



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Departamento de Ciencias Médicas Básicas

**Efecto de los Láseres de Arseniuro de Galio-Aluminio
(655 y 830 nm) a Baja Potencia sobre la Neurotransmisión
en la Unión Neuromuscular**

Tesis Doctoral
Renata Amadei Nicolau
Reus, 2005

*Efecto de los láseres de Arseniuro de Galio-Aluminio (655 y 830 nm)
a baja potencia sobre la neurotransmisión en la unión neuromuscular.*

Tesis Doctoral



**UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI**

Departamento de Ciencias Médicas Básicas

**INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS EXPERIMENTALES APLICADAS A LA
BIOMEDICINA**

UNITAT D'HISTOLOGIA I NEUROBIOLOGIA (UHN)

**Efecto de los Láseres de Arseniuro de Galio-Aluminio
(655 y 830 nm) a Baja Potencia sobre la Neurotransmisión
en la Unión Neuromuscular**

Memoria presentada por

Renata Amadei Nicolau

Para conseguir el grado de

Doctor en Ciencias Médicas Básicas

Reus, 2005



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES

Carrer Sant Llorenç, 21
43201 Reus
Tel. 977 759 300
Fax 977 759 322

JOSEFA RIGAU I MAS, Profesora Asociada del Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, de la Universidad Rovira i Virgili, y

MANEL SANTAFE MARTINEZ, Profesor Titular Universitario del Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, de la Universidad Rovira i Virgili,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctotal “ Efectos de los láseres de Arseniuro de Galio-Aluminio (655 y 830 nm) a baja potencia sobre la neurotransmisión en la unión neuromuscular”, presentada por Doña Renata Amadei Nicolau, ha sido realizada, bajo su dirección, en la Unidad de Histología y Neurobiología del Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud.

Y que, a la vista del trabajo desarrollado para aspirar al título de Doctor,

AUTORIZAN:

Su presentación y defensa ante la comisión correspondiente.

Reus, 30 de noviembre de 2004

Josefa RIGAU i MAS

Manel SANTAFÉ MARTINEZ



¿Por qué esta magnífica tecnología científica, que ahorra trabajo y nos hace la vida más fácil, nos aporta tan poca felicidad? La respuesta es, simplemente: porque aún no hemos aprendido a usarla con tino.

Albert Einstein

A Mauro y Gabriela

AGRADECIMIENTOS

Quisera que las próximas líneas sirvan como reconocimiento a las personas e instituciones que han hecho posible la realización de esta tesis. A todas ellas, quiero agradecer de todo corazón la ayuda dispensada:

A mis directores, Dra. Josepa Rigau i Mas y Dr. Manel Santafé, por sus guías y sus valiosas aportaciones, sin las que este trabajo no hubiera sido posible.

Al Dr. Nicolau Ortiz por el asesoramiento en las técnicas de neurografía motora.

Al director de la Unidad de Histología y Neurobiología, Dr. Josep María Tomàs i Ferré, por la oportunidad que me brindó de realizar este trabajo, y por lo mucho que me ha enseñado.

A las Dras. Mari Angel Lanuza y Neus Garcia por la amistad e incentivo en los momentos difíciles.

A los compañeros de doctorado y, principalmente, a los inolvidables e incommensurables amigos Marc Ignasi Corral Baqué y Albert Amat, por todo el cariño y atenciones desde los primeros días de mi llegada.

A las compañeras del día a día: Carmen González, Isabel Salón y Mar Sabaté, que compartieron conmigo las experiencias en el laboratorio y en la unidad.

A la Dra. Maria Rosa Fenoll que siempre tiene una sonrisa amiga, una ayuda o un incentivo a ofrecer.

A Amparo Aguilar, por la gran ayuda en el laboratorio.

Al Dr. Renato Amaro Zângaro, con el cual tuve la honra y satisfacción de trabajar durante los últimos años. Persona que me incentivó y junto con el Dr. Batista Gargione Filho y el Dr. Marcos Tadeu T. Pacheco han hecho posible la concesión de mi beca de los estudios de doctorados en la URV.

A la Universitat Rovira i Virgili, a la Universidade do Vale do Paraíba y a SORISA por el soporte económico que ha permitido realizar esta tesis.

A mi familia y amigos, que también han puesto su grano de arena y me han apoyado incondicionalmente.

A mi marido Mauro y mi hija Gabriela, que aún estando distantes, me han apoyado y fortificado durante todo el tiempo de la investigación.

INDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Unión Neuromuscular	3
<u>1.1.1. Neurotransmisión</u>	8
<u>1.1.2. Electrofisiología</u>	13
<u>1.1.3. Neurografía motora</u>	14
1.2. Láser	16
<u>1.2.1. Láser de baja potencia y la neurobiología</u>	17
1.2.1.1. Láseres rojos	19
1.2.1.2. Láseres infrarrojos.....	20
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	30
2.1. Hipótesis	30
2.2. Objetivo General	30
2.3. Objetivos Específicos	30
3. MATERIAL Y METODOS	32
3.1. Animales	32
3.2. Obtención de las muestras	33
3.3. Láser	34
3.4. Temperatura de la muestra durante la irradiación láser	36
3.5. Transmisión de la luz	37
<u>3.5.1. Muestras de piel humana</u>	37
<u>3.5.2. Muestra de piel de ratón</u>	37
<u>3.5.3. Músculo diafragma de ratón</u>	37
3.6. Estudio electrofisiológico	39
<u>3.6.1. Estudio poblacional de MEPPs y EPPs con bloqueo pre- y postsináptico</u> ...	39
<u>3.6.2 Estudio de EPPs con pares de pulsos</u>	40
3.7. Estudio electroneurográfico	46
3.8. Análisis estadístico	50
4. RESULTADOS	52
4.1. Temperatura durante la irradiación láser	52
4.2. Transmisión de los láseres de AsGaAl (655 y 830 nm) a través de muestras	

de piel humana, muestra de piel y músculo diafragma de ratón.....	55
4.3. Estudio electrofisiológico. Estudio poblacional de MEPPs y EPPs con bloqueo pre- y postsináptico.....	57
<u>4.3.1. Efecto de la irradiación láser en los potenciales de placa terminal en miniatura (MEPPs)</u>	<u>57</u>
<u>4.3.2. El efecto de la irradiación láser en los potenciales evocados de placa terminal (EPPs) en presencia de curare (dTC)</u>	<u>59</u>
<u>4.3.3. Efecto de la irradiación láser en los EPPs en presencia de alta concentración de magnesio (MgSO₄)</u>	<u>60</u>
4.4. Efecto de la irradiación láser en los EPPs evocados con par de pulsos (PP)....	63
4.5. Neurografía motora.....	66
5. DISCUSIÓN	69
5.1. Efecto del láser rojo sobre la neurotransmisión (<i>in toto</i>)	78
5.2. Efecto del láser infrarrojo sobre la neurotransmisión (<i>in toto</i>).....	81
5.3. Efecto del láser rojo e IR-cercano en la neurotransmisión (<i>in vivo</i>).....	84
6. CONCLUSIONES.....	87
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	90
8. ABREVIATURAS Y SIMBOLOS.....	117

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema representativo ultraestructural de la unión neuromuscular (componentes pre- y postsináptico).....	4
Figura 2. Receptor nicotínico (membrana postsináptica - unión neuromuscular) y sitios de acoplamiento de la ACh al RACH (subunidades α), permite el cambio del gradiente de iones (sódio y potásio; adaptado de Pestronk, 2004).	7
Figura 3. Esquema del cambio iónico transmembrana durante el potencial de placa terminal y potencial de acción. I) Potencial de membrana en reposo. II) Despolarización. III) Repolarización. IV) Periodo refractario. V) Potencial de membrana en reposo (adaptado de Chudler, 2003).....	11
Figura 4. Esquema de la formación, liberación y reciclaje de las vesículas sinápticas (adaptado de Nicholls, 1994).	12
Figura 5. Esquema de eventos celulares conocidos y que se espera que se produzcan en cascada, post-irradiación con láser rojo e infrarrojo cercano, con longitud de onda entre 600 - 1064 nm del espectro electromagnético.....	28
Figura 6. Esquema del sistema de registro electrofisiológico intracelular <i>in vitro</i> . A) Cámara de registro conteniendo preparación de hemidiafragma de ratón con su nervio frénico, acoplada a los electrodos de estímulo (a), electrodo de referencia (b) y electrodo de registro (c). B) Sistema digital de registro y análisis de los registros.....	42
Figura 7. Registro intracelular de MEPPs (1 minuto). Escala: barra horizontal, 1 ms; barra vertical, 1 mV.....	43
Figura 8. Registro intracelular de EPPs en negro y la media en rojo, realizados en fibras musculares de diafragma de ratón con bloqueo postsináptico con d-TC (A) y presináptico con alta $[Mg^{2+}]$ en el medio (B). El bloqueo con curare o con Mg^{2+}	

permite que las amplitudes permanezcan en niveles de sumación lineal ($\leq 4,5$ mV). AE- Artefacto de estímulo. X- amplitud media (mV). L- latencia media (ms). Tsub- tiempo de subida media (ms). Escala: barra horizontal, 1 ms; barra vertical, 1 mV..... 44

Figura 9. Registro intracelular de EPP con PP en fibras musculares de diafragma de ratón con bloqueo presináptico con alta $[Mg^{2+}]$ en el medio o bloqueo postsináptico con d-TC. AE- Artefacto de estímulo. Escala: barra horizontal, 10 ms; barra vertical, 2 mV..... 45

Figura 10. Esquema del músculo elevador largo de la oreja (*Levator auris longus*; LAL). **a)** Origen (región mediana del cráneo). **b)** Inserción (oreja). **c)** Nervio auricular posterior. **d)** Localización de electrodos de registro y referencia. Escala: barra horizontal, 1,0 mm (Adaptado de Angaut-Petit y cols., 1987). 47

Figura 11. Esquema de registro de CMAP evocados. **A)** Sistema digital de registro y análisis de los registros. **B)** Animal en posición, con 2 electrodos de estímulo insertados en la rama del nervio auricular posterior facial en el meato acústico (**a**) y en el un paquete muscular del músculo LAL 1 electrodo de registro (**b**) y 1 electrodo de referencia (**c**), a una distancia de 0,5 cm del electrodo de registro. 48

Figura 12. Registro de CMAP en LAL de ratón. Amplitud de pico positivo al pico negativo (*peak-to-peak*) del CMAP evocado. AE- Artefacto de estímulo. Escala: barra horizontal, 2,5 ms; barra vertical, 2 mV..... 49

Figura 13. Temperatura de las muestras de hemidiafragma de ratón post-irradiación (protocolos A, B, C e D; tabla 2) con los diodos láseres de 655 y 830 nm. Las barras representan el porcentaje de cambio entre control e irradiado ($media \pm SEM$). Las diferencias no fueron significativas ($p>0,05$)..... 53

Figura 14. Temperatura de las muestras de piel de ratón post-irradiación (protocolos E, F, G e H; tabla 2) con los diodos láseres de 655 y 830 nm. Las barras representan el porcentaje de cambio respecto a la temperatura control ($media \pm SEM$). Las

diferencias no fueron significativas ($p>0,05$)..... 54

Figura 15. Transmisión de los láseres 655 nm (16 hasta 74 mW) y 830 nm (18 hasta 69 mW) a través de muestras piel humana (■), diafragma () y piel de ratón (●). La irradiación se hizo con el haz de 0,2 cm². Los datos representan el porcentaje de la potencia transmitida a través de la muestra. **A)** Irradiación con láser diodo de 655 nm. **B)** Irradiación con láser diodo de 830 nm..... 56

Figura 16. Efecto del láser de baja potencia sobre los potenciales de placa terminal en miniatura (MEPPs). Irradiación con láser diodo de 655 (protocolos: A y B) y 830 nm (protocolo: C y D). **Frecuencia** de potenciales en miniatura por minuto. **Amplitud** normalizada asumiendo un potencial de membrana de -80mV. Las barras representan el porcentaje de cambio (media ± SEM). Las diferencias no fueron significativas ($p>0,05$) 58

Figura 17. Efecto del láser de baja potencia de AsGaAl de 655 y 830 nm de longitud de onda, sobre los potenciales evocados (EPPs). Las barras representan el porcentaje de cambio sobre los correspondientes controles (media ± SEM). * Diferencias significativas ($p<0,05$). Estudio poblacional de músculos con bloqueo postsináptico (dTC) y presináptico (MgSO₄), irradiados con 4 y 12 J/cm². **A)** Irradiación con 655 nm (protocolos: A y B) y **B)** Irradiación con 830 nm de longitud de onda (protocolo: C y D). 62

Figura 18. Efecto del láser de baja potencia sobre los EPPs por un PP en un medio con concentraciones altas de magnesio (4–7 mM, en 498 fibras) y en preparaciones de dTC (589 fibras). Irradiación con láser diodo de 655 (protocolos: A y B) y 830 nm (protocolos C y D). Las barras representan el porcentaje de cambio (media ± SEM) en el estudio poblacional realizado. Las diferencias no fueran significativas ($p>0,05$)..... 65

Figura 19. Efecto del láser de baja potencia en los CMAPs (n = 20 animales, 3 registros/animal). Láser diodo de 655 (protocolos: E y F) y 830 nm (protocolo: G y H). Los datos representan el porcentaje de cambio (media ± SEM) respecto a los valores control. Las diferencias no fueron significativas ($p>0,05$)..... 67

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Resumen de los datos recogidos sobre la acción de láseres rojos y infrarrojos cercanos en el Sistema Nervioso.....	23
Tabla 2. Protocolos experimentales de irradiación láser. En los protocolos la emisión del haz para ambos láseres fue continua y con un área del haz constante de 0,2 cm ² . Los protocolos de A hasta D y de E hasta H se utilizaran en el estudio electrofisiológico y neurográfico motor respectivamente.....	35
Tabla 3. Porcentaje de cambio en los MEPPs post-irradiación láser.....	57
Tabla 4. Porcentaje de cambios respecto al control en los EPPs post-irradiación láser en presencia de dTC o alta concentración en el medio de MgSO ₄	61
Tabla 5. Porcentaje de cambios respecto al control en los EPPs con PP post-irradiación láser en presencia de dTC o alta concentración de MgSO ₄	64



1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La salud y el bienestar del hombre son los logros perseguidos por las ciencias de la salud. La obtención de terapias curativas o paliativas con un mínimo de efectos colaterales para el enfermo se incluye en estos logros (Croke y Bourne, 1999). Entre las terapias más antiguas se encuentra la utilización de la energía del sol o de la luz mono o policromática para el beneficio humano (Simplicio y cols., 2002). Recientemente se ha comprobado el efecto de la exposición al sol sobre la producción de melatonina en humanos (Boivin y cols., 1996), así como la relación entre los estados depresivos y la ausencia de exposición o baja intensidad de luz solar durante largos períodos de tiempo (Boivin y James, 2002; Karu y cols., 2003).

Desde mediados de los años 60, la manipulación de la energía lumínica apareció como una alternativa terapéutica (Mester, 1966) a partir del desarrollo de la tecnología láser. Utilizando altas y bajas potencias, se abrió un campo nuevo en la interacción de la energía electromagnética con el tejido biológico vivo. Entre los procesos donde más se ha utilizado el láser a bajas potencias como una potencial herramienta, ha sido en el control de la inflamación, reparación de heridas cutáneas (Rigau, 1996; Ribeiro y cols., 2004; Gaida y cols., 2004; Mendez y cols., 2004) y mucosas (Almeida-Lopes y cols., 1999), en tejido óseo (Silva Junior y cols., 2002; Nicolau y cols., 2003; Barbos-Pinheiro y cols., 2003; Khadra y cols. 2004) y disfunciones neuromusculares (Harada y cols., 1991; Asagai y cols., 1994 a y b; Gur y cols., 2002; Ilbuldu y cols., 2004). 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 esta terapia (revisión: Túner y Hode, 1999; Reddy, 2004; Enwemeka, 2004). 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 (Basford, 1993 a; Basford, 1995). La diversidad de parámetros láser así como la gran variedad de protocolos y metodologías usadas, hicieron que muchos trabajos no se consideraron fiables o fuera imposible comparar entre ellos (Bagis y cols., 2002). La explotación comercial contribuyó al descrédito de esta terapia, ya que se anunciaba como “cura milagrosa” para un sin fin de enfermedades y problemas sin ninguna base científica (Basford, 1993 a).

Actualmente la aplicación clínica de esta terapia se realiza casi bordeando el empirismo debido a la ausencia de apoyo en la investigación científica que contribuya a conocimientos básicos de la interacción láser-tejido biológico y, el presente caso, al láser-sistema neuromuscular. Algunos estudios básicos, realizados por grupos de prestigio reconocido utilizando láser con emisión en la región del rojo e infrarrojo (IR) cercano, han impedido que caiga en el olvido la investigación así como la utilización de la terapia láser en general y en particular en disfunciones neuromusculares (Balaban y cols., 1992; Karu, 1999; Karu y cols., 2001; Allais y cols, 2003).

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 (Rigau y cols., 1991; Nara y cols., 1991; Steinlechner y Dyson, 1993; Rigau, 1996). La determinación de los acontecimientos celulares y moleculares de interacción de la energía procedente de láseres rojos y IR-cercano con el sistema neuromuscular, particularmente en la neurotransmisión periférica, sería determinante para el conocimiento y optimización de la terapia láser en especialidades como la rehabilitación o fisioterapia. Asimismo, otro conocimiento básico importante pendiente de investigar a fondo es determinar el umbral de “seguridad del uso” de la terapia láser en determinados tejidos patológicos y en los tejidos sanos circundantes.

1.1. Unión Neuromuscular

La unión neuromuscular es la sinapsis mejor caracterizada desde el punto de vista morfológico y funcional. Debido a su sencillez, tamaño y localización accesible, estas sinapsis permiten un análisis experimental muy estandarizado (Purves y cols., 2001).

La unión neuromuscular está dividida en un componente presináptico (neurona motora) y un componente postsináptico (célula muscular esquelética). El espacio que separa estos componentes se denomina hendidura sináptica.

El componente presináptico está compuesto por el axón y la célula de Schwann. Parte del control de este sistema está regulado por la secreción de un neurotransmisor, la acetilcolina (ACh). En el componente presináptico existen tres tipos de vesículas: las vesículas sinápticas, vesículas *coated* y vesículas *dense-core*. Las primeras están dispersas en el terminal de forma más abundante que las otros dos. Se estima que en cada una de esas vesículas sinápticas hay una cantidad de entre 8000 – 10000 moléculas de ACh (un cuanta; Brown, 1984; van der Kloot y Molgó, 1994). Las vesículas *coated* están situadas en las proximidades de la membrana axonal y tienen la función de recambiar la membrana axonal mediante su fusión a esta durante la neurotransmisión, facilitando la exocitosis de ACh (Palfrey y Artalejo, 1998). Por último las vesículas *dense-core*, que parecen ser moduladoras del componente postsináptico (Burgoyne y Barclay, 2002) cuanto a su maduración y mantenimiento (Pecot-Dechavassine y Brouard, 1993), las cuales pueden sufrir procesos de exo-endocitosis al mismo sitio (Pecot-Dechavassine y cols., 1991; Pecot-Dechavassine y Brouard, 1997; Colasante y Pecot-Dechavassine, 1996) (figura 1).

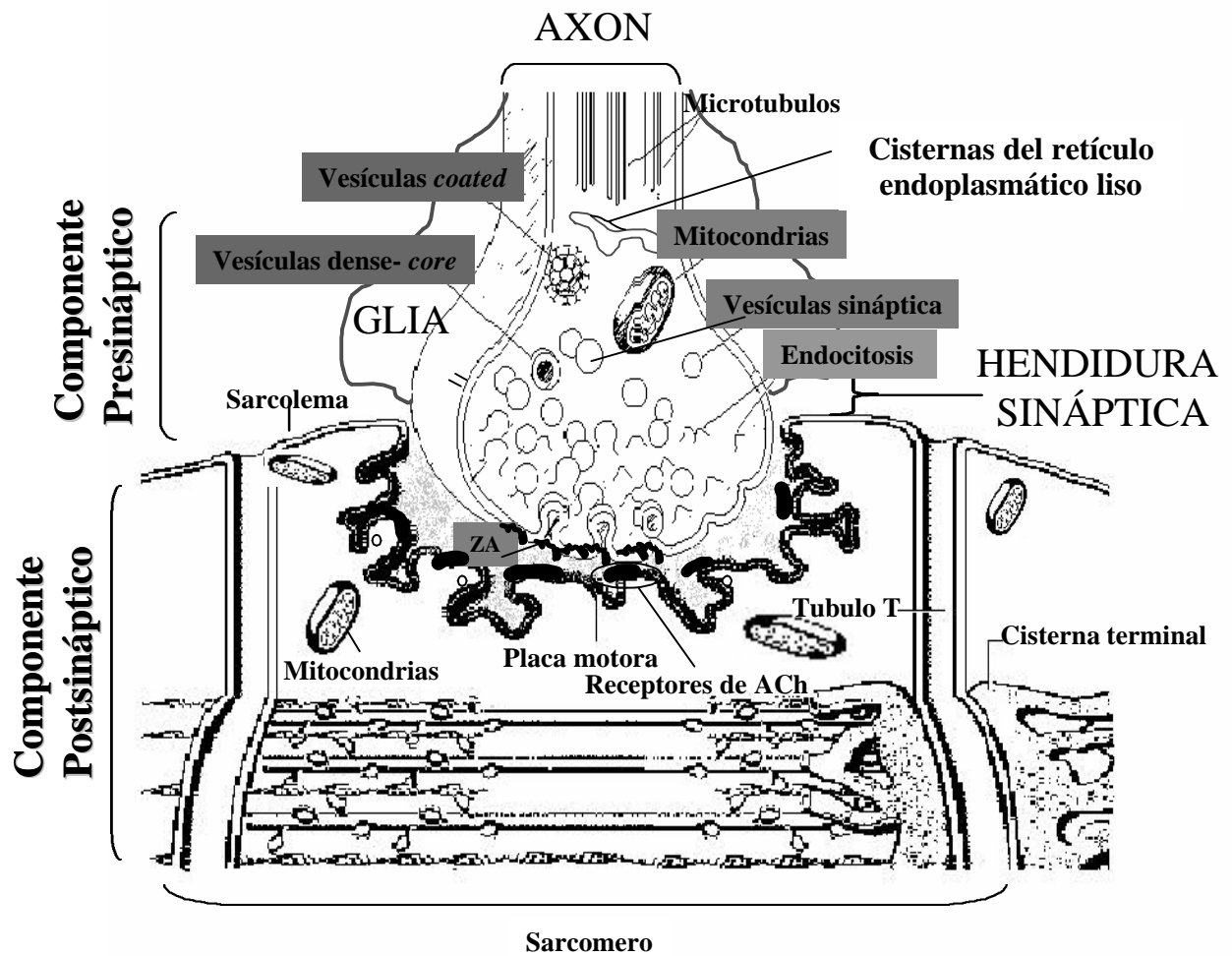


Figura 1. Esquema representativo ultraestructural de la unión neuromuscular (componentes pre- y postsináptico).

La membrana axonal o axolema presenta densificaciones ricas en proteínas, por donde son liberados los neurotransmisores. Estas áreas de la membrana axonal se denominan zonas activas (ZA). Las vesículas sinápticas quedan preferentemente agrupadas en las cercanías de las ZA, ancladas a unos microfilamentos. Estos microfilamentos se fijan a su vez a las zonas activas. La célula de Schwann se deposita, firmemente anclada, sobre el axón y precinta el espacio o hendidura sináptica por sus extremos externos. En la hendidura sináptica, se libera la ACh (Katz y Miledi, 1965), este espacio mide entre 50 e 70 nm y está ocupado por matriz extracelular sináptica (Heuser y Reeser, 1973). Entre otras macromoléculas ésta matriz sináptica permite la íntima adhesión del axón al componente postsináptico gracias a sistemas de adhesión neural y complejos integrina-laminina (Hall y Rutishauser, 1987). Estas uniones moleculares también permiten la difusión de la ACh liberada desde las ZA hasta el componente postsináptico (figura 1) en un tiempo del orden de microsegundos (Ales y cols., 1998).

En el componente postsináptico se encuentra la membrana celular de la fibra muscular. El componente postsináptico se identifica como una superficie con pliegues que forman una depresión en la célula muscular, que se adapta y une al axón, denominada pliegue primario. A parte del pliegue primario existen los pliegues secundarios, que son invaginaciones de las membranas de las células musculares, perpendiculares y radiales, paralelas entre si y que penetran cerca de una micra hacia el interior de la célula muscular. Entre cada dos pliegues secundarios hay una cresta que expone su membrana de una forma directa al axón. Estas crestas presentan la membrana densificada por el acumulo de proteínas relacionadas con la neurotransmisión como canales iónicos, bombas y receptores de la ACh (RACH) (figura 2). La fibra muscular tiene forma alargada y en su interior se encuentran abundantes núcleos y las estructuras encargadas de la contracción muscular: las miofibrillas. Las miofibrillas se encuentran formadas por unidades contráctiles básicas denominadas sarcómeras. A su vez en el interior de cada sarcómera se encuentran unos filamentos proteicos inicialmente

responsables de la contracción: la actina y la miosina, que se interdigitan longitudinalmente entre sí. Al deslizarse entre ellas producen acortamiento de la sarcómera y con ello la contracción muscular. Existen otras proteínas, como la troponina y la tropomiosina, que actúan en la regulación del mecanismo de contracción (Purves y cols., 2001).

