

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Óptica con orientación en Óptica física**

**Estudio de la fotobiomodulación en huevos de mosquito de *Aedes
aegypti*.**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

Presenta:

Alba Daniela Rodríguez Pérez

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por

Alba Daniela Rodríguez Pérez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Jacob Licea Rodríguez
Codirector de tesis

Dr. Guillermo Daniel Jiménez Gómez
Codirector de tesis

Dra. Carolina Álvarez Delgado

Dr. Eugenio Rafael Méndez Méndez

Dr. Edvin Díaz Santiz

Dr. Israel Rocha Mendoza



Dra. Karina Garay Palmett
Coordinadora del Posgrado en Óptica

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Alba Daniela Rodríguez Pérez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Óptica con orientación en Óptica Física.

Estudio de la fotobiomodulación en huevos de mosquito de *Aedes aegypti*.

Resumen aprobado por:

Dr. Jacob Licea Rodríguez
Codirector de tesis

Dr. Guillermo Daniel Jiménez Gómez
Codirector de tesis

La fotobiomodulación (PBM), conocida como terapia láser de baja intensidad, es un fenómeno biofotónico que se da cuando se irradian seres vivos con luz roja o infrarroja por debajo del nivel de daño celular. En este trabajo se presentan resultados del efecto de la fotobiomodulación en el desarrollo de la capa externa (*exocorium*) de los huevos de mosquito de la especie *Aedes aegypti*, ante diversas condiciones de irradiación con luz láser. Para el desarrollo de este estudio se contó con la colaboración del CICESE en Ensenada, y la empresa Grupo Molecular en Tijuana. En donde recientemente, realizaron estudios para monitorear el proceso de desarrollo del *exocorium*, siendo menor a 90 minutos (a 28°C), pasando de una tonalidad semitransparente, en su etapa inicial, a una tonalidad más opaca en su etapa madura. Bajo este contexto, la motivación del presente trabajo busca investigar cómo la irradiación de luz infrarroja cercana afecta el desarrollo del *exocorium* y evaluar su respuesta biológica utilizando microscopía óptica. Para el proceso de irradiación se emplearon tres longitudes de onda (785, 806 nm, 561 nm) y tiempos de irradiación de 10, 100, 500 segundos. El monitoreo de las muestras duró 3 horas a 21°C, y las imágenes se analizaron con un programa en desarrollado en Matlab. Nuestros hallazgos muestran que las densidades de energía que presentan un aceleramiento en el desarrollo del *exocorium*, en un tiempo de irradiación de 10 segundos para $\lambda=785$ nm fueron 0.0001, 0.001 y 0.0025 J/cm², para $\lambda=806$ nm fue 0.005 J/cm² y para $\lambda=561$ nm son 0.0025 y 0.005 J/cm². Con 100 segundos de irradiación, 0.05 J/cm² fue la densidad de energía más efectiva para todas las longitudes de onda. Para 500 segundos, $\lambda=785$ nm y $\lambda=806$ nm mostraron la menor diferencia de tiempo en densidades con valores de 0.05 y 0.05 J/cm², mientras que para $\lambda=561$ nm fue 0.125 y 0.25 J/cm². Esto se atribuye, a que la Citocromo c oxidasa tiene una mayor absorción en longitudes de onda del rojo e infrarrojo cercano (600-900 nm), como también la luz infrarroja tiene una mayor penetración en la muestra que la luz visible.

Palabras clave: Fotobiomodulación, terapia con láser de baja intensidad, *Aedes aegypti*, dinámica mitocondrial.

Abstract of the thesis presented by **Alba Daniela Rodríguez Pérez** as a partial requirement to obtain the Master of science degree in Optics with orientation in Physical Optics.

Study of photobiomodulation in *Aedes aegypti* mosquito eggs

Abstract approved by:

Dr. Jacob Licea Rodríguez
Thesis Co-Director

Dr. Guillermo Daniel Jiménez Gómez
Thesis Co-Director

Photobiomodulation (PBM), also known as low-level laser therapy, is a biophotonic phenomenon occurring when living organisms are irradiated with red or infrared light below the cellular damage threshold. This study presents results on the effect of photobiomodulation on the development of the outer layer (*exocorium*) of *Aedes aegypti* mosquito eggs under various laser light irradiation conditions. The collaboration of CICESE in Ensenada and Grupo Molecular in Tijuana was enlisted for this study. Recent investigations monitored the *exocorium* development process, which lasts less than 90 minutes (at 28°C), transitioning from a semitransparent hue in its initial stage to an opaquer tone in its mature stage. Within this context, this work aims to investigate how near-infrared light irradiation affects *exocorium* development and evaluate its biological response using optical microscopy. Three wavelengths (785 nm, 806 nm, 561 nm) and irradiation times of 10, 100, 500 seconds were employed. Sample monitoring lasted 3 hours at 21°C, with images analyzed using a Matlab-based program. Findings indicate that energy densities accelerating *exocorium* development within a 10-second irradiation period were 0.0001, 0.001, and 0.0025 J/cm² for $\lambda=785$ nm, 0.005 J/cm² for $\lambda=806$ nm, and 0.0025 and 0.005 J/cm² for $\lambda=561$ nm. A density of 0.05 J/cm² was most effective across all wavelengths with a 100-second irradiation. For 500 seconds, $\lambda=785$ nm and $\lambda=806$ nm showed minimal time differences in densities, with values of 0.05 J/cm², while for $\lambda=561$ nm, it was 0.125 and 0.25 J/cm². This is attributed to cytochrome c oxidase having higher absorption in red and near-infrared wavelengths (600-900 nm), and near-infrared light penetrating samples more effectively than visible light.

Keywords: Photobiomodulation, Low-level laser therapy, *Aedes aegypti*, mitochondrial dynamics.

Dedicatoria

A Sindy y Violeta, por brindarme tanto amor
y apoyo durante todos estos años.

Agradecimientos

Agradezco al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) como también al Grupo molecular, por brindarme el apoyo económico para realizar mis estudios de maestría

A toda mi familia y seres queridos por su incondicional apoyo, en especial a mi madre y padre por ser tan perseverantes y ayudarme a seguir este sueño, a mi hermano, hermana y sobrina por motivarme a contar a pesar de las adversidades. A mi abuela por regalarme sus experiencias de vida como lecciones de la mía.

A mis amigos y compañeros de maestría: Mafe, Napo, José, Lu, Juan y Jorge por ser esa red de apoyo durante este tiempo y por cada aporte para construir este proyecto de tesis.

A mis amigos Julio, Luchi y Tefa por escucharme y aconsejarme durante todo este tiempo. A Vivian, mi mejor amiga, gracias por ser mi confidente y apoyarme con tus miles de mensajes que me mantenían en pie.

A Ferney, infinitas gracias por tus enseñanzas y aprendizajes tanto personales como académicas, por tanta paciencia y amor mientras desarrollaba este proyecto.

A mis directores de tesis, el Dr. Jacob Licea y el Dr. Daniel Jiménez, por sus enseñanzas y sugerencias a lo largo de este trabajo. Por su paciencia, apoyo y total disposición cuando los necesité. A mis sinodales, por sus valiosos comentarios para mejorar este trabajo de tesis. Ellos son: Dra. Carolina Álvarez Delgado, Dr. Eugenio Méndez, Dr. Edwin Diaz, Dr. Israel Rocha.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Tabla de contenido	vi
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Justificación	3
1.2 Hipótesis	3
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
1.4 Estructura de la tesis	4
Capítulo 2. Antecedentes	6
2.1 Fotobiomodulación.....	6
2.2 Dispositivos y Aplicaciones de la Fotobiomodulación	9
2.3 Parámetros de irradiación: irradiancia y densidad de energía	10
2.4 Cantidad de luz infrarroja a partir de la Luz solar	11
Capítulo 3. Metodología.....	14
3.1 Preparación de muestras.	14

3.2 Extracción de muestras	14
3.3 Irradiación de muestras.....	16
3.4 Montaje experimental para la irradiación de 785 nm	17
3.5 Montaje experimental para la irradiación a 806 nm	19
3.6 Montaje experimental para la irradiación 561 nm	20
3.7 Adquisición, procesamiento y análisis de imágenes	20
Capítulo 4. Resultados	23
4.1 Determinación de los primeros parámetros de irradiación y descripción del procedimiento de análisis de resultados.	23
4.1.1 Determinación primeros parámetros de irradiación	23
4.1.2 Descripción del procedimiento de análisis de resultados.....	24
4.2 Resultados utilizando los primeros parámetros de irradiación.....	26
4.2.1 Primer conjunto de datos a 785 nm.....	26
4.2.1.1 Tiempo de irradiación: 10 segundos	26
4.2.1.2 Tiempo de irradiación: 100 segundos.....	27
4.2.1.3 Tiempo de irradiación: 500 segundos.....	29
4.2.1.4 Tiempo de irradiación: 1000 segundos.....	30
4.3 Determinación de los segundos parámetros de irradiación	31
4.4 Resultados utilizando los segundos parámetros de irradiación.....	32
4.4.1 Longitud de onda 785 nm	32
4.4.1.1 Tiempo de irradiación: 10 segundos.....	32
4.4.1.2 Tiempo de irradiación: 100 segundos.....	33
4.4.1.3 Tiempo de irradiación: 500 segundos.....	34
4.4.2 Longitud de onda 806 nm	35
4.4.2.1 Tiempo de irradiación: 10 segundos	35

4.4.2.2	Tiempo de irradiación: 100 segundos.....	36
4.4.2.3	Tiempo de irradiación: 500 segundos.....	37
4.4.3	Longitud de onda 561 nm	39
4.4.3.1	Tiempo de irradiación: 10 segundos.....	39
4.4.3.2	Tiempo de irradiación: 100 segundos.....	40
4.4.3.3	Tiempo de irradiación: 500 segundos.....	41
4.4.4	Discusión de resultados de los segundos parámetros.....	42
4.5	Análisis visual del desarrollo del <i>exocorium</i>	43
Capítulo 5.	Conclusiones	46
	Literatura citada	48
	Anexos	51

Lista de figuras

Figura	Página
1. Esquema general del desarrollo de la actividad celular debido a la técnica de fotobiomodulación. En la imagen: ATP: trifosfato de adenosina; ROS: especies de oxígeno reactivas; NO: Óxido nítrico.	1
2. Proceso de fotobiomodulación para diferentes rangos de longitud de onda y alcance de la penetración de cada una de ellas. En la imagen de derecha a izquierda el rango de longitudes de onda es: 900-1100nm (Infrarrojo cercano); (600-850nm) (luz roja, luz azul; luz verde). Imagen obtenida de (Salehpour et al., 2018).	7
3. a) Estructura de la membrana interna mitocondrial. En la imagen de derecha a izquierda el complejo I (NADH deshidrogenasa), complejo II (succinato deshidrogenasa), complejos III (Cytocromo bc1), IV (Cytocromo C Oxidasa (CCO)), complejo V (ATP sintasa). b) Estructura interna IV (Cytocromo C Oxidasa (CCO)). Imagen obtenida de (Salehpour et al., 2018).	9
4. Espectro solar de Radiación a partir de una cantidad de energía solar de 1353 W/m ²	13
5. Representación esquemática del proceso de extracción de huevos de mosquito <i>Aedes aegypti</i>	15
6. a) Montaje experimental 785 nm. b) Montaje experimental 785 nm con esfera integradora. En la imagen: NM: Nido de Monitoreo, NI: Nido irradiando, MD: Medidor de Potencia.	17
7. Montaje experimental 806 nm. En la imagen FDN1: Filtro de densidad neutra1; FDN2: Filtro de densidad neutra 2; PO: Polarizador; MP: Medidor de potencia.	19
8. Montaje experimental 561 nm. En la imagen E1, E2, E3: Espejos.	20
9. Última imagen como referencia para la selección de cada huevo.	21
10. Secuencia del análisis de las imágenes de como el huevo cambia de intensidad y como se marca cada pixel.	22
11. Niveles de oscuridad.	24
12. a) Datos obtenidos a partir de medir números de pixeles durante el tiempo de monitorio y su respetivo ajuste Savitzky–Golay. b) Primera derivada del ajuste savitzky–golay. c) segunda derivada del savitzky–golay. En la imagen Vmax: velocidad máxima; Tf= tiempo final del desarrollo del <i>exocorium</i> ; To: tiempo inicial del desarrollo del <i>exocorium</i> , ΔT : diferencia de tiempos entre tiempo final y tiempo inicial del desarrollo del <i>exocorium</i>	25
13. Primer conjunto 785 nm con un tiempo de irradiación de 10 seg. En la imagen Tf= tiempo final del desarrollo del <i>exocorium</i> ; To: tiempo inicial del desarrollo del <i>exocorium</i> , ΔT : Diferencia de tiempos entre tiempo final y tiempo inicial del desarrollo del <i>exocorium</i>	27

26. Diferente desarrollo visual del <i>exocorium</i> de los huevos. Desarrollo de polo a polo (PP); Desarrollo desde el centro a uno de los polos (CP1P2); Desarrollo uniforme desde el centro hasta los dos polos (CPP). En la imagen el círculo azul señala el inicio.	44
27. Número de huevos que presenta cada una etiqueta de desarrollo para cada una de las diferentes longitudes de onda. En la gráfica: (PP) desarrollo de polo a polo; (CP ₁ P ₂) desarrollo desde el centro a uno de los polos; (CPP) Desarrollo uniforme desde el centro hasta los dos polos.	45
28. Diagrama de flujo del programa de análisis de imágenes.	51
29. Código del programa.....	54

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Primeros parámetros de irradiancia.	23
2.Datos obtenidos primer conjunto 785 nm para un tiempo de irradiación de 10 segundos.	27
3.Datos obtenidos primer conjunto 785 nm para un tiempo de irradiación de 100 segundos.	28
4.Datos obtenidos primer conjunto 785 nm para un tiempo de irradiación de 500 segundos.	29
5.Datos obtenidos primer conjunto 785 nm para un tiempo de irradiación de 1000 segundos. ...	30
6.Segundos parámetros de irradiancia.	32
7.Datos obtenidos para 785 nm para un tiempo de irradiación de 10 segundos.	32
8.Datos obtenidos para 785 nm para un tiempo de irradiación de 100 segundos.	33
9.Datos obtenidos para 785 nm para un tiempo de irradiación de 500 segundos.	34
10. Datos obtenidos para 806 nm para un tiempo de irradiación de 10 segundos.....	36
11.Datos obtenidos para 806 nm para un tiempo de irradiación de 100 segundos.	37
12.Datos obtenidos para 806 nm para un tiempo de irradiación de 500 segundos.	37
13.Datos obtenidos para 561 nm para un tiempo de irradiación de 10 segundos.	39
14.Datos obtenidos para 561 nm para un tiempo de irradiación de 100 segundos.	40
15.Datos obtenidos para 561 nm para un tiempo de irradiación de 500 segundos.	41

Capítulo 1. Introducción

Indudablemente en la actualidad el uso de diversas técnicas basadas en procesos óptico-físicos son de gran relevancia en diversas áreas de las ciencias de la vida tales como las medicina y la biología. Una de estas técnicas es la fotobiomodulación (PBM, por sus siglas en inglés), descubierta en la década de los 1960 por Endre Mester (Mester et al., 1968; Hamblin, 2016), que permite estimular y/o inhibir procesos celulares como consecuencia de irradiación de luz con parámetros controlados. Inicialmente, sus estudios se centraron en la aplicación de incidir luz infrarroja en ratones, a los cuales se les habían implantado células cancerígenas. Sin embargo, a medida que avanzaba la investigación no se observó una reducción de estas células, sino más bien una mejora en la capa superficial de la piel; es decir se observó una cicatrización y recuperación en las áreas donde se encontraban las incisiones o heridas causadas por dichas implantaciones (Winkler, 2019). Estas observaciones marcaron el inicio de una serie de pruebas continuas hasta demostrar que es posible utilizar de forma clínica la radiación de luz infrarroja por debajo del umbral de daño celular (razón por la que también se le conoce como terapia láser de baja intensidad).

