

Acción de la terapia láser sobre la actividad enzimática mitocondrial en un modelo de miopatía experimental.

Dávila, S. (1), Vignola, M. B. (2), Cremonuzzi, D. (3), Simes, J. C. (2), Campana, V. (2,4).

Action of laser therapy on mitochondrial enzyme activity in a model of experimental myopathy.

Abstract

Hypotheses about the mechanism of action of low level laser (LLLT: Low Level Laser therapy), Helium-Neon (He-Ne) and gallium arsenide (As.Ga) focus in the mitochondria. The effect of LLLT in experimental myopathy, evaluating the activity: citrate synthase (CI) and complex I-IV of the mitochondrial respiratory chain (CRM). We used 70 female rats, Wistar strain, divided into 7 groups: A) control, B) injured and sacrificed at 24 hours, C) injured and sacrificed at 10 days, D) injured + He-Ne laser, E) As.Ga injured + laser, F) He-Ne laser and G) laser As.Ga. Myopathy was induced by carrageenan injected into the left hind foot. The variables were determined by spectrophotometry. LLLT was performed for 10 consecutive days (9.5 J/cm²).

Statistical analysis was performed using ANOVA-Fisher test ($p < 0.05$). He-Ne laser alone was significantly increased ($p < 0.05$) CI activity and decreased activity of complex IV of the MCA ($p < 0.05$). The laser alone increased CI and decreased activity of complex II ($p < 0.001$) and IV (0.05). LLLT was effective in inflammatory myopathy normal-regulating mitochondrial enzyme activity.

Key words: myopathy, Helium Neon laser, Gallium Arsenide laser, mitochondrial respiratory chain.

Resumen

Las hipótesis sobre el mecanismo de acción del láser de baja intensidad (LLLT: Low Level Laser Therapy), Helio-Neón (He-Ne) y Arseniuro de Galio (As.Ga), se centran en la mitocondria. Se evaluó el efecto de LLLT en miopatía experimental, valorando la actividad de: citrato sintasa (CI) y los complejos I-IV de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM). Se utilizaron 70 ratas hembras, cepa Wistar, distribuidas en 7 grupos: A) control, B) injuriado y sacrificado a las 24 hs., C) injuriado y sacrificado a los 10 días, D) injuriado + láser de He-Ne, E) injuriado + láser de As.Ga, F) láser de He-Ne y G) láser de As.Ga. La miopatía se indujo con carragenina, inyectada en un miembro posterior. Las variables fueron determinadas por espectrofotometría. LLLT se realizó durante 10 días consecutivos (9,5 J/cm²).

El análisis estadístico se realizó aplicando ANOVA-test de Fisher ($p < 0.05$). El láser de He-Ne por si solo aumentó significativamente ($p < 0.05$) la actividad de CI y disminuyó la actividad del complejo IV de la CRM ($p < 0.05$). El láser por si solo aumentó la actividad de CI y disminuyó los complejos II ($p < 0.001$) y IV (0.05). LLLT en miopatía inflamatoria tuvo efecto normo-regulador de la actividad enzimática mitocondrial.

Palabras clave: miopatía, láser de Helio-Neón, láser de Arseniuro de Galio, cadena respiratoria mitocondrial.

(1) Instituto de Investigación Científica de Salud Humana (IICSHUM) –UNLaR. Av. Luis M. de la Fuente S/N - La Rioja sole_davila@hotmail.com

(2) Cátedra de Física Biomédica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Santa Rosa 1085 – Córdoba

(3) Cátedra de Patología. Carrera de Medicina. Universidad Nacional de La Rioja. Av. Luis M. de la Fuente S/N - La Rioja

(4) Cátedra de Física Biomédica. Carrera de Medicina. Universidad Nacional de La Rioja. Av. Luis M. de la Fuente S/N - La Rioja

Introducción

El término miopatía significa “enfermedad del tejido muscular” y se define como el estado anormal del músculo esquelético caracterizado por debilidad, consunción y cambios histológicos. Se debe a múltiples causas y ocasiona problemas en el tono y la contracción de los músculos, con diferentes grados de severidad. Existen distintos tipos de miopatías, entre ellas las de naturaleza inflamatoria (Kumar y col., 2008).

