
**Riesgos personales
producidos por LEDS
utilizados en dispositivos
de uso cotidiano**

**Eva Chamorro
y cols.**

Ayudas a la investigación 2011

Investigador Principal

Eva Chamorro

Tecnóloga en Factoría I+D.
Investigadora de la Universidad Complutense

Equipo Investigador

Cristina Bonnin

Tecnóloga en Alta Eficacia Tecnología.
Investigadora de la Universidad Complutense

Luis Lucio Lobato-Rincón

Tecnólogo en Factoría I+D.
Investigador de la Universidad Complutense

Juan José Navarro-Valls

Tecnólogo en Alta Eficacia Tecnología.
Investigador de la Universidad Complutense

Carolina Navarro-Blanco

Investigadora de la Universidad Complutense

Guillermo Ramírez-Mercado

Investigador de la Universidad Complutense

Celia Sánchez-Ramos

Fundadora de las empresas Factoría I+D y Alta Eficacia Tecnología
Directora del departamento de Óptica II: Optometría
y Visión de la Universidad Complutense de Madrid.
Investigadora de la Universidad Complutense

Índice

	Página
1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	4
3. MATERIALES Y METODOLOGÍA	4
Emisor: Dispositivo de iluminación LED	5
Receptor: Células del epitelio pigmentario de la retina	5
Experimento de fototoxicidad	5
Tratamiento estadístico	
4. RESULTADOS	5
Supervivencia celular	5
Apoptosis (muerte celular inducida por la luz)	5
5. DISCUSIÓN	6
6. CONCLUSIÓN	7
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7

1. RESUMEN

El uso de fuentes de iluminación LEDs está incrementando de manera exponencial tanto en el campo de la iluminación ambiente como en dispositivos de uso personal y doméstico como smartphones, pantallas de ordenador, electrodomésticos, etc. Sin embargo, el principal problema que plantean los LEDs que emiten luz blanca es derivado de su alto contenido de radiaciones de la banda del azul, que se ha demostrado que son dañinas para el sistema visual.

En este proyecto se ha diseñado un dispositivo de iluminación formado por diodos LEDs de diferentes características espectrales para comprobar si los diodos LEDs producen daño en la retina, concretamente en células del epitelio pigmentario. Los experimentos han demostrado que la exposición a la luz aumenta el porcentaje de muerte celular inducida por la luz para todas las fuentes de luz LED, sobre todo en las células expuestas a luz azul y blanca, en las que se produjo un aumento del 92% y 94%. De este estudio se concluye que la exposición a altas intensidades de luz LED durante ciclos de luz/oscuridad produce daños en las células de la retina.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El primer diodo LED (de la sigla inglesa LED: Light-Emitting Diode: “diodo emisor de luz”) fue desarrollado en 1927 por Oleg Vladimirovich Lósev (1903-1942), pero no fueron comercialmente utilizables hasta el año 1962 cuando se consiguió desarrollar un LED rojo de intensidad relativamente baja con una frecuencia de emisión de unos 650 nm. En la década del 70 se introdujeron nuevos colores al espectro (verde, naranja y ámbar) así como LEDs infrarrojos. Sin embargo, no fue hasta 1993 cuando se desarrollaron los LEDs azules gracias a las tareas de investigación del científico Shuji Nakamura que descubrió un proceso barato de fabricación de LED azul con los compuestos Nitruro de Galio y nitruro de Indio. Este hecho dio paso al desarrollo del LED blanco a partir de LEDs azules con un recubrimiento de fósforo.

