

MODELADO MATEMÁTICO Y SIMULACIÓN COMPUTACIONAL DE LOS EFECTOS DE LA LLLT EN LA PROLIFERACIÓN DE OSTEÓBLASTOS

Brenda Lizbeth Arroyo-Reyes^a, Ricardo Agustín-Serrano^b, Plácido Zaca-Morán^c, Fabián Galindo-Ramírez^a, Marco A. Morales^d

^aInstituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla C.P. 72570, México. brenda.arroyore@alumno.buap.mx

^bFacultad de Ciencias Físico Matemáticas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla C.P. 72570, México. ricardo.agustin@correo.buap.mx

^cInstituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla C.P. 72050, México. placido.zaca@correo.buap.mx

^dFacultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla C.P. 72570, México. fabian.galindo@correo.buap.mx

RESUMEN

La terapia láser de bajo nivel (LLLT, Low-Level Laser Therapy) ha mostrado efectos biomoduladores sobre diversos tipos de células, incluidos los osteoblastos, lo que se establece como un coadyuvante en los procesos de reparación del tejido óseo. Sin embargo, los mecanismos moleculares y biofísicos que regulan su acción permanecen parcialmente comprendidos, particularmente en contextos de regeneración ósea. En el presente estudio se evaluó la respuesta proliferativa de osteoblastos murinos en cultivo tras la aplicación de LLLT con una densidad de energía de 10 J/cm² por sesión, administrada en tres exposiciones intermitentes (dosis total: 30 J/cm²) a intervalos de 24, 48 y 96 h.

Los resultados experimentales mostraron un incremento en la proliferación celular, indica la activación de rutas asociadas a la regeneración ósea y la modulación del metabolismo en osteoblastos. Con base en estos resultados, se desarrolló un modelo matemático tipo Gray–Scott que incorpora la dinámica de señalización inducida por LLLT, proporcionando un marco teórico para la descripción y optimización de su efecto biológico. En conjunto, los resultados obtenidos indican que la LLLT constituye una alternativa terapéutica no invasiva con capacidad para favorecer la reparación y regeneración del tejido óseo.

Palabras clave: LLLT, láser, remodelación ósea, modelo - Gray-Scott, migración celular

ABSTRACT

Low-level laser therapy (LLLT) has shown biomodulatory effects on various cell types, including osteoblasts, establishing itself as a coadjuvant in bone tissue repair processes. However, the molecular and biophysical mechanisms that regulate its action remain partially understood, particularly in bone regeneration contexts. In this study, the proliferative response of murine osteoblasts in culture was evaluated after LLLT application with an

energy density of 10 J/cm² per session, administered in three intermittent exposures (total dose: 30 J/cm²) at intervals of 24, 48, and 96 h.

The experimental results showed an increase in cell proliferation, indicating the activation of pathways associated with bone regeneration and the modulation of osteoblastic metabolism. Based on these results, a Gray–Scott-type mathematical model was developed, incorporating the signaling dynamics induced by LLLT and providing a theoretical framework for describing and optimizing its biological effect. Overall, the results obtained indicate that LLLT constitutes a noninvasive therapeutic alternative with the potential to promote bone tissue repair and regeneration.

Keywords: LLLT, laser, bone remodeling, Gray-Scott model, cellular migration

1 INTRODUCCIÓN

Los fenómenos biológicos complejos, como la proliferación celular, pueden describirse mediante modelos matemáticos de reacción-difusión. Entre ellos destaca el sistema de Gray–Scott [1, 2], el cual describe patrones espacio-temporales derivados de mecanismos de autoactivación y retroalimentación inhibitoria.

Particularmente, la modelación matemática de la proliferación de osteoblastos permite evaluar los efectos de terapias no invasivas como la terapia láser de baja intensidad (LLLT), basada en fotobiomodulación que induce respuestas celulares sin generar aumento térmico en los tejidos tratados [3].

