científica al escepticismo [5-7].

Algunos estudios básicos, realizados por grupos mundialmente reconocidos utilizando láser con emisión en la región del rojo e infrarrojo (IR) cercano, han basado el desarrollo de la investigación acerca de la terapia láser [8-10]. La determinación de los acontecimientos moleculares de interacción de la energía procedente de láseres rojos y IR cercano con el sistema neuromuscular, es un gran paso para el conocimiento y optimización de la terapia láser en especialidad como la rehabilitación.

Material y Métodos

Animales

Los experimentos se realizaron utilizando 21 ratones *Swiss*, de 20-25 g de peso (Criffa, Barcelona - España), para la neurografía motora (5 animales/dosis testada). Los animales fueron divididos en tres grupos: control, láser rojo y láser infrarrojo. Un animal fue utilizado para experimentos de análisis de temperatura y transmisión de los láseres (parámetros en la tabla 1) a través piel de ratón. La muestra de piel fue obtenida de la región periauricular del ratón. La manipulación dos animales fue realizada siguiendo la ley aprobada en 1995 por el Parlamento de Cataluña de 21 de junio (5/1995), de protección de animales utilizados para la experimentación y para otros fines científicos.

Láser

Se utilizarán de diodos láser de AsGaAl (SORISA, Barcelona - España) con longitudes de onda de 655 y 830 nm. Antes de iniciar cada experimento, los equipos láser fueron calibrados con un detector de potencia y energía (2-Watt Broadband Power/Energy Meter, Modo 13 PEM 001/J, Holanda).

Tabla 1: Protocolos experimentales de irradiación láser

Protocolo	DE (J/cm ²)	Energía (J)	Potencia (mW)	Tiempo (s)
A	137,9	0,8	20	40
B	416,5	2,4	118	20
C	92,9	0,8	86	9
D	297,1	2,4	86	28

En los protocolos la emisión de haz para ambos láseres fue continua y con un área de haz constante de 0,2 cm². DE - densidad de energía. J - julios. s - segundos. mW - miliwatios. cm² - centímetros cuadrados.

Temperatura de la muestra durante irradiación láser

La temperatura de muestras de piel de ratón de la región periauricular fuera evaluada durante la irradiación con láser en 655 nm y 830 nm (área de haz de 0,2 cm²). La medida de la temperatura fue realizada con dos sondas térmicas (YSI *Reusable Temperature probe* - YSI Incorporated 402, resolución $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$). Una de las sondas era fijada en contacto con la muestra (en medio a solución fisiológica). La otra sonda era mantenida como referencia, en solución de Ringer. Ambas conectadas a un analizador multicanales digital (Letica - TMP 812). Los registros de temperatura se hicieron durante un periodo de cinco minutos post-irradiación. Antes de cada irradiación se registraba la temperatura control de la muestra. Durante los experimentos la temperatura ambiente fue de $25,9 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$, no interfiriendo en los valores de temperatura de las muestras.

Transmisión de los láseres a través de muestras de piel de ratón

En la superficie de la piel de ratón de la región periauricular se irradió por contacto con los diodos láseres de 655 nm y 830 nm. Al otro lado de la muestra se detectaba la energía transmitida con un medidor de potencia (2-Watt Broadband Power/Energy Meter, Modelo 13 PEM 001/J, Holanda). La irradiación se hizo con el haz de 0,2 cm².

Neurografía motora

Este estudio fue realizado utilizándose el músculo elevador de la oreja (*Levator auris longus*; LAL) (Figura 1) de 20 ratones anestesiados con tribromoetanol a 2 % (0,3 ml/10 g de peso, intraperitoneal) (Sigma Aldrich, Steinheim - Alemania). Fueron registrados y evaluados los potenciales de acción muscular compuestos (PAMCs) evocados. Para los registros fueron utilizados dos electrodos de tungstenio (Medelec Mystro), alojado subcutáneamente, puesto horizontalmente hacia el LAL, estimulándose el nervio auricular. El

supramaximo de estímulo se alcanzó aumentando la intensidad de voltaje para la obtención del PAMC, evitando el artefacto del estímulo. El voltaje del estímulo fue de 9 mV. La duración del estímulo fue de 0,1 milisegundos y los filtros altos y bajos fueron de 10 kHz y 2 Hz, respectivamente. El electrodo de referencia era un receptor en aguja, alojado en el LAL contralateral (Figura 1).

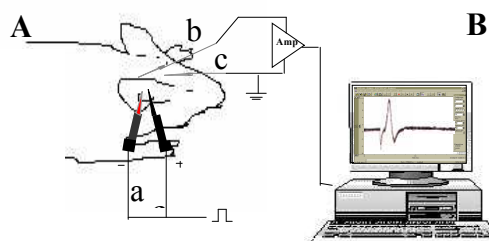


Figura 1: Esquema del sistema de registro-neurografía motora. **A)** Animal posicionado: 2 electrodos de estímulo (a) fijados en el nervio auricular, 1 electrodo de registro (b) en el músculo LAL y 1 electrodo de referencia (c). **B)** Sistema digital de registro y análisis de los registros.

