

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS



TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

***“Acción fotobiológica de la terapia láser en procesos inflamatorios
osteomioarticulares en modelos experimentales”***

JUAN CARLOS SIMES

AÑO 2009

COMISIÓN DE TESIS

Director:

Prof. Dr. José Atilio Palma

Comisión de seguimiento:

Prof. Dra. María Elisa Dionisio de Cabalier

Prof. Dra. Rita Inés Noher de Halac

(R.D. 3827/04)

CERTIFICO que el presente trabajo de Tesis del Bioquímico Juan Carlos Simes, fue realizado en la Cátedra de Física Biomédica, de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.-----

Córdoba, Octubre de 2009.

DEDICATORIA

A Mercedes, Lucila y Valter

A mi madre

Agradecimientos

A mi director de tesis, Prof. Dr. José Atilio Palma, quién con su conocimiento me asesoró en el desarrollo de la tesis y me brindó la posibilidad de poder integrar el equipo de investigación de la Cátedra de Física Biomédica.

A las Prof. Dra. María Dionisio de Cabalier y Prof. Dra. Inés Noher de Halac, por sus valiosas sugerencias y sentido crítico, me ayudaron a superar los obstáculos en el desarrollo de la tesis.

A la Prof. Dra. Vilma Campana, por haberme brindado la posibilidad de iniciarme en la investigación y colaborar siempre con desinterés y amistad para el logro de la tesis.

A los Prof. Dres. Patricia Paglini, Mónica Moya, Walter Rivarola y Antonio Gavotto, por su colaboración desinteresada, sugerencias y optimismo para el desarrollo del presente trabajo.

A las Biólogas Claudia Reinoso, Natalia Servetto, Alejandra Baez, María Baez, y a los Médicos Mariana Tarán y Ariel Balceda, por su colaboración y amistad.

A todo el personal de la Cátedra de Física Biomédica por su desinteresado apoyo para el desarrollo de esta tesis.

A mi esposa e hijos, por su eterno apoyo y comprensión por las horas de ausencia para hacer realidad este proyecto.

A todos aquellos que de manera directa o indirecta contribuyeron y me incentivaron para la realización del presente trabajo.

*“LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS
OPINIONES DE ÉSTA TESIS”*

(Art. N° 30 del Reglamento para la Carrera de Doctorado en Ciencias de la
Salud).

INDICE

Pág.

Resumen	I
Summary	IV

Introducción

El Fenómeno Inflamatorio.....	1
Mediadores Inflamatorios.....	3
Las Artropatías.....	5
Las Miopatías.....	9
Las Mitocondrias.....	10
La Cadena Respiratoria Mitocondrial.....	13
Los Fenómenos Fotolumínicos: El Láser.....	20
El Láser de He-Ne.....	22

Objetivos

Objetivos Generales.....	26
Objetivos Específicos.....	26

Materiales y Método

Animales.....	27
Grupos.....	27
Instrumental.....	28
Inducción del proceso inflamatorio articular.....	28
Inducción del proceso inflamatorio muscular.....	29
Tratamiento con Láser de baja potencia.....	29
Tratamiento Farmacológico	30
Preparación del material experimental	

Obtención del plasma	30
Obtención del tejido articular	30
Obtención del tejido muscular	31
Obtención de las mitocondrias del tejido muscular esquelético.....	31
Procesamiento del material biológico	
Determinación del fibrinógeno plasmático.....	31
Determinación de L-citrulina en plasma.....	31
Determinación de Nitrotirosina en plasma.....	31
Determinación de Oxido Nítrico en plasma.....	32
Estudio histomorfológico.....	32
Análisis mitocondrial.....	33
Funcionamiento del ciclo de Krebs.....	33
Actividad de los complejos de la cadena respiratoria.....	33
Análisis Estadístico.....	34

Resultados

Artropatías.....	35
Miopatías.....	49

Discusión	68
------------------------	----

Conclusiones	86
---------------------------	----

Bibliografía	88
---------------------------	----

Producción Científica	100
------------------------------------	-----

RESUMEN

Las artropatías microcristalinas son patologías inflamatorias inducidas por reacción celular al depósito de cristales en las articulaciones, resultan de la combinación de factores sistémicos y locales.

Las miopatías se caracterizan por el estado anormal del músculo esquelético caracterizado por debilidad, consunción y cambios histológicos; se deben a múltiples causas y ocasionan problemas en el tono y la contracción con diferentes grados de severidad, entre ellas las “miopatías inflamatorias” originadas tanto por factores endógenos como exógenos.

En búsqueda de una terapia antiinflamatoria libre de los efectos adversos que provocan los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), se propone el tratamiento con láser de baja potencia, como el de Helio-Neón (He-Ne).

Se estudió el efecto antiinflamatorio del láser de He-Ne en modelos experimentales de **artropatías** inducidas por cristales de hidroxapatita (HP) y de pirofosfato cálcico (PFCa) en ratas, en diferentes períodos de tiempo, determinando marcadores plasmáticos inflamatorios y de estrés oxidativo: fibrinógeno, L-citrulina, óxido nítrico (ON) y nitrotirosina, estudio histomorfológico y comparación con AINEs.

Se utilizaron 120 ratas hembras, distribuidas en 15 grupos. La artropatía se indujo por inyección intraarticular de 2mg de HP o PFCa en miembros posteriores.

En un grupo se inyectó cristales durante 3 días seguidos y en otro durante 2 semanas (día por medio). Tratamiento con láser de He-Ne se realizó por 3 días consecutivos sobre las articulaciones afectadas en el 1º grupo y por 5 días en el 2º grupo. El tratamiento con AINEs: 1,25mg/día/rata de diclofenac y meloxicam; y 0.05mg/día/rata de celecoxib y rofecoxib, individualmente en 3 oportunidades cada 24 hs. después de inyectar HP. La histología se realizó por microscopía óptica. La determinación de marcadores se realizó por espectrofotometría; y se utilizó ANOVA - test de Fisher ($p < 0.05$).

Los marcadores en los grupos con artritis inducidas con HP o PFCa, en 3 días o 2 semanas mostraron un incremento significativo de fibrinógeno y L-citrulina ($p < 0.001$); de ON al compararlo con el control y con el grupo inyectado y tratado con láser ($p < 0.02$); y de nitrotirosina al comparar entre el grupo con artritis

y el posteriormente tratado ($p < 0.01$). Al comparar los niveles de fibrinógeno de las ratas con artritis por HP con el control y las artríticas tratadas con AINEs o láser se observó $p < 0.01$. Resultados correlacionados en parte, con evolución histomorfológica.

Los resultados demuestran el efecto antiinflamatorio del láser de He-Ne en las artropatías agudas y crónicas inducidas por cristales de HP y PFCa en ratas, demostrado por la disminución de los niveles plasmáticos incrementados de fibrinógeno, L-citrulina, ON y nitrotirosina, su evolución histológica y sin encontrar diferencias en los niveles de fibrinógeno comparando con el efecto de AINEs.

Se estudió el efecto del láser de He-Ne en un modelo experimental de **miopatía** inducida a través de inyecciones de adrenalina, determinando biomarcadores inflamatorios y de estrés oxidativo: fibrinógeno, ON, L-citrulina y nitrotirosina, el análisis histológico de músculo y mitocondrias; y actividad enzimática mitocondrial.

Se utilizaron 56 ratas hembras distribuidas en 7 grupos: control, injuriado, 2 grupos injuriados y tratados con una y dos dosis de láser de He-Ne, un grupo solo irradiado con láser de He-Ne, otro grupo inyectado solamente con solución fisiológica y un grupo inyectado con adrenalina y sacrificado a los 7 días sin tratamiento alguno. La miopatía se indujo por inyecciones musculares de adrenalina (0.05mg/rata/día) en un mismo punto durante 5 días. El tratamiento con láser de He-Ne se realizó durante 7 días consecutivos sobre la misma zona afectada con una dosis diaria en un grupo y con dos dosis diarias en otro grupo.

Los biomarcadores en el grupo con miopatía inducida mostraron un incremento significativo de fibrinógeno y L-citrulina ($p < 0.001$), y ON y nitrotirosina ($p < 0.01$) comparando con el grupo control y grupos injuriados y tratados con láser de He-Ne. Resultados correlacionados con la evolución histológica.

Los resultados demuestran el efecto antiinflamatorio del láser en miopatías inducidas con inyecciones de adrenalina demostrado por la disminución de los niveles de fibrinógeno, L-citrulina, nitrotirosina y ON, correlacionado con la evolución histomorfológica evidenciada en los grupos tratados con el láser de He-Ne, disminuyendo notablemente los grados de alteración mitocondrial del III y IV a I y II. El número de mitocondrias se modificó significativamente por los diferentes

tratamientos y se evidenció un aumento de la actividad enzimática mitocondrial de los complejos I y III en los grupos injuriados y tratados con láser de He-Ne, pudiendo inferirse un posible aumento de la síntesis de ATP.

En ambos modelos experimentales de artropatía y miopatía fue demostrado el efecto antiinflamatorio del láser de He-Ne.

SUMMARY

Microcrystalline arthropaties are inflammatory pathologies induced by a cellular reaction to the deposit of crystals in the joints; they result from the combination of systemic and local factors. Myopathies are characterized by the abnormal condition of the skeletal muscles characterized by weakness, consumption and histological changes; these have multiple causes and they bring about problems in the muscular tone and contraction with different degrees of severity, such as the "inflammatory myopathies" triggered not only by endogenous but also exogenous factors.

In the search of an anti-inflammatory therapy free of the adverse effects caused by the NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drug), it is proposed a treatment with a low-power laser, such as the Heli um- Neon (He-Ne).

The anti-inflammatory effect of the He-Ne laser was studied in experimental models of **artrophaties** induced by Hydroxyapatite crystals and calcium pyrophosphate in laboratory rats, in different periods of time, determining plasma inflammatory markers and of oxidative stress: fibrinogen, L-citrulline, nitric oxide (NO) and nitrotyrosine, histomorphologic study and comparison with NSAIDs.

Female rats were used (120), distributed in 15 groups. The artrophaty was induced by intraarticular injection of 2mg of Hydroxyapatite crystals or calcium pyrophosphate in the back limbs. In one group crystals were injected during a period of three consecutive days and in another group during two weeks (every other day). The He-Ne laser treatment was carried out for 3 consecutive days on the affected joints in the first group and for 5 days in the second group. The treatment with NSAIDs: 1.25mg/day/rat of diclofenac and meloxicam; and 0.05mg/day/rat of celecoxib and rofecoxib individually in three occasions every 24 hours after injecting Hydroxyapatite. The histology was performed with optical microscopy. The determination of markers was done with spectrophotometry; and ANOVA -Fisher test ($p < 0.05$) was used.

The indicators in the groups suffering from arthritis induced with Hydroxyapatite or calcium pyrophosphate in three days or two weeks showed a significant increase of fibrinogen and L -Citrulline ($p < 0.001$); of NO when compared to the control group and to the injected group and treated with laser

($p < 0.02$); and of nitrotyrosine when making a comparison between the group with arthritis and the group which was later treated ($p < 0.01$). Comparing the fibrinogen levels of the rats with arthritis induced by Hydroxyapatite with the control group and the arthritics treated with NSAIDs or laser, $p < 0.01$ was observed. Results correlated, in part with histomorphological evolution.

The results show the anti-inflammatory effect of the He-Ne laser in acute and chronic arthropathies induced by Hydroxyapatite crystals and calcium pyrophosphate in rats, evidenced by a decrease in the increased plasma levels of fibrinogen, L-citrulline, NO and nitrotyrosine, by its histological evolution and without finding differences in the levels of fibrinogen compared to the NSAIDs effect.

The effect of the He-Ne laser was studied in an experimental model of **myopathy** induced through injections of adrenaline, determining in this way, inflammatory biomarkers and of oxidative stress: fibrinogen, NO, L-citrulline and nitrotyrosine, the histological analysis of the muscle and mitochondria and mitochondrial enzymatic activity.

Female rats were used (56) distributed in 7 groups: control, injured, 2 injured groups treated with one and two doses of He-Ne laser, one group only radiated with laser He-Ne, another group only injected with physiological salt solution and one group injected with adrenaline and killed after 7 days without any treatment. The myopathy was induced by muscular injections of adrenaline (0.05 mg/rat/day) on the same spot during 5 days. The He-Ne laser treatment was carried out during 7 consecutive days on the same affected muscular area applying one daily dose to one group and two daily doses to another group.

Biomarkers in the group with induced myopathy showed a significant increase in fibrinogen y L-citrulline ($p < 0.001$) y NO and nitrotyrosine ($p < 0.01$) compared to the control group and injured groups treated with He-Ne laser. Results correlated to the histological evolution.

The results show the anti-inflammatory effect of the laser in myopathies induced with adrenaline injections demonstrated by a decrease in the levels of fibrinogen, L-citrulline, nitrotyrosine and NO, correlated with the histomorphological evolution evidenced in the groups treated with He-Ne laser, significantly diminishing the levels of mitochondrial alteration of III and IV to I and II. The

number of mitochondria was significantly affected by the different treatments. An increase in the mitochondrial enzymatic activity of complexes I and III in the injured groups and treated with He-Ne laser was evidenced, what could be inferred as a possible increase in the synthesis of ATP.

The anti-inflammatory effect of the He-Ne laser was proved in both experimental models of arthropaty and myophaty.

INTRODUCCION

El Fenómeno Inflamatorio

Los procesos inflamatorios son la respuesta defensiva del organismo frente a un agente agresor. El objetivo principal del mismo es liberar al organismo de la causa de agresión y reparar la lesión tisular. La inflamación surge de una reacción del tejido conjuntivo vascularizado ante una lesión celular, cuyos orígenes pueden ser exógenos o endógenos (1).

El vocablo “inflammationis” hace referencia a la acción de inflamarse, o lo que es lo mismo se “enciende en llamas” (2).

Aurelio Cornelio Celso, en su obra *De re medica* o *De medicina* en el siglo I D. C. determinó los signos cardinales de la inflamación en: rubor, calor, dolor y tumor.

Rudolf Virchow, en el siglo XIX señaló el quinto signo, que lo definió como impotencia funcional, completando así los cuatro previamente enunciados por Celso (1).

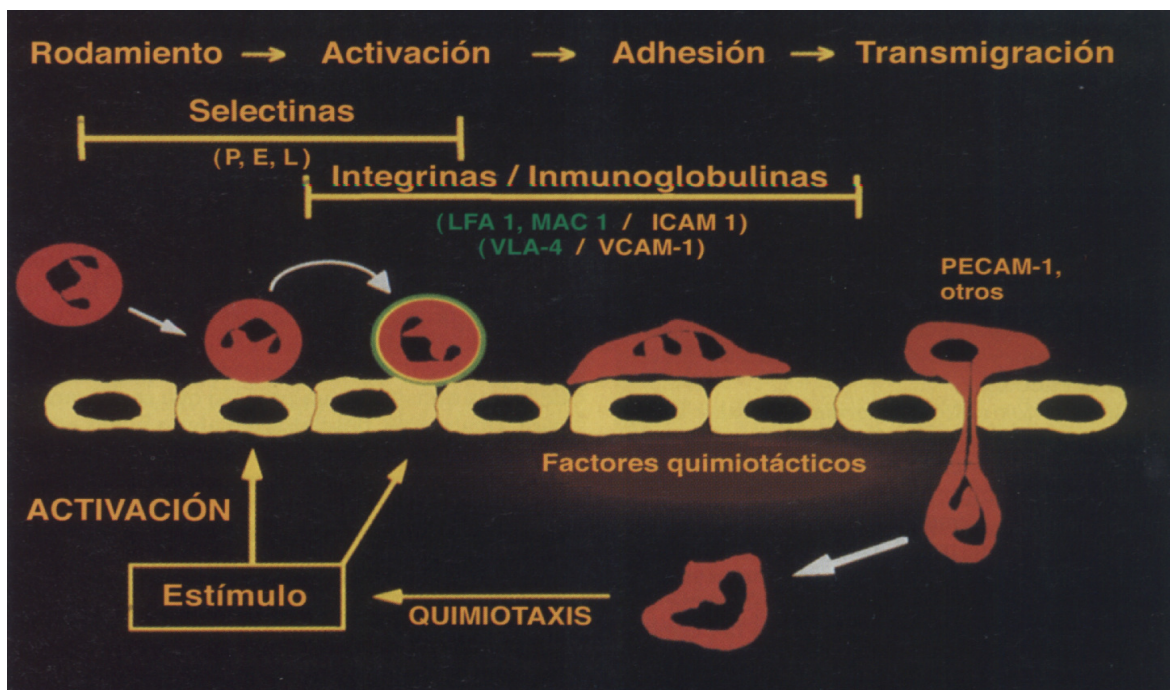
El **proceso inflamatorio**, caracterizado por su carácter multifactorial y su gran complejidad, ha sido siempre un tema al que la comunidad científica internacional le ha prestado particular atención. Múltiples son las enfermedades en cuya fisiopatología se encuentran asociados eventos característicos de la reacción inflamatoria, aumentando el número de especies intermediarias que se descubren asociadas a sus mecanismos y que se consideran vinculadas a la etiología de muchas enfermedades. Por esta y otras razones, estudiar los procesos inflamatorios resulta un hecho imprescindible y necesario con gran repercusión en el campo terapéutico.

La inflamación se divide en dos tipos de procesos: agudo y crónico. El primero tiene un comienzo rápido, de segundos a minutos, y es de duración corta, de minutos a días; sus principales características son la exudación de líquido y proteínas plasmáticas, que producen edema y la migración de leucocitos, especialmente neutrófilos. La inflamación crónica, es de duración mas larga, histológicamente se encuentra y fibrosis y necrosis tisular (1).

En el desencadenamiento del fenómeno inflamatorio ocurren dos acontecimientos: a) intravascular y b) extravascular.

a) Los fenómenos intravasculares son la respuesta frente a un estímulo, el cual desencadena una serie de fenómenos tales como el rodamiento de los leucocitos activados por las selectinas, que generan posteriormente la activación de los polimorfonucleares a través de las integrinas, se desencadena la adhesión a la pared vascular por los mediadores ICAM 1 y VCAM 1 y finalmente se produce la transmigración vascular por presencia de factores tales como el PECAM 1 (1, 3).

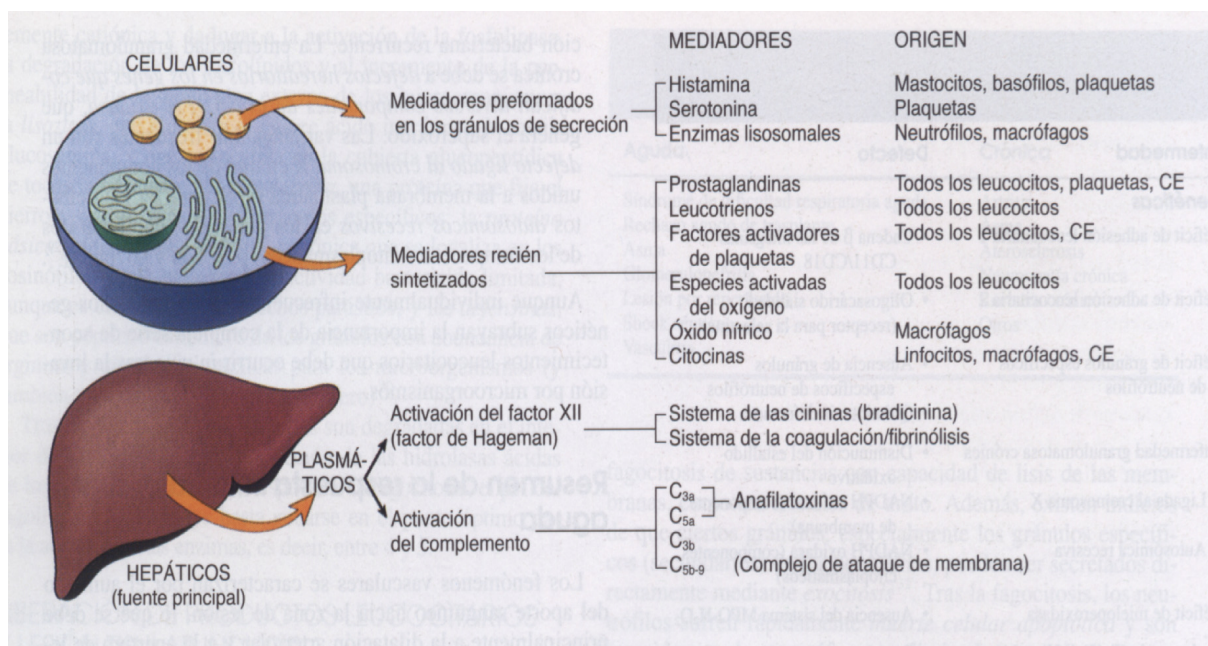
b) A partir de aquí, los leucocitos desencadenan un proceso inflamatorio extravascular como consecuencia de la migración a través del endotelio, llamada diapédesis, lo que ocurre principalmente en las vénulas, y concomitantemente al aumento de la permeabilidad vascular. Luego de penetrar en el tejido conectivo y extravascular los leucocitos son capaces de adherirse a la matriz extracelular por medio de las integrinas. A continuación se produce la quimiotaxis, locomoción de los leucocitos hasta el sitio de la lesión (**Fig. 1**).



Todos los procesos que conllevan a desencadenar la inflamación están regulados por mediadores químicos, cuyos orígenes pueden ser celulares o plasmáticos. Los primeros tienen su origen en los leucocitos, mastocitos, y plaquetas, existiendo sustancias que se encuentran en gránulos de secreción y en

su interior se hayan mediadores químicos como la histamina, la serotonina y enzimas lisosomales. Los agentes de reconocimiento mas reciente son las prostaglandinas, los leucotrienos, los factores de activación de plaquetas, óxido nítrico y sus derivados, y las citocinas (2).

Los factores de origen plasmático tienen como productor principal el hígado. Allí se observan dos vías, la activación del sistema de complemento y del factor de coagulación XII o de Hageman, que actúa a su vez sobre el sistema de las cininas y el sistema de coagulación y fibrinólisis (1) (**Fig. 2**).



caliceína para formar luego bradicinina o actuar sobre el sistema fibrinolítico que produce plasmina, el cual a su vez actúa sobre el sistema del complemento activando el C3 o sobre la fibrina. Al estar activado el factor de Hageman desencadena la cascada de coagulación, como otra alternativa llegando a producir al final del camino **fibrinógeno** (**Fig. 3**).

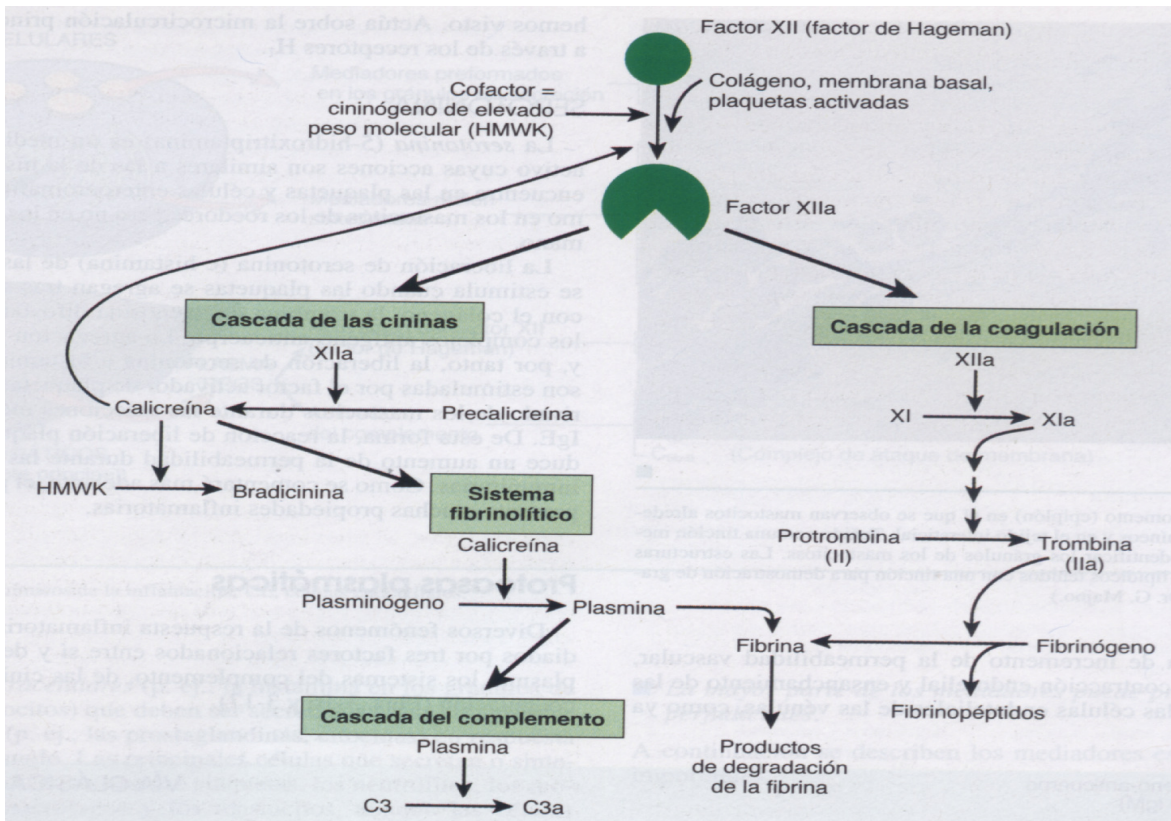


Fig. 3. Factores plasmáticos que intervienen en la inflamación (1).

Las respuestas a la inflamación aguda se caracterizan por aumentar la concentración de ciertas proteínas plasmáticas, conocidas como proteínas de fase aguda, entre ellas fibrinógeno y proteína C reactiva, usualmente medidas como marcadores de procesos inflamatorios (4).

Las condiciones que comúnmente conducen a un cambio sustancial en las proteínas de fase aguda (PFA) son: infección, trauma, cirugía, quemadura, tejido

infartado, causas inmunológicas e inflamación inducida por cristales. Los mediadores químicos llevan el nombre de citoquinas, siendo estos de origen polipeptídico y su función es la comunicación intercelular. Las citoquinas asociadas a la inflamación son las interleuquinas (IL), el factor de necrosis tumoral α (TNF α), y el interferón, las que son producidas por una variedad de células específicas, pero su fuente más importante son los macrófagos y monocitos de los sitios de inflamación (5).

La respuesta de tipo inespecífica de la inflamación no siempre tiene un carácter protector; puede ser perjudicial como en las enfermedades crónicas cuya característica principal es la presencia de monocitos, linfocitos y plasmocitos. La inflamación granulomatosa es inespecífica, típica de la respuesta hística suscitada, entre otras causas por la presencia de cuerpos extraños, predominan

en ella los macrófagos activados, cuyas acumulaciones nodulares forman granulomas y células gigantes multinucleadas (1).

Las Artropatías

Las **artropatías microcristalinas** constituyen patologías inflamatorias inducidas por reacción celular al depósito de cristales en las articulaciones. Pueden producir lesión gradual del cartílago y del hueso, favoreciendo procesos degenerativos o lesiones destructivas de la articulación (artritis) o extraarticular (periartritis). Estas manifestaciones clínicas comúnmente se expresan en este grupo de patologías, también denominadas “enfermedades por cristales” (6).

La aplicación del microscopio de luz polarizada al análisis del líquido sinovial, que es el fluido lubricante secretado en el interior de las articulaciones (7), permitió identificar la presencia de **microcristales** de ácido úrico en los derrames sinoviales de pacientes gotosos. A partir de este descubrimiento se comenzó a experimentar inyectando cristales en articulaciones de animales, con el objetivo de obtener un modelo experimental de inflamación aguda (8).

El uso de técnicas como la microscopía electrónica, el análisis de los elementos químicos por dispersión de energía y la difracción de rayos X, han confirmado la participación de las distintas clases de microcristales en las artritis o las periartritis agudas y crónicas, las cuales provocan en el animal y en el hombre una reacción inflamatoria similar. Entre los cristales más conocidos causantes de artropatías se encuentran: el urato monosódico en la gota, el pirofosfato cálcico dihidratado en la condrocalcinosis, la hidroxiapatita en la enfermedad de las calcificaciones múltiples o en el reumatismo por hidroxiapatita (9, 10).

La artropatía por depósito de **pirofosfato cálcico**, también denominada **condrocalcinosis** (calcificación del cartílago articular), se localiza sobre todo en el cartílago de las rodillas, pubis y muñecas. Puede producir molestias o dolor persistente en la articulación afectada e incluso puede desencadenar brusca inflamación con intenso dolor, calor y dificultad para mover la articulación. Estos ataques son similares a los producidos por la gota, por ello también se han denominado ataques de **seudogota**. El origen de esta patología probablemente esté relacionado con una mayor actividad metabólica de los condrocitos, los que

generan mayor cantidad de pirofosfato que en los individuos normales. Este exceso lleva a la formación de cristales en el espesor del cartílago, los que eventualmente son liberados a la cavidad articular, siendo estas sustancias químicas muy irritantes. Desencadenan una intensa reacción inflamatoria llamada **artritis**, que significa articulación inflamada. Tales calcificaciones en el interior del cartílago articular pueden favorecer su deterioro y desgaste causando **artrosis (osteoartritis)**. Con frecuencia los cristales también se depositan en estructuras paraarticulares, como la cápsula sinovial, los tendones o los ligamentos (11, 12).

La enfermedad por depósito de cristales de **hidroxiapatita** es reconocida como una enfermedad sistémica de etiología desconocida. Causa el depósito de cristales en la región paraarticular y/o intraarticular. La manifestación clínica de esta patología es muy parecida a la condrocalcinosis y, como en ésta, no todos los pacientes son sintomáticos. Puede haber distribución de calcificaciones mono o poliarticular. Cuando el depósito es intraarticular puede provocar la destrucción del cartílago (13, 14).

La hidroxiapatita es un componente natural del hueso, pero cuando se desprende y deposita en tejidos blandos puede ocasionar sinovitis aguda. Tiene un rol preponderante en la respuesta inflamatoria y causa deterioro progresivo del cartílago articular observado en la osteoartritis (6, 14) (**Fig. 4**).

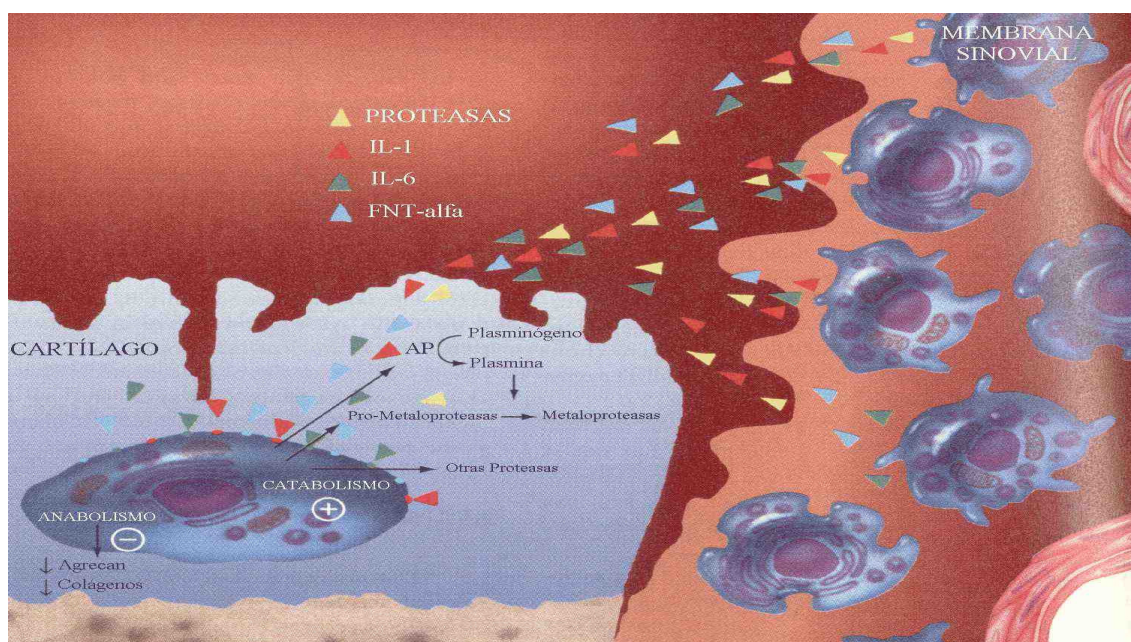


Fig. 4. Reacción inmunoquímica de la artropatía (15).

Una vez que los cristales han penetrado en la cavidad articular, son fagocitados por los leucocitos polimorfonucleares que liberan enzimas lisosomales, como colagenasas y proteasas, que serían responsables de la inflamación articular. Los cristales activan los macrófagos induciendo la síntesis de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 y la TNF α , las que solas o asociadas pueden estimular la producción de enzimas preteolíticas, como las prostaglandinas, las proteínas de fase aguda y los radicales superóxidos, los cuales crearán así un mecanismo de retroacción positivo del **proceso inflamatorio** (11).

Ha sido demostrado en modelos animales, y en enfermedades inflamatorias humanas, que en la respuesta inflamatoria participaría además el **óxido nítrico (ON)**, radical libre diatómico que tiene un importante rol en procesos fisiológicos normales y en estados patológicos (1).

El líquido sinovial de las articulaciones humanas sanas contiene niveles muy bajos de ON. En el líquido sinovial procedente de pacientes con artrosis o artritis reumatoidea hay altas concentraciones de ON (16).

De todos los tejidos que forman parte de una articulación, el cartílago es el que tiene mayor potencial para sintetizar ON. El cartílago normal no lo produce ni expresa la enzima que lo genera, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (16). En plasma de pacientes con artritis inflamatoria los niveles de ON están incrementados (17).

El ON se sintetiza a partir de L-arginina en una reacción equimolar con O₂, NADPH y con la producción de **L-citrulina**. Entre los eventos que marcan en forma indirecta una respuesta sobre la producción de ON está la cuantificación del aminoácido L-citrulina (**Fig. 5**).

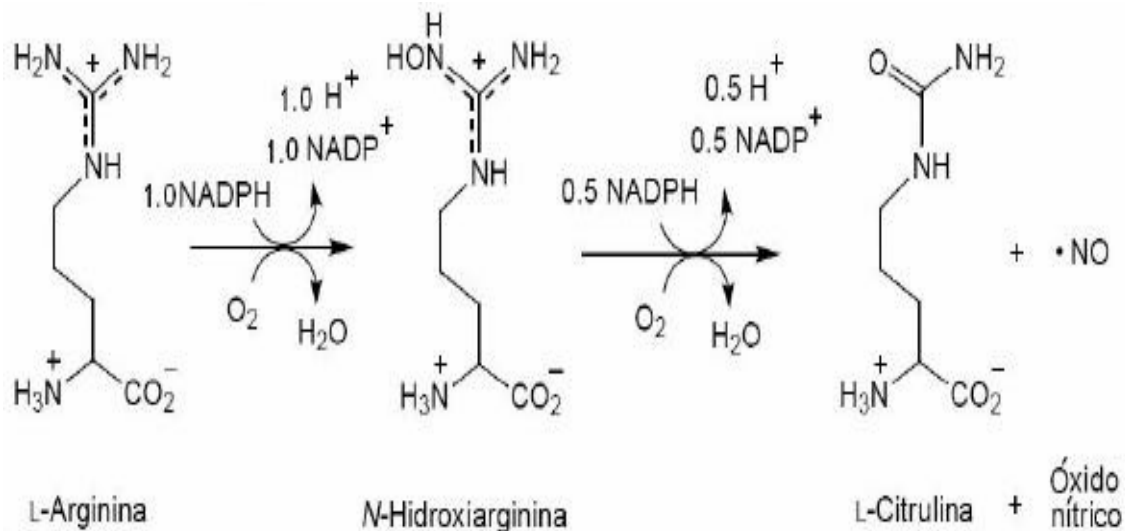


Fig. 5. Reacción química de la formación de ON y L-citrulina (21).

El ON es un factor que favorece la degradación del cartílago articular (16) y se han encontrado altos niveles de L-citrulina en líquido sinovial y en suero de pacientes con patologías reumáticas. Se han encontrado además, altos niveles de L-citrulina en suero de pacientes con patologías inflamatorias (18, 19). Ha sido demostrado que el ON tiene un importante rol en procesos fisiológicos normales y en estados patológicos (17).

Numerosas investigaciones han demostrado que el daño oxidativo debido a la sobreproducción de ON y otras especies reactivas del oxígeno (EROs) pueden estar implicadas en la patogénesis inflamatoria (20).