Entre los agentes capaces de inducir inflamación se encuentra la carragenina, un polisacárido y poderoso agente irritante utilizado en modelos experimentales (Albertini y col., 2008; Bortone y col., 2008; Sluka y col., 2006). Descubierto por Winter y col. (1962) y muy utilizado para evaluar la efectividad de drogas y terapias antiinflamatorias.

Ciertas miopatías son causadas por una disfunción metabólica mitocondrial y se caracterizan por reacciones enzimáticas oxidativas anormales (Karbowski y Youle, 2003). Los daños en la membrana mitocondrial pueden tener múltiples efectos en la función de las mitocondrias, incluyendo un incremento en la permeabilidad de membrana, pérdida de componentes mitocondriales, disipación del potencial de membrana, disminución de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM), entre otras (Garg y col., 2004).

Ha sido demostrado que la terapia con bajo nivel de energía, también llamada Low Level Laser Therapy (LLLT), es importante en el control de la inflamación, reparación de heridas cutáneas, disfunciones neuromusculares, patologías reumáticas, entre otras (Nakano y col., 2009; Parra y col., 2007; Reinoso y col., 2009; Rezende y col., 2007; Rochkind y col., 2007; Servetto y col., 2010; Soriano y col., 2006; Suazo Galdames y col., 2007).

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 activando a corto plazo la CRM. Se atribuyen los efectos de la fotoestimulación a la formación de pequeñas cantidades de EROs y de antioxidantes posterior a la irradiación, cambiando el estado redox celular y reduciendo el estrés oxidativo (Hamblin y Demidova, 2006; Lindgard y col., 2007; Abdel y col., 2007; Karu y col., 2005, 2010; Lubart y col., 2005; Vladimirov y col., 2004).

La determinación de los acontecimientos celulares y moleculares de interacción de la energía procedente de láseres de baja intensidad como el de He-Ne o el de As.Ga con el sistema muscular, sería determinante para el conocimiento, aplicación y optimización del uso de LLLT en patologías inflamatorias ya que, en la bibliografía revisada son muchos los trabajos encontrados con resultados contradictorios.

Teniendo en cuenta que la mayor parte de los estudios sobre el mecanismo de acción de LLLT se centran en la mitocondria y como orgánulo responsable de la transducción energética en la célula (Hamblin y Demidova, 2006; Karu y col., 2010; Manteifel y Karu, 2005), se propone evaluar el efecto fotobiológico de la terapia láser, con diferentes λ , en un modelo experimental de miopatía, a fin de intentar dar un paso adelante en el conocimiento de LLLT en patologías musculares inflamatorias, valorando las alteraciones de la actividad enzimática de la CRM.

Materiales y métodos

1. Animales: Se utilizaron 70 ratas hembras cepa Wistar distribuidas en 7 grupos (n=10), de peso promedio 220 ± 20 g y 5 meses de edad, alimentadas con dieta balanceada para ratas con un mínimo de 17% de contenido proteico.

2. Grupos:

- A. Control (intactas).
- B. Injuriadas y sacrificadas a las 24 hs.
- C. Injuriadas y sacrificadas a los 10 días.
- D. Injuriadas y tratadas a las 24 hs con láser de He-Ne.
- E. Injuriadas y tratadas a las 24 hs con láser de As.Ga.
- F. Irradiadas con láser de He-Ne.
- G. Irradiadas con láser de As.Ga.

3. Modelo experimental: Se inyectaron 50 μ l de carragenina λ (tipo IV) al 1% diluida con solución fisiológica, por única vez, en músculo gastrocnemius del miembro posterior izquierdo, con la intención de inducir un proceso inflamatorio (Albertini y col., 2008; Bortone y col., 2008).

4. Tratamiento con LLLT: En los grupos D y E, las aplicaciones comenzaron a realizarse a las 24 horas posteriores a la injuria, durante 10 días consecutivos, sobre la misma zona muscular previamente marcada. Los equipos de láser utilizados fueron: a) Láser de He-Ne ($\lambda=632.8$ nm) de color rojo, de una potencia de 5mW, con un spot de 2 mm de diámetro y la densidad de energía suministrada fue de 9.5 J/cm², lo que corresponde a 60 segundos de irradiación en el mismo punto previamente marcado.

b) Láser de As.Ga ($\lambda=904$ nm) infrarrojo, de una potencia de 12 mW, la densidad de energía suministrada fue de 9.5 J/cm², lo que corresponde a 47 segundos de exposición en el mismo punto previamente marcado.