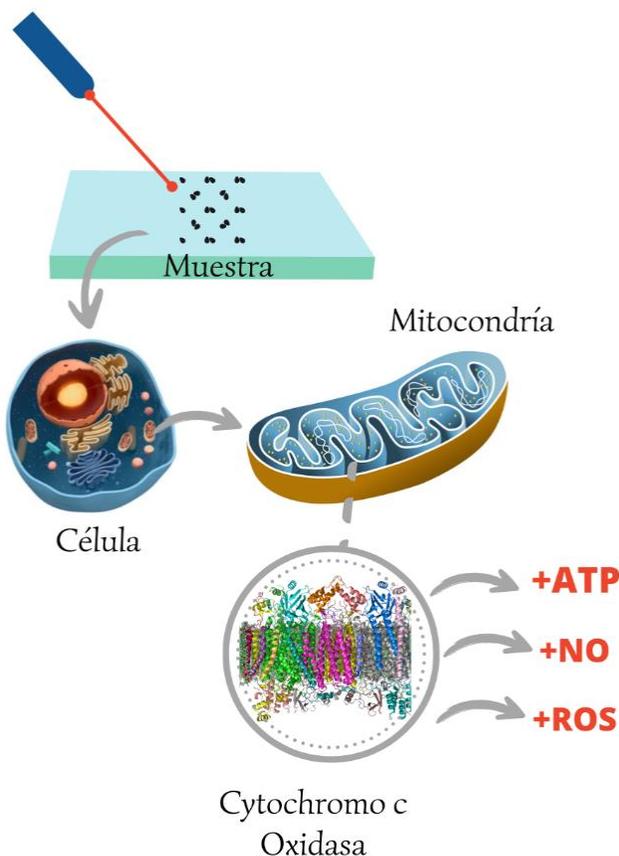


Figura 1. Esquema general del desarrollo de la actividad celular debido a la técnica de fotobiomodulación. En la imagen: ATP: trifosfato de adenosina; ROS: especies de oxígeno reactivas; NO: Óxido nítrico.

El principal mecanismo de la PBM es la absorción de luz por los diferentes fotorreceptores localizados en la membrana celular o los cromóforos en la mitocondria. Uno de estos cromóforos es la Citocromo C Oxidasa (CCO), enzima de la cadena respiratoria mitocondrial, que presenta bandas de absorción en las regiones del espectro rojo (600-700 nm) y del infrarrojo cercano (NIR 760-900 nm) (De Freitas & Hamblin, 2016; Dompe et al., 2020). Estos cromóforos en la mitocondria (principalmente la CCO) son los encargados del flujo de electrones de niveles de mayor a menor energía, creando un gradiente de protones siendo útil para el almacenamiento de energía (Alberts et al., 2002); Este proceso es necesario para todas las actividades celulares desde la estimulación, inhibición, activación, aumento, etc., de moléculas como el adenosín trifosfato ATP, especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO) (Li &, Zhang, 2019) (ver esquema de la Figura 1). Por lo que en la PBM comúnmente se usa luz roja e infrarroja, ya que además esta tiene una mayor penetración en tejidos biológicos y ha demostrado ser seguro en pruebas clínicas (Hamblin, 2016; Hamblin et al., 2019).

Para el buen funcionamiento de la PBM son importantes los parámetros y las dosis adecuadas dependiendo el tipo de muestra a utilizar. Los parámetros más importantes que impactan sobre el efecto biológico que han sido identificados a la fecha incluyen la longitud de onda, irradiancia, estructura temporal (pulsado u onda continua) y propiedades de coherencia, así como la energía total depositada, densidad de energía, tiempo de irradiación e intervalos de tratamiento. Con respecto a la potencia de irradiación, se podría inferir que a mayor sea la potencia, se obtendrán mejores resultados en menor tiempo. Sin embargo, no siempre sucede esto, también se ha encontrado que si la dosis se suministra demasiado rápido puede existir una disminución del rendimiento, debido a la irradiancia y densidad de energía (Winkler, 2019), lo que demuestra la importancia de considerar estos parámetros y que más adelante se describen a detalle.

La PBM ha sido empleada en investigaciones en diferentes áreas, incluyendo la clínica, la agricultura y la apicultura. Por ejemplo, se han realizado estudios en algunos vertebrados como caracoles, erizos de mar, paramecios, sapos, ranas, gallinas y plantas (Hamblin, 2016). Además, se han obtenido resultados cualitativos y cuantitativos de los efectos biofotónicos inducidos por luz en una gran variedad de dolencias entre los que se incluyen principalmente el dolor e inflamación (Hamblin, 2017), enfermedades neurológicas (Salehpour et al., 2018) y regeneración ósea (Escudero et al., 2019); Cabe mencionar que, aun cuando la PBM es una técnica con un área de estudio muy amplia y en constante investigación, existen preguntas abiertas y cierta controversias en relación a la dependencia de estos efectos biológicos frente las variaciones de los parámetros de irradiación, por ejemplo, entre los regímenes continuo/pulsado y las

propiedades de coherencia espacial y temporal de la fuente de luz (Chaves et al., 2014; Hamblin et al., 2019). Teniendo en cuenta lo anterior, Es así como esta tesis se centra en la investigación del efecto biológico de la fotobiomodulación en huevos del modelo entomológico *Aedes aegypti* con el objetivo de medir y evaluar la respuesta estimuladora y/o inhibitoria durante el proceso del desarrollo del *exocorium* frente a diversas condiciones de irradiación con luz láser. Se utilizó luz infrarroja a longitudes de onda de 785 nm, 806 nm, así como en el visible a 561 nm, con el objetivo de establecer un cuadro comparativo entre ellas y determinar los parámetros de irradiación para los cuales el efecto de la PBM es óptimo en estas muestras biológicas. Finalmente, la medición y evaluación de la respuesta de las muestras se realizó mediante un sistema de monitoreo desarrollado por la empresa Grupo Molecular.

1.1 Justificación

Con base a estudios previos realizados por el laboratorio de entomología aplicada de la empresa Grupo molecular, se observó que el tiempo del desarrollo de la capa externa de los huevos(*exocorium*) es menor a 90 minutos a una temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, pasando de una tonalidad semitransparente en su etapa inicial a una tonalidad más opaca y negra en su etapa madura hasta lograr la eclosión. En este sentido, el propósito de esta esta tesis es, por un lado, inducir y estudiar los efectos de la luz en el proceso de desarrollo de los huevos del mosquito bajo diferentes parámetros de irradiación en el infrarrojo cercano y, por otro lado, evaluar la respuesta biológica en el proceso de la estimulación/inhibición de las muestras irradiadas mediante imágenes de campo claro. Además, con la finalidad de tener una referencia del proceso biológico inducido, se realizó irradiaciones con una longitud de onda en el espectro visible (561 nm). Cabe resaltar que, a diferencia de otras aplicaciones biofotónicas que utilizan alta potencia y/o calentamiento, la PBM se realiza a niveles de irradiancia y densidad superficial de energía relativamente bajos (típicamente menores a 200 mW/cm^2 y de 0.1 a 100 J/cm^2) de forma que no producen calentamiento significativo en las muestras irradiadas.

1.2 Hipótesis

Los tiempos necesarios para el desarrollo de la capa externa (*exocorium*) de los huevos de *Aedes aegypti* serán afectados disminuyendo o aumentando de manera significativa por diferentes tipos y tiempos de irradiación.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto biológico de la fotobiomodulación en huevos de mosquito *Aedes aegypti* para medir la respuesta estimuladora e inhibitoria de los tiempos de desarrollo del corion de las muestras irradiadas ante diversas condiciones de irradiación con luz láser.

1.3.2 Objetivos específicos

- Inducir el efecto de fotobiomodulación en huevos de mosquito *Aedes aegypti* utilizando luz infrarroja a 785 Y 806 nm en el régimen continuo bajo distintas condiciones de irradiación (potencia y tiempo de exposición).
- Utilizar luz visible (561 nm) para efectos de comparación del efecto de fotobiomodulación.
- Estimar los tiempos de desarrollo de la capa externa de los huevos (*exocorium*) de las muestras irradiadas.
- Evaluar la respuesta biológica de los efectos de la luz (Infrarroja y visible) sobre la estimulación e inhibición de la capa externa de los huevos (*exocorium*) mediante microscopia óptica de campo claro.

1.4 Estructura de la tesis

Esta tesis está conformada por cinco capítulos y está organizada de la siguiente manera: En el Capítulo 1. se presenta la introducción, justificación, hipótesis, objetivos y estructura de la tesis. En el Capítulo 2. se describen los antecedentes y estado del arte del proyecto; se presenta la información relacionada la técnica de fotobiomodulación, fundamentos biológicos y aplicaciones. En el Capítulo 3. se muestra la metodología experimental utilizada; de forma detallada se explica el proceso de preparación y extracción de las muestras, parámetros de irradiación, montajes de cada una de las longitudes de onda y la adquisición, procesamiento y análisis de las imágenes. Los resultados obtenidos en este trabajo y su

discusión se describen en el Capítulo 4. Y finalmente, en el Capítulo 5. se presentan las conclusiones de esta tesis y el trabajo propuesto a futuro.

Capítulo 2. Antecedentes

En este capítulo se describe la información y trabajos realizados que anteceden al presente proyecto de tesis. En específico, se describe cómo surge esta técnica de la fotobiomodulación, el proceso interno, características y aplicaciones. También se mencionan los trabajos relacionados al uso de esta técnica, así como los parámetros de irradiación comúnmente usados y de interés.

2.1 Fotobiomodulación

La fotobiomodulación (PBM) es una técnica que utiliza una fuente de luz (generalmente un sistema Láser o LED) para activar tejido celular, permitiendo la estimulación o inhibición de diversos procesos biológicos intracelulares. El principal precursor de esta técnica fue el médico Endre Mester en 1967, que, aunque sus estudios originales estaban orientados en remover un modelo de cáncer implantado en ratones con el uso de un prototipo de laser de rubí de 694 nm, obtuvo por casualidad resultados en los que se observaba una aceleración de la cicatrización y el crecimiento del pelaje en la zona de las incisiones que tenían estos animales (Liebert & Kiat, 2021). Es así, que orienta su investigación en la línea de curación de heridas, regeneración de fibras musculares, entre otros.

Como era de esperarse, las primeras aplicaciones de esta técnica fueron en torno al campo de la medicina, con láseres de baja potencia principalmente de luz roja o infrarroja cercana (NIR) (600–1100 nm) y densidades de energía en el rango de 0,1 a 100 J/cm² (Hamblin, 2016). Se obtuvieron beneficios como reducción de la inflamación, tratamiento de heridas, lesiones musculares, alivio de dolor, regeneración de tejidos, etc. Una de las ventajas de estas longitudes de onda es que tienen una mayor profundidad de penetración en los tejidos y causan un menor daño en la muestra. Sin embargo, también se ha explorado inducir el efecto de PBM en otras longitudes de onda del espectro visible, específicamente en el rango de 400-500 nm (azul) y 500-570 nm (verde) (Wang et al., 2016). Los estudios realizados en el rango de 400-700 nm se han enfocado principalmente en tratar afecciones de la piel, como el acné y en odontología para el blanqueamiento dental. Los estudios realizados en el rango de 500-570 nm se han empleado primordialmente en el tratamiento de problemas cutáneos, como el enrojecimiento y las lesiones vasculares (Glass, 2021).

En la figura 2 se muestra el esquema del proceso de PBM y el alcance de penetración de las diferentes longitudes de onda. Actualmente, las longitudes de onda que se utilizan para inducir el efecto de PBM están en el rango espectral de 400-1100 nm, dependiendo de la aplicación y objetivos de estudio. No obstante, las longitudes de onda típicamente empleadas se encuentran en el espectro conocido como la primera ventana biológica (650-950 nm). Durante un extenso periodo de tiempo, surgió la interrogante acerca del mecanismo de acción de la técnica de PBM, es decir cuáles eran los procesos desencadenados y los organismos involucrados al irradiar células, tejidos etc., con estas longitudes de onda y como se obtenían los beneficios previamente mencionados. Afortunadamente en los últimos años se han identificado algunas posibles explicaciones para estos procesos que impactan en ciertos componentes celulares (Hamblin, 2017).

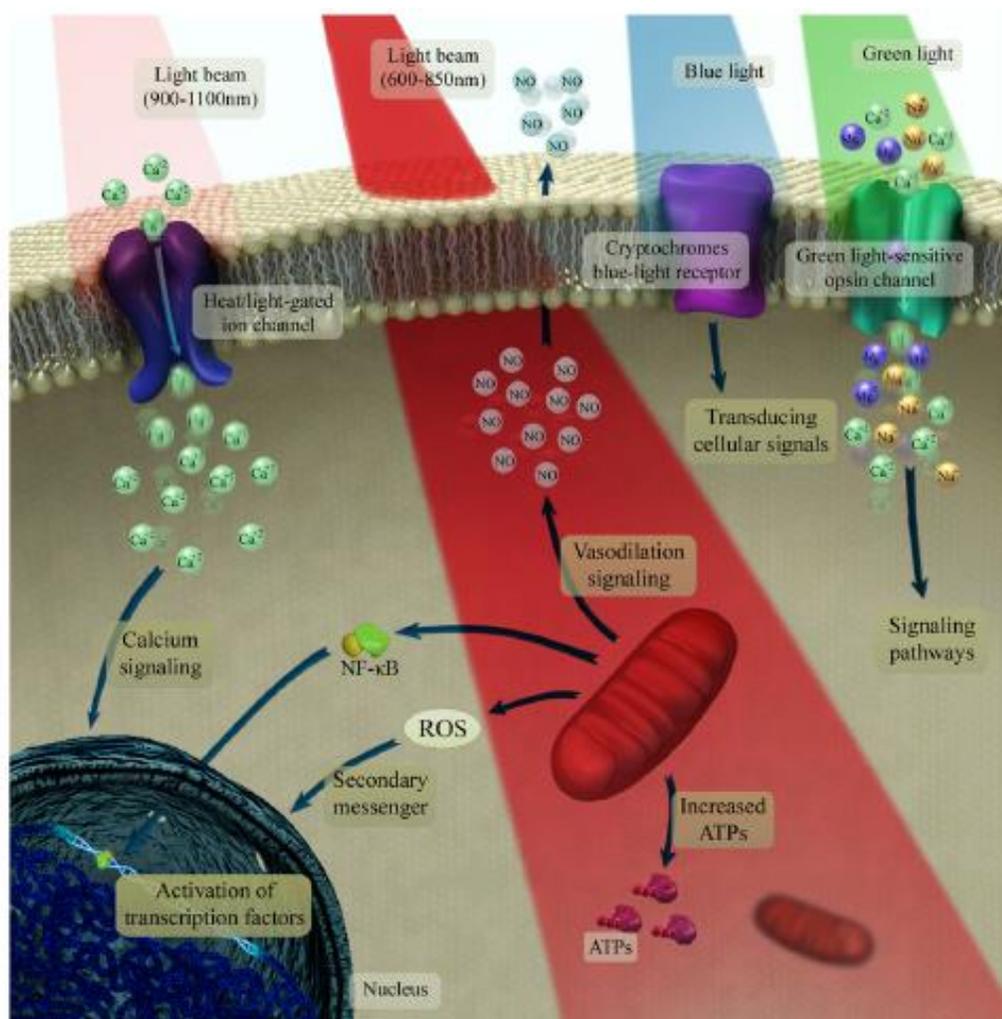


Figura 2. Proceso de fotobiomodulación para diferentes rangos de longitud de onda y alcance de la penetración de cada una de ellas. En la imagen de derecha a izquierda el rango de longitudes de onda es: 900-1100nm (Infrarrojo cercano); (600-850nm) (luz roja, luz azul; luz verde). Imagen obtenida de (Salehpour et al., 2018).