La presencia de ON en sistemas biológicos conduce a la formación de especies reactivas del nitrógeno (RNS), tales como el peroxinitrito, que reacciona rápidamente con residuos de tirosina de las proteínas, para formar **nitrotirosina**.

A causa de la corta vida de los reactantes naturales, este metabolito no puede ser medido directamente en una muestra de cartílago. Por ende, la evidencia de un producto de reacción de ROS y ON es la nitrotirosina (22), ya que permite valorar el efecto tóxico del ON (20).

La nitrotirosina ha sido encontrada en tejidos y líquidos sinoviales de articulaciones inflamadas de pacientes con artritis y artrosis (20, 23, 24), en tejidos de pacientes ancianos (20) y en suero de pacientes en estadio temprano de artritis reumatoidea (25).

La correlación positiva entre la expresión de nitrotirosina y las variables de activación y daño de la enfermedad demuestra que especies nitrogenadas y oxigenadas pueden estar comprometidas en la destrucción articular (26).

Aunque los **modelos experimentales de inflamación** no pueden reproducir satisfactoriamente los reumatismos inflamatorios y degenerativos humanos, son herramientas valiosas e indispensables para esclarecer entre otras cosas el comportamiento metabólico de las células intervinientes, los mediadores y/o moduladores de la respuesta inflamatoria in vivo, así como también permiten también brindar una orientación terapéutica y apuntan al desarrollo y la efectividad de nuevos tratamientos antiinflamatorios (27).

Las Miopatías

El término **miopatía** se define como el estado anormal del músculo esquelético caracterizado por debilidad, consunción y cambios histológicos.

La “enfermedad del tejido muscular” puede originarse por múltiples causas y ocasionar problemas con el tono y la contracción de los músculos esqueléticos, desde rigidez (miotónia) hasta debilidad, con diferentes grados de severidad (1).

Existen distintos tipos de miopatías, entre ellas: inflamatorias, distales, miotónicas, congénitas, mitocondriales, metabólicas, distróficas y por parálisis periódicas primarias.

Entre las miopatías, la polimiositis y la dermatomiositis se consideran “miopatías inflamatorias idiopáticas” (1).

El **tejido muscular** se caracteriza por poseer conjuntos de largas células especializadas, dispuestas en haces paralelos, su función principal es la contracción a cargo de dos tipos de miofilamentos: finos y gruesos; ambos ocupando la mayor parte del volumen del citoplasma, llamado sarcoplasma. Las células musculares contienen una gran cantidad de filamentos contráctiles alineados que utilizan energía con el único propósito de producir trabajo mecánico (28).

En el tejido **muscular estriado esquelético** las células exhiben estriaciones transversales visibles con el microscopio óptico. Las fibras

musculares se clasifican en rojas, blancas e intermedias reflejando el contenido de mioglobina y la cantidad de mitocondrias con sus complejos constitutivos de citocromos transportadores de electrones (según la actividad funcional del músculo). Estos complejos son indispensables para que, en la fosforilación oxidativa se produzca **adenosina trifosfato (ATP)**, la fuente de energía del músculo (28).

El aporte energético es indispensable para que el músculo cumpla su función de contracción. La energía es generada por las **mitocondrias**, organelas subcelulares que producen la mayoría del ATP de las células aeróbicas (28).

Las Mitocondrias

Las **mitocondrias** son abundantes en las células que generan y consumen gran cantidad de energía, como las células musculares estriadas. Se ubican en los espacios intermiofibrilares, poseen su propio genoma, aumentan su cantidad por división y sintetizan algunas de sus proteínas estructurales y sus propios ribosomas. Otras proteínas mitocondriales son codificadas por el DNA nuclear. La cantidad, forma y estructura interna son características de los tipos celulares específicos. Pueden teñirse específicamente por medio de procedimientos histoquímicos que detectan algunas de sus enzimas constitutivas, como las que intervienen en la síntesis de ATP y en el **transporte de electrones**. Es un compartimento intracelular de importancia fundamental para el metabolismo celular. Aumentan su cantidad por división durante toda la interfase y sus divisiones no están sincronizadas con el ciclo celular. Pueden tanto cambiar de ubicación como sufrir modificaciones temporales en su forma. Pueden compararse con generadores de energía móviles que migran de una región celular a otra para proveer la energía necesaria. Según la ubicación topográfica hay dos tipos de mitocondrias: periféricas o subsarcolémicas y centrales (28, 29).

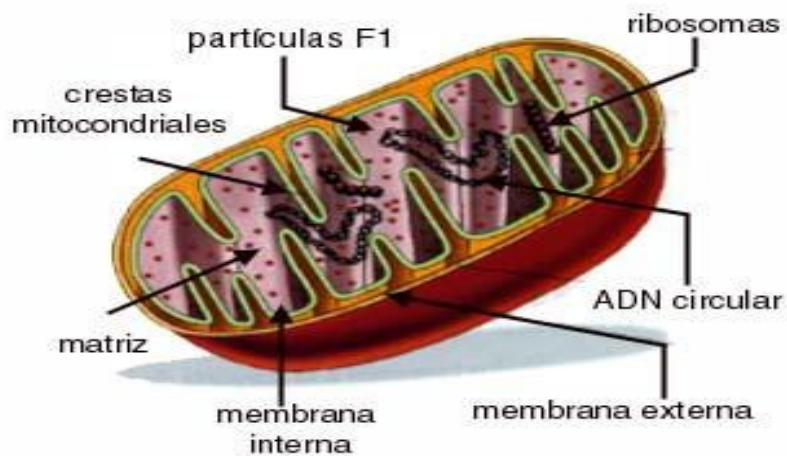


Fig. 6. Esquema de la mitocondria (30).

También hay dos poblaciones bioquímicamente distintas que se corresponden con las poblaciones antes mencionadas, probablemente según el estado de acoplamiento de la fosforilación oxidativa (28, 29).

La mitocondria está integrada por membranas y posee distintos compartimientos. La membrana externa mitocondrial (**MEM**), la membrana interna mitocondrial (**MIM**), la matriz (**Matriz**) y el espacio intermembranal (**EIM**). Estos compartimientos son diferentes en cuanto a su composición, su electroquímica y su estado de óxido reducción (**Fig. 6**) (28).

La membrana que forma las crestas MIM contiene proteínas con tres funciones principales: 1) producir las reacciones de oxidación reducción de la **cadena respiratoria del transporte de electrones**, 2) sintetizar ATP y 3) regular el transporte de metabolitos hacia adentro y hacia afuera de la matriz mitocondrial (28).

Los complejos de la cadena respiratoria están embebidos en la MIM. La cadena consta de cuatro complejos enzimáticos (del I al IV), la coenzima Q (ubiquinona), la citocromo c oxidasa (cit c) y la ATP sintasa, que se conoce como complejo V. El cit c es el único miembro de la cadena respiratoria que no está embebido dentro de la MIM. Estos complejos están funcionalmente colocados en un arreglo jerárquico electroquímico basados en sus potenciales redox. La cadena respiratoria posee un amplio espectro de potenciales redox que varía desde -280

mV (complejo I) hasta +250 mV (complejo IV). El ingreso de los electrones a la cadena puede ser a través del complejo I o del II por la oxidación del NADH o el FADH₂, respectivamente. Permite que fluyan por la cadena hasta el complejo IV en donde reducen el O₂ a H₂O. Acoplado al flujo de electrones, los protones son bombeados desde la matriz al EIM (31).

La MIM es impermeable a los protones, pero estos reingresan a la matriz a través de la enzima ATP sintasa. El óxido nítrico compite con el O₂ por el sitio de unión en el complejo IV y el consumo de O₂ se realiza de una manera reversible (31) (**Fig. 7**).

En el espacio intermembranoso se encuentran las enzimas específicas que utilizan el ATP generado en la membrana mitocondrial interna (creatincinasa, adenilatocinasa y citocromo c). La matriz contiene las enzimas del electrónico de la membrana mitocondrial interna. Las mitocondrias también regulan la concentración de ciertos iones de la matriz citoplasmática. La matriz contiene DNA mitocondrial, ribosomas y RNA_t. La membrana externa está en íntimo contacto con el citoplasma (28).

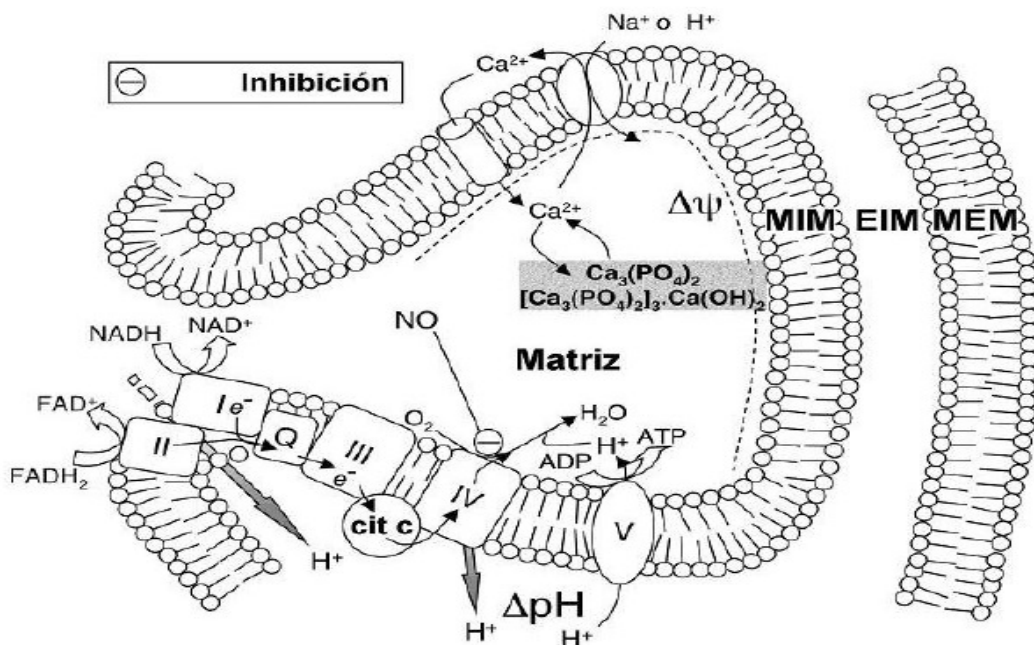


Fig. 7. Distribución de los complejos enzimáticos en la MIM (31).

La Cadena Respiratoria Mitocondrial

La Cadena Respiratoria Mitocondrial (CRM) se encuentra formada por cinco complejos, cada uno tiene mayor afinidad por los electrones que su predecesor, a su vez, los electrones van perdiendo energía a medida que recorren la cadena (31). Los complejos enzimáticos son: NADH ubiquinona reductasa o **complejo I**, succinato ubiquinona reductasa o **complejo II**, ubiquinona citocromo c oxido reductasa o **complejo III** y citocromo c oxidasa o **complejo IV**. La energía disponible de la transferencia de electrones a tres sitios de unión en estos complejos es conservada en forma de gradiente protónico. Un complejo ATP sintasa o complejo V finalmente utiliza este gradiente para formar ATP a partir del ADP (32) (**Fig. 8**).

a) **Complejo I**. NADH-deshidrogenasa. NADH-coenzima Q reductasa. NADH-ubiquinona oxidoreductasa. El Complejo I es una bomba de protones alimentada por la energía del proceso de transferencia de electrones.

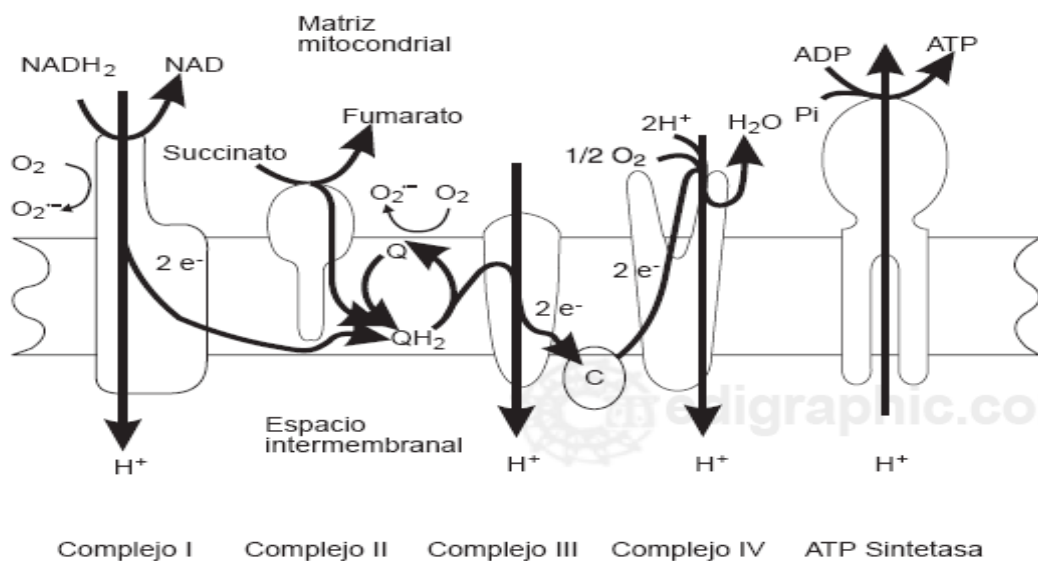


Fig. 8. El esquema muestra el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria, la traslocación de protones por los complejos I, III, IV y la síntesis de ATP, además de los sitios que se han identificado como formadores del radical superóxido: el complejo I y la interfase entre el ciclo Q y el complejo III (33).

Este complejo produce además una separación de cargas a ambos lados de la membrana, dejando el interior cargado negativamente con respecto al

espacio intermembrana al pasar los H^+ (**Fig.9**). Así, el proceso global que tiene lugar es el siguiente:

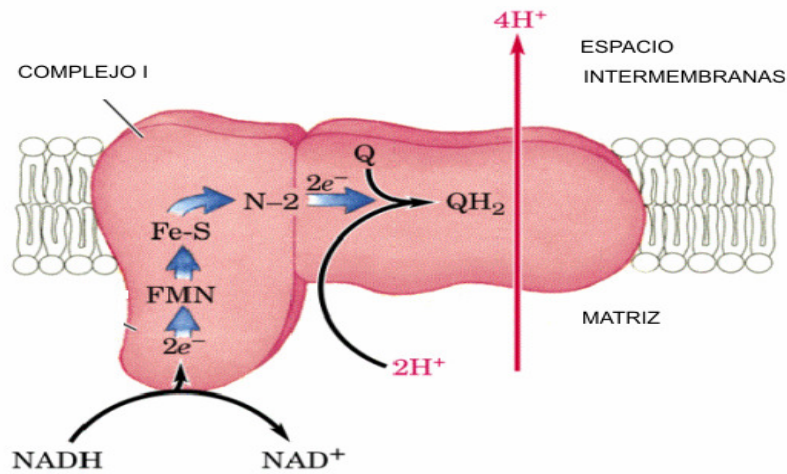


Fig. 9. Complejo I. La proteína presenta forma de L, con uno de los brazos insertado en la membrana y el otro extendiéndose hacia la matriz mitocondrial (34).

La NADH deshidrogenasa puede aceptar también electrones del NADPH, aunque con poca eficiencia. Normalmente se traspasan los equivalentes de reducción del NADPH al NAD^+ mediante una transhidrogenasa (34).

b) **Complejo II.** Succinato deshidrogenasa. Succinato-coenzima Q reductasa. Es un enzima del ciclo del ácido cítrico que, a diferencia del resto de las enzimas de esta cadena, se encuentra localizada en la membrana interna de la mitocondria hacia el lado de la matriz. Utiliza como coenzima el FAD y su misión es transferir electrones directamente desde su $FADH_2$ a los otros transportadores de la membrana. Contiene también centros sulfoférricos, que son los que finalmente transfieren los electrones desde el $FADH_2$ a la CoQ, y un citocromo *b*, que no se encuentra en el paso de electrones pero protege frente a la formación de EROs (34) (**Fig. 10**).

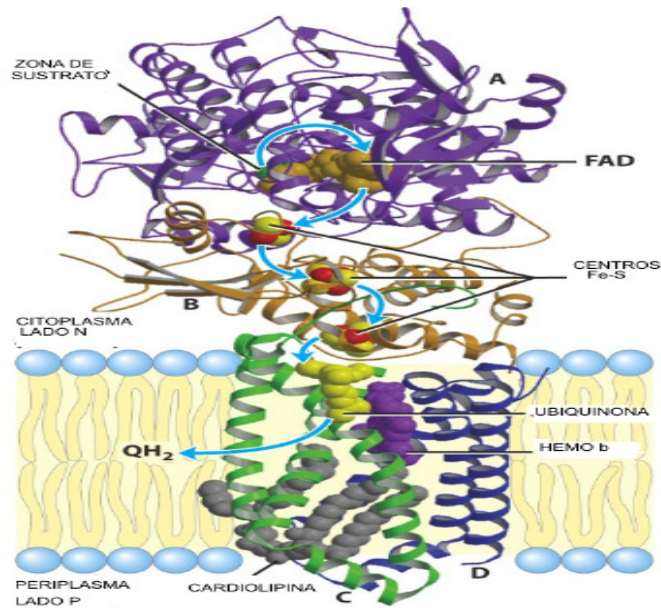


Fig.10. Estructura del Complejo II resuelta por difracción de rayos X. Se observan centros sulfoférricos, los que transfieren los electrones desde el FADH₂ al CoQ, y un cit.*b*, no se encuentra en el paso de electrones, protege la formación de EROs (34).

c) **Complejo III.** Citocromo *c*-coenzima Q oxidoreductasa. Proteína integral de membrana que resulta difícil de separar de ella y que acopla el transporte de electrones desde el CoQH₂ al citocromo *c* con el transporte vectorial de protones desde la matriz al espacio intermembranar. También es conocido como complejo citocromo bc₁ (34) (**Fig. 11**).

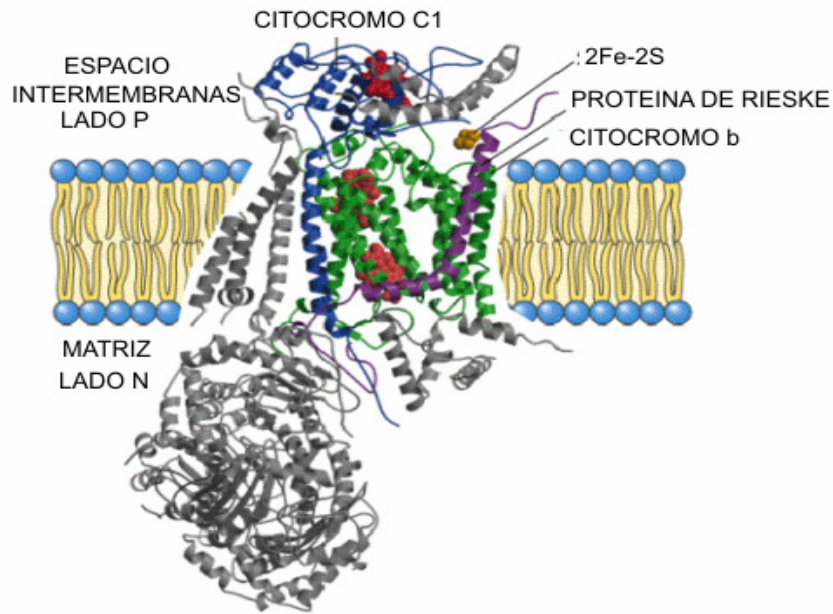


Fig.11. La estructura del Complejo III ha sido resuelta por difracción de rayos-X. En un centro se localizan los cit. b y c, y además la proteína sulfoférrica tipo Rieske (34).

d) **Complejo IV:** Citocromo Oxidasa. Transporta los electrones desde el citocromo *c* al O_2 , reduciéndolo a H_2O , por tanto cataliza la reducción del oxígeno a agua mientras bombea protones de la matriz al espacio intermembrana. Como grupos prostéticos contiene Cu, citocromo *a* y citocromo a_3 . La transferencia de electrones en el CIV va desde el citocromo *c*, al centro CuA, al hemo *a*, al centro hemo a_3 -CuB, y finalmente al O_2 (34).

Por cada cuatro electrones que atraviesan el CIV, la enzima consume cuatro H^+ sustrato de la matriz para convertir el O_2 a $2H_2O$.

El CIV también utiliza la energía liberada en este proceso redox para bombear un protón desde la matriz al espacio intermembrana por cada electrón que se transporta (**Fig. 12**).

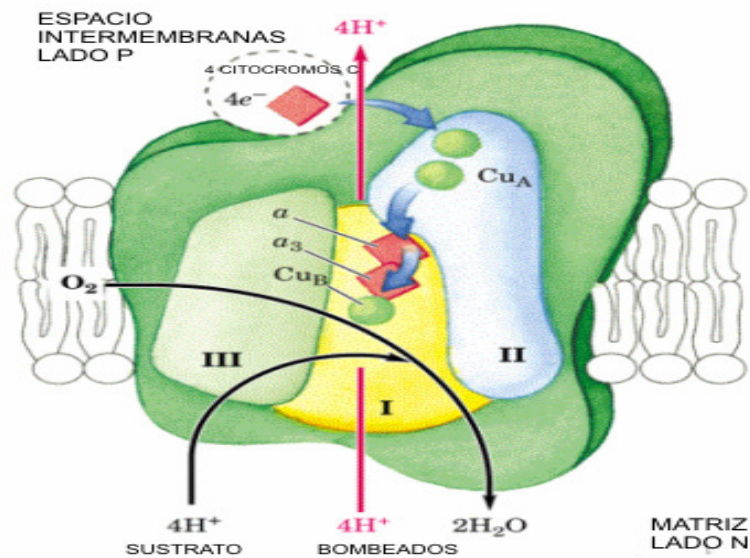


Fig. 12. Estructura del Complejo IV. La reducción de O_2 por cuatro electrones involucra solo centros redox capaces de transferir los electrones de uno en uno, por tanto han de aparecer en el proceso especies intermediarias tales como radicales libres de peróxido o de hidroxilo, que son especies muy reactivas que podrían dañar los componentes celulares. Estos intermedios permanecen fuertemente unidos al CIV, concretamente al hemo a_3 hasta que son completamente convertidos en agua (34).

Las mitocondrias sufren **cambios morfológicos** en relación con su estado funcional y esto es considerado la causa de ciertas miopatías y de un número de desórdenes multisistémicos en humanos. Estas alteraciones en las mitocondrias se caracterizan por cambios morfológicos miofibrilares, reacciones enzimáticas oxidativas anormales, variación en el número y tamaño de mitocondrias, además de configuraciones aberrantes de crestas y variación en su cantidad. La matriz a menudo contiene inclusiones lipídicas o muestra vacuolización. Además como anomalía mitocondrial se encuentran las inclusiones, que son como verdaderos cristales de material proteico en el espacio intracrestal o intermembrana (29).

Estudios experimentales indican que las mitocondrias, como resultado del estrés celular, pueden provocar el inicio de la apoptosis. El principal fenómeno en la muerte celular es la liberación de citocromo c producido por las mitocondrias desde el espacio intermembranoso hacia el citoplasma celular. Este

acontecimiento inicia la cascada de reacciones enzimáticas proteolíticas que conduce a la apoptosis (28, 35).

Se utiliza la técnica de coloración tricrómica modificada de Gomori para demostrar fibras con reacciones enzimáticas oxidativas anormales. Las anomalías morfológicas no distinguen diferentes miopatías mitocondriales y no son indicativas de un defecto metabólico particular (36).

Las mitocondrias son además responsables de una serie de procesos que son tóxicos para la célula, tales como la generación de especies oxidantes o el inicio de los proceso de apoptosis. La CRM, ha sido reconocida como una de las principales fuentes intracelulares de **especies reactivas del oxígeno** (EROs) (32, 33).

La membrana mitocondrial interna presenta la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). El ON producido por esta enzima, puede bloquear la respiración mitocondrial, por lo tanto, la presencia de una NOS mitocondrial sugiere que el ON puede desempeñar, en ciertas circunstancias, un papel fisiológico sobre el control de la respiración y el flujo de electrones (37) (**Fig. 13**).

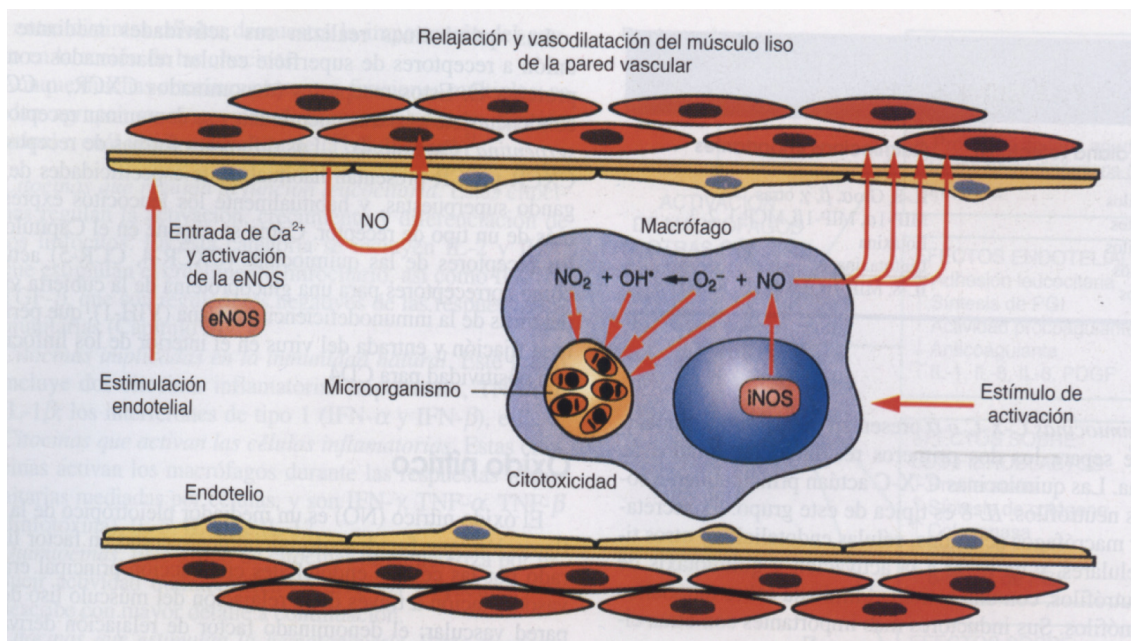


Fig.13. Función vascular del óxido nítrico en la respuesta inflamatoria (1).

Las especies reactivas de oxígeno no neutralizadas por las defensas antioxidantes reaccionan con proteínas, ADN, ARN y lípidos de membranas

celulares determinando bloqueos en pasos del metabolismo celular y disfunción mitocondrial, que conducen al fracaso energético celular produciendo de esa manera el **estrés oxidativo** (38).

Otra fuente de EROs está relacionada a la cupla xantino/xantino oxidasa (oxidadasas catabólicas, presentes en los peroxisomas). La acumulación de hipoxantina y xantina, bajo condiciones anaeróbicas, de isquemia / reperfusión o sea producen deficiencia en la irrigación sanguínea. Luego empobrece la llegada de sangre y, por consiguiente, de oxígeno a un tejido, con posterior reflujo sanguíneo y consecuente afluencia de oxígeno y con bajo contenido energético, puede desembocar en la producción de EROs (39).

En analogía al término “estrés oxidativo” se ha denominado “**estrés nitrosativo**” a la excesiva formación del radical ON[·] y ERNs derivadas del mismo como la nitrotirosina.

Las principales ERNs son ON y el peroxinitrito (ONOO⁻). Este último considerado como uno de los más potentes oxidantes biológicos. Las ERNs pueden dañar y matar células por distintos mecanismos: inactivación de los distintos complejos de la cadena respiratoria, daño a proteínas y a lípidos, inhibición de síntesis proteica o de ADN, depleción de GSH o de ATP (37).

El ONOO⁻ está en equilibrio con una forma activada de estructura desconocida, que reacciona con metionina para dar metilsulfóxido o, en presencia de CO₂, un derivado con actividad nitrante de compuestos aromáticos. La principal fuente de ERNs, en células de mamíferos, es la oxidación enzimática de L-arginina por la ON sintasa (21, 39).

El ON es una molécula de señal ubicua, que funciona en la regulación de distintos procesos en los sistemas nervioso, cardiovascular e inmune. Está asociado a procesos inflamatorios, neurotóxicos y de isquemia/reperfusión. Se ha propuesto que el ON actuaría induciendo la producción mitocondrial de ONOO⁻. Este produciría a su vez la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria (NADH:Ubiquinona reductasa), lo cual tiene un efecto crítico sobre el suplemento de energía en varios tejidos y sobre la producción de EROs. Los efectos del ON sobre la generación de EROs mitocondrial son complejos. La producción de EROs y ERNs inducida por ON y su posterior modulación son iniciados por la reacción entre ON y el ubiquinol llevando a la formación y autooxidación de la

ubisemiquinona. Posteriormente se forma una intrincada red de equilibrios de óxido-reducción, involucrando al ubiquinol, al anión superóxido, al ONOO⁻ y al ON, que cubre un amplio campo en los aspectos regulatorios y protectores contra el estrés oxidativo. El balance final de daño por estrés oxidativo o de protección por defensas antioxidantes en mitocondrias, dependerá del contenido de ubiquinol y de ON en el estado estacionario, del nivel de enzimas antioxidantes y de la extensión de la inhibición inducida en el Complejo I en la membrana mitocondrial (39).

Las células cuentan con una batería de defensas antioxidantes, cuya función es impedir la formación de EROs o neutralizarlas una vez que se han formado. Una parte importante de estas defensas se concentran en la mitocondria, clasificándose en cinco niveles: a) el complejo IV citocromo oxidasa, b) superóxido dismutasa mitocondrial (SODm), c) glutatión peroxidasa (GPx), d) atrapadores de radicales libres como quinonas, α -tocoferol, etc. y e) los mecanismos de reparación genéticos (21, 38, 39).

Además de los mecanismos de protección antioxidante, enzimáticos y no enzimáticos, también contribuyen a paliar el posible daño oxidativo: la fidelidad de las relaciones metabólicas de óxido reducción, la gran compartimentalización celular, la cromatina compacta, la presencia de histonas, y la formación de complejos (39).

Entre las terapias antiinflamatorias más utilizadas para contrarrestar los efectos provocados por las artropatías y miopatías se encuentran los AINEs. En búsqueda de solucionar los efectos no deseados de los mismos se propone la terapia con láser de baja potencia.

Los Fenómenos Fotolumínicos: El Láser

Desde mediados de los años 60, la manipulación de la **energía lumínica** apareció como una alternativa terapéutica. A partir del desarrollo de la tecnología **láser** se abrió un campo nuevo en la interacción de la energía electromagnética con el tejido biológico vivo (40).

El proceso por el cual el **láser de baja energía (LLLT: Low level laser therapy)** estimula las funciones celulares es denominado **fotoestimulación**. Entre los procesos donde más se ha utilizado LLLT como una importante

herramienta, ha sido en el control de la inflamación, reparación de heridas cutáneas, disfunciones neuromusculares, patologías reumáticas, entre otras (41, 42, 43, 44, 45, 46). Desde su inicio, los efectos obtenidos clínicamente apuntaban al láser como una nueva terapia de bajo costo, sin efectos colaterales y bien aceptada por los pacientes. En este sentido podemos encontrar abundantes publicaciones de estudios clínicos utilizando LLLT (47, 48). Sin embargo la falta de estudios y resultados concluyentes sobre la interacción de la energía lumínica a nivel celular y molecular, condujeron en pocos años a la sociedad científica al escepticismo. La diversidad de parámetros láser así como la gran variedad de protocolos y metodologías usadas, hicieron que muchos resultados no se consideraron fiables o que fuera imposible la comparación entre ellos.

Los tejidos biológicos tienen la capacidad de absorber la energía lumínica y transformarla en energía útil para la célula, hecho que se manifiesta principalmente en situaciones de estrés celular. Una radiación puede estimular y/o inhibir un proceso dependiendo del tejido y de los parámetros de irradiación, considerándose esto como acción moduladora (47).

La determinación de los acontecimientos celulares y moleculares de interacción de la energía procedente de láseres rojos como el de **Helio-Neón (He-Ne)** con el sistema artromuscular, sería determinante para el conocimiento y optimización del uso de LLLT en las diferentes especialidades médicas.

En el láser ocurre un proceso de amplificación, capaz de producir emisión **estimulada** de radiación. La amplificación se produce cuando un átomo en estado excitado emite un fotón al recibir otro de sus mismas características (fase, energía y dirección), estimulándolo a emitir dos fotones. Para ello es necesario que un porcentaje alto de átomos esté en estado excitado, lo que se conoce como **inversión de población** y se logra suministrando energía al sistema, proceso llamado **bombeo**. Lo mencionado determina las características del láser:

- **Monocromaticidad:** tiene un solo color, a diferencia de la luz visible que está formada por todo un espectro de longitudes de onda, la luz láser solo tiene una única longitud de onda; por ejemplo, el láser de He-Ne tiene una longitud de onda de 632.8 nm, situada dentro del espectro visible en la banda del rojo.

- **Coherencia:** todas sus ondas están en la misma fase, lo cual produce una enorme cantidad de energía localizada en un punto.

- Direccionalidad: transmisión sin apertura de luz, es decir, no hay divergencia del haz.

Posee además, las restantes propiedades de la luz: se refleja, se refracta, atraviesa medios transparentes y es absorbida. La producción de láser se consigue mediante un medio activo (helio, neón, cobalto, dióxido de carbono, etc.), un sistema de energía y un resonador. Con el aporte de energía externa, las moléculas del medio activo alcanzan un nivel de energía muy alto, nivel que es incrementado por el resonador. Llegado un momento se produce una emisión en forma de fotones que son canalizados por un sistema emisor (49).

Dependiendo de la energía emitida por el láser existen distintos tipos:

- a) De alta energía o fotoablativo (10^6 Watt/cm²).
- b) De mediana energía o de coagulación (10^2 Watt/cm²).
- c) De baja energía o bioestimulante (10^{-3} Watt/cm²).

El Láser de He-Ne

El láser de He-Ne ha sido el de mayor difusión hasta la aparición de los láseres de diodo visibles e infrarrojos. El primero fue construido por Ali Javan en 1961.

El bombeo del láser de He-Ne se realiza por medio de las colisiones que una descarga de electrones producida dentro del gas tiene, fundamentalmente, con los átomos de Helio. La inversión de población en el Neón ocurre debido a colisiones con átomos excitados de Helio. Como resultado de estas colisiones, los átomos de Helio pasan a su estado base y los átomos de Neón pasan a un estado excitado.

La realización de una transferencia de energía entre átomos de Helio y Neón ocurre debido a:

- a) La proximidad de los niveles excitados de energía del Helio y del Neón.
- b) La más elevada presión del helio en la mezcla He-Ne, lo cual también reduce la probabilidad de que la excitación ocurra en la dirección opuesta, es decir Ne a He.

El papel que juega el Helio es el de aumentar la eficiencia del proceso de amplificación. El láser de He-Ne tiene tres estructuras principales:

1) El Tubo de plasma: se compone por uno interno de 2 mm de diámetro y otro externo de 2,5 mm de diámetro, soldado al interno.

El proceso de amplificación láser tiene lugar dentro del tubo interno, que contiene una mezcla de gases: 85-90 % de Helio, y 10-15 % de Neón, en una relación que va de 1:6 a 1:10.

2) La Cavidad Óptica: normalmente es de tipo semi-confocal, compuesta por un espejo plano que refleja aproximadamente el 98 % de la luz - espejo de salida -, y otro espejo cóncavo que refleja el 100 %, con una distancia focal igual a la longitud de la cavidad (**Fig.14**).

3) La Fuente de Alimentación: Un láser de He-Ne que proporciona una potencia de emisión de 1 mW utiliza normalmente una fuente de alimentación de corriente continua de alto voltaje (2.000 V), y debe de ser estabilizada, ya que el láser requiere un suministro constante de electrones.

El medio activo determina las posibles longitudes de onda que pueden ser emitidas por el láser, debidas a las transiciones posibles entre los niveles energéticos del material.

El principio básico operativo del láser es similar en todos los casos, y aunque se generaliza hablando de átomos, en realidad el medio activo puede estar compuesto por átomos, moléculas, iones o semiconductores, en función del tipo de láser (49).

