



Uso de fototerapia LED para el tratamiento de heridas: amputación en Ciervo Axis hembra



Coordinador de sección
Juan Carlos Troiano



Coordinadora de sección
Sandra Rosa Ierino

Autores:

Vieta, C.; Rivulgo, M.; Sánchez Bruni, S.; D'Angelo, C.; Lester, M.; Rosatti, J.; Brusco, M.; Garcia, J.

Introducción

El uso de fuentes de luz de radiaciones no ionizantes como Light Emitting Diode (LED) para el tratamiento y el alivio del dolor e inflamación, se conoce como Fototerapia o Fotobiomodulación. La Fototerapia de LEDs de alta potencia instantánea, se genera por la estimulación del diodo

semiconductor que produce una luz de muy baja potencia de emisión (1-5 mWatt). Los equipos de LEDs de alta potencia instantánea tienen mayor profundidad de penetración (véase **fig. 1**) que los LEDs comunes (acción más superficial). Las luces LED se utilizan con una longitud de onda que van desde los 380 a 436 nm (luz violeta), 436 a 495 nm (luz azul), 495 a 566 nm (luz verde), 566 a 589 nm (luz amarilla), 589 a 627 nm (luz naranja), 627 a 780 nm (luz roja), 770 a 940 nm (luz infrarroja). Las mismas son responsables de diversas acciones sobre la célula, incluyendo su permeabilidad, su estimulación de mitocondrias, la síntesis de ATP y sobre proteínas como colágeno y elastina. (McGowan y Goff, 2016; Millis y Levine, 2014; Russel, 2005). A su vez, está documentado que además de acelerar el proceso de cicatrización de heridas, poseen efecto antimicrobiano, antiinflamatorio y analgésico, dependiendo de la longitud de onda utilizada (Tomazoni et al., 2017; Redondo y Sthepens, 2019). Desafortunadamente, al presente hay pocos estudios experimentales en especies superiores sobre los efectos favorables de fototerapia LED en el proceso de cicatrización de heridas (Dall-algon et al. 2009, Farouk et al. 2003, Meyer

“Además de acelerar el proceso de cicatrización de heridas, poseen efecto antimicrobiano, antiinflamatorio y analgésico, dependiendo de la longitud de onda utilizada”



EXÓTICOS | Uso de fototerapia LED para el tratamiento de heridas: amputación en Ciervo Axis hembra



Figura 1. Se observa el grado de penetración de la luz producida por LEDs a través de los tejidos. Fuente: Elaboración propia.

bioeléctrico, traduciéndose en una variación del comportamiento normal (Tregrove et al., 1999). El restablecimiento del potencial eléctrico endógeno durante la cicatrización normal requiere de la interacción de muchos procesos biológicos, por lo que la interrupción de algunos de estos circuitos bioeléctricos, genera una lesión crónica que incide directamente en la prolongación de la fase inflamatoria inhibiendo la cicatrización (Tregrove et al., 1999; Zhao 2009)

Los diodos emisores de luz (LED) son dispositivos semiconductores en estado sólido por el cual circula la corriente eléctrica únicamente en una dirección y emite luz. Los rayos LEDs están compuestos de dos terminales denominadas p-n, el material n tiene demasiados electrones y el material p le faltan electrones, cuando se da un voltaje, los n se dirigen a los p, formando una diferencia de potencial eléctrico; por tanto, los electrones se orientan al orbital de mayor energía a uno más bajo (Dorronsoro y Gonzalo 2015; Gupta et al. 2017; Malacara 2015). El color de la iluminación LED depende de los diferentes materiales semiconductores. Estos poseen una radiación (longitud de onda) dentro de la gamma infrarroja hasta el visible (Malacara 2015), Además poseen alta resistencia a las vibraciones y una mayor estabilidad térmica. La fototerapia LED es una tecnología amigable con el medio ambiente, no utiliza compuestos de mercurio y una bombilla LED tiene mayor durabilidad que una común (Calderón 2016, D'Souza et al. 2017, Abramovitis y Arrazalap2005)