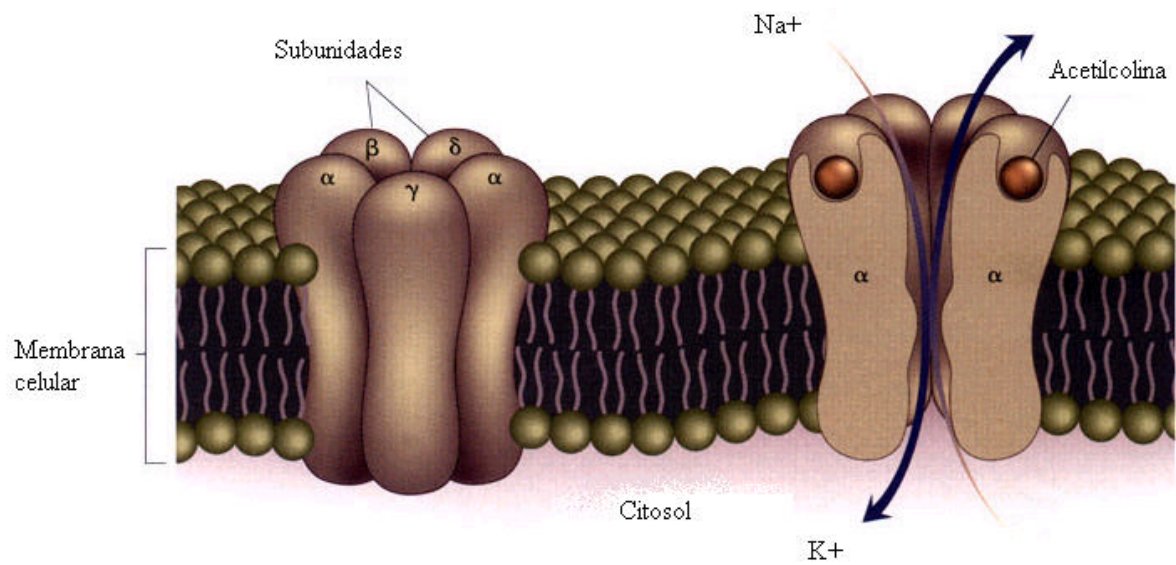


Figura 2. Receptor nicotínico (membrana postsináptica - unión neuromuscular) y sitios de acoplamiento de la ACh al RACH (subunidades α), permite el cambio del gradiente de iones sodio (Na^+) y potasio (K^+); adaptado de Pestronk, 2004).

1.1.1. Neurotransmisión

Las neuronas transmiten las señales sensitivas y motoras por potenciales eléctricos que se conocen por el nombre de potenciales de acción. Una vez iniciado el potencial de acción en cualquier punto de la neurona, este llega al terminal nervioso y se propaga por todo el componente presináptico hasta las ZA. Allí provoca la abertura de canales de calcio voltage dependiente o *voltage-dependent calcium channels* (VDCC), identificados por canales tipo P/Q (Uchitel y cols., 1992; Day y cols., 1997), permitiendo la entrada de cerca de 50000 moléculas de calcio (Ca^{2+}) (Katz y Miledi, 1970; Catterall, 1992; Sakmann, 1992; Birnbaumer y cols., 1994; Catterall, 1995; Losavio y Muchnik, 1997). El aumento de la concentración del calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) activa reacciones en cascada de moléculas presinápticas (Henzi y MacDermott, 1992; Iino y Tsukioka, 1994; Simpson y cols., 1995) y de la ZA como las syntaxinas, sinaptobrevinas, sinaptofisinas, sinaptotagminas, entre otras (Jessell y Kandel, 1993). Uno de los resultados de estas reacciones en cascada es la exocitosis de las vesículas sinápticas con consecuente liberación de ACh a la hendidura sináptica. Con la elevación del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se produce la fusión muy rápida de un pequeño número de vesículas sinápticas a la membrana presináptica. Con el incremento residual del $[\text{Ca}^{2+}]_i$, otras vesículas sinápticas se aproximan a la membrana presináptica a través de los microfilamentos. Estos filamentos se desestructuran facilitando la aproximación de las vesículas hasta la membrana presináptica, con la subsecuente fusión (Trifaro y Vitale, 1993). Conforme las vesículas próximas a la membrana presináptica se agotan, se van liberando las vesículas de reserva (Hamill y Sakmann, 1981; Parsons y cols., 1995). Se ha calculado que la neurotransmisión evocada por un solo episodio de potencial de acción provoca la exocitosis de unas 300000 vesículas sinápticas en todo el terminal nervioso motor. Si cada vesícula excitada incorpora su membrana a la membrana axonal, hemos de suponer que un solo potencial de acción provocaría un exceso

de membrana axonal. En previsión de esto, paralelamente se activa un sistema de endocitosis de membrana que, gracias a la participación de unas proteínas de membrana como las clatras, recuperan la membrana axonal apareciendo en el citoplasma axonal casi tantas vesículas *coated* como vesículas sinápticas que han sido exocitadas. Las vesículas *coated* emigrarán hasta el retículo endoplasmático liso reciclando allí su membrana y creándose vesículas sinápticas vacías de ACh (Heuser y Reese, 1973). En su recorrido desde el retículo endoplasmático liso hasta las ZA se llenan de ACh hasta cubrir un cuanta. Las moléculas de ACh que han sido liberadas, atravesarán la hendidura sináptica y se fijarán a RACh presentes en el componente postsináptico (figura 1 y 2)

El receptor postsináptico tipo nicotínico de la ACh es una estructura proteínica conformada por cinco subunidades (α_2 , β , γ y δ). Hay dos unidades α y una de cada una de las restantes unidades (figura 2). En las dos unidades α se unen dos moléculas de ACh, provocando un cambio conformacional en el receptor. Este cambio permite el paso de iones sodio (Na^+) y potasio (K^+) a través de la membrana postsináptica (figura 3). Este flujo de iones provoca un cambio en el potencial de membrana postsináptica desencadenando el potencial de placa terminal o *End-Plate Potential* (EPP) (Shafqat y cols., 1993). El cambio en el potencial de membrana postsináptica, en general, suele ser lo suficientemente intenso como para llevar el potencial de membrana de la célula muscular muy por encima de su umbral, produciéndose un potencial de acción postsináptico (figura 3). El potencial de acción postsináptico, desencadenado por EPP, hace que la fibra muscular se contraiga. Por otro lado, existen componentes unitarios del EPP generados por la pequeña descarga continuada de ACh desde el terminal nervioso. Son pequeñas despolarizaciones que surgen espontáneamente y tienen aspecto similar al de los EPPs, pero de amplitud menor (0,5-2 mV) y se denominan potenciales de placa terminal en miniatura o *Miniature End-Plate Potential* (MEPPs). Esta liberación espontánea ocurre como resultado de pequeñas oscilaciones locales en la

concentración de calcio intracelular, que provoca la fusión de alguna vesícula sináptica con la membrana presináptica (Silinsky, 1985; Losavio y Muchnik, 1997). Se cree que los MEPPs son producidos por la liberación de 8000 a 10000 moléculas de ACh contenidas en una vesícula sináptica (van der Kloot y Molgó, 1994), mientras que los EPPs son originados por la liberación masiva de ACh (200-300 cuantas de ACh), como respuesta a la excitación del terminal nervioso (Martin, 1966; Hille, 1992).

Los potenciales sinápticos (EPPs y MEPPs) son revertidos mediante hidrólisis de las moléculas de ACh por la acción de la enzima Acetil colinesterasa (AChE), con subsecuente inactivación de los receptores de ACh. La hidrólisis de la ACh genera “colinas” libres en la hendedura sináptica. La colina es captada por el componente presináptico y utilizada como sustrato en la síntesis de nuevas moléculas de ACh, mediante la acción de la enzima colin acetil transferasa y de la acetil coenzima A mitocondrial. La ACh citoplasmática recién formada es introducida en las vesículas sinápticas vacías que se están reciclando en endosomas (Heuser y Reese, 1973) (figura 4).

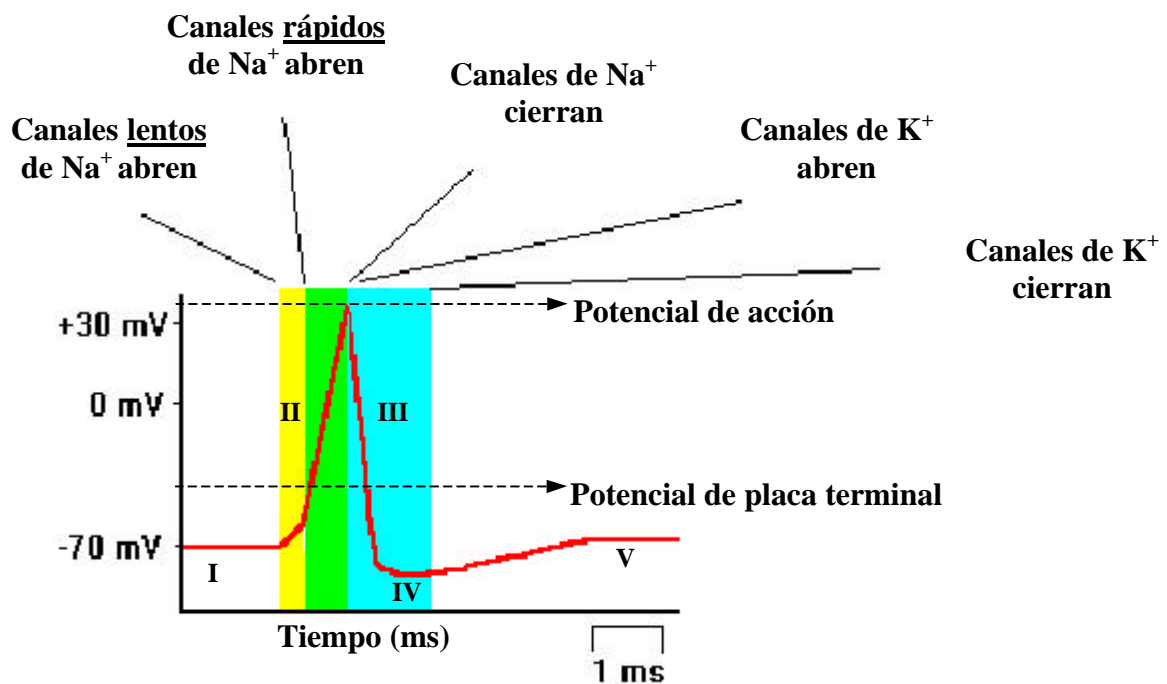


Figura 3. Esquema del cambio iónico transmembrana durante el potencial de placa terminal y potencial de acción. I) Potencial de membrana en reposo. II) Despolarización. III) Repolarización. IV) Periodo refractario. V) Potencial de membrana en reposo (adaptado de Chudler, 2003).

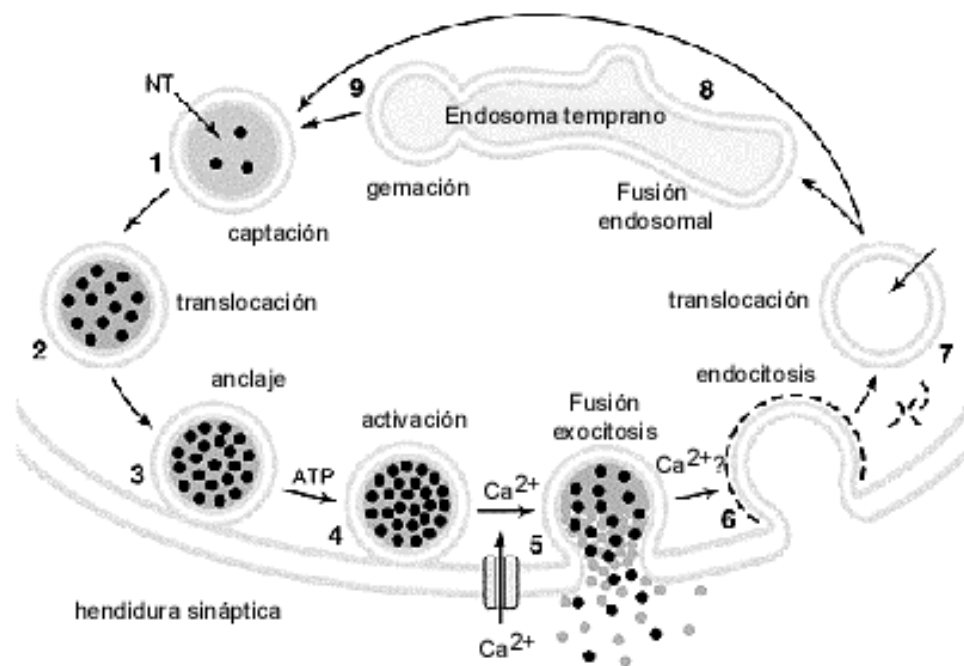


Figura 4. Esquema de la formación, liberación y reciclaje de las vesículas sinápticas (adaptado de Nicholls, 1994).

1.1.2. Electrofisiología

La neurotransmisión en una unión neuromuscular puede ser estudiada por medio de registros a través de microelectrodos, con un sistema de estimulación eléctrica controlada y un sistema de registro intracelular de EPPs y MEPPs así como su evaluación (Hubbart y col., 1969).

Los EPPs representan electricamente las corrientes postsinápticas resultantes de la unión de neurotransmisores secretados por el terminal nervioso a los receptores postsinápticos (RACH). Para poder registrarlas se inserta un electrodo en las inmediaciones de la placa y se evoca la neurotransmisión. Es preciso impedir la contracción muscular ya que puede desalojar el microelectrodo. Habitualmente para eliminar las contracciones musculares podemos actuar presinápticamente disminuyendo la concentración de Ca^{2+} o aumentar la concentración de magnesio (Mg^{2+}) en el medio extracelular o actuando parcialmente, bloqueando los RACH con d-tubocurarina (dTC). El bloqueo postsináptico con dTC es posible debido a su capacidad de acoplamiento a los RACH por un proceso de competencia entre el curare y la ACh (Salgado y cols., 2000; Moyer y van Lunteren, 2001; Fortier y cols., 2001). La frecuencia en la que el receptor se abre y se cierra es muy baja es decir, disminuye el número de veces que se abre y se cierra, pero no el tiempo que está abierta ni el ión que pasa. Con el sulfato de magnesio (MgSO_4) el bloqueo presináptico se produce en función de la penetración del Mg^{2+} en los canales bivalentes, compitiendo con el Ca^{2+} (Caterrall, 1995) disminuyendo la neurotransmisión. Con estos métodos los EPP que se generan son muy bajos (menos de 5 mV) y no llegan al umbral de disparo del potencial de acción muscular y el miocito no se contrae.

1.1.3. Neurografía motora

El axón de una misma neurona motora medular inerva un número variable de miocitos. El conjunto de neurona motora y de las células musculares inervadas por esta, se llama unidad motora (UM). La despolarización de la membrana del cuerpo neuronal de la motoneurona con la consiguiente transmisión del cambio de potencial de membrana que se transmite a través de su axón, es capaz de activar estos miocitos. La técnica de registro de los cambios eléctricos que se producen en todos estos miocitos mediante electrodos de aguja (receptores) se denomina electromiografía. Estos potenciales se llaman potenciales de unidad motora (PUM) y son distintos para cada UM. Estos potenciales suelen presentar un inicio brusco y su morfología en general es bi- o tri-fásica. Cuando se analizan estos PUM, únicamente se recogen los que tiene un tiempo de subida, tiempo transcurrido desde el pico de la primera fase positiva hasta el de la siguiente fase negativa, menor de 200 μ seg. Esto nos asegura que el registro se realiza a una distancia muy corta. Los parámetros más valorables de estos potenciales son la amplitud, que es medida desde el pico positivo más bajo hasta el pico negativo más alto, el número de fases (numero de veces que el trazado del potencial pasa la línea de base) y la duración, tiempo que transcurre desde el inicio del cambio de potencial hasta la vuelta a la línea de base (Kimura, 1983 y 1989).

Utilizando electrodos estimuladores (en general de superficie) con una cierta intensidad de estímulo eléctrico y situados cerca de un nervio, se consigue provocar un cambio de potencial de membrana de los axones de este nervio. Esta despolarización es transmitida en las dos direcciones del axón. La transmisión de este cambio de polaridad de membrana de un axón en sentido periférico es capaz de provocar la despolarización de la membrana de los miocitos de su UM, provocando por tanto un PUM (Tsubahara y Takenaka, 2002). Colocando potenciales de recepción superficiales encima de un músculo inervado por

el nervio que ha sido activado, podemos recoger el cambio eléctrico producido por el conjunto de PUM de las diferentes UM del músculo (Zalewska y cols., 2004). Este potencial se llama potencial de acción muscular compuesto (PAMC; suma de diferentes potenciales UM). Esta técnica se llama neurografía motora. En este caso los parámetros más importantes que se recogen de estos PAMC son la amplitud, medida desde el pico positivo hasta el pico negativo, y la latencia distal, que es el tiempo que tarda en aparecer el PAMC desde que se realiza el estímulo eléctrico (latencia) y nos da idea de la velocidad de conducción (Bagis y cols., 2003; Asawa y cols., 2004). La amplitud del PAMC se correlaciona con el número de axones que activan fibras musculares. La velocidad de conducción se correlaciona con el correcto funcionamiento de la vaina de mielina (Bayramoglu y cols., 2004; Ogura y cols., 2004). El registro de estos potenciales también se puede realizar utilizando pins subcutáneos adyacentes al músculo que se explorará (Kimura, 1983 y 1989; Lomen-Hoerth y cols., 2003).

1.2. Láser

La palabra láser procede del acrónimo de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (luz amplificada por emisión estimulada de radiación). Las características que diferencian la luz de un láser de la luz de una lámpara fluorescente o de filamento son que la luz láser está compuesta por fotones con la misma longitud de onda (monocromaticidad), alta concentración de energía (intensidad), en fase espacial y temporal (coherencia y direccionalidad). La posibilidad de focalizar el haz de láser en áreas muy pequeñas y la emisión de altas densidades de energía, hacen del láser un instrumento de gran interés e importancia para aplicaciones en las áreas de la salud.

Los láseres son clasificados según su efecto térmico o no térmico, en láseres de alta y de baja potencia. Los primeros son destinados principalmente a la cirugía, y son considerados como un buen instrumento para la vaporización, corte y coagulación de tejidos. La utilización del láser como instrumento quirúrgico, se basa en la capacidad de transformación de la energía fotónica (según la longitud de onda) en energía térmica y calorífica en un tiempo controlado. Este efecto afectará más a un tejido o a otro dependiendo del cromóforo predominante. Son ejemplos de esta acción específica:

- a) Corte preciso de tejido neuronal con láser de Dióxido de Carbono (CO_2), causando un mínimo daño periférico ya que es altamente absorbido por el agua;
- b) Coagulación de lesiones vasculares con láser de Neodímio: Ytrio-Aluminio-Granada (Nd: YAG), debido a la alta absorción de energía en esta longitud de onda por la hemoglobina (Krishnamurthy y Powers, 1994).

Los láseres a baja potencia son aplicados tanto para el diagnóstico fotodinámico como para la terapia terapia fotodinamica o para la terapia láser de baja potencia, conocida

internacionalmente LLLT (*Low Level Laser Therapy*) (revisiones: Friedmann y Lubart, 1993; Krishnamurthy y Powers, 1994; Basford, 1995; Rochkind, 1996; Navratil y Dylevsky, 1997).

La LLLT ha sido descrita como una técnica capaz de modular los procesos biológicos. El proceso de reparación de tejidos puede ser modulado por la acción del láser según los parámetros de la irradiación empleados, tales como: longitud de onda, forma de emisión (modo pulsado o continuo; Calderhead, 1991), densidad de potencia y de energía (Calderhead, 1991), frecuencia de pulsos, área de irradiación, ritmo y tiempo de tratamiento (número de secciones semanales y totales), entre otros (Túner y Hode, 1999).

El éxito de esta terapia ha sido referenciado en diferentes especialidades médicas y en una gran variedad de estudios biológicos, en diferentes países de todo el mundo. Pero su forma de aplicación y resultados obtenidos son en algunos casos contradictorios. Estudios actuales, han revelado una gran variedad de mediadores celulares relacionados con el proceso de interacción láser-tejido, tanto en el rango del rojo como en el infrarrojo cercano del espectro electromagnético (Manteifel y cols., 1999; Nelson y Cox, 2000; Uzdensky, 2002).

1.2.1. Láser de baja potencia y la neurobiología

El inicio de las investigaciones sobre la interacción entre la luz y las células eucariotas (específicamente con las mitocondrias) se dió con el trabajo de Arvanitaki y Chalazonitis (1947), considerado hoy un referente. A partir de ese momento y durante las siguientes décadas, aparecieron un gran número de resultados experimentales, reforzando las tesis de que tanto las neuronas como las células musculares pueden ser estimuladas por diferentes longitudes de onda de luz visible (Balaban y cols., 1992).

La interacción láser-sistema nervioso aparece en la literatura con estudios a nivel del sistema nervioso central (SNC) (Iwase y cols., 1996; Rochkind y cols., 2002) y sistema

nervioso periférico (SNP) (Comelekoglu y cols., 2002), tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando diferentes longitudes de onda y/o parámetros de irradiación láser (Túner y Hode, 1999). Este hecho, hace que la mayoría de los trabajos no puedan ser comparados y por otra parte, la mayoría de autores no llagan a una conclusión creando la necesidad de más estudios para esclarecer la acción del láser rojo de baja potencia en el SNP ya sea para reafirmar los resultados o para justificarlos (Naveh y cols., 1990; Kono y cols., 1993; Chelyshev y Kubitsky, 1995; Kasai y cols., 1996; Shamir y cols., 2001; Rochkind y cols., 2001) (tabla 1).

Los principios de la LLLT, tanto con láseres rojos como láseres infrarrojos, se basan en la existencia de compuestos celulares sensibles a la luz, o cromóforos (Walsh y cols., 1995), que absorben la luz. Esta energía absorbida es utilizada en reacciones biológicas adenosina trifosfato (ATP)-dependientes siguiendo los principios de la fotobiología (Karu, 1999). Se ha sugerido la presencia de algunos cromóforos en la unión neuromuscular situados principalmente en la vaina de mielina y en las mitocondrias (Kasai y cols., 1996). La capacidad de absorción de estos cromóforos y la generación de cambios biológicos, esta relacionada con las propiedades físicas de la luz empleada (principalmente la monocromaticidad) y los parámetros de irradiación. Los principales efectos celulares inducidos por láseres de baja potencia en la unión neuromuscular son cambios en el potencial de membrana, interferencia en la liberación de neurotransmisores (Fork, 1971), aumento de la actividad respiratoria y fosforilación en las mitocondrias neuronales (Zubkova y Sokolova, 1978) (figura 5). Otros autores refieren que parte de la acción ejercida por el láser de baja potencia en la unión neuromuscular consistiría en el incremento de la actividad del enzima AChE con la aceleración de la hidrólisis de la ACh (Navratil y Dylevsky, 1997). Las investigaciones no sólo demostraron que la interacción del láser de baja potencia era longitud de onda dependiente sino también dosis dependiente, de esta forma reaparece la tesis de que

los láseres rojos e infrarrojos pueden interactuar con el tejido nervioso de forma diferente uno del otro con sus ventajas y limitaciones.

1.2.1.1. Láseres rojos

El efecto del láser rojo de Helio Neón (HeNe, 632,8 nm) sobre la despolarización y el periodo latente fue estudiado controlando directamente las corrientes iónicas a través de membranas de neuronas con la técnica de *patch-clamp* en neuronas piramidales de hipocampo, células de la glía de rata y en cardiomiocitos de cobaya (Karu y cols., 1996). Re y cols., en el año 1992. Ambos autores describieron el efecto del láser de baja potencia en la membrana del nervio periférico después de la irradiación con láser de HeNe. Se observó la facilitación del gradiente iónico por el aumento de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa. El Cambio en la Na^+/K^+ -ATPasa genera un gradiente de Na^+ y de Ca^{2+} transmembrana que puede interferir en la conducción nerviosa (Kasai y cols., 1996; Lubart y cols., 1996) (figura 5). Estos canales utilizarían el ATP extra para bombear Na^+ y Ca^{2+} (Karu y cols., 1996). Son varios los trabajos de Karu (revisión 1999 y Karu y cols. 2001) y Passarella y cols. (1983 y 1984) que demuestran el aumento de la concentración de ATP mitocondrial provocado por la absorción del láser de baja potencia en la región del visible. Se ha sugerido que los canales iónicos son sensibles al aumento de ATP local, generado por la absorción del láser de HeNe. Otros investigadores observaron el efecto del láser sobre el incremento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ principalmente con luz visible (Young y cols., 1990; Lubart y cols., 1992; Karu, 1992; Vacca y cols., 1996 y 1997; Lubart y cols., 1997). Yu y cols. (1997) también se ha descrito el efecto del láser de Argón-Colorantes a la longitud de onda de 660 nm en el consumo de oxígeno mitocondrial, potencial del fosfato y carga energética post-irradiación con densidad de energía de 0,6–4,8 J/cm^2 y densidad de potencia de $10\text{mW}/\text{cm}^2$. Lubart y cols. (1997) demostraron

que la acción específica del láser a 632,8 nm era dosis dependiente pues, con una potencia del orden de 0,3 mW y energías de 0,06-0,2 J obtenían un aumento de $[Ca^{2+}]_i$, pero cuando se elevaba la dosis de irradiación a una potencia de 10 mW y energías de entre 0,6-7,2 J se producía la inhibición de la captación del ión del medio extracelular hacia el intracelular. Recientemente, Alexandratou y cols. (2002) demostraron en cultivos de fibroblastos humanos, cambios inducidos por la irradiación directa al utilizar el microscopio confocal. El láser utilizado en este tipo de microscopio emitía a una longitud de onda de 647 nm. Los autores observaron cambio en el potencial de membrana mitocondrial, alteración del pH intracelular y una descarga temporal global del $[Ca^{2+}]_i$. Este cambio en el Ca^{2+} intracelular fue citado anteriormente por Lubart y cols. (1996) pero con longitudes de onda de 540 y 780 nm.

1.2.1.2. Láseres infrarrojos

Muchos estudios con láser de infrarrojo cercano son pobremente controlados, con falta de reproductibilidad y con incompleta información de parámetros, generando el descrédito de su utilización (Basford, 1995; Cambier y cols., 2000). La falta de conocimiento en cuanto a la interacción del láser a nivel fisiológico y bioquímico son la base de esta controversia. Las normas de publicación han contribuido a mejora notablemente la calidad de los trabajos publicados en relación a décadas pasadas (Basford, 1995), pero los efectos a nivel molecular del IR-cercano en el sistema nervioso periférico permanece desconocido (Bagis y cols., 2002), principalmente por la falta de inversión en su estudio morfológico.

Estudios recientes han demostrado que la LLLT con láser IR-cercano puede afectar la actividad del sistema nervioso (Asagai y cols., 1994 a y b; Basford y cols., 1993 b y 1995; Cambier y cols., 2000). Uno de los efectos descritos tanto en estudios experimentales (Khullar y cols., 1995 y 1999) como clínicos (Midamba y Haanaes, 1993; Khullar, 1996; Lee y cols.,

1996) es la capacidad de la luz láser IR-cercano de modular la excitabilidad de células neuronales.