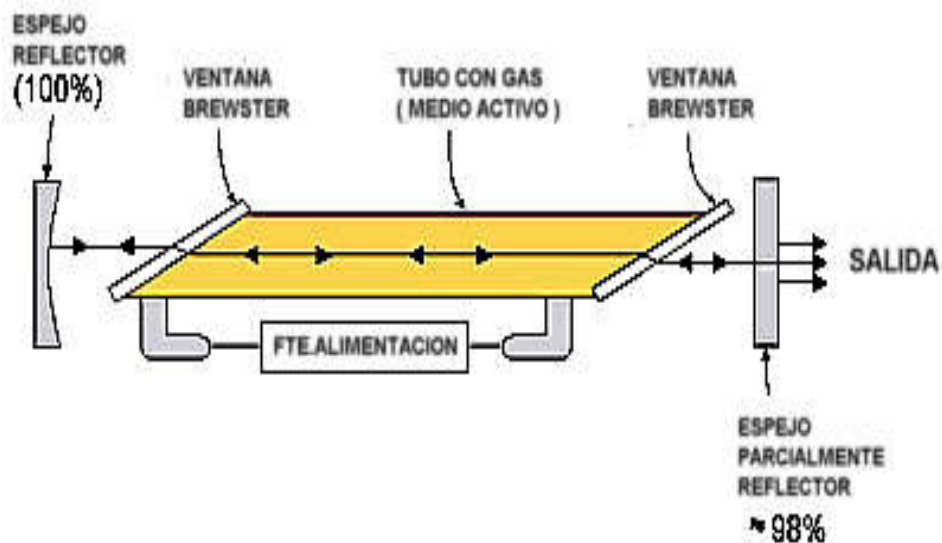


Fig. 14. Estructura de la cavidad de un láser de He-Ne (49).

El medio activo determina las posibles longitudes de onda que pueden ser emitidas por el láser, debidas a las transiciones posibles entre los niveles

energéticos del material. El principio básico operativo del láser es similar en todos los casos, y aunque se generaliza hablando de átomos, en realidad el medio activo puede estar compuesto por átomos, moléculas, iones o semiconductores, en función del tipo de láser (49).

Los principios de LLLT se basan en la existencia de compuestos celulares sensibles a la luz, fotoreceptores componentes de la CRM que absorben los fotones cambiando el potencial de membrana y activan a corto plazo la CRM (50).

Se atribuyen los efectos de la fotoestimulación a la formación de pequeñas cantidades de EROs y antioxidantes posterior a la irradiación, cambiando el estado redox celular, reducen el estrés oxidativo (51), conduciendo a las respuestas biológicas, pudiendo tener un amplio rango de aplicaciones clínicas (52, 53, 54, 55).

Cuando el láser impacta con un tejido, la energía fotolumínica puede tomar varias vías, esto debido a la compleja estructura de los estratos cutáneos (córneo, epidermis y dermis), cada uno con diferentes índices de refracción, éstos pueden presentar cuatro procesos básicos: uno es la **absorción**, la cual se refiere a qué tan lejos es absorbido o transferido el rayo dentro del tejido; otro fenómeno que ocurre es la **reflexión**, este se refiere a si el rayo es reflejado en el tejido y en qué proporción. Una tercera vía es la **dispersión**, entendiéndose este fenómeno como la cantidad de energía fotónica que se dispersa en el tejido. Finalmente puede ocurrir **transmisión**, que se refiere a qué tan lejos es transmitida o irradiada la luz láser a través del punto de impacto en el tejido (**Fig.15**) (56).

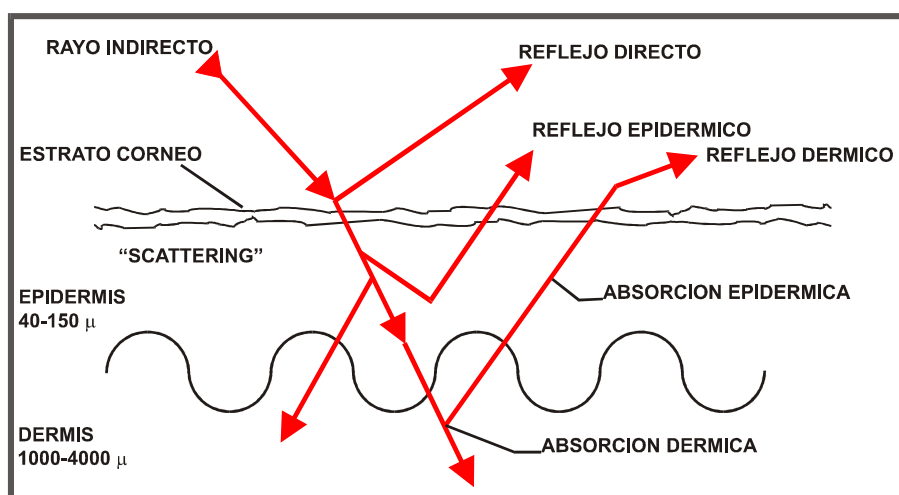


Fig.15. Absorción selectiva de la radiación laser por los tejidos (56).

La mayor parte de los estudios sobre el mecanismo de acción de LLLT se centran en la mitocondria y en las lesiones morfológicas y bioquímicas que se producen en la misma, y como orgánulo responsable de la transducción energética en la célula. Es por ello que nos proponemos investigar el efecto fotobiológico del láser de He-Ne en un modelo experimental de artropatía y miopatía a fin de intentar avanzar en el conocimiento de la interacción del láser en enfermedades artro-musculares. Se valoran las modificaciones en plasma de marcadores inflamatorios, de estrés oxidativo y posibles alteraciones de la estructura histológica. Se contribuye a esclarecer un síntoma evidente de activación o inhibición tanto a nivel de la histomorfometría mitocondrial como de la actividad enzimática de los complejos respiratorios.

OBJETIVOS GENERALES

- Estudiar el efecto del láser Helio-Neón sobre el compromiso osteomioarticular en ratas con procesos inflamatorios inducidos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reproducir en ratas modelos experimentales de:
 - artropatías por cristales y
 - miopatías inflamatorias
- Evaluar el efecto antiinflamatorio del láser de He-Ne a través de la determinación de reconocidos biomarcadores inflamatorios en los modelos experimentales de artropatías y miopatías:
 - Fibrinógeno en plasma
 - Óxido nítrico en plasma
 - L-citrulina en plasma
 - Nitrotirosina en suero
- Comparar los efectos antiinflamatorios del láser de He-Ne y diferentes AINEs en artritis por cristales, a través de la determinación de fibrinógeno en plasma.

- Analizar los posibles cambios histomorfológicos generados por acción del láser de He-Ne en los procesos inflamatorios inducidos.
- Determinar el número promedio y los grados de alteración mitocondrial a través de un análisis ultraestructural histomorfométrico de cada grupo.
- Investigar en que parte de la cadena respiratoria mitocondrial actuaría el láser al interaccionar sobre el músculo esquelético injuriado, a través de la determinación de las actividades enzimáticas de la citrato sintasa y de los complejos I, II, III, y IV de la Cadena Respiratoria Mitocondrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Se utilizaron 168 ratas hembras, cepa Suquía, de 3 meses de edad, endocriadas en el Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, de peso promedio 200 ± 20 g, alimentadas con dieta balanceada para ratas con un mínimo de 17% de contenido proteico.

2. Grupos

a) Artropatías

1-Control (ratas intactas) (n=8).

2-Inyectadas con Hidroxiapatita (HP) durante 3 días consecutivos (n=8).

3-Inyectadas con HP durante 3 días consecutivos y posteriormente tratadas con láser de He-Ne durante 3 días seguidos (n=8).

4-Inyectadas con HP durante 2 semanas (día de por medio) (n=8).

5-Inyectadas con HP durante 2 semanas (día de por medio) y posteriormente tratadas con láser de He-Ne durante 5 días consecutivos (n=8).

6-Inyectadas con Pirofosfato de Calcio (PFCa) durante 3 días consecutivos (n=8).

7-Inyectadas con PFCa durante 3 días consecutivos y posteriormente tratadas con láser de He-Ne durante 5 días consecutivos (n=8).

8-Inyectadas con PFCa durante 2 semanas (día de por medio) (n=8).

9-Inyectadas con PFCa durante 2 semanas y tratadas posteriormente con láser de He-Ne durante 5 días (n=8).

10-Irradiadas con láser de He-Ne durante 5 días consecutivos sobre las articulaciones sin otro tratamiento (n=8).

11-Inyectadas con 0.5 ml de solución fisiológica en articulaciones sin otro tratamiento (n=8).

12-Inyectadas con HP por 3 días consecutivos y tratadas posteriormente con el antiinflamatorio diclofenac por 3 días (n=8).

13-Inyectadas con HP por 3 días consecutivos y tratadas posteriormente con el antiinflamatorio meloxicam por 3 días (n=8).

14-Inyectadas con HP por 3 días consecutivos y tratadas posteriormente con el antiinflamatorio celecoxib por 3 días (n=8).

15-Inyectadas con HP por 3 días consecutivos y tratadas posteriormente con el antiinflamatorio rofecoxib por 3 días (n=8).

b) Miopatías

16-Inyectadas con adrenalina (n=8).

17-Inyectadas con adrenalina y tratadas con una dosis diaria de láser de He-Ne (Adrenalina + IL) (n=8).

18-Inyectadas con adrenalina y tratadas con doble dosis diaria de láser de He- Ne (Adrenalina + IIL) (n=8).

19-Irradiadas solamente con láser de He-Ne (n=8).

20-Inyectadas con solución fisiológica el músculo de los miembros posteriores de las ratas (n=8).

21-Inyectadas con adrenalina y sacrificadas a los 7 días sin tratamiento alguno (n=8).

3. Instrumental

- Microscopio Óptico: Ziess Jena Laboval 4 Binocular.
- Microscopio Electrónico: Leo 906E.
- Espectrofotómetro: Metrolab 1600 Plus.
- Ultraturrax: Janke & Kunkel. Ikalabortechnik Stuafen. Modelo 8
- Ultracentrífuga: Beckman Modelo L-2
- Ultracentrífuga: Eppendorf 5415 R
- Balanza electrónica: Mettler Toledo AB54-S

4. Inducción del proceso inflamatorio articular

Se inyectaron 2 mg de cada cristal por vez, (hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), o pirofosfato cálcico ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), disueltos en 0.05 ml de solución fisiológica en cada articulación de los miembros posteriores, administradas en diferentes tiempos con la intención de producir inflamación aguda: inyectando en 3 oportunidades con un intervalo de 24 hs. entre cada inyección y en otro grupo inflamación crónica: inyectando durante 2 semanas en días alternos en 6 oportunidades (57).

También se realizó la inyección de 0.5ml de solución fisiológica en cada articulación de los miembros posteriores con el fin de descartar un aumento en los parámetros que medimos originados por el solvente.

5. Inducción del proceso inflamatorio muscular

Se inyectaron 0.05 mg/rata/día de adrenalina en músculo de un miembro posterior durante 5 días consecutivos en un mismo punto previamente marcado, en los grupos 16, 17 y 18, induciendo un proceso inflamatorio (miopatía inflamatoria) (58, 59).

La tesis se desarrolló bajo las normas de conducta bioéticas según la guía de cuidados y usos de animales de laboratorio publicadas por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (US National Institute of Health, NIH publication(N°85-23, revised 1996).

6. Tratamiento con Láser de baja potencia

El tratamiento se realizó con un equipo de láser He-Ne, con una longitud de onda de 632.8nm de color rojo y la potencia de 5mW, con un spot de 2 mm de diámetro y la densidad de energía suministrada fue de 9.5 J/cm^2 , lo que corresponde a 1 minuto de irradiación en el mismo punto marcado.

Las aplicaciones se realizaron diariamente sobre las articulaciones inyectadas con los cristales, durante 3 días seguidos cuando la inyección del cristal se hizo en 3 oportunidades y durante 5 días consecutivos cuando la inyección del cristal se realizó en 6 oportunidades.

Las aplicaciones con láser se realizaron diariamente durante 7 días consecutivos posteriores a los 5 días de las inyecciones con adrenalina sobre la misma zona muscular previamente marcada en el grupo 17 y en el grupo 18, y en puntos musculares sin inyección, el grupo 19, y con inyección de solución fisiológica, el grupo 20 (**Fig.16**).



Fig.16. Láser de He-Ne utilizado en el desarrollo de la tesis.

7. Tratamiento Farmacológico

Se utilizaron los siguientes antiinflamatorios no esteroideos: 1,25 mg/día/rata de diclofenac y la misma dosis de meloxicam, ambos inyectables; y 0.05 mg/día/rata de celecoxib y la misma dosis de rofecoxib, vía oral, se suministraron individualmente en tres oportunidades, inmediatamente después de la inyección de microcristales de hidroxapatita, a las 24 hs y a las 48 hs.

8. Preparación del material experimental

a. Obtención del plasma

La sangre se obtuvo sacrificando los animales por decapitación, previa anestesia con Ketalar 10 mg/kg/rata. La sangre fue recogida en cápsula de Petri con una mezcla de anticoagulante, constituida por oxalato de amonio y de potasio en una proporción de 2:1 e inmediatamente centrifugada a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos para obtener el plasma.

b. Obtención del tejido articular para el estudio histomorfológico por microscopia óptica

Las articulaciones de los miembros posteriores fueron seccionadas con tijera después de ser sacrificados los animales.

c. Obtención del tejido muscular

Se seccionó con hoja de afeitar después de sacrificados los animales.

d. Obtención de las mitocondrias del tejido muscular esquelético

Las mitocondria se aislaron a partir de los músculos de los miembros posteriores de las ratas, según el método citado por Rickwood y col. modificada (60). La sección muscular (aproximadamente 1g) fue lavada y suspendida en buffer de aislamiento helado SETH, constituido por sacarosa 0.25 Molar, 2 mM de EDTA, 10 mM de Tris base y 50 Unidades de heparina por ml de solución final, e inmediatamente homogenizado; se llevó a cabo sobre hielo. Primeramente se desmenuzó con tijera y luego con un homogenizador Potter Elvehjem y posteriormente se terminó de procesar con ultra turrax. El homogenizado fue centrifugado a 1500 g, a 4°C por 20 min.; se separó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 10000 g a 4°C por 5 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet mitocondrial se lavó con el buffer y se centrifugó nuevamente a 10000 g 4°C por 10 min; se descartó nuevamente el sobrenadante y el pellet mitocondrial se volvió a centrifugar (purificación). El pellet (rico en mitocondrias) se resuspendió en buffer de aislamiento (relación tejido/buffer: 1/1) y las alícuotas se guardaron a -80°C en un termo con Nitrógeno líquido. La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford (61).

9. Procesamiento del material biológico

a. Determinación de fibrinógeno plasmático

Por espectrofotometría, según el método de Ratnoff y Menzie (62), en el cual se precipita del plasma el fibrinógeno y posteriormente se hace reaccionar con el reactivo de Foling y con lectura a 625 nm.

b. Determinación de L-citrulina en plasma

Por espectrofotometría según Boyde y Rahmatullah (63). En esta reacción se leyó la absorbancia a 530nm. Se utilizó como reactivo cromogénico diacetilmonoxime y thiosemicarbacida.

c. Determinación de Nitrotirosina en suero

Por técnica de Elisa utilizando reactivos de Oxis Research® (64).

d. Determinación de Oxido Nítrico en plasma

Según Reacción de Griess modificada por Choi (7). Se utilizó como reactivo cromogénico la sulfanilamida y la naftilendiamina, leyéndose posteriormente a 530 nm en espectrofotómetro.

e. Estudio histomorfológico

Después de ser sacrificados los animales, se seccionaron con tijera las articulaciones de los miembros posteriores (equivalente a la rodilla en el humano), y se conservaron los tejidos en formol al 10% para ser posteriormente coloreados con Hematoxilina - Eosina y observadas las estructuras articulares sinoviales, cartilaginosas y óseas por microscopía óptica. También se utilizó la tinción de tricrómico de Gomori y se observó el tejido muscular al microscopio óptico (100X y 400X).

Procesamiento de las articulaciones: fijación en solución acuosa de formaldehído al 10% durante 24 hs., inclusión en parafina y coloración con Hematoxilina – Eosina y coloración Tricrómica de Gomori modificado (65). Los tejidos duros (hueso) fueron descalcificados en solución acuosa de ácido nítrico al 10% a temperatura ambiente y luego coloreados con Hematoxilina-Eosina y Tricromica de Gomori.

Procesamiento del tejido muscular: posterior a la decapitación de los animales, los tejidos musculares afectados y/o tratados de los miembros posteriores fueron cortados con hojas de afeitar e inmersos en:

- a. Solución acuosa de formaldehido al 10%, posterior inclusión en parafina para ser luego coloreadas con Hematoxilina-Eosina y Tricrómico de Gomori para ser observados por microscopia óptica (MO) (100X y 400X). Con esta última coloración es posible distinguir amplias áreas de fibrosis entre las fibras musculares (65).
- b. Solución de Karnovsky (1 mm² de músculo) y posterior fijación en tetróxido de osmio e inclusión en araldita. Los cortes finos se contrastaron con acetato de

uranilo y nitrato de plomo. Las observaciones y el análisis mitocondrial se realizaron mediante microscopía electrónica (ME) con magnificación de 10000X y 27000X (66, 67).

f. Análisis mitocondrial

Se realizó la morfometría sobre un total de 10 fotos observadas con el mismo aumento en forma aleatoria por grupo estudiado (n=10). Se cuantificó el número total de mitocondrias y se determinó el grado de alteración mitocondrial, en cada uno de los grupos, considerándose:

- Grado 1: apariencia normal
- Grado 2: tamaño normal, con crestas dilatadas.
- Grado 3: mayor tamaño del normal y se observan algunas crestas o restos de ellas.
- Grado 4: tamaño muy por encima del normal, tumefacción, aclaración de la matriz, separación anormal de la membrana interna y externa.

g. Funcionamiento del ciclo de Krebs

Se estudió mediante la determinación de la enzima Citrato Sintasa por espectrofotometría (68). Se utilizaron como reactivos de la reacción: Oxalacetato de Na (OAA), Acido 5,5' ditio-bis-2 nitrobenzoico (conocido como DTNB o Reactivos de Ellman), y Acetil coenzima A (Acetil Co-A). La mayoría de las preparaciones mitocondriales contienen actividad hidrolasa de Acetil Co-A. Se midió un aumento en la absorbancia a 412 nm.

h. Actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial

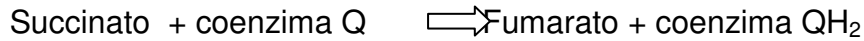
Se realizó por técnicas espectrofotométricas:

El Complejo I (NADH - Ubiquinona reductasa) de acuerdo a la técnica descrita por Ragan y col. (69). La reacción de oxido reducción se lleva a cabo de acuerdo al siguiente esquema:



Se utilizó Decilubiquinona como aceptor de electrones en vez del natural coenzima Q₁ como consecuencia de la insolubilidad de este último. Se leyó en a 340 nm y se midió el decaimiento en la absorbancia.

El Complejo II (Succinato - Ubiquinona reductasa) en base a la técnica desarrollada por Ziegler y Doeg (70), según la siguiente reacción:



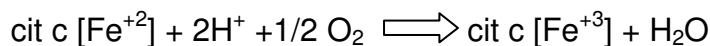
La reducción de la coenzima Q se midió en forma indirecta por el cambio de coloración del reactivo 2,6-diclorofenolindofenol (DPIP) que se reduce en presencia del ubiquinol. Se midió a 600 nm con un descenso en la lectura de la absorbancia.

El Complejo III (Ubiquinona - Citocromo c reductasa) siguiendo los criterios de Trijbels y col. (71). El complejo III de la cadena respiratoria cataliza la transferencia de electrones desde el ubiquinol del complejo Q hasta el citocromo c de acuerdo a la siguiente reacción de óxido reducción:



Se leyó a 550 nm y se midió un aumento en la absorbancia

El Complejo IV (Citocromo c oxidasa) de acuerdo a lo expuesto por Wharton y col. (72). La enzima citocromo c oxidasa o complejo IV cataliza la oxidación de acuerdo a la siguiente reacción:



Se leyó a 550 nm y se midió una disminución de la absorbancia .

10. Análisis Estadístico.

Los resultados de los datos cuantitativos (biomarcadores inflamatorios y actividad enzimática) fueron expresados: $\bar{X} \pm \text{ES}$ y estadísticamente analizados aplicando ANOVA - Test de Fisher. El análisis mitocondrial observado con ME, fueron realizados en el programa Axiovision 4.6 (Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Hallbengmoos-Germany), referenciados a una escala de 1µm. Considerándose significativas las diferencias cuando p fue menor de 0.05 para todos los casos.

RESULTADOS

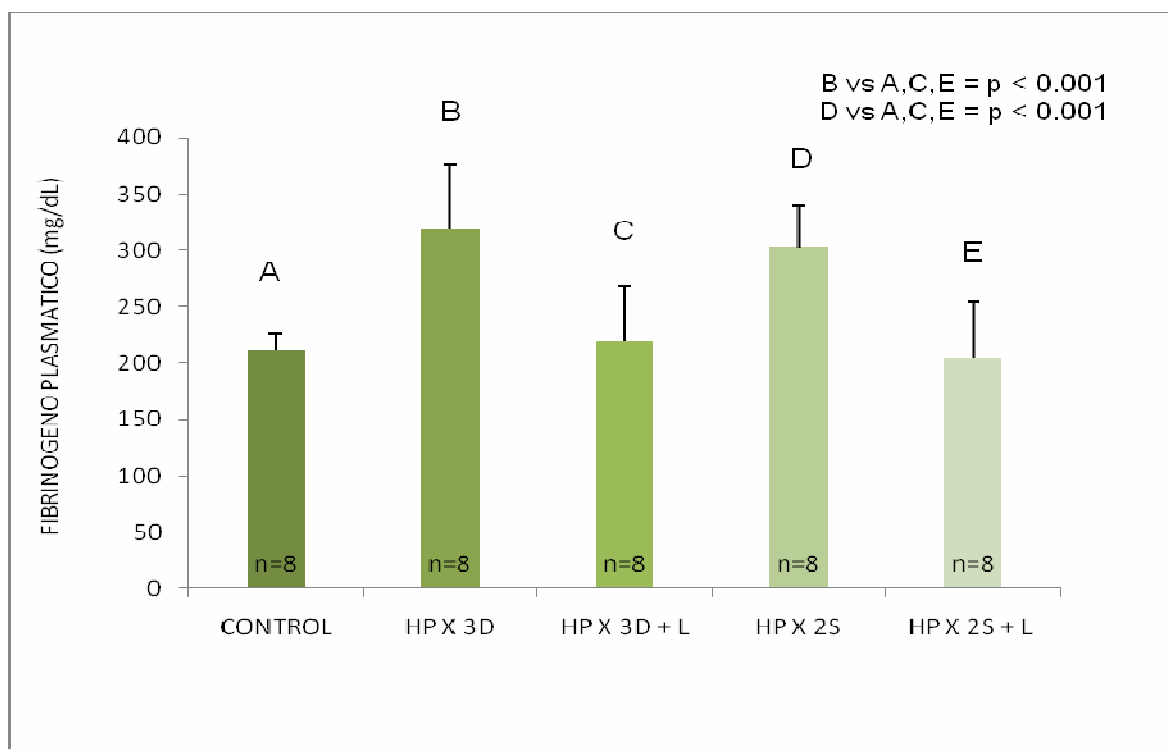
Para facilitar la interpretación de los resultados en el presente trabajo, se ha considerado conveniente separarlos en las secciones:

1. ARTROPATÍAS

2. MIOPATÍAS.

1-ARTROPATIAS

El efecto del láser de He-Ne en artropatías inducidas por cristales de Hidroxiapatita (HP) se presenta en la **Fig.18**.



Cada barra expresa: Media \pm ES

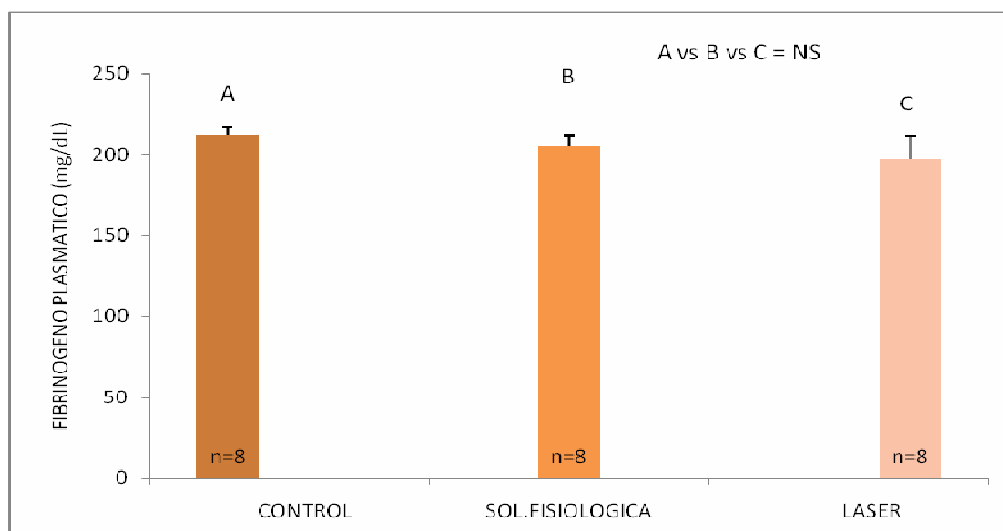
Fig.18: Efecto del láser de He-Ne en artropatía inducida en ratas por cristales de hidroxiapatita (HP) a los 3 días y a las 2 semanas, evaluado por los niveles de fibrinógeno en plasma.

El nivel de **fibrinógeno plasmático** observado en las ratas a las cuales se indujo un proceso inflamatorio en las articulaciones de los miembros posteriores por inyección de HP durante 3 días fue de 319.33 ± 10.21 mg/dL(B). Cuando se inyectaron por 2 semanas el nivel fue de 303.11 ± 13.19 mg/dL (D) sin encontrar diferencias significativas entre ambos grupos, pero si al comparar lcon el grupo control (211.86 ± 5.02 mg/dL) ($p < 0.001$) (A).

El nivel del fibrinógeno observado en ratas con injuria articular durante 3 días y a las cuales posteriormente se irradió con láser de He-Ne también durante 3 días fue de 220.01 ± 13.31 mg/dL (C) encontrando diferencias significativas ($p < 0.001$) comparando con el grupo injuriado sin tratamiento (B).

En el grupo de ratas injuriadas con HP durante 2 semanas e irradiadas con láser de He-Ne durante los 5 días posteriores, el nivel de fibrinógeno fue de 204.58 ± 12.36 mg/dL (E) encontrando una $p < 0.001$ comparándolo con el grupo (D). No existen diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó los grupos con artritis aguda y crónica (B vs D).

Para tener la certeza que el incremento de fibrinógeno se debía al depósito de los cristales y no por la agresión o estrés que podría provocar la introducción de la aguja o el efecto del solvente por sí solo, se inyectó solamente el solvente (solución fisiológica) (B) (**Fig.19**). Cada barra expresa: $X \pm ES$



Cada barra expresa: $X \pm ES$

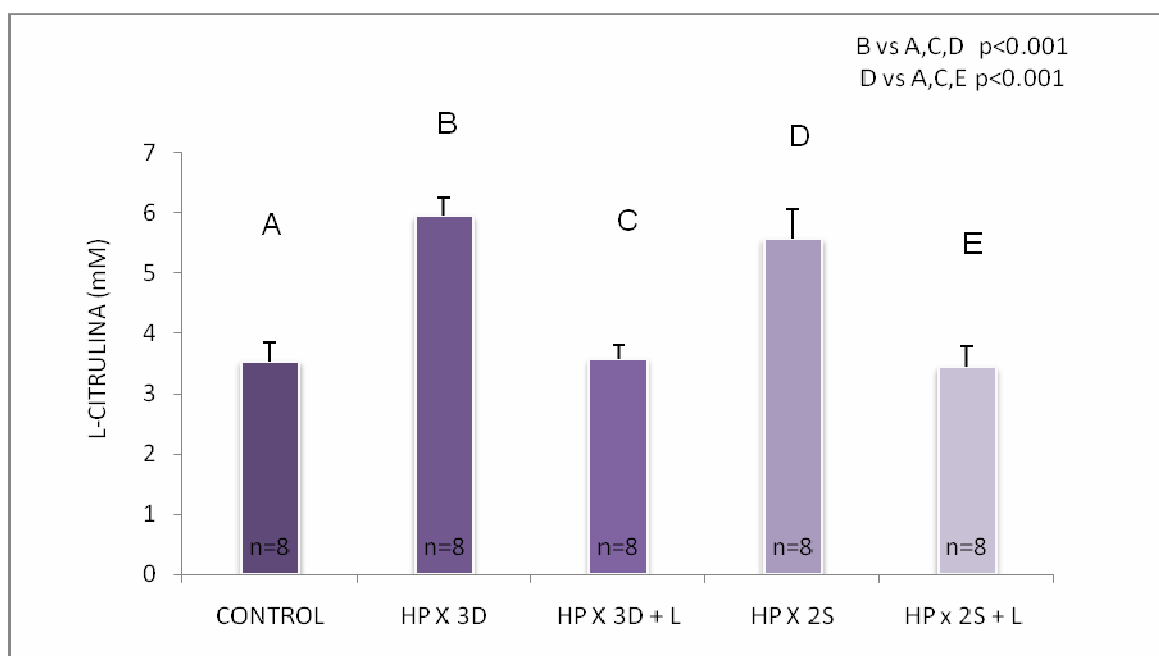
Fig.19: Comparación entre los niveles de fibrinógeno de ratas intacta, inyectados con solución fisiológica intraarticular y solamente irradiadas con láser en la zona articular.

Por otra parte, para conocer si la irradiación por sí sola podía provocar modificación de los niveles de fibrinógeno, se irradió las articulaciones sin haber inyectado nada previamente (C).

En la **Fig.19** puede observarse que al comparar los niveles de fibrinógeno entre ratas intactas (211.86 ± 5.02 mg/dL) (A), con los inyectados en zona intraarticular con solución fisiológica (205.45 ± 6.39 mg/dL) (B) o irradiadas con

láser sin otro tratamiento (197.42 ± 14.91 mg/dL) (C), no se encontró diferencia significativa entre los grupos (A vs B vs C).

La **Fig. 20** muestra el incremento de **L-citrulina** en el grupo de ratas con artropatía experimental, tanto cuando fueron inyectadas durante 3 días con HP (5.95 ± 0.11 mM) (B) (o 2 semanas (5.57 ± 0.17 mM) (D), existiendo una diferencia significativa ($p < 0.001$) comparando los niveles de estos grupos con los del grupo control (3.54 ± 0.11 mM) (A), o con los valores de los lotes tratados posteriormente a la injuria articular realizada en 3 días o 2 semanas, irradiando las articulaciones lesionadas con láser de He-Ne durante 3 días en el primero (3.58 ± 0.17 mM) (C) y 5 días en el segundo (3.44 ± 0.13 mM) (E).

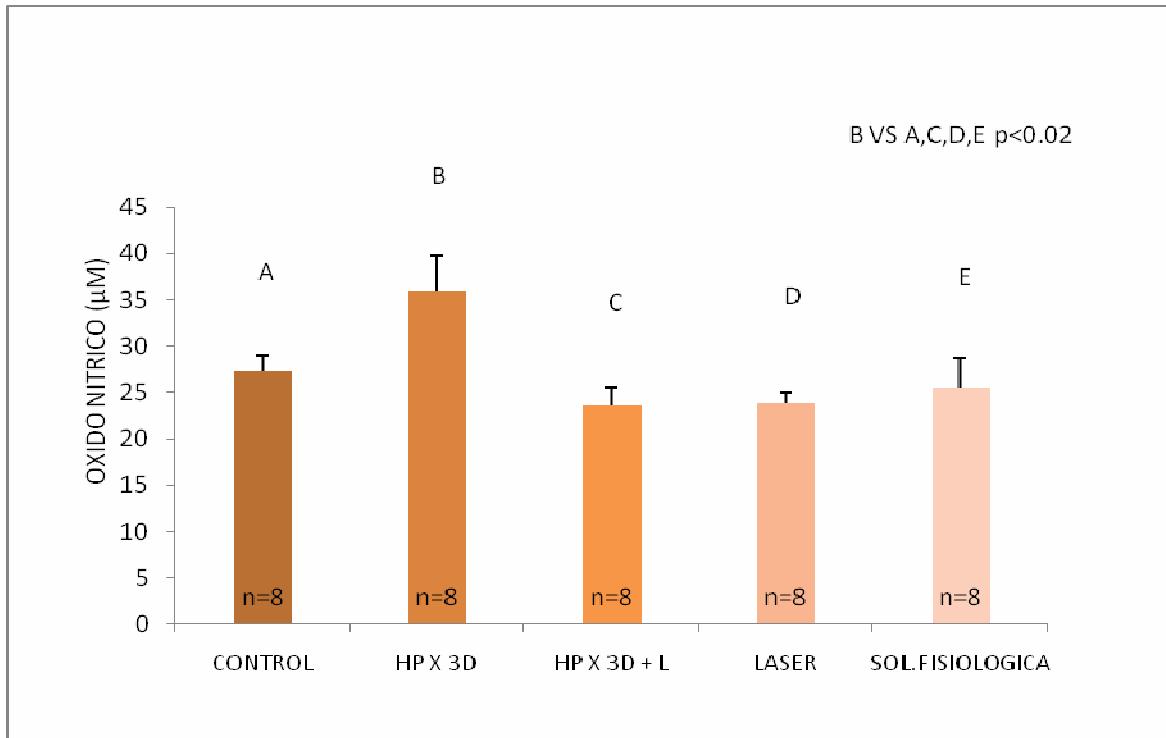


Cada barra expresa: Media \pm ES

Fig.20: Efecto del láser de Helio Neón en artropatía inducida en ratas por cristales de Hidroxiapatita en 3 días y 2 semanas, evaluado por los niveles de L-citrulina.

Por otra parte, no hubo diferencia estadísticamente significativa comparando los niveles de L-citrulina plasmática del grupo control (3.54 ± 0.11 mM) (A) con los niveles de los grupos inyectados con hidroxiapatita y tratados con láser de He-Ne respectivamente (3.58 ± 0.17 mM) (C) (3.44 ± 0.13 mM) (D), ni tampoco entre los dos grupos con artritis, aguda (5.95 ± 0.11 mM) (B) y crónica (5.57 ± 0.17 mM) (D) y sin tratamiento posterior.

En la **Fig.21** puede observarse el incremento de la concentración plasmática de **óxido nítrico** en ratas inyectadas durante 3 días con hidroxiapatita ($35.83 \pm 3.99 \mu\text{M}$) (B), existiendo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.02$) al comparar este grupo con el inyectado y posteriormente tratado con láser ($23.57 \pm 1.97 \mu\text{M}$) (C) y con el grupo control ($27.37 \pm 1.64 \mu\text{M}$) (A).



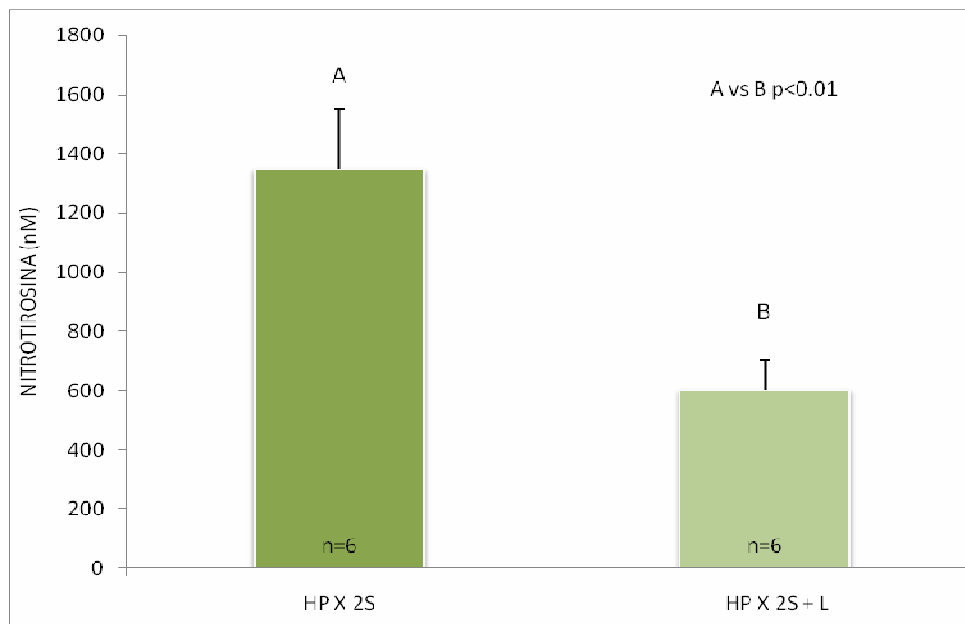
Cada barra expresa: Media \pm ES

Fig.21: Efecto del láser de He-Ne sobre los niveles plasmáticos de oxido nítrico en ratas inyectadas con hidroxiapatita durante 3 días y tratadas con láser, solamente irradiadas e inyectadas con solución fisiológica.