En las moléculas biológicas existe una semimolécula denominada cromóforo. Este último es una región molecular donde la diferencia de energía entre dos

et al. 2010, Channal, et al., 2008; Deland et al., 2007)

Durante el proceso de cicatrización de una herida, una sucesión de eventos son activados, sobre la acción celular. Estos estimulan el crecimiento, reparación y remodelación del tejido dañado, por medio del restablecimiento de la características físicas, mecánicas y eléctricas del mismo (Hosgood, 2003; Velnar et al. 2009; Stashak y Theoret, 2008). Los campos eléctricos endógenos se encuentran de manera natural en el organismo y son los encargados de controlar los procesos de crecimiento y comportamientos celulares. De esta manera se produce (a nivel celular) una señal bioeléctrica generada por un potencial transmembrana que permiten varios procesos fisiológicos en las células. Estas características eléctricas presentes en la piel están dadas principalmente por la epidermis, que ante la presencia de una lesión altera la integridad del circuito

“Los campos eléctricos endógenos se encuentran de manera natural en el organismo y son los encargados de controlar los procesos de crecimiento y comportamientos celulares”

EXÓTICOS | Uso de fototerapia LED para el tratamiento de heridas: amputación en Ciervo Axis hembra

orbitales moleculares cae dentro del rango del espectro visible. Los cromóforos son receptores primarios que capturan la energía y cambian su forma, cada cromóforo posee un espectro propio de absorción y este cambio es el que genera los efectos fotobiológicos que se busca en la clínica (Austin et al., 2021). En el caso de la luz visible, la luz azul que se encuentra en el rango de 450 nanómetros de longitud de onda (λ) convierte la bilirrubina no conjugada en isómeros no tóxicos y solubles, además estimula el flujo de bilis y la excreción de bilirrubina siendo el tratamiento de la hiperbilirrubinemia en neonatos (Ebbesen et al., 2022) y presenta a su vez efectos antimicrobianos (Leanse et al., 2020; Wang et al., 2017). La efectividad del LED verde ($\lambda=515-525$ nm), tiene como objetivo los cromóforos de la hemoglobina y melanina, produciendo efectos hemodinámicos (Ebbesen et al., 2022). Por otro lado, el LED rojo ($\lambda 620-630$ nm) posee su cromóforo objetivo en la melanina dando efectos sobre la cicatrización y el rejuvenecimiento de la piel. A su vez, también la citocromo Coxidasa (CCO) dentro de las mitocondrias y cromóforos de la membrana plasmática de las células, fundamentalmente fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y linfocitos, se activan provocando varios procesos de bioestimulación, con una cadena de reacciones biológicas, bioquímicas, bioeléctricas y bioenergéticas, teniendo efectos a nivel molecular, celular y niveles tisulares (Leanse et al., 2020; Wang et al., 2017).

De esta manera, los efectos fisiológicos primarios se inician por una compleja cascada de señalización celular producida por el estímulo luminoso, generando numerosos efectos a nivel celular,



Figura 2. Se observa la herida de amputación el primer día de tratamiento (A) con su respectiva histología en donde se observa vascularización compatible con congestión y áreas de necrosis. (B y C) Se observa el proceso de contracción de la herida. El último día de tratamiento (D) se observa la herida con una costra gruesa y en la histología se observa la epidermis engrosada, sin zonas de necrosis.

molecular y tisular. Los efectos complementarios son estimulados por la microvascularización, angiogénesis, proliferación de fibroblastos (colágeno) y trofismo celular. Además, se genera liberación de endorfinas y opioides centrales mediado por el aumento

de óxido nítrico (ON) en sangre, aumento de superóxido dismutasa (SOD), modula la producción de citoquinas, modula factores de crecimiento como PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), TGF- β 1 (factor de crecimiento transformador beta)



EXÓTICOS | Uso de fototerapia LED para el tratamiento de heridas: amputación en Ciervo Axis hembra

y MMP (metaloproteinasas) activa células T CD8 e induce la apoptosis (Bartoled 2008, Russel et al. 2005).