El mecanismo general propuesto por Tiina Karu (1999) de la acción del láser rojo y IR-cercano puede ser considerado una acción moduladora es decir, una radiación puede estimular y/o inhibir un proceso biológico dependiendo del tejido diana y de los parámetros de irradiación. El láser IR-cercano induce la descarga del calcio al citoplasma, el cual es responsable de la activación de ciertas funciones celulares. Los principales fotorreceptores primarios en la célula son los componentes de la cadena respiratoria: flavinas, dehidrogenasas, citocromos, y citocromo-*c* oxidasa. Moléculas que tienen en común la presencia de grupos prostéticos o enlaces químicos que tienen la capacidad de oxidarse y/o reducirse. La absorción de fotones por estos componentes causa una activación a corto plazo de la cadena respiratoria. Esto lleva a cambios en el estado redox de la mitocondria. Un aumento en el ion de hidrógeno intracelular y concentración de ATP en las células eucariotas causa activación del Na⁺/K⁺-ATPase que influye en la actividad celular (Conlan y cols., 1996). La absorción de fotones, intensifica la formación de un gradiente protónico electroquímico transmembrana en la mitocondria siendo el Ca²⁺ liberado hacia el citoplasma. El ATP facilita que el Ca²⁺ sea bombeado, generando más Ca²⁺ en el medio circundante, alterando el gradiente de concentración del Ca²⁺ del medio extracelular en relación al citoplasma. Esto activa una entrada rápida de Ca²⁺ hacia el citoplasma vía canales iónicos (Lubart y cols., 1992; Breitbart y cols., 1996; Lubart y cols., 1997; Greco y cols., 2001).

Tanto en neonatos como en adultos, la neurotransmisión es altamente dependiente de la entrada de calcio desde el medio extracelular por los VDCCs (Katz y Miledi, 1970; Santafé y cols., 2001 y 2002). Pequeños cambios en la [Ca²⁺]_i pueden influenciar la neurotransmisión (Narita y cols., 2000). Considerando que las sinapsis traducen cualquier modificación de

[Ca²⁺]_i en cambios en la neurotransmisión y que el láser modifica la [Ca²⁺]_i, la neurotransmisión podría ser afectada por la irradiación láser.

La liberación de ACh evocada en la unión neuromuscular del mamífero maduro es medida por este influjo (Katz y Miledi, 1970). Considerando que las sinapsis pueden demostrar el tránsito de calcio en la membrana o citosol, es posible que la transmisión en la unión neuromuscular se afecte por la irradiación del IR-cercano, puesto que se ha demostrado que la unión neuromuscular puede absorber longitudes de onda comprendidas entre los 500 y 1000 nm (Balaban y cols., 1992; Karu, 1999; Karu y cols., 2001). La especificidad en la dosis y el tiempo de irradiación todavía hoy en día se discute en términos clínicos, principalmente debido a la escasez de datos concluyentes en investigación básica.

Por todo lo expuesto hasta este momento, el poder encontrar un modelo *in toto* e *in vivo* de unión neuromuscular para el estudio controlado de los efectos del láser en el rango del visible e IR-cercano, puede representar un paso adelante en el conocimiento de la interacción láser-tejido neuromuscular.

Tabla 1. Resumen de los datos recogidos sobre la acción de láseres rojos e infrarrojos cercanos en el Sistema Nervioso.

FENÓMENO	CAMBIOS	MODELO	LÁSER (nm)	AUTOR (S)
Reducción de la repuesta neuronal				
Latencia				
			Rojo	
	+	<i>In toto</i>	HeNe (632,8)	Balaban y cols., 1992
	+	<i>In toto</i>	HeNe (632,8)	Ebert y Roberts, 1997
	0	Conejo	HeNe (632,8)	Jarvis y cols., 1990
	-	Conejo	HeNe (632,8)	Kasai y cols., 1996
	0	Hombre	HeNe (632,8)	Lundeberg y cols., 1988
	+	Conejo	HeNe (632,8)	Shi y cols., 1997
			Infrarrojo	
	+	Hombre	AsGaAl (830)	Basford y cols., 1993 b
	+	Revisión	Diodo (830)	Barford, 1995
	+	Hombre	AsGaAl (830)	Cambier y cols., 2000
	0	Hombre	AsGa (904)	Greathouse y cols., 1985
	0	Hombre	Nd:YAG (1064)	Ito y Tsulioka, 1989
	+	Hombre	AsGaAl (830)	Lowe y cols., 1994
	0	Hombre	AsGa (904)	Lundeberg y cols., 1988
	+	Hombre	AsGaAl (890)	Noble y cols., 2001
	+	<i>In toto</i>	Nd:YAG (1064)	Orchardson y cols., 1997
	+	<i>In vitro</i>	AsGaAl (820)	Walsh y cols., 1995
	0	Hombre	AsGaAl (820)	Walsh y cols., 2000
Amplitud				
			Rojo	
	0	Conejo	HeNe (632,8)	Jarvis y cols., 1990
	+	Gato	HeNe (632,8)	Kono y cols., 1993
	0	Hombre	HeNe (632,8)	Lundeberg y cols., 1988
	+	Hombre	HeNe (632,8)	Nelson y Friedman, 2001
	+	<i>In vitro</i>	Argonio (488)	Olson y cols., 1981
	+	<i>In vitro</i>	Diodo (685)	
	-	<i>In toto</i>	HeNe (632,8)	Ratsbaum y cols., 1976
	-	Ratón	HeNe (632,8)	Rochkind y cols., 1987 b
	+	Hombre	HeNe (632,8)	Walter y Akhanjee, 1985
			Infrarrojo	
	-	Hombre	AsGaAl (880)	Antipa y cols., 1996
	-	Ratón	AsGa (904)	Assia y cols., 1989
	0	<i>In toto</i>	AsGa (904)	Bagis y cols., 2002

0	<i>In toto</i>	AsGa (904)	Comelekoglu y cols., 2002
-	Revisión	visible y IR	Friedmann y Lubart, 1993
0	Hombre	AsGa (904)	Greathouse y cols., 1985
0	Hombre	Nd:YAG (1064)	Ito y Tsulioka, 1989
0	Hombre	AsGa (904)	Lundeberg y cols., 1988
0	Ratón	Nd:YAG (1064)	Matsushita y cols., 1989
+	Hurón (<i>Ferret</i>)	Nd:YAG (1064)	Orchardson y cols., 2000
-	Ratón	AsGaAl (830)	Wakabayashi y cols., 1993

Reducción del dolor

Rojo

+	Hombre	HeNe (632,8)	Antipa y cols., 1996
+	Hombre	Diodo (670)	Branco y Naeser, 1999
+		Revisión	Enwemeka y cols., 2004
+	Hombre	HeNe (632,8)	Iijima y cols., 1991
+	Hombre	HeNe (632,8)	Ilbuldu y cols., 2004
+		Revisión	Sun y Tuner, 2004
+	Hombre	HeNe (632,8)	Walker, 1983

Infrarrojo

+	Hombre	AsGa	Allais y cols., 2003
+	Hombre	AsGaAl (880)	Antipa y cols., 1996
+	Hombre	AsGaAl (830)	Asagai y cols., 1996 a
+	Hombre	Nd:YAG (1064)	Basford y cols., 1999
+	Hombre	AsGa (904)	Branco y Naeser, 1999
+	Hombre	Diodo (780, 830)	Brugnera y cols., 2000
+		Revisión	Chow, 2001
+	Hombre	AsGaAl (830)	Chow y cols., 2003
+	Hombre	AsGaAl (832)	Eckerdal y Bastian, 1996
+		Revisión	Enwemeka y cols., 2004
+	Hombre	AsGa (904)	Gur y cols., 2004
+	Hombre	AsGaAl (860)	Irving y cols., 2004
+	Hombre	AsGaAl (809)	Kreisler y cols., 2004
+	Hombre	AsGaAl (830)	Lee y cols., 1996
+	Hombre	AsGaAl (830)	Lowe y cols., 1997
+		Revisión	Marks y cols., 1999
+	Hombre	Diodo (660-950)	Mokhtar y cols., 1995
+	Hombre	AsGaAl (830)	More, 1996 a
+	Hombre	AsGaAl (830)	More, 1996 b

		Revisión	Navratil y Dylevsky, 1997
+			
0	Ratón	AsGa (904)	Parris y cols., 1994
0	Ratón	Diodo (830)	
+	Ratón	AsGaAl (830)	Sato y cols., 1994
+	Hombre	AsGaAl (830)	Simunovic, 1996
+		Revisión	Sun y Tuner, 2004
+	Hombre	AsGa (904)	Tam, 1999
0	Hombre	AsGaAl (830)	Tascioglu y cols., 2004
+	Hombre	AsGaAl (830)	Toida y cols., 2003
0	Hombre	AsGaAl (830)	Tullberg y cols., 2004
+		Revisión	Túner y Rode, 1999

Aumento de la temperatura

		Rojo	
0	Conejo	HeNe (632,8)	Jarvis y cols., 1990
0	Hombre	HeNe (632,8)	Lundeberg y cols., 1988

		Infrarrojo	
+	Hombre	AsGaAl (810)	Asagai y cols., 2000 a
0	Hombre	AsGaAl (810)	Asagai y cols., 2000 b
0	Hombre	AsGaAl (830)	Cambier y cols., 2000
0	Hombre	AsGa (904)	Greathouse y cols., 1985
0	Hombre	AsGa (904)	Lundeberg y cols., 1988
+	Ratón	AsGaAl (830)	Stadler y cols., 2004
0	Hombre	AsGaAl (820)	Walsh y cols., 2000

Aumento del flujo sanguíneo en el SNP

		Rojo	
+	Gato	HeNe (632,8)	Del'tsova y cols., 1983
		Infrarrojo	
+	Hombre	AsGaAl (830)	Asagai y cols., 1996 b
+	Hombre	AsGaAl (810)	Asagai y cols., 2000 a
+	Hombre	AsGaAl (810)	Asagai y cols., 2000 b
0	Hombre	AsGaAl (830)	Tullberg y cols., 2004

Reparación y proliferación celular neuronal

		Rojo	
+	Ratón	HeNe (632,8)	Anders y cols., 1993
+	Hombre	HeNe (632,8)	Antipa y cols., 1996
+	Ratón	HeNe (632,8)	Assia y cols., 1989

+	Revisión	HeNe (632,8)	Belkin y Schwartz, 1989
+	Hombre	HeNe (632,8)	Bersnev y cols., 1996
+	Ratón	HeNe (632,8)	Buliakova y Azarova, 2000
+	Hombre	Revisión	Dionette y cols., 1996
+	<i>In vitro</i>	HeNe (632,8)	Mester y cols., 1991
+	Ratón	HeNe (632,8)	Naveh y cols., 1990
+	Ratón	HeNe (632,8)	Nisan y cols., 1986
+	Ratón	HeNe (632,8)	Rochkind y cols., 1987 a
+	Ratón	HeNe (632,8)	Rochkind y cols., 1989
+	Ratón	HeNe (632,8)	Rochkind, 1992
+	Perro	HeNe (632,8)	
+	Hombre	HeNe (632,8)	Rochkind y cols., 1992
+	Ratón	HeNe (632,8)	Rochkind y cols., 1996
+	Ratón	HeNe (632,8)	Rochkind y cols., 2001
+	Ratón	Diodo (780)	Rochkind y cols., 2002
+	<i>In toto</i>	HeNe (632,8)	Rosner y cols., 1993
+	Perro	HeNe (632,8)	Santiesteban y cols., 1988
+	Conejo	HeNe (632,8)	Schwartz y cols., 1987
+	<i>In vitro</i>	HeNe (632,8)	Shahar y cols., 1996
+	<i>In vitro</i>	HeNe (632,8)	Snyder y cols., 2002
+	<i>In vitro</i>	HeNe (632,8)	van Breugel y Bar, 1992
+	<i>In vitro</i>	Diodo (670)	van Breugel y cols., 1993
+	<i>In vitro</i>	HeNe (632,8)	Wollman y Rochkind, 1998
Infrarrojo			
+	Hombre	AsGaAl (880)	Antipa y cols., 1996
+	Ratón	AsGa (904)	Assia y cols., 1989
0	Ratón	AsGa (904)	Bagis y cols., 2003
0	Ratón	AsGa (890)	Chelyshev y Kubtsky, 1995
0	Ratón	AsGa (1220)	
+	Hombre	Revisión	Dionette y cols., 1996
+	Ratón	AsGaAl (905)	Gigo-Benato y cols., 2004
+	Ratón	AsGaAl (808)	
+	Ratón	AsGaAl (830)	Khullar y cols., 1995
+	Hombre	AsGaAl (820)	Khullar y cols., 1996
+	Rata	AsGaAl (830)	Khullar y cols., 1999
+	Hombre	AsGaAl (830)	Midamba y Haanaes, 1993
+	Hombre	AsGaAl (820-830)	Miloro y Repasky, 2000
+	Perro	AsGa (904)	Santiesteban y cols., 1988
+		Revisión	Túner y Rode, 1999

-	<i>In vitro</i>	Diodo (780)	van Breugel y cols., 1993
+	<i>In vitro</i>	Diodo (830)	

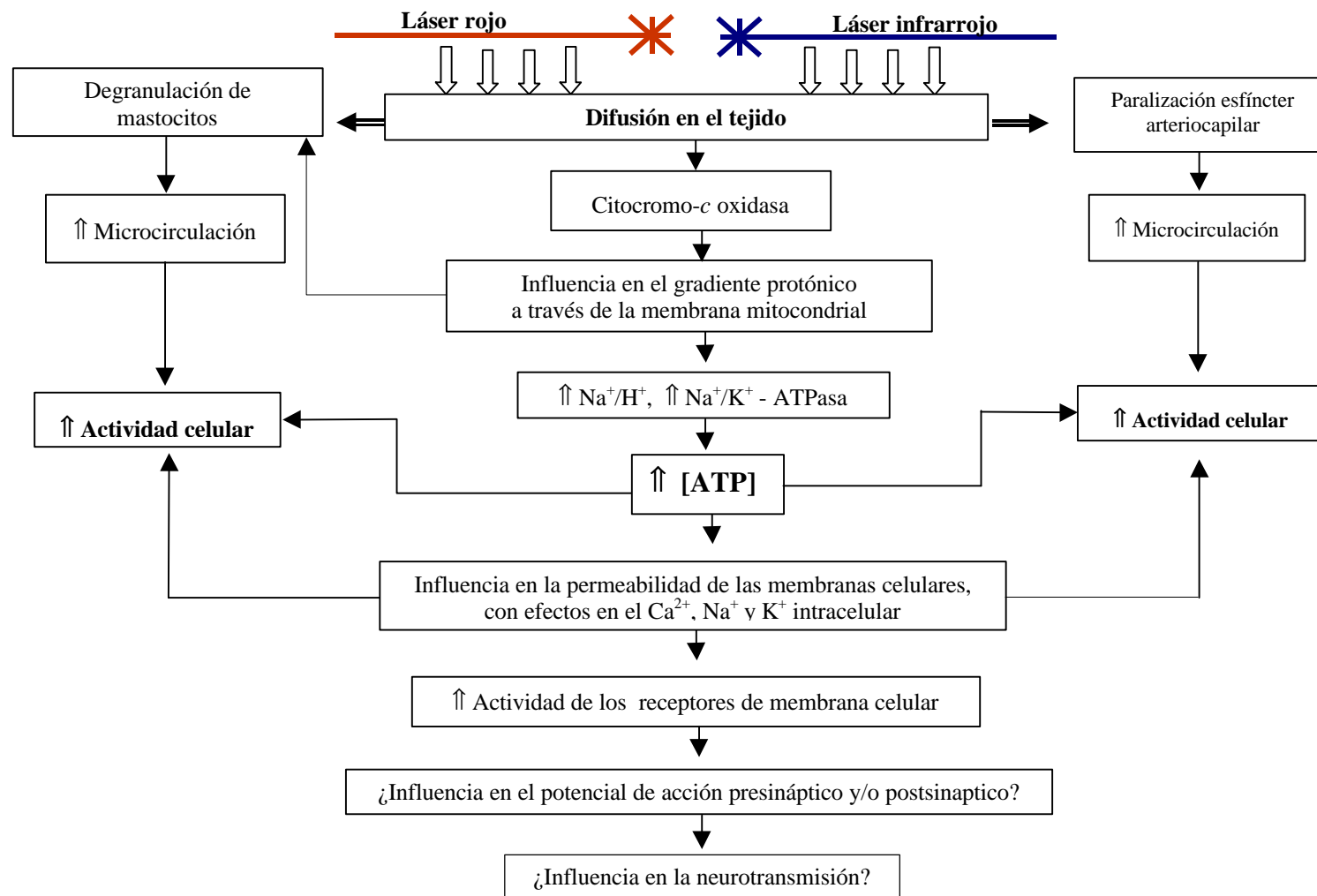


Figura 5. Esquema de eventos celulares conocidos y que se espera que se produzcan en cascada, post-irradiación con láser rojo e infrarrojo cercano, con longitud de onda entre 600 - 1064 nm del espectro electromagnético.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Considerando la existencia de la interacción de la radiación electromagnética producida por los láseres emitiendo en la región del visible infrarrojo cercano sobre la actividad celular, se propone que esta radiación podría tener la capacidad de producir cambios en la transmisión neuromuscular *in toto* e *in vivo*.

2.2. Objetivo General

Estudiar el efecto de los láseres de diodo de Arseniuro de Galio-Aluminio (AsGaAl, 655 y 830 nm) a baja potencia sobre la neurotransmisión en la unión neuromuscular de músculo diafragma y músculo elevador largo de la oreja de ratón.

2.3. Objetivos Específicos

- Estudio electrofisiológico de los potenciales evocados de placa terminal con bloqueo pre- y postsináptico en diafragma de ratón,
- Estudio electrofisiológico de los potenciales espontáneos de placa terminal en miniatura en diafragma de ratón,
- Estudio neurográfico motor del potencial de acción muscular compuesto en el músculo elevador largo de la oreja de ratón.

3. MATERIAL Y METODOS



3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Animales

Se utilizaron 82 ratones *Swiss*, de 20-25 g de peso (Criffa, Barcelona - España). Los animales fueron divididos en dos grupos, un grupo para estudio electrofisiológico (n = 60) y otro grupo para estudio neurográfico motor (n = 20). Dos animales fueran utilizados para experimentos de análisis de temperatura y transmisión del láser sobre muestras de piel y diafragma. Los animales mantenidos en la Facultat de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili, en condiciones de estabulación estándar en cajas de Makrolon® (23x46x14 cm³) a una temperatura entre 20 e 22°C, regulada con un termostato electrónico y humedad relativa de 60-70 %. Sometidos a ciclos de 12 horas de luz blanca artificial, con lámpara de neón, y 12 horas de oscuridad. La alimentación se realizó con pienso de mantenimiento del tipo A.04 Panlab® y agua *ad libitum*.

Para el estudio electrofisiológico se utilizaron hemidiafragmas con su aporte nervioso, aislados (*in toto*) para registro intracelular. En el estudio neurográfico motor de músculo estudiado *in vivo*, se utilizó el músculo elevador largo de la oreja de ratón o *Levator auris longus* (LAL).

La manipulación de los animales fue realizada siguiendo la ley aprobada en 1995 por el Parlamento de Cataluña del 21 de junio (5/1995), de protección de animales utilizados para la experimentación y para otros finales científicos.

3.2. Obtención de las muestras

Los animales fueron anestesiados con tribromoetanol al 2 % intraperitoneal (0,15 ml/10 g de peso) (Sigma-Aldrich, Steinheim- Alemania) y seguidamente desangrados. Para la obtención de las muestras en cada animal, el tórax y la parte superior del abdomen eran extraídos en bloque y sumergidos en solución de Ringer normal (en mM: NaCl, 137; KCl, 5; CaCl₂, 2; MgSO₄, 1; NaHCO₃, 12; NaHPO₄, 1 y glucosa, 11) oxigenada con 95 % O₂ y 5 % CO₂. El hemidiafragma y el nervio frénico derecho correspondiente fueron aislados bajo lupa estereoscópica. El nervio frénico se aisló a partir de su ramificación, cerca de la superficie del hemidiafragma, evitando cualquier tracción del tejido nervioso durante esta fase. A partir de aquí, el hemidiafragma es liberado cuidadosamente del tejido conectivo que cubre el lado torácico del músculo, procurando evitar perforaciones traumáticas de las fibras musculares. Una vez que el nervio frénico y el hemidiafragma estaban separados de sus vainas conectivas se liberaba el corazón y los correspondientes cuerpos vertebrales. El resto de estructuras de la pared torácica, pared abdominal y músculos eran disecados, dejando sólo 3 o 4 mm de pared costal. Finalmente, las costillas se escindían de los cuerpos vertebrales restantes, y se disecaban los hemidiafragmas (Fortier y cols., 2001). En este momento el hemidiafragma con su nervio se transfería a una cámara de mantenimiento y registro con 1 ml de solución de Ringer normal, que se renovaba cada 30 minutos. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente, entre 21 y 25°C.

3.3. Láser

Se utilizaron dos diodos láser de Arseniuro de Galio-Aluminio (AsGaAl) (SORISA, Barcelona - España) de 655 y 830 nm de longitud de onda. Antes de iniciar cada experimento, los diodos eran calibrados con un medidor de potencia y energía (2-Watt Broadband Power/Energy Meter, Modelo 13 PEM 001/J, Holanda). Previamente a la realización de la técnica de electrofisiología y neurografía motora se determinó la temperatura y la absorbancia de las muestras de diafragma así como la piel de ratón, utilizando diferentes dosis de irradiación láser.

Para el cálculo de los diferentes parámetros (tabla 2) densidad de energía, energía, densidad de potencia y área del haz, se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$\text{Densidad de energía (J/cm}^2\text{)} = \text{energía (J)} / \text{área del haz (cm}^2\text{)}$$

$$\text{Energía (J)} = \text{potencia (W)} \times \text{tiempo (s)}$$

$$\text{Densidad de potencia (mW/cm}^2\text{)} = \text{potencia (mW)} / \text{área del haz (cm}^2\text{)}$$

$$\text{Área del haz (cm}^2\text{)} = \pi \times \text{radio}^2$$

Protocolo	Longitud de onda (nm)	DE (J/cm²)	Energía (J)	Potencia (mW)	DP (mW/cm²)	Tiempo (s)
A	655	4	0,8	20	100	40
B	655	12	2,4	118	590	20
C	830	4	0,8	86	430	9
D	830	12	2,4	86	430	28
E	655	137,9	27,6	20	100	1379
F	655	416,5	83,3	118	590	706
G	830	92,9	18,6	86	430	216
H	830	279,1	55,8	86	430	649

Tabla 2. Protocolos experimentales de irradiación láser. En los protocolos la emisión del haz para ambos láseres fue continua y con un área del haz constante de 0,2 cm². Los protocolos de A hasta D y de E hasta H se utilizaran en el estudio electrofisiológico y neurográfico motor respectivamente. DE – densidad de energía. DP – densidad de potencia.

3.4. Temperatura de la muestra durante la irradiación láser

Dos preparaciones de hemidiafragma y dos muestras de piel de ratón de la región periauricular fueron aisladas para evaluar los posibles cambios de temperatura durante la irradiación tanto con láser de 655 nm como con láser de 830 nm. Los parámetros de irradiación fueron: energía desde 0,8 J hasta 83,3 J, DE desde 4 hasta 416,5 J/cm² y DP desde 100 hasta 590 mW/cm², un tiempo de 9 hasta 1379 s. La obtención de la temperatura fue realizada a través de dos sondas térmicas (YSI Reusable Temperature probe - YSI Incorporated 402, resolución $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$). Una de las sondas era fijada en contacto con las muestras (en medio de Ringer normal). La otra sonda era mantenida como referencia, en solución de Ringer. Ambas conectadas a un analizador multicanal digital (Letica – TMP 812). Antes de la irradiación se registraba la temperatura control de la muestra y postirradiación se registraba la temperatura durante cinco minutos. El equipo láser fue calibrado previamente al inicio del experimento. La solución de Ringer normal se renovaba cada 5 minutos, junto al cambio de muestra o de la dosis de irradiación testada. Durante los experimentos la temperatura ambiente fue de $25,9 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$, no interfiriendo en los valores de temperatura de las muestras.

3.5. Transmisión de la luz

3.5.1 Muestras de piel humana

Se utilizaron muestras de piel abdominal humana, de un individuo sano caucásico de 35 años, sometido a cirugía plástica de lipectomía abdominal. La muestra de piel fue mantenida a temperatura ambiente en medio esencial mínimo hasta el momento de su utilización, que no superó las dos horas siguientes a su exéresis.

En la superficie de la piel se irradió por contacto con los diodos láseres de 655 nm (16 hasta 74 mW) y 830 nm (18 hasta 69 mW). Al otro lado de la muestra se detectaba la energía transmitida con un medidor de potencia. La irradiación se hizo con el haz de 0,2 cm².

3.5.2. Muestra de piel de ratón

Una muestra de piel de ratón fue obtenida de la región periauricular, mantenida en Ringer normal oxigenada hasta el momento de su utilización, que se hizo dentro de las dos horas siguientes a su exéresis.

Se procedió a la medición de la energía transmitida con la misma metodología utilizada en la transmisión de piel humana.

3.5.3. Músculo diafragma de ratón

Se utilizó un hemidiafragma con su correspondiente nervio siguiendo la misma metodología de aislamiento y preparación y se procedió a la medición de la energía

transmitida siguiendo la misma metodología utilizada en las mediciones de la transmisión en piel.

3.6. Estudio electrofisiológico

Los registros intracelulares se realizaron mediante un microelectrodo de borosilicato (diámetro interno: $\cong 1 \mu\text{m}$; resistencia de punta: 48-52 $\text{M}\Omega$), conteniendo KCl (3M) en su interior. El electrodo de registro se conectó a un amplificador (Tecktronics, AMSO2). Otro electrodo de Ag-AgCl mantenido a cierta distancia, conectado al baño a través de un puente de Agar (Agar 3,5 % en 137 mM NaCl) se utilizó como referencia. Los registros fueron digitalizados (Digidata 1322A Interface, Axon Instruments, Foster City - USA), almacenados y analizados por ordenador con el programa Axoscope 9.0 (Axon Instruments) (figura 6).

3.6.1. Estudio poblacional de MEPPs y EPPs con bloqueo pre- y postsináptico

En el estudio poblacional de potenciales de placa terminal en miniatura y de potenciales evocados, se utilizaron varias fibras musculares y los registros fueron hechos durante 60 minutos antes (control) y después de la irradiación láser.

La aparición de los MEPPs se registró durante un período de un minuto, con el análisis de la frecuencia por minuto y la amplitud, que fue calculada y corregida asumiendo un potencial de membrana de -80 mV (figura 7).

Para los registros de EPPs se insertó una fibra muscular con un electrodo de registro y se estimuló continuamente el nervio a una frecuencia de 0,5 Hz por medio de dos electrodos de oro conectados a una unidad estimuladora (Cibertec CS-20) (figura 6). La intensidad de los estímulos fue siempre tres veces mayor que el valor del umbral de estimulación del músculo. Durante el registro se previno la generación de la contracción muscular mediante el bloqueo postsináptico con dTC [1,5–2,5 μM (Sigma-Aldrich)] o por bloqueo presináptico con MgSO_4 (4–7 mM) que se añade al medio de mantenimiento de la muestra (Hubbard y cols., 1973). No

fue necesario realizar ninguna corrección de la sumación no-lineal de la neurotransmisión ya que las concentraciones de dTC y MgSO₄ fueron ajustadas para la obtención de EPPs menores de 4,5 mV de amplitud (McLachlan y Martin, 1981) (figura 8 A y B).