Las moléculas con la capacidad de absorber luz son conocidas como cromóforos. Estos cromóforos responden de manera distinta ante diferentes irradiaciones, y esta variación está fuertemente influenciada por la capacidad de penetración de la luz y la profundidad de alcance. Algunos de los cromóforos identificados incluyen los canales de opsinas, que absorben luz verde los cuales son capaces de incrementar el calcio intracelular; los criptocromos que son parte de las flavoproteínas y absorben principalmente la luz azul. Por otra parte, la luz roja e infrarroja estimulan la enzima citocromo c oxidasa (CCOX) la cual está estrechamente relacionada con la producción de adenosín trifosfato (ATP) (ver esquema de la figura 2). Finalmente, también se ha considerado que el agua puede absorber estas longitudes de onda de manera más efectiva, especialmente alrededor de los 810 nm (Hamblin, 2017; Salehpour et al., 2018; L. Wang et al., 1995). Ahora, considerando que uno de los objetivos principales de esta tesis es estudiar la técnica de PBM en las longitudes de las ondas de 785 y 806 nm, abordaremos con más detalle el mecanismo de acción de la PBM en el espectro de luz roja e infrarrojo cercano. En la figura 2 se muestra un esquema de la estructura interna de la célula, podemos observar que en la parte inferior se encuentra iluminado mayormente por luz infrarroja un orgánulo muy importante, llamado mitocondria, compuesto por una doble membrana presente en la mayoría de las células eucariotas y es la, encargada de la producción de energía celular (Marazziti et al., 2012).

Dentro de la mitocondria, esta producción de energía se debe a una cadena de transporte de electrones compuesta por cinco complejos (ver figura3.a). El complejo I (NADH deshidrogenasa), recibe electrones de NADH, y a su vez el complejo II (succinato deshidrogenasa) recibe electrones de FADH₂, es decir, estos dos complejos son las grandes puertas para la transferencia de electrones. Estos electrones son transportados por la ubiquinona (coenzima Q₁₀, CoQ) y el citocromo c (Cyt c) hasta los complejos III y IV respectivamente (Berry et al., 2000). El complejo IV (Citocromo C Oxidasa (CCO)), es una enzima tiene la propiedad de tener una mayor absorción de la luz roja e infrarroja cercana (NIR) (ver figura3.a). Esta enzima participa en el transporte de electrones. A medida que los electrones pasan por la CCO se genera un bombeo de protones que crea un gradiente o potencial de energía. Por último, este gradiente es utilizado por el complejo V donde se realiza la producción de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (FoF₁ ATPasa), (Hunter et al., 2000; Neustadt & Pieczenik, 2008). No obstante, aunque todo este sistema o cadena este encargado de la producción de energía en forma de ATP, también se producen especies reactivas de oxígeno (ROS), esta molécula es muy importante ya que puede incluir radicales libres O₂ y H₂O (ver esquema en la figura 3.b) creando así un estrés oxidativo o desequilibrio de transporte de electrones generando una actividad contraria a lo anteriormente mencionado. Esto puede resultar altamente beneficioso en situaciones como

la señalización celular, la apoptosis (muerte celular programada) o como parte de la respuesta inmune.

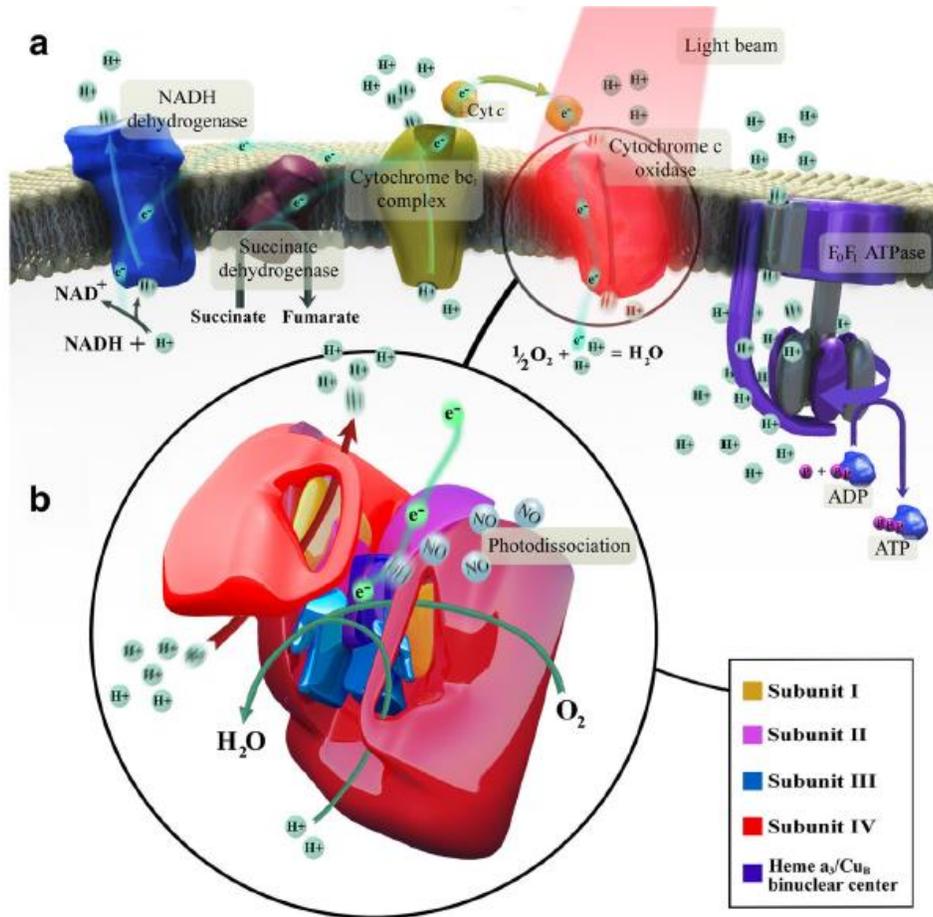


Figura 3. a) Estructura de la membrana interna mitocondrial. En la imagen de derecha a izquierda el complejo I (NADH deshidrogenasa), complejo II (succinato deshidrogenasa), complejos III (Cytocromo bc1), IV (Cytocromo C Oxidasa (CCO)), complejo V (ATP sintasa). b) Estructura interna IV (Cytocromo C Oxidasa (CCO)). Imagen obtenida de (Salehpour et al., 2018).

2.2 Dispositivos y Aplicaciones de la Fotobiomodulación

Los dispositivos comúnmente utilizados para esta técnica son sistemas laser de una sola longitud de onda o LEDs. El rango de potencias de salida utilizada varía desde 1 mW a 30 W, para el caso de los láseres, y hasta 480W para los LED (Hamblin, 2016). Es importante destacar que en la actualidad hay una amplia variedad de equipos con diseños, estructuras y tamaños diversos destinados para diferentes funciones y/o aplicaciones (Alibaba ,2015). Estos equipos son desarrollados generalmente en el sector privado que posteriormente se lanza al mercado. También se encuentran equipos de uso exclusivo para procesos de

investigación internos y montajes experimentales utilizados en laboratorios del ámbito educativo e investigativo. En lo que respecta a las aplicaciones, como se mencionó anteriormente, la PBM encontró su primera aplicación significativa en el ámbito médico. Sin embargo, gran parte de las investigaciones y pruebas iniciales fueron realizadas en diversas especies animales para posteriormente extenderse a estudios en seres humanos.

Además de su aplicación en el tratamiento de heridas y la mejora en la cicatrización, se han realizado investigaciones en tratamientos de la alopecia (Esmat et al., 2017), el control del dolor y cicatrización ósea en personas con osteoporosis (Escudero et al., 2019). También se ha estudiado y buscado mejorar los síntomas de enfermedades como el Parkinson (Moro et al., 2014), Alzheimer (Maksimovich, 2015), lesiones traumáticas (Morries et al., 2015) y la depresión (Cassano et al., 2015; Disner et al., 2016). En el ámbito veterinario, se han realizado estudios en iguanas que demostraron mejoras en la cicatrización de heridas después de la irradiación con una longitud de onda de 660 nm, en comparación con el uso de cremas como la sulfadiazina (Cusack et al., 2018). En el caso de mascotas, como perros y gatos, la PBM se ha utilizado para tratar la inflamación dental e infecciones (Maver-Biscanin et al., 2004; Watson & Brundage, 2019). Aunque la investigación principal de la PBM se centra en procesos terapéuticos en el campo médico y veterinario, estudios recientes han identificado aplicaciones importantes en la producción de alimentos (Nadimi et al., 2021); el crecimiento de cultivos microbiológicos (Peplow et al., 2010) y estudios contra las sequías (Xiang et al., 2021).

Debido a la importancia ecológica y económica de diversos insectos (por ejemplo: los polinizadores y aquellos utilizados en técnicas de control por insecto estéril), es posible que los resultados obtenidos tengan aplicaciones directas en la industria o en el sector agroalimentario. Cabe mencionar que, aunque se ha presentado un panorama muy general de las aplicaciones al utilizar la PBM, se han obtenido grandes ventajas y beneficios en una gran variedad de especies (mamíferos, reptiles, invertebrados, etc.) sin embargo, aún se está investigando de manera continua la dependencia de los efectos inducidos con respecto a los parámetros de irradiación como la irradiancia y la densidad de energía depositada, los cuales se describen a continuación.

2.3 Parámetros de irradiación: irradiancia y densidad de energía

A diferencia de otras aplicaciones biofotónicas que utilizan alta potencia y/o calentamiento, la PBM se

realiza a niveles de irradiancia y densidad superficial de energía generalmente por debajo de los 200 mW/cm² en un rango de densidad de energía de 0.1 a 100 J/cm². Considerando estos parámetros como referencia, en nuestros experimentos hemos decidido emplear valores de irradiancia por debajo de los 200 mW/cm² y de densidad de energía tales que cubran y superen los límites de los rangos indicados tanto en el extremo de alta como de baja densidad de energía. Los detalles sobre los parámetros de irradiación (potencia, irradiancia y densidad de energía) correspondientes a cada experimento se presentan en las tablas 1 y 2 en la sección de resultados (sección 4). Considerando que la iluminación sea uniforme sobre una cierta área, la irradiancia de un haz de luz que incide sobre esta área está dada por la potencia óptica del haz entre su sección transversal P_{haz} :

$$I = \frac{P_{haz}}{A_{haz}}, \quad (1)$$

donde A_{haz} el área de la superficie donde incide la luz. Por tanto, las unidades de la irradiancia en el sistema internacional son W/m². Para determinar el valor de la irradiancia asociada a una potencia específica, es necesario medir tanto la potencia como el área de la superficie sobre la cual incide el haz laser (ecuación 1). En nuestros experimentos, ajustamos los diámetros de los haces de los diodos láser a 5mm, utilizando la medida del FWHM (ancho completo a la mitad del máximo) que se midió mediante la técnica de la navaja. El área irradiada por las tres longitudes de onda (785, 806 y 561 nm) fue de $A_{haz} = \pi * r^2 = 0.19 \text{ cm}^2$. Una vez conocida la irradiancia, se puede calcular la exposición, que representa la densidad de energía depositada (ρ) para un tiempo de irradiación dado mediante la siguiente ecuación:

$$\rho = I * t_{irradiación}, \quad (2)$$

donde, I es la irradiancia y $t_{irradiación}$ el tiempo de irradiación.

2.4 Cantidad de luz infrarroja a partir de la Luz solar

Antes de que se implementara el uso del láser en los procesos de irradiación de tejidos, células, etc., la fuente de irradiación utilizada de manera natural para la PBM era el sol. Es interesante saber, a partir de

la luz natural emitida por el sol, cuánta de esta corresponde a las longitudes de onda utilizadas en este estudio, en una superficie dada. Es por esto, que en este apartado se realiza una estimación de ello. Partimos de que, la irradiancia es decir la potencia por unidad de área producida por el sol es aproximadamente de $I_{sol}=1353 \text{ W/m}^2$ según el reporte de la Nasa. (NASA Official, 2022). Esta irradiancia está distribuida en función de la longitud de onda(λ) de acuerdo a la distribución de Planck:

$$I_{sol} = \int_0^{\infty} I_{\lambda}(\lambda) d\lambda = \int \frac{N}{\lambda^5} \frac{1}{e^{\left(\frac{hc}{k_{\beta}T\lambda}\right)-1}} d\lambda \quad (3)$$

Donde $h=6.62 \times 10^{-34} \text{ J.s}$ es la constante de Planck, $k_{\beta}=1.38 \times 10^{-23} \text{ J/K}$ es la constante de Boltzmann, la velocidad de la luz es $c=3 \times 10^8 \text{ m/s}$ y N es la constante de normalización. Esta constante de normalización N , depende de la temperatura de la superficie emisora, en este caso se utiliza la temperatura de la superficie solar $T=5772\text{K}$, de forma que:

$$N = I_{sol} \frac{15h^4c^4}{\pi^4k_{\beta}^4T^4} \quad (4)$$

$$N = \frac{15}{\pi^4} I_{sol} (3.86 \times 10^{-23} \text{ m}^4) \quad (5)$$

Al evaluar el integrando de la función de la ecuación 3 obtenemos como resultado la distribución que se muestra en la figura 4. Esta curva corresponde a la irradiancia espectral de la radiación solar dentro del rango de 10-1500 nm, cabe mencionar que aquí se han ignorado los efectos de absorción atmosférica que reducen los valores por debajo de esta estimación teórica.

Con este ejercicio se puede estimar aproximadamente el valor de la irradiancia espectral a una longitud de onda en específico, en nuestro caso las longitudes de onda de interés son 785, 806 y 561 nm, que son las que se utilizaron en esta investigación. Los valores de irradiancia espectral correspondientes a cada una de estas longitudes de onda se reportan en la tabla insertada dentro de la figura 4.