Para tener la certeza que el incremento de ON se debía al depósito de los cristales y no a la injuria o estrés que podría provocar la introducción de la aguja o el solvente por sí solo, se inyectó solamente solvente, solución fisiológica como puede observarse en la **Fig.21**.

Para conocer si la irradiación por sí sola podía provocar modificación de los niveles de ON, se irradiaron las articulaciones sin haber inyectado nada previamente, observándose que entre el grupo con articulación irradiada con láser ($23.85 \pm 1.07 \mu\text{M}$) (D) y el inyectado intraarticularmente con solución fisiológica ($25.50 \pm 3.27 \mu\text{M}$) (E), no existe diferencia estadísticamente significativa (A vs C vs D vs E).

El efecto del láser de He-Ne sobre los niveles de **nitrotirosina** plasmática en ratas con artritis experimental por hidroxapatita se muestra en la **Fig.22**, donde se evidencia un aumento significativo ($p < 0.01$) en el grupo con artritis (1346.67 ± 199.36 nM) (A) y una marcada disminución en el grupo con artritis y posteriormente irradiado con láser de He-Ne (603.50 ± 100.03 nM) (B) estableciéndose diferencias significativas ($p < 0.01$).

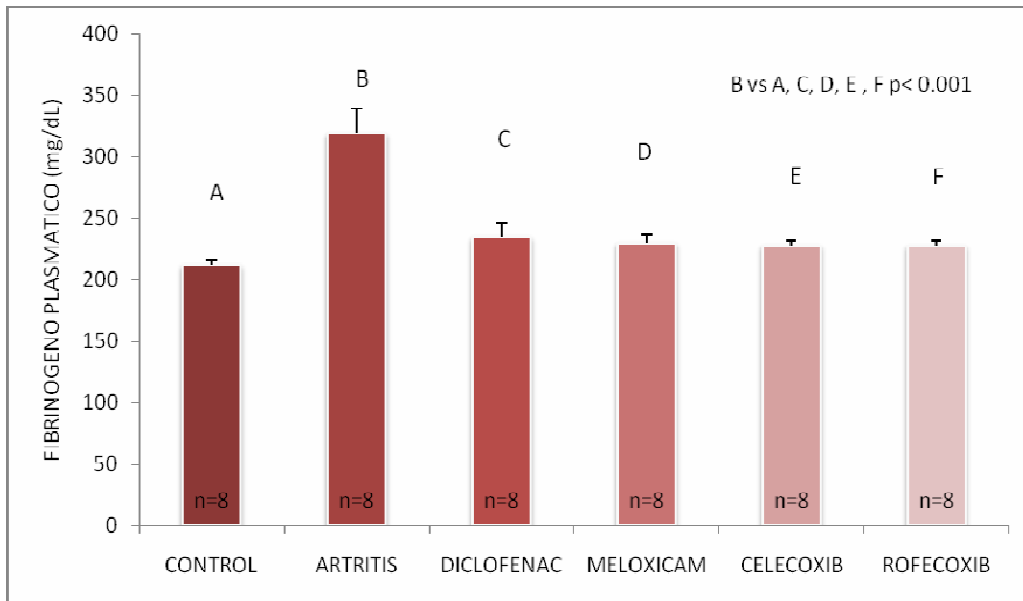


Cada barra expresa: Media \pm ES

Fig.22: Efecto del láser de He-Ne sobre los niveles plasmáticos de nitrotirosina en ratas con artropatía inducida con hidroxapatita.

El comportamiento del fibrinógeno como marcador de un proceso inflamatorio inducido por cristales de hidroxapatita (HP) en articulaciones de ratas y posteriormente tratadas con diferentes AINEs: diclofenac, meloxicam, celecoxib y rofecoxib puede observarse en la **Fig. 23**.

Entre los niveles aumentados de **fibrinógeno** del grupo con artritis inducida ($319.33 \pm 20,21$ mg/dL) (B) y los grupos con artritis y tratados con **diclofenac** (235.0 ± 11.02 mg/dL) (C), **meloxicam** (230.11 ± 7.04 mg/dL) (D), **celecoxib** (228.22 ± 3.7 mg/dL) (E) y **rofecoxib** (228.1 ± 4.1 mg/dL) (F) existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$), observándose en estos grupos tratados con AINEs valores similares al grupo control (211.86 ± 5.02 mg/100ml) (A). No existen diferencias significativas entre los grupos control y los injuriados y posteriormente tratados con los diferentes AINEs.



Cada barra expresa: Media \pm ES

Fig.23: Efecto de diferentes AINEs sobre los niveles plasmáticos de fibrinógeno en cristalopatía experimental por hidroxipatita.

Resultados del estudio histomorfológico de las articulaciones por microscopía óptica.

A continuación se muestra y describe el análisis morfológico de las articulaciones normales, **Fig.24 a y b.**

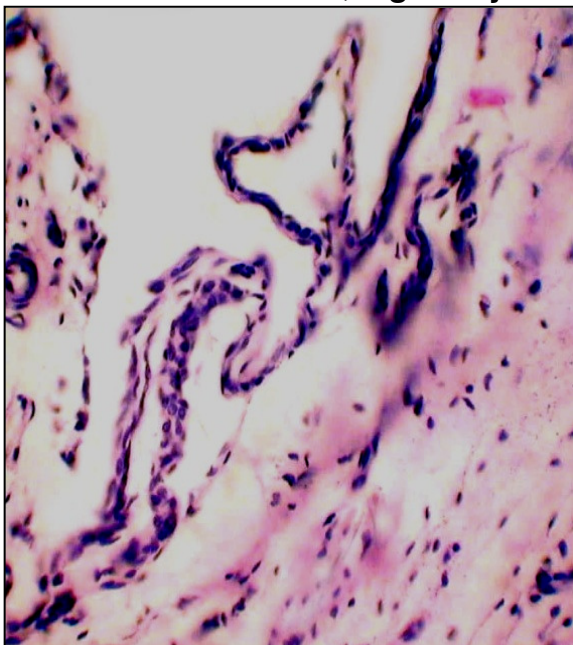


Fig. 24 a

Fig. 24 a. Se observa tejido sinovial sin inflamación. HE 400 X.

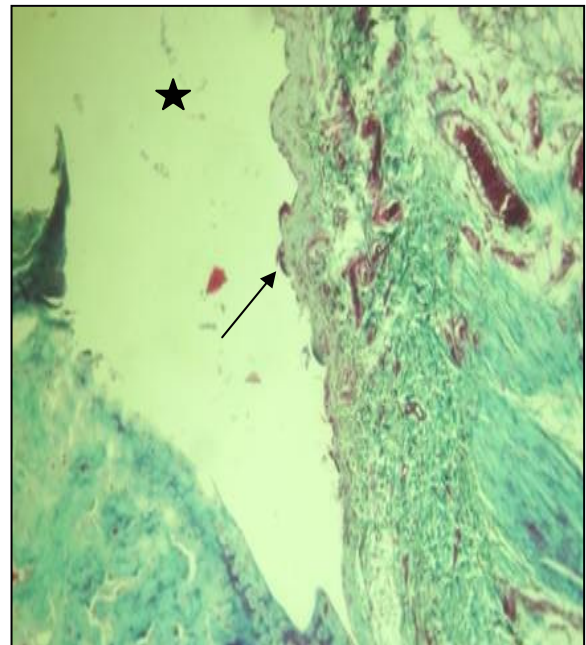


Fig. 24 b

Fig. 24 b. Se muestra la membrana sinovial (flecha) en relación a la luz articular (estrella) e intensa vascularización. Tricrómico de Gomori 400X.

En las **Fig. 25 a, b y c** se muestra articulación inyectada con cristales de hidroxapatita por 3 días:

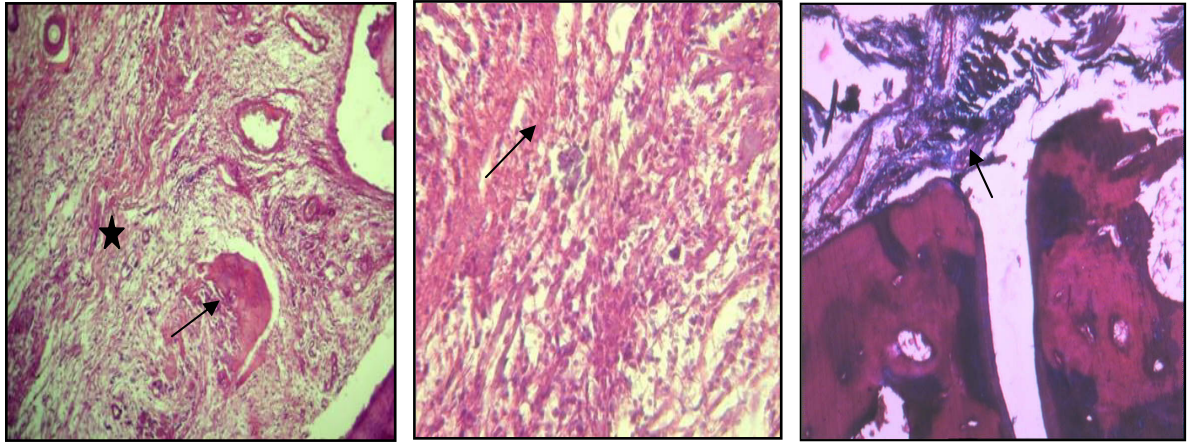


Fig. 25 a

Fig. 25 b

Fig. 25 c

Fig. 25 a. Se muestra vista panorámica del proceso inflamatorio con moderada fibrosis (flecha) y destrucción de las fibras musculares (estrella). HE 100X.

Fig. 25 b. Se observa inflamación. Se destacan cristales fragmentados entre haces de colágeno e infiltrado linfocitario (flecha). HE 400X.

Fig. 25 c. Se observa destrucción de fibras musculares (flecha). Tricrómico de Gomori 100X.

Las **Fig.26 a, b y c** muestran el efecto del tratamiento con láser de He-Ne posterior a las 3 inyecciones de hidroxapatita intraarticulares:

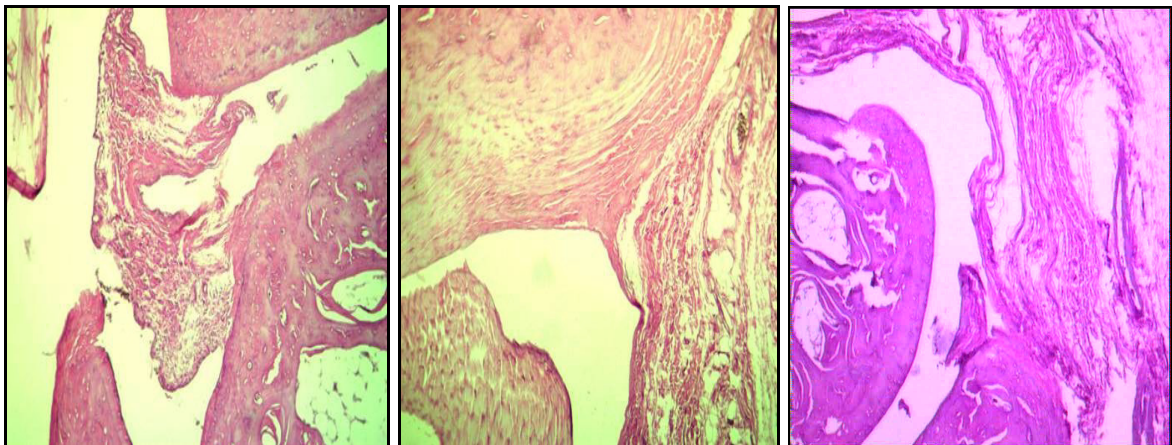


Fig. 26 a

Fig.26 b

Fig. 26 c

Fig.26 a. Se observa estructura osteoarticular y membrana sinovial con edema leve. HE 100X.

Fig.26 b. Se muestra estructura osteoarticular y ausencia de inflamación y cristales. HE 100X.

Fig.26 c. Se observa infiltrado inflamatorio periarticular linfocitario sin formación de granulomas. HE 400X

En las **Fig. 27 a, b y c** se muestra el efecto de las inyecciones de hidroxiapatita intraarticular administradas durante 2 semanas:

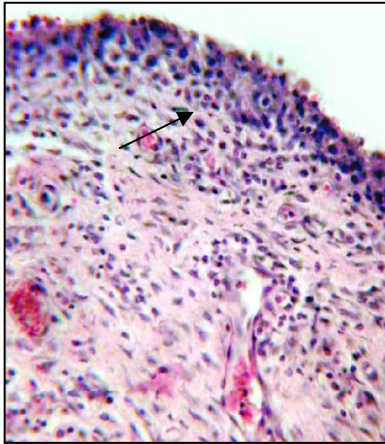


Fig. 27 a

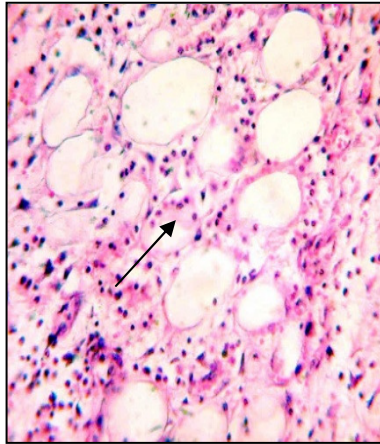


Fig. 27 b

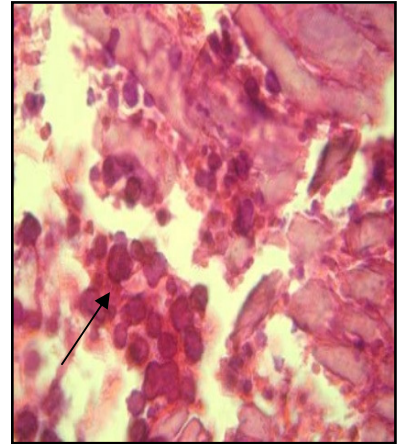


Fig. 27 c

Fig.27 a. Se observa sinovitis aguda. Estroma con infiltrado de leucocitos neutrófilos (flecha) y proliferación fibroblástica. Revestimiento sinovial ligeramente hiperplásico (arriba). El compromiso inflamatorio se extiende a las membranas sinoviales. HE 400X.

Fig. 27 b. Se muestra paniculitis aguda. Células adiposas rodeadas por infiltrado de leucocitos neutrófilos (flecha). HE 400X.

Fig. 27 c. Se observan cristales en el espesor del músculo estriado (flecha). HE 400X.

En la **Fig. 28 a y b** se muestra el efecto en la articulaciones inyectadas durante 2 semanas con HP y su posterior tratamiento con láser de He-Ne.

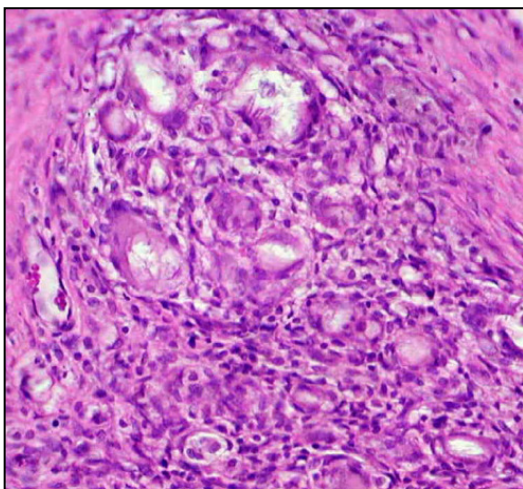


Fig. 28 a

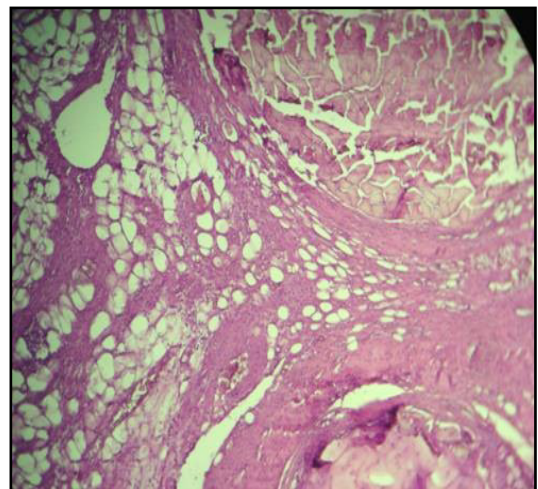


Fig. 28 b

Fig.28 a. Se observa inflamación periarticular. Granulomas. HE 400X.

Fig.28b. Se muestra fibrosis y tejido adiposo entre haces musculares (arriba) y fragmento óseo (abajo). La inflamación es leve. HE 100X.

A continuación se analizan los resultados obtenidos por los efectos del láser de He-Ne sobre los niveles plasmáticos de **fibrinógeno** en ratas con artritis experimental inducida por cristales de PFCa. En la **Fig.29**. Se observa que existe un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.001$) de los niveles de fibrinógeno plasmático de los grupos de ratas inyectados con PFCa durante 3 días ($298.51 \pm 25.68\text{mg/dL}$) (B) o durante 2 semanas ($302.55 \pm 26.28 \text{ mg/dL}$) (D) comparándolos con los del grupos: control ($211.86 \pm 14.20 \text{ mg/dL}$) (A) y los grupos con artritis inducida durante 3 días y posteriormente tratados con láser ($231.81 \pm 30.22 \text{ mg/dL}$) (C) y durante 2 semanas ($213.80 \pm 25.27 \text{ mg/dL}$) (E). Entre estos dos últimos grupos y el control no existen diferencia estadísticamente significativa, como así tampoco entre los grupos inyectados durante 3 días o dos semanas sin tratamiento posterior (A vs C vs E).

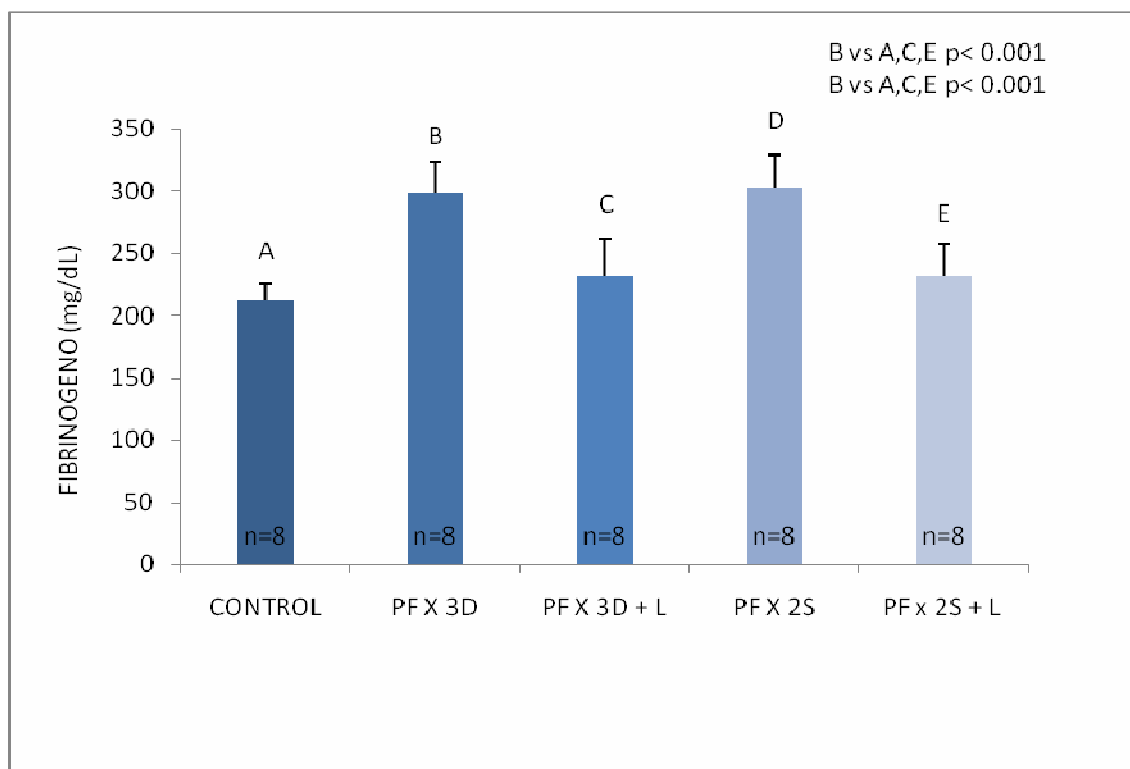


Fig.29. Efecto del láser de He-Ne en artropatía inducida en ratas por pirofosfato cálcico durante 3 días y 2 semanas, evaluado por los niveles plasmáticos de fibrinógeno.

Los efectos del láser de He-Ne sobre los niveles plasmáticos de **L-citrulina** en ratas con artritis experimental inducida por cristales de PFCa se presentan en la **Fig.30**.

Se observa que existe un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.001$) de los niveles de L-citrulina plasmática de los grupos de ratas inyectados con PFCa durante 3 días (4.27 ± 0.12 mM) (B) o 2 semanas (4.70 ± 0.18 mM) (D) comparándolos con los del grupos: control (3.54 ± 0.11 mM) (A) y los grupos con artritis inducida durante 3 días y posteriormente tratados con láser (3.77 ± 0.13 mM) (C) y los tratados durante 2 semanas (3.45 ± 0.12 mM) (E).

Entre estos dos últimos grupos y el control no existe diferencia estadísticamente significativa. En el grupo inyectado durante 2 semanas se produce un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.001$) comparándolo con el grupo inyectado durante 3 días sin tratamientos posteriores.

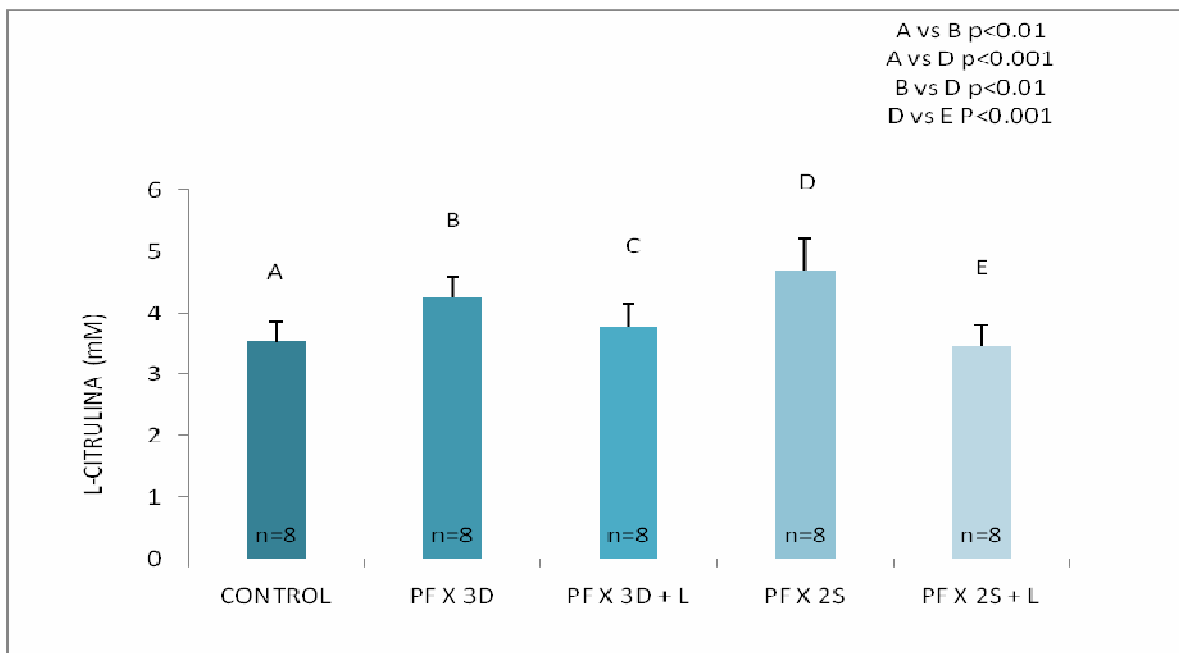


Fig. 30. Efecto del láser de He-Ne en artropatía inducida en ratas por pirofosfato cálcico durante 3 días y 2 semanas, evaluado por los niveles de L-citrulina.

A continuación se muestra y describe la histomorfología del efecto del láser de He-Ne sobre las articulaciones inyectadas con **PFCa**. Las **Fig. 31 a y b** muestran articulaciones inyectadas durante 3 días con PFCa.

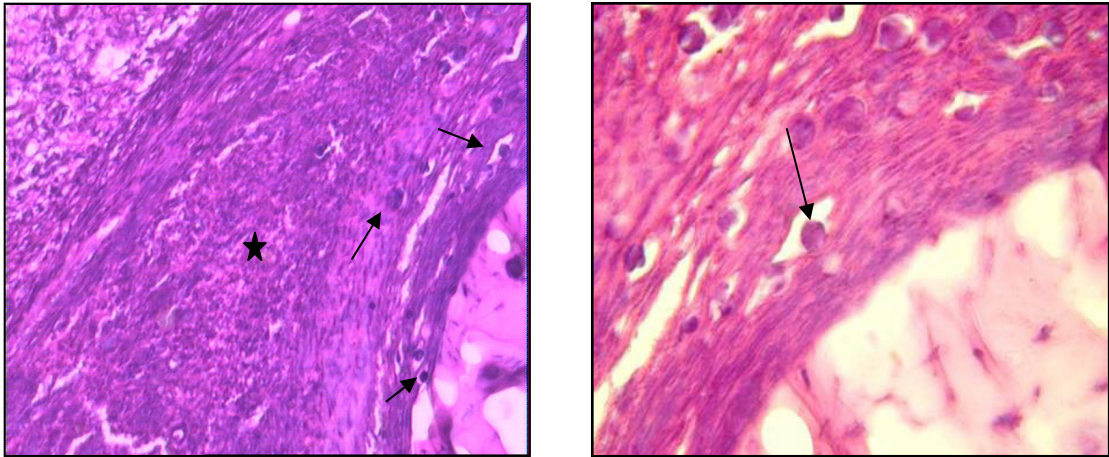


Fig. 31 a. Se observa periostitis (estrella) y cristales (flechas). HE 100X.

Fig.31 b. Se muestra detalle de la imagen anterior. Presencia de cristales y fragmentos en relación a fibras musculares estriada destruidas (flecha). HE 400X.

En las **Fig. 32 a y b** se muestra articulaciones de ratas inyectadas durante 3 días consecutivos con PFCa y posteriormente tratadas con láser.

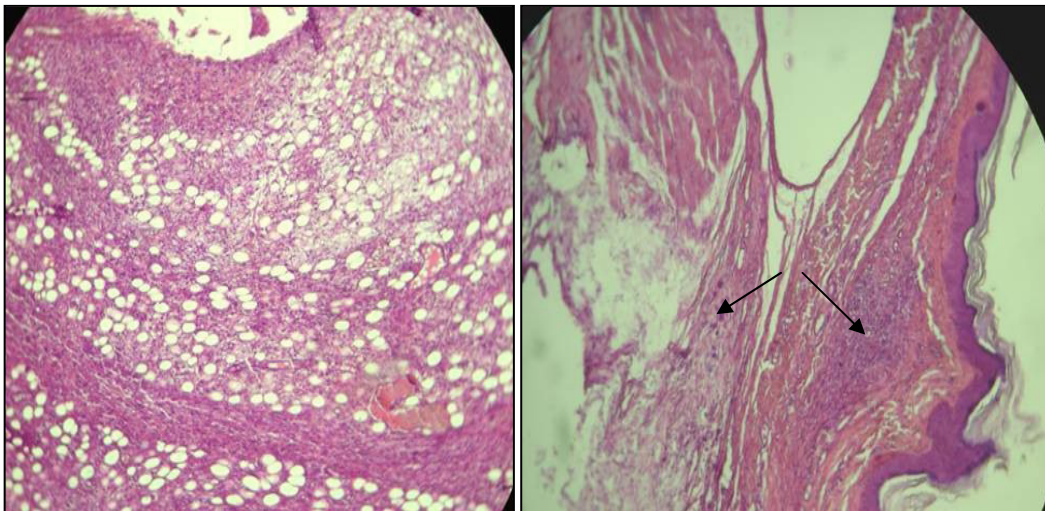


Fig. 32a

Fig. 32b

Fig. 32 a. Se observa proceso inflamatorio leve. Fibrosis y tejido adiposo. No se observan cristales. HE 100X.

Fig. 32 b. Se observa granuloma y restos de cristales (flecha). HE 100X.

En las **fig. 33 a y b** se observan articulaciones inyectadas con PFCa durante 2 semanas, intentado reproducir un proceso inflamatorio crónico.

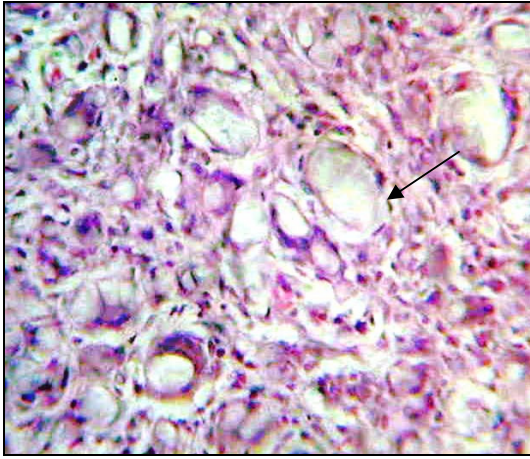


Fig. 33 a

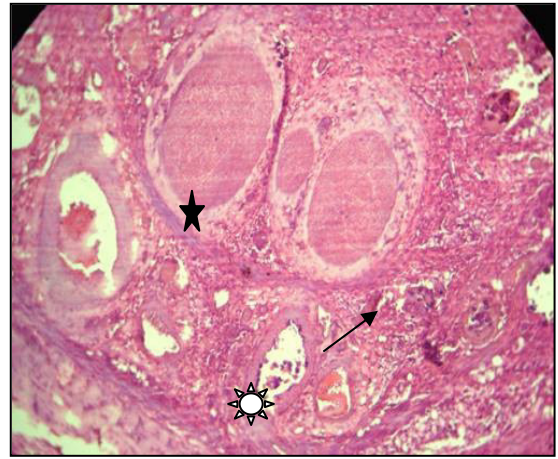
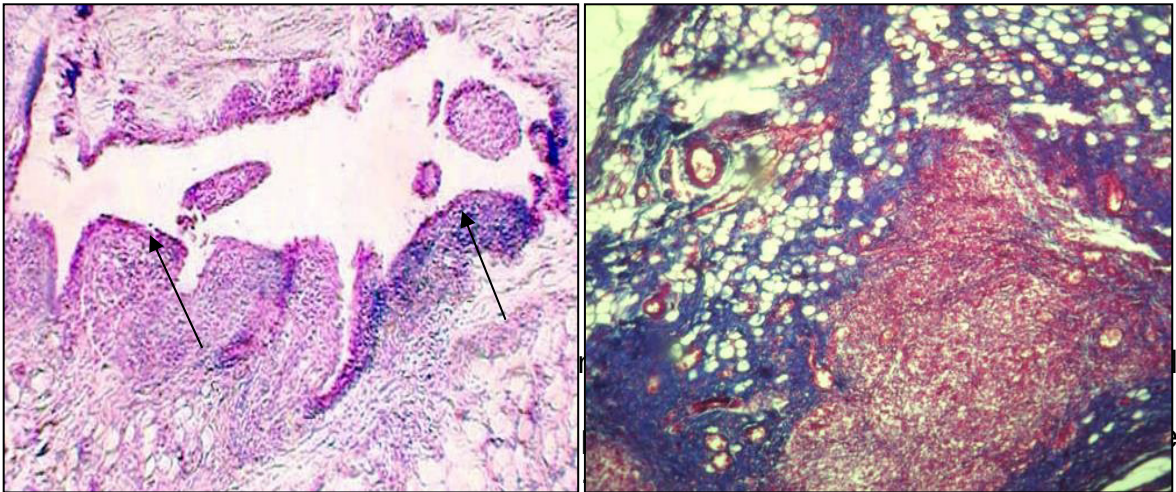


Fig. 33 b

Fig. 33 a. Vista panorámica de granuloma con células gigantes multinucleadas. Paniculitis aguda. Células adiposas rodeadas (flecha) por infiltrado de leucocitos neutrófilos. Vasos sanguíneos congestivos. HE 400 X.

Fig.33 b. Paquete vasculonervioso y músculo estriado (asterisco) con inflamación y cristales (estrella). Profusión de cristales (flecha) y fibrosis. HE 100X.

En las **Fig. 34 a y b** se puede observar el efecto del láser sobre las articulaciones inyectadas durante 2 semanas con cristales de PFCa:



En las **Fig. 35 a y b** se puede observar el efecto del láser sólo:

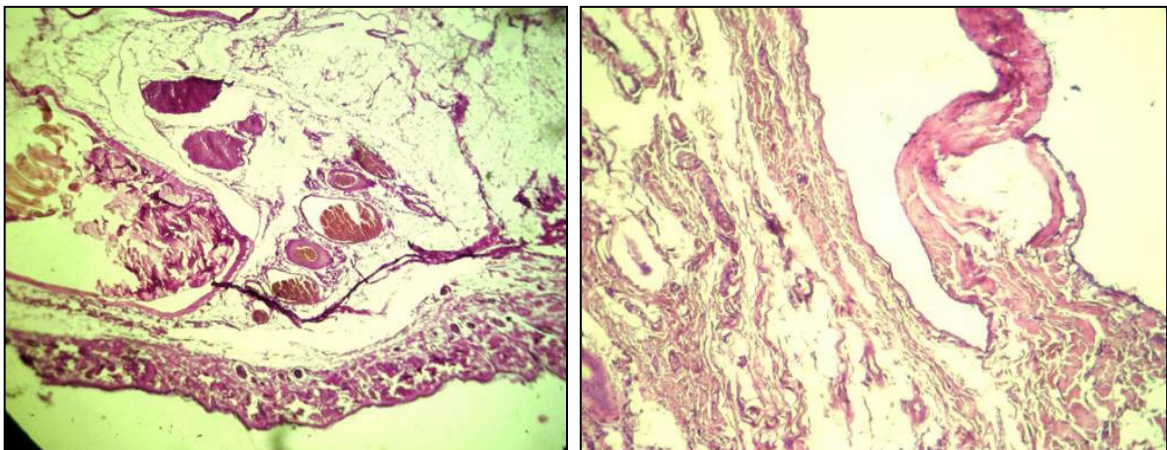


Fig.35 a. Se muestra tejido conectivo laxo perimuscular ricamente vascularizado.
Fig.35 b. Se observan membranas sinoviales y tejidos blandos periarticulares sin alteraciones histopatológicas. H-E. 100X.

En las **Fig. 36 a y b** se muestra articulación inyectada con solución fisiológica sin otro tratamiento previo ni posterior.

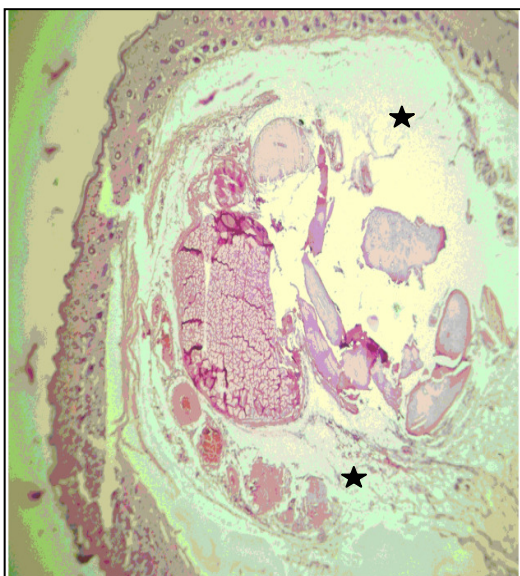


Fig. 36 a

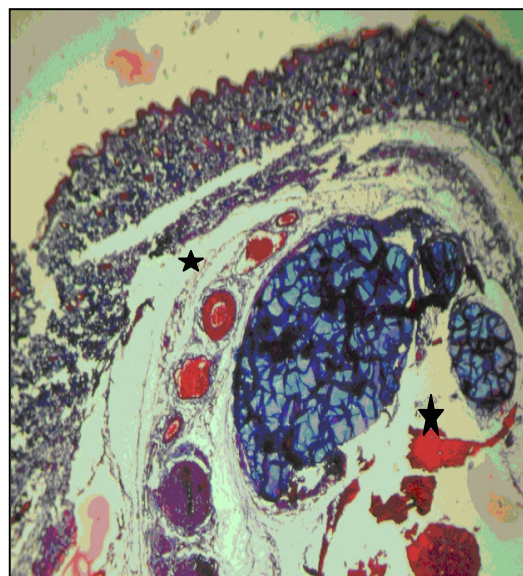


Fig. 36 b

Fig.36 a. Estructuras osteomusculares y paquete vasculonervioso rodeados de tejido conectivo laxo (asterisco).HE 100X.