Las primeras aplicaciones de los LEDs fueron para su uso en mandos a distancia de televisores, equipos de música, etc. Más tarde fue aumentando su utilización y en la actualidad su uso está generalizado en dispositivos electrónicos, electrodomésticos, aplicaciones de control remoto, detectores, telefonía móvil, dispositivos de señalización, paneles informativos, alumbrado de pantallas de cristal líquido de teléfonos móviles, calculadoras, agendas electrónicas, etc. En el ámbito de la iluminación los LEDs blancos han sido desarrollados como una opción para sustituir las bombillas tradicionales, ya que presenta indudables ventajas, particularmente en cuanto al bajo consumo de energía, baja tensión, baja temperatura, mayor rapidez de respuesta y mayor vida útil. Un reciente artículo de Behar-Cohen et al (2011) indica que en los próximos años las fuentes de luz incandescente serán reemplazadas progresivamente por LEDs, estimándose su desaparición en Europa en septiembre de 2016[1]. Sin embargo, los principales problemas que plantean los LEDs que emiten luz blanca son deriva-

dos de su alto contenido de radiaciones de la banda del azul junto con la alta luminancia.

Es una evidencia científica que la luz azul (longitudes de onda corta) afecta negativamente a los ojos (retina). Clásicamente se han diferenciado tres tipos de lesiones producidas por la luz: por un lado las fotomecánicas (efectos de choque de las ondas luminosas), por otro, las fototérmicas (calor local producido por las ondas) y por último las fotoquímicas (cambios en las macromoléculas). Actualmente se conocen con bastante precisión los cambios en la retina inducidos por la luz [2,3].

Publicaciones recientes han evaluado los efectos tóxicos de la luz en cultivos de células del epitelio pigmentario de la retina [4,5]. Los objetivos principales de estos estudios han estado orientados a valorar la supervivencia celular de las células tras ser expuestas a radiaciones de luz. Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios que evalúen el efecto dañino de la luz en las estructuras oculares que produce la radiación emitida por el diodo LEDs, hecho de gran interés debido al elevado número de horas que una persona estará expuesto a lo largo de su vida a este tipo de fuentes de luz. Por ello, parece imprescindible su estudio en las zonas del cuerpo humano expuestas a ellas, es decir, los ojos y concretamente en la retina, la zona más vulnerable del ojo e imprescindible para la visión.

Portanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el daño inducido por la luz (fototoxicidad) en la retina in vitro de distintos diodos LEDs para conocer la repercusión en el sistema visual de las personas.

3. MATERIALES Y METODOLOGÍA

Emisor: Dispositivo de iluminación LED

Se ha diseñado un dispositivo de iluminación que consta de 6 zonas diferenciadas y separadas entre sí mediante barreras separadoras de material blanco. Cada una de las zonas contiene un LED que produce luz de irradiancia 5mW/cm² pero que emite luz de diferentes características espectrales: LED azul (468nm), LED verde (525nm), LED rojo (616nm), LED blanco T^a Color 5400K y LED Blanco T^a 6500K. La última zona estaba formada por un grupo control de células que no habían estado expuestas a la luz (Figura 1)

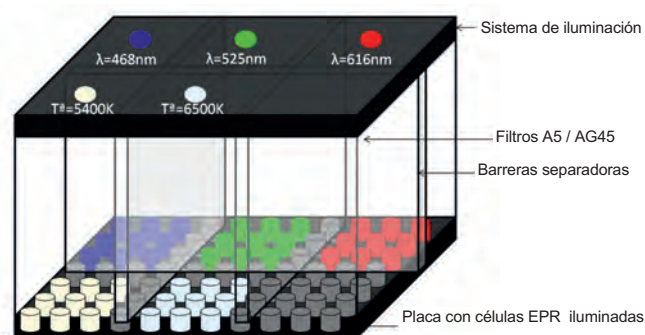


Figura 1. Esquema del sistema de iluminación LED utilizado en este estudio.

Receptor: Células del epitelio pigmentario de la retina

Se utilizaron células del epitelio pigmentario de la retina de donantes humanos sanos que crecieron en un medio de cultivo, indispensable para el cultivo in vitro de las células. Las células se colocaron en placas de 96 pocillos y sembraron a una densidad de 5000 células por pocillo. Para evitar evaporaciones por el desprendimiento de calor producido por la luz el medio de cultivo se reemplazó cada 24 horas. El epitelio pigmentario de la retina es una capa de células con forma hexagonal que es esencial para el procesamiento visual y que su alteración conduce a la degeneración retiniana, disminución de la función visual e incluso ceguera.