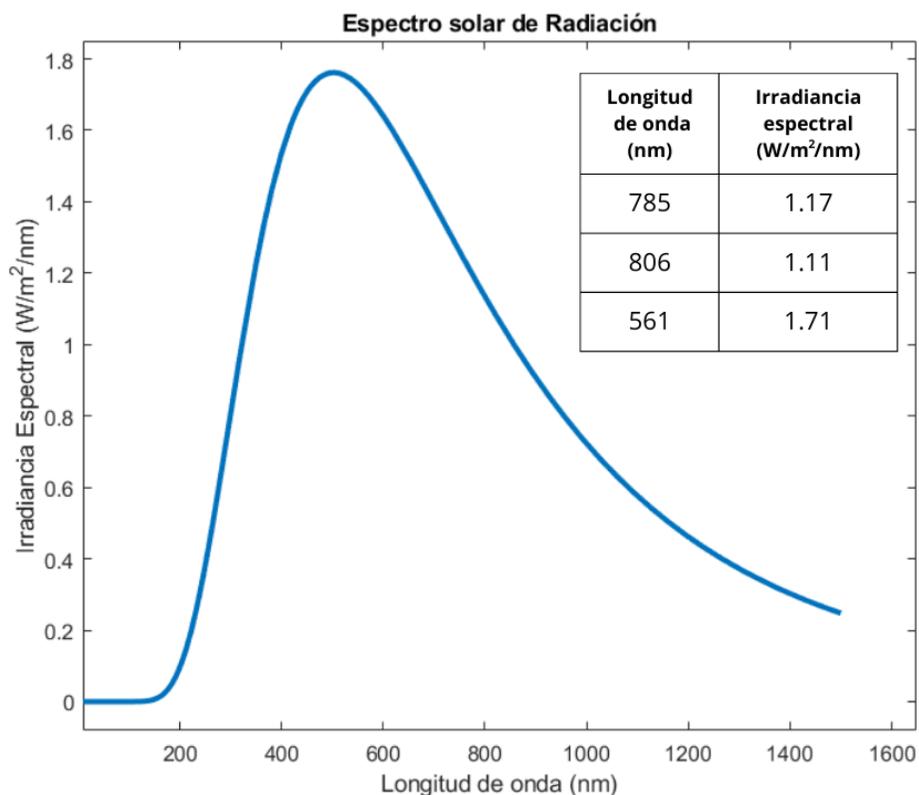


Figura 4. Espectro solar de Radiación a partir de una cantidad de energía solar de 1353 W/m².

Con base en estos resultados podemos ver que, si bien las densidades de potencia utilizadas en PBM son moderadas (usualmente de 0.01 a 0.5 W/cm²), al utilizar fuentes láser con anchos espectrales angostos (que típicamente cubren un intervalo de ± 2 a 5 nm), éstas son capaces de generar irradiancias espectrales significativamente por encima de las irradiancias que se obtienen de la luz solar. Por ejemplo, un sistema que emite 0.1 W de potencia sobre un intervalo de 5 nm en un área de 1 cm² produce una irradiancia espectral de 200 W/m²/nm. Por lo tanto, es posible observar que los campos utilizados en PBM puede alcanzar valores de irradiancia espectral sumamente por encima de los valores a los que están expuestos los seres vivos de manera natural.

Capítulo 3. Metodología

En este capítulo se presentan los métodos experimentales utilizados en el desarrollo de este proyecto. Se describe el proceso de preparación y extracción de muestras, se muestran los montajes experimentales implementados y, finalmente, se describe el proceso de captura y procesamiento de las imágenes obtenidas

3.1 Preparación de muestras

Para la preparación de muestras fue necesario obtener mosquitos hembras y machos de *Aedes aegypti* de 4 días de edad, los cuales fueron proporcionados por el laboratorio de entomología de Grupo Molecular. Estos mosquitos fueron concentrados en jaulas de 30 cm³. Posteriormente, fueron alimentadas con sangre y separadas en contenedores de plástico cubiertos con tricot (tela translúcida) sujetado con ligas. Las hembras experimentales se mantuvieron a temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de 70-80% y fotoperiodo Luz Oscura de 12:12h. Diariamente, se les proporcionó una solución azucarada al 10% para garantizar su sobrevivencia.

3.2 Extracción de muestras

Una vez preparados y alimentados los mosquitos hembras de 4 días de edad, se procede a colocarlos dentro de un contenedor diseñado y adaptado para su transporte seguro hacia el laboratorio de preparación de muestras biológicas del CICESE. En este laboratorio, después de 72 horas posteriores a su alimentación, se realiza el proceso de extracción de los huevos de mosquitos.

Para esto, se siguieron las recomendaciones y el protocolo ya establecido por el equipo de entomología de GM.

A continuación, se describe el procedimiento de extracción de los huevos de mosquito, el cual también se muestra de manera esquemática en la figura 5:

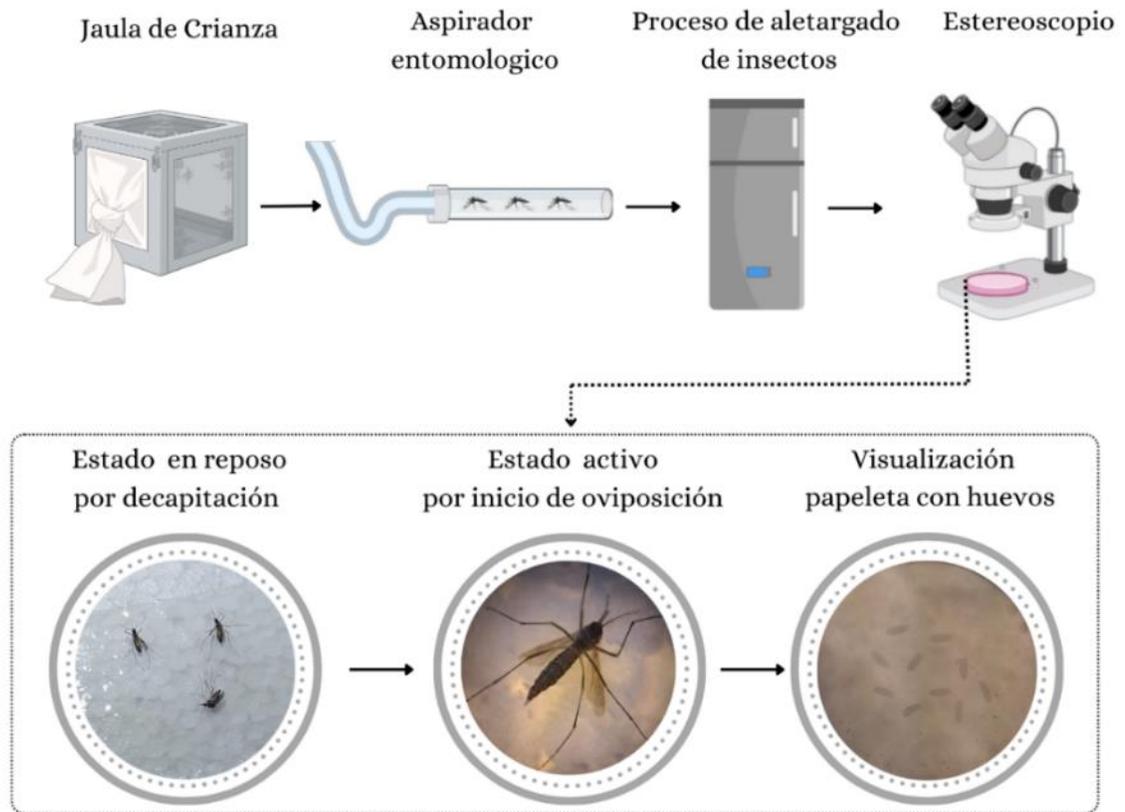


Figura 5. Representación esquemática del proceso de extracción de huevos de mosquito *Aedes aegypti*.

1. Para extraer de manera controlada los mosquitos de la jaula de crianza, se construyó un aspirador entomológico que consta de una manguera y un tubo de vidrio unidos entre sí, además de un filtro interno. Con este dispositivo es posible aspirar una cantidad específica de individuos. Generalmente, se seleccionan y aspiran de 2 a 3 hembras, de las cuales se extraen aproximadamente de 30 a 40 huevos de cada una, cantidad suficiente para el experimento correspondiente.
2. El aspirador entomológico que contiene los mosquitos se coloca dentro de una nevera a 5 °C durante 2 minutos. A esta temperatura, las funciones fisiológicas de los mosquitos se ven alteradas, lo que provoca principalmente una notable disminución en su movilidad (efecto similar a la anestesia). Esto asegura que sus funciones se ralenticen y facilita la manipulación.
3. El aspirador entomológico es retirado de la nevera, y se observaron los mosquitos en reposo a

través de un estereoscopio (Modelo Edmund Ind. Optics), notando el inicio de su actividad locomotora como indicio para proceder realizar el proceso de oviposición inducida por extirpación de la cabeza del mosquito (Diaz-Santiz and Mikery 2023 en prensa).

4. Inmediatamente después de la extirpación, se inició la expulsión de huevos de coloración transparente mediante contracciones presentadas en el abdomen. Utilizando un microscopio estereoscópico y un pincel con punta fina, se procedió a retirar los huevos uno a uno, teniendo el cuidado de no extirparlos ni arrastrarlos debido a su fragilidad. Finalmente, estos se colocan sobre papeletas de papel filtro de 6 mm de diámetro, previamente humedecidas para su posterior irradiación.
5. En todos los experimentos realizados se colocaron 10 huevos en cada papeleta, esto con el objetivo de contar con un número significativo de muestras para su análisis. En cada experimento de irradiación, se utilizaron dos papeletas con muestras, una designada como control (sin irradiar) y la otra destinada a ser irradiada. Al concluir cada irradiación, se inició el proceso de monitoreo de las muestras durante un periodo de 3 horas.

3.3 Irradiación de muestras

Los experimentos de irradiación y evaluación de los efectos biológicos inducidos en las muestras se realizaron en las instalaciones del CICESE. Para el proceso de irradiación se utilizaron diferentes longitudes de onda: dos de ellas en el infrarrojo cercano (785 y 806 nm) y una en el visible (561 nm). Para el caso de 785 nm, se utilizó un diodo laser operando en el régimen de onda continua (cw) y con salida de fibra óptica a sintonizable en potencia de 0 a 500 mW (MDL-III-785-500mW).

La irradiación a 806 nm se realizó con un dispositivo de fibra láser, con una potencia fija de 100mW desarrollado por GM. Este dispositivo láser se utilizó en modalidad de onda continua. Para el caso de 561 nm, se utilizó, un diodo laser operando en el régimen de emisión continua (Obis 561, Coherent). Esta última longitud de onda se utilizó para efectos comparativos con respecto a las longitudes de onda del infrarrojo cercano.

3.4 Montaje experimental para la irradiación de 785 nm

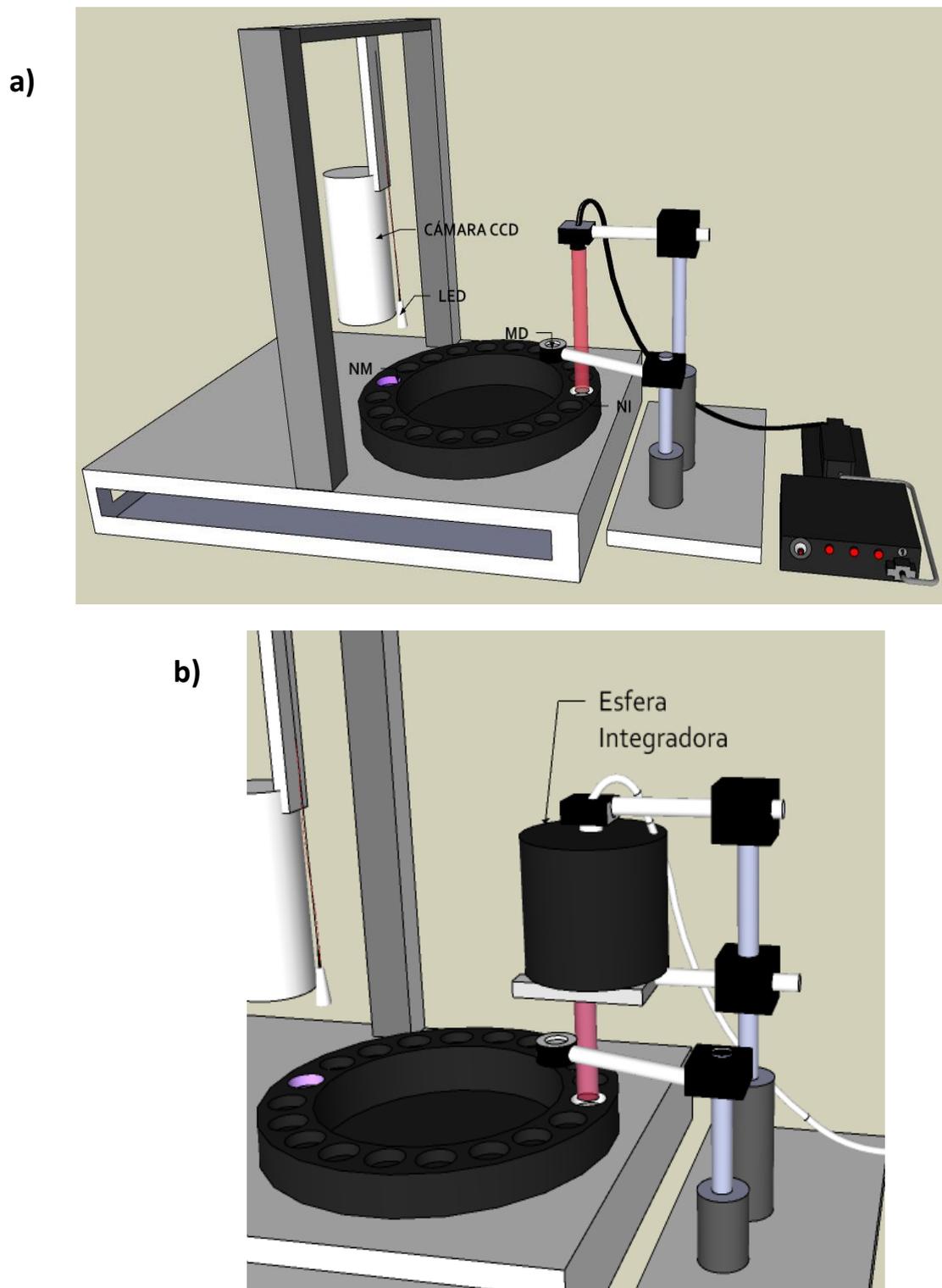


Figura 6. a) Montaje experimental 785 nm. b) Montaje experimental 785 nm con esfera integradora. En la imagen: NM: Nido de Monitoreo, NI: Nido irradiado, MD: Medidor de Potencia.

Para el proceso de irradiación correspondiente a la longitud de onda de 785 nm, se utilizó el arreglo experimental que se muestra esquemáticamente en la Figura 6.a). El arreglo consta del diodo láser (CNI, MDL-III-785-500 mW) con salida a fibra óptica y potencia variable de 0 a 500 mW. El haz láser es colimado mediante una lente de colimación (Thorlabs, F240SMA-780) que es acoplada a la salida de la fibra. Después de la fibra, se coloca un medidor de potencia sobre una montura desplazable angularmente para las mediciones de potencias correspondientes.

El sistema de colocación de muestras y monitoreo está integrado en una mesa indexadora construida por GM. Esta mesa cuenta con un carrusel que tiene 12 compartimentos circulares denominados “nidos” de un diámetro de 1 cm, en los cuales se colocan las muestras. Sobre la base de los nidos se colocan trozos circulares hechos a medida de algodón, y sobre estos se colocan las papeletas con las muestras (huevos). Es importante destacar que las muestras deben de mantenerse hidratadas para no afectar el proceso de desarrollo del corión; por lo cual se procede a humedecer tanto el algodón como las papeletas antes de iniciar los experimentos.

El sistema de monitoreo está conformado por una fuente de iluminación (LED blanco) y un sistema formador de imagen compuesto por una lente y una cámara CCD. El proceso de adquisición de imágenes está sincronizado con el movimiento circular del carrusel, lo cual permite adquirir imágenes de manera selectiva y automatizada. La adquisición de imágenes es controlada mediante un software programado en Python desarrollado también en GM.