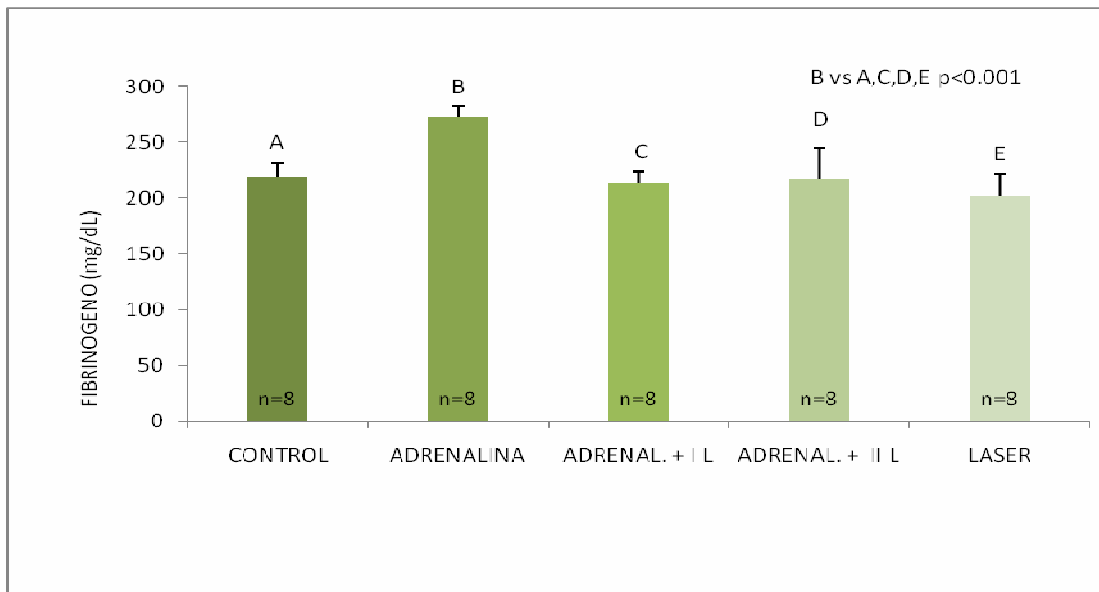
Fig.36 b. Estructuras osteomusculares y paquete vasculonervioso rodeados de tejido conectivo laxo (asteriscos). Tricrómico de Gomori 100 X.

2-MIOPATIAS

I) Efecto del láser de He-Ne sobre los biomarcadores plasmáticos: fibrinógeno, L-citrulina, óxido nítrico y nitrotirosina.

El efecto del láser de He-Ne sobre los niveles plasmáticos de **Fibrinógeno** en ratas con miopatías inducidas con inyecciones de adrenalina se observa en la **Fig.37**. Se observa un aumento significativo de los niveles de fibrinógeno en plasma en el grupo inyectado con adrenalina sin tratamiento posterior ($273,11 \pm 10,20$ mg/dL) (B), existiendo una diferencia estadísticamente significativa al compararlo con los siguientes grupos: control (ratas intactas) ($219,39 \pm 11,82$ mg/dL) (A), ratas a las cuales se les inyectó adrenalina y posteriormente se las

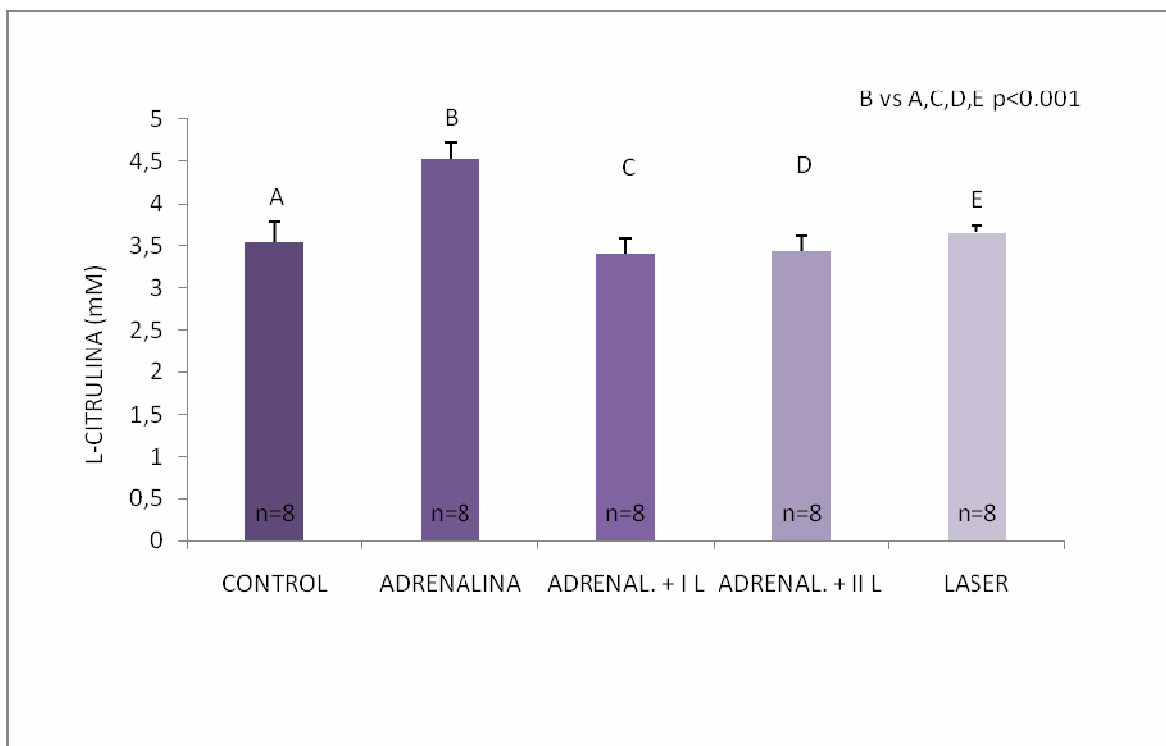
trató con láser de He-Ne a diferentes dosis I (213.07 ± 10.40 mg/dL) (C), y II (217.75 ± 27.77 mg/dl)(D) y los grupos a los que solo se les realizó el tratamiento con el láser de He-Ne (201.77 ± 20.55 mg/dL) (E) ($p < 0.001$). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los últimos cuatro grupos mencionados (A vs C vs D vs E).



Cada barra expresa: Media \pm ES

Fig.37: Efecto del láser de He-Ne sobre los niveles plasmáticos de Fibrinógeno en ratas con miopatías inducidas con inyecciones de adrenalina.

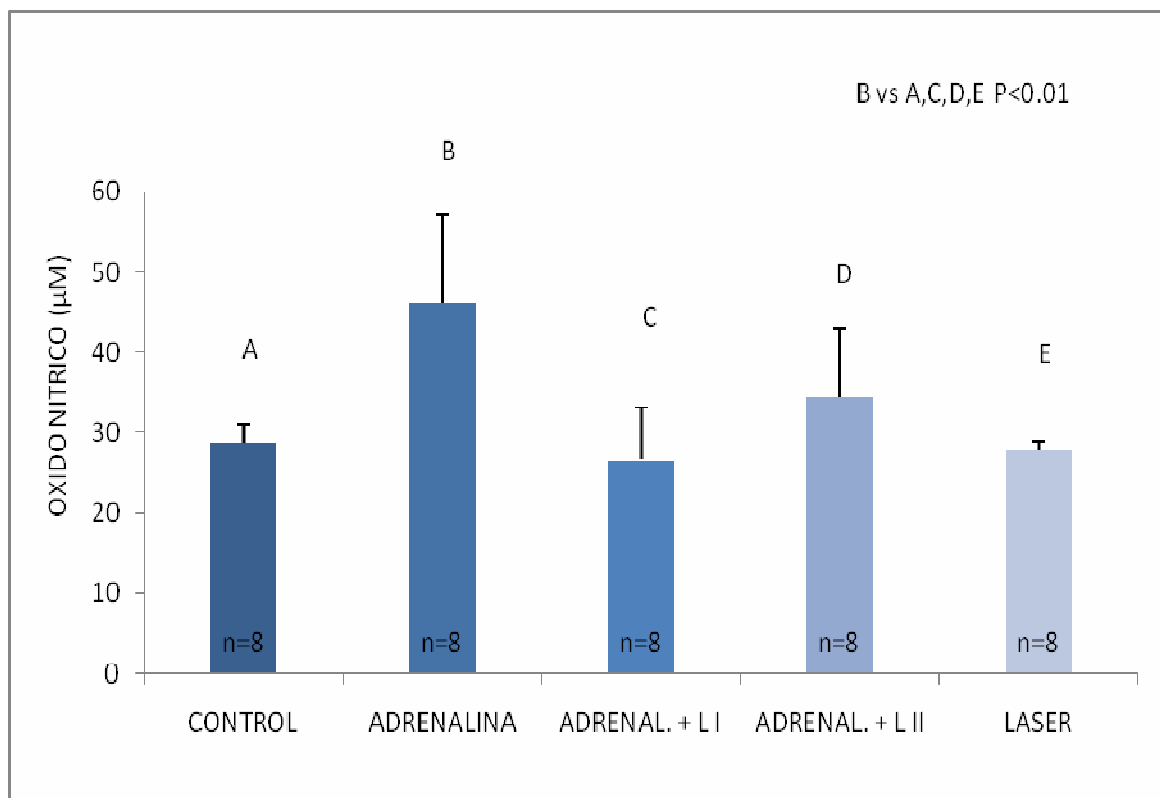
El efecto del Láser de He-Ne sobre los niveles plasmáticos de **L-Citrulina** en ratas con miopatías inducidas con inyecciones de adrenalina se observa en la **Fig.38**. Los niveles plasmáticos de L-citrulina aumentaron en el grupo inyectado con adrenalina ($4.53 \pm 0,24$ mM) (B), existiendo una diferencia estadísticamente significativa al compararlo con los siguientes grupos: control ($3,54 \pm 0,21$ mM) (A), ratas a las cuales se les inyectó adrenalina y posteriormente se las trató con láser de He-Ne (3.40 ± 0.19 mM) (C), ratas a las cuales se les inyectó adrenalina y posteriormente se les realizaron dos tratamiento con láser de He-Ne (3.43 ± 0.18 mM)(D) y al grupos que solo se le realizó el tratamiento con el laser de He-Ne ($3,65 \pm 0,09$ mM) (E) ($p < 0,001$). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los últimos cuatro grupos mencionados (A vs C vs D vs E).



Cada barra expresa: Media \pm ES

Fig. 38. Efecto del láser de He-Ne sobre los niveles plasmáticos de L-Citrulina en ratas con miopatías inducidas con inyecciones de adrenalina.

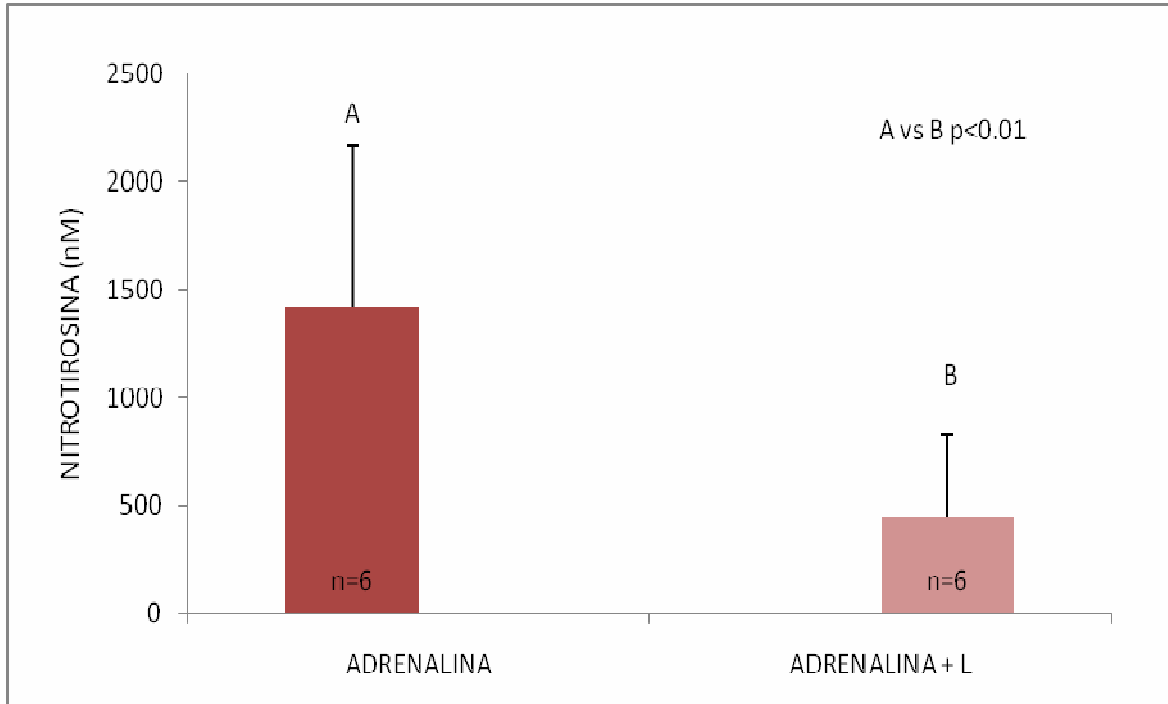
El efecto del láser de He-Ne sobre los niveles plasmáticos de óxido nítrico en ratas con miopatías inducidas con inyecciones de adrenalina se muestra en la **Fig.39**. Se observó un aumento significativo de la concentración plasmática de óxido nítrico en el grupo inyectado con adrenalina ($46.12 \pm 11.01 \mu\text{M}$) (B) en comparación con los siguientes grupos: control ($28.72 \pm 2.43 \mu\text{M}$) (A), ratas a las cuales se les inyectó adrenalina y posteriormente se las trató con láser de He-Ne ($26.56 \pm 6.53 \mu\text{M}$) (C), ratas a las cuales se inyectó adrenalina y se les aplicó doble dosis de tratamiento con láser ($34.48 \pm 8.61 \mu\text{M}$)(D) y los grupos a los que solo se les realizó el tratamiento con láser de He-Ne ($24,78 \pm 1,10 \mu\text{M}$) (E), ($p < 0,01$). No hubo diferencias estadísticamente significativas comparando los últimos cuatro grupos mencionados entre sí (A vs C vs D vs E).



Cada barra expresa: Media \pm ES

Fig.39: Efecto del láser de He-Ne sobre los niveles plasmáticos de ON en ratas con miopatías inducidas con inyecciones de adrenalina.

Finalmente, el último marcador estudiado fue el nivel de nitrotirosina en plasma. En las ratas inyectadas con adrenalina la concentración fue (1419.17 ± 746.31 nM) (A). Comparado este grupo el inyectado con adrenalina e irradiación con láser de He-Ne (448.00 ± 376.81 nM)(B), se halló una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) (**Fig.40**).



Cada barra expresa: Media \pm ES

Fig. 40. Efecto del láser de He-Ne sobre los niveles plasmáticos de Nitrotyrosina en ratas con miopatías inducidas con inyecciones de adrenalina.

II) Resultados del estudio histomorfológico con microscopía óptica y electrónica en miopatías:

En las **Fig. 41 a y b** se muestran cortes de músculo estriado del grupo control estudiados por microscopía óptica con dos coloraciones diferentes: Hematoxilina-Eosina (HE) y Tricrómico de Gomori.

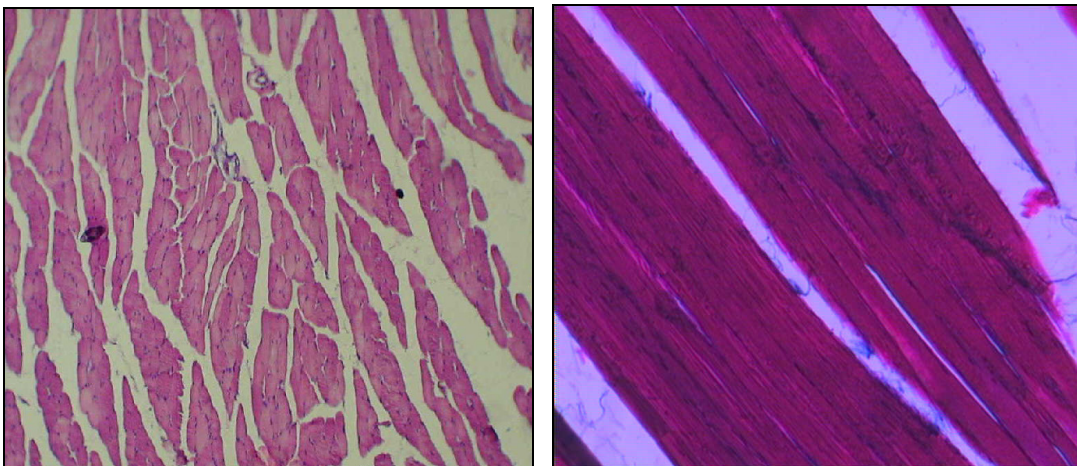


Fig.41 a.

Fig.41 b.

Fig.41a. Músculo estriado normal: se observan estriaciones longitudinales y transversales características de esta clase de fibras musculares. HE 400X.

Fig.41 b. Músculo estriado normal: se muestran fibras musculares conservadas con escaso tejido conectivo vascular intersticial. Tricrómico de Gomori 400X.

A continuación se muestra la morfología del músculo del miembro posterior estudiado con microscopía electrónica en el grupo control. **Fig. 43 (a y b).**

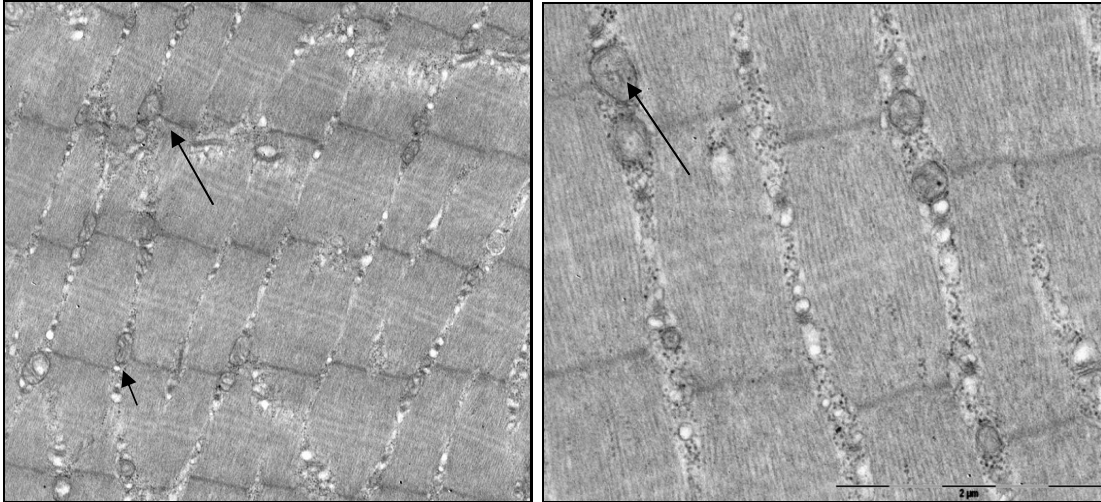


Fig. 42 a.

Fig. 42 b.

Fig.42 a. Microfotografía electrónica en la que se observa disposición normal de la estructura muscular con su alternancia de bandas oscuras y claras. Existe correspondencia entre los sarcómeros de diferentes miofibrillas. Las mitocondrias se hallan dispuestas aisladamente o agrupadas entre las fibras (flecha). 10000X.

Fig. 42 b. Las mitocondrias se presentan con un grado I de alteración (flecha). 21500X.

Las **Fig. 43 (a y b)** muestran cortes de músculo injuriado por inyecciones de adrenalina estudiados en microscopía óptica con dos coloraciones HE y Tricrómico de Gomori.

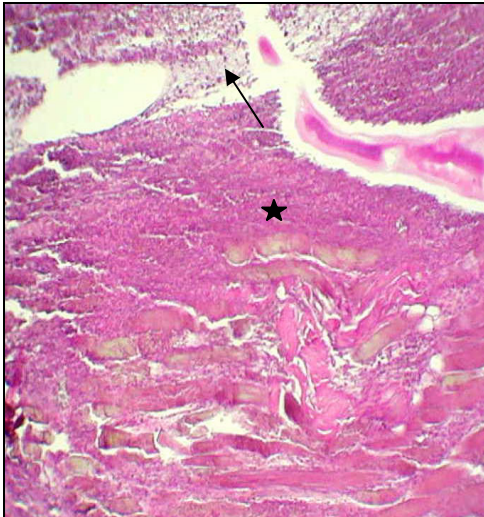


Fig. 43 a.

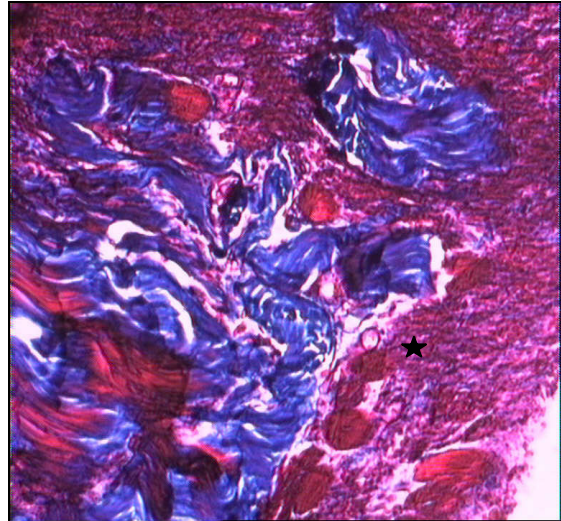


Fig.43 b.

Fig.43 a. Vista panorámica de tejido muscular estriado en la que se observa destrucción de las fibras, reemplazo parcial por tejido conectivo (estrella), infiltrado inflamatorio mononuclear y edema (flecha). Material necrótico con escasas fibras musculares conservadas. Efecto miopático generado por la adrenalina. HE 400X.

Fig.43 b. Depósito de fibras colágenas (azul) e infiltrado inflamatorio mononuclear en relación a las fibras musculares destruidas. Fibras musculares estriadas con marcada citólisis. Se observa infiltrado inflamatorio moderado en relación a las fibras destruidas (estrella). Tricrómico de Gomori 400X.

La **Fig. 44 (a, b, c y d)** muestra cortes de músculo estriado de este mismo grupo analizado por microscopía electrónica.

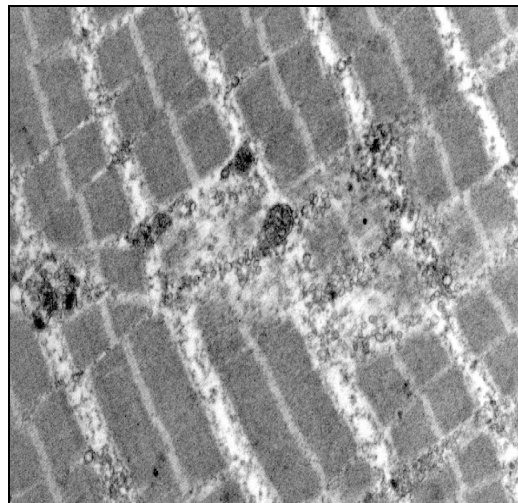
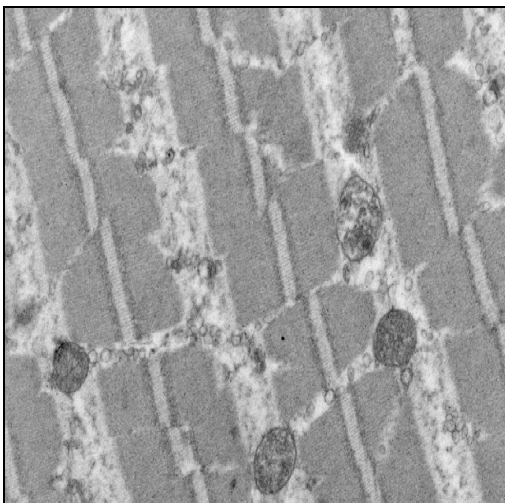


Fig.44 a

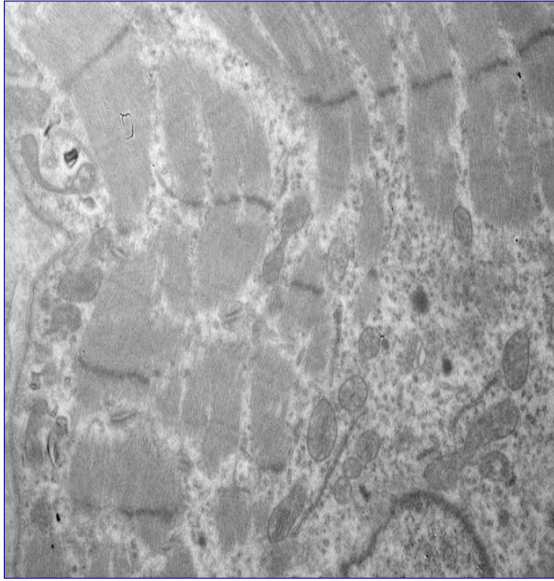


Fig.44 b

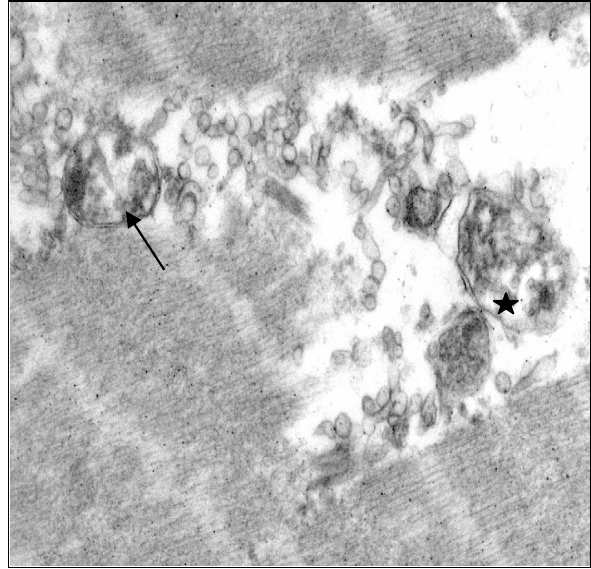


Fig. 44 c

Fig. 44 d

Fig.44 a, b, c. Marcada distorsión de las fibras musculares. Se pierde la regularidad de la disposición de las miofibrillas, alteradas en sus puntos de unión. 10000X.

Fig.44 d. Se destaca alteración mitocondrial, aumento de tamaño, disrupción de las crestas o restos de ellas (flecha) y aclaramiento de la matriz (asteriscos). Grado IV de alteración. 21500X.

A continuación se muestran cortes de músculo estriado estudiado por MO con las dos coloraciones, del grupo injuriado por inyecciones de adrenalina y el posterior un tratamiento con láser de He-Ne. **Fig. 45 (a y b).**

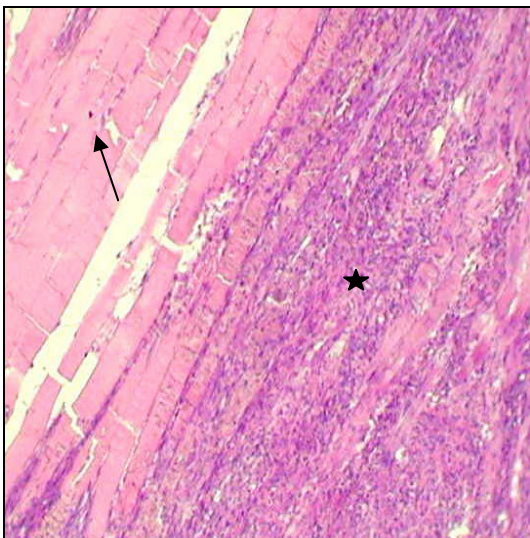


Fig. 45 a.

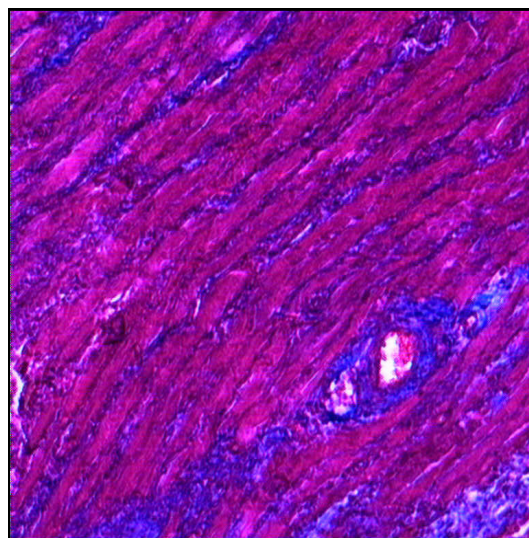


Fig.45 b.

Fig.45 a. Fibras conservadas en corte transversal y longitudinal con escaso conectivo vascular interpuesto. Infiltrado inflamatorio (estrella) y fibras musculares conservadas (flecha). Severa reacción inflamatoria. HE 400X. **Fig.45 b.** Corte transversal de fibras conservadas (rojo) con escaso conectivo vascular (azul). Tricrómico de Gomori 400X.

La **Fig. 46 (a y b)** muestra cortes de músculo de este grupo con ME.

Fig.46 a

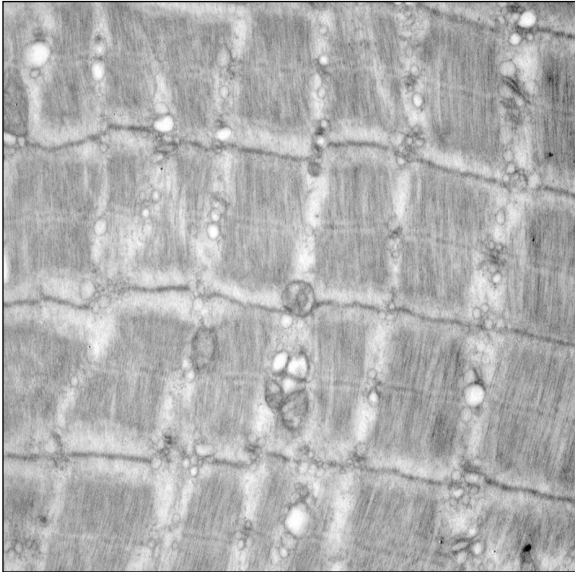


Fig.46 b

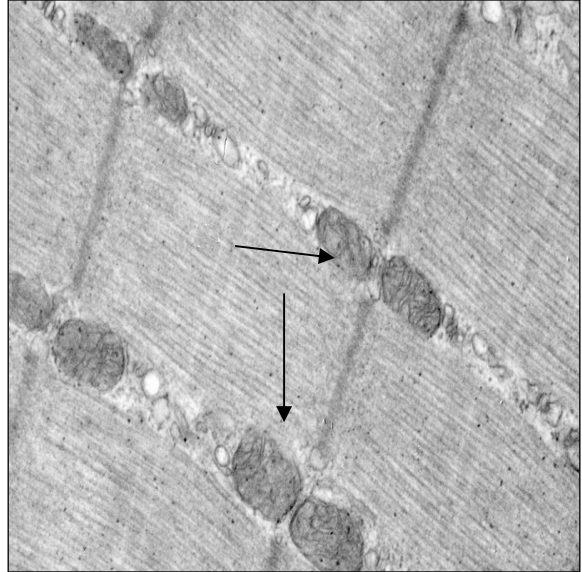


Fig. 46 a. Muestra una disposición conservada del músculo esquelético. 10000X.

Fig. 46 b. Mitochondrias conservadas en tamaño y número (flechas). Estructura miofibrillar normal. Grado II de alteración. 21500X.

La **Fig.47 (a y b)** muestra MO con dos coloraciones (HE y Tricrómico de Gomori), del músculo injuriado por inyecciones de adrenalina y el tratamiento con doble dosis de láser de He-Ne.

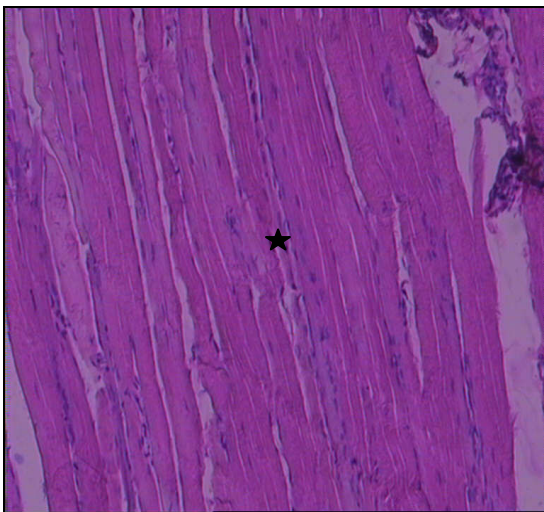


Fig. 47 a.

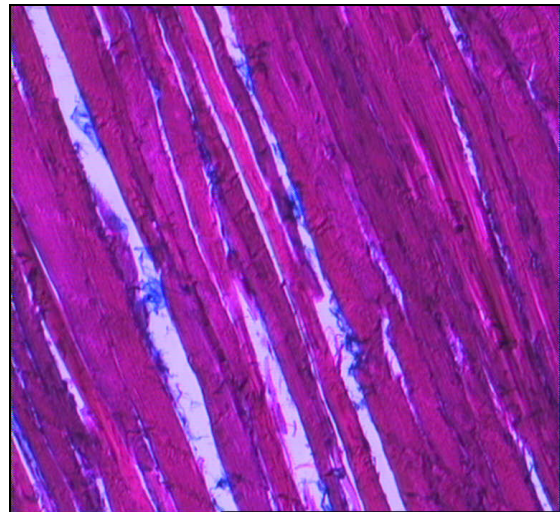


Fig.47 b.

Fig.47 a. Miositis. Se observa infiltrado inflamatorio mono y poliformonuclear entre las fibras musculares (asterisco). Moderada reacción inflamatoria. Es notoria la recuperación de la estructura muscular, muy similar al normal. Aumento en el número de núcleos, posiblemente debido a una proliferación de las células satélites a partir de las cuales se regeneran las fibras musculares. HE 400X.

Fig.47 b. Se muestran fibras musculares estriadas conservadas. Escaso tejido conectivo laxo interpuesto con leve infiltrado inflamatorio. Tricrómico de Gomori 400X.

La **fig.48 (a y b)** muestra cortes de músculo estriado de este mismo grupo analizado en microscopía electrónica.

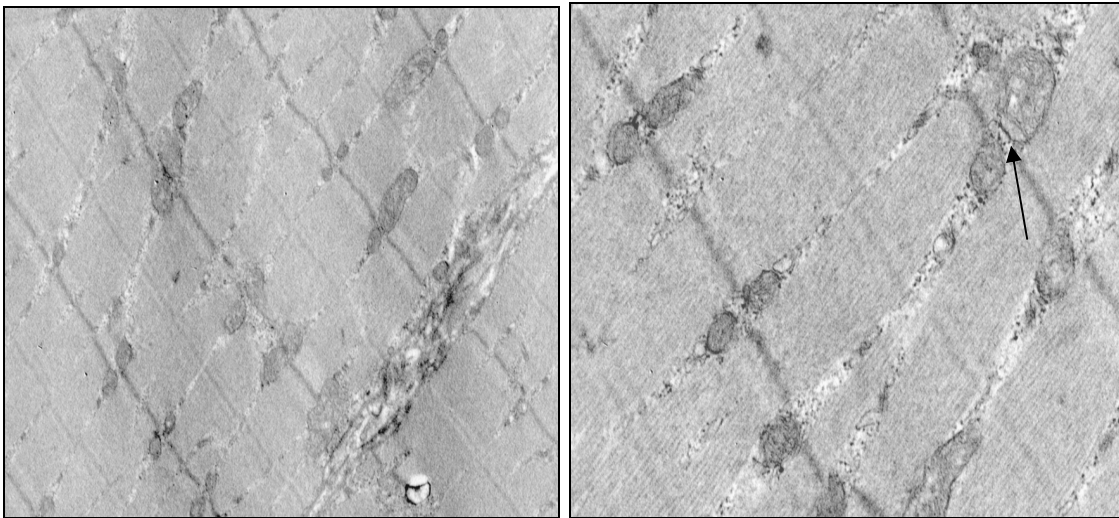


Fig.48 a.