Los primeros 20 EPPs de cada fibra fueron despreciados y los 50 EPPs siguientes fueron registrados, con un mínimo de 15 fibras control y 15 fibras post-irradiación (tabla 2) por músculo. Fue rechazado todo registro cuyo potencial de membrana fuera menor a -50 mV así como los registros que tenían oscilaciones superiores a 5 mV con relación al valor inicial de registro.

La media del contenido cuántico (M) de la respuesta evocada fue evaluada con el método de la varianza:

$$M = (V_{EPP})^2 / ((S_{EPP})^2 - (S_{ruido})^2),$$

donde V_{EPP} es la media de la amplitud de EPP, y S_{EPP} y S_{ruido} son la desviación media estándar del registro de amplitud de EPP y la desviación media estándar del ruido, respectivamente (Hubbard y cols., 1969). La amplitud media (X) por fibra fue calculada y corregida asumiendo un potencial de membrana de -80 mV. La latencia (L) de la respuesta evocada fue analizada con el lapso de tiempo transcurrido desde la aparición del artefacto de estímulo hasta la base del EPP. En los experimentos fueron seleccionados para registro sólo los EPPs con menos de 2 ms de tiempo de subida (figura 8 A y B).

3.6.2 Estudio de EPPs con pares de pulsos

El fenómeno de la facilitación de la neurotransmisión fue estudiado mediante registros de estímulos dobles o par de pulsos (PP). El PP genera facilitación cuando se estimula el axón por dos estímulos eléctricos de idéntica intensidad, dentro de un espacio corto de tiempo. Lo

que se espera con esta estimulación doble es el aumento de la amplitud del segundo EPP respecto al primero. Para tal fin, el nervio fue estimulado con dos estímulos de 40 Hz separados por 25 ms. Fue comparada la facilitación entre las fibras control *versus* las irradiadas después de 4 y 12 J/cm² de densidad de energía, en preparaciones bloqueadas parcialmente con dTC (Meakin y cols., 1992) y en presencia de concentración alta de magnesio (Foldes, 1981). Los registros fueron obtenidos de un mínimo de 30 fibras por músculo (fibras control e irradiadas). El análisis se realizó con el cálculo de la razón entre la amplitud del primer EPP (X_1) y el segundo EPP (X_2): X_1/X_2 (figura 9).

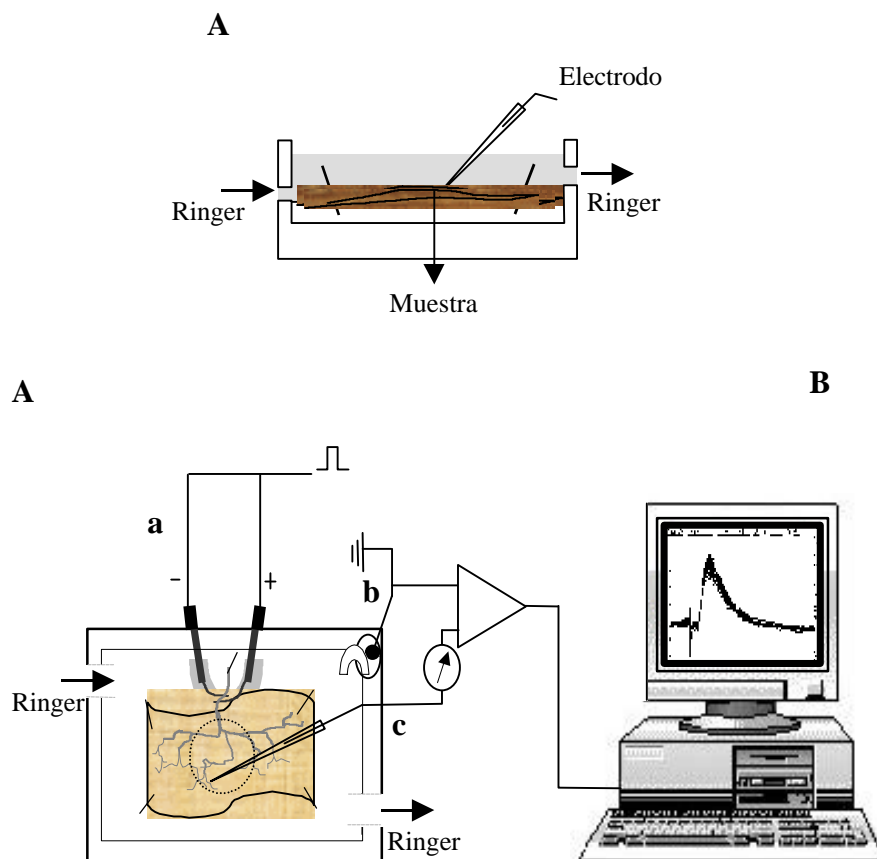


Figura 6. Esquema del sistema de registro electrofisiológico intracelular con muestras aisladas. **A)** Cámara de registro conteniendo preparación de hemidiafragma de ratón con su nervio frénico, acoplada a los electrodos de estímulo (**a**), electrodo de referencia (**b**) y electrodo de registro (**c**). **B)** Sistema digital de registro y análisis de los registros.

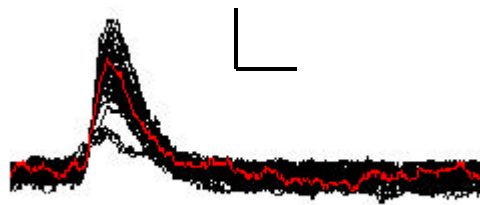


Figura 7. Registro intracelular de MEPPs (1 minuto). Escala: barra horizontal, 1 ms; barra vertical, 1 mV.

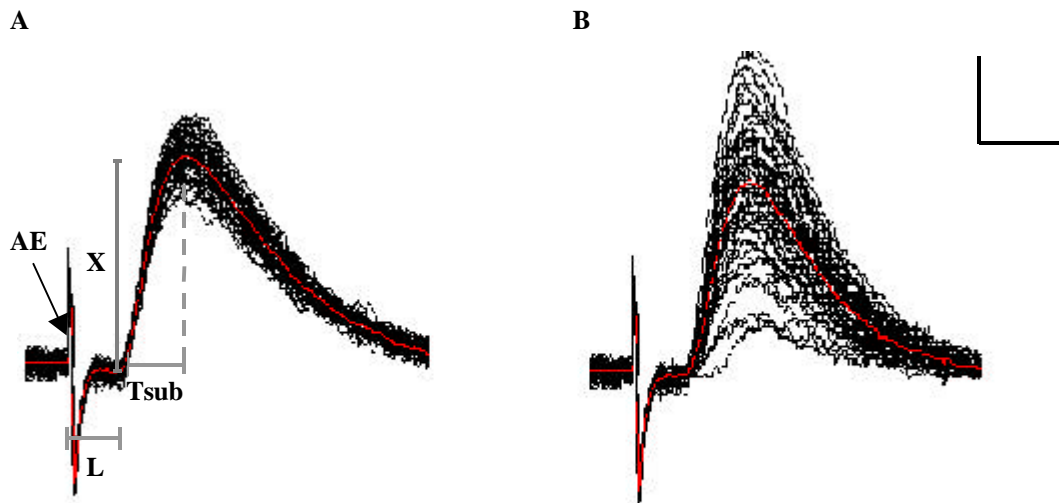


Figura 8. Registro intracelular de EPPs en negro y la media en rojo, realizados en fibras musculares de diafragma de ratón con bloqueo postsináptico con dTC (**A**) y presináptico con alta $[Mg^{2+}]$ en el medio (**B**). El bloqueo con curare o con Mg^{2+} permite que las amplitudes permanezcan en niveles de sumación lineal ($\leq 4,5$ mV). AE- Artefacto de estímulo. X- amplitud media (mV). L- latencia media (ms). Tsub- tiempo de subida media (ms). Escala: barra horizontal, 1 ms; barra vertical, 1 mV.

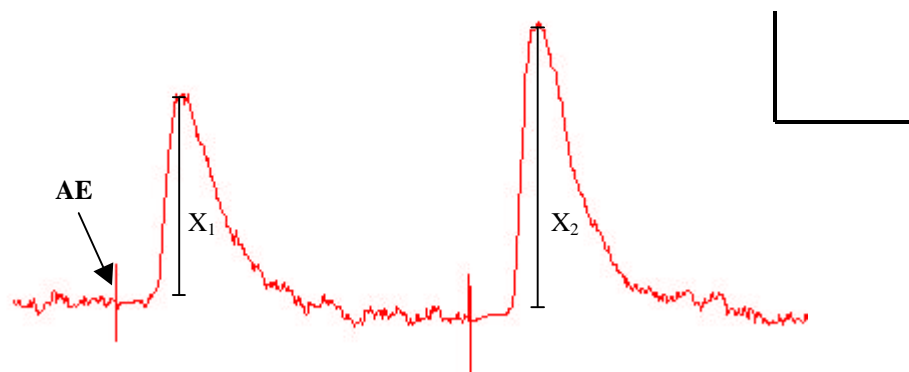


Figura 9. Registro intracelular de EPP con PP en fibras musculares de diafragma de ratón con bloqueo presináptico con alta $[Mg^{2+}]$ en el medio o bloqueo postsináptico con dTC. AE- Artefacto de estímulo. Escala: barra horizontal, 10 ms; barra vertical, 2 mV.

3.7. Estudio electroneurográfico

Este estudio se realizó en el músculo elevador largo de la oreja (Eržen y cols., 2000) o *Levator auris longus* (LAL) (figura 10) de 20 ratones anestesiados previamente por vía intraperitoneal con tribromoetanol a 2 % (0,3 ml/10 g de peso) (Sigma Aldrich, Steinheim - Alemania). El nervio auricular posterior (Trachtenberg, 1998) fue expuesto quirúrgicamente, bajo lupa estereoscópica con aumento de 10x. Entonces, utilizando dos electrodos de tungsteno insertados en el meato acústico, se estimuló continuamente el nervio a una frecuencia de 0,5 Hz mediante una unidad estimuladora (Cibertec CS-20). Para el registro de los potencial de acción motor compuesto (PAMC) fueron utilizados dos electrodos de tungsteno, uno insertado subcutáneamente sobre el músculo (electrodo de registro) y el otro a distancia (electrodo de referencia). El electrodo de registro se conectó a un amplificador Neuro Data IR183 (Cygnus Tehcnology, Inc.) (figura 11). Fueron registrados y evaluados los PAMCs. Se hicieron 3 tipos de registros de PAMCs por animal en 0, 5 y 10 minutos después de la irradiación (tabla 2). Los registros previos a la irradiación fueron considerados registros control (3 registros/animal).

Los registros fueron digitalizados (Digidata 1322A Interface, Axon Instruments, Foster City - USA), almacenados y analizados por ordenador. Se utilizo el programa Axoscope 9.0 (Axon Instruments) para la adquisición y análisis de los registros. El análisis fue realizado a partir de la medida entre los picos negativo y positivo (*peak-to-peak*) de la amplitud del registro del PAMC (figura 12). En estos experimentos (registro pre- y post-irradiación) no se movió ninguno de los electrodos.

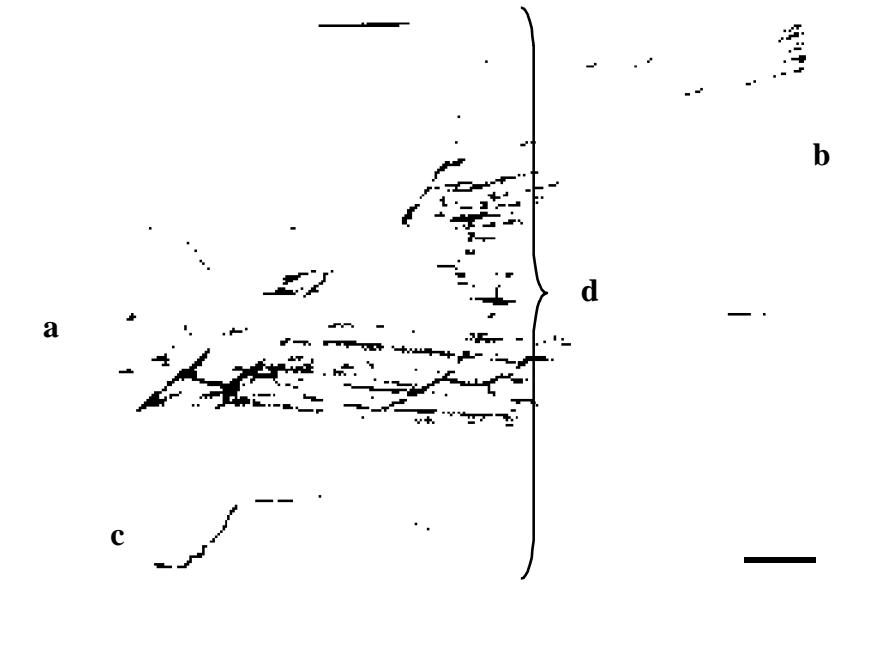


Figura 10. Esquema del músculo elevador largo de la oreja o *Levator auris longus* (LAL). **a)** Origen (región mediana del cráneo). **b)** Inserción (oreja). **c)** Nervio auricular posterior. **d)** Localización de electrodos de registro y referencia. Escala: barra horizontal, 1,0 mm (Adaptado de Angaut-Petit y cols., 1987).

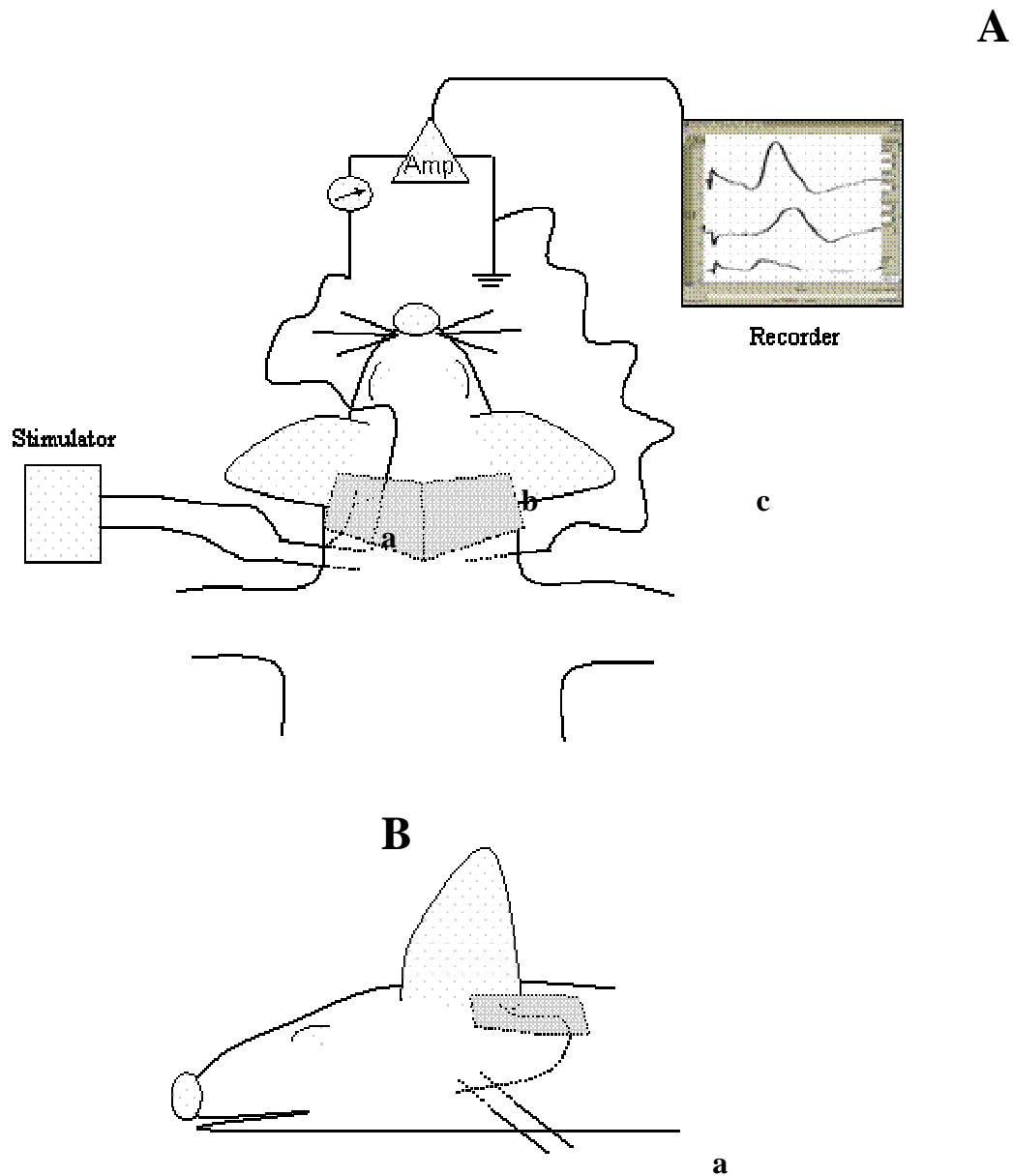


Figura 11. Esquema de registro de PAMCs evocados. **A)** Sistema digital de registro y análisis de los registros. **B)** Animal en posición, con 2 electrodos de estímulo insertados en la rama del nervio auricular posterior facial en el meato acústico (**a**) y en el un paquete muscular del músculo LAL 1 electrodo de registro (**b**) y 1 electrodo de referencia (**c**), a una distancia de 0,5 cm del electrodo de registro.

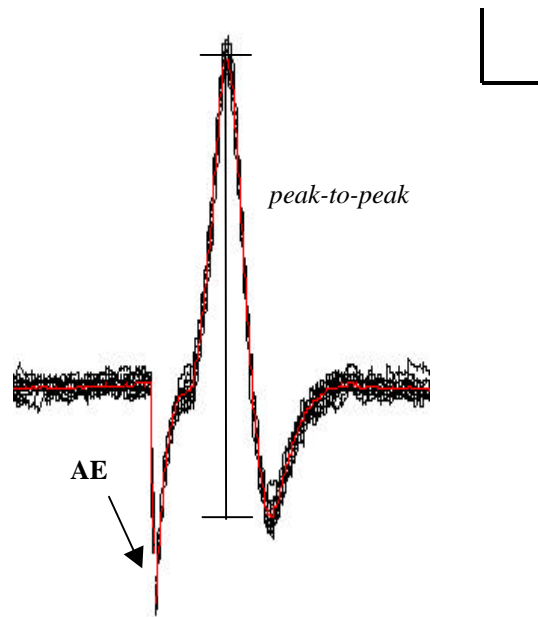


Figura 12. Registro de PAMCs en LAL de ratón. Amplitud de pico positivo al pico negativo (*peak-to-peak*) del PAMC evocado. AE- Artefacto de estímulo. Escala: barra horizontal, 2,5 ms; barra vertical, 2 mV.

3.8. Análisis estadístico

Los resultados fueron almacenados y procesados mediante Microsoft Office 97 (Excel como hoja de cálculo). Los valores de los datos están expresados en media \pm la media de error estándar (*Standard Error Mean*; SEM). Los cálculos estadísticos se hicieron con el programa *GraphPad Prism 2.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA - USA). La significación estadística fue evaluada por el Análisis de Varianza (ANOVA), con la prueba post-hoc de rango múltiple de Bonferroni. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0,05$.



4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Temperatura durante la irradiación láser

Diferentes autores han descrito que un ligero cambio en la temperatura de la unión neuromuscular podría afectar la fisiología neuronal (Goodgold y Eberstein, 1978; Walsh y cols., 1995). Aunque el cambio de temperatura puede corregirse por medio de cálculos de normalización (Cambier y cols., 2000), debe evitarse, trabajando en condiciones próximas de las fisiológicas. Los resultados obtenidos, en las condiciones de trabajo utilizados en la experimentación, demostraron no diferencia significativa ($p>0,05$) en la temperatura tanto en las muestras control como en las post-irradiación (sometida a diferentes dosis). El registro se realizó durante el período de 1 a 5 minutos post-irradiación (figura 13 y 14) para los diferentes láseres.

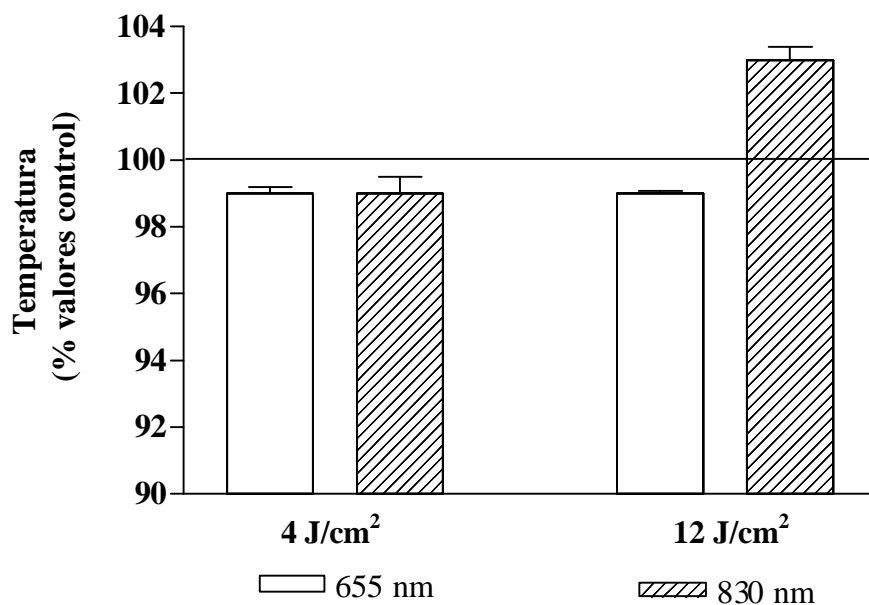


Figura 13. Temperatura de las muestras de hemidiafragma de ratón post-irradiación (protocolos A, B, C e D; tabla 2) con los diodos láseres de 655 y 830 nm. Las barras representan el porcentaje de cambio entre control e irradiado (media \pm SEM). Las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$).

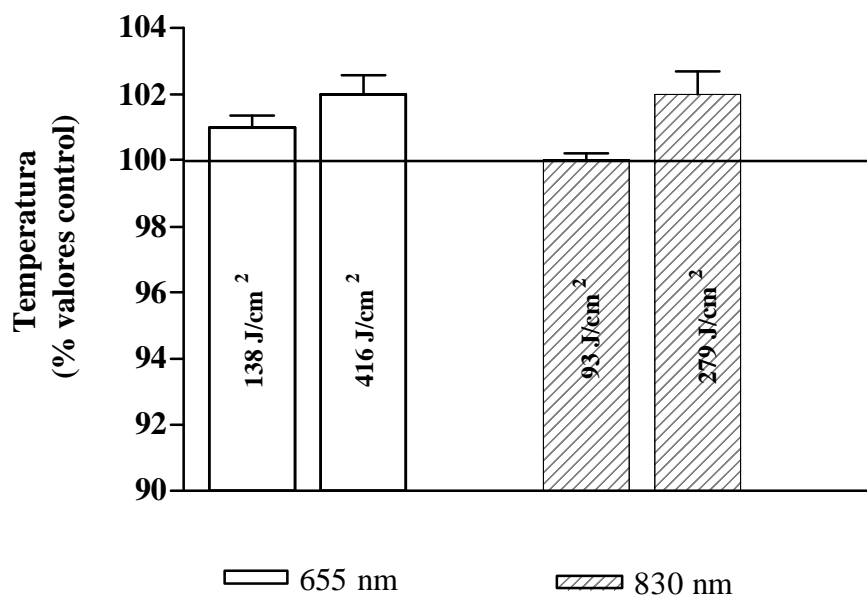


Figura 14. Temperatura de las muestras de piel de ratón post-irradiación (protocolos E, F, G e H; tabla 2) con los diodos láseres de 655 y 830 nm. Las barras representan el porcentaje de cambio respecto a la temperatura control (media \pm SEM). Las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$).

4.2. Transmisión de los láseres de AsGaAl (655 y 830 nm) a través de muestras de piel humana, muestra de piel y músculo diafragma de ratón

Durante la interacción de los distintos láseres con los tejidos biológicos, uno de los fenómenos ópticos que suele ocurrir es la transmisión de la radiación láser a través de los tejidos. Cuanta más energía es contenida por el tejido y menor es la cantidad de energía transmitida a través de este, mayor es la interacción entre el láser y el tejido biológico. Para evaluar la cantidad de energía láser que quedaba en las muestras de piel humana, piel y músculo diafragmático de ratón durante la irradiación con láseres 655 y 830 nm, se hicieron mediciones de la transmisión de radiación a través de estas muestras.

La transmisión del láser de AsGaAl 655 nm a través de la muestra de piel humana (epidermis, dermis papilar y folicular, 1,5 mm de grosor) de individuo adulto caucásico y piel de ratón (1,0 mm de grosor) es de aproximadamente del 3 %, mientras que la transmisión a través la muestra de diafragma de ratón es de aproximadamente 8,5 %. El porcentaje no se altera a pesar de la elevación de la densidad de potencia sobre la muestra (figura 15 A).

La transmisión del láser de AsGaAl 830 nm a través de la muestra de piel humana es de aproximadamente del 1 %, siendo en piel de ratón de aproximadamente del 4,3 %. La transmisión a través la muestra de diafragma de ratón es de aproximadamente 21 %. El porcentaje se altera cuando elevamos la DP sobre las muestra (figura 15 B).

Estos resultados demuestran que poca energía es transmitida a través de las muestras estudiadas, o sea, mucha de la energía que llega a las mismas puede interaccionar con los medios celulares en cuestión.