El haz láser tiene un perfil espacial Gaussiano cuyo diámetro medido al valor FWHM es de 5 mm. Si bien, el diámetro completo del haz cubre totalmente el nido cuyo diámetro es de 10 mm, se debe de tener cuidado y tener la certeza de colocar las muestras en la zona central y dentro del diámetro FWHM de incidencia del haz, esto para garantizar que todas las muestras sean irradiadas con la misma densidad de energía.

Con el fin de lograr una distribución homogénea de la energía de irradiación en toda el área del nido, se emplea una esfera integradora Mikropack 50 mm, la cual se posiciona en la salida de la fibra óptica, como se ilustra en la Figura 6.b). Esta configuración asegura una irradiación uniforme en todas las muestras ubicadas en el nido. Es importante señalar que la distancia tanto de la fibra como de la esfera integradora se ajustó para que el haz cubriera completamente el área del nido.

3.5 Montaje experimental para la irradiación a 806 nm

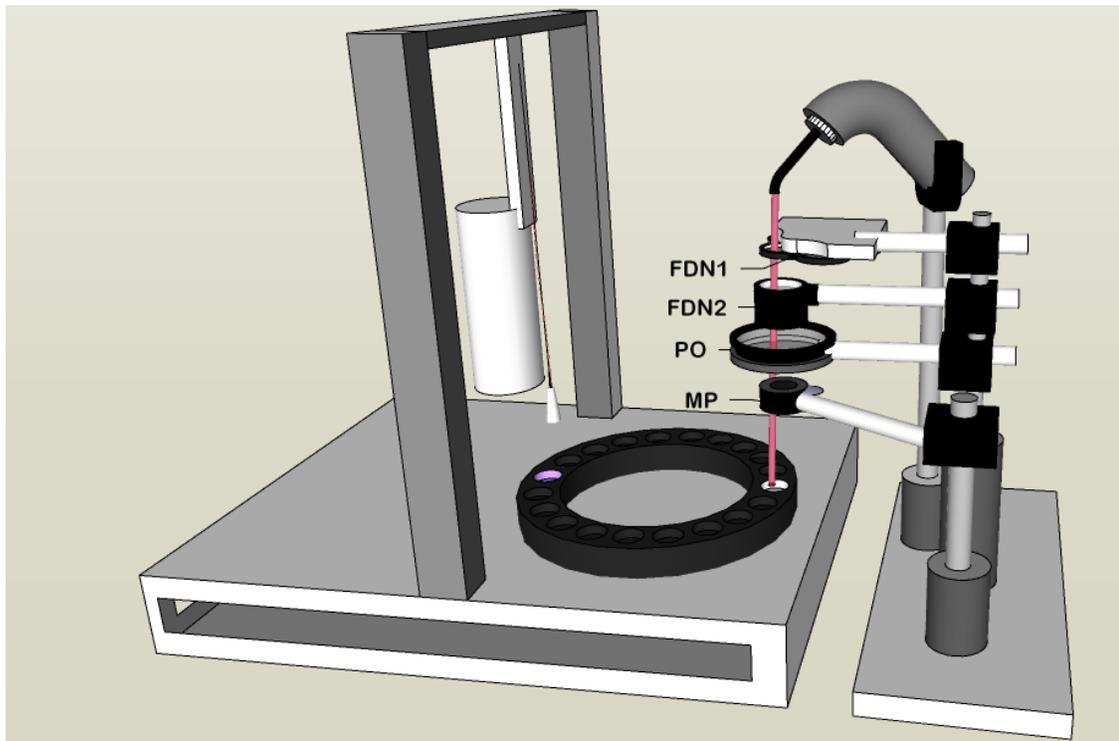


Figura 7. Montaje experimental 806 nm. En la imagen FDN1: Filtro de densidad neutra1; FDN2: Filtro de densidad neutra 2; PO: Polarizador; MP: Medidor de potencia.

Para el caso de la irradiación a 806 nm, el arreglo experimental se muestra en la Figura 7. El sistema de colocación de muestras y de monitoreo (mesa indexadora) es el mismo que en el caso anterior, solamente, se adaptó el sistema de irradiación. En esta configuración, se utiliza un dispositivo láser de 806 nm, el cual tiene una potencia de salida fija de 100 mW.

Para ajustar los valores de potencia correspondientes, empleamos un conjunto de filtros de densidad neutra FDN1-FDN2 y un atenuador. La potencia se mide con un medidor de potencia colocado después del atenuador.

Es importante mencionar que, a diferencia del arreglo experimental de 785 nm en este caso no se requiere el uso de la esfera integradora, ya que el dispositivo láser fue diseñado para iluminar de manera uniforme toda la superficie de los nidos.

3.6 Montaje experimental para la irradiación 561 nm

Para el caso de los experimentos con irradiación en el espectro visible, se utilizó un diodo láser de emisión continua a 561 nm (Obis, Coherent). Similar al caso de irradiación a 785 nm, fue necesario ajustar el diámetro del haz y utilizar la esfera integradora para lograr una iluminación uniforme en toda la superficie de los nidos. El arreglo experimental se muestra de manera esquemática en la figura 8.

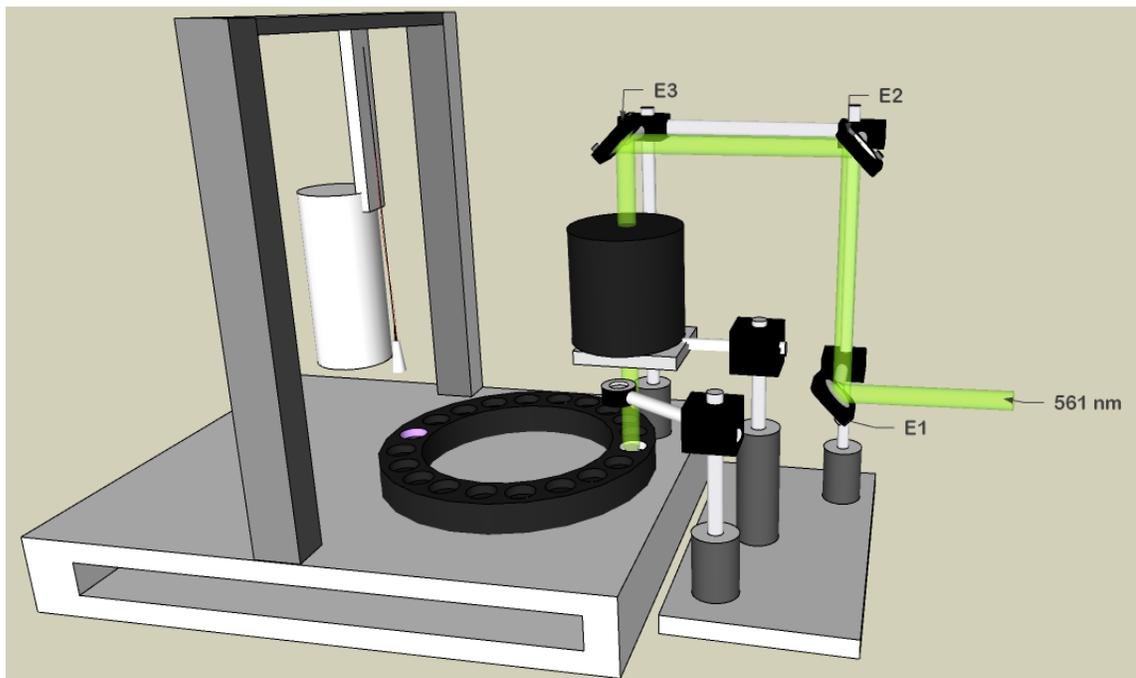


Figura 8. Montaje experimental 561 nm. En la imagen E1, E2, E3: Espejos.

3.7 Adquisición, procesamiento y análisis de imágenes

Como se mencionó previamente, el proceso de adquisición de imágenes está sincronizado con el movimiento giratorio del carrusel que contiene las muestras. El programa de control y adquisición está programado en el lenguaje Python. A través de la interfaz, se puede seleccionar los nidos para la observación. En todos los experimentos, el tiempo de monitoreo fue de 3 horas después de la irradiación. El intervalo de tiempo entre la adquisición de imágenes consecutivas de cada nido varía según el número de nidos que se monitorean simultáneamente, oscilando entre 13 y 45 segundos. Cabe mencionar que en todos los casos se utilizaron dos nidos: uno para el grupo de control y otro para el grupo de irradiación. El software utilizado facilita la separación y el almacenamiento de las imágenes asociadas a cada caso. Para

determinar de manera más eficiente el tiempo de desarrollo del *exocorium* de los huevos a partir de las imágenes obtenidas en cada experimento, se diseñó un programa en Matlab. Es te programa primero carga todas las imágenes de la carpeta correspondiente. Cada carpeta tiene definido el tiempo inicial de la primera foto y el intervalo de tiempo con el que se tomó cada imagen. La última imagen del monitoreo se utiliza como referencia, y a partir de esta, se selecciona con el puntero el huevo a analizar (ver figura 9). El programa realiza un “barrido” de la muestra seleccionada sobre todo el conjunto de imágenes de ese experimento.



Figura 9. Última imagen como referencia para la selección de cada huevo.

Los pixeles que componen cada imagen se convierten a escala de grises y posteriormente se obtiene el complemento de esta imagen, es decir, sus niveles de intensidad se invierten (el color más oscuro en la imagen original corresponde al color más claro en la imagen procesada). Este procedimiento se realiza debido a que los huevos en su estado inicial son transparentes y facilita el proceso para poderlos analizar. Para cada imagen se calcula el número total de pixeles y el número de pixeles de color blanco. Por último, a medida que avanza este barrido, los pixeles que cumplen con la condición de nivel de intensidad establecido, son etiquetados con marcadores rojos como referencia y registra el número de pixeles

etiquetados en memoria (ver figura 10).

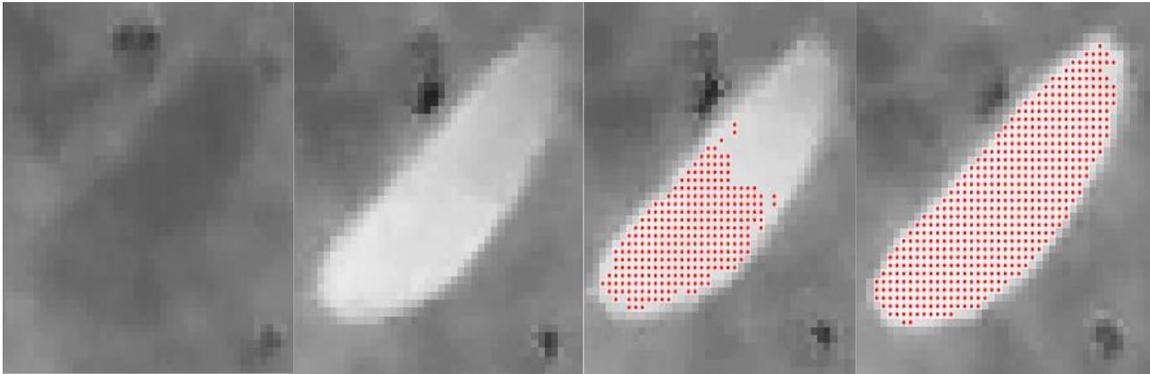


Figura 10. Secuencia del análisis de las imágenes de como el huevo cambia de intensidad y como se marca cada pixel.

Por último, a los datos obtenidos, se les aplica un suavizado de Savitzky–Golay reducir para reducir el ruido sin afectar las características propias de la curva obtenida y estimar su primera y segunda derivada. Posteriormente, se usan estos datos para medir el tiempo en el que se alcanzan los máximos de la función correspondiente a velocidad y aceleración del proceso de en el desarrollo del *exocorium* y así calcular los máximos de la función correspondiente a velocidades máximas y aceleraciones (primera y segunda derivada). Finalmente, los datos relevantes se guardan en un archivo de texto (txt). Este procedimiento se repite para cada uno de los 10 huevos presentes en la imagen. El diagrama de flujo y el código del programa se muestra de manera detallada en la sección de anexos. El nivel de intensidad y otros detalles sobre el análisis de datos se presentan con más detalle en la sección 4.1.2 Descripción del procedimiento de análisis de resultados.

Capítulo 4. Resultados

En este capítulo se describen y discuten los resultados del presente proyecto de tesis. Estos resultados incluyen la determinación del primer conjunto de parámetros de irradiación realizados con la longitud de onda de 785 nm. Se muestran los resultados utilizando los segundos parámetros de irradiación para las tres longitudes de onda de 785, 806 y 561 nm. Finalmente, se muestra de manera visual la dirección de desarrollo del *exocorium* junto con respectiva estadística.

4.1 Determinación de los primeros parámetros de irradiación y descripción del procedimiento de análisis de resultados

4.1.1 Determinación primeros parámetros de irradiación

Como se había mencionado en la sección 1.1, la PBM se realiza a niveles de irradiancia y densidad superficial de energía relativamente bajos, valores menores típicamente a 200 mW/cm² y de 0.1 a 100 J/cm². Teniendo en cuenta estos valores, se estableció que la primera recolección de datos englobaría valores de irradiancia desde 1 mW/cm² hasta 200 mW/cm² (Ver tabla 1), esto con el fin de observar el comportamiento de los huevos a diferentes tiempos de irradiación, específicamente a 10, 100, 500 y 1000 segundos. Estos primeros parámetros fueron tomados solo para la longitud de onda de 785 nm.

Tabla 1. Primeros parámetros de irradiancia.

Potencia (mW)	Irradiancia (mW/cm ²)	Densidad de Energía(J/cm ²)			
		Tiempo de irradiación (s)			
		10	100	500	1000
0.19	1	0.01	0.1	0.5	1
1.96	10	0.1	1	5	10
4.91	25	0.25	2.5	12.5	25
9.82	50	0.5	5	25	50
19.63	100	1	10	50	100
39.26	200	2	20	100	200

4.1.2 Descripción del procedimiento de análisis de resultados

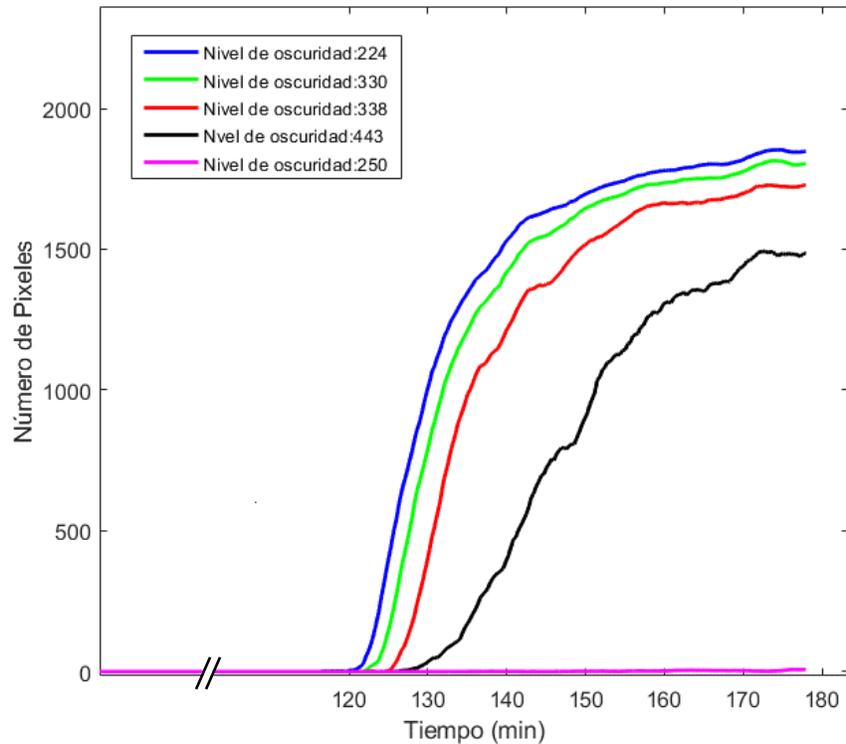


Figura 11. Niveles de oscuridad.