Se hizo 3 registros de PAMC por animal (0, 5 y 10 minutos post-irradiación, tabla 1). Los registros previos a la irradiación fueron considerados registros control (3 registros/animal). Los registros fueron digitalizados (Digidata 1322A Interface, Axon Instruments, CA- USA), almacenados y analizados por ordenador. Fue utilizado el programa Axoscope 9.0 (Axon Instruments) para la adquisición y análisis de los registros. El análisis fue realizado a partir de la medida entre los picos negativo y positivo de la amplitud de los PAMCs (*peak-to-peak*) (Figura 2). Durante el periodo de registro (pre y post-irradiación) el mismo paquete muscular permaneció fijado.

Análisis estadístico

Los valores de los datos están expresados en media \pm SEM (*Standard Error Mean*). La significación estadística fue evaluada

utilizando el Análisis de Varianza (ANOVA). Los cálculos estadísticos se hicieron con el programa *GraphPad Prism 2.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Las diferencias fueron consideradas significantes cuando $p < 0,05$. Los datos están expresados gráficamente por el porcentaje de variación respecto a los valores control.

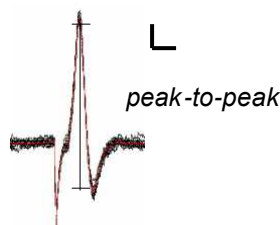


Figura 2: Registro de PAMC en LAL de ratón. Amplitud de pico positivo al pico negativo do potencial (*peak-to-peak*) Escala: barra horizontal, 2,5 ms; barra vertical, 2 mV.

Resultados

Temperatura durante la irradiación láser

Estos experimentos se realizaron ya que un moderado cambio en la temperatura de la unión neuromuscular podría afectar la fisiología neuronal [11]. Aunque el cambio de temperatura puede corregirse por medio de cálculos de normalización [12], debe ser evitado, trabajándose en condiciones próximas a las fisiológicas. Los resultados obtenidos en las condiciones de trabajo utilizados en experimentación, demostraron ausencia de diferencia significativa ($p > 0,05$) en la temperatura de las muestras controles y post-irradiación (sometida a las diferentes dosis), durante el período de 1 a 5 minutos post-irradiación (Figura 3) para los diferentes láseres.

Transmisión de los láseres de AsGaAl (655 y 830 nm) a través de muestras de piel de ratón

La transmisión del láser de AsGaAl 655 nm a través de la muestra de piel de ratón (1,0 mm de grosor) es de aproximadamente del 3 %. El porcentaje no se altera a pesar de la elevación de la energía sobre la muestra. La transmisión del láser de AsGaAl 830 nm a través de la muestra de piel de ratón es de aproximadamente del 4,3 %.

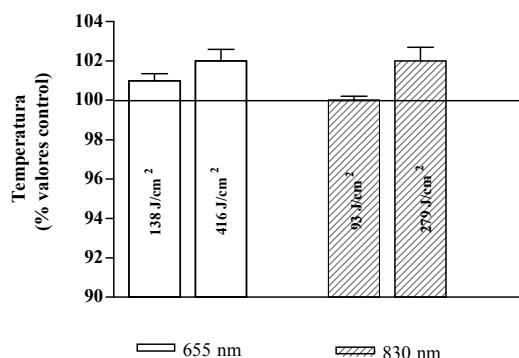


Figura 3: Temperatura de las muestras piel de ratón post-irradiación con los diodos láseres con 655 y 830 nm. Las barras representan el porcentaje de cambio entre control e irradiado (media \pm SEM). Las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$).

Neurografía motora

En la figura 4 están resumidos los resultados de los PAMCs. No se ha encontrado ningún cambio ($p > 0,05$) en los potenciales respecto al control, en animales irradiados con láser de 655 nm con una DE del 137,9 J/cm² (porcentaje de cambio respecto al control: 10,39 \pm 0,46 %) o con DE del 416,5 J/cm² (porcentaje de cambio respecto al control: 2,81 \pm 0,73 %). Tampoco se observó cambio significativo ($p > 0,05$) en los paquetes musculares irradiados con láser de 830 nm con una DE del 92,9 J/cm² (porcentaje de cambio respecto al control: 2,53 \pm 1,44 %) o DE del 279,1 J/cm² (porcentaje de cambio respecto al control: 5,9 \pm 1,41 %).

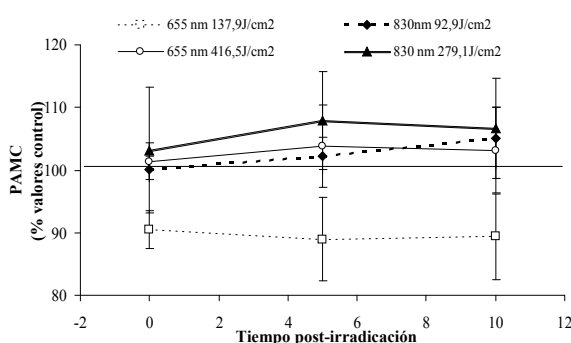


Figura 4: Efecto del láser de baja potencia en los PAMCs (n=20 animales). Irradiación con láser diodo de 655 y 830 nm. Los datos representan el porcentaje de cambio (media \pm SEM) respecto a valores control. Las diferencias no fueran significantes ($p > 0,05$).