Las longitudes de onda empleadas en las terapias de LLLT abarcan el rango de 600 a 1100 nm, con potencias de salida entre 1 y 500 mW y densidades de energía de 0.1 a 100 J/cm². Estas condiciones promueven de manera dependiente de la dosis y el tiempo de exposición la proliferación celular, la síntesis de ATP, la diferenciación osteoblástica y la migración celular. Dichos efectos se atribuyen a la estimulación de la actividad mitocondrial y a la inducción de la diferenciación de osteoblastos, sin comprometer la viabilidad celular [4-6].

La implementación de modelos de tipo reacción-difusión, como el sistema de Gray–Scott, permite simular dinámicas colectivas de poblaciones celulares bajo estímulos externos, integrando la difusión espacial de señales bioquímicas con las interacciones locales entre células [1]. Estos modelos ofrecen un marco teórico para evaluar, mediante simulación computacional, cómo los parámetros físicos de la LLLT (energía, tiempo o frecuencia de irradiación) influyen en la densidad de osteoblastos, guiando el diseño de estrategias terapéuticas para la regeneración ósea.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de la terapia láser de bajo nivel (LLLT) sobre la proliferación de osteoblastos murinos en cultivo, y desarrollar un modelo matemático fundamentado en la dinámica de Gray–Scott que describa e interprete los efectos inducidos en la proliferación celular inducida por la irradiación. Este enfoque busca establecer un marco teórico que contribuya a la optimización de la aplicación de la LLLT en los procesos de regeneración del tejido óseo.

2. METODOLOGÍA

2.1 Proliferación celular

El efecto de la LLLT sobre la capacidad proliferativa celular se evaluó mediante un ensayo *in vitro* con osteoblastos murinos cultivados bajo condiciones controladas. Las células se mantuvieron en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con alta concentración de glucosa, suplementado con ácido ascórbico (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y suero fetal bovino (SFB) al 0.2 %, condiciones que favorecen la viabilidad y la actividad osteoblástica. Las células se mantuvieron incubadas a una temperatura de 37°C, en una atmosfera controlada de 5% de CO_2 .

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos, con una densidad de 2,500 células por pozo en un volumen final de 200 μL de medio de cultivo. Los ensayos incluyeron dos grupos experimentales: un grupo control sin tratamiento y otro irradiado con LLLT.

La Figura 1 presenta el diagrama experimental correspondiente a la aplicación de la terapia LLLT en cultivos de osteoblastos murinos, junto con el esquema de las variables empleadas en el modelo matemático utilizado para la simulación. El grupo experimental fue sometido a tres sesiones de irradiación láser, cada una con una exposición continua de 300 s. La emisión fue conducida mediante un colimador de fibra óptica que dirigió el haz hacia las muestras celulares, mientras que un medidor de potencia calibrado permitió monitorear de manera continua la intensidad de salida, garantizando que la dosis administrada se mantuviera constante a lo largo de todo el protocolo (Figura 1a).

La LLLT se realizó con un láser infrarrojo de 970 nm (modelo BWF-970-450E/55373, B&W Tek, Inc., EE. UU.), con una potencia de salida de 7.58 mW. La densidad de energía aplicada fue de 10 J/cm^2 por sesión sobre un área de 0.22 cm^2 , con un tiempo de exposición de 300 s por sesión, alcanzando una dosis total acumulada de 30 J/cm^2 al finalizar el tratamiento. La proliferación celular se evaluó a las 24, 48 y 96 horas posteriores a irradiación.