Para realizar un análisis de resultados para esta investigación fue necesario establecer dentro de la segunda etapa del programa de Matlab (ver sección 3.7 Adquisición, procesamiento y análisis de imágenes), un criterio de medición específico como lo fue el nivel de intensidad con valor de 224 dentro de una escala de 0 (negro) a 255 (blanco). El nivel de intensidad con valor de 224 se obtuvo a partir de observar que otros valores no se ajustaban a la medición del desarrollo del *exocorium*. La dependencia temporal del número de píxeles que supera el umbral se presenta en la figura 11 para distintos valores del valor umbral de intensidad.

Tomando en consideración lo anterior se pudo de optimizar la evaluación de parámetros relevantes para cada huevo obtenidos siguiendo el procedimiento de la figura 12. Primero se hace un ajuste de Savitzky-Golay a las gráficas de los datos que corresponden a los números de píxeles blancos durante el tiempo de monitoreo (ver línea azul de la figura 12 a). Este ajuste reduce el ruido como se puede apreciar en la línea roja de la figura 12 a).

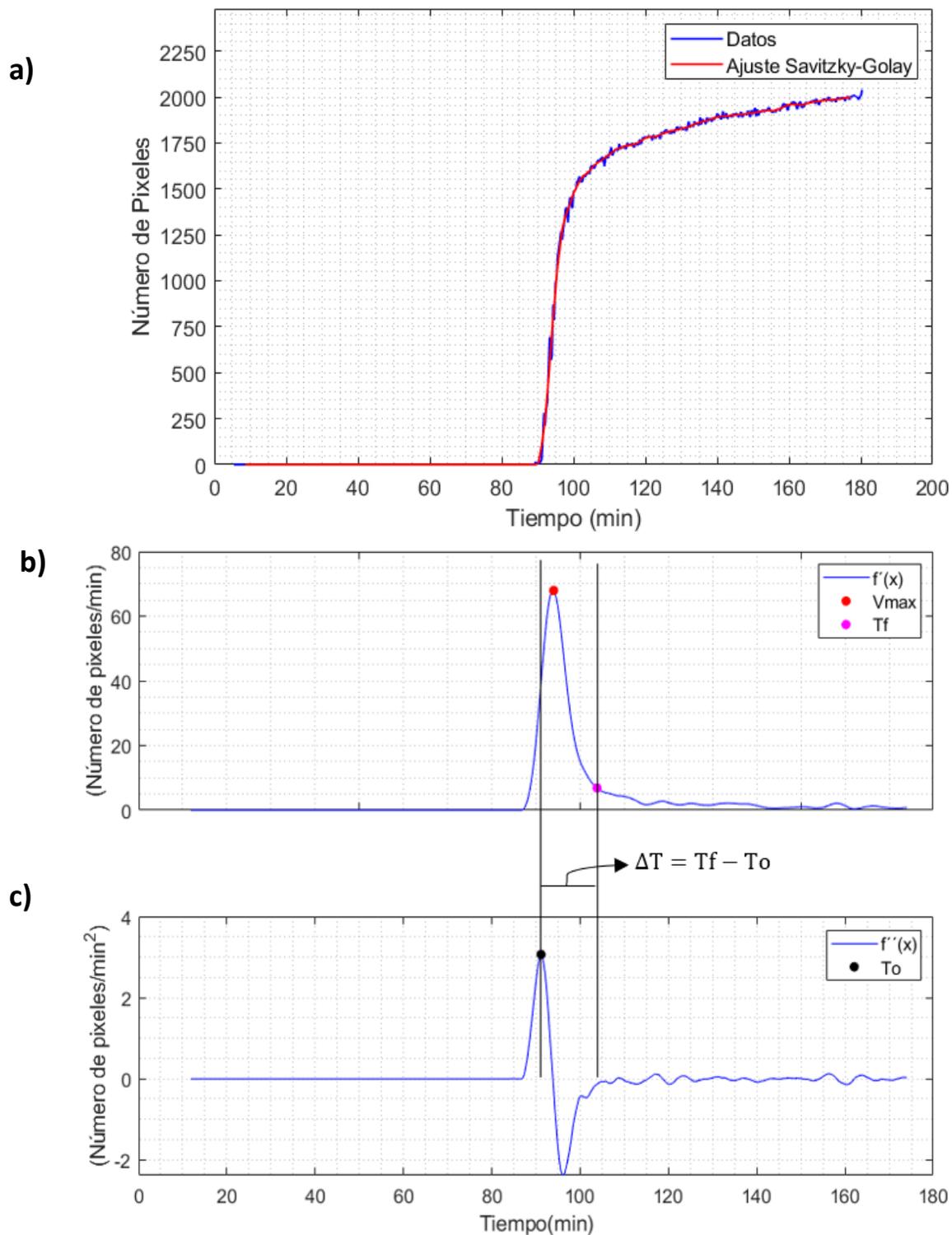


Figura 12. a) Datos obtenidos a partir de medir números de pixeles durante el tiempo de monitoreo y su respectivo ajuste Savitzky–Golay. b) Primera derivada del ajuste savitzky–golay. c) segunda derivada del savitzky–golay. En la imagen V_{max} : velocidad máxima; T_f : tiempo final del desarrollo del *exocorium*; T_o : tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*, ΔT : diferencia de tiempos entre tiempo final y tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*.

En la figura 12 b) se muestra la primera derivada producida a partir del ajuste de Savitzky-Golay, se indica la ubicación del valor máximo y la ubicación donde la primera derivada alcanza un 10% del valor máximo; el tiempo asociado al valor máximo corresponde al momento en que la velocidad del desarrollo del *exocorium* es máxima, mientras que el tiempo asociado al 10% del valor máximo se asocia con el momento donde se finaliza el proceso de desarrollo completo del *exocorium*. Al calcular este valor de velocidad final obtenemos también el tiempo final del desarrollo de *exocorium*. En la figura 12 c) se muestra el valor máximo de la segunda derivada correspondiente al valor de la aceleración a este valor se le asocia el tiempo de inicio del desarrollo del *exocorium*. Este tiempo corresponde al tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*. Es conveniente resaltar nuevamente que este proceso se repitió para cada uno de los 10 huevos irradiados y de control, esto con la finalidad de obtener un promedio del tiempo final e inicial del desarrollo, dichos parámetros fueron los escogidos para estudiar el efecto de PBM, así como la diferencia de estos tiempos es decir tiempo final menos tiempo inicial ΔT . Esta diferencia permite saber el tiempo de duración de desarrollo del *exocorium* para cada huevo. Cabe resaltar que este procedimiento del análisis de resultados se llevó cabo tanto para resultados obtenidos de los primeros parámetros de irradiación (sección 4.2) como también para los resultados de los segundos parámetros de irradiación (sección 4.4).

4.2 Resultados utilizando los primeros parámetros de irradiación

4.2.1 Primer conjunto de datos a 785 nm

4.2.1.1 Tiempo de irradiación: 10 segundos

En la tabla 2 se muestran los valores obtenidos al irradiar las muestras durante 10 segundos con una longitud de onda de 785 nm a diferentes densidades de energía y su respectivo control (muestra sin irradiar). Este control tiene un valor inicial de 125.42 ± 11.59 (min) y las demás densidades de energía sus tiempos iniciales son menores a este valor.

Esta relación la podemos observar también para los tiempos finales; sin embargo, podemos notar que en las diferencias de tiempos se presenta un aceleramiento del proceso del desarrollo de *exocorium*,

especialmente para una densidad de energía de 0.01 J/cm^2 mientras que a medida que se aumenta esta densidad de energía, también aumenta esta diferencia tendiendo a un valor parecido a la del control. Esto se puede observar con detalle en la gráfica de la figura 13, donde la línea azul muestra esta diferencia de tiempos y la línea azul punteada muestra su control, a medida que aumenta la densidad de energía el valor del tiempo del desarrollo tiende a tomar valores cerca del control.

Tabla 2. Datos obtenidos primer conjunto 785 nm para un tiempo de irradiación de 10 segundos.

Densidad de Energía depositada (J/cm^2)	Tiempo inicial T_o (min)	Tiempo final T_f (min)	Diferencia de tiempos ΔT (min)
0	125.42 ± 11.59	160.74 ± 13.36	35.32 ± 17.69
0.01	108.23 ± 6.48	130.13 ± 14.06	21.89 ± 15.48
0.1	113.36 ± 5.51	139.01 ± 12.96	25.65 ± 14.08
0.25	114.52 ± 4.55	143.34 ± 15.22	28.81 ± 15.89
0.5	122.23 ± 6.018	155.58 ± 9.75	33.35 ± 11.46
1	116.20 ± 7.41	148.15 ± 11.33	31.95 ± 13.54
2	112.84 ± 5.48	145.45 ± 9.32	32.60 ± 10.81

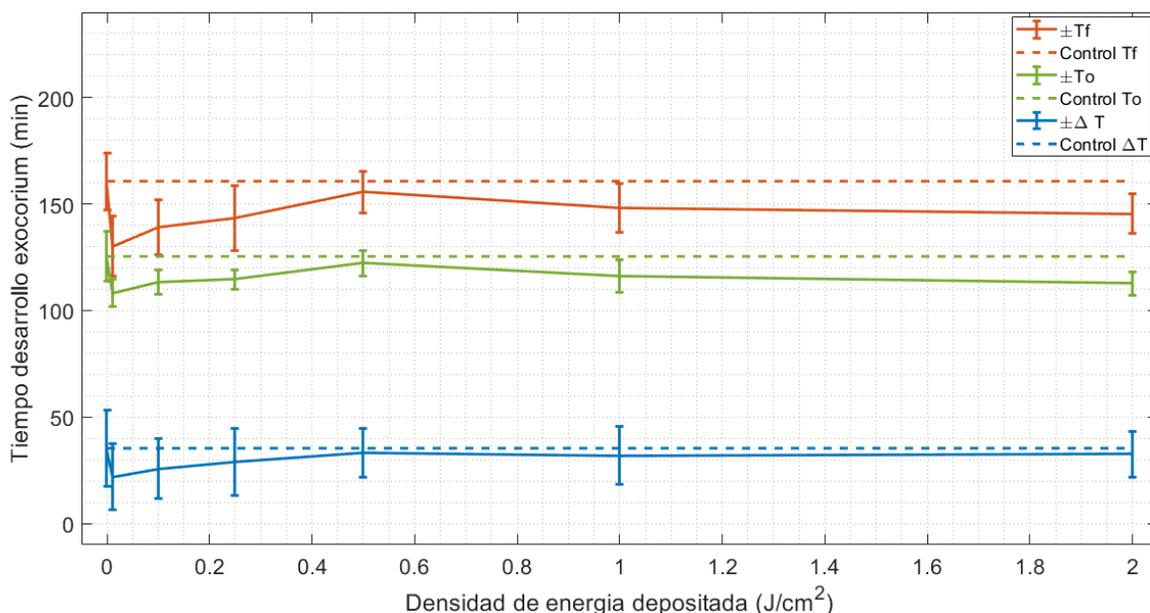


Figura 13. Primer conjunto 785 nm con un tiempo de irradiación de 10 seg. En la imagen T_f = tiempo final del desarrollo del *exocorium*; T_o : tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*, ΔT : Diferencia de tiempos entre tiempo final y tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*.

4.2.1.2 Tiempo de irradiación: 100 segundos.

En la tabla 3 se muestran a los valores obtenidos al irradiar las muestras por 100 segundos con una longitud

de onda de 785 nm a diferentes densidades de energía y su respectivo control. Este control tiene un valor inicial de 121.22 ± 9.67 (min) y las demás densidades de energía sus tiempos iniciales es menor a este valor. Esta relación la podemos observar también para los tiempos finales, sin embargo, podemos notar que en las diferencias de tiempos entre tiempo final y tiempo inicial se presenta un aceleramiento del proceso del desarrollo de *exocorium* especialmente para una densidad de energía de 2.5 J/cm^2 .

Tabla 3. Datos obtenidos primer conjunto 785 nm para un tiempo de irradiación de 100 segundos.

Densidad de Energía depositada (J/cm^2)	Tiempo inicial T_o (min)	Tiempo final T_f (min)	Diferencia de tiempos (min)
0	121.22 ± 9.67	152.72 ± 16.53	31.50 ± 19.15
0.1	84.52 ± 6.360	108.54 ± 13.90	24.02 ± 15.28
1	102.84 ± 3.53	122.00 ± 10.63	19.16 ± 11.20
2.5	97.26 ± 5.75	114.37 ± 6.95	17.11 ± 9.02
5	98.48 ± 2.65	125.73 ± 4.23	27.24 ± 5.00
10	94.10 ± 7.66	127.46 ± 12.12	33.36 ± 14.34
20	91.21 ± 7.75	119.66 ± 6.58	28.44 ± 10.16

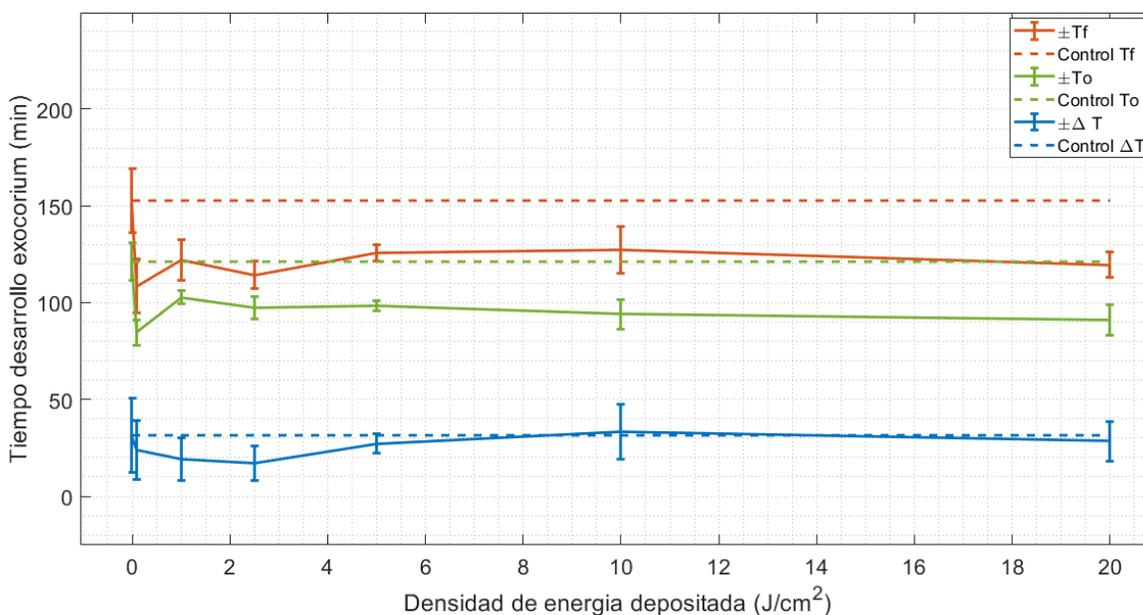


Figura 14. Primer conjunto 785 nm con un tiempo de irradiación de 100 seg. En la imagen T_f = tiempo final del desarrollo del *exocorium*; T_o : tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*, ΔT : diferencia de tiempos entre tiempo final y tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*.