Objetivo

Los objetivos de este estudio fueron: a) valorar in vitro el espectro y la calidad de rayos utilizados en el estudio in vivo b) evaluar los efectos de las luces LEDs con longitudes de onda de luz visible de espectros rojo, amarillo, verde e infrarrojo, en el tratamiento de una herida en ciervo axis axis, a través de la evolución del proceso de cicatrización y por histopatología

Materiales y métodos

Valoración de física de espectro y calidad de rayos LED (estudio in vitro)

Todos los espectros fueron registrados con un espectrómetro de alta resolución (Modelo 504, Acton Research Corporation, USA). La señal (luz emitida) de cada LED fue debidamente aislada. Para esto se usó una máscara que deja expuesto al LED a medir, dejando oculto el resto. Cada señal fue enfocada en la rendija de entrada del espectrofotómetro (alrededor de 10 µm de apertura), mediante una lente de cuarzo de 100 mm de longitud focal. La señal es dispersada mediante una red de difracción de 1200 líneas/mm, y permite cubrir un rango espectral de 200 a 1200 nm. La detección de la luz dispersada fue ejecutada por un arreglo de fotodiodos lineales no intensificado (Model RY-1024, PricentonInstrument, Inc., USA) y sin posibilidad de discriminación

Tabla 1. Interales de los perfiles de emisión de los diferentes tipo de diodos

| LEDs | Intensidad interada (u.a.) |
|----------|----------------------------|
| Verde | 101740 |
| Amarillo | 285757 |
| Rojo | 125913 |
| IF | 1,37953E6 |

temporal. Este arreglo de fotodiodos cubre un ancho de 50 nm del espectro a estudiar en cada toma de datos. En cada caso, se implementó un tiempo de exposición de 2 s, y los registros espectrales finales fueron ajustados por la eficiencia cuántica correspondiente al sensor utilizado. En particular para el caso del LED de IF (infrarrojo), su espectro se armó de registros secuencial en cuatros zonas espectrales centrales (900, 930, 960 y 990 nm).

Estudio in vivo de tratamiento de herida

Descripción del animal

Especie: Cérvido, perteneciente a la familia Axis axis, de 4 meses de edad, sexo hembra, que presentó una herida en miembro pelviano izquierdo cuando fue pisado por su propia madre, con el resultado de una fractura de metatarso expuesta con compromiso vascular, por lo que se tuvo que realizar una amputación del miembro a la altura de la articulación tarsometatarsiana. La herida se dejó que cierre por segunda intención. A la semana del procedimiento, el veterinario de referencia decide derivarlo a fisioterapia.

Tratamiento y terapia implementada

Para este estudio se utilizaron cuatro fuentes de luces LEDs,

de un equipo de fototerapia, de marca Demox© con 4 pads de luces LED. El equipo de LEDs de alta potencia instantánea utilizado tiene una fuente de alimentación regulada y estabilizada universal (100V/240V), 50-60 Hertz, tipo Switching de 12-volt y 5 amperes. Cada aplicador de LEDs (Pad) tiene las siguientes luces:

- Infrarrojo: 904 nm
- Rojo: 625 nm y aporta 0,95 mWatt
- Amarillo: 590 nm y aporta 0,885 mWatt
- Verde: 525 nm y aporta 12 mWatt

La superficie que abarca cada LED es de 0,19cm². A la herida se le realizaron cinco sesiones, 1 vez por semana. En el protocolo de cicatrización de heridas se colocaron los Pads sobre la herida con biofilm para proteger los Pads, se aplicaron frecuencias bajas y sin modular para la actividad regenerativa de la piel y el pelo, entre 800 hertz y 1 khtz, con una duración del tratamiento de 30 minutos.