5. Preparación del material experimental: Obtención y procesamiento del tejido muscular: El músculo fue seccionado con hoja de afeitar después de ser sacrificados los animales.

Actividad enzimática mitocondrial: Para realizar el aislamiento mitocondrial, la sección muscular (aproximadamente 1g) se lavó y suspendió en buffer de aislamiento helado SETH y fue inmediatamente homogeneizada. El homogenato se centrifugó a 1.500 g, a 4°C por 20 min. Seguidamente se separó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 10.000g a 4°C por 5 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet mitocondrial se lavó con el buffer, se centrifugó nuevamente a 10.000g a 4°C por 10min, se descartó 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. La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford (1976).

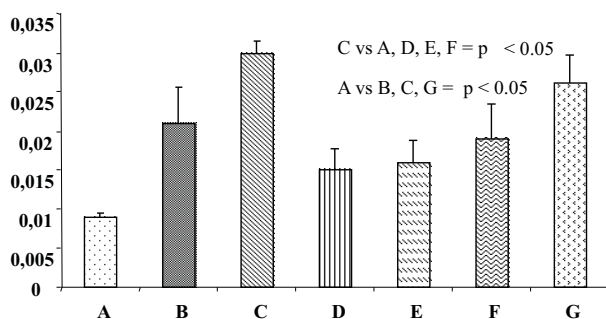
Funcionamiento del Ciclo de Krebs: mediante la determinación de la enzima citrato sintasa, por espectrofotometría (Vyatkina y col., 2004).

Actividad de los complejos de la CRM: se realizó por técnicas espectrofotométricas: el complejo I (NADH-ubiquinona reductasa) se estudió de acuerdo a la técnica descrita por Ragan y col. (1987). El complejo II (succinato-ubiquinona-reductasa) y el III (ubiquinona-citocromo c-reductasa) siguiendo los criterios de Trijels y col. (1996), y el complejo IV (citocromo c-oxidasa) se analizó de acuerdo a las técnicas de Wharton y col. (1959).

6. **Análisis Estadístico:** Los resultados se analizaron aplicando ANAVA, test de Fisher, estableciéndose un nivel de significancia de $p < 0.05$ para todos los casos.

Resultados

El efecto de LLLT sobre la actividad enzimática de la Citrato sintasa (mM/min.mg proteína) se muestra en la Fig. 1.

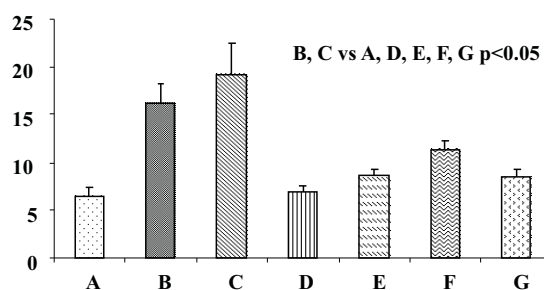


Nota: Cada barra expresa: Media ± ES.

Fig. 1- Efecto de LLLT en miopatía experimental sobre la actividad enzimática de la Citrato sintasa.

El grupo con miopatía y sacrificado a los 10 días (C) (0.03 ± 0.002) mostró un aumento significativo en comparación con los grupos: control (A) (0.01 ± 0.001), injuriados y tratados con el láser de He-Ne (D) (0.015 ± 0.003), injuriados y tratados con el láser de As.Ga (E) (0.016 ± 0.003) y sólo irradiados con láser de He-Ne (F) (0.019 ± 0.004) ($p < 0.05$); no así con el grupo (B) (0.021 ± 0.005) y (G) (0.026 ± 0.004). En los grupos (B), (C) y (G) se observó un aumento significativo comparado con el grupo control (A) ($p < 0.05$).

