

Efecto de la luz emitida por diodos (LED) sobre la viabilidad celular

Effect of light emitted by diodes (LED) on cell viability

Jhon Elvis Farro-Tello^{1,a}; Stalin Tello-Vera^{2,b}

RESUMEN

Objetivo: Identificar el efecto del uso concomitante de cuatro longitudes de onda; rojo, 645-700nm; azul, 439-440nm; amarillo, 586 nm, y verde 509-510nm, a 35,8mW y 62,81mW de potencia luminosa sobre la viabilidad celular a los 10, 20 y 30 minutos de exposición. **Material y Métodos:** Se diseñó una lámpara usando diodos emisores de luz, que tuvo un microcontrolador que permitió el control del tiempo y la potencia de la energía luminosa emitida hacia las células. Se separaron linfocitos de sangre periférica usando ficoll hypaque exponiéndolos luego a la luz por 10, 20 y 30 minutos y evaluando su viabilidad combinándolos con bromuro de etidio y naranja de acridina al finalizar cada tiempo para lo que se usó un microscopio de inmunofluorescencia. **Resultados:** La viabilidad de los leucocitos después de su irradiación por la lámpara de diodos emisores de luz a una potencia eléctrica de 1028,8 mW fue 93%, 70% y 51% a los 10, 20 y 30 minutos, respectivamente, mientras que sus respectivos controles tuvieron 93%, 91% y 86%. La viabilidad de los Leucocitos después de su irradiación por la lámpara de diodos emisores de luz a una potencia eléctrica de 1681.3mW fue 93%, 75% y 45% a los 10, 20 y 30 minutos, respectivamente, mientras que sus respectivos controles tuvieron 94%, 91% y 86%. **Conclusiones:** La exposición de las células a la luz emitida por diodos (LED), a las potencias eléctricas de 1028.8mW y 1681.3mW generan reducción de su viabilidad después de los 10 minutos de irradiación comparados con sus respectivos controles.

Palabras clave: luz; supervivencia celular; Láseres de Estado Sólido. (Fuente: DeCS-BIREME).

ABSTRACT

Objective: Identify the effect of concomitant use of four wavelengths; red, 645-700nm; blue, 439-440nm; yellow, 586 nm, and green 509-510nm, at 35.8mW and 62.81mW of light power over cell viability at 10, 20 and 30 minutes of exposure. **Material and Methods:** A lamp was designed using light emitting diodes, which had a microcontroller that allowed time and power control of the light energy emitted to the cells. Peripheral blood lymphocytes were separated using ficoll hypaque, then exposed to light for 10, 20 and 30 minutes and evaluating their viability by combining them with ethidium bromide and acridine orange at the end of each time for which an immunofluorescence microscope was used. **Results:** viability of the leukocytes after irradiation by the light emitting diode lamp at an electrical power of 1028.8 mW was 93%, 70% and 51% at 10, 20 and 30 minutes, respectively, while their respective controls had 93 %, 91% and 86%. The viability of the Leukocytes after their irradiation by the

light emitting diode lamp at an electric power of 1681.3mW was 93%, 75% and 45% at 10, 20 and 30 minutes, respectively, while their respective controls had 94%, 91% and 86%. **Conclusions:** The exposure of the cells to the light emitted by diodes (LED), to the electric powers of 1028.8mW and 1681.3mW generate reduction of their viability after 10 minutes of irradiation compared to their respective controls.

Keywords: Light-emitting diodes; Cell Survival; Lasers, Solid-State (Source: DeCS-BIREME).

INTRODUCCIÓN

En el mundo alrededor del 80 por ciento de las personas mueren víctimas de una enfermedad crónica, no transmisible y de baja regeneración⁽¹⁾. Del año 2014 al 2016 en Perú las enfermedades degenerativas representaron 58,5% de las causas de mortalidad, realidad que podría cambiarse con la medicina regenerativa⁽²⁾. Las células madres como base de la medicina regenerativa, constituyen un campo interdisciplinario emergente, que busca reparar, reemplazar y regenerar células, tejidos y órganos con la finalidad de restaurar la pérdida de sus funciones⁽³⁾.