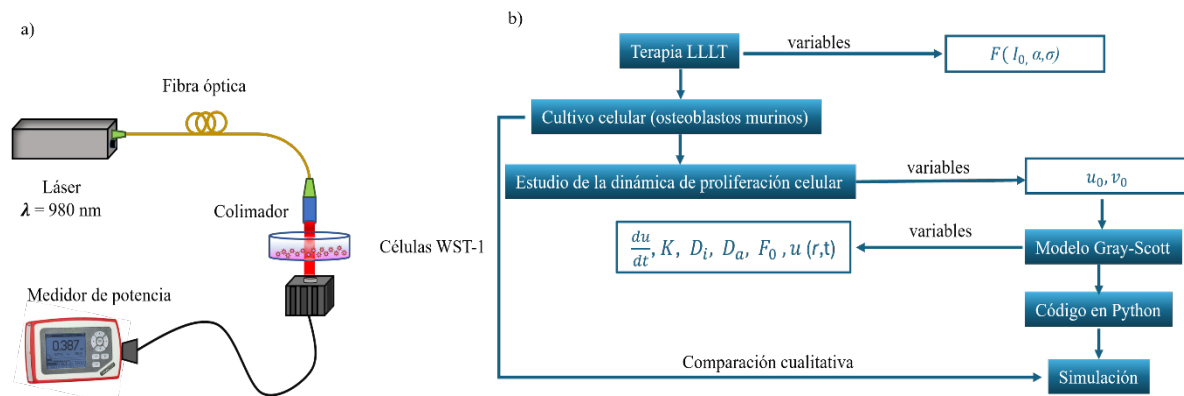


Figura 1. Diagrama experimental a) de la LLLT utilizando un láser de 970 nm sobre cultivos de osteoblastos murinos. b) del modelo matemático propuesto para describir la proliferación osteoblástica bajo terapia LLLT

La cuantificación de la proliferación celular se realizó mediante el ensayo WST-1 (WST-1 Cell Proliferation Assay Kit, 12352200; Roche, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia resultante, proporcional a la actividad metabólica de las células viables, fue medida por espectrofotometría utilizando un lector de microplacas ELISA (Filter Max F5, Molecular Devices). Cada grupo experimental se realizó por triplicado, y cada condición fue analizada en tres réplicas independientes.

2.2 Modelo matemático

El modelo matemático bidimensional de reacción-difusión se desarrolló a partir del sistema de Gray-Scott para simular la dinámica de proliferación de osteoblastos estimulados por LLLT (Ver Figura 1b). El modelo considera la interacción entre una especie activadora, asociada a la proliferación celular, y una inhibidora, acopladas mediante difusión espacial. La ecuación diferencial se modificó para incluir una fuente espacial gaussiana que representa el estímulo láser aplicado sobre una región del cultivo (0.22 cm^2), afectando los parámetros cinéticos de alimentación y eliminación.

El análisis del impacto de la LLLT sobre la dinámica de proliferación de osteoblastos murinos se implementó mediante una modificación del modelo de Gray-Scott que incorpora una fuente espaciotemporal de energía para representar la irradiancia. Este estímulo se modeló como un término gaussiano, siguiendo el enfoque propuesto por Yoon et al. [7] con el objetivo de capturar la distribución espacial y temporal del láser sobre el cultivo celular. Los parámetros empleados en la simulación se definen en la ecuación (1):

$$F(I_0, \alpha, \sigma) = I_0 \alpha e^{\left(-\alpha z - \frac{r^2}{2\sigma^2}\right)} + F_0, \quad (1)$$

donde la tasa de alimentación $F_0=0.02$, la intensidad láser $I_0=0.005$ desviación estándar espacial del estímulo $\sigma=0.005$, el factor de atenuación $\alpha = 1 \times 10^{-8}$ y r es la distribución espacial radial.

La adaptación del modelo permite representar la distribución del estímulo inducido por el láser en el tejido, considerando su dispersión espacial y su aplicación intermitente en el tiempo. Esta modificación ajusta los parámetros de alimentación F y eliminación K en el sistema de Gray-Scott. Las ecuaciones (2) y (3) que describen la dinámica de las concentraciones de dos especies reactivas representadas por u (asociada a la densidad celular de osteoblastos) y v (factor inhibidor), considerando términos de difusión D_u , interacción no lineal uv^2 , alimentación de irradiación F y eliminación K fueron basadas en el trabajo publicado de Pearson et al. [8]. Y constituyen la base del sistema de reacción-difusión (activador – inhibidor):

$$\frac{du}{dt} = D_u \nabla^2 u - uv^2 + F(1 - u) + \beta F(I_0, \alpha, \sigma), \quad (2)$$

$$\frac{dv}{dt} = D_v \nabla^2 v + uv^2 - (F + K)v, \quad (3)$$

La inclusión del término F definido en la ecuación (1), permite representar el estímulo biofísico generado por la irradiación, produciendo una modulación local de los valores basales F_0 . Este estímulo externo, aplicado de forma cíclica en los tiempos experimentales (24, 48 y 96 h), se dimensiona mediante el coeficiente de conversión β , el cual traduce la energía óptica en una perturbación externa sobre el sistema. Esta formulación permite reproducir la influencia intermitente y periódica del láser y facilita la extrapolación de los resultados numéricos hacia condiciones biológicas.