Experimento de fototoxicidad

Las células del epitelio pigmentario de la retina fueron expuestas a las diferentes fuentes de luz durante 3 ciclos de luz/oscuridad (12 horas / 12 horas). Una vez concluida la exposición, las células fueron tratadas con tratamientos específicos de valoración de toxicidad y fueron observadas mediante microscopía de fluorescencia (BD Pathway 855, Becton, Dickinson and Company).

Para cuantificar la supervivencia celular se utilizó tinte DAPI, una técnica especialmente adecuada para el recuento celular que consiste en un colorante que tiñe los núcleos celulares y que se excita con luz ultravioleta para producir una fuerte fluorescencia azul cuando se encuentra unido al ADN.

El indicador utilizado para valorar la muerte celular inducida por la luz (apoptosis) fue la activación de las caspasas 3-7, ya que estas enzimas están implicadas en la regulación y en la ejecución de la apoptosis.

Tratamiento estadístico

Cada experimento se repitió al menos 2 veces. Los valores son dados como media \pm desviación estándar. Los datos fue-

ron analizados utilizando el test estadístico t-student con el software estadístico Statgraphics version Centurion XVI.I (USA). Se consideraron valores significativos p-valores menores a 0.05.

4. RESULTADOS

Supervivencia celular

Tras el periodo de exposición durante 3 ciclos de luz/oscuridad (12 horas / 12 horas), los núcleos de las células del epitelio pigmentario de la retina se tiñeron con DAPI para contar el número de células por pocillo.

Las células no irradiadas crecieron bien en los pocillos, sin embargo la irradiación con luz LED inhibió el crecimiento de las células. La luz azul produjo una disminución muy significativa del número de células, aunque también se observó el efecto fototóxico para la luz verde y blanca. En el caso de la luz roja no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 2).

Apoptosis (muerte celular inducida por la luz)

La activación de las caspasas 3-7 fue el indicador utilizado para valorar la muerte celular inducida por la luz, ya que estas enzimas están implicadas en los mecanismos de apoptosis.

Los experimentos mostraron que la exposición a la luz aumenta el porcentaje de células apoptóticas para todas las fuentes de luz LED, sobre todo en las células expuestas a luz azul y blanca, en las que se produjo un aumento del 92% y 94% de las células apoptóticas respectivamente. En las imágenes mediante microscopía se observa la activación de las caspasas como una coloración rosada alrededor del núcleo teñido azul con DAPI. (Figura 3)