Medición del área de la herida

La medición de la herida se tomó con un calibre mecánico Hamilton 150 mm C10 de acero inoxidable, las mediciones se realizaron el primer día antes de la primera sesión, en la tercera sesión y luego de finalizada la



EXÓTICOS | Uso de fototerapia LED para el tratamiento de heridas: amputación en Ciervo Axis hembra

última sesión de terapia. Se tomó registro escrito y audiovisual con una cámara de 29 megapíxeles marca Samsung. Las medidas se tomaron en dos puntos de cada lado, del lado medial y lateral de la herida del miembro pelviano y se realizó un promedio.

Estudio histológico

Se tomaron muestras de piel con una aguja trucut®, el primer día antes del tratamiento y el último día de tratamiento. Las muestras fueron conservadas en formol al 10% hasta su análisis. Luego se procedió a procesarlas y a tomar registro audiovisual de las mismas con un microscopio con cámara incorporada modelo Olympus®.

Resultados

Espectros de absorción

En cuanto a los resultados de los espectros de absorción, el de mayor espectro por varios órdenes de magnitud fue la fuente de luz infrarroja, seguido de la fuente de luz roja, amarilla y verde, respectivamente.

En la **tabla 1** se observa Intensidades integradas espectralmente, relativas entre los diferentes diodos

Evolución de la medición de contracción del área de cierre de herida en función de tiempo

La primera medición de la herida fue antes de comenzar el tratamiento dando como resultado 6 cm de largo por 5 cm de ancho. En la segunda medición, realizada en la tercera sesión (tercer semana) hubo una reducción a 4 cm de largo por 2,2 cm de ancho y