Las ecuaciones (2) y (3) conforman un sistema extendido que permite analizar la evolución espacio-temporal de la proliferación de osteoblastos murinos bajo la influencia de pulsos periódicos de LLLT. En la simulación se utilizaron los siguientes parámetros iniciales: tasa de alimentación $F_0 = 0.02$, tasa de eliminación $K = 0.06$, coeficiente de difusión del activador $D_a = 2 \times 10^{-5}$ y del inhibidor $D_i = D_a/2$. La intensidad del láser fue $I_0 = 0.005$, con desviación estándar espacial $\sigma = 0.05$ y factor de atenuación $\alpha = 1 \times 10^{-8}$. Las concentraciones iniciales se fijaron en $u_0 = 1$ para los osteoblastos y $v_0 = 0$ para el componente inhibidor, con una condición aleatoria localizada definida por $u_{0l} = 0.5$ y $v_{0l} = 0.25$, estos valores se basan en los puntos fijos del modelo Gray-Scott.

La simulación se ejecutó con discretización por diferencia finita para la difusión, y el método de Euler para la derivada temporal, desde $t_0 = 0$ hasta $t_f = 10000$ con paso $\Delta t = 0.5$, utilizando una malla espacial de $l = 128$ puntos (espaciado $h = 2.5/l$). Con esta configuración, se analizó la respuesta proliferativa de los osteoblastos a la estimulación de irradiación intermitente y periódica, considerando una distribución inicial homogénea en todo el dominio.

3. RESULTADOS

Figura 2 muestra los resultados obtenidos mediante la simulación del modelo Gray-Scott en 2D, donde se observan patrones de reacción-difusión que representan la evolución de la densidad de osteoblastos. La variable activadora u genera manchas localizadas de alta concentración (colores cálidos) rodeadas por regiones de baja concentración (colores fríos). Las áreas rojas indican focos de elevada densidad celular, mientras que las zonas azules corresponden a equilibrio o baja actividad proliferativa. Estos patrones se modifican al introducir una fuente localizada que simula la irradiación LLLT: la variable u alcanza su máximo en la región estimulada y disminuye gradualmente con la distancia, generando un patrón concéntrico y una ruptura de simetría en el sistema. Este comportamiento refleja un aumento local de la densidad de osteoblastos, coherente con las observaciones experimentales cerca del área irradiada, y reproduce cualitativamente el efecto de bioestimulación inducido por la LLLT.

Los resultados experimentales y las simulaciones muestran una correspondencia cualitativa en las tres sesiones analizadas. En la primera, tanto el grupo control como el irradiado con LLLT presentan baja densidad celular y escasa confluencia, reflejada en el modelo como una distribución homogénea con pocas regiones activadas. En la segunda sesión se observa un incremento moderado en la proliferación de osteoblastos en ambos grupos, más notable bajo LLLT, donde las células presentan una morfología más activa y orientada; el modelo

reproduce este comportamiento mediante un aumento de manchas naranjas concentradas alrededor del centro de la fuente simulada. En la tercera sesión, la diferencia entre condiciones se intensifica: el grupo control muestra una proliferación sostenida, mientras que la irradiación LLLT genera una alta confluencia celular y una distribución densa y uniforme. De manera concordante, la simulación presenta una activación casi completa del dominio, indicando un crecimiento expansivo de la población inducido por la fuente luminosa. Los resultados experimentales muestran que la LLLT favorece la proliferación de osteoblastos en comparación con el control en todos los tiempos evaluados, sin evidencias de citotoxicidad. A nivel computacional, la inclusión de una fuente localizada en el modelo Gray-Scott permite simular un estímulo espacial que reproduce el aumento localizado y progresivo de la densidad celular, con propagación hacia regiones periféricas.