Los valores de diferencia de tiempos para densidades de energía como $0.1, 1, 5, 10 \text{ J/cm}^2$ se mantuvieron menores al del control. Sin embargo, para una densidad de energía de 10 J/cm^2 llegó a ser mayor esta diferencia respecto a su control, es decir el proceso de desarrollo fue moderadamente ralentizado. En la

gráfica de la figura 14 se muestra la tendencia de como para ciertas densidades de energía, al realizar sus respectivas diferencias de tiempo, algunos valores se mantienen por debajo del control y a medida que aumenta estas densidades los valores llegan a ser mayores en el caso de 10 J/cm² y para los demás valores de densidad se mantienen muy parecidos a los valores del control.

4.2.1.3 Tiempo de irradiación: 500 segundos.

Los valores presentados en la tabla 4 corresponden al caso en que las muestras se irradiaron durante 500 segundos con una longitud de onda de 785 nm a diferentes densidades de energía y su respectivo control. Este control tiene un valor de diferencia de tiempos de 30.31 ± 21.76 (min). Sin embargo, a medida que aumenta la densidad de energía esta diferencia de tiempos tiende a ser oscilante, es decir, para una densidad de energía de 0.5 J/cm² aumenta su valor respecto al control.

En el caso de 5 J/cm² este valor disminuye. Para densidades de 12.5 y 25 J/cm² la diferencia de tiempos vuelve aumentar, siendo esta última densidad de energía que presenta la mayor diferencia de tiempos con un valor de 43.15 ± 13.9 min. Por último, para densidad 50 y 100 J/cm² nuevamente disminuye esta diferencia de tiempos. Se presenta un aceleramiento del proceso del desarrollo de *exocorium* especialmente para una densidad de energía de 100 J/cm²; Esta densidad como se observa en la gráfica de la figura 15 se observa se mantiene por debajo del control tanto como en el tiempo inicial, final y de la diferencia de tiempos.

Tabla 4.Datos obtenidos primer conjunto 785 nm para un tiempo de irradiación de 500 segundos.

Densidad de Energía depositada (J/cm ²)	Tiempo inicial To (min)	Tiempo final Tf (min)	Diferencia de tiempos (min)
0	119.41 ± 12.09	149.73 ± 18.09	30.31 ± 21.76
0.5	113.06 ± 13.11	147.20 ± 9.97	34.14 ± 16.47
5	111.84 ± 2.03	126.68 ± 19.81	14.83 ± 19.91
12.5	114.20 ± 8.71	149.25 ± 9.021	35.04 ± 12.54
25	107.50 ± 4.53	150.65 ± 13.20	43.15 ± 13.95
50	119.53 ± 11.55	136.06 ± 13.23	16.53 ± 17.56
100	96.69 ± 6.00	107.34 ± 9.12	10.65 ± 10.92

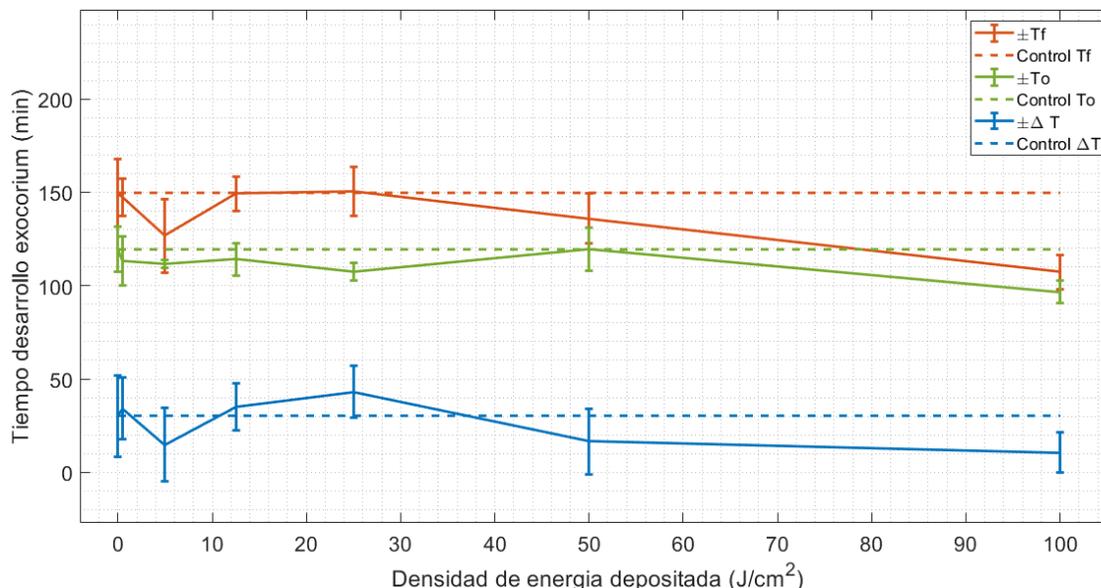


Figura 15. Primer conjunto 785 nm con un tiempo de irradiación de 500 seg. En la imagen Tf= tiempo final del desarrollo del *exocorium*; To: tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*, ΔT: diferencia de tiempos entre tiempo final y tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*.

4.2.1.4 Tiempo de irradiación: 1000 segundos.

Tabla 5. Datos obtenidos primer conjunto 785 nm para un tiempo de irradiación de 1000 segundos.

Densidad de Energía depositada (J/cm ²)	Tiempo inicial To (min)	Tiempo final Tf (min)	Diferencia de tiempos (min)
0	110.67 ± 9.69	130.83 ± 11.02	20.15 ± 14.68
1	106.97 ± 7.18	118.54 ± 5.51	11.57 ± 9.05
10	108.08 ± 10.35	127.46 ± 11.74	19.37 ± 15.66
25	121.20 ± 9.15	134.82 ± 5.33	13.61 ± 10.59
50	104.31 ± 5.49	129.24 ± 12.22	24.92 ± 13.40
100	102.17 ± 5.81	123.32 ± 9.75	21.14 ± 11.35
200	117.94 ± 10.18	149.96 ± 11.02	32.02 ± 23.05

La tabla 5 corresponde a los valores obtenidos al irradiar las muestras por 1000 segundos con una longitud de onda de 785 nm a diferentes densidades de energía y su respectivo control. Este control tiene un valor de diferencia de tiempos de 20.15 ± 14.68 (min). Tanto en la tabla 5 como en la gráfica de la figura 16 se observa que para valores de densidad de energía depositada entre 1 y 25 J/cm², sus respectivos valores de diferencia se mantienen por debajo del control, mientras que aumentan para densidades de energía de 50 y 200 J/cm². En este caso se presenta un aceleramiento del proceso del desarrollo de *exocorium* especialmente para una densidad de energía de 1 J/cm². La mayor diferencia de tiempos se presenta para

una densidad de energía de 200 J/cm^2 con una duración de 32.02 ± 23.05 (min), es decir, este fue la mayor duración en que se desarrollaron el *exocorium* de los huevos.

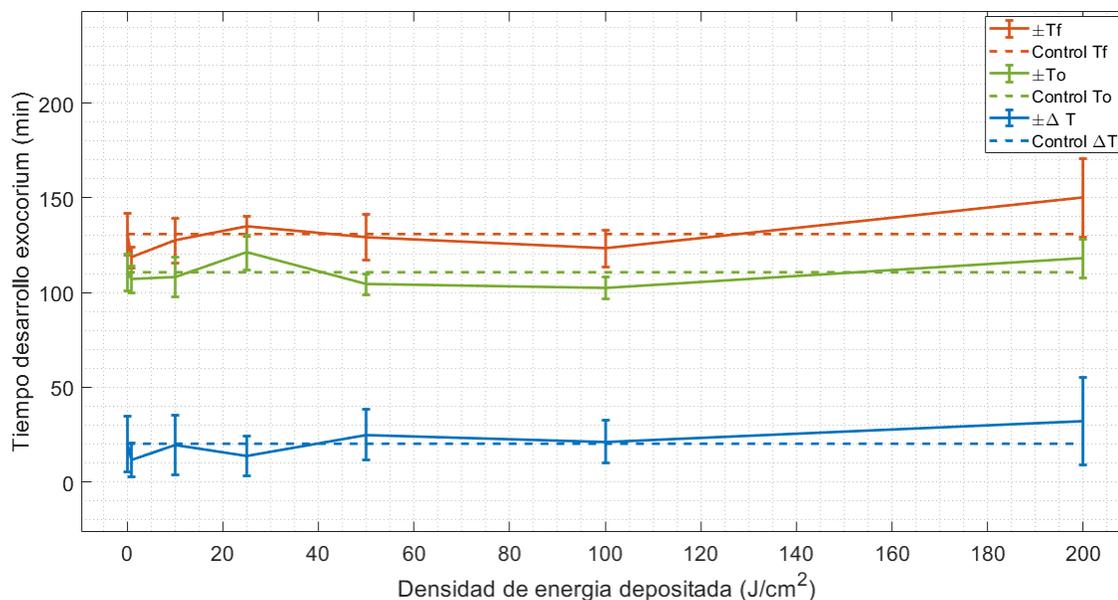


Figura 16. Primer conjunto 785 nm con un tiempo de irradiación de 1000 seg. En la imagen T_f = tiempo final del desarrollo del *exocorium*; T_o : tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*, ΔT : diferencia de tiempos entre tiempo final y tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*.

4.3 Determinación de los segundos parámetros de irradiación

Considerando los resultados del primer conjunto de irradiaciones, se observó un efecto estimulador importante en los tiempos de desarrollo cuando se utilizaron densidades de energía entre 1 a 5 J/cm^2 . Este resultado incitó la decisión de estudiar detalladamente condiciones de irradiación con potencia, irradiancia y energía menor a los utilizados en el primer conjunto de irradiaciones. Por lo que, se generaron nuevos valores de irradiancias y densidades de energía (Ver tabla 6).

Se excluyó el tiempo de irradiación correspondiente a 1000 segundos debido a la ausencia de aceleramiento significativo del proceso de desarrollo del *exocorium* en el primer conjunto de irradiaciones. Finalmente, como parte del procedimiento y tomando como referencia la tabla 1, se procedió a calcular nuevamente los respectivos valores de densidad de energía. Cabe mencionar que estos valores de densidad de energía se usaron para las tres longitudes de onda (785, 806 y 561 nm).

Tabla 6. Segundos parámetros de irradiancia.

Potencia (mW)	Irradiancia (mW/cm ²)	Densidad de Energía (J/cm ²)		
		Tiempo de irradiación (s)		
		10	100	500
0.001	0.00001	0.0001	0.001	0.005
0.019	0.0001	0.001	0.01	0.05
0.049	0.00025	0.0025	0.025	0.125
0.098	0.0005	0.005	0.05	0.25

4.4 Resultados utilizando los segundos parámetros de irradiación

4.4.1 Longitud de onda 785 nm

4.4.1.1 Tiempo de irradiación: 10 segundos.

Como se observa en la tabla 7 y la gráfica de la figura 17 al irradiar con esta longitud de onda y estableciendo un tiempo de irradiación de 10 segundos, tenemos que la diferencia de tiempo para el control tuvo un valor de 25.52 ± 9.71 (min). La diferencia de tiempos correspondiente a las densidades de energía de 0.0001, 0.001 y 0.0025 (J/cm²) se mantuvieron por debajo de este control. Siendo la densidad de energía de 0.0001 (J/cm²) la que presenta menor valor. Para una densidad de energía 0.005 (J/cm²) se sobrepasa el valor del control, siendo la densidad de energía con mayor diferencia de tiempo, es decir, fue la densidad de energía con mayor duración en el desarrollo de *exocorium*.

Tabla 7. Datos obtenidos para 785 nm para un tiempo de irradiación de 10 segundos.

Densidad de Energía depositada (J/cm ²)	Tiempo inicial To (min)	Tiempo final Tf (min)	Diferencia de tiempos (min)
0	86.86 ± 14.22	112.39 ± 6.37	25.52 ± 9.71
0.0001	91.41 ± 12.47	108.22 ± 10.74	16.81 ± 12.36
0.001	90.82 ± 13.37	113.14 ± 6.31	22.31 ± 8.21
0.0025	89.33 ± 10.21	108.83 ± 10.14	19.50 ± 14.04
0.005	90.45 ± 5.61	120.80 ± 9.38	30.34 ± 12.23

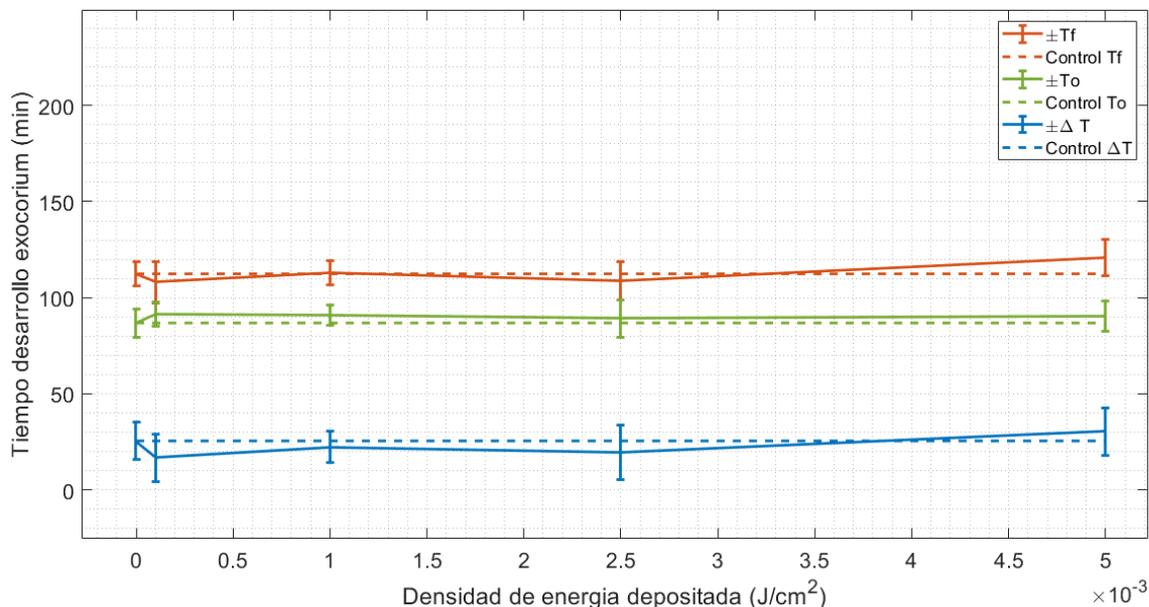


Figura 17.Datos 785 nm con un tiempo de irradiación de 10 seg. En la imagen Tf= tiempo final del desarrollo del *exocorium*; To: tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*, ΔT : diferencia de tiempos entre tiempo final y tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*.