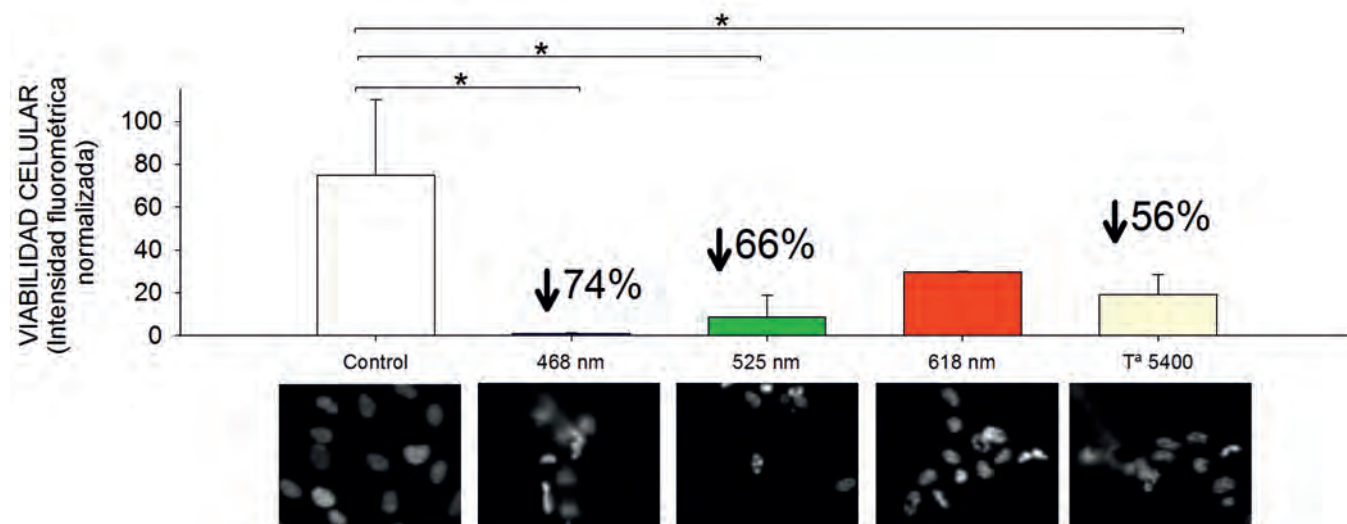


Figura 2. Supervivencia celular de las células del epitelio pigmentario de la retina. Gráfico representativo de media \pm desviación estándar de $n=3-5$ experimentos e imágenes representativas obtenidas mediante microscopía de fluorescencia. El asterisco (*) indica diferencias estadísticas cuando se compara con el control ($p > 0.05$, test t-student).

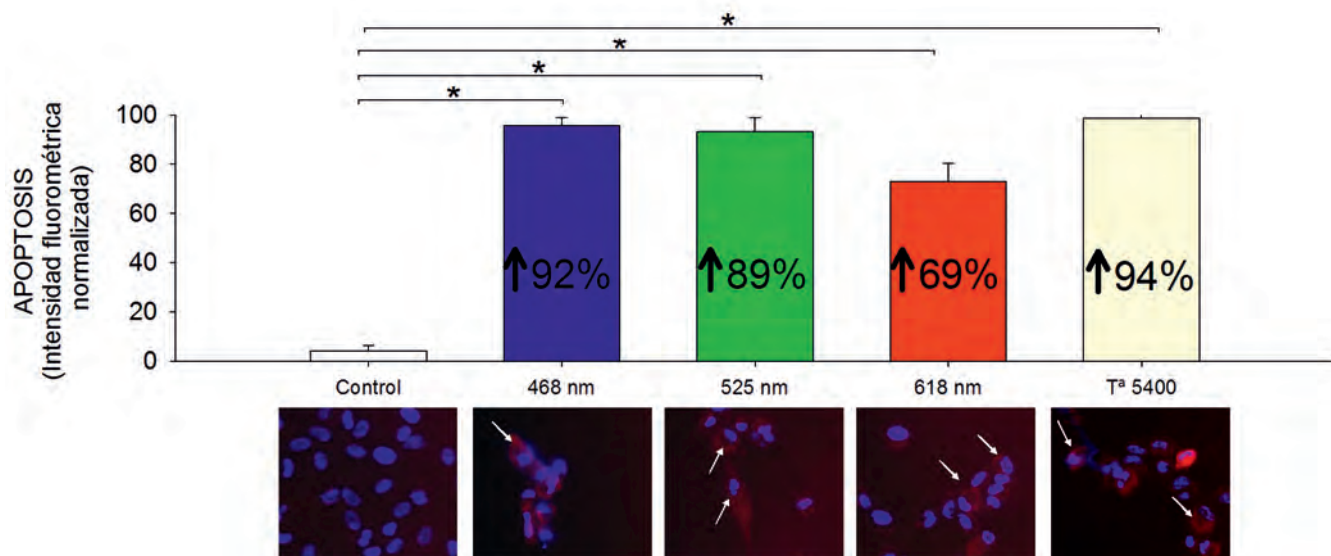


Figura 3. Muerte celular inducida por la luz determinada por la activación de las caspasas -3, -7. Gráfico representativo de media \pm desviación estándar de $n=3-5$ experimentos e imágenes representativas obtenidas mediante microscopía de fluorescencia. El asterisco (*) indica diferencias estadísticas cuando se compara con el control ($p>0.05$, test t-student).