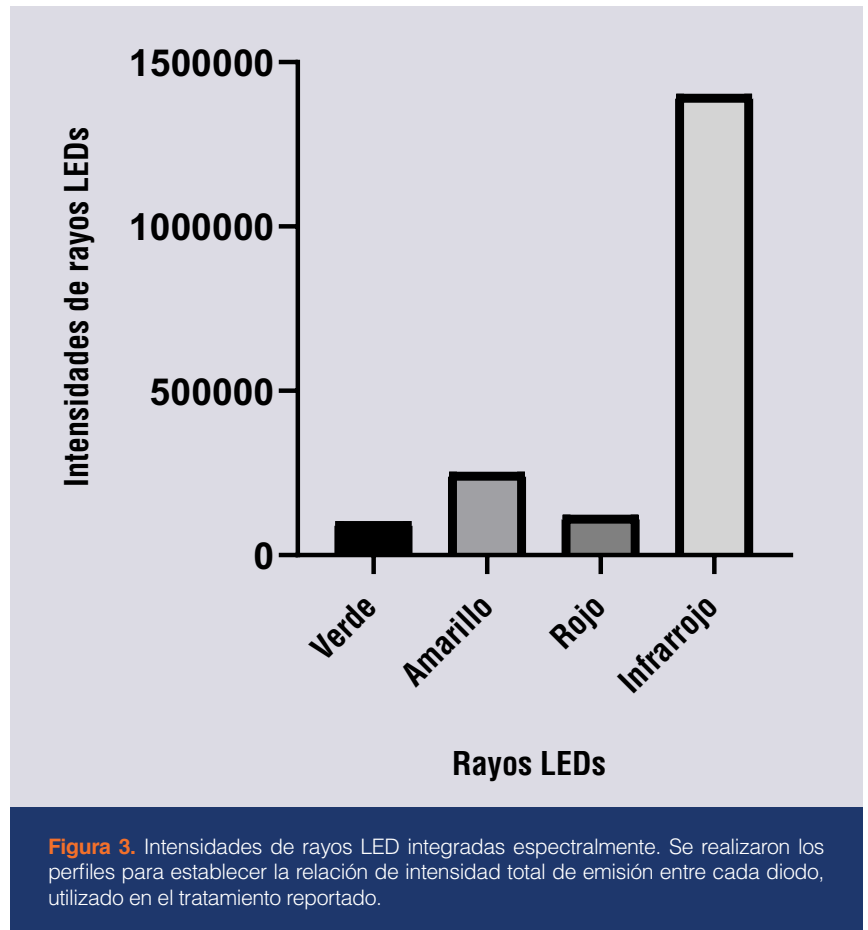


Figura 3. Intensidades de rayos LED integradas espectralmente. Se realizaron los perfiles para establecer la relación de intensidad total de emisión entre cada diodo, utilizado en el tratamiento reportado.

en la tercera medición, realizada en la última sesión (quinta semana de tratamiento) fue de 0,5 cm, observándose prácticamente la reducción total de la herida (véase **fig. 2**).

Cambios morfológicos a través de histopatología registrados

- **Muestra 1** (antes del tratamiento): Se observó abundante cantidad de tejido de granulación compuesto por un abundante número de vasos sanguíneos de calibre mediano, rodeado por una moderada cantidad de fibras colágenas y fibroblastos orientados perpendicularmente hacia los vasos. Se observa de forma multifocal y al azar

zonas de necrosis líticas, caracterizado por la presencia de una abundante cantidad de neutrófilos degenerados mezclados con restos celulares y fibrina. Además, se observa áreas extensas de hemorragia y edema proteináceo, la mayoría de los vasos sanguíneos se encuentran en su interior llenos de glóbulos rojos compatibles con congestión (**fig. 3**).

- **Muestra 2** (último día de tratamiento): Se observa la capa de la epidermis engrosada de forma focal por una costra formada por células inflamatorias degeneradas y células epiteliales descamadas mezcladas con queratina desorganizada (**fig. 3**).



Discusión

Los agentes físicos utilizados en fisioterapia pueden jugar un rol importante en el manejo de las heridas, ya que disponen de recursos terapéuticos capaces de acelerar el proceso de cicatrización sobre todo en especies no tradicionales, en donde los tiempos del procedimiento de curación debe reducirse al mínimo, ya que son animales que sufren un alto estrés ante el manejo del hombre (Basson y Hoffmayer 1973; Odeon y Romera 2017). Los resultados del presente estudio resultaron en una cura de la herida por reepitelización y formación de tejido de granulación en un tiempo menor al registrado por otros autores Stashak y Theoret, 2008, en donde registran tiempos mayores a 75 días hasta 1 año para el cierre de una herida por tratamiento convencional.

También nuestras observaciones concuerdan con publicaciones anteriores (Gupta et al. 2014), en donde se mostraron resultados positivos en la curación de tejidos, luz roja e infrarroja para mejorar significativamente la curación de abrasiones dérmicas. En otro estudio realizado por Meyer et al. 2010, en donde se evaluó el efecto del LED en la cicatrización de heridas en piel de ratas los resultados mostraron que el tejido de granulación estaba más desarrollado en los grupos irradiados, así como también mayor deposición de colágeno y mejores efectos antiinflamatorios.

En nuestro estudio, el análisis de la histología de las dos biopsias realizadas mostró mejorar el proceso de cicatrización favoreciendo el engrosamiento de la epidermis y de esta manera crear un muñón más resistente.

El cierre de una herida implica la migración de los límites de una lesión hacia su centro y puede evaluarse mediante parámetros relacionados, como la medida de contracción de la herida (Hosgood, 2003) por lo que uno de estos agentes físicos con propiedades prometedoras para el manejo de heridas es la fototerapia o fotobiomodulación LED (Light Emitting Diode).