Discusión

En esta investigación se estudia la acción de la irradiación con láser rojo e IR cercano a baja potencia sobre la respuesta neuromuscular *in vivo* a través de neurografía motora [11,12].

Variaciones en la temperatura, pueden causar cambios en la neurotransmisión, sobre todo en la velocidad de conducción [13]. En el trabajo actual se evaluó el posible cambio en la temperatura de una muestra durante la irradiación con diferentes dosis de irradiación. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Walker [14], Basford et al. [15] y Bibikova y Oron [16]. La inexistencia de cualquier alteración en la temperatura de la muestra post-irradiación permite descartar la interferencia de la temperatura en los resultados obtenidos.

Según autores los láseres de baja potencia pueden inducir cambios en la concentración de calcio [17] y/o aumento de la adenosina trifosfato [18,19], esto podría generar un cambio en la neurotransmisión. Bajo las condiciones de trabajo de este estudio, la neurografía motora no reveló cambios significativos en cuanto a la amplitud o morfología de los CMPAs, en ninguno de los láseres empleados ni en ninguna de las dosis utilizadas corroborando con los resultados obtenidos por Bagis et al. [20] y Comelekoglu et al. [21].

Conclusión

No existen modificaciones detectables potenciales de acción muscular compuestos evocados post-irradiación en las condiciones testadas por la técnica de análisis empleada.

Referencias

- [1] MESTER, E. The use of the laser beam in therapy. **Orv Hetil.** V.107, n.22, p.1012-1016, 1966.
- [2] HARADA, R. et al.. Low energy laser irradiation for patients with spastic paralysis". **Sogo Rehabilitation.** V.19, p.1089-1091, 1991.
- [3] ASAGAI et al.. Relaxation of spasticity by low energy laser irradiation in cases with cerebral palsy. **Kanto J Orthop Traumatol.** V.25, p.84-90, 1994.
- [4] TÚNER, J.; HODE, L. Reinnervation after nerve injury: the effects of low laser treatment. In: Low level laser therapy- Clinical practice and science background. Prima Books, Sweden, 1999.
- [5] BASFORD, J.R. Laser therapy: scientific basis and clinical role. **Orthopedics.** V.16, n.5, p.541-547, 1993.
- [6] BASFORD JR. "Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool." **Lasers Surg Med.** V.16, n.4, p.331-342, 1995.
- [7] BAGIS et al.. Acute electrophysiologic effect of pulsed gallium-arsenide low energy laser irradiation on configuration of compound nerve action potential and nerve excitability. **Lasers Surg Med.** V.30, n.5, p.376-380, 2002.
- [8] BALABAN et al.. He-Ne laser irradiation of single identified neurons. **Lasers Surg Med.** V.12, n.3, p.329-337, 1992.
- [9] KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B.** V.49, n.1, p.1-17. 1999.
- [10] KARU et al.. Changes in absorbance of monolayer of living cells induced by laser radiation at 633, 670 and 820 nm. **IEEE J Quantum Elect.** V.7, n.6, p.982-988, 2001.
- [11] GOODGOLD, J.; EBERSTEIN, A. Electrodiagnosis of neuromuscular diseases. Williams & Wilkins: Baltimore. 1978.
- [12] KIMURA, J. Electrodiagnosis in diseases of the nerve and muscle. Principles and practice. Philadelphia. FA Davis. 1989.
- [13] CAMBIER et al.. The influence of low intensity infrared laser irradiation on conduction characteristics of peripheral nerve: A randomised, controlled, double blind study on the sural nerve. **Laser Med Sci.** V.15, n.3, p.195-200, 2000.
- [14] WALKER, J. Relief from chronic pain by low power laser irradiation. **Neurosci Lett.** V.43, n.2-3, p.339-344, 1983.
- [15] BASFORD, J.R. et al. Does low-intensity helium-neon laser irradiation alter sensory nerve active potentials or distal latencies? **Lasers Surg Med.** V.10, n.1, p.35-39, 1990.
- [16] BIBIKOVA, A.; ORON, U. Attenuation of the process of muscle regeneration in the toad gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Lasers Surg Med.** V.14, n.4, p.55-361, 1994.
- [17] ALEXANDRATOU et al. Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy. **Photochem Photobiol Sci.** V.1, n.8, p.547-552, 2002.
- [18] KARU et al.. He-Ne laser radiation influences single-channel ionic currents through cell membrane: a patch-clamp study. **Lasers Life Sci.** V.7, p.35-48, 1996.

[19] KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B.** V.49, n.1, p.1-17, 1999.

[20] BAGIS et al.. Acute electrophysiologic effect of pulsed gallium-arsenide low energy laser irradiation on configuration of compound nerve action potential and nerve excitability. **Lasers Surg Med.** V.30, n.5, p.376-380, 2002.

[21] COMELEKOGLU et al.. Electrophysiologic effect of Gallium Arsenide laser on frog gastrocnemius muscle. **Lasers Surg Med.** V.30, n.3, p.221-226, 2002.