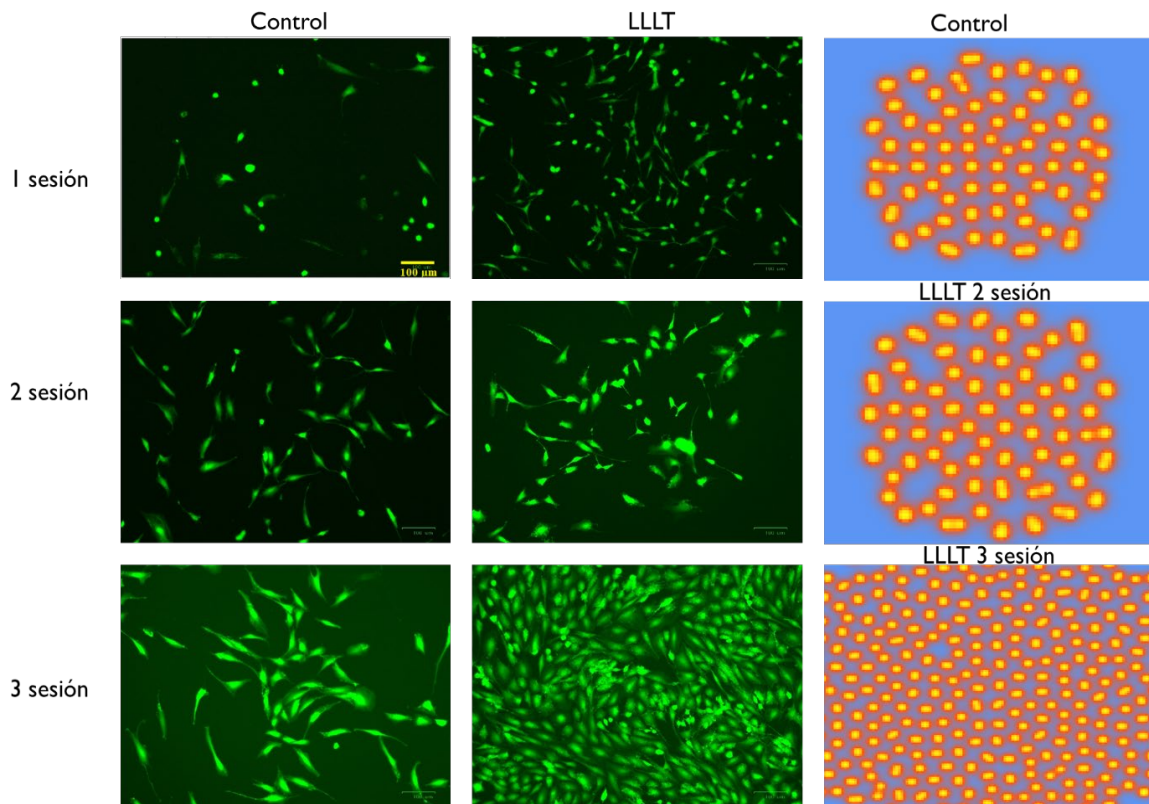


Figura 2. Micrografías de fluorescencia y simulaciones computacionales de cultivos de osteoblastos. Escala 100µm

La Figura 3 muestra los resultados experimentales de la proliferación celular obtenidos bajo dos condiciones, control y LLLT, evaluadas a las 24, 48 y 96 horas, así como los resultados de la simulación que describen la relación entre la función de frecuencia relativa y la escala temporal simulada para distintos tiempos de activación del estímulo LLLT. La Figura 3a muestra la evolución del número de células en función del tiempo (24, 48 y 96 horas) para las condiciones experimentales control y LLLT. El grupo tratado con LLLT (línea roja) presenta un incremento progresivo en el número de osteoblastos a lo largo del periodo de observación, reflejando que la irradiancia láser favorece la proliferación celular conforme avanza el tiempo. En contraste, el grupo control (línea negra) mantiene valores relativamente constantes, sin cambios apreciables entre las mediciones. Esta diferencia entre ambos grupos

confirma la influencia positiva de la estimulación lumínica en los procesos de división y crecimiento celular.