Un haz de luz aplicado a un tejido vivo tendrá diferentes efectos sobre los componentes del tejido dependiendo de la longitud de onda. De esta manera, los efectos bioestimulantes que inducen a los queratinocitos no lesionados y células endoteliales en la piel circundante a migrar al área de lesión y promover la reepitelización y angiogenesis.

Los rayos de luz roja e IF pueden penetrar los tejidos en profundidad y permiten llevar a cabo un tratamiento no invasivo para aumentar los procesos de curación. La luz roja visible (λ660) es absorbida fácilmente por la sangre y la superficie de la piel limitando su penetración en los tejidos a menor a 10 mm. Por otro lado, los rayos infrarrojos poseen una mayor profundidad de penetración a los tejidos de 30 a 40 mm proporcionando una mayor deposición de fotones (Redondo y Sthepens, 2019), lo que concuerda con nuestro trabajo en donde la luz infrarroja tuvo una mayor intensidad integrada que el resto de las luces seguida por la luz amarilla, roja y verde, respectivamente (véase **fig. 3**). La cicatrización de la herida por amputación reportada en este estudio, luego del tratamiento con rayos LED, demostró un cierre eficiente de los bordes de la herida en cinco sesiones de 1 vez por semana de tratamiento.

Conclusión

En conclusión, los hallazgos del presente estudio sugieren que la fotobioestimulación generada por las luces LEDs induce un proceso de curación que incluye la proliferación celular, reduciendo los tiempos de cierre de una herida. Sin embargo, más estudios con un número relevante de animales y diferentes lesiones son necesarios para establecer un protocolo de tratamiento de heridas, sobre todo en especies no tradicionales.

Bibliografía

- Abramovitis W, Arrozalal GAK. Light-emitting diode-based therapy. *Dermclin* 2005. 12 (3):163-7.
- Austin E, Geisler AN, Nguyen J, Kohli I, Hamzavi I, Lim HW, Jagdeo J. Visible light. Part I: Properties and cutaneous effects of visible light. *J Am Acad Dermatol*. 2021 May;84(5):1219-1231. doi: 10.1016/j.jaad.2021.02.048. Epub 2021
- Bartoled D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Semin Cutan Med Surg*. 2008. 27(4):227-38.
- BASSON, P.A. y HOFMEYER, J.M. 1973. Mortalities associated with wildlife capture operations. en: *The capture and care of Wild animals*. E. YOUNG editor, Human and Rousseau, Cape Town and Pretoria. pp151-160.
- Calderón, A. 2016 Tecnología y diseño de pantallas electrónicas gigantes: Larevolución led. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/udlasp/detail.action?docID=5192643>
- Channual J, Choi B, Osann K, Pattanachinda D, Lotfi J, Kelly



EXÓTICOS | Uso de fototerapia LED para el tratamiento de heridas: amputación en Ciervo Axis hembra