1. Universidad Nacional Pero Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
2. Laboratorio de biología molecular y citometría de flujo, Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo, EsSalud, Chiclayo, Perú.
a. Licenciado en Física.
b. Médico con especialidad en Patología Clínica.

La fotoactivación es un proceso que se lleva a cabo para generar activación celular, siendo controlados por equipos electrónicos de uso médico, este trabajo tuvo por finalidad el diseño de un equipo electrónico para evaluar el efecto sobre la viabilidad celular de la luz emitida por diodos, ya que muchos equipos usan dicha exposición para promover la activación celular⁽⁴⁻⁶⁾. Actualmente encontramos en el mercado equipos biomédicos que usan el principio de fotoactivación, para promover la regeneración celular. Se hizo uso de un dispositivo electrónico llamado microcontrolador, el cual permitió controlar la potencia y el tiempo de los diodos emisores de luz, permitiendo evaluar la radiación lumínica entregada a las células, haciéndolo de fácil manejo por el usuario. Finalmente se evaluó la viabilidad celular después de la exposición a la luz emitida por diodos (LED), mediante inmunofluorescencia⁽⁴⁾.

Debemos tener en cuenta que todo equipo para uso médico se diseña, teniendo en cuenta su uso en seres humanos procurando evitar daños; por ello se plantea identificar la viabilidad celular a los 10, 20 y 30 minutos de exposición al estímulo luminoso a 1028.8mW y 1681.3mW de potencia eléctrica, insertar en el equipo una pantalla de visualización y pulsadores que permitan el control de la potencia y el tiempo, diseñar un equipo para uso clínico a bajo costo, pero con características similares a los equipos usados en fototerapia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Método: se diseñó una lámpara con diodos emisores de luz usando componentes electrónicos como el mosfet que nos permite el control de potencia requerido en este estudio, para que sea esto posible se necesitó realizar acciones, guardarlas y ser ejecutadas posteriormente, para ello se usó un microcontrolador, siendo éste el corazón de todo el diseño, ya que de él fueron ejecutadas todas las acciones, no solo a los diodos emisores de luz, sino a los pulsadores que hicieron que este equipo fuera de manejo sencillo al interactuante y permitió enviar la información para ser visualizada en una pantalla LCD y también fue posible controlar el tiempo que estuvo en actividad los diodos emisores de luz.

Medición de efectividad: se estimó la viabilidad celular como primera fase de evaluación de un probable efecto de fotoestimulación, tomando en cuenta en primera instancia que el equipo no debe generar daño a la célula. Terminado el equipo se pasó al proceso de experimentación con muestras de Linfocitos, haciendo que estos sean expuestos a los diodos emisores de luz (LED), el equipo contó además con un puerto de comunicación hacia un computador para poder recolectar los datos que marcó el sensor de lux que se implementó para el conocimiento de la cantidad de lux que recibieron las muestras y posteriormente hacer el

cálculo de la potencia luminosa, obtenida nuestra data. Con la lámpara de fotoactivación se introdujo una muestra en su interior para posteriormente ser expuesta a la emisión de luz de los diodos LED durante diferentes tiempos con una cierta potencia.

Materiales empleados:

- Fuente de alimentación de corriente alterna y salida a 12V en corriente continua para uso con tiras de LED, y dispositivos en general.
- Microcontrolador: Microchip de la familia 16F PIC16F877A, dispositivo de 8-bits, el cual cuenta con capacidad de 14KB de memoria para almacenar programas.
- Módulo Sensor de Luz digital BH1750, sensor de iluminación digital para medición de flujo luminoso (iluminancia) de la empresa Rohm Semiconductor. Posee un conversor interno de 16-bit, por lo que entrega una salida digital en formato I2C. Su desempeño es mejor al de un Foto-Resistor (LDR), pues no es necesario realizar conversiones de voltaje para obtener datos interpretables.
- Pantalla LCD: LCD 16x2 es una pantalla básica de 16 caracteres por 2 líneas con un fondo azul y una luz de fondo blanco.
- Diodos emisores de luz, una de las nuevas versiones de LEDs que se están utilizando son las tiras de LED flexibles. Estas tiras vienen en muchas configuraciones ya que uno las puede hacer muy brillantes para iluminar, también las hay de varias longitudes y colores.
- Componentes electrónicos y varios más.
- Mosfet IRFZ44N, Fibra de vidrio, Diodos LED, resistores, Condensadores, Pulsadores, Multi metro, Otros.
- Placas Terasaki: Multipocillos de poliestireno (6 filas x 12 columnas), Ficol: Polisacárido hidrofílico altamente ramificado, soluble en soluciones acuosas, Ficol hace parte de "Ficoll-Hypaque"; que es usado en laboratorios de biología molecular con el fin de separar los componentes de la sangre tales como eritrocitos y leucocitos. El Ficoll luego de ser centrifugado con la sangre, revelará en capas de arriba hacia abajo: El plasma, capa de leucocitos mononucleares, Ficoll-Hypaque, granulocitos y hematíes. Solución de Hanks: Grupo colectivo de sales ricas en iones de bicarbonato, por lo general, se usan como un sistema tampón en medios de cultivo celular y ayudan a mantener el pH fisiológico óptimo para el crecimiento celular, Naranja de Acridina: es un colorante catiónico selectivo para los ácidos nucleicos y útil para realizar determinaciones sobre el ciclo celular, se utiliza conjuntamente para diferenciar entre células vivas y apoptóticas.
- Microscopio Lx 500, utilizado en inmunofluorescencia.
- Contador de leucocitos: LW SCIENTIFIC, contador de 8 teclas.

- Centrifuga para laboratorio de 6 tubos, marca Greetmed y modelo: gt119-100t.

Muestra de Linfocitos

Primero se obtuvo una muestra sanguínea anticoagulada con EDTA en 4 tubos de 2.7ml, después estos fueron centrifugados a 1000 revoluciones/min por 5 minutos, permitiendo la separación de los compuestos sanguíneos en diferentes capas de acuerdo a su densidad específica, en la parte inferior se ubicaron los hematíes, sobre ellos los leucocitos y plaquetas, y en la parte superior el plasma.

Posteriormente se tomó la capa leucocitaria de cada tubo que se diluyó con igual volumen de C1Na 9% y posteriormente se combinó en una proporción de dos volúmenes de sangre diluida con un volumen de ficoll hypaque, permitiendo que la sangre diluida quede sobre el ficoll previamente colocado en tubos de polipropileno de 15ml. Una vez combinados estos tubos fueron centrifugados a 1500 revoluciones por 20 minutos permitiendo una separación en gradiente de fases, permitiendo que los hematíes se encuentren al final, encima el ficoll, superior a ella la capa leucocitaria (constituida principalmente por linfocitos), y finalmente en la capa superior el plasma. Los linfocitos obtenidos se resuspendieron en solución de hanks (2ml), luego se centrifugó a 1000 revoluciones por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el botón celular obtenido en la parte inferior del tubo de ensayo fue diluido con solución de hanks hasta obtener de 2000 a 4000 leucocitos/ μ l, evaluados con el equipo hematológico de 5 estirpes Mindray.

Exposición de las muestras a la lámpara y conteo celular

Una vez obtenidas las muestras de linfocitos en suspensión, se utilizaron alícuotas de 1μ l en 7 pocillos de una placa terasaki de 72 pocillos que fueron utilizados como basal y 3 grupos de 7 pocillos que fueron utilizados como grupos experimentales. El grupo control se mantuvo a temperatura ambiente y expuesto solo a luz ambiental del laboratorio de inmunología en espacios de 10, 20 y 30 minutos (por cada ensayo se preparó un nuevo control y se expuso al tiempo respectivo a la luz ambiental) mientras que en el grupo experimental se expuso a estimulación lumínica por 10, 20 y 30 minutos a potencias eléctricas de 1028.8mW y 1681.3 mW.

A los grupos controles y experimentales irradiados se les agregó una solución de naranja de acridina y bromuro de Etidio para evaluar la viabilidad celular⁽⁴⁾.