El efecto de LLLT sobre la actividad enzimática del Complejo I (NADH-ubiquinona reductasa) (mM/min.mg proteína) de la CRM se muestra en la Fig. 2. No se encontraron diferencias significativas entre los animales injuriados y sacrificados a las 24 horas (B) (16.16 ± 2.07) y los animales injuriados y sacrificados a los 10 días (C) (19.15 ± 3.25), pero si un incremento significativo de ambos grupos al compararlos con: control (A) (6.55 ± 0.90), injuriados y tratados con láser de He-Ne (D) (6.83 ± 0.63), animales injuriados y tratados con láser de As.Ga (E) (8.56 ± 0.64), sólo irradiados con láser de He-Ne (F) (11.38 ± 0.90) y solamente irradiados con láser de As.Ga (G) (8.53 ± 0.85) ($p < 0.05$).



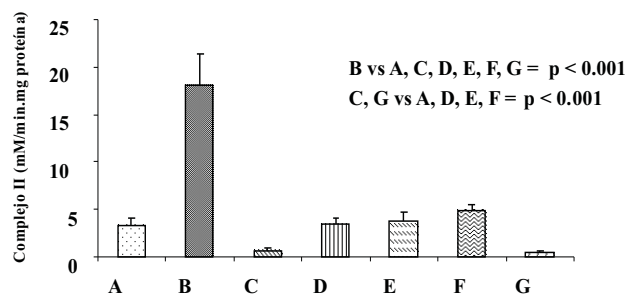
Nota: Cada barra expresa: Media ± ES.

Fig. 2- Efecto del láser de He-Ne y de As.Ga en miopatía experimental, sobre la actividad enzimática del Complejo I de la CRM. Complejo I expresados en mM/min.mg proteína.

El efecto del láser de He-Ne y de As.Ga sobre la actividad enzimática del Complejo II (succinato-ubiquinona-reductasa) (mM/min.mg proteína) de la CRM se muestra en la Fig. 3.

Se observó un aumento significativo en el grupo injuriado y sacrificado a las 24 horas (B) (18.08 ± 3.92) en comparación con el resto de los grupos estudiados: Control (A) (3.29 ± 0.73), grupo injuriado y sacrificado a los 10 días (C) (0.60 ± 0.37), animales injuriados y tratados con láser de He-Ne (D) (3.53 ± 0.68), animales injuriados y tratados con láser de As.Ga (E) (3.79 ± 0.92), animales sólo irradiados con láser de He-Ne (F) (4.94 ± 0.66) y ratas solamente irradiadas con láser de As.Ga (G) (0.55 ± 0.13) ($p < 0.001$).

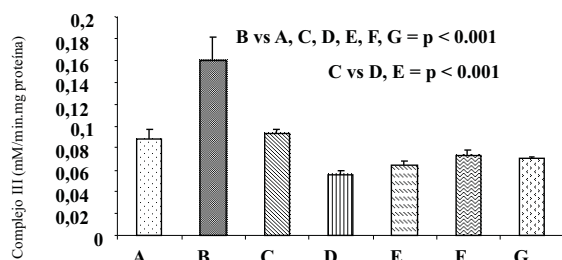
Entre los grupos (C) y (G) y entre (A), (D), (E) y (F), no se encontraron diferencias significativas.



Nota: Cada barra expresa: Media \pm ES.

Fig. 3- Efecto del láser de He-Ne y de As.Ga en miopatía experimental, sobre la actividad enzimática del Complejo II de la CRM.

El efecto de LLLT sobre la actividad enzimática del Complejo III (Ubiquinona citocromo c reductasa) (mM/min.mg proteína) de la CRM se muestra en la Fig. 4. Se observó un aumento significativo en el grupo con miopatía y sacrificado a las 24 hs (B) (0.161 ± 0.020) en comparación con los grupos: control (A) (0.089 ± 0.008), injuriado y sacrificado a los 10 días (C) (0.093 ± 0.004), injuriado y tratado con He-Ne (D) (0.056 ± 0.003), injuriado y tratado con As.Ga (E) (0.064 ± 0.004), tratado con He-Ne (F) (0.073 ± 0.005) y tratado con As.Ga (G) (0.070 ± 0.002) ($p < 0.001$). Existe disminución significativa en los grupos (D) y (E) con respecto a (C) y (A) ($p < 0.001$), sin diferencias entre (A), (F) y (G).