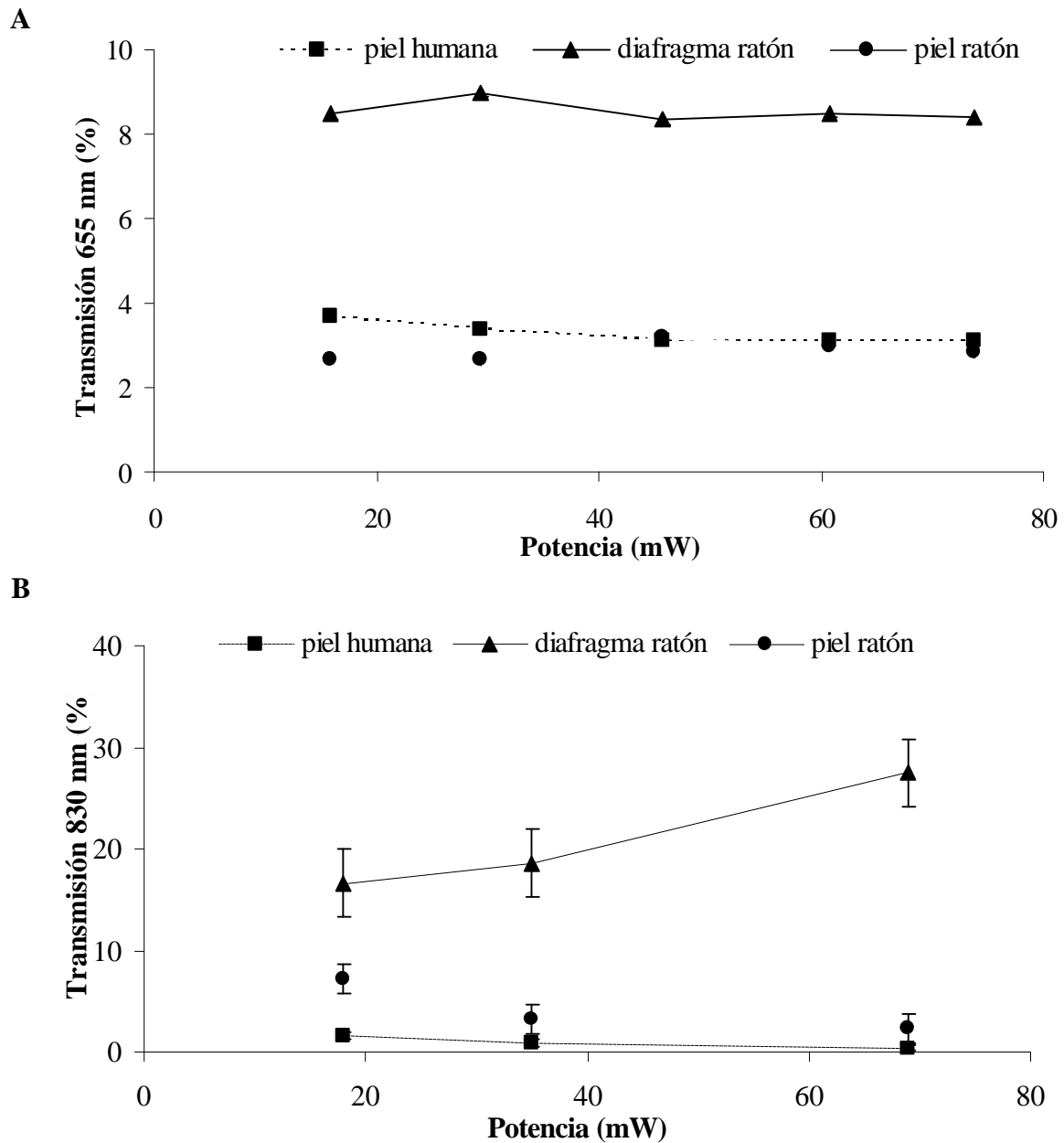


Figura 15. Transmisión de los láseres 655 nm (16 hasta 74 mW) y 830 nm (18 hasta 69 mW) a través de muestras piel humana (■), diafragma (▲) y piel de ratón (●). La irradiación se hizo con el haz de 0,2 cm². Los datos representan el porcentaje de la potencia transmitida a través de la muestra. **A)** Irradiación con láser diodo de 655 nm. **B)** Irradiación con láser diodo de 830 nm.

4.3. Estudio electrofisiológico. Estudio poblacional de MEPPs y EPPs con bloqueo pre- y postsináptico

4.3.1. Efecto de la irradiación láser en los potenciales de placa terminal en miniatura (MEPPs)

La liberación espontánea de vesículas sinápticas (MEPPs) parece responder, entre otras cosas, a cambios locales sutiles en la homeostasis del calcio. Interesa pues, ver si el láser puede modificar la homeostais del calcio en las cercanias de la maquinaria de la neurotransmisión que se evidenciaría como un cambio en la frecuencia de aparición de los MEPPs. Además una variación en la amplitud de los MEPPs nos indicaría alguna modificación a nivel de los receptores de acetilcolina.

Los resultados del estudio electrofisiológico poblacional de 692 fibras musculares se encuentran resumidos en la tabla 3 y figura 16. No se observan diferencias significativas ($p > 0,05$) entre controles e irradiados con las dosis láser testadas.

La ausencia de cambios en los MEPPs descarta la posibilidad de cambios pré (cambio en la frecuencia de los MEPPs) o postsinápticos (cambios en la amplitud de los MEPPs) sea cual sea los láseres estudiados con las distintas dosis empleadas.

Dosis (J/cm ²)	Láser (nm)	Frecuencia (% cambio)	Amplitud (% cambio)	Fibras (n)
4	655	16,7 ± 5,6	6,7 ± 3,9	120
12	655	17,6 ± 4,4	10,9 ± 4,4	211
4	830	8,21 ± 1,8	14,84 ± 5,0	181
12	830	12,65 ± 6,3	7,82 ± 3,8	180

Tabla 3. Porcentaje de cambio en los MEPPs post-irradiación láser.

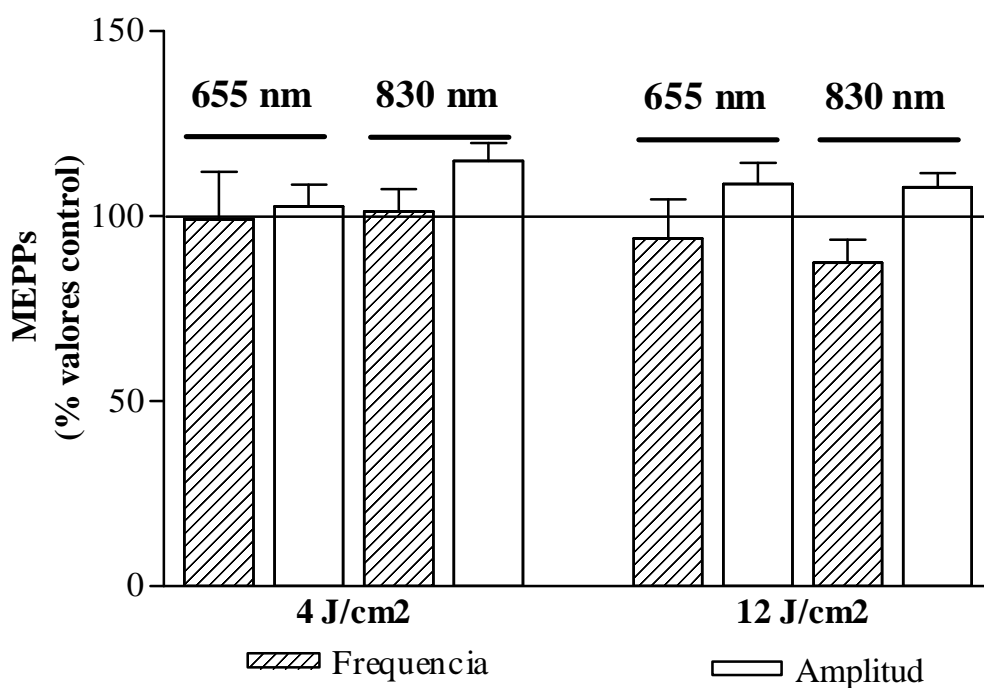


Figura 16. Efecto del láser de baja potencia sobre los potenciales de placa terminal en miniatura (MEPPs). Irradiación con láser diodo de 655 (protocolos: A y B) y 830 nm (protocolo: C y D). **Frecuencia** de potenciales en miniatura por minuto. **Amplitud** normalizada asumiendo un potencial de membrana de -80 mV. Las barras representan el porcentaje de cambio (media \pm SEM). Las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$).

4.3.2. El efecto de la irradiación láser en los potenciales evocados de placa terminal (EPPs) en la presencia de curare (dTC)

Las aportaciones en la literatura investigada, proporcionan bases teóricas de que tanto los láseres en la región del rojo como del infrarrojo son capaces de generar cambios en los eventos ATP y/o calcio-dependientes relacionados en el proceso de la neurotransmisión. De entre las diferentes posibilidades estarían los cambios en la respuesta presináptica y/o postsináptica.

La utilización del curare en las preparaciones permite disminuir la fuerza de contracción del músculo en estudio por un sistema competitivo entre el neurotransmisor (ACh) y la d-Tubocurarina (dTC) por el receptor nicotínico (RACH), pero sin bloquearlo completamente. Es decir que este método permite que el componente presináptico funcione completa y fisiológicamente sin ninguna interferencia por parte del investigador. Esto nos permite estudiar la influencia de los láseres sobre la concentración o tiempo de liberación del neurotransmisor que se pone en evidencia con cambios en el contenido cuántico, amplitud o latencia de respuesta en los EPPs.

En la tabla 4 y figura 17 A y B están resumidos los resultados del estudio electrofisiológico poblacional de 355 fibras musculares.

Tras irradiar con láser de 830 nm con dosis de 12 J/cm^2 99 fibras no hubo cambios en la latencia ($p > 0,05$), pero el contenido cuántico y la amplitud fueron significativamente más pequeños respecto al control ($p = 0,0126$ y $p = 0,038$, respectivamente).

Los resultados demuestran la influencia del láser IR a 12 J/cm^2 sobre la neurotransmisión que se alteraron el contenido cuántico y la amplitud.

4.3.3. Efecto de la irradiación láser en los EPPs en presencia de alta concentración de magnesio (MgSO_4)

Cuando los EPPs se registran en un medio con alto $[\text{Mg}^{2+}]$, entra menos calcio en el axon y el neurotransmisor es liberado en menor cantidad. Es interesante la realización de este tipo de experimentos ya que: a) el componente postsináptico no está manipulado farmacológicamente (a diferencia de los experimentos con curare) y entonces variaciones en la amplitud de los EPP pueden ser sugestivas de afectación postsináptica; b) puede detectarse un posible efecto de la irradiación del láser sobre la neurotransmisión que no podía detectarse en los experimentos con curare.

En la tabla 4 y figura 17 A y B están resumidos los resultados del estudio poblacional de 346 fibras. La irradiación con las distintas dosis y longitudes de onda no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) en el contenido cuántico, amplitud o latencia.

La ausencia de cambios en los EPPs en presencia de alta $[\text{Mg}^{2+}]$, post-irradiación, demuestra la inexistencia o no detectable influencia de los láseres testados sobre el componente pré-sináptico con la técnica empleada.

Estudio	Dosis (J/cm ²)	Láser (nm)	Contenido cuántico (%)	Amplitud (%)	Latencia (%)	Fibras (n)
EPP dTC	4	655	17,1 ± 9,3	6,9 ± 2,8	4,0 ± 0,6	106
	12	655	17,2 ± 3,3	8,4 ± 7,1	15,0 ± 6,0	60
	4	830	16,9 ± 6,5	14,1 ± 2,6	5,6 ± 2,7	90
	12	830	27,8 ± 3,6 *	21,9 ± 2,8 *	4,2 ± 1,1	99
EPP MgSO₄	4	655	11,0 ± 2,7	14,8 ± 9,5	3,1 ± 2,4	65
	12	655	11,6 ± 8,7	6,5 ± 4,2	1,3 ± 0,7	71
	4	830	7,4 ± 5,1	10,2 ± 5,1	3,2 ± 0,7	106
	12	830	7,9 ± 2,4	3,9 ± 1,9	3,1 ± 1,4	104

* $p < 0,05$

Tabla 4. Porcentaje de cambios respecto al control en los EPPs post-irradiación láser en presencia de dTC o alta concentración en el medio de MgSO₄.

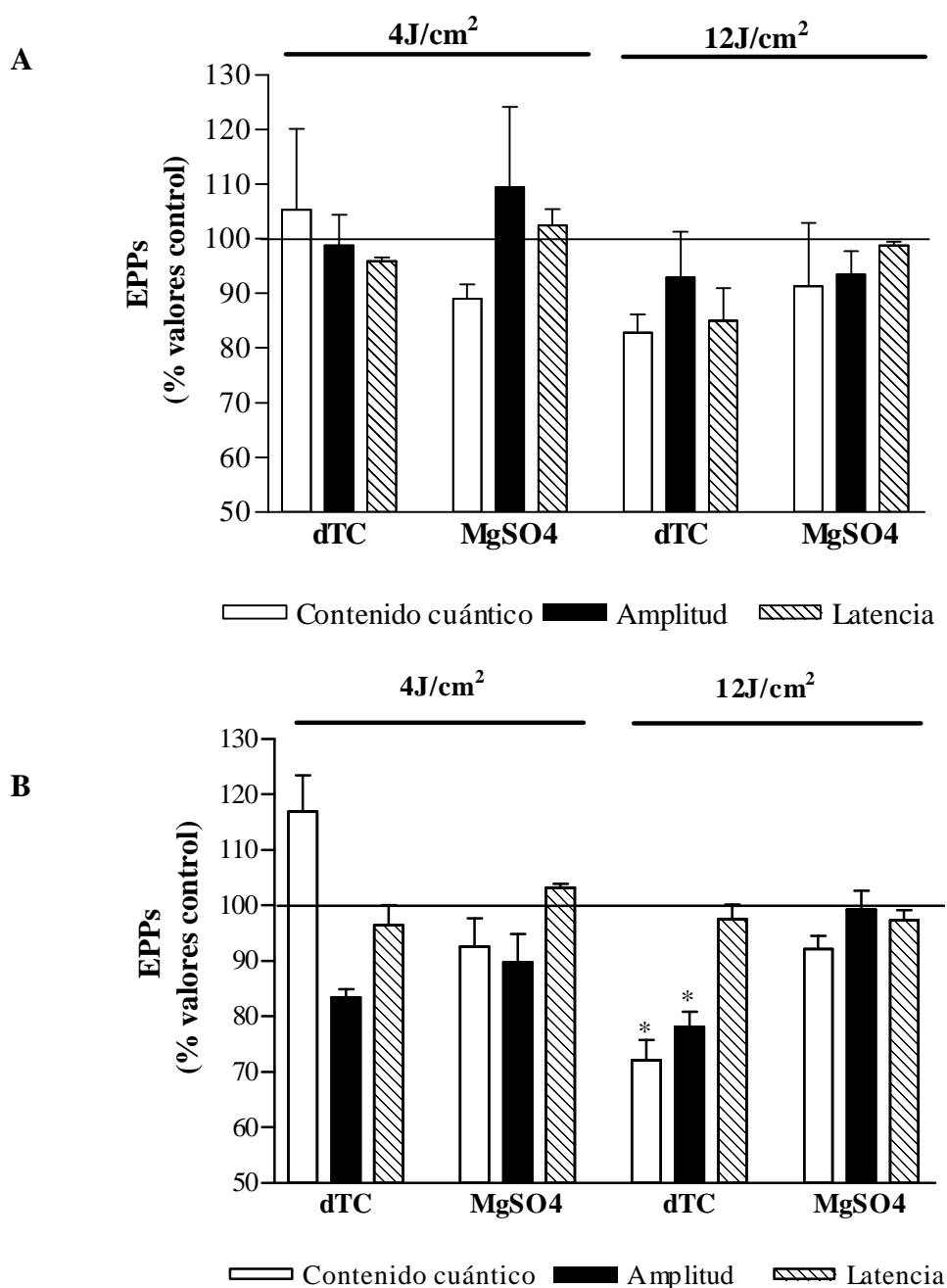


Figura 17. Efecto del láser de baja potencia de AsGaAl de 655 y 830 nm de longitud de onda, sobre los potenciales evocados (EPPs). Las barras representan el porcentaje de cambio sobre los correspondientes controles (media \pm SEM). * Diferencias significativas ($p < 0,05$). Estudio poblacional de músculos con bloqueo postsináptico (dTC) y presináptico (MgSO₄), irradiados con 4 y 12 J/cm². **A)** Irradiación con 655 nm (protocolos: A y B) y **B)** Irradiación con 830 nm de longitud de onda (protocolo: C y D).

4.4. Efecto de la irradiación láser en los EPPs evocados con un par de pulsos (PP)

El estudio de la facilitación y la depresión sináptica es una de las técnicas clásicas en electrofisiología para poner en evidencia la eficacia sináptica. Para ello se utilizan trenes de pulsos de alta frecuencia. Los primeros pulsos suelen generar EPPs progresivamente de mayor tamaño. Eso es debido a que antes de que el sistema *buffer* del calcio (bombas de calcio, mitocondrias, cisternas del retículo endoplasmático liso, etc) haya restaurado la concentración de calcio a valores iniciales aparece el siguiente pulso. A este fenómeno se le denomina facilitación. Después de esta facilitación inicial le sigue una depresión, es decir que los EPPs generados son progresivamente de menor tamaño. Esto es debido a que se están agotando las reservas de vesículas sinápticas y progresivamente se libera menos neurotransmisor. Actualmente se utilizan estímulos dobles, separados solo por unos milisegundos, que únicamente pueden facilitar y que ponen de manifiesto la eficacia de la neurotransmisión en relación con la fisiología del ion calcio. Si el láser influyera sobre la neurotransmisión a través de modificar la fisiología del ion calcio se podría observar con el método del par de pulsos.

En la tabla 5 y figura 18 se resumen los resultados del estudio en un total de 1087 fibras. No se ha encontrado ningún cambio ($p > 0,05$) en la facilitación de EPP, respecto al control en las distintas dosis y longitudes de onda con bloqueo pre- ($MgSO_4$) o postsináptico (dTC).

La ausencia de cambios en la facilitación descarta la posibilidad de influencia de los láseres 655 y 830 nm, a las dosis testadas sobre el ion calcio.

EPP Par de Pulso	Dosis	Láser	X₁/X₂	Fibras
	(J/cm²)	(nm)	(% cambio)	(n)
Bloqueo con MgSO₄	4	655	26,6 ± 1,7	121
	12	655	14,3 ± 11,1	102
	4	830	22,7 ± 14,1	152
	12	830	8,1 ± 5,9	123
Bloqueo con dTC	4	655	1,95 ± 1,6	76
	12	655	23,1 ± 11,9	189
	4	830	17,5 ± 1,9	166
	12	830	4,8 ± 1,0	158

Tabla 5. Porcentaje de cambios respecto al control en los EPPs por par de pulsos post-irradiación láser en presencia de dTC o alta concentración de MgSO₄.

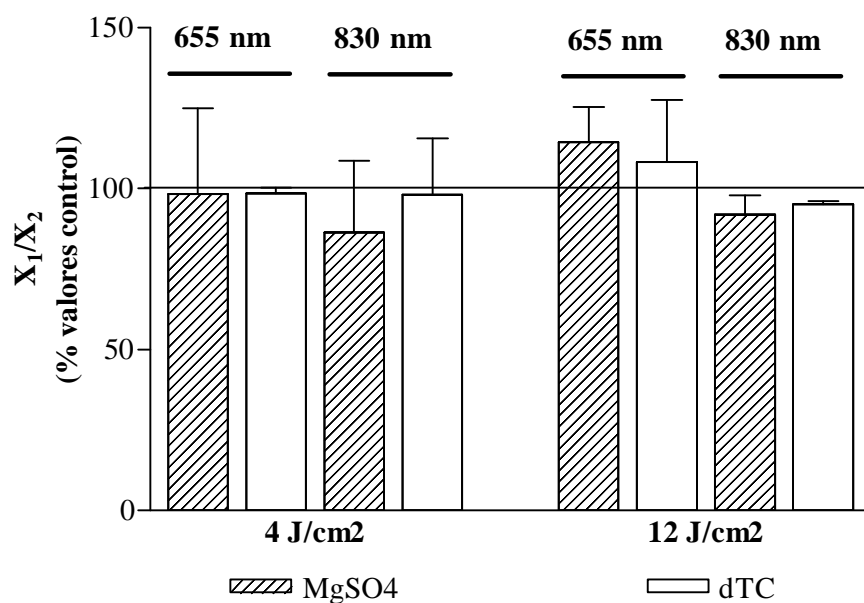


Figura 18. Efecto del láser de baja potencia sobre los EPPs por par de pulsos en un medio con concentraciones altas de magnesio (4–7 mM, en 498 fibras) y en preparaciones de dTC (589 fibras). Irradiación con láser diodo de 655 (protocolos: A y B) y 830 nm (protocolos C y D). Las barras representan el porcentaje de cambio (media \pm SEM) en el estudio poblacional realizado. Las diferencias no fueran significativas ($p > 0,05$).

4.5. Neurografía motora

La electrofisiología *in toto* empleada en los apartados anteriores permiten de una forma muy controlada, en cuanto a las variables del medio, evaluar la interferencia de la irradiación láser sobre el sistema neuromuscular. Sin embargo, las técnicas con la muestra aislada suelen obviar la interrelación de la muestra con otros tejidos y órganos. Es posible que no se observen cambios en un modelo *in toto* pero si *in vivo*. La influencia de los láseres a baja potencia sobre la neurotransmisión y generación de potenciales de acción postsinápticos puede ponerse de manifiesto en un sistema neuromuscular *in toto*. Por lo que, este estudio se hizo con la intención de medir posibles alteraciones en el potencial de acción motor compuesto (PAMC) del músculo *Levator auris longus* (LAL).

En la figura 19 están resumidos los resultados de los PAMCs de 48 registros/experimentos/músculos. No se ha encontrado ningún cambio ($p > 0,05$) en los músculos irradiados respecto al control con la longitud de onda de 655 nm a una DE de 137,9 J/cm² (porcentaje de cambio respecto al control: $10,39 \pm 0,46$ %, $n = 12$) o con DE de 416,5 J/cm² (porcentaje de cambio respecto al control: $2,81 \pm 0,73$ %, $n = 12$). Tampoco se observó cambio significativo ($p > 0,05$) en los músculos irradiados con la longitud de onda de 830 nm ni a una DE de 92,9 J/cm² (porcentaje de cambio respecto al control: $2,53 \pm 1,44$ %, $n = 12$) ni a DE de 279,1 J/cm² (porcentaje de cambio respecto al control: $5,9 \pm 1,41$ %, $n = 12$).

Los resultados obtenidos no corroboran los resultados obtenidos en la electrofisiología *in toto*, frente a la irradiación con longitud de onda de 830 nm a la dosis de 12 J/cm², pero son coherentes con los resultados obtenidos en los apartados anteriormente descritos. Así si el láser IR a 12 J/cm² es capaz de modificar la neurotransmisión, este fenómeno no se repite en un sistema *in vivo* sano.

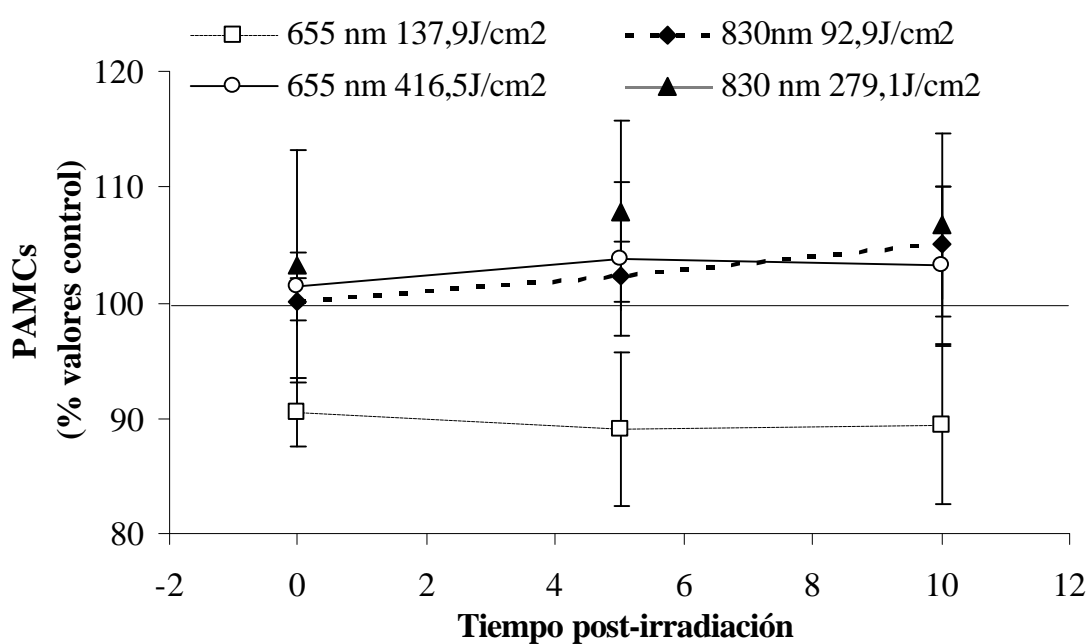


Figura 19. Efecto del láser de baja potencia en los PAMCs (n = 20 animales, 3 registros/animal). Láser diodo de 655 (protocolos: E y F) y 830 nm (protocolo: G y H). Los datos representan el porcentaje de cambio (media \pm SEM) respecto a los valores control. Las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$).



5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Estudios realizados sobre la interacción de los láseres a baja potencia a la longitud de onda de 655 nm (rojo) y 830 nm (IR-cercano), permiten especular sobre una posible acción sobre el sistema neuromuscular (tabla 1) Los láseres de baja potencia utilizados con parámetros adecuados de densidad de potencia y de energía, interaccionan con organelas celulares (Lombard y cols., 1993; Túner y Hode, 1999, Karu y cols., 2004). La absorción de fotones en tejido biológico desencadena reacciones electro-químicas que llevan a un aumento de la síntesis de ATP (Bolognani y cols., 1992; Wilden y Karthein, 1998), transcripción y replicación del ácido desoxirribonucleico (van Breugel y Bar, 1992), modificación iónica (transporte y almacenamiento) intra y extracelular (Breitbart y cols., 1996; Lubart y cols., 1996 y 1997; Greco y cols., 2001), estimulación de la acción de la acetilcolinesterasa (Navratil y Dylevsky, 1997), interferencia en el gradiente de protones en la membrana mitocondrial (Passarella y cols., 1983 y 1984; Friedmann y cols., 1991), variación de la actividad de las enzimas glutamato dismutasa y aspartato transferasa (metabolismo de aminoácidos) y superoxidodismutasa (antioxidante; Lombard y cols., 1993).