Análisis estadístico: se usó frecuencias relativas (porcentajes) y se aplicó la prueba T de student para comparar medias con un nivel de confianza del 95% y $p < 0,05$.

Aspectos éticos: cuenta con la aprobación de la escuela de física de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo y la autorización del laboratorio de biología molecular y citometría de flujo del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo.

RESULTADOS

El diseño se implementó mediante la unión de distintos módulos, conformados por componentes electrónicos usados en física instrumental, que en conjunto hacen posible el funcionamiento de la lámpara. Para explicar el funcionamiento se utilizó un diagrama de bloques para explicar las etapas de su contenido (figura N°1).

Al evaluar la viabilidad celular posterior a la irradiación con luces LED durante los primeros 10 minutos, con ambas potencias evaluadas, pudo apreciarse, que no existió diferencias significativas ($p=0,011$), con respecto a los grupos no irradiados (controles, tabla N 1y 2), sin embargo hubo una notoria diferencia entre los grupos irradiados por 20 y 30 minutos y sus respectivos grupos control, a las potencias evaluadas, obteniéndose a los 20 y 30 minutos 70% y 45% de viabilidad, respectivamente, con diferencias significativas comparadas con las muestras controles que obtuvieron 90 y 86% de viabilidad, respectivamente (tablas N°1 y 2).

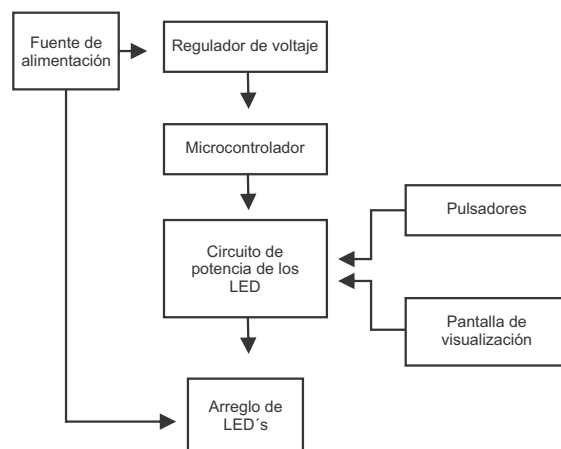


Figura 1.
Diseño de la lámpara de diodos emisores de luz.

DISCUSIÓN

El bromuro de Etidio ingresa a la célula y brinda a las muestras apoptóticas un color rojo-naranja, aclarando que solo puede ingresar si la membrana se encuentra dañada en cambio la naranja de acridina ingresa a la célula viable, se intercala con el ADN y la torna de color verde, distinguiendo con estos colores las muestras apoptóticas y vivas⁽⁴⁾.

Tabla N°1. Viabilidad de Leucocitos después de su Irradiación por la lámpara de diodos emisores de luz a una potencia eléctrica de 1028.8mW.

N° muestra	Basal	Control 10 min	Grupo 10 min	Control 20 min	Grupo 20 min	Control 30 min	Grupo 30 min
1	96%	95%	94%	91%	82%	87%	45%
2	97%	94%	95%	92%	68%	88%	52%
3	99%	90%	89%	89%	81%	84%	50%
4	100%	94%	94%	90%	63%	85%	54%
5	95%	93%	92%	90%	65%	88%	47%
6	95%	94%	91%	91%	62%	87%	60%
7	96%	94%	93%	91%	66%	85%	49%
Promedio	97%	93%	93%	91%	70%	86%	51%

Tabla N°2. Viabilidad de Leucocitos después de su Irradiación por la lámpara de diodos emisores de luz a una potencia eléctrica de 1681.3 mW.