- KM. 2008. Vascular effects of photodynamic and pulsed dye laser therapy protocols. *LasersSurgMed* 40:644-650.
- Deland MM, Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG. 2007. Treatment of radiation -induced dermatitis with light-emitting diode(LED) photomodulation. *LasersSurgMed* 2(39):164-8.
 - Dall-Agnol MA, Nicolau RA, Lima DE, Munin E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus no coherent light(light emitting diode) for tissue repairs in diabetic rats. *Laser MedSci* 2009;24(6):909-16
 - Ebbesen F, Vreman HJ, Hansen TWR Blue-Green (~480 nm) versus Blue (~460 nm) Light for Newborn Phototherapy-Safety Considerations. *nt J Mol Sci.* 2022 Dec 27;24(1):461. doi: 10.3390/ijms24010461.
 - Farouk AH, Al-Watban B L. 2003. Polychromatic LED Therapy in-burn healing of non-diabetic and diabetic rats. *J Clin Laser Med Surg* ;5(21):249-58 Malacara, D. 2015. Óptica básica. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/udlasp/reader.action?docID=4760033&query=Diodos+emisores+de+luz>
 - Leanse LG, Dos Anjos C, Mushtaq S, Dai T. Antimicrobial blue light: A 'Magic Bullet' for the 21st century and beyond? *Adv Drug Deliv Rev.* 2022 Jan;180:114057. doi: 10.1016/j.addr.2021.114057. Epub 2021 Nov 18. PMID: 34800566
 - McGowan and L Goff. *Animal physiotherapy: assessment, treatment and rehabilitation of animals*, 2nd edn. Wiley, 2016.
 - Meyer P., Hennes Gentil de Araújo, Maria Goretti Freire Carvalho, Beverly Ingrid ilva Tatum, Iohanna Cynthia de Andrade Gomes Fernandes, Oscar Ariel Ronzio, Marcus inicius de Mello Pinto. 2010. Assessment of effects of LED on skin wound healing in Wistar rats. *Avaliação dos efeitos do LED nacicatrizaçãodeferidas cutâneas em ratos Wistar.* *Fisioterapia Brasil - Vol:11 - Número 6*
 - McGowan, Goff L., Stubbs N. 2007 *Animal Physiotherapy: Assessment, Treatment and Rehabilitation of Animals* Wiley
 - Millis y Levine. 2014. *Canine Rehabilitation and Physical Therapy.* Second Edition
 - Gupta, D. S., Agarwal, A., Ibaraki, Y., Pocock, T., van Iersel, M. W., Bugbee, B., Wojciechowska, R. 2017. *Light Emitting Diodes for Agriculture.* 103,191. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5807-3>
 - D'Souza, C., Yuk, H. G., Khoo, G. H., & Zhou, W. (2015). Application of Light-mitting Diodes in Food Production, Postharvest Preservation, and Microbiological Food Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 719-740. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12155>
 - Hosgood G. Wound repair and specific tissue response to injury. In: Slatter D, ed. *Textbook of Small Animal Surgery.* 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2003:66-86.
 - Odeon MM y Romera SA 2017. Estrés en ganado: Causas y consecuencias. *Rev. vet.* 28 no.1
 - Redondo MS and Sthepens BJ. *Veterinary Laser Therapy.* In *small Animal Practice.* 2019 5M Publishing
 - Russell BA, Kellett N, Reilly LR. 2005. A study to determine the efficacy of combination LED light therapy (633 nm and 830nm) in facial skin rejuvenation. *Cosmet Laser Ther;*7(3-4):196-200.
 - Seung Yoon Lee, Ki-Ho Park, Jung-Woo Choi, Jung-Kyun Kwon, Doo Rak Lee, Mi Sun Shin, Jee Sung Lee, Chung Eui You, Mi Youn Park. 2007 A prospective, randomized, placebo-controlled, double-blinded, and split-face clinical study on LED phototherapy for skin rejuvenation: clinical, profilometric, histologic, ultrastructural, and biochemical evaluations and comparison of three different treatment settings. *J Photochem Photobiol B.* Jul 27;88(1):51-67.
 - Stashak TS y Theoret CL. *Equine Wound Management* 2nd Edition, 2008
 - Tomazoni S, Costa LDCM, Guimarães LS, et al. Effects of photobiomodulation therapy in patients with chronic non-specific low back pain: protocol for a randomised placebo-controlled trial. *BMJ Open* 2017;10:e017202.
 - Trengove N, Stacey M, MacAuley S et al. Analysis of acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen.* 1999;7(6):442-52.
 - Velnar T, Baley T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009;37:1528-42
 - Wang Y, Wang Y, Wang Y, Murray CK, Hamblin MR, Hooper DC, Dai T. Antimicrobial blue light inactivation of pathogenic microbes: State of the art. *Drug Resist Updat.* 2017 Nov;33-35:1-22. doi: 10.1016/j.drup.2017.10.002.
 - Zhao M. Electrical fields in wound healing-An overriding signal that directs cell migration [J]. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(6):674-82.