En el modelo matemático (Ver Figura 3b), la variable u representa la concentración relativa de osteoblastos, mientras que la variable v podría interpretarse como un recurso limitante o un factor regulador de la proliferación. La curva simulada de la concentración relativa de osteoblastos (“ u ”) presenta una tendencia crecientemente positiva a lo largo del tiempo, al igual que los datos experimentales del número de células con LLLT.

El análisis de la simulación muestra pequeñas inflexiones en la pendiente de la curva inmediatamente después de cada pulso de LLLT (a las 24, 48 y 96 h). Estas variaciones reflejan una aceleración momentánea de la tasa de crecimiento de “ u ” en respuesta al estímulo de irradiancia. En el modelo, cada pulso aumenta término de alimentación (F) o reduce la degradación (K), lo que se refleja en un ascenso más pronunciado posterior al estímulo. Este comportamiento es coherente con el patrón experimental, donde cada aplicación de LLLT genera un pico relativo de proliferación celular.

En conjunto, ambas graficas evidencian un crecimiento acumulativo tras cada sesión de irradiación, lo que demuestra un efecto fotobiomodulador de la LLLT. Este resultado concuerda con estudios previos, que reportan que la irradiación con láser de bajo nivel potencia la proliferación osteoblástica en cultivos celulares [9].

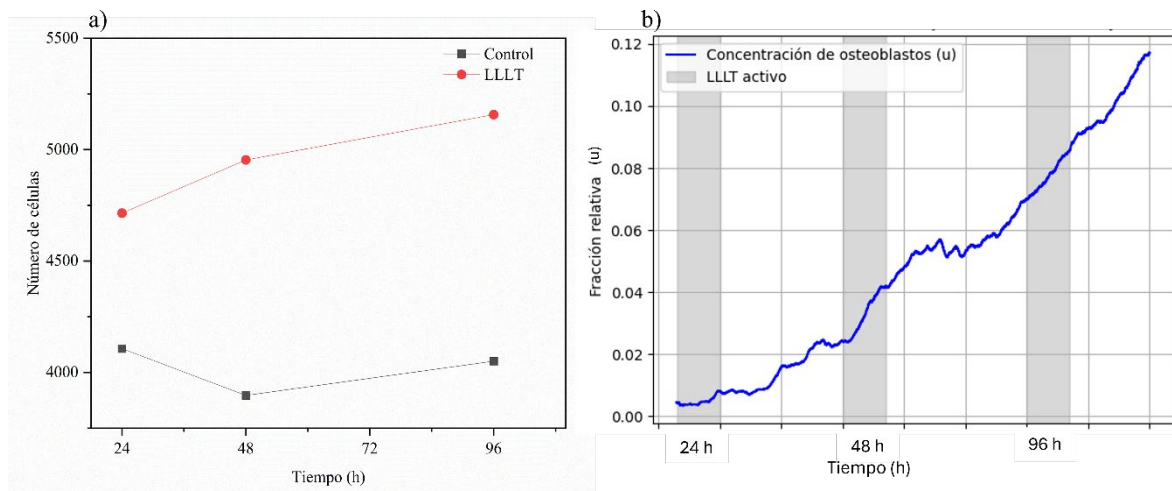


Figura 3. Comparación entre los resultados simulados y experimentales del efecto de la terapia LLLT sobre la proliferación osteoblástica. (a) Resultados experimentales del número de células cultivadas con y sin LLLT, mostrando una tendencia creciente en la condición irradiada, coherente con el comportamiento simulado. (b) Evolución temporal de la fracción relativa simulada de osteoblastos (u) bajo pulsos discretos de irradiación LLLT (zonas grises). Se observa un incremento sostenido asociado a los periodos de estimulación