La teoría más aceptada es que la energía de los láseres rojos e IR-cercanos es absorbida en la célula principalmente, a nivel de las mitocondrias y membranas, que es donde se sitúa la mayoría de cromóforos conocidos. Según ha demostrado Tiina Karu (Karu, 1999; Karu y cols., 2001, Karu y cols., 2004), el fotón de longitud de onda en el espectro visible-rojo interacciona con la cadena respiratoria, directamente a nivel del citocromo-*c* oxidasa, presente en las crestas mitocondriales, con el consecuente aumento en la síntesis del ATP (Karu y cols., 2004) (figura 5). En el caso de los láseres IR la energía del fotón es muy débil predominando su carácter electro-magnético de onda por encima del energético de fotón aunque, Karu ha demostrado la absorción selectiva de la energía hasta alrededor de los 900

nm del espectro electromagnético en el componente aa3 del citocromo 3 oxidasa produciéndose en consecuencia, un aumento de la síntesis de ATP.

Un aumento del ATP citosólico a nivel del componente presináptico, tanto por interacción del láser rojo como del IR-cercano, puede traducirse en un incremento en el transporte activo de iones transmembrana (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , etc) (van Breugel y cols., 1992; Friedmann y Lubart, 1993; van Breugel y cols., 1993) o, podría influenciar la neurotransmisión, ya que el ATP forma parte de las vesículas sinápticas participando como co-neurotransmisor (Giniatullin y Sokolova, 1998; Galkin y cols., 2001). Así mismo, un aumento del ATP citosólico podría generar cambios en las reacción ATP-dependientes (Friedmann y Lubart, 1993; Navratil y Dylevsky, 1997).

Se han realizado estudios de interacción láser-tejido nervioso *in vitro* e *in vivo*, en estado fisiológicamente sano y patológico (tabla 1). Sin embargo, debemos tener en cuenta que los datos obtenidos a través de estudios con el tejido nervioso *in vitro* no siempre se pueden extrapolar a los mecanismos de la unión neuromuscular *in vivo* o *in toto*. Así como también, en muchos puntos, los efectos de los láseres sobre los procesos de reparación no pueden ser extrapolados a los tejidos sanos y normales, debido a cambios en el pH, microcirculación, oxigenación, etc.

Las longitudes de onda más comúnmente usadas en el espectro del IR-cercano, son aquéllas comprendidas entre el 810 y el 905 nm. Con longitudes de onda entre 820 - 890 nm, se ha observado en humanos sanos voluntarios, la interacción con la conducción nerviosa (Lowe y cols., 1994, Cambier y cols., 2000, Noble y cols., 2001). Otros estudios con 830 nm y 904 nm observan un aumento significativo en el pico negativo de latencia y reducción de la neurotransmisión (Walsh y cols., 1995; Ebert y Roberts, 1997). Así mismo, también encontramos referencias sin resultados significativos utilizando la luz láser de 904 nm, aunque cabe mencionar que estos autores trabajaron con emisión de luz láser frecuenciada con

diferentes pulsos en vez de en emisión continua (Bagis y cols., 2002; Comelekoglu y cols., 2002).

Estudios clínicos demostraron reducción del dolor después de la irradiación tanto en el espectro visible con 630 - 670 nm [Iijima y cols., 1991 (dolor post-herpético); Branco y Naeser, 1999 (dolor en la síndrome del Tunel Carpiano)] como en el IR con 820 - 830 nm [Lee y cols., 1996 (dolor cervical); Eckerdal y Bastian, 1996 (dolor trigemial); Khullar y cols., 1996 (parestesia), Miloro y Repasky; 2000 (parestesia)]. Branco y Naeser (1999), utilizando un diodo láser IR (904 nm) pulsado ha encontrado una reducción clínica significativa del dolor en el síndrome del Tunel Carpiano. Los resultados obtenidos perduran incluso más de 24 meses. Sin embargo, todavía se pueden encontrar estudios clínicos que no obtienen resultados significativos de la conducción nerviosa del nervio radial, por ejemplo, en humanos sanos con dolor provocada experimentalmente, tanto con 820 nm (Walsh y cols., 2000) como con 904 nm en emisión frecuenciada (Greathouse y cols., 1985). Estos resultados apuntan a una posible ausencia de respuesta a la reducción de la neurotransmisión en sistemas sanos.

Muchos estudios clínicos han demostrado reducción del dolor (Irving y cols., 2004; Halguder y cols., 2003), aceleración en el proceso de reparación neuronal (Miloro y Repasky, 2000) y depresión de la neurotransmisión (Nelson y Friedman, 2001), a distintas longitudes de onda y dosis (Enwemeka y cols., 2004), sin embargo algunas aportaciones, tanto experimentales como clínicas, han obtenidos efectos nulos o negativos utilizando parámetros parecidos (tabla 1). Por lo que persiste la polémica en cuanto a longitudes de onda más adecuadas y que dosis son las indicadas en cada patología, así como que dosis terapéuticas causan algún daño en tejidos sanos.

A pesar de los resultados publicados de los efectos de los láseres rojo y IR-cercano (tabla 1) favoreciendo la actividad neuronal y su utilización en clínica, no había aún ninguna evidencia

de como la luz del láser puede influir en la sinapsis neuromuscular (Basford y cols., 1993 b; Sun y Turner, 2004; Reddy, 2004).

Los láseres rojo e IR-cercano poseen propiedades ópticas distintas que varían según el tejido biológico irradiado, propiedades como la energía del fotón, el coeficiente de dispersión y el coeficiente de absorción, entre otros (Anderson y Parrish, 1982; Star, 1997). El láser rojo posee un fotón más energético y con menor poder de penetración en los tejidos, comparado a el láser IR (Enwemeka, 2001). El coeficiente de dispersión en los distintos tejidos es directamente proporcional al grado de concentración de colágeno (Anderson y Parrish, 1982). Un tejido con gran cantidad de fibras organizadas dificulta la transmisión de la luz, pero puede o no interferir en el coeficiente de absorción (Larsson y cols., 2002). El coeficiente de absorción depende de la concentración de cromóforos existentes en un determinado tejido, que puedan absorben una longitud de onda determinada. La interacción del láser con el tejido depende pues, principalmente a la longitud de onda y de la energía (Bagis y cols., 2002). Láseres en emisión en el IR pueden ser absorbidos por moléculas de agua, enzimas, etc. La interacción de la energía absorbida puede inducir efectos en estructuras vecinas, como por ejemplo síntesis o actividad de proteínas (Bolognani y Volpi, 1991).

Otro efecto clínico que ha sido demostrado por diferentes autores, es el efecto del láser a baja potencia sobre la microcirculación (el Sayed y Dyson, 1996; Schaffer y cols., 2000), con una vasodilatación postirradiación que se mantiene durante 10 minutos después de cesar la irradiación (Kubota, 2002). Este fenómeno ha sido estudiado siguiendo varias vías de investigación, destacando los trabajos realizados en los años 80 por Trelles y colaboradores (1989 a y b) que demostraron la degranulación del mastócito en lengua de rata por análisis local y en sangre cardíaca del nivel de histamina, demostrando la diseminación sistémica de las aminas vasoactivas. El efecto de la histamina sobre la circulación provoca vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Otro mecanismo de acción es el efecto sobre las

metarteriolas, produciendo un aumento de la irrigación sanguínea local (el Sayed y Dyson, 1996) (figura 5). Este efecto vascular de aumento de la permeabilidad, vasodilatación y de aumento de la microcirculación es independiente de un efecto térmico desde el punto de vista fotobiológico pero, si que produce un aumento de la temperatura (Stadler y cols., 2004) en el tejido irradiado al aumentar el flujo sanguíneo y este aumento de temperatura si que podría influir en la conducción nerviosa del área. Está descrito que la velocidad de conducción nerviosa puede variar de entre 1 y 2,4 milisegundos por cada grado centígrado de cambio de temperatura (Goodgold y Eberstein, 1978; Cherniack y cols., 2004), así como puede promover cambios en la latencia (Bahrami y cols., 2004), y en la neurotransmisión (Samigullin y cols., 2003). Sin embargo, no debemos olvidar que el sistema nervioso es un sistema altamente controlado, equilibrado y regulado. Es posible que un efecto directo de excitación de la neurotransmisión inducido por los láseres *in vivo*, sea compensado por una disminución de la neurotransmisión por el aumento de la actividad mitocondrial y aumento de la concentración del ATP (De Castro e Silva y cols., 2001), movilización de Ca^{2+} , cambio en el gradiente protónico, etc., que provocaría una rápida liberación de neurotransmisores o una rápida repolarización (Belkin y Schwartz, 1994).

En este estudio fue evaluada la influencia directa de la radiación de los láseres de diodo rojo (655nm) e IR-cercano (830 nm) en la unión neuromuscular, a través de preparación aislada de nervio frénico con su músculo diafragmático correspondiente y en músculo elevador largo de la oreja de ratón. Las técnicas de electrofisiología en muestras aisladas y neurografía motora *in vivo* son idóneas para este tipo de estudios, puesto que la metodología para ambas técnicas está muy bien estandarizada y aceptada por la comunidad científica (Chrisman y cols., 1972; Foldes, 1981, Brown, 1984). La técnica de electrofisiología permite controlar casi todas las variables (por ejemplo la composición del medio, nivel de nutrición y oxigenación de la muestra; Foldes, 1981), situación difícil de lograr en un estudio *in vivo*. La unión neuromuscular de diafragma de ratón es similar a la humana (Meakin y cols., 1992), lo que permite sugerir que los resultados

obtenidos en este estudio nos pueden orientar para entender que ocurre en los músculos humanos. La neurografía motora sin embargo, nos permite evaluar el sistema neuromuscular *in vivo* y la influencia que la circulación sanguínea y el ambiente orgánico-tisular pueden tener sobre la misma, comparando con los resultados obtenidos con muestras aisladas (Asagai y cols., 1994 a y b; Bagis y cols., 2003)

Las técnicas de electrofisiología permiten registros de la conducción nerviosa con precisión (medidas de amplitud y latencia) y por consiguiente, podemos valorar objetivamente los efectos fisiológicos que el láser puede producir en las células (Baxter, 1994; Basford y cols., 1999). En el presente estudio se utilizó la electrofisiología para evaluar los efectos a diferentes dosis de irradiación con láser rojo e IR. Se evaluó el contenido cuántico, la amplitud y la latencia de EPPs con alta concentración de magnesio en el medio (bloqueo presináptico) o con dTC (bloqueo postsináptico). También se evaluó el posible efecto sobre la liberación evocada y facilitación de EPPs, y en la frecuencia y amplitud de MEPPs.

Según la literatura consultada, las dosis de energía varían desde 0,13 a 15 J (Baxter, 1994; Ebert y Roberts, 1997; Turner y Hode, 1999; Enwemeka y cols, 2004). Las dosis de energía que se han utilizado en este estudio, siempre se han mantenido entre 0,2 y 2,36 J, tanto para estudio electrofisiológico como en la neurografía motora. Así mismo, como era la primera vez que se realizaba una irradiación en este sistema de trabajo, para descartar un posible efecto térmico (principalmente del láser IR) se evaluó los posible cambio en la temperatura de la muestra antes, durante y después de la irradiación con diferentes dosis de irradiación. La inexistencia de cualquier alteración en la temperatura de la muestra durante y post-irradiación permite descartar la interferencia del factor térmico en los resultados electrofisiológicos obtenidos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Walker y Akhanjee (1985), Basford y cols. (1990), Bibikova y Oron (1994), los cuales utilizaron dosis de irradiación incluso inferiores a las empleadas en este estudio.

Siguiendo las leyes de la física, la absorción de la luz es inversamente proporcional a la transmisión. La piel, tanto humana como de ratón, tiene unas características ópticas muy poco homogéneas provocando por una parte, una dispersión importante debido a la presencia de fibras de colágeno (Kovach y Athanasiou, 1997) y por otra lado, la presencia de folículos pilosos, queratina y pigmentos hacen que se absorban la mayoría de los fotones que pretenden alcanzar el subcutáneo. Produciéndose un aumento en la absorción en este tipo de tejido (Anderson y Parrish, 1982; Larsson y cols., 2003). En ambos tipos de láseres, llegó al tejido celular subcutáneo menos del 10 % del total de energía emitida, así que la mayoría de la energía emitida queda absorbida en los tejidos previos como la piel, interaccionando con la muestra, durante los estudios de neurografía motora, menos de un 10% (figura 15). El fenómeno físico de la reflexión especular de la luz sobre las muestras se minimizó al irradiar en contacto con la muestras. En la muestra de músculo de ratón, se observó una mayor transmisión de la longitud de onda del 830 nm comparado con el 655 nm es decir, los fotones del láser de 655 nm eran más absorbidos en el músculo que los fotones del láser de 830 nm. Uno de los motivos podría ser la gran concentración de mitocondrias, poseedoras de muchas moléculas como los citocromos que absorben principalmente longitudes de onda del visible. Por lo que en general, se utilizan dosis energéticas más elevadas de IR para facilitar la absorción de fotones suficientes para producir una respuesta biológica (Ebert y Roberts, 1997; Comelekoglu y cols., 2002, Kujawa y cols., 2003). Si se aumenta en superficie la densidad de potencia de emisión del láser de 655 nm, no se modificaron los valores de transmisión en las distintas muestras, este hecho, probablemente sea debido a fenómenos como la reflexión difusa en el interior del tejido que aumenta en relación al aumento de la densidad de potencia (aumento del total energético fotónico; Pope, 2001). Cuando aumentamos la densidad de potencia del láser de 830 nm se produce un aumento en la transmisión a través de la muestra muscular y una disminución de la misma, a través de la piel. Este es otro de los ejemplos de cómo la interacción luz-tejido varía entre estudios *in vitro* e *in*

vivo. *In vitro*, las células reciben la irradiación directamente con la posibilidad de absorber un número importante de fotones. Por el contrario, en el sistema *in vivo* los fotones pueden ser absorbidos en multitud de cromóforos intra y extracelulares (microcirculación, impedancia de la piel, etc.; Anderson y Parrish, 1982).

La cantidad de energía láser absorbida en las muestras del estudio electrofisiológico es lo suficientemente grande como para permitir la interacción energética con las áreas de la unión neuromuscular, puesto que el sistema facilita la absorción, con una transmisión mínima (figura 15). En el momento de insertar las fibras musculares para el registro se procuró que siempre fueran lo más superficiales posible. En el caso de la neurografía motora, el electrodo de registro se colocó subcutáneamente dado que el músculo LAL es uno de los más planos y más subcutáneos del ratón.

Para saber si las dosis de energía que estábamos utilizando *in vivo* se alejaban mucho de las dosis utilizadas en clínica, se determinó la transmisión de los láseres (655 y 830 nm) a través de una muestra de piel humana de adulto sano. La irradiación transcutánea demostró que la piel humana permite la transmisión media de un 3% del láser de 655 nm y 6,6% del láser de 830 nm. Irradiando piel de ratón la transmisión del láser rojo fue de un 2,9% y el láser IR-cercano fue de 4,3%, en media (figura 15). Estos porcentajes nos indican la parte de energía emitida en superficie que puede llegar a la capa muscular. O sea que, para extrapolar los valores energéticos de este estudio es necesario tener en cuenta los valores de absorción de la energía en piel humana. En el estudio de neurografía motora, las energías para ambos los láseres (tabla 2), fueron calculadas considerando la absorción que se produce cuando la energía traspasa la piel del ratón. Así los resultados de la electrofisiología se podían comparar a los de la neurografía motora desde el punto de vista energético.

El diseño experimental del estudio electrofisiológico permite la discriminación de los efectos (directos e indirectos) del láser sobre el componente presináptico (terminal nervioso) y/o

los efectos sobre el componente postsináptico (célula muscular). Cambios presinápticos irían ligados a variaciones de los siguientes parámetros: el contenido cuántico, la latencia de los EPP, cambios en la facilitación de los EPP de los pulsos dobles y la frecuencia de aparición de los MEPPs. Parámetros relacionados con cambios a nivel postsináptico son: la amplitud de los EPP y de los MEPPs. El bloqueo pre o postsináptico (alta $[Mg^{2+}]$ y dTC, respectivamente) permiten determinar cual de los componentes expresarían los cambios provocados por los láseres. Indirectamente además, permite evidenciar cambios en el gradiente de Ca^{2+} puesto que, en la transmisión sináptica, los niveles neuronales de Ca^{2+} interfieren directamente en la liberación de ACh. Cambios en estos mecanismos calcio-dependientes presinápticos se traducen en cambios en el contenido cuántico, facilitación de los pulsos dobles y frecuencia de aparición de los MEPPs. Por otro lado, la activación de los receptores postsinápticos por la ACh provoca la entrada de Na^{+} al componente postináptico, lo cual activan las cascadas de eventos que culminaran en variaciones del potencial de membrana que registramos como EPPs o MEPPs.

5.1. Efecto del láser rojo sobre la neurotransmisión (*in toto*)

En base a la bibliografía, debemos considerar que si la irradiación con láser rojo puede inducir algún cambio en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), la actividad mitocondrial, vesicular o de membranas del retículo endoplasmático (Alexandratou y cols., 2002), puede ser que estos cambios ocurran fuera de las zonas activas y de la maquinaria de liberación de la acetilcolina. También puede ser que sean cambios que no generen modificaciones detectables por las técnicas de electrofisiología (Llinas y cols., 1992; Schweitzer y Williamson, 1995). Además, cualquier aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en los terminales nerviosos debe ser rápidamente compensado, como forma de garantizar la neurotransmisión en sus diferentes formas de plasticidad actividad-dependiente, ya que los movimientos del calcio están muy bien regulados en los terminales nerviosos (Zucker, 1996). Una vez la liberación del transmisor se produce, varios mecanismos actúan para devolver la $[Ca^{2+}]_i$ a valores basales. El excedente de $[Ca^{2+}]_i$ puede ser regulado por mecanismos de calcio-taponamiento o calcio-activación por proteínas como las calpainas (Melloni y Pontremoli, 1989), calmodulina (Rasmussen y Means, 1989), activándose las cisternas del retículo endoplásmico liso a través de receptores de la rianodina (Coronado y cols., 1994; Leong y MacLennan, 1998) o con la expulsión del calcio hacia el medio extracelular (Blaustein, 1988; Carafoli, 1988). En las células nerviosas, estos mecanismos actuarían bloqueando de una forma mucho más eficaz los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$, si lo comparamos con otro tipo de célula como por ejemplo, fibroblastos, hepatocitos o miocitos (donde se han realizado la mayoría de estudios láser).

La mayoría de los trabajos publicados atribuye al láser rojo una acción excitadora sobre la neurotransmisión relacionada con el proceso de reparación neuronal (Rochkind y cols., 1987 a y b, 1989, 1992, 1996, 2001), pero también algunos trabajos demuestran una

acción sobre la acetilcolina (ACh). Lundeberg y colaboradores (1988) refieren que la ACh es uno de los neurotransmisores más sensible al láser de baja potencia. En este sentido, Navratil y Dylevsky (1997) describen la ACh como un cromóforo en las sinapsis colinérgicas, puesto que es fácilmente hidrolizada por la AChE, esta también considerado un cromóforo (Kujawa y cols., 2003), generando así cambios en la concentración de colina y acetato en la hendidura sináptica. Probablemente este efecto estaría relacionado con la interacción del láser rojo con las uniones energéticas de la molécula de ACh, como apunta Amat y colaboradores (2002) en relación a la afinidad del láser rojo sobre las moléculas de ATP.

En todos los casos citados la acción del láser podría ser estudiada mediante técnicas electrofisiológicas, tanto el registro de potenciales espontáneos como los evocados. En este sentido, Re y colaboradores (1992) demostraron un aumento en la frecuencia de potenciales en miniatura post-irradiación con láser rojo, pero sin efecto sobre el contenido cuántico. Sin embargo, estos autores no esclarecieron a que nivel se producía la interacción, pero sugirieron la posibilidad de una interacción energética con el complejo molecular responsable de la secreción o a la hidrólisis de la ACh.

En el presente trabajo el láser rojo (655 nm) utilizado a densidades de energía de 4 y 12 J/cm² no afectó a ninguno de los parámetros estudiados de la neurotransmisión muscular evocada o espontánea. Los resultados obtenidos en este estudio corroboran los obtenidos por Re y colaboradores (1992) en cuanto a la ausencia de cambios en el contenido cuántico. Estos autores usaron un diseño experimental similar al empleado en el presente estudio, sin embargo la metodología de los autores podría haber provocado el aumento de la frecuencia de potenciales espontáneos (MEPPs) ya que utilizaron KCl tanto en muestras controles cuanto irradiadas. Después de la obtención del aumento en la frecuencia de los MEPPs con KCl, observaron que en presencia del láser hubo un aumento en el tiempo de decaimiento de los MEPPs. En el actual estudio, los MEPPs se registraron siempre en condiciones que se

consideran más fisiológicas (sin evocarlos con KCl) y los resultados obtenidos no refieren cambios en la frecuencia. Este hecho confirmaría la hipótesis de que el sistema neuromuscular de mamíferos, en normalidad, no responde a la irradiación con láser rojo (bajo estos determinados parámetros). Respuesta que si observamos en condiciones patológicas o de estrés elevado (Nara y cols., 1991; Steinlechner y Dyson, 1993). De hecho, en el actual estudio, no se observó ninguna variación en la amplitud o frecuencia de los MEPPs, lo que descarta un efecto del láser en la neurotransmisión, tanto a nivel pre como postsináptico.

Se considera que la sinapsis neuromuscular de mamíferos, tanto los potenciales espontáneos o MEPPs (Losavio y Muchnik, 1997) como los evocados o EPPs (Narita y cols., 2000) son altamente dependientes de la $[Ca^{2+}]_i$ y de la [ATP] del terminal nervioso. Los resultados aportados en el presente estudio, indican la ausencia de la influencia del láser rojo, en estas condiciones de estudio, tanto sobre el $[Ca^{2+}]_i$ como del [ATP] perceptibles en la sinapsis post-irradiación.

5.2. Efecto del láser infrarrojo sobre la neurotransmisión (*in toto*)

El principal resultado obtenido en el estudio electrofisiológico de la interacción del láser IR-cercano con el sistema neuromuscular, es que la irradiación a una densidad de energía de 12 J/cm², reduce la liberación evocada de ACh en determinadas circunstancias. Es decir, hay una disminución en el contenido cuántico de ACh. Este cambio sólo se ha observado para esta longitud de onda ya que, como se ha indicado previamente, cuando se irradia con láser rojo en 655 nm a las dosis de 4 y 12 J/cm², no hay cambios fisiológicos perceptibles en el neurotransmisor en la placa terminal motora de los ratones.

No se encontró ningún cambio en los MEPPs, ni en la amplitud ni en relación al tiempo. Porque, cambios en el tamaño de los potenciales espontáneos pueden atribuirse a la densidad funcional de los receptores colinérgicos presentes en la membrana postsináptica del músculo o sea, puede descartarse un efecto postsináptico del láser de IR en las condiciones estudiadas. Así mismo, no se encontró ningún cambio funcional en el elemento postsináptico. El potencial de la membrana celular del músculo no se modificó con la irradiación.

Otro punto a destacar, es que no se observó diferencia significativa en los resultados experimentales de la latencia de los EPPs. La latencia de la respuesta evocada se analizó con el lapso del tiempo desde el artefacto de estímulo a la base del EPP. El tracto corto del nervio entre el electrodo de estímulo y la unión neuromuscular (aproximadamente 4-5 mm) podría detectar cambios en la latencia de EPP irradiación-inducido. Por consiguiente, como no hubo ningún cambio en la latencia de EPP, es de suponerse que la irradiación con láser IR en el nervio frenico del músculo diafragma de ratón no altera la cascada molecular de propagación eléctrica ni la velocidad de conducción de estos axones motores. Confirmado por la estabilidad, previamente mencionada, del potencial de membrana de la célula muscular.

La frecuencia de MEPPs tampoco se altera con la irradiación, indicando claramente que no hubo ningún cambio, inducido por el láser de IR, en el mecanismo presináptico de descarga espontánea. Aunque este mecanismo probablemente se relaciona con los movimientos de calcio intracelular, es diferente del mecanismo de liberación evocada (Losavio y Muchnik, 1997). La frecuencia de MEPPs es muy sensible a los cambios en la homeostasis presináptica del ión calcio, así la ausencia de modificaciones inducidas por la irradiación con láser de IR-cercano, nos hace pensar es un mecanismo no relacionado con el calcio.

La irradiación con láser IR reduce la liberación evocada de ACh (contenido cuantico y amplitud de EPP) en la unión neuromuscular curarizada, pero no en presencia magnesio (4-7mM). Esto sugiere que en condiciones fisiológicas, los mecanismos de liberación evocada presinaptica pueden afectarse por la irradiación. En esta situación (diferente de la liberación que se produce con alto nivel de magnesio en el medio), muchas vesículas cercanas a la membrana sináptica liberan ACh sincrónicamente con la entrada de iones calcio a través de VDCCs. Por consiguiente, la reducción en el volumen cuántico, podría ser debido a cambio láser IR-inducido (Navratil y Dylevsky, 1997) durante el proceso de renovación de las vesículas sinápticas (Nicholls, 1994; Suedhof, 1995). La ausencia de efecto en los mecanismos calcio-dependientes durante la liberación espontánea de ACh (frecuencia de MEPPs) y en el mecanismo de facilitación presináptico (Magleby y Zengel, 1982, Zengel y cols., 1994), siguen confirmando que los iones calcio no están relacionados en la reducción del contenido cuántico observado después de la irradiación.

La facilitación por par de pulsos ocurre cuando dos pulsos de estímulo idéntico se producen en un espacio de tiempo muy corto, dando como resultado un primer EPP con una amplitud mayor que la del segundo EPP. La facilitación del segundo EPP se produce por la actividad que provoca el calcio residual involucrado en la generación del primer EPP. Así, los

cambios en la facilitación indican variaciones en el mecanismo de excitación-secreción dependiente del calcio. La facilitación por un par de pulsos no se afectó por la irradiación ni en los experimentos con alto magnesio ni en los músculos curarizados, lo que confirma una vez mas que la interacción de la irradiación láser en la excitación-secreción es independiente del calcio (Zucker, 1996).

5.3. Efecto del láser rojo e IR-cercano en la neurotransmisión (*in vivo*)

Bajo las condiciones de trabajo de este estudio, la neurografía motora no reveló cambios significativos en cuanto a la amplitud o morfología de los CMPAs, en ninguno de los láseres empleados ni en ninguna de las dosis utilizadas. Estos resultados demuestran que la reducción de la liberación del neurotransmisor, resultado obtenido con el láser de 830 nm a 12 J/cm² *in toto*, no era suficientemente como para obtener un resultado *in vivo* o, la mayor absorción en piel de los fotones, impidió que llegara la energía necesaria al terminal motor como para producir una respuesta detectable. El nivel de reducción de la neurotransmisión (aproximadamente 25 %) que mostró el láser de IR-cercano, no generó cambios *in vivo*. Cabe la posibilidad de que haya ocurrido un aumento en la microcirculación periférica neutralizando los efectos sobre la conducción o, enmascarando los efectos sobre las unidades motoras (Nelson y cols., 2004). No se observó tampoco una respuesta tardía ya que los PAMCs fueron evaluados hasta 10 minutos post-irradiación.