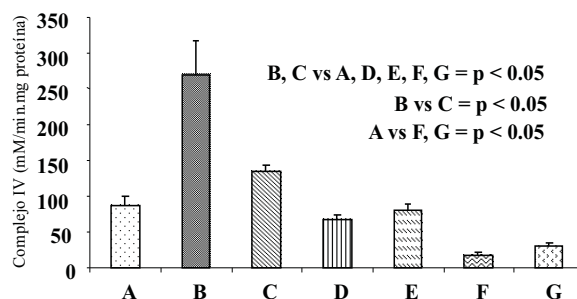
Nota: Cada barra expresa: Media \pm ES.

Fig. 4- Efecto del láser de He-Ne y de As.Ga en miopatía experimental, sobre la actividad enzimática del Complejo III de la CRM.

En la Fig. 5 se observa el efecto del láser de He-Ne y de As.Ga en miopatía experimental, sobre la actividad enzimática del Complejo IV (citocromo c-oxidasa) (mM/min.mg proteína) de la CRM.

Se observó un incremento significativo en los grupos de animales injuriados y sacrificados a las 24 hs (B) (270.53 ± 47.17) y animales injuriados y sacrificados a los 10 días (C) (134.89 ± 7.30), comparados con los grupos: control (A) (87.31 ± 12.31), animales injuriados y tratados con láser de He-Ne (D) (67.09 ± 6.99), injuriados y tratados con el láser de As.Ga (E) (79.57 ± 9.31), ratas solamente irradiadas con láser de He-Ne (F) (17.22 ± 3.59) y sólo tratadas con láser de As.Ga (G) (31.23 ± 3.38) ($p < 0.05$).

Asimismo, hubo diferencias significativas entre los grupos (B) y (C), por la mayor actividad enzimática en el grupo (B) ($p < 0.05$). Finalmente es los grupos (F) y (G) la actividad enzimática disminuyó significativamente cuando se lo comparó con el grupo control (A) ($p < 0.05$).



Nota: Cada barra expresa: Media \pm ES.

Fig. 5- Efecto del láser de He-Ne y de As.Ga en miopatía experimental, sobre la actividad enzimática del Complejo IV de la CRM.

Discusión

La CRM provee más del 90% de ATP celular mediante la oxidación de transportadores de alta energía (NADH y FADH₂) 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 (Martín García y Goldenthal, 2002).

En la bibliografía revisada se ha encontrado que en patologías que se manifiestan con debilidad muscular ocurre una inhibición del complejo V con la consecuente disminución de la síntesis de ATP, sin embargo, la actividad enzimática de la CRM no se vio afectada (Venkatesh y col., 2009).

Numerosos estudios confirman que el fotoceptor de los LLLT sería el citocromo c oxidasa (complejo IV de la CRM) (Hamblin y Demidova, 2006; Karu y col., 2004, 2010; Manteifel y Kart, 2005).

El estudio de la actividad de la enzima citrato sintasa del ciclo de Krebs se realizó para comprobar la existencia de actividad enzimática en el tejido extraído para el posterior estudio de los complejos I, II, III y IV.

En base a los resultados obtenidos sobre la actividad mitocondrial por determinación de citrato sintasa, se observó un aumento significativo en los animales injuriados a las 24 horas y a los 10 días de inducida la miopatía, respecto al grupo control.

Si bien el tratamiento con ambos láseres no logró igualar los valores normales de actividad de esta enzima, sí disminuyó la actividad enzimática diferenciándose de los animales injuriados. Por otra parte, sólo el láser de As.Ga aumentó considerablemente la actividad enzimática.

Con respecto al complejo I de la CRM, también se observó un aumento significativo de la actividad enzimática en ambos grupos injuriados respecto al resto de los grupos. Ambos láseres lograron disminuir la actividad del complejo I semejándose a los valores normales. Asimismo, tanto el láser de He-Ne como el de As.Ga por sí solos no modificaron la actividad enzimática normal del complejo estudiado.