5. DISCUSIÓN

Las primeras evidencias del daño que la luz produce en la retina humana se remontan a 1912 en Alemania cuando miles de individuos sufrieron lesiones en la retina tras observar un eclipse solar[6]. Clásicamente, se han descrito dos bandas del espectro visible que provocan daños fototóxicos, una coincide con el espectro de absorción de la rodopsina y otra que alcanza el máximo daño en la región de longitud de onda corta (lo que proporciona la base para el concepto de riesgo de luz violeta-azul). Consecuentemente, se han propuesto dos mecanismos de daño fotoquímico en la retina, el propuesto por Noell en 1965 y el propuesto por Ham en 1976. En la tabla 1 se exponen sus características diferenciales[7-9].

Tabla 1. Características diferenciales de los mecanismos de daño fotoquímico en la retina propuestos por Noell en 1965 y Ham en 1976.

Tipo I o tipo azul-verde o tipo Noell	Tipo II o tipo UV-azul o tipo Ham
Producido tras largas exposiciones a bajas intensidades de luz ($<1\text{MW}/\text{cm}^2$)	Producido tras cortas exposiciones a altas intensidades de luz ($>10\text{MW}/\text{cm}^2$)
Daño inicial localizado en los fotorreceptores	Daño inicial localizado en las células del epitelio pigmentario de la retina
Longitudes de onda que producen mayor daño: equivalente al espectro de absorción del pigmento visual.	Longitudes de onda que producen mayor daño: longitudes de onda más cortas

Werner et al (1989) describieron diferentes grados de daño en las células del epitelio pigmentario de la retina en pacientes cuyos ojos tenían que ser enucleados y que voluntariamente miraron al sol. Sin embargo, no mostraron importantes alteraciones en los fotorreceptores, lo que explica la buena visión tras la exposición[10]. El epitelio pigmentario de la retina se regenera rápidamente, sin embargo, los fotorreceptores comienzan un proceso de degeneración llegando incluso a su desaparición después de la exposición lumínica[11].

En los últimos años, diversas publicaciones se han centrado en valorar los efectos fototóxicos de la luz en cultivos de células del epitelio pigmentario de la retina. Los objetivos principales de estos estudios se han orientado a la valoración de la supervivencia celular de las células epiteliales tras ser expuestas a la luz. Sin embargo, en algunos estudios se valoraron también otros parámetros como la actividad mitocondrial, el daño en el ADN, los niveles de factor de crecimiento endotelial y otros aspectos destacables.

Por ejemplo, en los trabajos de Godley et al (2005) se irradiaron cultivos celulares con luz compuesta de longitudes de onda entre 390-550 nm, cuya irradiancia fue de $2.8\text{mW}/\text{cm}^2$, el tiempo de exposición osciló en un intervalo entre 0-9 horas. Sus resultados mostraron que tras 3 horas de la exposición lumínica no existían diferencias en la supervivencia celular, pero sin embargo tras 6-9 horas apreciaron una significativa disminución de la respiración mitocondrial. También observaron existía un aumento de producción de especies reactivas al oxígeno tras 1 hora de exposición, que continuó hasta las 6 horas de exposición lumínica, y daño en el ADN tras 3 horas de exposición que disminuía a las 6 horas, indicando el inicio de reparación del ADN (respuesta adaptativa)[4].

Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios que hayan evaluado el efecto fototóxico de la radiación emitida por el diodo LEDs en células retinianas. En nuestro estudio se ha va-

lorado la supervivencia celular y la muerte celular inducida por la luz del epitelio pigmentario de la retina producido por luz LED de medias intensidades de luz (5mW/cm²). Los resultados de nuestros experimentos muestran una importante disminución de la supervivencia celular asociado a un aumento de la muerte celular inducida por la luz, siendo este daño fototóxico más importante para las luces de menor longitud de onda.