No podemos olvidar que el estudio electrofisiológico se hizo con el músculo diafragma. Músculo predominantemente compuesto por fibras musculares lentas, que se caracterizan por poseer grandes cantidades de mioglobulina (Purves y cols., 2001) y un número importante de mitocondrias con un alto metabolismo oxidativo. Así mismo el diafragma va acompañado de un sistema vascular extenso. Por otro lado, el estudio neurográfico se realizó sobre el músculo elevador de la oreja, compuesto exclusivamente por fibras musculares rápidas (Eržen y cols., 2000), con retículo endoplásmico extenso y una gran cantidad de enzimas glucolíticas (liberación rápida de iones calcio y de energía por glucólisis, respectivamente). Esta diferencia metabólica, nos dice que también estas células se diferencian ópticamente, ya que con toda seguridad la densidad de cromóforos difiere de un

tipo de miocito a otro (mitocondrias, mioglobulinas, moléculas con grupos prostéticos metálicos, moléculas de ATP y membranas celulares).

Podemos confirmar que el láser de diodo de 655 nm en condiciones normales de uso clínico, no interfiere en la función de la sinapsis neuromuscular. En este estudio se observó un limitado efecto del láser de diodo de 830 nm a baja potencia sobre el potencial electrofisiológico de la sinapsis neuromuscular de ratones. Por primera vez se ha demostrado una reducción en la liberación del neurotransmisor, acetilcolina evocada en condiciones fisiológicas de normalidad. Esta modulación en la transmisión sináptica observada por el láser IR, puede que abra una puerta a la comprensión del efecto clínico de relajamiento muscular post-irradiación. A pesar de que en las condiciones de nuestro estudio, los resultados observados *in vivo* no acompañan los resultados observados *in toto*, consideramos que este tipo de investigación colabora en el esclarecimiento de la interacción de la luz con el tejido biológico.



6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Los efectos del láser de Arseniuro de Galio y Aluminio (AsGaAl) de 655 y 830 nm, a baja potencia, en los parámetros establecidos, sobre la neurotransmisión en la unión neuromuscular de diafragma y músculo elevador largo de la oreja de ratón (*Levator auris longus*, LAL) se pueden resumir en:

- I. El láser de AsGaAl a la longitud de onda de 655 nm, no causa modificaciones electrofisiológicas detectables en los potenciales evocados de placa terminal (EPPs) tanto a nivel pre como postsináptico en diafragma de ratón.
- II. El láser de AsGaAl a la longitud de onda de 830 nm y a una densidad de energía de 12 J/cm^2 , causa una reducción en la liberación de acetilcolina (ACh) evocada por un mecanismo independiente del calcio.
- III. No existen modificaciones electrofisiológicas detectables a nivel pre o postsináptico en cuanto a la neurotransmisión espontánea post-irradiación en las condiciones establecidas.
- IV. No existen modificaciones en los potenciales de acción muscular compuesto (PAMCs) post-irradiación en las condiciones establecidas.

La irradiación de la luz láser a longitud de onda en la región del rojo, no causa ningún cambio en la neurotransmisión neuromuscular. Así, es de suponer que en su uso clínico para promover una mejor reparación tanto en heridas cutáneas como en otras localizaciones, no tiene ningún efecto sobre las sinapsis neuromusculares adyacente. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos podemos afirmar que con el láser a la longitud de onda del infrarrojo cercano, es posible observemos efectos secundarios de miorelajación al tratar áreas

colindantes a paquetes musculares. Efecto extremadamente útil cuando se trata de fisioterapia o rehabilitación.

La ausencia de cambios en el experimento *in vivo* nos indica que es necesaria una mayor investigación para determinar las dosis clínicas más adecuadas, principalmente a lo que se refiere a la densidad de potencia de los láseres, con el fin de optimizar los efectos clínicos y poder protocolizar los tratamientos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ales E, Poyato JM, Valero V, Alvarez de Toledo G. 1998. Neurotransmitter release: a process of membrane fusion occurring in fractions of milliseconds. *Rev Neurol* 27(155):111-117.

Alexandratou E, Yova D, Handris P, Kletsas D, Loukas S. 2002. Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy. *Photochem Photobiol Sci* 1(8):547-552.

Allais G, De Lorenzo C, Quirico PE, Lupi G, Airola G, Mana O, Benedetto C. 2003. Non-pharmacological approaches to chronic headaches: transcutaneous electrical nerve stimulation, lasertherapy and acupuncture in transformed migraine treatment. *Neurol Sci* 24 Suppl 2:S138-42.

Almeida-Lopes L, Velez-Gonzalez M, Brugnera Jr., A, Pinheiro AB. 1999. The use low level laser therapy for wound healing: clinical study. In: *Annual Meeting—Lasers Surg Med, Proceedings*. Florida, EUA. 16-18.

Amat A, Nicolau RA, Rigau J, Tomas J. 2002. Energy light interaction whit molecules with high energy bond. 4th World Congress of the World Association of Laser Therapy- Tsukuba, Japon. 125.

Anders JJ, Borke RC, Woolery SK, Van de Merwe WP. 1993. Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. *Lasers Surg Med* 13(1):72-82.

Anderson RR, Parrish JA. 1982. Optical properties of human skin. In: Regan JD y Parrish JA. 1982. *The Science of Photomedicine* 147-195.

Angaut-Petit D, Molgo J, Connold AL, Faille L. 1987. The levator auris longus muscle of the mouse: a convenient preparation for studies of short- and long-term presynaptic effects of drugs or toxins. *Neurosci Lett* 82(1):83-88.

Antipa C, Nacu M, Bunila D, Stanciulescu, Polenau A, Vasiliu V. 1996. Clinical results of the low energy laser action on distal forearm posttraumatic nerve lesions. First World Congress of the World Association of Laser Therapy- Jerusalem, Israel. 36.

Arvanitaki A, Chalazonitis N. 1947. Reactions bioelectriques a la photoactivation des cytochromes. Arch Sci Physiol 1:385-405.

Asagai Y, Kanai H, Y Miura, Oshiro T. 1994 a. Application of low reactive-level laser therapy (LLLT) in the function training of cerebral palsy patients. Laser Ther 6:195-202.

Asagai Y, Inoue M, Takayasu R, Aizawa Y, Miura Y. 1994 b. Relaxation of spasticity by low energy laser irradiation in cases with cerebral palsy. Kanto J Orthop Traumatol 25:84-90.

Asagai Y, Ueno R, Y Miura, Oshiro T. 1996 a. Application of low reactive-level laser therapy (LLLT) in patients with cerebral palsy of the adult tension athetosis type First World Congress of the World Association of Laser Therapy- Jerusalem, Israel. 39.

Asagai Y, Ueino R, Y Miura, Oshiro T. 1996 b. Characteristics of low reactive-level laser beam and its effects on the autonomic nervous system in patients with cerebral palsy. First World Congress of the World Association of Laser Therapy- Jerusalem, Israel. 40.

Asagai Y, Imakire A, Oshiro T. 2000 a. Thermographic effects of laser therapy in patients with cerebral palsy. Laser Ther 12:12-15.

Asagai Y, Imakire A, Oshiro T. 2000 b. Thermographic study of low level laser therapy for acute-phase injury. Laser Ther 12:31-33.

Asawa T, Shindo M, Momoi H. 2004. Compound muscle action potentials during repetitive nerve stimulation. Muscle Nerve 29(5):724-728.

Assia E., Rosner M., Belkin M., Solomon A., Schwartz M. 1989. Temporal parameters of low energy laser irradiation for optimal delay of post-traumatic degeneration of rat optic nerve. Brain Research 476(2):205-212.

Bagis S, Comelekoglu U, Sahin G, Buyukakilli B, Erdogan C, Kanik A. 2002. Acute electrophysiologic effect of pulsed gallium-arsenide low energy laser irradiation on configuration of compound nerve action potential and nerve excitability. *Lasers Surg Med* 30(5):376-380.

Bagis S, Comelekoglu U, Coskun B, Milcan A, Buyukakilli B, Sahin G, Ozisik S, Erdogan C. 2003. No effect of GA-AS (904 nm) laser irradiation on the intact skin of the injured rat sciatic nerve. *Lasers Med Sci*. 18(2):83-88.

Balaban P, Esenaliev R, Karu T, Kutomkina E, Letokhov V, Oraevsky A, Ovcharenko N. 1992. He-Ne laser irradiation of single identified neurons. *Lasers Surg Med* 12(3):329-337.

Bahrami MH, Rayegani SM, Zare A. 2004. Studying nerve conduction velocity and latency of accessory nerve motor potential in normal persons. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 44(1):11-14.

Basford JR, Daube JR, Hallman HO, Millard TL, Moyer SK. 1990. Does low-intensity helium-neon laser irradiation alter sensory nerve active potentials or distal latencies? *Lasers Surg Med* 10(1):35-39.

Basford JR. 1993 a. Laser therapy: scientific basis and clinical role. *Orthopedics* 16(5):541-547.

Basford JR, Hallman HO, Matsumoto JY, Moyer SK, Buss JM, Baxter GD. 1993 b. Effects of 830 nm continuous wave laser diode irradiation on median nerve function in normal subjects. *Lasers Surg Med* 13:597-604.

Basford JR. 1995. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Lasers Surg Med* 16(4):331-342.

Basford JR, Sheffield CG, Harmsen WS. 1999. Laser therapy: a randomized, controlled trial of the effects of low-intensity Nd: YAG laser irradiation on musculoskeletal back pain. *Arch Phys Med Rehabil* 80(6):647-652.

Baxter DG. 1994. Therapeutic Lasers. In: Low-intensity laser therapy for pain relief. 139-185. Churchill Livingstone, London.

Bayramoglu FG, Dalkilic N, Kiziltan E, Demirel I. 2004. Deep peroneal motor nerve conduction velocity distribution and correlation between nerve conduction groups and the number of innervated muscle fibers. *Int J Neurosci* 114(9):1147-1159.

Belkin M, Schwartz M. 1989. New biological phenomena associated with laser irradiation. *Health Phys* 56(5):687-690.

Belkin M, Schwartz M. 1994. Evidence for the existence of low-energy laser bioeffects on the nervous system. *Neurosurgical Review* 17(1):7-17

Bersnev VP, Tyshkevich TG, Gurevich YE. 1996. HeNe laser irradiation on partially injured nerves: nerve blood flow and conduction changes. First World Congress of the World Association of Laser Therapy- Jerusalem, Israel. 41.

Bibikova A, Oron U. 1994. Attenuation of the process of muscle regeneration in the toad gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Lasers Surg Med* 14(4):355-361.

Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Tsien RW. 1994. The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 13(3):505-506.

Blaustein MP. 1988. Calcium transport and buffering in neurons. *Trends Neurosci* 11(10):438-443.

Boivin DB, Duffy JF, Kronauer RE, Czeisler CA. 1996. Dose-response relationships for resetting of human circadian clock by light. *Nature* 379(6565):540-542.

Boivin DB, James FO. 2002. Circadian adaptation to night-shift work by judicious light and darkness exposure. *J Biol Rhythms* 17(6):556-567.

Bolognani L, Volpi N. 1991. Reactivation of partially inactivated enzymes by low power laser beams (LPL). *Radiol Med* 81(4):81-86.

Bolognani L, Cavalca L, Magnani C, Volpi N. 1992. ATP synthesis catalysed by myosin "ATPase": effect of laser and e.m. field. *Laser Technol* 2(3):115-120.

Branco K, Naeser MA. 1999. Carpal tunnel syndrome: clinical outcome after low-level laser acupuncture microamps transcutaneous electrical nerve stimulation, and other alternative therapies - an open protocol study. *J Altern Complement Med* 5(1): 5-26.

Breitbart H, Levinshal T, Cohen N, Friedmann H, Lubart R. 1996. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (HeNe laser). *J Photochem Photobiol B* 34(2-3):117-121.

Brown W F. 1984. Neuromuscular transmission normal and abnormal. In: *The physiological and technical basis of electromyography*. Butterworth, USA, 369-427.

Brugnera AJ, Garrini AE, Pinheiro A, Campos DHS, Donamaria R, Magalhães F, Zanin F, Pecora JD, Takamoto M, Ladalardo TC. 2000. Laser therapy in the treatment of dental hypersensitivity – A histologic study and clinical application. *Laser Ther* 12:16-21.

Buliakova NV, Azarova VS. 2000. Structural and functional characteristics of muscle allotransplants, formed under different conditions of laser irradiation. *Tsitologii* 42(1):27-31.

Burgoyne RD, Barclay JW. 2002. Splitting the quantum: regulation of quantal release during vesicle fusion. *Trends Neurosci* 25:176–178.

Calderhead, GR. 1991. Watts a joule: on the importance of accurate and correct reporting of laser parameters in low reactive- level laser therapy and photobioactivation research. *Laser Ther* 3:177-182.

Cambier DC, Blom K, Witvrouw E, Ollevier G, De Mynck M, Vanderstraeten G. 2000. The influence of low intensity infrared laser irradiation on conduction characteristics of peripheral nerve: A randomised, controlled, double blind study on the sural nerve. *Laser Med Sci* 15(3):195-200.

Carafoli E. 1988. Membrane transport of calcium: an overview. *Methods Enzymol* 157:3-11.

Catterall WA. 1992. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol Rev* 72(4 Suppl):S15-48.

Catterall WA. 1995. Structure and function of voltage-gated ion channels. *A Rev Biochem* 64:493-531.

Chelyshev YA, Kubitsky AA. 1995. Effect of infra-red low-power laser irradiation on regeneration of myelinated axons. *Laser Med Sci* 10:273-277.

Cherniack M, Brammer AJ, Lundstrom R, Meyer J, Morse TF, Nealy G, Nilsson T, Peterson D, Toppilla E, Warren N, Fu RW, Bruneau H. 2004. Segmental nerve conduction velocity in vibration-exposed shipyard workers. *Int Arch Occup Environ Health* 77(3):159-176.

Chow RT. 2001. Dose Dilemmas in low level laser therapy – the effects of different paradigms and historical perspectives. *Laser Ther* 13:102-109.

Chow R, Barnsley L, Heller G, Siddal P. 2003. Efficacy of 300 mW, 830 nm laser in the treatment of chronic pain: a survey in a general practice setting. *J Musculoskeletal Pain* 11 (3): 13-21.

Chrisman CL, Burt JK, Wood PK, Johnson EW. 1972. Electromyography in small animal clinical neurology. *J Am Vet Med Assoc* 160(3):311-318.

Chudler EH. Washington University's Department of Neurology. Disponible: <http://faculty.washington.edu/chudler/ap3.gif> (acesado en 26/05/2003).

Comelekoglu U, Bagis S, Buyukakilli B, Sahin G, Erdogan C. 2002. Electrophysiologic effect of Gallium Arsenide laser on frog gastrocnemius muscle. *Lasers Surg Med* 30(3):221-226.

Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. 1996. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol* 23(5):492-496.

Coronado R, Morrissette J, Sukhareva M, Vaughan DM 1994. Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol* 266(6 Pt 1):C1485-504.

Colasante C, Pecot-Dechavassine M. 1996. Ultrastructural distribution of synaptophysin and synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *J Neurosci Res.* 44(3):272-282.

Croke M, Bourne RD. 1999. A review of recent research studies on the efficacy of Esogetic Colorpuncture Therapy- A wholistic acu-light system. *Am J Acupunct* 27(1-2):85-94.

de Castro e Silva Junior O, Zucoloto S, Menegazzo LA, Granato RG, Marcassa LG, Bagnato VS. 2001. Laser enhancement in hepatic regeneration for partially hepatectomized rats. *Lasers Surg Med* 29(1):73-77.

Day NC, Wood SJ, Ince PG, Volsen SG, Smith W, Slater CR, Shaw PJ. 1997. Differential localization of voltage-dependent calcium channel alpha1 subunits at the human and rat neuromuscular junction. *J Neurosci* 17(16):6226-6235.

Del'tsova EI, Neiman AM, Shiian OA. 1983. Effect of helium-neon laser rays on the vascular and nerve tissue structures of the small intestine in the cat. *Nauchnye Doki Vyss Shkoly Biol Nauki* 12:47-50.

Dionette P, Franz S, Giacenelli M, Pianura C. 1996. LLLT in facial peripheral paresis. *First World Congress of the World Association of Laser Therapy- Jerusalem, Israel.* 36.

Ebert DW, Roberts C. 1997. Importance of using rigorous statistical methods to analyse low energy laser experimental data. Part Two. *Lasers Surg Med* 21(1):42-49.

Eckerdal A, Bastian HL. 1996. Can low reactive-level laser therapy be used in the treatment of neurogenic facial pain? A double-blind, placebo controlled investigation of patients with trigeminal neuralgia. *Laser Ther* 8:247-252.

el Sayed SO, Dyson M. 1996. Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. *Lasers Surg Med* 19(4):433-437.

Enwemeka CS. 2001. Attenuation and penetration of visible 632.8nm and invisible infra-red 904nm light in soft tissues. *Laser Ther* 13:95-101.

Enwemeka CS, Parker JC, Dowdy DS, Harkness EE, Sanford LE, Woodruff LD. 2004. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. *Photomed Laser Surg* 22(4):323-329.

Eržen I, Cvetko E, Obreza S, Angaut-Petit D. 2000. Fiber types in the mouse levator auris longus muscle: a convenient preparation to study muscle and nerve plasticity. *J. Neurosci Res.* 59: 692-697

Foldes F. 1981. The significance of physiological $[Ca^{2+}]$ and $[Mg^{2+}]$ for in vitro experimentation on synaptic transmission. *Life Sci* 28(14):1585-1590.

Fork RL. 1971. Laser stimulation of nerve cells in alypsia. *Science.* 171:907-908. In: Basford JR. 1995. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Lasers Surg Med* 16(4): 331-342.

Fortier LP, Robitaille R, Donati F. 2001. Increased sensitivity to depolarization and nondepolarizing neuromuscular blocking agents in young rat hemidiaphragms. *Anesthesiology* 95(2): 478-484.

Friedmann H, Lubart R, Laulicht I, Rochkind S. 1991. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol B* 11(1):87-95.

Friedmann H, Lubart R. 1993. Nonlinear photobiostimulation: the mechanism of visible and infrared laser- induced stimulation and reuction of neural excitatability and growth. *Laser Ther* 39-42.

Gaida K, Koller R, Isler C, Aytekin O, Al-Awami M, Meissl G, Frey M. 2004. Low Level Laser Therapy--a conservative approach to the burn scar? *Burns*. 30(4):362-367.

Galkin AV, Giniatullin RA, Mukhtarov MR, Svandova I, Grishin SN, Vyskocil F. 2001. ATP but not adenosine inhibits nonquantal acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction. *Eur J Neurosci* 13(11):2047-2053.

Giniatullin RA, Sokolova EM. 1998. Modulating role of ATP in the neuromuscular junction. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova* 84(10):1132-8.

Goodgold J, Eberstein A. 1978. *Electrodiagnosis of neuromuscular diseases*. Pp 275. Williams & Wilkins: Baltimore. In: Basford JR, Hallman HO, Matsumoto JY, Moyer SK, Buss JM, Baxter GD. 1993. Effects of 830 nm continuous wave laser diode irradiation on median nerve function in normal subjects. *Lasers Surg Med* 13(6):597-604.

Greathouse DG, Currier DP, Gilmore RL. 1985. Effects of clinical infrared laser on superficial radial nerve conduction. *Phys Ther* 65(8):1184-7.

Greco M, Vacca RA, Moro L, Perlino E, Petragallo VA, Marra E, Passarella S. 2001. Helium-Neon laser irradiation of hepatocytes can trigger increase of the mitochondrial membrane potential and can stimulate c-fos expression in a Ca²⁺- dependent manner. *Lasers Surg Med* 29(5):433-441.

Gur A, Karakoc M, Nas K, Cevik R, Sarac J, Demir E. 2002. Efficacy of low power laser therapy in fibromyalgia: a single-blind, placebo-controlled trial. *Lasers Med Sci* 17(1):57-61.

Gur A, Sarac AJ, Cevik R, Altindag O, Sarac S. 2004. Efficacy of 904 nm gallium arsenide low level laser therapy in the management of chronic myofascial pain in the neck: a double-blind and randomize-controlled trial. *Lasers Surg Med* 35(3):229-235.

Hamill OP, Sakmann B. 1981. Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells. *Nature* 294(5840):462-464.

Hall AK, Rutishauser U. 1987. Visualization of neural cell adhesion molecule by electron microscopy. *J Cell Biol* 104(6):1579-1586.

Harada R, Shigeki K, Okajima K, Terashima H, Tsuruoka G, Mogi M, Takahashi G, Suzuki Y, Kurashima S. 1991. Low energy laser irradiation for patients with spastic paralysis. *Sogo Rehabilitation* 19:1089-1091.

Henzi V, MacDermott AB. 1992. Characteristics and function of Ca^{2+} and inositol 1,4,5-trisphosphate-releasable stores of Ca^{2+} in neurons. *Neuroscience* 46(2):251-273.

Heuser JE, Reese T. 1973. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57(2):315-344.

Hille B. 1992. G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron* 9(2):187-95.

Hubbard JL, Llinás R, Quastel DML. 1969. Investigation of presynaptic function. In: *Electrophysiological Analysis of Synaptic Transmission*. 112-173. Edward Arnold Publishers, London.

Hubbard JI, Wilson DF. 1973. Neuromuscular transmission in a mammalian preparation in the absence of the blocking drugs and the effect of D-tubocurarine. *J Physiol* 228(2):307-325.

Iijima K, Shimoyama N, Shimoyama M, Mizuguchi T. 1991. Evaluation of analgesic effect of low-power He:Ne laser on postherpetic neuralgia using VAS and modified McGill pain questionnaire. *J Clin Laser Med Surg* 9(2):121-126.

Iino M, Tsukioka M. 1994. Feedback control of inositol trisphosphate signalling by calcium. *Mol Cell Endocrinol* 98(2):141-146.

Ilbuldu E, Cakmak A, Disci R, Aydin R. 2004. Comparison of laser, dry needling, and placebo laser treatments in myofascial pain syndrome. *Photomed Laser Surg* 22(4):306-311.

Irvine J, Chong SL, Amirjani N, Chan KM. 2004. Double-blind randomized controlled trial of low-level laser therapy in carpal tunnel syndrome. *Muscle Nerve* 30(2):182-187.

Ito A, Kakami K, Matsushita H, Fukaya M. 1989. Effects of Nd:YAG low power laser irradiation on the ulnar nerve. *Aichi-Gakuin Dental Science* 2:1-8.

Iwase T, Hori N, Morioka T, Carpenter DO. 1996. Low power laser irradiation reduces ischemic damage in hippocampal slices in vitro. *Lasers Surg Med* 19(4):465-470.

Jarvis D, MacIver MB, Tanelian DL. 1990. Electrophysiologic recording and thermodynamic modeling demonstrate that helium-neon laser irradiation does not affect peripheral A-delta- or C-fiber nociceptors. *Pain* 43(2):235-242.

Jessell TM, Kandel ER. 1993. Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell* 72 Suppl:1-30.

Karu T. 1992. Derepression of the genome after irradiation of human lymphocytes with He-Ne laser. *Laser Ther* 4(1):5-24.

Karu T, Kurchikov A, Letokhov V, Mokh V. 1996. He-Ne laser radiation influences single-channel ionic currents through cell membrane: a patch-clamp study. *Lasers Life Sci* 7:35-48.

Karu T. 1999. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B* 49(1):1-17.

Karu TI, Afanasyeva NI, Kolyakov SF, Pyatibrat LV, Welser L. 2001. Changes in absorbance of monolayer of living cells induced by laser radiation at 633, 670 and 820 nm. *IEEE J Quantum Elect* 7(6):982-988.

Karu T, Pyatibrat LV, Ryabykh TP. 2003. Melatonin modulates the action of near infrared radiation on cell adhesion. *J Pineal Res* 34(3):167-172.

Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. 2004. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem Photobiol Sci* 3(2):211-216.

Kasai S, Kono T, Yamamoto Y, Kotani, Sakamoto T, Mito M. 1996. Effect of low-power laser irradiation on impulse conduction in anesthetized rabbits. *J Clin Laser Med Surg* 14(3):107-109.

Katz B, Miledi R. 1965. The measurement of synaptic delay and the time course of acetylcholine release at the neuromuscular junction. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 161:483-495.

Katz B, Miledi R. 1970. Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J Physiol* 207(3):789-801.

Khadra M, Ronold H J, Lyngstadaas S P, Ellingsen J E, Haanaes H R. 2004. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 15 (3): 325-332.

Kreisler MB, Haj HA, Noroozi N, Willershausen B. 2004. Efficacy of low level laser therapy in reducing postoperative pain after endodontic surgery-- a randomized double blind clinical study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33(1):38-41.

Khullar SM, Brodin P, Messelt EB, Haanaes HR. 1995. The effects of low level laser treatment on recovery of nerve conduction and motor function after compression injury in the rat sciatic nerve. *Eur J Oral Sci* 103(5):299-305.

Khullar SM, Brodin P, Barkvoll P, Haanaes HR. 1996. Preliminary study of low-level laser for treatment of long-standing sensory aberrations in the inferior alveolar nerve. *J Oral Maxillofac Surg* 54(1):2-8.

Khullar SM, Brodin P, Fristad I, Kvinnsland IH. 1999. Enhanced Sensory

Reinnervation of Dental Target Tissues in Rats Following Low Level Laser (LLL) Irradiation. *Lasers Med Sci* 14(3):177–184.

Kimura J. 1983. Electromyography: techniques and normal findings. En: Davis FA, ed. *Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice*. Philadelphia: 227-230.

Kimura J. 1989. *Electrodiagnosis in diseases of the nerve and muscle. Principles and practice*. Philadelphia. FA Davis.

Kono T, Kasai S, Sakamoto T, Mito M. 1993. Cord dorsum potentials suppressed by low power laser irradiation on a peripheral nerve in the cat. *J Clin Laser Med Surg* 11(3):115-118.

Kovach IS, Athanasiou KA. 1997. Small-angle HeNe laser light scatter and the compressive modulus of articular cartilage. *J Orthop Res* 15(3):437-441.

Krishnamurthy S, Powers SK. 1994. Lasers in neurosurgery. *Lasers Surg Med* 15(2):126-167.

Kubota J. 2002. Effects of diode laser therapy on blood flow in axial pattern flaps in the rat model. *Lasers Med Sci* 17(3):146-153.