Al analizar los resultados del complejo II, se obtuvo un aumento significativo de su actividad sólo después de las 24 horas de producida la injuria y una disminución considerable a los 10 días de la inducción de la injuria. Cuando los animales injuriados fueron tratados con ambos láseres, la actividad enzimática se normalizó. El láser de He-Ne por sí solo no provocó cambios en la actividad enzimática del complejo II, pero sí hubo una disminución significativa en el grupo irradiado con el láser de As.Ga, asimilándose a los valores obtenidos en los animales injuriados y sacrificados a los 10 días.

Con respecto a la actividad del complejo III, se obtuvo un aumento de la actividad después de las 24 horas de producida la injuria. Sin embargo, a los 10 días de inducida la miopatía, los valores se normalizan por sí solos. Al tratar con ambos láseres a los animales injuriados, se observó una disminución significativa de la actividad enzimática respecto al grupo control. Los láseres de He-Ne y de As.Ga por sí solos no produjeron cambios en la actividad del complejo III.

Al analizar los resultados del complejo IV, se obtuvo un aumento significativo en el grupo de animales injuriados y sacrificados a las 24 hs., si bien a los 10 días de producida la injuria, los valores de actividad enzimática tienden a normalizarse, siguen siendo significativamente superiores al grupo control. Cuando se trató a los animales injuriados con ambos láseres, la actividad enzimática se normalizó. Sin embargo, en los animales irradiados tanto con el láser de He-Ne como con el de As.Ga, la actividad del complejo IV disminuyó significativamente respecto al grupo control.

Con los resultados obtenidos de la actividad enzimática mitocondrial, se puede observar una tendencia al aumento de la misma, en los animales injuriados y no tratados.

Aunque la bibliografía revisada sugiere que la LLLT activa la CRM, en ningún trabajo hacen referencia a la restitución de los valores normales de la misma. Ante nuestros resultados, proponemos que el láser de baja intensidad tiende a normalizar la actividad enzimática de las mitocondrias.

Respecto a la acción de los láseres por sí solos, se encontraron resultados dispares. El láser de He-Ne sólo disminuyó la actividad enzimática del complejo IV respecto al grupo control. El láser de As.Ga por sí sólo disminuyó no sólo la actividad del complejo IV sino también la del complejo II. Estos resultados se contradicen con la bibliografía revisada, en donde algunos aluden un aumento de la actividad enzimática en mitocondrias irradiadas (Manteifel y Karu, 2005; Silveira y col. 2007).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos confirmar el efecto benéfico de la terapia con láseres de baja intensidad en miopatía inflamatoria inducida con carragenina, evidenciado por la modulación de la actividad enzimática mitocondrial.

Referencias.

Abdel, S., Abdel-Meguid I., Korraa, S. 2007. Markers of oxidative stress and aging in Duchene muscular dystrophy patients and the possible ameliorating affect of He-Ne laser. *Acta Myol* 2007; 26: 14-21.

Albertini, R., Balbin Villaverde, A., Aimbire, F., Bjordal, J., Brugnera, A., Mittmann, J., Silva, J. A., Costa, M..2008. Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. *Photom Laser Surg* 2008; 26: 19-24.

Bortone, F., Santos, H.A., Albertini, R., Pesquero, J.B., Costa, M.S., Silva, J. A. 2008. Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 206.

Bradford, M.A. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-DNA binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.

Garg, N., Vyatkina, G., Bhatia, V., Gerstner, A., Papaconstantinou, J. 2004. Impaired mitochondrial respiratory Chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1689:162-73.

Hamblin, M.R., Demidova, T.N. 2006.. Mechanisms of Low Level Light Therapy. *Proc. Of SPIE* 2006; 6140: 1-9.

Karowski, M., Youle, J. 2003. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 2003; 10: 870-80.

Karu, T., Pyatibrat, L., Afanasyeva, N., 2005. Cellular effects of low power therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med* 2005; 36: 307-14.