Fig. 48 b.

Fig. 48 a. Se observa disposición conservada del músculo esquelético. 10000X.

Fig.48 b. Se muestran mitocondrias de conformación irregular, ligeramente aumentadas de tamaño. Grado II de alteración (flecha). 21500X.

La **Fig. 49 (a y b)** muestra la microscopia óptica con dos coloraciones (HE y Tricrómico de Gomori), del músculo tratado con láser de He-Ne.

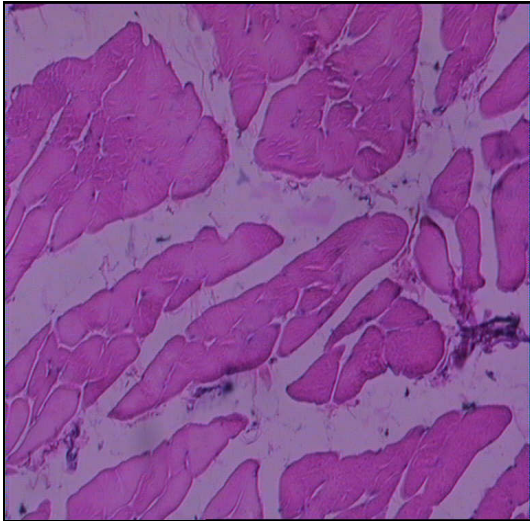


Fig. 49 a.

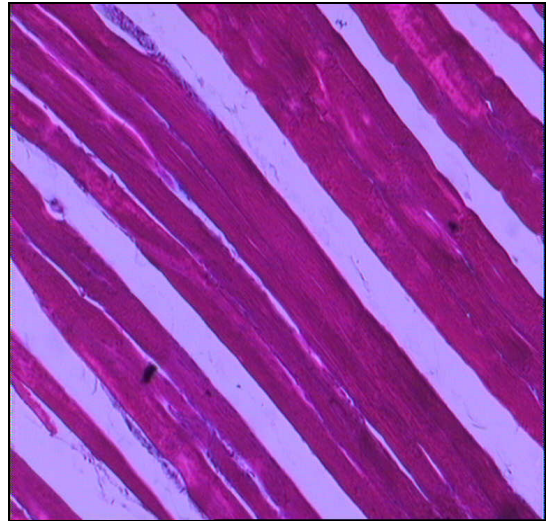


Fig. 49 b.

Fig.49 a. Se observan fibras musculares estriadas cortadas longitudinalmente, conservadas. Escaso tejido vascular intersticial. HE 400X.

Fig.49 b. Corte longitudinal de fibras musculares estriadas conservadas (rojo). Escaso tejido conectivo vascular interpuesto (azul). Tricrómico de Gomori 400X.

Aquí, el músculo presenta características que coinciden con la normalidad en las dos tinciones. Se observa un aparente aumento en el número de fibras blancas.

La **Fig.50 (a, b, c y d)** muestra cortes de músculo estriado de este mismo grupo analizado con microscopía electrónica.

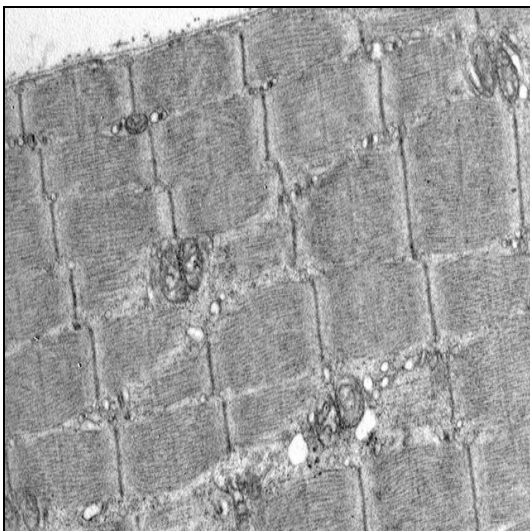


Fig.50 a

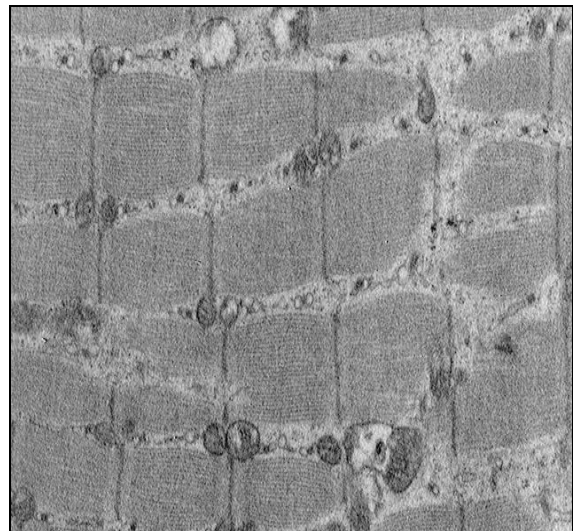


Fig.50 b

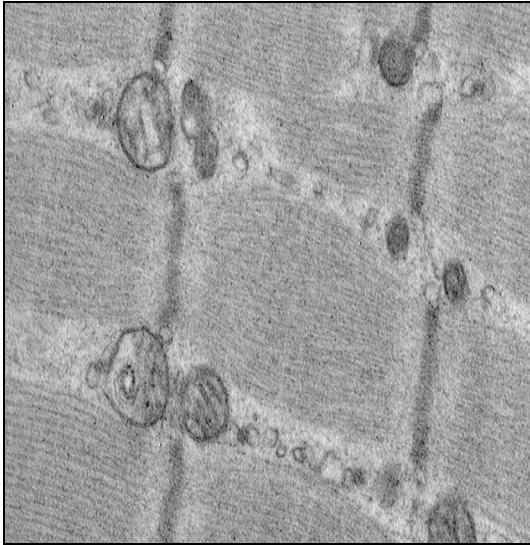


Fig.50 c

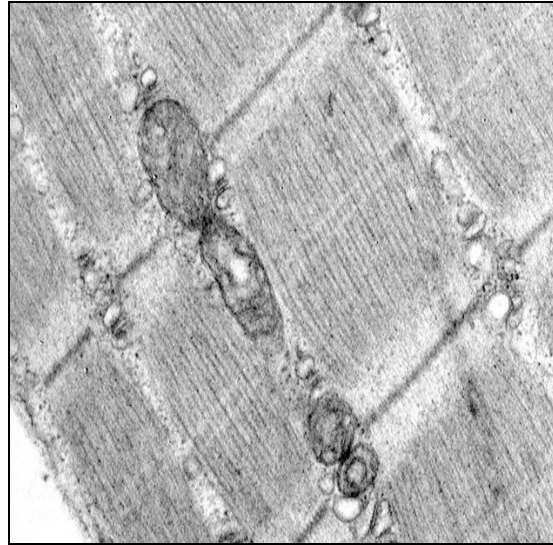


Fig.50 d

Fig.50 a y b. Disposición conservada de la ultra estructura del músculo esquelético. 10000X.

Fig.50 c y d. Mitocondrias conservadas en tamaño y número. Estructura miofibrillar normal. Grado I de alteración mitocondrial. 21500X.

La **Fig.51 a y b** muestran el músculo injuriado y sin tratamiento posterior (se sacrificó a la semana de la última inyección) por MO.

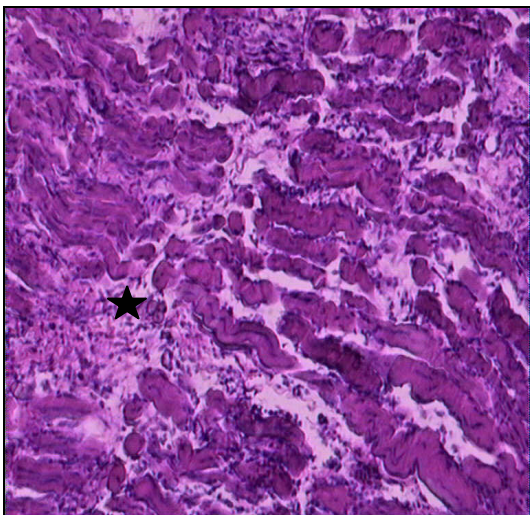


Fig.51 a

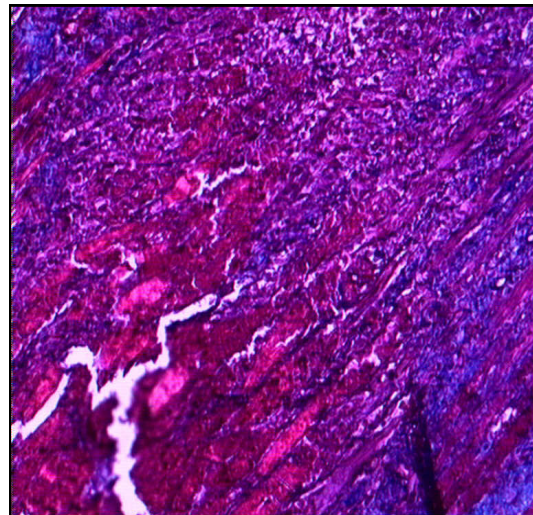


Fig.51 b

Fig.51 a. Fibras musculares conservadas, con escaso conectivo vascular interpuesto. Moderado infiltrado inflamatorio mononuclear (asterisco). Tricrómico de Gomori 400X.

Fig.51 b. Fibras musculares estriadas conservadas rodeadas por tejido conectivo. Note ausencia de inflamación. HE 400X.

La ME muestra cortes del músculo de este grupo en la **Fig. 52 (a y b)**.

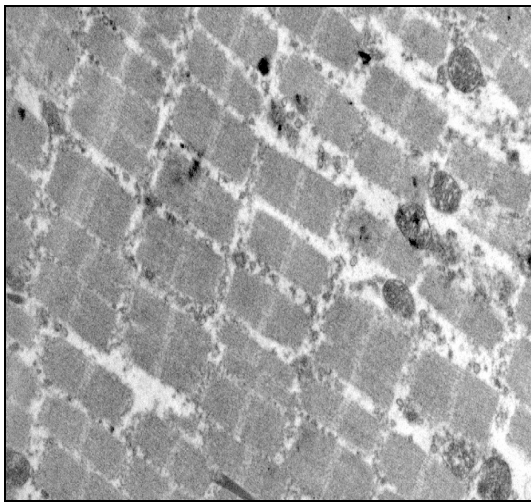


Fig.52a

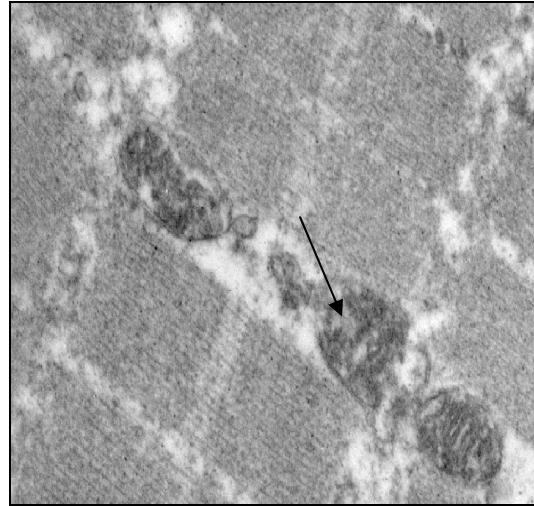


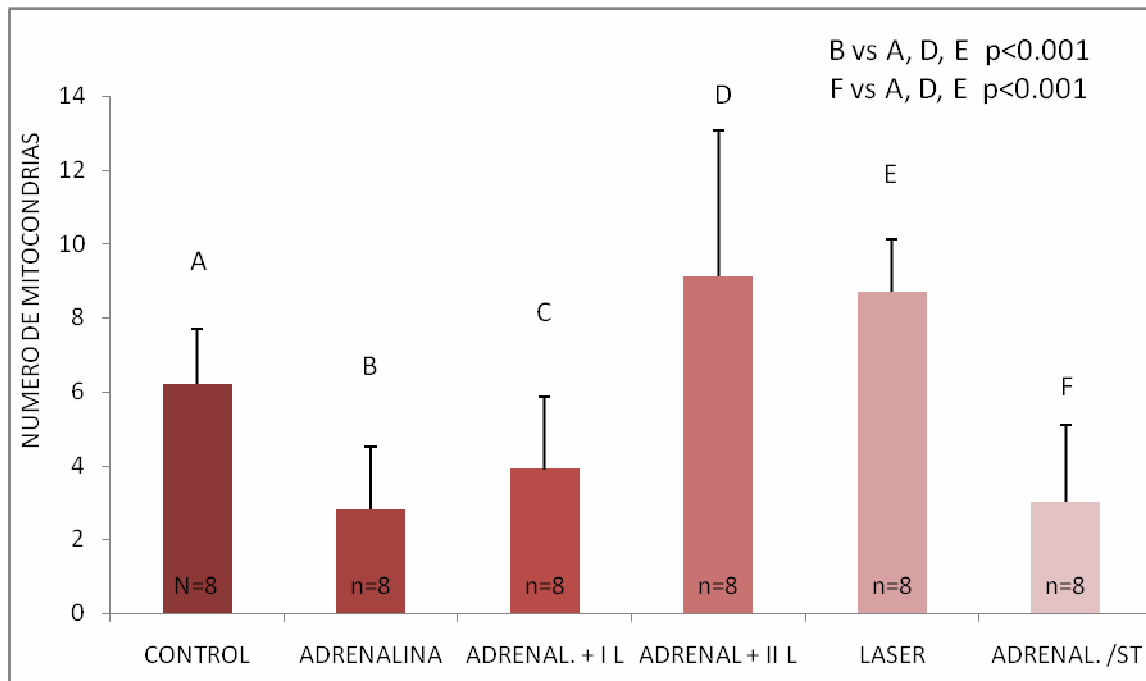
Fig.52b

Fig.52 a. Alteración de la organización de las fibras musculares. 10000X.

Fig.52 b: Se destaca alteración mitocondrial, aumento de tamaño, disrupción de las crestas o restos de ellas (flecha). Grado III de alteración mitocondrial. 21500X.

III) Resultados del estudio histomorfométrico mitocondrial:

El efecto del láser de He-Ne sobre el número de mitocondrias en ratas con miopatías inducidas se observa en la **Fig.53**.



Cada barra expresa: Media \pm ES

Fig.53. Efecto del láser de He-Ne sobre el número promedio de mitocondrias en ratas con miopatías inducidas con inyecciones de adrenalina.

Se observó diferencia estadísticamente significativa entre el número de mitocondrias encontradas en el grupo control (6.20 ± 0.46) (A), el grupo injuriado (2.80 ± 0.31) (B), los grupos injuriados y tratados con una aplicación de láser de He-Ne (4.66 ± 0.61) (C) y con dos aplicaciones de láser de He-Ne (9.10 ± 1.25) (D); los grupos a los que solo se les realizó el tratamiento con láser de He-Ne (8.7 ± 0.85) (E) y el grupo al que se inyectó con adrenalina y no se le realizó ningún tratamiento (3.00 ± 2.11) (F) **Fig.53**.

El efecto del láser de He-Ne sobre los grados de alteración mitocondrial en ratas con miopatías inducidas con inyecciones de adrenalina, observados a través de microscopía electrónica y expresados en porcentajes se observan en la **Fig.54**.

En el grupo control (A): G_I: 85.45%; G_{II}: 14.54%; G_{III}: 0%; G_{IV}: 0%. En el grupo al cual se le indujo la injuria muscular (B): G_I: 0; G_{II}: 32.00%; G_{III}: 50.00%; G_{IV}: 18.00%. En el grupo de ratas inyectadas y posteriormente tratadas con una aplicación de láser de He-Ne (C): G_I: 0%; G_{II}: 2.00%; G_{III}: 62.00%; G_{IV}: 36.00%. En el grupo de ratas inyectadas y posteriormente tratadas con dos aplicaciones láser de He-Ne (D): G_I: 71.43%; G_{II}: 3.29%; G_{III}: 24.18%; G_{IV}: 1.10%, el grupo al que solo se le aplicó láser de He-Ne (E): G_I: 97.7%; G_{II}: 2.7%; G_{III}: 0%; G_{IV}: 0% y el grupo que solo se le realizó la injuria con adrenalina y no se aplicó ningún tratamiento(F): G_I: 0%; G_{II}: 3.00%; G_{III}: 67.00%; G_{IV}: 30.00%.

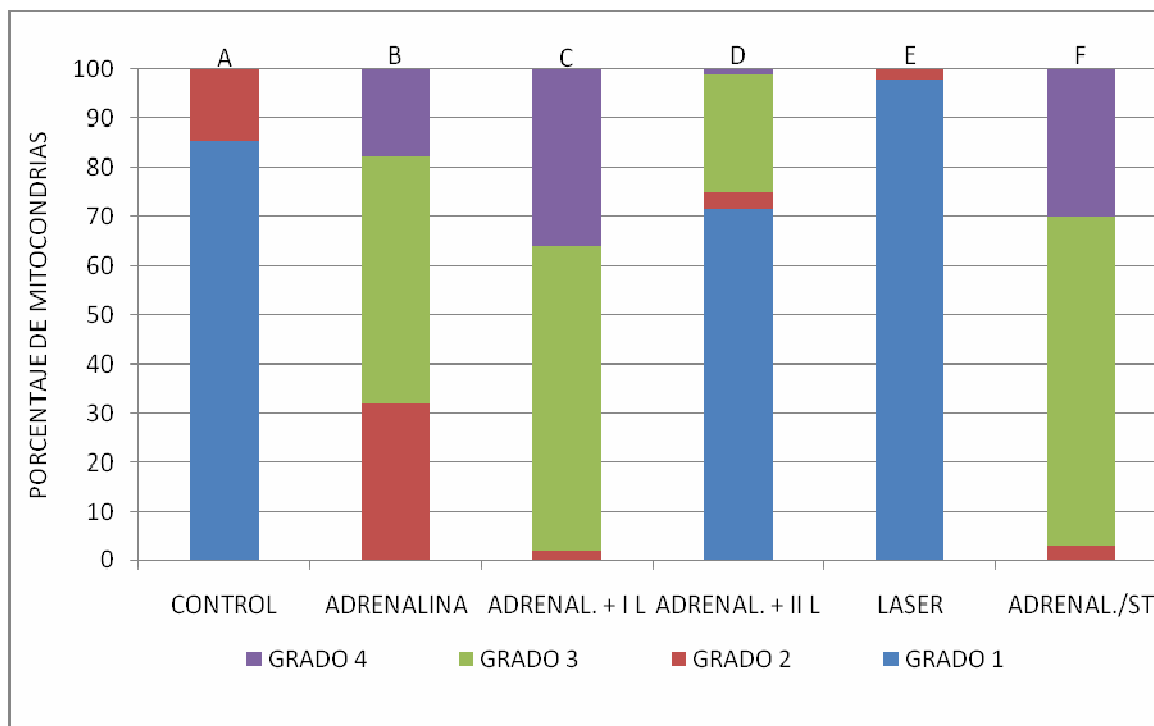
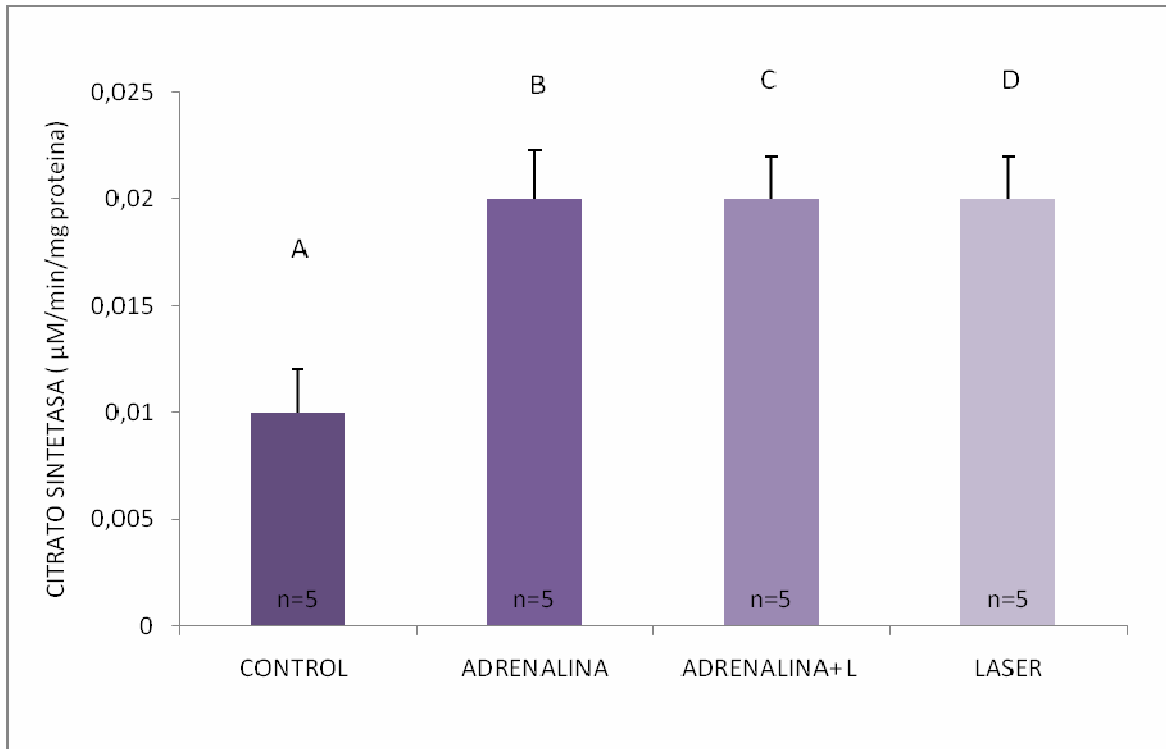


Fig. 54. Efecto del láser de He-Ne sobre los grados de alteración mitocondriales en ratas con miopatías inducidas con inyecciones de adrenalina (n=8).

IV) Resultados de la actividad enzimática:

Actividad enzimática de Citrato Sintasa.

El efecto del láser de He-Ne sobre la actividad enzimática de la Citrato Sintasa ($\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) en ratas con miopatías inducidas con inyecciones de adrenalina puede observarse en la **Fig.55**, donde no se observan cambios estadísticamente significativos entre los distintos grupos estudiados: control (0.01 ± 0.003) (A), ratas a las cuales solo se les inyectó adrenalina ($0,02 \pm 0,0031$) (B), ratas a las cuales se les inyectó adrenalina y posteriormente se las trató con láser de He-Ne ($0,02 \pm 0,004$) (C), y los grupos a los que sólo se les realizó el tratamiento con láser de He-Ne ($0,02 \pm 0,01$) (D).

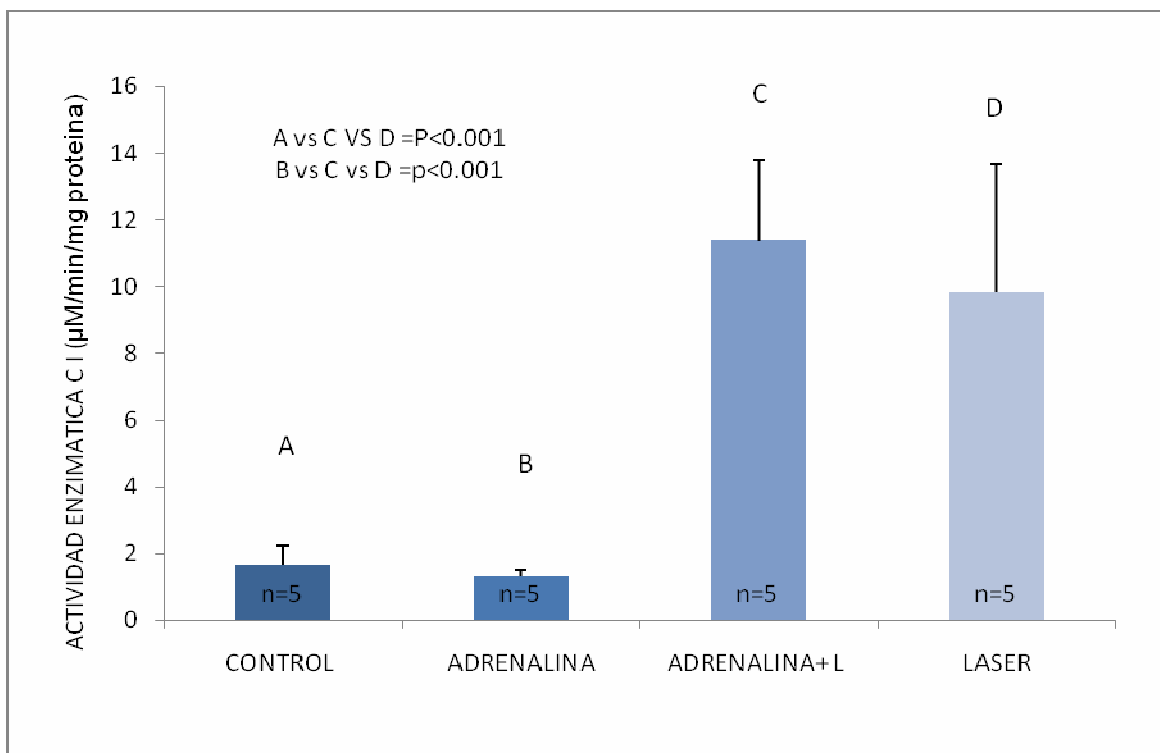


Cada barra expresa: Media \pm ES

Fig. 55. Efecto del láser de He-Ne sobre la actividad enzimática de la Citrato Sintasa en ratas con miopatías inducidas con inyecciones de adrenalina.

Actividad enzimática de los complejos de la Cadena Respiratoria (I a IV):

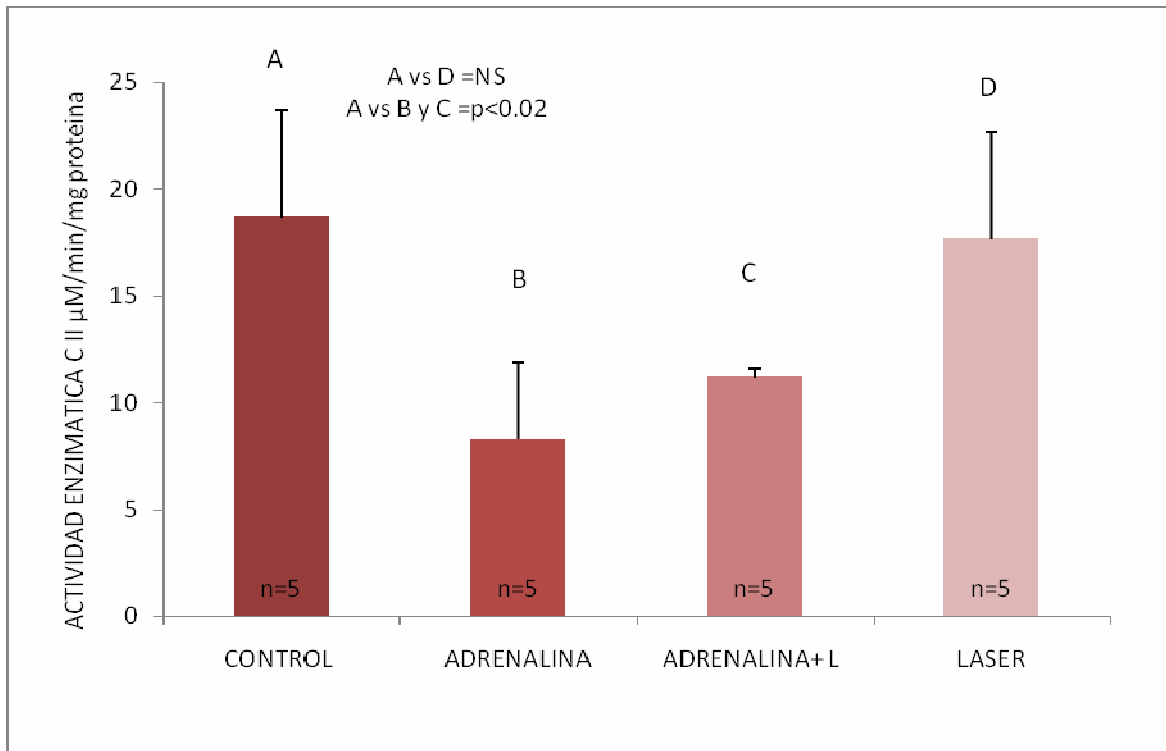
El efecto del láser de He-Ne sobre la actividad enzimática del **Complejo I** de la CRM (μ moles/min/mg de proteína) puede observarse en la **Fig.56**. Se aprecia un aumento significativo de la actividad enzimática en el grupo inyectado con adrenalina con tratamiento posterior de laser de He-Ne (11.38 ± 2.40) (C), y ratas a las que sólo se les realizó el tratamiento con láser de He-Ne (9.82 ± 3.84) (D) al compararlo con los siguientes grupos: control ($1.65 \pm 0,58$) (A), y a ratas a las cuales se les inyectó adrenalina sin tratamiento con láser de He-Ne (1.31 ± 0.18) (B). Comparando los lotes A, C, y D se obtuvo una $p < 0.001$, al igual que cuando se compara el lote B vs C y D se obtuvo una $p < 0.001$, en tanto al comparar el lote A vs B por un lado y el C vs D por otro no se obtuvieron datos significativos.



Cada barra expresa: Media \pm ES

Fig.56. Efecto del láser de He-Ne sobre la actividad enzimática del Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial en ratas con miopatías inducidas con inyecciones de adrenalina.

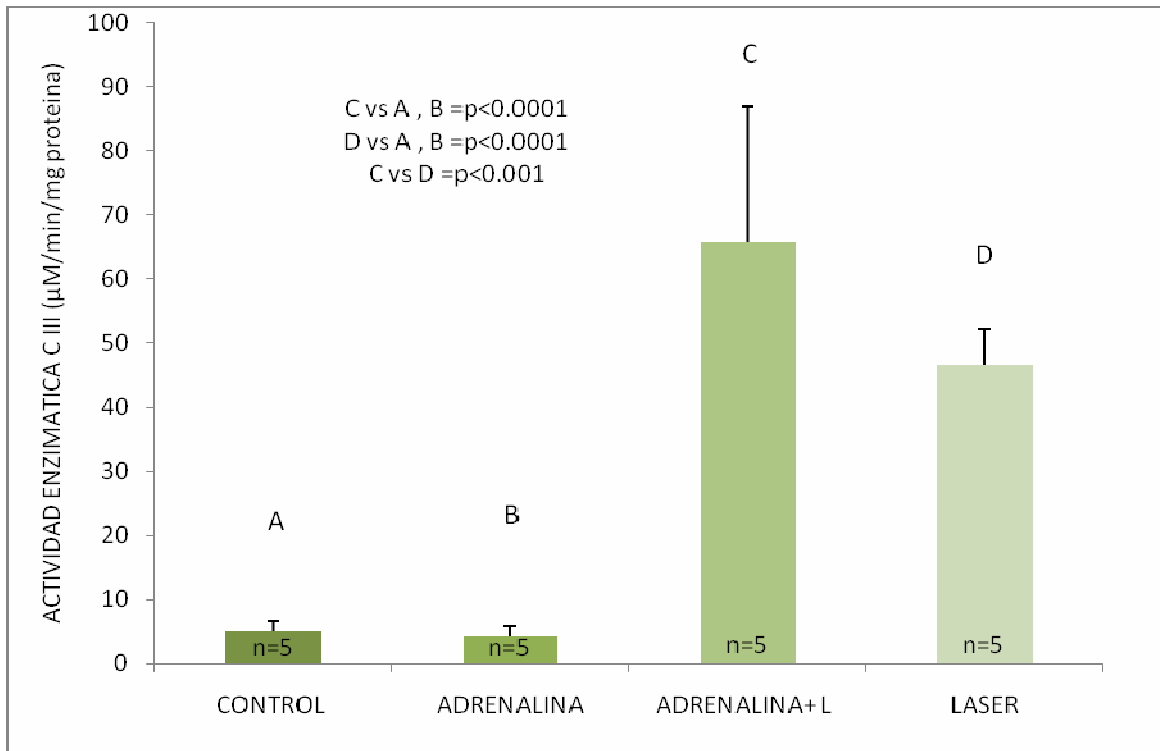
El efecto del láser de He-Ne sobre la actividad enzimática del **Complejo II** de la cadena respiratoria mitocondrial (μ moles/min/mg de proteína) se observa en la **Fig.57**. Se aprecia que hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control (18.68 ± 13.69) (A), al compararlo con la actividad enzimática de los siguientes grupos: inyectado con adrenalina (8.28 ± 3.62) (B), y ratas inyectadas y posteriormente tratadas con láser de He-Ne (11.19 ± 0.40) (C) ($p < 0.02$). A su vez no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con el láser de He-Ne (17.67 ± 9.29) (D) y el grupo control (A).



Cada barra expresa: Media \pm ES

Fig. 57. Efecto del láser de He-Ne sobre la actividad enzimática del Complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial en ratas con miopatías inducidas con inyecciones de adrenalina.

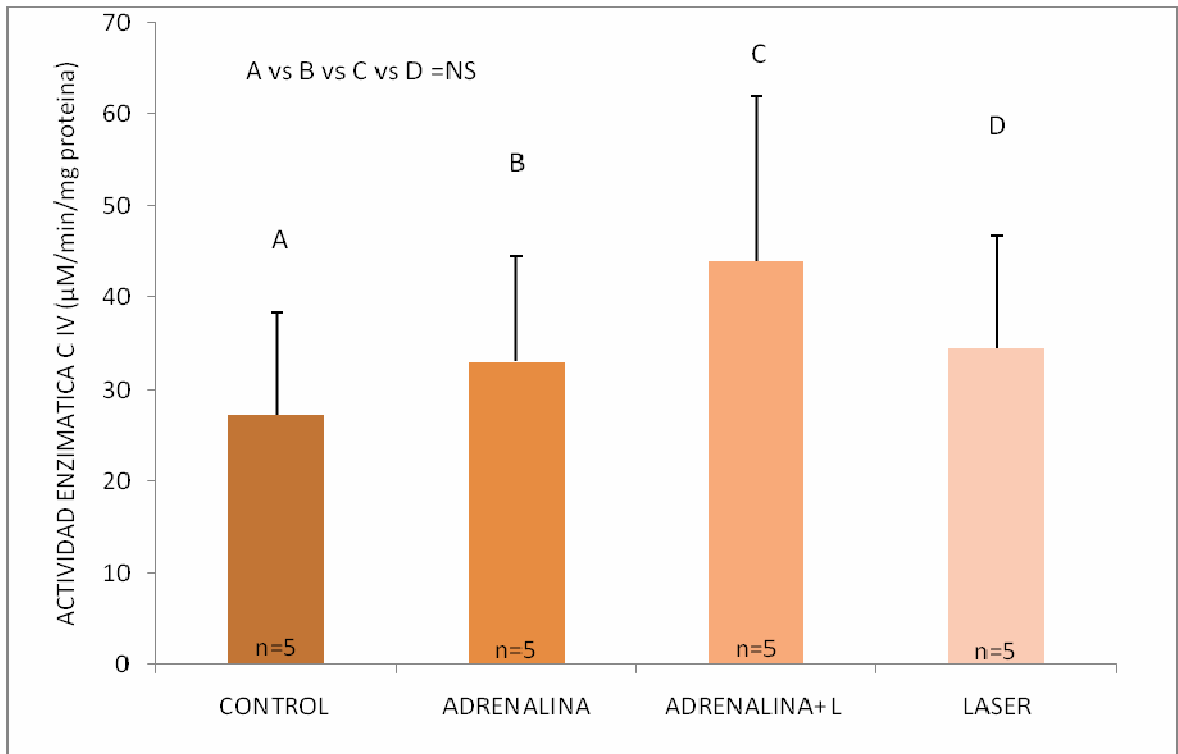
El efecto del láser de He-Ne sobre la actividad enzimática del **Complejo III** de la cadena respiratoria mitocondrial (μ moles/min/mg de proteína) se puede observar en la **Fig.58**, donde se evidencia que no existe diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control (5.03 ± 1.55) (A) y el grupo de ratas que se les inyectó adrenalina (4.27 ± 1.46) (B). Cuando se comparan los grupos (A) y (B) con los grupos de ratas a las cuales se les inyectó adrenalina y posteriormente se las trató con láser de He-Ne (65.84 ± 21.06) (C), y el grupo sólo tratado con láser de He-Ne (46.53 ± 5.61) (D) se obtienen valores estadísticamente significativos ($p < 0.0001$). Por otro lado se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos C vs D ($p < 0.001$).