Es de reseñar que la norma EN 62471 ha clasificado las fuentes de iluminación según el riesgo fototóxico (desde la radiación ultravioleta a la radiación infrarroja) y acorde al máximo tiempo de exposición permitido establece 4 grupos de riesgo:

- Riesgo 0 (sin riesgo) cuando el límite máximo de exposición es superior a 10000 segundos
- Riesgo 1 (bajo riesgo) cuando el límite máximo de exposición está entre 100 y 10000 segundos
- Riesgo 2 (riesgo moderado) cuando el límite máximo de exposición está entre 0,25 y 100 segundos
- Riesgo 3 (alto riesgo) cuando el límite de máximo de exposición es menor a 0,25 segundos.

Acorde a esta normativa, Behar-Cohen indicó que un LED azul con una intensidad superior a 15W pertenece al grupo de riesgo 3 y si la intensidad de la luz es 0.07W pertenece al grupo 1, siendo las fuentes de iluminación LED de uso cotidiano para público general clasificadas como grupo de riesgo 2 (en comparación con las fuentes de iluminación convencionales que pertenecen al grupo 0 o 1) Por otro lado, describió que la cantidad de luz azul emitida por un LED blanco es aproximadamente un 20% superior que la luz del día de las mismas características en cuanto a temperatura de color [1].

6. CONCLUSIÓN

La exposición a luz LED durante ciclos de luz/oscuridad (12 horas / 12 horas), sobre todo las bandas de luz de menores longitudes de onda, produce daños en células del epitelio pigmentario de la retina. Futuros estudios son necesarios para determinar las intensidades, longitudes de onda y tiempos de exposición de los dispositivos de iluminación LED que son letales y no letales para los tejidos retinianos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Behar-Cohen F, Martinsons C, Vienot F, Zissis G, Barlier-Salsi A, Cesarini JP, Enouf O, Garcia M, Picaud S, Attia D: Light-emitting diodes (led) for domestic lighting: Any risks for the eye? *Prog Retin Eye Res* 2011;30:239-257.
- 2 Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, Reme CE: Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2005;24:275-306.
- 3 Wu J, Seregard S, Algvere PV: Photochemical damage of the retina. *Surv Ophthalmol* 2006;51:461-481.
- 4 Godley BF, Shamsi FA, Liang FQ, Jarrett SG, Davies S, Boulton M: Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *J Biol Chem* 2005;280:21061-21066.
- 5 Sparrow JR, Miller AS, Zhou J: Blue light-absorbing intraocular lens and retinal pigment epithelium protection in vitro. *J Cataract Refract Surg* 2004;30:873-878.
- 6 Postel EA, Pulido JS, Byrnes GA, Heier J, Waterhouse W, Han DP, Mieler WF, Guse C, Wipplinger W: Long-term follow-up of iatrogenic phototoxicity. *Arch Ophthalmol* 1998;116:753-757.
- 7 Noell WK: Aspects of experimental and hereditary degeneration; in Graymore C (ed): *Biochemistry of the retina*. London, Academic Press, 1965, pp 51-72.
- 8 Ham WT, Jr., Ruffolo JJ, Jr., Mueller HA, Clarke AM, Moon ME: Histologic analysis of photochemical lesions produced in rhesus retina by short-wave-length light. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978;17:1029-1035.
- 9 Ham WT, Mueller HA, Sliney DH: Retinal sensitivity to damage from short wavelength light. *Nature* 1976;260:153-155.
- 10 Werner JS, Steele VG, Pfoff DS: Loss of human photoreceptor sensitivity associated with chronic exposure to ultraviolet radiation. *Ophthalmology* 1989;96:1552-1558.
- 11 Tso MO, La Piana FG: The human fovea after sungazing. *Trans Sect Ophthalmol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1975;79:OP788-795.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este proyecto. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.