- Karu, T. 2010 Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulation in Context of New Data About Multiple Roles of ATP. *Photomed Laser Surg*; 28: 159-160.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Robbins, S.L. 2008. *Patología Humana*. Elsevier España 2008; 111-79.
- Lindgar, A., Hultén, L.M., Svensson, L., Soussi, B. 2007 Irradiation al 634 nm releases nitric oxide from human monocytes. *Lasers Med Sci* 2007; 22: 30-6.
- Lubart, R., Eichler, M., Lavi, R., Friedman, H., Shainger, A. 2005. Low-Energy Laser Irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg* 2005; 23: 3-9.
- Manteifel, V.M. Karu, T.I. 2005. Structure of Mitochondrial and Activity of Their Respiratory Chain in Successive Generations of Yeast Cells Exposed to He.Ne Laser Light. *Biol Bullet* 2005; 32: 556-66.
- Martín García, J., Goldenthal, M.J. 2002. Mitochondrial organelle and the Heart. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55:1293-1310.
- Parra, R., Vargas, F., Mella, H. 2007. Efecto Morfológico de la Irradiación Láser AsGa en el Músculo Esquelético de Rata. *Int. J. Morphol* 2007; 25: 43-50.
- Ragan, C. I.; Wilson, M. T.; Darley-Usmar, V. M.; Lowe, P. N. 1987. Subfractionation of Mitochondria and Isolation of the Proteins of Oxidative Phosphorilation. In: Darley-Usmar, V. M.; Rickwood, D.; Wilson, M. T. *Mitochondria a practical approach*. England: IRL Press 1987, 79-112.
- Reinoso, C., Simes, J., Moya, M., Soriano, F., Palma, J., Campana, V. 2009 Inflammatory and oxidative stress markers in experimental crystalopathy are modified by photostimulation. *Photomed Laser Surg* 2009; 27: 79-84.
- Rezende, S.B., Ribeiro, M.S., Núñez, S.C., Garcia, V.G., Maldonado, E.P. 2007. Effects of a single near-infrared laser treatment on cutaneous wound healing: Biometrical and histological study in rats. *J Photochem Photobiol B* 2007; 87: 145-53.
- Rochkind, S., Drory, V., Alon, M., Nissan, M., Ouaknine, G. 2007. Laser phototherapy (780 nm), a new modality in treatment of long-term incomplete peripheral nerve injury: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Photomed Laser Surg* 2007; 25: 436-42.
- Servetto, N., Cremonezzi, D., Simes, J.C., Moya, M., Soriano, F., Palma, J.A., Campana, V.R. 2010. Evaluation of Inflammatory Biomarkers Associated With Oxidative Stress and Histological Assessment of Low-Level Laser Therapy in Experimental Myopathy. *Laser Surg Med* 2010; 42: 577-83.
- Silveira, P.C., Streck, E.L., Pinho, R.A. 2007. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B* 2007; 86: 279-82.
- Sluka, K.A., Skyba, D.A., Radhakrishnan, R., Leeper, B.J., Wright, A. 2006. Joint Mobilization Reduces Hyperalgesia Associated With Chronic Muscle and Joint Inflammation in Rats. *J Pain* 2006; 7: 602-7.
- Soriano, F., Campana, V., Moya, M., Gavotto, A., Simes, J., Soriano, M., Soriano, R., Spitale, L., Palma, J. 2006 Photomodulation of Pain and Inflammation on Microcrystalline Arthropathies Experimental and Clinical Results. *Photomed Laser Surg* 2006; 24: 140-50.
- Suazo Galdames, I.C., Sepúlveda, M., Cantín López, M., Zavando Matamala, D.A. 2007. Effect of the Low-power Laser on the Oral Mucous Injured. *Int J Morphol* 2007; 25: 523-52.
- Trijbels, J.M.F.; Ruttenbeek, W.; Sengers, R.C.A.; Janssen, A.J.M.; Van Oost, B. A. 1996. Bening Mitochondrial Encephalomyopathy in a Patient with Complex I Deficiency. *J Inher Metab Dis* 1996; 19: 149-152.
- Viatkina, G.; Vandanjay, B.; Arpad, G.; Papaconstantinou, J. 2004. Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development. *Bioch Biophys Acta* 2004; 1689: 162-173.
- Vladimirov, Y., Osipov, N., Klebanov, G. 2004. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochem* 2004; 69: 103-13.
- Wharton, D. C.; Tzagoloff, A. 1959. Cytochrome Oxidase from Beef Heart Mitochondria. *Methods of Biochemical Analysis*, New York: D. Glick, ed. 1959; Vol. II: 427-435.
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W. 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 111: 544-7.

Agradecimientos.

El presente trabajo ha sido financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba y de la Universidad Nacional de La Rioja.