N° muestra	Basal	Control 10 min	Grupo 10 min	Control 20 min	Grupo 20 min	Control 30 min	Grupo 30 min
1	95%	94%	94%	92%	75%	90%	41%
2	95%	94%	95%	92%	77%	84%	58%
3	98%	94%	93%	91%	73%	84%	49%
4	96%	92%	95%	90%	73%	90%	53%
5	91%	95%	90%	92%	73%	84%	63%
6	95%	93%	94%	90%	76%	88%	39%
7	94%	94%	90%	89%	76%	84%	15%
Promedio	95%	94%	93%	91%	75%	86%	45%

La viabilidad evaluada con un microscopio de inmunofluorescencia clínico Lx 500, permite visualizar los linfocitos vivos y apoptóticos y usando un contador manual hasta evaluar un total de 100 linfocitos por pocillo, permite el conteo respectivo de viabilidad para las muestras control, e irradiada, lo que muestra el importante efecto sobre la viabilidad celular que la irradiación con luces LED tiene después de los 10 minutos.

Nuestros resultados con potencias luminosas de 35,89mW y 62,81mW (correspondientes a las potencias eléctricas de 1028.8mW y 1681.3mW) fueron similares a los hallados por Romero y Manrique⁽⁵⁾, quienes evaluaron un equipo regenerador de tejidos durante un tiempo de aplicación de 1 a 15 minutos, y potencias luminosas de 5 a 100mW, así mismo artículos seleccionados en PubMed durante los últimos 12 años sobre fotobiomodulación por Fekrazad, Asefi, Allahhadi y Kalhori mostraron resultados de potencia luminosa utilizada para luz visible en el rango de 30-110mW⁽⁶⁾.

Por otra parte estudios realizados por Hadis et.al con

matrices LED en fotobiomodulación obtuvieron potencias luminosas de 1,12- 45.44mW, demostrando que las potencias fueron similares. Cabe mencionar que las longitudes de onda utilizadas en la literatura se encuentran en el rango de 440nm a 700nm como las 4 longitudes de onda utilizadas que comprendieron el rojo, 645-700nm ; azul, 439-440nm; amarillo , 586nm y verde 509-510nm. Este estudio aportamos información del diseño y evaluación del efecto de la luz LED sobre la viabilidad celular, como primera fase para posteriores estudios que pretendan evaluar aspectos más complejos como la activación celular y el efecto de la estimulación luminosa sobre ella.

Con el tiempo de 0 a 10 minutos y potencias luminosas evaluadas de 35,89, 62,81mW no hubo diferencias significativas comparadas con las muestras controles, determinándose que el porcentaje de viabilidad fue mayor al 90% en ambos grupos. Los grupos expuestos a irradiación de 20 y 30 minutos tuvieron una importante reducción de la viabilidad celular con valores próximos al 70 y 50% comparado con el 91 y 86 % de los grupos control.

Conflictos de interés: Los autores niegan conflictos de interés.

Financiamiento: Autofinanciado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shetty P. Enfermedades crónicas: hechos y cifras [Internet]. SciDev.Net América Latina y el Caribe. [citado 9 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://bit.ly/2SKLe2T>.
2. Ojeda DDV. Situación de las enfermedades crónicas no transmisibles: problema cancer. Ministerio de Salud. [Internet]. [citado 9 de noviembre de 2019]. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/2283.pdf>
3. Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa [Internet]. [citado 9 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://bit.ly/39SMsP0>
4. Alvarez M, Urbina G, Perdomo L. Producto de Excreción de *Shigella Dysenteriae* (PESdy) Induce Muerte Celular en Larvas de Pez Cebra (Danio rerio): Marcaje in vivo con Naranja de Acridina y

- Bromuro de Etidio (NA/BE). *International Journal of Morphology*. 2014;32(1):84-89.
5. Romero Román HL, Manrique Solorzano SL. Diseño e implementación de equipo regenerador de tejidos blandos basado en diodos emisores de luz y láser diodo. Pontificia Universidad Católica del Perú [Internet]. el 8 de febrero de 2013 [citado 9 de noviembre de 2019]; Disponible en: <http://repositorio.pucp.edu.pe/index/handle/123456789/163581>.
 6. Fekrazad R, Asefi S, Allahdadi M, Kalhori KAM. Effect of Photobiomodulation on Mesenchymal Stem Cells. *Photomed Laser Surg*. 2016;34(11):533-42.

Correspondencia

Stalin Tello Vera

Correo: unprg2008@gmail.com

Revisión de pares

Recibido: 10/11/2019

Aceptado: 18/12/2019