La forma general de la curva simulada (una pendiente ascendente tras las aplicaciones de LLLT) es cualitativamente coherente con el incremento observado experimentalmente, indicando que el modelo reproduce adecuadamente la dirección del efecto estimulante sobre el crecimiento celular. Estudios de modelado de tejidos y hueso han mostrado resultados análogos: modelos reacción-difusión en el crecimiento óseo han producido distribuciones celulares similares a las fisiológicas reales [10]. No obstante, el modelo propuesto carece de detalles biológicos específicos (p. ej., etapas del ciclo celular, secreción de factores de

crecimiento), por lo que la magnitud exacta de la simulación puede diferir de los valores experimentales absolutos. En términos cualitativos, ambos sistemas (modelo y experimento) evidencian que la terapia LLLT incrementa la tasa de crecimiento celular, y esta coincidencia concordancia básica respalda la validez conceptual del modelo como representación esquemática coherente del fenómeno observado [2, 9].

4. CONCLUSIONES

En este trabajo se combinaron observaciones experimentales y modelación matemática para analizar el efecto proliferativo de la LLLT sobre osteoblastos murinos en cultivo. Las simulaciones del modelo de reacción-difusión de Gray-Scott modificado y los resultados *in vitro* mostraron una correspondencia cualitativa entre la estimulación láser y el aumento en la densidad celular. La inclusión de una fuente espacial gaussiana permitió reproducir patrones espacio-temporales asociados con la proliferación inducida por LLLT, demostrando la capacidad del modelo para representar el efecto estimulador. El análisis conjunto de micrografías y curvas de proliferación mostro que la LLLT promueve un crecimiento celular superior al del control, sin indicios de citotoxicidad. En conjunto, los resultados destacan el potencial de la simulación computacional como herramienta para optimizar protocolos de estimulación luminosa en procesos de regeneración ósea.

5. REFERENCIAS

- [1]. Hao, W. and C.J.J.o.m.b. Xue, *Spatial pattern formation in reaction–diffusion models: a computational approach*. 2020. **80**(1): p. 521-543. doi.org/10.1007/s00285-019-01462-0
- [2]. Landge, A.N., et al., *Pattern formation mechanisms of self-organizing reaction-diffusion systems*. 2020. **460**(1): p. 2-11. doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.10.031
- [3]. Glass, G.E.J.J.o.P., Reconstructive and A. Surgery, *Photobiomodulation: A review of the molecular evidence for low level light therapy*. 2021. **74**(5): p. 1050-1060. doi.org/10.1016/j.bjps.2020.12.059
- [4]. Crous, A. and H. Abrahamse, *The signalling effects of photobiomodulation on osteoblast proliferation, maturation and differentiation: a review*. Stem Cell Reviews and Reports, 2021: p. 1-20. doi.org/10.1007/s12015-021-10142-w
- [5]. Garzón, J., et al., *Response of osteoblastic cells to low-level laser treatment: a systematic review*. 2022. **37**(8): p. 3031-3049. doi.org/10.1007/s10103-022-03587-z
- [6]. Bai, J., et al., *Low level laser therapy promotes bone regeneration by coupling angiogenesis and osteogenesis*. 2021. **12**(1): p. 432. doi.org/10.1186/s13287-021-02493-5
- [7]. Yoon, J.-H., J.-W. Park, and J.-I.J.J.o.K.P.T. Youn, *Numerical Analysis of the Wavelength Dependence in Low Level Laser Therapy (LLLT) Using a Finite Element Method*. 2010. **22**(6): p. 77-84.
- [8]. Pearson, J.E.J.S., *Complex patterns in a simple system*. 1993. **261**(5118): p. 189-192. [doi: 10.1126/science.261.5118.189](https://doi.org/10.1126/science.261.5118.189)

- [9]. Wang, L., et al., *The effect of low-level laser irradiation on the proliferation, osteogenesis, inflammatory reaction, and oxidative stress of human periodontal ligament stem cells under inflammatory conditions*. 2022. **37**(9): p. 3591-3599. doi.org/10.1007/s10103-022-03638-5
- [10]. Buenzli, P.R., et al., *Cell proliferation and migration explain pore bridging dynamics in 3D printed scaffolds of different pore size*. 2020. **114**: p. 285-295. doi.org/10.1016/j.actbio.2020.07.010