Cada barra expresa: Media \pm ES

Fig.58. Efecto del láser de He-Ne sobre la actividad enzimática del Complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial en ratas con miopatías inducidas con inyecciones de adrenalina.

El efecto del láser de He-Ne sobre la actividad enzimática del **Complejo IV** de la CRM (μ moles/min/mg de proteína) se presenta en la **Fig.59**, donde se puede observar que no existe diferencia estadísticamente significativa comparando el grupo control (27.25 ± 11.04) (A) con el resto de los grupos: ratas a las cuales se les inyectó adrenalina y posteriormente se las trató con láser de He-Ne (43.97 ± 18.05) (C), el grupo inyectado con adrenalina (33.09 ± 11.36) (B), y el grupo que sólo se le realizó en tratamiento con el láser de He-Ne (34.60 ± 12.19) (D) .



Cada barra expresa: Media \pm ES

Fig.59. Efecto del láser de He-Ne sobre la actividad enzimática del Complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial en ratas con miopatías inducidas con inyecciones de adrenalina.

DISCUSIÓN

Las aplicaciones de láser en medicina se iniciaron en 1961 en Nueva York, donde se practicó con éxito la primera intervención quirúrgica con láser de rubí. Este es un láser de alta potencia, del orden de los 10^3 Vatios, conocido entre otros como “láseres quirúrgicos” de efecto térmico. A mediados de los años 60 se comenzaron a observar efectos muy significativos al utilizar radiaciones de energía muy inferiores, láseres de baja potencia del orden de los milivatios (10^{-3} Vatios), que no producen aumento de temperatura sino que tienen efecto fotoquímico y fotoeléctrico. Poco tiempo después, Mester, en Budapest, practica una serie de experiencias que pusieron de manifiesto los efectos estimulantes del láser de baja potencia, tanto en el área clínica como celular (73).

Actualmente existen láseres que cubren longitudes de onda desde el infrarrojo al ultravioleta con una gran variedad en potencias y aplicaciones biomédicas. Esta diversidad ofrece la posibilidad de seleccionar el equipo adecuado para cada especialidad, quirúrgica y no quirúrgica. Estos últimos de frecuencias débiles no llegan a romper uniones químicas. El efecto radiante del láser no se incluye dentro de las radiaciones *ionizantes*, *solo producen excitación electrónica* (74). Los **láseres de baja potencia** tienen gran aplicación en medicina por la variedad de efectos biológicos que producen al interactuar con los tejidos. Los más utilizados son los que emiten en la porción visible del espectro de las radiaciones electromagnéticas y en la porción del infrarrojo, entre ellos el de He-Ne y el de Arseniuro de Galio (As-Ga) respectivamente.

Estos láseres surgieron como herramientas útiles para nuevas posibilidades de tratamientos antiinflamatorios sin producir los efectos adversos de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). El mecanismo de acción de éstos es a través de la inhibición de las ciclooxigenasas: Cox-1 y Cox-2. La primera de ellas involucrada en el mantenimiento de la protección gástrica, el flujo renal, la

agregación plaquetaria, la migración de neutrófilos; la segunda es inducida por los mediadores de la inflamación en condiciones patológicas. La acción antiinflamatoria de los AINEs es a través de la inhibición de la Cox-2, y los efectos adversos se manifiestan al inhibir la Cox-1 (75, 76).

Los LLLT son antiinflamatorios, así como poderosos vasodilatadores de la circulación; producen incrementos en la síntesis del adenosintrifosfato mitocondrial, y logran inducir cambios significativos en la velocidad de síntesis del DNA y del RNA. Otros cambios primarios que se producen son: alteraciones en el contenido de prostaglandinas, liberación de histamina, incremento de las betaendorfinas, que explican su poder analgésico; incremento en la actividad de los fibroblastos, así como en la formación de colágenos y una mayor proliferación celular (73). Como consecuencia de estos efectos biológicos, se producen otros efectos indirectos que aparecen localmente y a distancia, tales como el estímulo de la microcirculación y los efectos sobre el trofismo celular. En cuanto al estímulo de la microcirculación, lo realiza actuando a través de mediadores como la histamina; este aumento de la microcirculación trae como consecuencia el efecto antiinflamatorio, al mismo tiempo que habrá un mayor aporte de elementos defensivos al eliminar los catabolitos, de igual forma aumentará el trofismo al elevarse los aportes de nutrientes y la oxigenación (73).

El mecanismo de acción de los láseres de baja potencia está asociado a las mitocondrias. La sensibilidad de éstas por las longitudes de onda monocromáticas ha sido confirmada por numerosos estudios en los que se observó el incremento del potencial electroquímico de membrana (77, 78).

Con el objetivo de estudiar el efecto antiinflamatorio, en el presente trabajo se realizó una injuria artro-muscular experimental a través de sucesivas inyecciones de cristales de hidroxapatita y pirofosfato de calcio en las articulaciones (artropatía) y de adrenalina en músculo (miopatía). Estas patologías experimentales se caracterizan por ser enfermedades adquiridas tanto en las articulaciones como en el músculo esquelético cursando las últimas con moderada a severa debilidad e inflamación muscular (79).

A los fines de estudiar los mecanismos patológicos subyacentes de las **artropatías** agudas, crónicas y evaluar la eficacia de diversos tratamientos, se desarrollaron modelos experimentales. Mediante la aplicación de distintos

cristales para generar **artritis por cristales** se intentó que la respuesta inflamatoria se aproxime a las manifestaciones de sus dos etapas, aguda y crónica. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con la bibliografía previamente consultada (41, 42, 43, 46).

Recientes estudios sugieren que los cristales de distinta naturaleza hallados en las articulaciones, entre ellos los de calcio, participan directamente en el daño del cartílago y de las articulaciones (80, 81).

El proceso inflamatorio común a numerosas patologías osteomioarticulares agudas y crónicas produce la liberación e interacción de mediadores químicos inflamatorios que marcan la evolución del proceso en distintos grados de la artropatía (1).

En las numerosas enfermedades articulares y musculares que presentan como denominador común un evento inflamatorio, se desencadena una respuesta en la que participan mediadores y especies intermedias que se consideran vinculadas a su etiología. Es por esto y por otras razones, que estudiamos los procesos inflamatorios como mecanismos nosológicos relevantes. Los distintos procedimientos realizados para lograr el control terapéutico de los procesos inflamatorios han pasado por diversas etapas, sin llegar al éxito completo, pues resulta difícil modular un evento fisiopatológico en el que intervienen tantos factores e intermediarios de muy variada naturaleza. Las expectativas de encontrar tratamientos antiinflamatorios más eficaces han experimentado recientemente un incremento. Dada la amplia utilización de los AINEs tanto en medicina humana como en veterinaria, se observa la constante aparición en el mercado de nuevos fármacos que aumentan su acción y disminuyen su toxicidad (82).

Con los avances de la biotecnología posibilitan nuevas opciones de tratamientos con menos efectos adversos. Es así que el láser de baja potencia ofrece una herramienta útil a la que se le atribuyó entre otras acciones terapéuticas el efecto antiinflamatorio, motivo del presente trabajo (41).

Si bien los modelos experimentales no reproducen con total fidelidad los reumatismos inflamatorios y degenerativos que padecen los humanos, son herramientas valiosas e indispensables para desarrollar y dilucidar el comportamiento metabólico de las células involucradas, los mediadores y/o

moduladores de la respuesta inflamatoria “in vivo”, como así también para ofrecer una orientación terapéutica en el desarrollo y efectividad de nuevos tratamientos antiinflamatorios (27, 83).

Con el fin de aportar más información acerca del efecto antiinflamatorio del láser de He-Ne, y en base a los trabajos previos realizados en nuestro laboratorio como también a la aplicación en paciente (41, 42, 43, 46) se realizó esta investigación.

En este trabajo nos propusimos estudiar el efecto del láser de baja potencia como posible terapia antiinflamatoria, por lo cual fue necesario reproducir las dos etapas del proceso inflamatorio: 1) aguda, en la cual la agresión por cristales se induce por corto tiempo y 2) crónica, en la cual el proceso flogósico se acentúa por la presencia del agente injuriante durante un periodo mas largo prolongando la inflamación (84).

Los presentes resultados demuestran la inducción de la artropatía con cristales de hidroxapatita al inyectarlos en distintos periodos de tiempo, durante 3 días (etapa aguda) y durante 2 semanas (etapa crónica). Los niveles de fibrinógeno en plasma tienen un incremento de concentración significativo con respecto a las ratas intactas, lo que demostraría el efecto lesivo de este cristal, confirmando la injuria articular pretendida.

Esto se deduce por que se ha demostrado luego de una injuria tisular que hay un considerable incremento en los niveles de concentración del fibrinógeno por aumento de su síntesis hepática (4, 41, 42, 43, 46, 59, 85), hecho que coincide con nuestros resultados.

En nuestros experimentos los grupos de ratas con inducción de artropatía con hidroxapatita y posteriormente tratados con láser por 3 días y por 2 semanas, la concentración del fibrinógeno plasmático disminuyó significativamente asemejándose a los valores del grupo control (**Fig.18**).

A los fines de tener la certeza de que el aumento del fibrinógeno se produjo por la acción injuriante de los cristales y no por su solvente, o por el estrés que podría haber provocado la inyección intraarticular (estímulo inespecífico), se inyectó solución fisiológica sola (solvente de los cristales) en las articulaciones posteriores de las ratas. Los resultados de este experimento mostraron que la concentración del fibrinógeno no varió con respecto al control, lo que demostró

que la artropatía se generó exclusivamente por la agresión de los cristales (**Fig.19**).

Finalmente, para conocer si la irradiación por sí sola podía provocar modificación de los niveles de fibrinógeno, se irradiaron las articulaciones sin haber inyectado algo previamente y pudo observarse que los niveles del fibrinógeno no sufrieron modificación con respecto al control, lo que demostró que el láser por sí sólo no provoca ningún cambio de concentración del fibrinógeno plasmático.

La L-citrulina es otro marcador que cobra importancia en el contexto de este trabajo experimental. Se genera como coproducto de la enzima iNOS en una ecuación equimolar en el ciclo L-citrulina-óxido nítrico de células sinoviales constituyendo un importante marcador temprano de enfermedades reumáticas (18, 19). Los valores de L-citrulina en ratas con artritis experimental sufrieron un aumento significativo de su concentración comparado con el grupo control, coherentemente con la bibliografía revisada (18).

Cuando los grupos de ratas con artritis por inyección de hidroxiapatita fueron tratados con láser de He-Ne se observó una disminución significativa de la L-citrulina; sin encontrar diferencias entre los grupos con artritis aguda y crónica. Podemos deducir que la L-citrulina se comporta en forma semejante al fibrinógeno, disminuyendo aproximadamente a los valores del grupo control después del tratamiento con LLLT (**Fig.20**).

Entre los tejidos que forman parte de una articulación, el cartílago es el que tiene mayor capacidad para sintetizar ON (16). Los resultados obtenidos en los grupos de ratas con artritis inducida, muestran un aumento significativo en la concentración del ON. Estos valores disminuyen significativamente cuando los grupos son tratados con el láser de He-Ne alcanzando los valores del grupo control confirmándose publicaciones previas acerca del su comportamiento del ON como marcador (18, 19).

Cuando el aumento del contenido de las EROs, como radical anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, etc., sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el **estrés oxidativo** (EO), a través del cual se induce daño a moléculas biológicas (33).

Como se realizó pruebas control, la medición del ON plasmático previa inyección de solución fisiológica en las articulaciones, no se observaron alteraciones de las concentraciones de ON ni tampoco cuando sólo se irradió con láser sin otro tratamiento en las articulaciones sanas (**Fig.21**).

Numerosas investigaciones han demostrado que el daño oxidativo debido a la sobreproducción de ON y EROs estarían comprometido en la patogénesis de osteoartritis. El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de estas enfermedades (20).

Es conocido por estudios realizados previamente que las ERNs tales como el peroxinitrito, reaccionan con residuos de tirosina de las proteínas para formar nitrotirosina. Esta incrementa y permite valorar el efecto tóxico del ON. Su expresión ha sido encontrada en tejidos y líquidos sinoviales de articulaciones de pacientes con artritis y artrosis (20, 23, 24).

En coincidencia con otros autores nuestros resultados evidencian que en los grupos de ratas con artritis por hidroxapatita, la nitrotirosina se presenta en elevada concentración en el plasma. Este compuesto no se encuentra en tejido normal (20, 23, 24), lo que indica que los cristales de hidroxapatita son responsables de la lesión articular, reflejada por los niveles elevados de nitrotirosina en plasma.

En los grupos de ratas con artritis crónica inducida durante 2 semanas y que posteriormente fueron tratados con láser de He-Ne la concentración de nitrotirosina disminuyó de manera significativa. Estos resultados indican que en las ratas con injuria el estrés nitrosativo está presente (38) y que disminuye después del tratamiento con láser de He-Ne (**Fig.22**).

A los fines de averiguar si los AINEs más prescritos en patologías reumáticas se comportan como el láser de He-Ne en procesos inflamatorios inducidos por cristales, se determinó la concentración de fibrinógeno en grupos de ratas con artritis por cristales de hidroxapatita y en aquellos con artritis inducida y posteriormente tratados con los diferentes AINEs. Los resultados mostraron que el tratamiento con las drogas **diclofenac**, **meloxicam**, **celecoxib** y **rofecoxib** disminuyeron de manera significativa la concentración de fibrinógeno, de manera semejante a los valores obtenidos en los grupos de ratas tratados con LLLT. Es

por ello lo que podríamos atribuir al láser la ventaja de provocar el mismo efecto que los AINEs sin sus efectos adversos (**Fig.23**).

Con respecto a la morfología de las articulaciones con artritis aguda se observó la presencia de cristales de hidroxapatita en el tejido celular subcutáneo alterado, con infiltrado inflamatorio y fibrosis (**Fig.25 a, b, c**). En la etapa crónica se evidenció un proceso inflamatorio más intenso, destacándose mayor compromiso del periostio, es decir que la aplicación de cristales a nivel de tejido producirían cambios importantes en la estructura del mismo en ambos casos (**Fig.27 a, b, c**).

Los cambios a nivel de tejido que producen los cristales de hidroxapatita se revirtieron cuando las ratas fueron tratadas con el láser de He-Ne. Se produjo una disminución del proceso inflamatorio. En el estudio morfológico correspondiente al periodo agudo no se encontraron cristales, probablemente debido a que fueron metabolizados.

En los estudios de tejidos correspondientes a la etapa crónica se observó una regresión de la inflamación, con persistencia de fibrosis y presencia de granulomas relacionados a la probable fagocitosis de los cristales (**Fig.26 a, b, c**). A los fines de lograr una reversión definitiva del proceso inflamatorio se necesitaría más tiempo de aplicación del láser en las lesiones en las zonas afectadas. La aplicación del láser de baja potencia actuaría interfiriendo con la acción conjunta de los mediadores en el lugar del daño tisular. Estudios realizados en otros modelos experimentales señalan al láser como factor responsable en desacelerar el proceso artrósico (41, 42, 43, 45, 86) (**Fig.28 a, b, c**).

La artropatía por depósito de **pirofosfato cálcico**, probablemente esté relacionada con una mayor actividad metabólica de los condrocitos, con mayor cantidad de pirofosfato que en las células de los individuos normales (11, 87). Cuando inyectamos pirofosfato cálcico en las articulaciones posteriores de las ratas se produjo un significativo incremento en la concentración de fibrinógeno plasmático tanto en la manifestación aguda como crónica experimental. Esto sugiere que el fibrinógeno se eleva independientemente de la naturaleza del cristal involucrado. También se observó que con el tratamiento con el láser de He-Ne la concentración de fibrinógeno alcanza valores similares a los del grupo

control (**Fig.29**). Otros autores obtuvieron resultados similares con biomarcadores inflamatorios como las prostaglandinas, confirmando la acción antiflogósica del láser (88).

Como se expresó anteriormente, un parámetro predictivo de una enfermedad reumática es la L-citrulina que se encuentra en elevada concentración en los estados tempranos de la patología (18) (**Fig.30**). Por otra parte, la concentración de L-citrulina se eleva significativamente en ratas con artritis inducidas por cristales de pirofosfato cálcico, comparando con el grupo control, comportándose éste biomarcador igual que lo observado en la artritis inducida por hidroxapatita. En el grupo 3 y en el grupo 5 de ratas que fueron tratados con el láser de He-Ne se observó una concentración significativa menor de L-citrulina confirmando su efecto antiinflamatorio. Esto también fue corroborado por el estudio anatomopatológico, en el cual se observaron en el experimento agudo menor evidencia de un proceso inflamatorio (**Fig.32 a, b**), y en la etapa crónica menor estado flogósico (**Fig.34 a**). La membrana sinovial mostró inflamación moderada y hubo reemplazo por tejido fibroadiposo (**Fig.34 b**).

Otros autores mostraron que el tratamiento con el láser de He-Ne aumentaría la biosíntesis del cartílago artrítico y produciría progresos en la reversión del proceso inflamatorio observables a nivel histopatológico en la articulación (89), lo cual coincide con las observaciones del presente trabajo.

En conclusión el estudio morfológico permite deducir que se reprodujo satisfactoriamente el proceso inflamatorio agudo a los 3 días (**Fig.31 a y b**) y crónico a las 2 semanas de la inyección con los cristales de pirofosfato de calcio (**Fig.33 a y b**). Se observó infiltrado inflamatorio, destrucción de fibras musculares, granulomas, vasos sanguíneos congestivos, fibrosis y sinovitis; todos estos son rasgos característicos de la inflamación (**Fig. 32 a y b ; Fig. 34 a y b**)

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sustentan el efecto benéfico del láser de He-Ne sobre las cristalopatías inducidas, evidenciado por la significativa reversión del aumento de las concentraciones en plasma de los diferentes biomarcadores estudiados: fibrinógeno, óxido nítrico, L-citrulina y nitrotirosina. Trabajos de otros autores en artropatías experimentales por cristales mostraron coincidentemente evidencias de cambios en la evolución histológica del

proceso inflamatorio después del tratamiento con LLLT (41, 42, 43) (**Fig. 32 a y b; Fig. 34 a y b**).

El uso del láser de baja energía es una estrategia innovadora para superar las múltiples barreras en el manejo de enfermedades osteoarticulares con alto impacto epidemiológico en distintos países. El efecto bioestimulador del láser hace referencia a que se producen cambios a nivel celular en ausencia de calor, en base de un efecto sobre el estado de óxido-reducción de la célula y se produciría el resultado deseado del tratamiento terapéutico (53).

Las reacciones fotobiológicas implican la absorción de luz de una longitud de onda específica para el funcionamiento de las moléculas fotorreceptoras. Estas absorben la luz, ascienden a estados electrónicamente excitados y los procesos moleculares subyacente podrían ser mensurables a nivel celular. Existen varias hipótesis al respecto, pero el interrogante que aún no ha sido respondido es cuál es la molécula fotorreceptora y cuáles son al detalle los cambios enzimáticos que se producen a nivel de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial y que originarían los efectos biológicos benéficos del láser de He-Ne (52, 54).

Según nuestros resultados, el láser de He-Ne atenúa el proceso inflamatorio inducido por cristales de hidroxapatita y pirofosfato cálcico en ratas evidenciado por la reversión del aumento de los marcadores plasmáticos inflamatorios y de estrés oxidativo y nitrosativo. Esto se debe posiblemente a la acción del láser de He-Ne sobre la actividad enzimática de la cadena respiratoria mitocondrial que contendría los fotorreceptores. Esta hipótesis explicaría los efectos antiinflamatorios benéficos del láser.

Se puede especular que el bloqueo selectivo que se supone podría provocar el láser de He-Ne sobre la Cox-2, produce alta eficacia antiflogósica al actuar localmente sobre el foco inflamatorio.

Los resultados a nivel celular muestran una mejora del proceso flogósico en el cual los distintos eventos marcan una regresión de la inflamación por acción del láser aumentando la microcirculación (41, 42, 43, 46). Esto ayudaría a reducir el edema y a estimular los procesos de reparación celular. En efecto, la visualización macroscópica de las articulaciones nos evidencia que tras el tratamiento con el láser, la inflamación articular disminuyó notoriamente.

Los resultados obtenidos brindan una orientación del uso antiinflamatorio del láser de He-Ne en artropatías como una opción positiva para contrarrestar los efectos producidos por patologías reumáticas, sin provocar efectos adversos.

A continuación analizaremos los fenómenos inflamatorios musculares producidos por inyecciones de adrenalina en los miembros posteriores de las ratas. A fin de descartar el posible efecto del estrés y su repercusión en los diversos tejidos a causa de las inyecciones de adrenalina se tomaron en cuenta trabajos previos de nuestro laboratorio (58) en los cuales se determinó adrenalina plasmática (endógena) en un grupo de ratas control al cual se le realizaron inyecciones de solución fisiológica, y en otros grupos inyectados con adrenalina por diferentes periodos de tiempo con el objetivo de inducir un proceso inflamatorio. Dicho trabajo concluyó que la inflamación era generada por la adrenalina exógena sin que interfiera la hormona vasoactiva secretada por las glándulas suprarrenales (adrenalina endógena), dado que se observó una concentración significativamente menor de ésta en plasma en los grupos de ratas a los cuáles se les realizó la injuria en comparación con el grupo normal. Este efecto se postuló que podría estar dado a causa de un sistema tipo down-regulation, probablemente debido a una disminución del número de receptores disponibles (58).

Para una mejor interpretación de los resultados del efecto del láser en las miopatías se ha organizado la exposición de esta discusión en diferentes secciones:

- I) Biomarcadores: fibrinógeno, L-citrulina, óxido nítrico y nitrotirosina.
 - II) Análisis morfológico por microscopía óptica, electrónica e histomorfometría mitocondrial.
 - III) Con el objeto de medir la capacidad funcional de la mitocondria posterior a la irradiación con LLLT, se analizó la actividad del ciclo de Krebs (Citrato sintasa) y los complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria.
- I) Biomarcadores: fibrinógeno, L-citrulina, óxido nítrico y nitrotirosina

Las inyecciones de adrenalina causan un incremento de **fibrinógeno plasmático (Fig.37)** diferenciándose significativamente del grupo control, lo que demuestra el efecto lesivo de las mismas. Los resultados son coincidentes con investigaciones previas realizadas con aplicación de distintos agentes injuriantes (4, 42, 43, 46, 85).

En los grupos de ratas a los cuales se les realizó la injuria con adrenalina y posteriormente el tratamiento con el láser de He-Ne, se evidenció un valor significativamente menor en los niveles de fibrinógeno asemejándose a los valores normales, sin existir diferencias significativas entre los grupos comparados. Además, se observó que estos valores no se diferenciaron estadísticamente en comparación con los grupos a los que solo se les realizó el tratamiento con láser de He-Ne (sin previa inyección), lo que demuestra que la irradiación por sí sola no provoca variación en los niveles de fibrinógeno. La **L-citrulina**, como se mencionó anteriormente es otro biomarcador que cobra importancia como indicador temprano de enfermedades reumáticas (90).

El aumento significativo de los valores de L-citrulina en el grupo de ratas a las cuales se les realizó la injuria muscular en comparación con el grupo control coincide con datos de la bibliografía revisada (90).

Es posible confirmar (**Fig.38**) que L-Citrulina se comporta de manera similar al fibrinógeno, normalizándose los valores de ambos luego de los tratamientos con LLLT, ejerciendo la aplicación de éstos un efecto antiinflamatorio sin consecuencias negativas estudiadas hasta la fecha.

El **ON** es sintetizado durante el proceso inflamatorio por macrófagos a través de la iNOS. Se considera la membrana interna de la mitocondria como el sitio intracelular donde se generan la mayor cantidad de dicho gas a través de la enzima óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) (33, 91). Los presentes resultados evidencian un aumento de la concentración de ON en el grupo de ratas a las cuales se les realizó la injuria muscular con adrenalina, lo cual se correlaciona con el incremento observado de L-citrulina (**Fig.39**). Si bien el ON es producido en grandes cantidades bajo condiciones asociadas a procesos inflamatorios (92), cuando se encuentra en concentraciones elevadas, en parte se autooxida generando trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), y en parte reacciona con el superóxido (O_2^-) formando peroxinitrito ($ONOO^-$) (38). El significativo aumento de

éste radical libre y la posible presencia de ONOO^- estarían indicando la existencia de estrés oxidativo, ya que al poseer electrones sin neutralizar son moléculas altamente reactivas que provocan daños irreparables sobre los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades; se perpetúa el proceso inflamatorio por diferentes mecanismos. Entre ellos la quimiotaxis de polimorfonucleares y la activación del factor nuclear kappa B (NFkB) por parte de mensajeros secundarios. Este factor migra al núcleo y se estimula selectivamente la transcripción de proteínas específicas de la inflamación. Se induce la transcripción de aquellos genes que promueven la producción de citocinas como la Il6, la Il8 y moléculas de adhesión como la ICAM-1 (1). De este modo se agudiza o perpetúa el proceso inflamatorio (20, 33, 41, 93).

Elevadas concentraciones de ONOO^- en procesos inflamatorios al reaccionar con residuos de tirosina forman nitrotirosina, variable encontrada elevada en plasma de ratas inyectadas sucesivamente con adrenalina intramuscular en elevadas concentraciones (**Fig.40**).

El láser de He-Ne podría ejercer un efecto antiinflamatorio, ya que en los grupos injuriados y posteriormente tratados con el láser de He-Ne los valores de ON y L-citrulina se encontraron próximos al grupo control. Por otro lado no se observó un efecto significativo sobre dichos biomarcadores en los grupos tratados solamente con los LLLT. Estos resultados nos estarían indicando que el láser de He-Ne podría estar regulando los niveles de EROs (51), posiblemente actuando a nivel de la membrana interna mitocondrial, donde no sólo tiene lugar parte de la síntesis de ON sino también donde se produce la mayor cantidad de O_2^- (33).

II) Análisis morfológico por microscopía óptica, electrónica e histomorfometría mitocondrial:

La inyección de adrenalina produjo a nivel de los miembros posteriores de las ratas un significativo infiltrado inflamatorio mononuclear, edema, destrucción de fibras musculares y su reemplazo por tejido conectivo y material necrótico, con escasas fibras musculares conservadas y efecto miopático generado por la adrenalina (**Fig.43 a**). Esto demuestra que el modelo experimental diseñado resultó adecuado para desencadenar los procesos inflamatorios a ser estudiados.

Las alteraciones morfológicas en el músculo de las ratas injuriadas fueron observadas con microscopía óptica en el músculo esquelético (**Fig.43 b**). Se pusieron de manifiesto las alteraciones con la tinción de Tricrómica de Gomori que mostró fibras colágenas teñidas de azul y fibras musculares estriadas con marcada citólisis. Se observó moderado infiltrado inflamatorio en relación a las fibras destruidas (**Fig.43 b**).

La microscopia electrónica (ME) reveló una marcada desorganización de las fibras musculares, perdiéndose la regularidad de las miofibrillas del músculo normal (**Fig.44 a, b, c**).

Posteriormente se aplicó una dosis de tratamiento con láser de He-Ne a las ratas injuriadas con adrenalina y se observaron fibras musculares conservadas, persistiendo la reacción inflamatoria aunque sin material necrótico (**Fig.45 a y b**). El estudio por microscopía electrónica mostró una disposición conservada del músculo esquelético (**Fig.46 a**).

Cuando a las ratas inyectadas con adrenalina se las trató con doble dosis de láser de He-Ne se observó una moderada reacción inflamatoria con escaso tejido conectivo y fibras musculares estriadas conservadas. La observación por microscopia electrónica mostró una disposición estructural también conservada, siendo muy parecida a la del grupo control (**Fig.47 a y b**).

El análisis a nivel mitocondrial del músculo esquelético demostraría que la serie de modificaciones de estrés oxidativo (aumento de O_2^- , $ONOO^-$ y nitrotirosina) en el grupo injuriado provoca alteraciones en la morfología. Se observó en efecto un aumento del tamaño de las mitocondrias y desorganización de las crestas mitocondriales con aclaramiento de la matriz mitocondrial. En este grupo se pone de manifiesto el grado IV de alteración, evidenciándose crestas o restos de ellas y una condensación de la matriz, condición denominada tumefacción (94,95).

Asociado a las alteraciones descritas, se produce pérdida de la integridad de la membrana celular generando un incremento de la hidratación de la matriz mitocondrial. Se alteraría de manera directa la permeabilidad de la membrana y por consiguiente existirían posibles repercusiones en la funcionalidad de la cadena respiratoria mitocondrial con la consiguiente mayor cantidad de EROs; las

cuales en concentraciones elevadas deterioran la mitocondria por efecto del estrés oxidativo (95, 96, 97, 98, 99).

El análisis del número de mitocondrias mostró diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó los grupos de ratas injuriadas con adrenalina y tratadas con láser y aquellos grupos de ratas injuriadas sin tratamiento, correlacionándose el aumento del número de mitocondrias en los grupos tratados con láser con la disminución del grado de alteración mitocondrial observado en la ME (**Fig.50 a, b c, y d y Fig.53**).

En los grupos de ratas con injuria muscular y posterior aplicación de los tratamientos con el láser de He-Ne la alteración mitocondrial manifestó una marcada mejoría, ya que se observó (**Fig.48 a y b**) a través de microscopía electrónica, alteraciones de grados I y II. Por los efectos del láser la mitocondria adquiere su tamaño normal y se reorganizan las crestas mitocondriales. A su vez, la terapia empleada influye sobre la reconstitución las fibras musculares, conservando su disposición normal. Consideramos que estos cambios se deben, como se mencionó previamente, al estímulo de la microcirculación. Se produce el incremento de la velocidad de la corriente sanguínea y de ésta forma un aumento de la recolección de exudado de elementos celulares de defensa en el tejido afectado y de la fagocitosis. Otros fenómenos celulares se estimulan, tales como la producción de ATP, la síntesis proteica, y la multiplicación celular, las cuales favorecen la velocidad de los fenómenos reparativos. Se ha demostrado que la susceptibilidad del músculo esquelético al tratamiento estaría relacionada a su elevado contenido mitocondrial y a la presencia de células satélite; las cuales, se ha descrito, son estimuladas por la irradiación láser de baja potencia (100). Es necesario recordar que ésta población celular que se sitúa sobre la fibra muscular por debajo del sarcolema está involucrada en la regeneración del músculo esquelético, participando además en su crecimiento, lo cual, aportan núcleos y la masa citoplasmática a la fibra muscular (28).

Para valorar el efecto de la irradiación del láser por si sola sobre músculo y la mitocondria (**Fig.49 a, b y Fig.50 a, b, c, d**) se realizaron los tratamientos en diferentes grupos de ratas con el láser de He-Ne, en donde se observaron fibras musculares conservadas y mitocondrias con grado de alteración I, lo que corresponde a mitocondrias de tamaño y crestas normales. Este

experimento confirma que el láser por si solo aplicado al músculo normal no produce cambios estructurales tisulares ni mitocondriales (100).

Se realizaron estudios sobre ratas injuriadas con adrenalina y sin tratamiento con láser de He-Ne. Se observó en la MO una baja estructuración del tejido, zonas de necrosis y ruptura de fibras en comparación con el grupo inyectado con adrenalina y tratado con una sola dosis de láser. Al estudiar este grupo por ME se observó alteración de las fibras musculares, y mitocondrias con alteración de grado III.

III) Con el objeto de medir la capacidad funcional de la mitocondria posterior a la irradiación con LLLT, se analizó la actividad del ciclo de Krebs (Citrato sintasa) y los complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria:

Como ya se mencionó la cadena respiratoria provee más del 90% de ATP celular mediante la oxidación de transportadores de alta energía (NADH y FADH_2), y el proceso de fosforilación oxidativa. Esta energía es necesaria para la contractibilidad muscular y para el cumplimiento de otras funciones metabólicas.

Un defecto en cualquier componente de la cadena respiratoria puede comprometer la capacidad de la fosforilación oxidativa y la disponibilidad de energía (90). La presencia de deleciones del ADN mitocondrial (ADNm) han permitido confirmar que las especies reactivas juegan un importante rol en el daño oxidativo. El ADNm es altamente susceptibles al daño por oxidantes reactivos debido a la falta de histonas protectoras, dado que el ADNm tiene escasa capacidad de reparación y porque gran parte de las especies reactivas del oxígeno no pueden atravesar tan fácilmente la membrana mitocondrial y quedan potenciando el daño sobre el ADN (101).

Numerosos estudios confirman que el fotoceptor de los LLLT sería la citocromo c oxidasa (complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial) (77, 78, 102), resultados en los que la bibliografía analizada presente mucha controversia. En el presente trabajo se propuso ampliar el campo de conocimiento acerca de los sitios de acción de la longitud de onda del láser de He-Ne sobre los complejos mitocondriales. La citocromo c oxidasa es la última enzima de la cadena respiratoria mitocondrial. Su excitación conduce a un incremento de la síntesis de ATP y por consiguiente se incrementa la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa y

la bomba de Ca^{+2} . Por otro lado, el ATP es el sustrato del AMPc, el cual en conjunto con el Ca^{+2} son muy importantes como segundos mensajeros, regulando numerosos procesos en el cuerpo humano (contracción muscular, expresión de genes, etc.) (102).

En base a los resultados obtenidos sobre la actividad mitocondrial por determinación de la **citrato sintasa (Fig.55)**, no se detectaron diferencias significativas en los grupos tratados y/o injuriados. En ningún grupo se observó una inactivación del ciclo de Krebs.

Con respecto al **complejo I** de la cadena mitocondrial (**Fig.56**) no se observó cambio de actividad de la NADH-ubiquinona reductasa en el grupo de ratas a las cuales se les realizó la injuria con adrenalina comparándolo con el grupo control. Por otro lado, se han encontrado en la bibliografía que en casos en los cuales el ON se haya en concentraciones elevadas se inactivaría la cadena respiratoria mitocondrial, específicamente disminuyendo la actividad de la NADH-ubiquinona reductasa (103), hecho que se correlaciona con las altas concentraciones plasmáticas de ON en el grupo injuriado y lo observado acerca de la actividad de dicha enzima en el complejo I.

En los grupos de ratas a los que se les realizaron los tratamientos con el láser, tanto los previamente injuriados como los sin injuria, se observó aumento de la actividad enzimática del complejo I, por lo que inferimos que la longitud de onda del laser de He-Ne ejercería efecto sobre dicha enzima mitocondrial.

Al analizar los resultados del **complejo II (Fig.57)** se evidenció una disminución de la actividad de dicha enzima en los grupos de ratas injuriados sin tratamiento y con tratamiento de láser de He-Ne con respecto al grupo control, lo que indica que la adrenalina tendría un efecto depresor de la actividad enzimática del complejo II, no reversible por el tratamiento con láser. También observamos que la actividad enzimática del complejo II no sufrió alteraciones cuando se comparó con el grupo control y con el grupo solamente irradiado. Las causas por las que el láser de He-Ne no producen el efecto fotolumínico estarían relacionadas con que el citocromo b que a pesar de encontrarse en la molécula del complejo II, no está en el camino de los electrones, sirviendo sólo como defensa antioxidante (34, 104, 105, 106).

Con respecto al **complejo III**, se observó que la actividad de dicha enzima mitocondrial permanece prácticamente inalterada cuando comparamos el grupo injuriado con adrenalina y el grupo normal. Sin embargo, se observó un aumento significativo de la actividad de este complejo cuando se aplicó láser tanto al grupo injuriado como al grupo al que solo se le aplicó LLLT.