Kujawa J, Zavodnik L, Zavodnik I, Bryszewska M. 2003. Low-intensity near-infrared laser radiation-induced changes of acetylcholinesterase activity of human erythrocytes. *J Clin Laser Med Surg* 21(6):351-355.

Lee G, Wong E, Mason DT. 1996. New concepts in pain management and in the application of low-power laser for relief of cervicothoracic pain syndromes. *Am Heart J* 132(6):1-7.

Larsson M, Steenbergen W, Stromberg. 2002. Influence of optical properties and fiber separation on laser doppler flowmetry. *J Biomed Opt* 7(2):236-243.

Larsson M, Nilsson H, Stromberg T. 2003. In vivo determination of local skin optical properties and photon path length by use of spatially resolved diffuse reflectance with applications in laser Doppler flowmetry. *Appl Opt* 42(1):124-134.

Leong P, MacLennan DH. 1998. Complex interactions between skeletal muscle ryanodine receptor and dihydropyridine receptor proteins. *Biochem Cell Biol* 76(5):681-694.

Llinas R, Sugimori M, Silver RB. 1992. Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* 256(5057):677-679.

Lombard A, Rossetti V, Rolfo PM, Cassone MC, Urciuoli R. 1993. Influence of dose of He-Ne laser irradiation on enzyme activities in rat brain. *Laser Technol* 3(1-2):25-29.

Lomen-Hoerth C, Slawnych MP. 2003. Statistical motor unit number estimation: from theory to practice. *Muscle Nerve* 28(3):263-272.

Losavio A, Muchnik S. 1997. Spontaneous acetylcholine release in mammalian neuromuscular junctions. *Am J Physiol* 273(6 Pt 1): C1835-C1841.

Lowe AS, Baxter GD, Walsh DM, Allen JM. 1994. Effect of low intensity laser (830 nm) irradiation on skin temperature and antidromic conduction latencies in the human median nerve: relevance of radiant exposure. *Lasers Surg Med* 14(1):40-46.

Lowe AS, McDowell BC, Walsh DM, Baxter GD, Allen JM. 1997. Failure to demonstrate any hypoalgesic effect of low intensity laser irradiation (830nm) of Erb's point upon experimental ischaemic pain in humans. *Lasers Surg Med* 20(1):69-76.

Lubart R, Friedmann H, Levinshal T, Lavie R, Breitbart H. 1992. Effect of light on calcium transport in bull sperm cells. *J Photochem Photobiol B* 15;15(4):337-41.

Lubart R, Friedmann H, Grossmann N, Adamek M, Shainberg A. 1996. The role of intracellular calcium oscillations in photobiostimulation. *Laser Technol* 6(3):79-84.

Lubart R, Friedmann H, Sinyakov M, Cohen N, Breitbart H. 1997. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780nm irradiation. *Lasers Surg Med* 21(5):493-499.

Lundeberg T, Zhou J. 1988. Low-power irradiation does not affect the generation of signal in a sensory receptor. *Am J Chinese Med* 16(3):87-91.

Magleby KL, Zengel JE. 1982. A quantitative description of stimulation-induced changes in transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Gen Physiol* 80(4):613-638.

Manteifel V, Bakeeva L, Karu T. 1999. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria. *J Photochem Photobiol B* 38(1):25-30.

Martin AR. 1966. Quantal nature of synaptic transmission. *Physiol Rev* 46:51-66.

Marks R, de Palma F. 1999. Clinical efficacy of low power laser therapy in osteoarthritis. *Physiother Res Int* 4(2):141-157.

Matsushita H, Kakami K, Ito A, Kaneko M, Ishihara A, Yoshida K, Fukaya M. 1989. Effect on the action potential of the low power Nd: YAG laser as irradiated directly to the nerve. *Aichi Gakuin Dent Sci* 2:19-28.

McLachlan EM, Martin AR. 1981. Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *J Physiol* 311:307-324.

Meakin G, Morton RH, Wareham AC. 1992. Age-dependent variation in response to tubocurarine in the isolated rat diaphragm. *Br J Anaesth* 68(2):161-163.

Melloni E, Pontremoli S. 1989. The calpains. *Trends Neurosci* 12(11):438-344.

Mendez T; Pinheiro A; Pacheco M; Nascimento P;Ramalho L. 2004. Dose and Wavelength of Laser Light Have Influence on the Repair of Cutaneous Wounds. *J Clin Laser Med Surg* 22 (1):19-25.

Mester E. 1966. The use of the laser beam in therapy. *Orv Hetil* 107(22):1012-1016.

Mester AF, Snow JB Jr, Shaman P. 1991. Photochemical effects of laser irradiation on neuritic outgrowth of olfactory neuroepithelial explants. *Otolaryngol Head Neck Surg* 105(3):449-456.

Midamba ED, Haanaes. 1993. Low reactive-level 830nm GaAlAs diode laser therapy (LLLT) successfully accelerates regeneration of peripheral nerves in human. *Laser Ther* 5:125-129.

Miloro M, Repasky M. 2000. Low-level laser effect on neurosensory recovery after sagittal ramus osteotomy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 89(1):12-18.

Mokhtar B, Baxter GD, Walsh DM, Bell AJ, Allen JM. 1995. Double-blind, placebo-controlled investigation of the effect of combined phototherapy/low intensity laser therapy upon experimental ischaemic pain in humans. *Lasers Surg Med* 17(1):74-81.

More KC. 1996 a. Laser therapy in post herpetic neuralgia. First World Congress of theWorld Association of Laser Therapy- Jerusalem, Israel. 48.

More KC. 1996 b. Postherpetic neuralgia as a complication of malignant disease and its treatment using a GaAlAs diodo laser. First World Congress of theWorld Association of Laser Therapy- Jerusalem, Israel. 49.

Moyer M, van Lunteren E. 2001. Effect of temperature on endplate potential rundown and recovery in rat diaphragm. *J Neurophysiol* 85(5):2070-2075.

Nara Y, Matono S, Morioka T. 1991. Regulatory action of low intensity laser on mitogenesis of cultured lymphocytes using concanavalin. *Surg Med Lasers* 4:17-20.

Narita K, Akita T, Hachisuka J, Huang S, Ochi K, Kuba K. 2000. Functional coupling of Ca(2+) channels to ryanodine receptors at presynaptic terminals. Amplification of exocytosis and plasticity. *J Gen Physiol* 115(4):519-532.

Naveh N, Bar-Ilan A, Rosner M, Schwartz M, Weissman, Belkin M. 1990. Low-energy laser irradiation – a new measure for suppression of arachidonic acid metabolism in the optic nerve. *J Neurosc Res* 26(3):386-389.

Navratil L, Dylevsky I. 1997. Mechanisms of the analgesic effect of therapeutic lasers in vivo. *Laser Ther* 9:33-40.

Nelson DL, Cox MM. 2000. Fosforilacion oxidativa y fotofosforilacion. In: Lehninger. *Principios de bioquímica*. 659-715. Ed. Omega, Barcelona.

Nelson AJ, Friedman MH. 2001. Somatosensory trigeminal evoked potential amplitudes following low level laser and sham irradiation over time. *Laser Ther* 13:60-64.

Nelson R, Agro J, Lugo J, Gasiewska E, Kaur H, Muniz E, Nelson A, Rothman J. 2004. The relationship between temperature and neuronal characteristics. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 44(4):209-216.

Nicolau RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MT, dos Reis LM, Zangaro RA. 2003. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci* 18(2):89-94.

Nicholls DG. 1994. Proteins, transmitters and synapses. 67-97. Blackwell scientific publications, USA.

Nissan M, Rochkind S, Razon N, Bartal A. 1986. HeNe laser irradiation delivered transcutaneously: its effect on the sciatic nerve of rats. *Lasers Surg Med* 6(5):435-438.

Noble JG, Lowe AS, Baxter GD. 2001. Monochromatic infrared irradiation (890 nm): effect of a multisource array upon conduction in the human median nerve. *J Clin Laser Med Surg* 19(6):291-295.

Ogura T, Mori M, Mikami Y, Hase H, Hayashida T, Kubo T, Kira Y, Aramaki S. 2004. Diagnostic utility of waveform analysis of compound muscle action potentials for carpal tunnel syndrome. *J Orthop Surg* 12(1):63-70.

Olson JE, Schimmerling W, Gundy GC, Tobias CA. 1981. Laser microirradiation of cerebellar neurons in culture. Electrophysiological and morphological effects. *Cell Biophys* 3(4):349-371.

Orchardson R, Peacock JM, Whitters CJ. 1997. Effect of pulsed Nd:YAG laser radiation on action potential conduction in isolated mammalian spinal nerves. *Lasers Surg Med* 21(2):142-148.

Orchardson R, Whitters CJ. 2000. Effect of HeNe and pulsed Nd:YAG laser irradiation on intradental nerve responses to mechanical stimulation of dentine. *Lasers Surg Med* 26(3):241-249.

Palfrey HC, Artalejo CR. 1998. Vesicle recycling revisited: rapid endocytosis may be the first step. *Neuroscience* 83(4):969-989.

Parsons TD, Coorsen JR, Horstmann H, Almers W. 1995. Doched granules, the exocytic burts, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. *Neuron* 15(5):1085-1096.

Parris WC, Janicki PK, Johnson BW Jr, Mathews L. 1994. Title Infrared laser diode irradiation has no behavioral or biochemical effect on pain in the sciatic nerve ligation-induced mononeuropathy in rat. *Anesth Prog* 41(4):95-99.

Passarella S, Perlino E, Quagliariello E. 1983. Evidence of changes, induced by HeNe laser irradiation, in the optical and biochemical properties of rat liver mitochondria. *Bioelectrochem. Bioenerg* 10:185-198.

Passarella S, Casamassima E, Molinari S, Pastore D, Quagliariello E, Catalano IM, Cingolani A. 1984. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *FEBS Lett* 175(1):95-99.

Pecot-Dechavassine M, Molgo J, Thesleff S. 1991. Ultrastructure of botulinum type-A poisoned frog motor nerve terminals after enhanced quantal transmitter release caused by carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone. *Neurosci Lett.* 130(1):5-8.

Pecot-Dechavassine M, Brouard MO. 1993. Changes in large dense-core vesicles during maturation of the rat neuromuscular junction. *Neuroreport*. 4(1):29-32.

Pecot-Dechavassine M, Brouard MO. 1997. Large dense-core vesicles at the frog neuromuscular junction: characteristics and exocytosis. *J Neurocytol*. 26(7):455-465.

Pestronk A. Washington University's Department of Neurology. Disponible: <http://pharyngula.org/~pzmyers/neuro/synapse/achchannel.jpg> (acesado en 20/02/2004).

Pope K. 2001. Comparative Monte Carlo Examination of Energy Penetration for Different Hair Removal Lasers. Disponible: <http://www.laserpartner.org/lasp/web/en/2001/0026.htm> (acesado en 10/04/2004).

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, Lamantia AS, McNamara JO. 2001. *Invitación a la Neurociencia*. Ed. Panamericana. Madrid-España. 41-158.

Rasmussen CD, Means AR. 1989. Calmodulin, cell growth and gene expression. *Trends Neurosci* 12(11):433-438.

Ratsbaum OM, Boiko ZF, Sheroshenko SM. 1976. The electrical reactions and lability of an isolated nerve exposed to low-energy laser radiation. *Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova* 62(2):211-221.

Re L, Castro LO, Giusti P, Ceccherelli F, Varotto E, Giron GP. 1992. Electrophysiological analysis of the HeNe laser effects at the mouse neuromuscular junction. *Laser Med Sci* 7:487-492.

Reddy GK. 2004. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J Clin Laser Med Surg* 22(2):141-150.

Ribeiro MS, Da Silva DF, De Araujo CE, De Oliveira SF, Pelegrini CM, Zorn TM, Zezell DM. 2004. Effects of Low-Intensity Polarized Visible Laser Radiation on Skin Burns: A Light Microscopy Study. *J Clin Laser Méd Surg* 22 (1): 59-66.

Rigau J, Trelles MA, Calderhead RO, Mayayo E. 1991. Changes on fibroblast proliferation and metabolism following in vitro Helium-neon laser irradiation. *Laser Ther* 3:25-33.

Rigau J. Acción de la luz láser a baja intensidad en la modulación de la función celular. Reus, 1996. Tesis de Doctorado en Medicina, Facultad de Medicina i Ciencias de la Salut, Univ. Rovira i Virgili.

Rochkind S, Barr-Nea L, Razon N, Bartal A, Schwartz M. 1987 a. Stimulatory effect of He-Ne low dose laser on injured sciatic nerves of rats. *Neurosurgery* 20(6):843-847.

Rochkind S, Nissan M, Barr-Nea L, Razon N, Schwartz M, Bartal A. 1987 b. Response of peripheral nerve to He-Ne laser: experimental studies. *Lasers Surg Med* 7(5):441-443.

Rochkind S, Rousso M, Nissan M, Villarreal M, Barr-Nea L, Rees DG. 1989. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. *Lasers Surg Med* 9(2):174-182.

Rochkind S. 1992. Central nervous system transplantation benefited by low-power laser irradiation. *Laser Med Sci* 7:143-151.

Rochkind S, Alon M, Ouaknif GE, Schiffer J, Razon N, Avram J, Doron A, Weiss S. 1992. Benign spinal cord tumor: surgical treatment improved by intraoperative low power laser irradiation. *Laser Bologna'92. Italy.* 77-81.

Rochkind S, Shahar A, Nevo Z. 1996. A combined procedure of cultured embryonic cells implantation and low power laser treatment to cure paraplegic rats following complete spinal cord transection. First World Congress of the World Association of Laser Therapy- Jerusalem, Israel. 32.

Rochkind S, Nissan M, Alon M, Shamir M, Salame K. 2001. Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats. *Lasers Surg Med* 28(3):216-219.

Rochkind S, Shahar A, Nevo Z. 2002. Laser therapy in further development of reconstructive and cell tissue-engineering approaches for peripheral nerve, spinal cord and brain tissue repair. 4th World Congress of the World Association of Laser Therapy- Tsukuba, Japon. 98.

Rosner M, Caplan M, Cohen S, Duvdevani R, Solomon A, Assia E, Belkin M, Schwartz M. 1993. Dose and temporal parameters in delaying injured optic nerve degeneration by low-energy laser irradiation. *Lasers Surg Med* 13(6):611-617.

Sakmann B. 1992. Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *Biosci Rep* 12(4):237-262.

Salgado AI, Cunha RA, Ribeiro JA. 2000. Facilitation by P(2) receptor activation of acetylcholine release from rat motor nerve terminals: interaction with presynaptic nicotinic receptors. *Brain Res* 877(2): 245-250.

Santafé MM, Garcia N, Lanuza MA, Uchitel OD, Tomas J. 2001. Calcium channels coupled to neurotransmitter release at dually innervated neuromuscular junctions in the newborn rat. *Neuroscience* 102(3):697-708.

Santafe MM, Garcia N, Lanuza MA, Uchitel OD, Salon I, Tomas J. 2002. Decreased calcium influx into the neonatal rat motor nerve terminals can recruit additional neuromuscular junctions during the synapse elimination period. *Neuroscience* 110(1):147-54.

Santiesteban JM, Avila I, Vélez M. 1988. Terapia láser en la sutura quirúrgica de nervios periféricos. *Bol CDL* 17:1-8.

Samigullin D, Bukharaeva E, Nikolsky E, Vyskocil F. 2003. Temperature effect on proximal to distal gradient of quantal release of acetylcholine at frog endplate. *Neurochem Res* 28(3-4):507-514.

Sato T, Kawatani M, Takeshige C, Matsumoto I. 1994. Ga-Al-As laser irradiation inhibits neuronal activity associated with inflammation. *Acupunct Electrother Res* 19(2-3):141-151.

Schaffer M, Bonel H, Sroka R, Schaffer PM, Busch M, Reiser M, Duhmke E. 2000. Effects of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). *J Photochem Photobiol B* 54(1):55-60.

Schwartz M, Doron A, Erlich M, Lavie V, Benbasat S, Belkin M, Rochkind S. 1987. Effects of low-energy He-Ne laser irradiation on posttraumatic degeneration of adult rabbit optic nerve. *Lasers Surg Med* 7(1):51-55.

Schweitzer JS, Williamson A. 1995. Relationship between synaptic activity and prolonged field bursts in the dentate gyrus of the rat hippocampal slice. *J Neurophysiol* 74(5):1947-1952.

Shafqat S, Velaz-Faircloth M, Guadano-Ferraz A, Fremeau RT Jr. 1993. Molecular characterization of neurotransmitter transporters. *Molec Endocrinal* 7(12):1517-1529.

Shahar A, Kleiman M, Levy A, Safran N, Rochkind S, Nevo Z, Kleiman M. 1996. Enhanced growth of cultured cerebral neurons by low power laser irradiation. 4th World Congress of the World Association of Laser Therapy- Jerusalem, Israel. 12.

Shamir MH, Rochkind S, Sandbank J, Alon M. 2001. Double-blind randomized study evaluating regeneration of the rat transected sciatic nerve after suturing and postoperative low-power laser treatment. *J Reconstr Microsurg* 17(2):133-138.

Shi K, Lu R, Xu X. 1997. Influence of low energy He-Ne laser on regeneration of peripheral nerve. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 11(1):14-18.

Silinsky EM. 1985. The biophysical pharmacology of calcium-dependent acetylcholine secretion. *Pharmacol Rev* 37(1):81-132.

Silva Junior AN, Pinheiro AL, Oliveira MG, Weismann R, Ramalho LM, Nicolau RA. 2002. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. *J Clin Laser Med Surg* 20(2):83-87.

Simplicio FI, Maionchi F, Hioka N. 2002. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos *Quim. Nova* 25(5):801-807.

Simpson PB, Challiss RA, Nahorski SR. 1995. Neuronal Ca^{2+} stores: activation and function. *Trends Neurosci* 18(7):299-306.

Simunovic Z. 1996. Low level laser therapy with trigger points technique: a clinical study on 243 patients. *J Clin Laser Med Surg* 14(4):163-167.

Snyder SK, Byrnes KR, Borke RC, Sanchez A, Anders JJ. 2002. Quantitation of calcitonin gene-related peptide mRNA and neuronal cell death in facial motor nuclei following axotomy and 633 nm low power laser treatment. *Lasers Surg Med* 31(3):216-222.

Star WM. 1997. Light dosimetry in vivo *Phys Med Biol* 42:763-787.

Stadler I, Lanzafame RJ, Oskoui P, Zhang RY, Coleman J, Whittaker M. 2004. Alteration of skin temperature during low-level laser irradiation at 830 nm in a mouse model. *Photomed Laser Surg* 22(3):227-231.

Steinlechner CWB, Dyson M. 1993. The effects of low level laser therapy on the proliferation of keratinocytes. *Laser Ther* 5:65-73.

Suedhof TC. 1995. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375:645-653.

Sun G, Tuner J. 2004. Low-level laser therapy in dentistry. *Dent Clin North Am* 48(4):1061-1076.

Tam G. 1999. Low power laser therapy and analgesic action. *J Clin Laser Med Surg* 17(1):29-33.

Toida M, Watanabe F, Goto K, Shibata T. 2003. Usefulness of low-level laser for control of painful stomatitis in patients with hand-foot-and-mouth disease. *J Clin Laser Med Surg* 21(6):363-367.

Trachtenberg JT. 1998. Fiber Apoptosis in Developing Rat Muscles Is Regulated by Activity, Neuregulin. *Dev Biol* 196(2):193-203.

Trelles MA, Mayayo E, Miro L, Rigau J, Baudin G, Calderhead G. 1989 a. The action of low reactive level laser therapy (LLLT) on mast cells: a possible pain relief mechanism examined. *Laser Ther* 1:27-30.

Trelles MA, Mester A, Rigau J, Mayayo E, Resa A, Lapin R. 1989 b. Clinical use of He-Ne laser for wound healing. *J Bloodless Med Surg* 7(1):3-7.

Trifaro JM, Vitale ML. 1993. Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 16(11):466-472.

Tullberg M, Alstergren P J, Ernberg M M. 2003. Effects of low-power laser exposure on masseter muscle pain and microcirculation. *Pain* 105: 89–96.

Túner J, Hode L. 1999. Reinnervation after nerve injury: the effects of low laser treatment. In: *Low level laser therapy- Clinical practice and science background*. 280-302. Prima Books, Sweden.

Tsubahara A, Takenaka S. 2002. Comparison of amplitudes of surface macro motor unit potentials recorded from various muscle sites. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 42(5):313-320.

Uzdensky AB. 2002. Isolated neuron response to blue laser microirradiation: phenomenology and possible mechanism. Disponible: <http://www.photobiology.com/v1/uzdensky2/> (acesado en 05/01/2002).

Uchitel OD, Protti DA, Sánchez V, Cherksey BD, Sugimori M, Llinás R. 1992. P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3330-3333.

Vacca RA, Marra E, Passarella S, Petragallo VA, Greco M. 1996. Increase in cytosolic and mitochondrial protein synthesis in rat hepatocytes irradiated in vitro by He-Ne laser. *J Photochem Photobiol B* 34:197-202.

Vacca RA, Moro L, Petragallo VA, Greco M, Fontana F, Passarella S. 1997. The irradiation of hepatocytes with He-Ne laser causes an increase of cytosolic free calcium concentration and an increase of cell membrane potential, correlated with it, both increases taking place in an oscillatory manner. *Biochem Mol Int* 43:1005-1014.

van Breugel HH, Bar PR. 1992. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med* 12(5):528-537.

van Breugel HH, Bar PR. 1993. He-Ne laser irradiation affects proliferation of cultured rat Schwann cells in a dose-dependent manner. *J Neurocytol* 22(3):185-190.

van der Kloot W, Molgo J. 1994. Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. *Physiol Rev* 74(4):899-991.

Wakabayashi H, Hamba M, Matsumoto K, Tachibana H. 1993. Effect of irradiation by semiconductor laser on responses evoked in trigeminal caudal neurons by tooth pulp stimulation. *Lasers Surg Med* 13:605-610.

Walker J. 1983. Relief from chronic pain by low power laser irradiation. *Neurosci Lett* 43(2-3):339-344.

Walker JB, Akhanjee LK. 1985. Laser-induced somatosensory evoked potentials: evidence of photosensitivity in peripheral nerves. *Brain Res* 344(2):281-285.

Walsh DM, Baxter GD, Allen JM. 1995. The effect of 820nm laser irradiation upon conduction in the frog (*rana temporaria*) sciatic nerve in vitro. *Laser Ther* 7:5-10.

Walsh DM, Baxter GD, Allen JM. 2000. Lack of effect of pulsed low-intensity infrared (820 nm) laser irradiation on nerve conduction in the human superficial radial nerve. *Lasers Surg Med* 26(5):485-490.

Wilden L, Karthein R. 1998. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. *J Clin Laser Med Surg* 16(3):159-165.

Wollman Y, Rochkind S. 1998. In vitro cellular processes sprouting in cortex microexplants of adult rat brains induced by low power laser irradiation. *Neurol Res* 20(5):470-472.

Young SR, Dyson M, Bolton P. 1990. Effect of light on calcium uptake by macrophages. *Laser Ther* 2:53-57.

Yu W, Naim JO, McGowan M, Ippolito K, Lanzafame RJ. 1997. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. *Photochem Photobiol* 66(6):866-871.

Zalewska E, Hausmanowa-Petrusewicz I, Stalberg E. 2004. Modeling studies on irregular motor unit potentials. *Clin Neurophysiol* 115(3):543-556.

Zengel JE, Sosa MA, Poage RE, Mosier DR. 1994. Role of intracellular Ca²⁺ in stimulation-induced increases in transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Gen Physiol* 104(2):337-355.

Zubkova SM, Sokolova ZA. 1978. State of the mitochondria and nuclear chromatin in cerebral cortex nerve cells during laser irradiation. *Vopr Med Khim* 24(3):326-330.

Zucker RS. 1996. Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron* 17(6):1049-1055.

8. ABREVIATURAS Y SIMBOLOS



8. ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ACh - acetilcolina

AChE – acetilcolinesterasa

AE – Artefacto de estímulo

Ag-AgCl – plata clorurada

AsGa – Arsenuro de Galio

AsGaAl – Arsenuro de Galio-Aluminio

ATP - adenosina trifosfato

Ca²⁺ - calcio

CaCl₂- cloruro de calcio

cm – centímetros

cm² – centímetros cuadrados

cm³ – centímetros cúbicos

CO₂ - dióxido de carbono

cols. - colaboradores

DE - densidad de energía

DP - densidad de potencia

dTC - d-tubocurarina

EPP - *End-Plate Potential* (potenciales de placa terminal)

g – gramos

HeNe – Helio Neonio

Hz – Herzios

IR – Infrarrojo

J – julios

K^+ - potasio

KCl – cloruro potásico

L – latencia media

LAL- *Levator auris longus* (músculo elevador largo de la oreja)

LLLT - *Low Level Laser Therapy* (terapia láser de baja potencia)

M – contenido cuántico medio

M - molar

$M\Omega$ - mega Ohms

MEPP - *Miniature End-Plate Potential* (potenciales de placa terminal en miniatura)

Mg^{2+} - magnesio

$MgSO_4$ – sulfato de magnesio

ml – mililitros

mm – milímetros

mM – milimolar

ms – milisegundos

mV - milivoltios

mW – miliwatios

Na^+ - sodio

Na^+/K^+ - ATPasa – sodio/potasio adenosina trifosfatasa

$NaCHO_3$ – bicarbonato sódico

NaCl – cloruro sódico

$NaHPO_4$ – fosfato sódico

Nd: YAG - Neodímio: Ytrio-Alumínio-Granada

nm - nanometros

O_2 – oxígeno

p – probabilidad estadística

PAMC - potencial de acción motor compuesto

PP – par de pulsos

PUM – potencial de unidad motora

RACH - receptor de acetilcolina

s - segundos

SEM - *Standard Error Mean* (error estándar medio)

S_{EPP} - desviación standard de amplitud de EPP

SNC - Sistema Nervioso Central

SNP - Sistema Nervioso Periférico

S_{ruido} - desvío standard del ruido

T_{sub} - tiempo de subida

UHN- Unidad de Histología y Neurobiología

UM – Unidad motora

VDCC - *voltage-dependent calcium channels* (canales de calcio voltaje dependiente)

V_{EPP} - amplitud media de EPP

X - amplitud media

X_1 - primer EPP

X_2 - segundo EPP

ZA - zonas activas

μm - micrómetro

μM – micro molar

$^{\circ}\text{C}$ - grados Celsius

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ - concentración de calcio intracelular libre

[ATP] – concentración de adenosina trifosfato

% - por ciento

α - alfa

β - beta

γ - gama

δ - delta

π - pi

® - marca registrada

\cong - igual o aproximadamente

\pm - más o menos

\leq - mayor o igual