Para explicar las posibles causas del aumento de la actividad del Complejo III nos referirnos a su estructura, en la cual se puede observar la presencia de proteínas de Rieske y citocromos b y c (**Fig.58**). Estas proteínas también se encuentran en los cloroplastos de las células de las plantas verdes actuando también como fotoreceptores en las células procariontes (34, 104, 105, 106). Una versión del complejo III es el citocromo bf que se encuentra en el aparato fotosintético de las cianobacterias y cloroplastos conectando los fotosistemas I y II. Los centros de reacción fotosintéticos están formados por una clorofila especial que actúa de trampa energética desde donde la energía radiante no puede transmitirse sino en forma de energía electrónica. El fotón de energía $h\nu$ es captado por pigmentos (carotenos y clorofila) que forman una antena receptora de luz, pudiendo inferirse que algo similar ocurriría con el complejo III. La molécula fotoaceptora transfiere esta energía (excitón) a otras moléculas no excitadas de propiedades eléctricas similares. El excitón se transmite de manera que, si el acoplamiento electrónico es fuerte el grupo de moléculas actúa como una supermolécula excitada. En el centro de reacción, la energía eléctrica está asociada con un electrón excitado (e^{\ominus}) a un nivel superior de energía. En el caso del complejo III, el láser de He-Ne proveería dicho fotón excitado y cuando éste vuelve a su estado basal, se conserva la energía lumínica como energía redox (104). De acuerdo a lo expuesto podemos inferir que el efecto fotolumínico del láser de He-Ne actúa principalmente en el complejo III, ya que la similitud funcional con los fotosistemas I y II del cloroplasto es importante, tal como lo afirmó por la teoría endosimbiótica sobre el origen común de las mitocondrias y los cloroplastos en las células eucariontes (104, 105, 106, 107).

Con respecto al **complejo IV (Fig.59)**, se observó cierta incongruencia en los resultados obtenidos y existe controversia con resultados de trabajos previos. Si bien no son abundantes los estudios realizados se considera en la literatura que el fotoaceptor de los LLLT sería el complejo IV. Los resultados obtenidos en

el presente trabajo indicarían lo contrario, ya que la actividad de la citocromo c-oxidasa es la que se encontró menos afectada por el láser de He-Ne; sin cambios significativos entre los distintos grupos estudiados (50).

CONCLUSIONES

- La ausencia de modificación en la concentración del fibrinógeno y ON plasmático en ratas solamente inyectadas con solución fisiológica, nos demuestra que son los cristales los causantes del proceso inflamatorio, lo cual fue corroborado con el estudio morfológico realizado.
- La irradiación del láser de He-Ne sobre las articulaciones sanas no produce modificaciones sobre los biomarcadores inflamatorios estudiados, ni sobre la morfología.
- Las alteraciones estructurales producidas por la inyección de los cristales de HP y PF en las articulaciones de las ratas, sufren una reversión significativa una vez tratada las ratas con láser de He-Ne.
- Tanto los AINEs como el láser de baja energía producen disminución semejante de la concentración de fibrinógeno plasmático de las ratas con artritis experimental.
- Los resultados morfológicos evidencian que las etapas aguda y crónica de la artritis se reprodujeron satisfactoriamente en forma experimental con la inyección de cristales a los 3 días y 2 semanas respectivamente.
- De los dos cristales utilizados en esta investigación, el PFCa resultó ser más injurioso que la HP, hecho demostrado por las alteraciones observadas a nivel tisular.
- Las inyecciones de adrenalina generan un proceso inflamatorio evidenciado por las variaciones de los biomarcadores fibrinógeno plasmático, L-citrulina, ON y nitrotirosina, correlacionadas con las alteraciones morfológicas estructurales.

- La irradiación del Láser de He-Ne no provoca cambios sobre los niveles de biomarcadores inflamatorios y de estrés oxidativo estudiados, tampoco variaciones estructurales a nivel tisular y mitocondrial.
- Las alteraciones estructurales en músculo y mitocondrias producidas por las sucesivas inyecciones de adrenalina (alteraciones de grado III y IV) sufrieron una regresión significativa cuando fueron tratadas con el láser de He-Ne (alteraciones de grado I y II), confirmando su efecto antiinflamatorio.
- La cantidad de mitocondrias se ve significativamente afectada por las inyecciones con adrenalina.
- El láser actúa aumentando la actividad enzimática de los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial.

BIBLIOGRAFIA

- 1-Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Inflamación aguda y crónica. Patología estructural y funcional. 7° Edición. Elsevier Saunders. 2005.
- 2-G. de la Fuente. Fisiopatología de la Inflamación. www2.udec.cl/~gdelafue/web/Inflama.pdf. 2004.
- 3- Blankenberg S, Barboux S y Tiret L. Adhesion Molecules and Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 170: 191-203. 2003.
- 4- Chicu M, Badescu M. Paraclinical methods for the assessment of chronic rheumatic inflammatory processes. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 109: 90-95. 2005.
- 5- Couderc R, Mary R, Veinberg F. Marcadores de inflamación en pediatría. *Acta Bioquim. Clin Latinoam* 38: 513-517. 2004.
- 6- Dalbeth N, Haskard DO. Inflammation and tissue damage in crystal deposition diseases. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17: 314-318. 2005.
- 7- McCarty DJ, Hollander JL. Identification of urate crystals in gouty synovial fluid. *Ann Intern Med* 54: 452-460. 1961.
- 8- Faires JS, McCarty DJ. Acute arthritis in man and dog after intrasynovial injection of sodium crystals. *Lancet* ii:682-684. 1962.
- 9- Wu CW, Terkeltaub R, Kalunian KC. Calcium-containing crystals and osteoarthritis: implications for the clinician. *Curr Rheumatol Rep* 7:213-219. 2005.
- 10- Wise CM. Crystal-associated arthritis in the elderly. *Rheum Dis Clin North Am* 33: 33-35. 2007.

11- Martínez Taboada VM, Blanco Alonso R, Alonso Bartolomé B, Rodríguez Valverde V. Artropatías microcristalinas II. Artritis por pirofosfatos. *Medicine* 8: 1773-1780. 2001.

12- Schneider I. Calcium pyrophosphate dihydrate-crystal induced arthropathy. *J Rheumatol* 63: 10-21. 2004.

13- Li-Yu J, Clyburne GM, Sieck MS, Walker SE, Athreya BH, DeHoratius RJ, Schumacher HR. Calcium apatite crystals in synovial fluid rice bodies. *Ann Rheum Dis* 61: 387-390. 2002.

14- Garcia GM, McCord GC, Kumar R. Hydroxyapatite crystal deposition disease. *Semin Musculoskelet Radiol* 7: 187-193. 2003.

15- Piscoya Arbañil JL. Revisión Sistemática de Osteoartritis. 27/10/2005 Lima. Perú.

16- Choi JW. Nitric oxide production is increased in patients with rheumatoid arthritis but does not correlate with laboratory parameters of disease activity. *Clin Chim Acta* 336: 83-87. 2003.

17- Pham TN, Rahman P, Tobin YM, Khraishi MM, Hamilton SF, Alderdice C, Richardson VJ. Elevated serum nitric oxide levels in patients with inflammatory arthritis associated with co-expression of inducible nitric oxide synthase and protein kinase C- η in peripheral blood monocyte-derived macrophages. *J Rheumatol* 30: 2529-2534. 2003.

18- Marini V, Babini A, Moretti E. Determinación de citrulina y óxido nítrico en el suero de pacientes con artritis reumatoidea y otras enfermedades reumáticas. *AAIC* 35: 39-45. 2004.

19- Ciurtin C, Cojocaru VM, Miron IM, Preda F, Milicescu M, Bojinca M, Costan O, Nicolescu A, Deleanu C, Kovacs E, Stoica V. Correlation between different

components of synovial fluid and pathogenesis of rheumatic diseases. *Rom J Intern Med* 44: 171-181. 2006.

20- Yudoh K, van Trieu N, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther* 7: 380-391. 2005.

21- Saavedra Molina A, Calderón Cortez E, Sierra Campos E, Cortés rojo C, Gaona Zamudio FJ, Clemente Guerrero M. Papel patofisiológico del óxido nítrico mitocondrial. *Mensaje Bioquímico Vol XXVIII*. 27-38 UNAM. México. 2004.

22- Herce-Pagliai C, Kotecha S, Shuker DE. Analytical methods for 3-nitrotyrosine as marker of exposure to reactive nitrogen species: a review. *Nitric Oxide* 2: 324-336. 1998.

23- Sandhu J, Robertson S, Birnboim H. Distribution of protein nitrotyrosine in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Rheumatol* 30: 1173-81. 2003.

24- Van der Harst M, Bull S, Brama PA, Barneveld AB, van Weeren PR, van de Lest C. Nitrite and nitrotyrosine concentrations in articular cartilage, subchondral bone, and trabecular bone of normal juvenile, normal adult, and osteoarthritic adult equine metacarpophalangeal joint. *J Rheumatol* 33: 1662-1667. 2006.

25- Kaur H, Halliwell B. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Letters* 350: 9-12. 1994.

26- Lotito AP, Muscara MN, Kiss MH, Teixeira SA, Novaes GS, Laurindo IM, Silva CA, Mello SB. Nitric oxide-derived species in synovial fluid from patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 31: 992-997. 2004.

- 27- van den Berg WB. Animal models of arthritis. What have we learned ? J Rheumatol Suppl72: 7-9. 2005.
- 28- Ross M, Kaye G, Romrell, L. Histología. Texto y Atlas color. Ed. Panamericana 212-215. 2005.
- 29- Stadhouders A, Sengers R. Morphological observations in skeletal muscle from patients with a mitochondrial myopathy. J Inher Metab Dis 10:62-80.1987.
- 30-Gonzalez Carlos. Mitochondrias. Morfología Celular. 2002. <http://www.botanica.cnba.uba.ar/.../MITOCONDRIAS.htm>
- 31-Ghafourifar P, Saavedra-Molina A. Functions of mitochondrial nitric oxide synthase. En: Nitric oxide, cell signaling and gene expression. E Cadenas Ed. Marcel Dekker Inc. San Diego. CA. 2004.
- 32- Turrens J. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol 552: 335-344. 2003.
- 33- Martinez Abundis E., Sánchez Rodríguez MA., Mohammed EHB. Participación de la mitocondria en el desarrollo de estrés oxidativo en la obesidad. Art De Rev Bioq Esp 30: 82.89. 2005.
- 34- Bernal Dossetto G. Procesos Biológicos. Fosforilación Oxidativa. 2009. <http://www.scribd.com/.../Procesos-Biologicos-16-Fosforilacion-Oxidativa290509>
- 35- [Navarro A](#), [Boveris A](#). The mitochondrial energy transduction system and the aging process. [Am J Physiol Cell Physiol](#) 2: 670-686. 2007.
- 36- Karbowski M, Youle J. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. Cell Death and Differentiation 10: 870–880.2003.

- 37- Nisoli E, Clementi E, Moncada, Carruba M. Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework. [Biochem Pharmacol](#) 67: 1-15. 2004.
- 38-Hurtado Breda F, Nin Vaeza N, Rubbo Amonini H. Estrés oxidativo y nitrosativo en la sepsis. *Med Intensiva*. 29: 159-165. 2005.
- 39-Rios de Molina M. El estrés oxidativo y el destino celular. *Química Viva*. 2: 17-28. 2003.
- 40- Mester E. The use of the laser beam in therapy. *Orv Hetil* 29: 1012-6.1966.
- 41- Campana V, Moya M, Gavotto A, Soriano F, Juri H, Spitale L, Simes J, Palma J. The relative effects of He-Ne Laser and meloxicam on experimentally induced inflammation. *Lasertherapy* 11: 36-43.1999.
- 42- Campana V, Moya M, Gavotto A, Simes JC, Spitale L, Juri H, Palma J. He-Ne Laser on Microcrystalline Arthropaties. *J Clin Laser Med Surg* 21: 99-103. 2003.
- 43- Campana V, Moya M, Gavotto A, Spitale L, Soriano F, Palma JA. Lasertherapy on arthritis induced by urate crystals. *Photomed Laser Surg* 22: 499-503. 2004.
- 44- [Ribeiro MS](#), [Da Silva Dde F](#), [De Araújo CE](#), [De Oliveira SF](#), [Pelegriini CM](#), [Zorn TM](#), [Zezell DM](#). Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. [J Clin Laser Med Surg](#) 22: 59-66. 2004.
- 45- Giuliani A, Fernández M, Farinelli M. Very low level laser therapy attenuates edema and pain in experimental models. *Int J Tissue React* 26: 29-37. 2004.
- 46- Soriano F, Campana V, Moya M, Gavotto A, Simes J, Soriano M, Soriano R, Spitale L, Palma J. Photomodulation of Pain and Inflammation on Microcrystalline Arthropathies Experimental and Clinical Results. *Photomed Laser Surg* 24: 140 – 150. 2006.

- 47- Reddy G. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J Clin Laser Med Surg.* 22: 141-150. 2004.
- 48- Hawkins D, Abrahamse H. Phototherapy a treatment modality for wound healing and pain relief. *Afr Biomed Res* 10: 99-109. 2007.
- 49- Arieli Rami. The Laser Adventure. <http://web.phys.ksu.edu/vqm/laserweb/>
- 50- Karu T, Pyatibrat L, Koyakov S, Afanasyeva N. Absorption measurements of cell monolayers relevant to mechanisms of laser phototherapy: reduction or oxidation of cytochrome c oxidase under laser radiation at 632.8.nm. *Photomed laser surg.* 26: 593-599. 2008.
- 51- Lindgard A, Hultén LM, Svensson L, Soussi B. Irradiation al 634 nm releases nitric oxide from human monocytes. *Lasers Med Sci* 22: 30-36. 2007.
- 52- Vladimirov Y, Osipov N, Klebanov G. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochem* 69: 103-113. 2004.
- 53- Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainger A. Low-Energy Laser Irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg* 23: 3-9. 2005.
- 54- Karu T, Pyatibrat L, Afanasyeva N. Cellular effects of low power therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med* 36: 307-314. 2005.
- 55- Abdel Se, Abdel-Meguid I, Korraa S. Markers of oxidative stress and aging in Duchene muscular dystrophy patients and the possible ameliorating affect of He-Ne laser. *Acta Myol* 26: 14-21. 2007.
- 56- Anderson R, Parrish JA. The Optics of Human Skin. *J Invest Dermatol* 77: 13-19.1981.

57- Woolf AD, Dieppe PA. Mediators of crystal-induced inflammation in the joint. *Brit Med Bull* 43: 429-444.1987.

58- Báez MC, Táran MD, Campana V, Simes JC, Pons P, Palma JA, Moya M. Marcadores de estrés oxidativo en aterogénesis inducida por hiperfibrinogenemia. *Arch Cardiol Méx* 79: 85-90, 2009.

59- Palma JA, Gavotto AC, Villagra SB. Effects of the administration of progesterone and adrenal medullectomy on the plasma fibrinogen levels in rats with surgical injury (laparotomy). *Arch In Physiol Biochem* 91: 81-85.1983.

60- Darley-Usmar VM, Rickwood D, Wilson MT. *Mitochondria a practical approach*. England: IRL Press79-112.1987.

61- Bradford MA. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-DNA binding, *Anal Biochem* 72: 248-254.1976.

62- Ratnoff OD, Menzie AC: A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. *J Lab Clin Med* 37: 316-320.1957.

63- Boyde TR, Rahmatullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination citrulline, using diacetyl monoxime. *Anal Biochem* 107: 424-431. 1980.

64- ter Steege JC, Koster-Kamphuis L, van Straaten EA, Forget PP, Burman WA. Nitrotyrosine in plasma of celiac disease patients as detected by a new sandwich ELISA. *Free Radic Biol Med* 25: 953-963.1998.

65- Engel WK, Cunningham GG. Rapid examination of muscle tissue. An improved trichrome method for fresh-frozen biopsy sections. *Neurology* 13: 919-923.1963.

- 66- Karnovsky MJ, Graham RC. A Formaldehyde – glutaraldehyde fixative of high osmolarity by MET. *Journ Cell of Biol* 27: 137-138. 1965.
- 67- Massa EM, Aoki A. Simple method for purification of glutaraldehyde. *Acta Physiol Latinoam* 21:161-163. 1971.
- 68-Viatkina G, Vandana Jay B, Arpad G, Papaconstantinou J. Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development, *Biochim Biophys Acta* 1689: 162-173.2004.
- 69- Ragan CI, Wilson MT, Darley-Usmar VM, Lowe PN. Subfractionation of Mitochondria and Isolation of the Proteins of Oxidative Phosphorilation. In: Darley-Usmar VM, Rickwood D, Wilson MT. *Mitochondria a practical approach*. England: IRL Press 79-112.1987.
- 70- Ziegler DM y Doeg KA. Properties of succinate: Q reductase. *Arch. Biochem Biophys*. 97: 41-50. 1962.
- 71- Trijbels JMF, Ruttenbeek W, Sengers RCA, Janssen AJM, Van Oost BA. Bening Mitochondrial Encephalomyopathy in a Patient with Complex I Deficiency. *J Inher Metab Dis* 19: 149-152. 1996.
- 72- Wharton DC, Tzagoloff A. Cytochrome Oxidase from Beef Heart Mitochondria. *Methods of Biochemical Analysis*. Vol. II, New York: D. Glick, 427-435.1959.
- 73- Martinez Morillo M, Sendra Portero F. Láser. Concepto e Introducción. <http://www.sld.cu/galerias/paf/sitios/rehabilitacion-fis/laser-morillo.paf>.
- 74- Peña Fernandez L, Pastor Vega JM, Ruiz Gómez MJ, Martinez Morillo M. Labour and residential risk due to electromagnetic fields exposition. *Mapfre Medicina* 13: 205-213.2002.

75- Arab G, Avile J, Rivera M, Martínez J, Sánchez N, Contreras FM, Collazo M. Efectos Cardiovasculares de los Inhibidores de la Cox-2: Un mito o una realidad. Arch. Venez. Farmacol. 22: 30-34.2003.

76- Ribera-Ordóñez A. AINES: su mecanismo de acción en el sistema nervioso central. Rev Mexicana de Anest 29: 36-40.2006.

77- Manteifel VM, Karu TI. Structure of Mitochondrial and Activity of Their Respiratory Chain in Successive Generations of Yeast Cells Exposed to He-Ne Laser Light. Biol Bulletin 32: 556-566.2005.

78- Karu T, Ludmila V, Pyatibrat, Kalendo GS. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. Photochem Photobiol Sci 3: 211-216.2004.

79- Vallejo García F., Medina LF., García L. Use of intravenous immunoglobulin in idiopathic inflammatory myopathy. Acta Med Colomb 32: 80-84.2007.

80- Wise CM. Crystal-associated arthritis in the elderly. Rheum Dis Clin North Am 33: 33-35.2007.

81- Wu CW, Terkeltaub R, Kalunian KC. Calcium-containing crystals and osteoarthritis: implications for the clinician. Curr Rheumatol Rep 7: 213-219.2005.

82- Crofford L, Lipski PE, Brooks P, Abramson SB, Simon LS, van de Putte LBA, Basic Biology and Clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. Arthritis Rheum 43: 4-13.2002.

83- Reginato AM., Olsen BR. Genetic and experimental models of crystal-induced arthritis. Lessons learned from mice and men: is it crystal clear? J Rheumatol 19: 134-45.2007.

84- Pepper BI. Mecanismos de enfermedad y de reacción del organismo. www.med.uchile.cl.2005.

85- Aggarwal A. Clinical application of tests used in rheumatology. Indian J Pediatr 69: 889-892.2002.

86-[Pfander D](#), [Jørgensen B](#), [Rohde E](#), [Bindig U](#), [Müller G](#), [Eric Scheller E](#). The influence of laser irradiation of low-power density on an experimental cartilage damage in rabbit knee-joints: an in vivo investigation considering macroscopic, histological and immunohistochemical changes. Biomed Tech 51: 131-8.2006.

87- Schneider I. Calcium pyrophosphate dihydrate-crystal induced arthropathy. J Rheumatol 63: 10-21.2004.

88-Mizutani K, Musya Y, Wakae K. A clinical study on serum prostaglandin E2 with low-level lasertherapy. Photomed Laser Surg 22: 537-9. 2004.

89- Lin YS, Huang MH, Chai CY. Effects of helium-neon laser on the mucopolysaccharide induction in experimental osteoarthritic cartilage. Osteoarthristis Cartilage.14: 377-83.2006.

90-Martín García J, Goldenthal MJ. Mitochondrial organelle and the Heart. Rev Esp Cardiol 55:1293-1310.2002.

91-Valdez LB, Zaobomyj T, Boveris A. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity Biochim Biophys Acta 1757: 166-172.2006.

92-Rodríguez Perón JM., Menéndez López JR., Trujillo López Y. Radicales Libres en la Biomedicina y estrés oxidativo. Rev Cub Med Milit 30: 36-44.2001.

93-Guzik TJ. *et. al.* Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. Hypert 39: 1088-1094. 2002.

94-Ballinger S. Mitochondrial Integrity and function in atherogenesis. *Circulation* 30: 544-549.2002.

95- Giulivi C. Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase. *Free Radic Biol Med* 34: 397-408.2003.

96-Boveris DL y Boveris A. Oxygen delivery to the tissues and mitochondrial respiration. *Front. Biosci* 12: 1014-1023.2007.

97-Ghafourifar P, Asbury ML, Joshi SS y Kincaid ED. Determination of mitochondrial nitric oxide synthase activity. *Met Enz* 392: 424-444.2005

98-Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends in Pharm Sci* 26: 190-195.2005.

99-Venkatraman A, Landar A, Davis AJ, Chamlee L, Sanderson HK, Page G, Pompilius M, Ballinger S, Darley-Usmar V, Bailey SM. Modification of the mitochondrial proteome in response to the stress of Ethanol-dependent hepatotoxicity. *J Biol Chem* 279: 22092-22101.2004.

100-Parra Lara R, Matamala Vargas F, Silva Mella H. Morphological Effect of As.Ga Laser Irradiation on Rat Skeletal Muscle. *Int J Morphol* 25: 43-50.2007.

101-Tsutsui H. Mitochondrial oxidative stress and heart failure. *Intern Med* 45: 809-813. 2006.

102-Hamblin MR, Demidova TN. Mechanisms of Low Level Light Therapy. *Proc. Of SPIE*; 6140: 1-9.2006.

103-Riobó NA, Clementi E, Melani M, Boveris A, Cadenas E, Moncada S, Poderoso JJ. Nitric Oxide inhibits mitochondrial NADH: ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem* 359: 139-145.2001.

104-Castillo Rodriguez F, Roldán Ruiz MD, Blasco Plá R. Biotecnología Ambiental. Editorial Tebar. 2005.

105-Berg J, Stryer L, Tymoczko J. Bioquímica. 6° Ed. Editorial Reverte. 2008.

106-Audesirk G, Byers B. Biología: la vida en la tierra. 6°Ed. Editorial Pearson Educación. 2003.

107-Kuriso G, Zhang H, Smith J, Cramer W. Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. Science. 302: 1009-1014. 2003.

PRODUCCION CIENTÍFICA

Publicaciones en Revistas Científicas o Publicaciones Periódicas

- ❖ He-Ne Laser on Microcrystalline Arthropaties. Campana V., Moya M., Gavotto A., Simes J.C., Spitale L., Soriano F., Palma J. J Clin Laser Med & Surg 21: 99-103, 2003.
- ❖ Photomodulation of Pain and Inflammation on Microcrystalline Arthropathies Experimental and Clinical Results. Soriano F., Campana V., Moya M., Gavotto A., Simes J.C, Soriano M., Soriano R., Spitale L., Palma J. Photomed Laser Surg 24: 140-150, 2006.
- ❖ Inflammatory and oxidative stress markers in experimental crystalopathy are modified by photostimulation Reinoso Rubio C., Simes J.C., Moya M., Soriano F., Palma J.A., Campana V. Photomed Laser Surg 27: 79-84, 2009.

Trabajos de Divulgación Científica

- ❖ Cambios histopatológicos en artropatía tratada con Láser de baja potencia. Campana V., Moya M., Gavotto A., Spitale L., Simes J., Palma J. UNLaR Ciencia 2: 22-25, 2004.
- ❖ Importancia del fibrinógeno plasmático en los mecanismos inflamatorios por artropatías y factor predictor de riesgo cardiovascular. Palma J., Gavotto A., Campana V., Spitale L., Moya M., Simes J. Anales de la Fundación Alberto J. Roemmers, XVI: 357-372, 2005.
- ❖ Efectos de la fotoestimulación sobre marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo en cristalopatía experimental. Reinoso Rubio C., Simes J., Moya M., Evequoz O., Palma J., Campana V. UNLaR Ciencia. En prensa.

Trabajos publicados en forma de Resúmenes

- ❖ Comportamiento del fibrinógeno plasmático en artropatía experimental tratada

con láser y celecoxib. Campana V., Moya M., Gavotto A., Simes J., Spitale L., Palma J.A. Medicina 63: 553; 2003.

❖ Producción de L-citrulina en artropatía inducida tratada con láser y rofecoxib. Campana V, Simes J, Moya M, Reinoso C, Palma J. Medicina 64: 106; 2004.

❖ Plasmatic levels of L-citruline after Laser irradiation and rofecoxib treatment in rats with induced arthritis. Soriano F., Campana V., Moya M., Reinoso C., Simes J., Palma J., Soriano R. Photomed Laser Surg 23: 135; 2005.

❖ Effects of He-Ne Laser on calcium pyrophosphate arthropaties. Soriano F., Campana V., Moya M., Gavotto A., Simes J., Palma J., Soriano R., Soriano M. Photomed Laser Surg 23: 135; 2005.

❖ Marcador plasmático temprano de enfermedad reumática y su posible tratamiento. Campana V., Moya M., Simes J., Reinoso C., Gavotto A., Palma J. Medicina 65: 63; 2005.

❖ Bioestimulación láser en cristalopatías inducidas en ratas. Reinoso C., Simes J., Moya M., Piccini D., Palma J., Campana V. Medicina 66: 187; 2006.

❖ Eficacia del láser de baja energía en la respuesta inflamatoria experimental. Simes J., Moya M., Reinoso C., Piccini D., Palma J., Campana V. Medicina 66: 187; 2006.

❖ Acción de la terapia láser en modelos experimentales de artropatías por cristales. Reinoso C., Simes J., Moya M., Soriano F., Piccini D., Palma J., Campana V. Revista Argentina de Reumatología 2: 23, 2006.

❖ Fototerapia aplicada en ratas con proceso inflamatorio muscular inducido. Simes J, Moya M, Reinoso C, Soriano F, Piccini D, Palma J, Campana V. Revista Argentina de Reumatología 2: 22, 2006.

❖ Efecto del Láser de Helio-Neón en Artropatías Experimentales. Reinoso C., Simes J., Moya M., Soriano F., Piccini D., Palma J., Campana V. Revista Argentina de Reumatología 3: 38; 2007.

❖ Efecto de fotobioestimulación sobre marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo en artritis inducida por cristales. Reinoso C., Simes J., Moya M., Piccini D., Palma J., Campana V. Medicina 67: 70-71; 2007.

❖ Efecto del Láser de Helio-Neón y Arseniuro de Galio sobre marcadores de estrés oxidativo en la respuesta inflamatoria in vivo. Servetto N., Baez M., Tarán M., Moya M., Dipietro A., Simes J., Palma J., Campana V. Medicina 67: 68; 2007.

- ❖ Acción Fotobiológica del Láser de Helio-Neón sobre la histomorfometría y actividad enzimática mitocondrial en miopatía experimental. Simes J., Servetto N., Moya M., Evequoz O., Palma J., Campana V. Medicina 67: 243; 2007.
- ❖ Variación histomorfométrica y de biomarcadores inflamatorios y de estrés oxidativo en ratas con miopatía experimental y tratadas con láseres de baja potencia. Servetto N., Cremonezzi D., Baez M., Tarán M., Moya M., Simes J., Campana V. International Journal of Morphology 26: 784; 2008.
- ❖ Lasertherapy applied in a Experimental Model of Cristal Disease. Reinoso C., Cremonezzi D., Simes J., Moya M., Campana V. J Clinical Rheum 14: S4, 2008.
- ❖ Histomorphometry and Mitochondrial Enzymatic Activity in Experimental Myopathy are Modified by Phototherapy. Simes J., Servetto N., Moya M., Palma J., Campana V. J Clinical Rheum 14: S7, 2008.
- ❖ Lasertherapy applied in a experimental model of myopathy. Servetto N., Cremonezzi D., Simes J., Soriano F., Moya M., Campana V. Photomed Laser Surg 27: 202, 2009.

Trabajos Científicos Presentados en Congresos o Eventos Similares

- ❖ Comportamiento del fibrinógeno plasmático en artropatía experimental tratada con láser y celecoxib. Campana V., Moya M., Gavotto A., Simes J., Spitale L., Palma J.A. XLVIII Reunión Anual de la SAIC., Mar del Plata, Noviembre, 2003.
- ❖ Comportamiento del fibrinógeno plasmático en artropatía experimental tratada con láser y celecoxib. Campana V., Moya M., Gavotto A., Simes J.C., Spitale L., Palma J.A. 4ª JIC - FCM – UNC., Diciembre, 2003.
- ❖ Producción de L-citrulina en artropatía inducida tratada con láser y rofecoxib. Campana V, Simes J, Moya M, Reinoso C, Palma J. XLIX Reunión Anual de la SAIC. L Reunión Anual de la SAI. Mar del Plata. Noviembre, 2004.
- ❖ Modificación de los niveles de L-citrulina en artritis microcristalina tratada con láser y rofecoxib. Simes J., Campana V., Moya M., Reinoso C., Palma J. 5º JIC – FCM - UNC, Diciembre, 2004.
- ❖ Plasmatic levels of L-citruline after Laser irradiation and rofecoxib treatment in rats with induced arthritis. Soriano F., Campana V., Moya M., Reinoso C., Simes J., Palma J., Soriano R. IV Congresso Brasileiro de Laser em Medicina e Cirurgia. Guarujá. Brasil. 25-27 Noviembre, 2004.

- ❖ Effects of He-Ne Laser on calcium pyrophosphate arthropaties. Soriano F, Campana V, Moya M, Gavotto A, Simes J, Palma J, Soriano R, Soriano M. IV Congreso Brasileiro de Laser em Medicina e Cirurgia. Guarujá. 25-11- 2004.
- ❖ Marcador plasmático temprano de enfermedad reumática y su posible tratamiento. Campana V., Moya M., Simes J., Reinoso C., Gavotto A., Palma J. 50 Reunión Anual de la SAIC. Mar del Plata. Noviembre, 2005.
- ❖ Fototerapia aplicada en ratas con proceso inflamatorio muscular inducido. Simes J, Moya M, Reinoso C, Soriano F, Piccini D, Palma J, Campana V. 39º Congreso Argentino de Reumatología. Mar del Plata, 5-8 de Octubre, 2006.
- ❖ Acción de la terapia láser en modelos experimentales de artropatías por cristales. Reinoso C, Simes J, Moya M, Soriano F, Piccini D, Palma J, Campana V. 39º Congreso Argentino de Reumatología. Mar del Plata. Octubre, 2006.
- ❖ Bioestimulación láser en cristalopatías inducidas en ratas. Reinoso C., Simes J., Moya M., Piccini D., Palma J., Campana V. 51 Reunión Anual de la SAIC. Mar del Plata. Noviembre, 2006.
- ❖ Eficacia del láser de baja energía en la respuesta inflamatoria experimental. Simes J., Moya M., Reinoso C., Piccini D., Palma J., Campana V. 51 Reunión Anual de la SAIC. Mar del Plata. Noviembre, 2006.
- ❖ Cristalopatías experimentales tratadas con fototerapia. Reinoso C., Simes J., Balceda., Manlla L., Moya M., Campana V. 7ª JIC – FCM - UNC. Noviembre, 2006.
- ❖ Modelo inflamatorio muscular tratado con láser de baja energía. Simes J., Moya M., Reinoso C., Piccini D., Palma J., Campana V. 7ª JIC - FCM - UNC. Noviembre, 2006.
- ❖ Efecto del Láser de Helio-Neón en Artropatías Experimentales. Reinoso C., Simes J., Moya M., Piccini D., Palma J., Campana V. 7º Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Osteología y Metabolismo Mineral. Santiago de Chile, 29 de Agosto - 1º de Septiembre, 2007.
- ❖ Efecto del Láser de Helio-Neón en Artropatías Experimentales. Reinoso C., Simes J., Moya M., Soriano F., Piccini D., Palma J., Campana V. Congreso Argentino de Reumatología. Bs.As. 14-17 de septiembre, 2007.

- ❖ Respuesta antiinflamatoria de la fotobiomodulación en artropatías experimentales. Reinoso C., Simes J., Moya M., Piccini D., Palma J., Campana V. Jornadas Científicas 2007. UNLaR. La Rioja, 3-5 Octubre, 2007.
- ❖ Efecto de fotobioestimulación sobre marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo en artritis inducida por cristales. Reinoso C., Simes J., Moya M., Piccini D., Palma J., Campana V. 52 Reunión Anual de la SAIC. Mar del Plata. Noviembre, 2007.
- ❖ Efecto del Láser de Helio-Neón y Arseniuro de Galio sobre marcadores de estrés oxidativo en la respuesta inflamatoria in vivo. Servetto N., Baez M., Tarán M., Moya M., Dipietro A., Simes J., Palma J., Campana V. 52 Reunión Anual de la SAIC. Mar del Plata. Noviembre, 2007.
- ❖ Acción Fotobiológica del Láser de Helio-Neón sobre la histomorfometría y actividad enzimática mitocondrial en miopatía experimental. Simes J., Servetto N., Moya M., Evequoz O., Palma J., Campana V. 52 Reunión Anual de la SAIC. Mar del Plata. Noviembre, 2007.
- ❖ Efecto de fotobioestimulación sobre marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo en artritis inducida por cristales. Reinoso C., Simes J., Moya M., Piccini D., Palma J., Campana V. 8º JIC - FCM – UNC. Diciembre, 2007. *1º Premio en el área Básica*
- ❖ Acción Fotobiológica del Láser de Helio-Neón sobre la histomorfometría y actividad enzimática mitocondrial en miopatía experimental. Simes J., Servetto N., Moya M., Evequoz O., Palma J., Campana V. 8º JIC - FCM – UNC. Diciembre, 2007.
- ❖ Efecto del Láser de Helio-Neón y Arseniuro de Galio sobre marcadores de estrés oxidativo en la respuesta inflamatoria in vivo. Servetto N., Baez M., Tarán M., Moya M., Dipietro A., Simes J., Palma J., Campana V. 8º JIC - FCM – UNC. Diciembre, 2007.
- ❖ Variación histomorfométrica y de biomarcadores inflamatorios y de estrés oxidativo en ratas con miopatía experimental y tratadas con láseres de baja potencia. Servetto N., Cremonuzzi D., Baez M., Tarán M., Moya M., Simes J., Campana V. XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas. Córdoba. 14-16 de Mayo, 2008.

- ❖ Estrategia terapéutica en enfermedades inflamatorias osteomiarticulares: Láser de Baja Potencia. Servetto N., Spitale L., Reinoso C., Balceda A., Simes J., Gavotto A., Campana V. Jornadas Científicas de UNLaR. 10-12 de Setiembre, 2008.
- ❖ Lasertherapy applied in a experimental model of myopathy. Servetti N., Cremonezzi D., Simes J., Soriano F., Moya M., Campana V. 7th International Congress of the World Association for Laser Therapy. Sun City, South Africa, 9-22 October, 2008.
- ❖ Lasertherapy applied in a Experimental Model of Crystal Disease. Reinoso C., Cremonezzi D., Simes J., Moya M., Campana V. XV Congress of the Pan American League of Associations of Rheumatology. Guatemala. August 13th-16th, 2008.
- ❖ Histomorphometry and Mitochondrial Enzymatic Activity in Experimental Myopathy are Modified by Phototherapy. Simes J., Servetto N., Moya M., Palma J., Campana V. XV Congress of the Pan American League of Associations of Rheumatology. Guatemala. August 13th-16th, 2008.

Miembro integrante de proyectos subsidiados

- ❖ "Importancia del fibrinógeno plasmático como factor de riesgo cardiovascular y en mecanismos inflamatorios por artropatías: Modelos experimentales. Financiado por SECyT, Res. 123/04; 137/04; 197/05; 162/06; 114/07.
- ❖ "Modelo Experimental de Artropatía por cristales tratado con láser de baja potencia" financiado por *CICYT - UNLaR*, Res. 067/04.
- ❖ "Estrategia terapéutica en enfermedades inflamatorias osteomioarticulares: Láser de Baja Potencia" financiado por *Agencia Córdoba Ciencia*. Expte.Nº 0279-004280/2005 - *CICYT – UNLaR*, Res. 065/06.
- ❖ "Acción fotobiológica de la terapia láser en procesos inflamatorios osteomioarticulares" financiado por *CICYT – UNLaR*, Res. 021/07.
- ❖ "Comportamiento de biomarcadores inflamatorios relacionados con estrés oxidativo en modelo experimental y clínico epidemiológico aterogénico" financiado por *CICYT-UNLaR*, Res. 020/07.
- ❖ "Fotoestimulación en miopatías experimentales" financiado por *CICYT-UNLaR*, Res. 086/08.