4.4.1.2 Tiempo de irradiación: 100 segundos.

De la tabla 8 y la gráfica de la figura 18 se observa que el tiempo inicial del desarrollo de los huevos fue aproximadamente igual para todas las densidades de energía; Sin embargo, los tiempos finales se mantuvieron entre los 122 a 124 min a excepción para una densidad de energía de 0.01 (J/cm^2) donde se presente el mayor tiempo final de desarrollo con un valor de 132.59 ± 15.69 (min), y mayor valor en la diferencia de tiempos. Por el contrario, la menor diferencia de tiempo se presentó para una densidad de energía de 0.05 (J/cm^2).

Tabla 8.Datos obtenidos para 785 nm para un tiempo de irradiación de 100 segundos.

Densidad de Energía depositada (J/cm^2)	Tiempo inicial To (min)	Tiempo final Tf (min)	Diferencia de tiempos (min)
0	97.25 ± 10.90	124.39 ± 15.28	27.14 ± 18.77
0.001	98.71 ± 8.85	122.21 ± 13.59	23.49 ± 16.22
0.01	97.15 ± 11.49	132.59 ± 15.69	35.43 ± 19.45
0.025	97.92 ± 10.21	126.89 ± 18.71	28.97 ± 21.32
0.05	99.50 ± 13.92	122.17 ± 18.82	22.66 ± 23.41

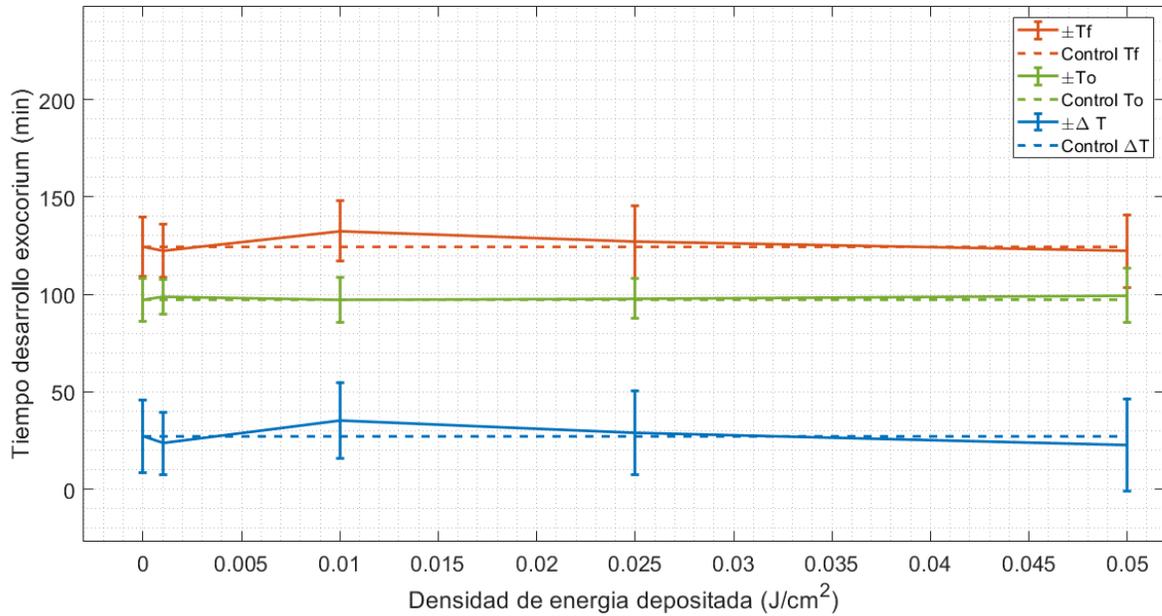


Figura 18. Datos 785 nm con un tiempo de irradiación de 100 seg. En la imagen Tf= tiempo final del desarrollo del *exocorium*; To: tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*, ΔT : diferencia de tiempos entre tiempo final y tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*.

4.4.1.3 Tiempo de irradiación: 500 segundos.

De la tabla 9 y la gráfica de la figura 19, se observa que los valores de densidad de energía de 0.005 y 0.05 (J/cm^2), tanto como sus tiempos iniciales como sus como sus tiempos finales se mantuvieron por debajo de las del control. Por consiguiente, sus diferencias de tiempos también fueron menores a este, es decir el desarrollo fue más rápido en estas densidades. Para densidades como 0.125 y 0.25 (J/cm^2), se observa que, aunque el desarrollo empezó antes con respecto al tiempo inicial del control, cada uno de sus procesos tomaron más tiempo que la diferencia de tiempos de control.

Tabla 9. Datos obtenidos para 785 nm para un tiempo de irradiación de 500 segundos.

Densidad de Energía depositada (J/cm^2)	Tiempo inicial To (min)	Tiempo final Tf (min)	Diferencia de tiempos (min)
0	114.91 ± 13.84	132.15 ± 15.06	17.24 ± 20.45
0.005	91.97 ± 7.58	107.49 ± 10.31	15.52 ± 12.79
0.05	110.10 ± 13.61	126.88 ± 12.80	16.78 ± 18.69
0.125	112.23 ± 7.82	138.23 ± 13.30	25.99 ± 15.43
0.25	97.75 ± 27.42	118.01 ± 6.19	20.26 ± 28.11

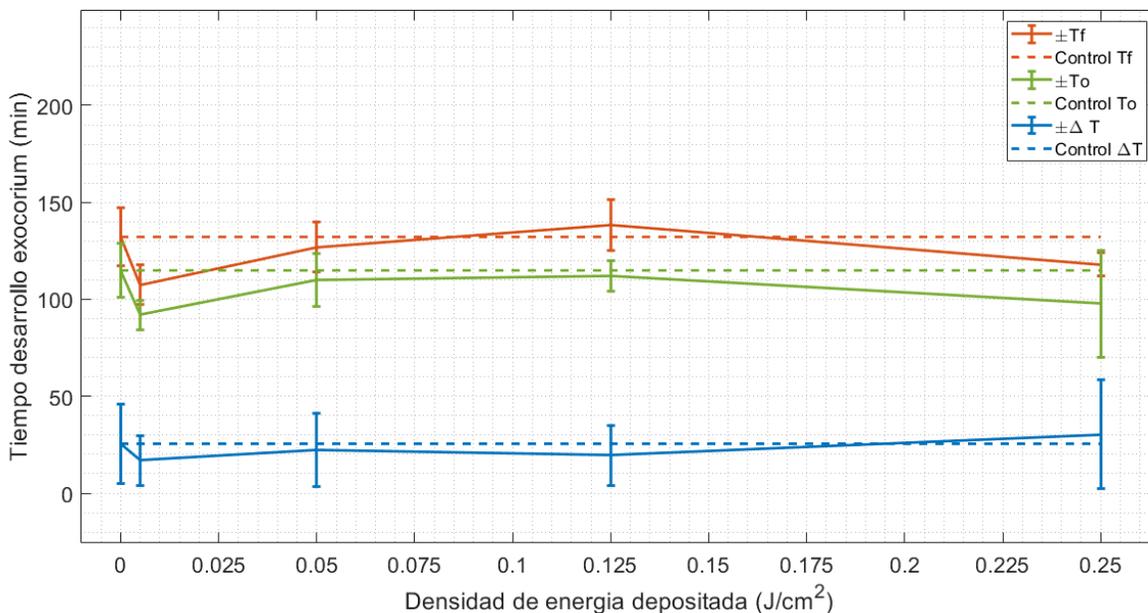


Figura 19. Datos 785 nm con un tiempo de irradiación de 500 seg. En la imagen Tf= tiempo final del desarrollo del *exocorium*; To: tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*, ΔT : diferencia de tiempos entre tiempo final y tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*.

4.4.2 Longitud de onda 806 nm

4.4.2.1 Tiempo de irradiación: 10 segundos

Teniendo en cuenta los valores de la diferencia de tiempos para una irradiación de 10 segundos con la longitud de onda de 806 nm, se observa que el control tiene un valor de 25.52 ± 9.71 min (Ver tabla 1 y gráfica de la figura 20). Teniendo este valor como nuestro punto referencia, vemos que para la densidad de energía como 0.0001 y 0.001 (J/cm²), esta diferencia de tiempos disminuye a 16.81 ± 12.36 min y 22.31 ± 8.21 min, respectivamente, es decir estos valores de densidad para este caso son los que presentan mayor efecto PBM.

Adicionalmente, se observa una ralentización altamente significativa del proceso de desarrollo del *exocorium* para una densidad de energía de 0.001 J/cm², tanto para el inicio como el final del mismo. Mientras que para una densidad mayor a 0.005 J/cm², este proceso es aproximadamente 5 minutos mayor respecto al control.

Tabla 10. Datos obtenidos para 806 nm para un tiempo de irradiación de 10 segundos.

Densidad de Energía depositada (J/cm ²)	Tiempo inicial To (min)	Tiempo final Tf (min)	Diferencia de tiempos (min)
0	98.94 ± 13.65	119.29 ± 15.22	20.35 ± 20.45
0.0001	92.39 ± 9.60	113.65 ± 10.35	21.25 ± 14.12
0.001	120.06 ± 10.16	148.67 ± 9.69	28.61 ± 14.04
0.0025	100.12 ± 7.08	126.78 ± 7.08	26.65 ± 10.02
0.005	121.74 ± 6.55	140.31 ± 8.22	18.56 ± 10.51

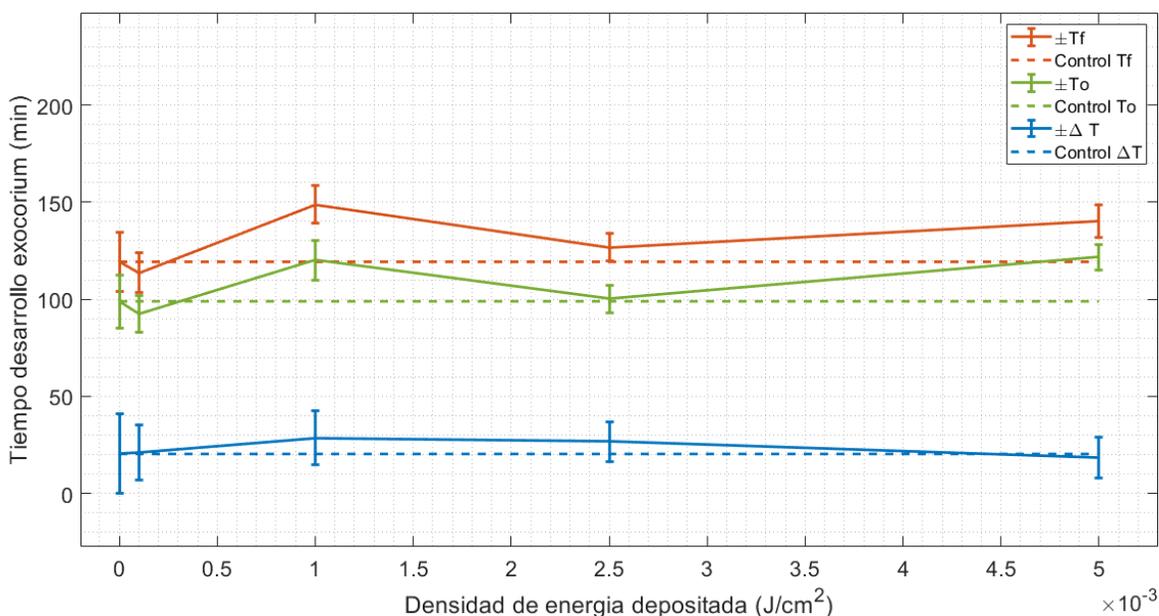


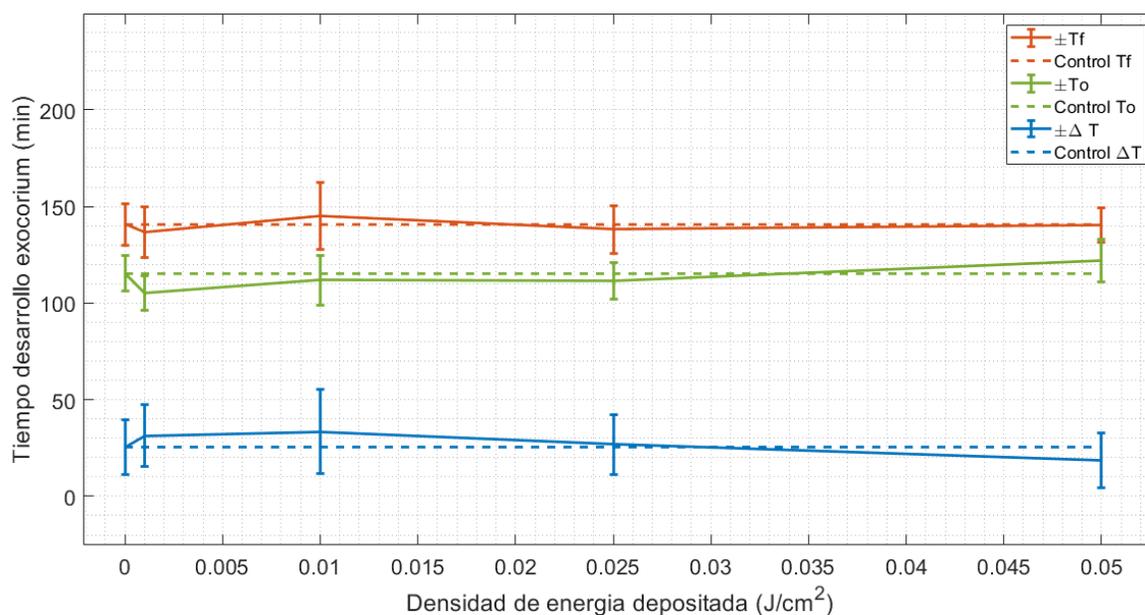
Figura 20. Datos 806 nm con un tiempo de irradiación de 10 seg. En la imagen Tf= tiempo final del desarrollo del *exocorium*; To: tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*, ΔT : diferencia de tiempos entre tiempo final y tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*.

4.4.2.2 Tiempo de irradiación: 100 segundos.

Para este caso en el que se irradió por 100 segundos las muestras (Ver tabla 11 y gráfica de la figura 21), se tiene que el control presentó un valor de diferencia de tiempo de 25.45 ± 14.27 min. La única densidad de energía que presentó un valor menor en esta diferencia de tiempo fue para 0.05 (J/cm²). Se observa que, aunque para esta densidad energía, su tiempo inicial de desarrollo empezó después que el tiempo inicial de control, no afectó en el hecho de que pudiera a llegar a durar más su desarrollo; esto lo vemos también reflejado en su tiempo final que llegó a ser un valor muy cercano al tiempo final del control.

Tabla 11.Datos obtenidos para 806 nm para un tiempo de irradiación de 100 segundos.

Densidad de Energía depositada (J/cm ²)	Tiempo inicial To (min)	Tiempo final Tf (min)	Diferencia de tiempos (min)
0	115.15 ± 9.18	140.61 ± 10.92	25.45 ± 14.27
0.001	105.25 ± 9.09	136.61 ± 13.33	31.35 ± 16.14
0.01	111.74 ± 13.01	145.18 ± 17.30	33.43 ± 21.65
0.025	111.25 ± 9.43	137.97 ± 12.24	26.71 ± 15.45
0.05	121.74 ± 11.06	140.31 ± 9.10	18.56 ± 14.32

**Figura 21.**Datos 806 nm con un tiempo de irradiación de 100 seg. En la imagen Tf= tiempo final del desarrollo del *exocorium*; To: tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*, ΔT: diferencia de tiempos entre tiempo final y tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*.

4.4.2.3 Tiempo de irradiación: 500 segundos.

Tabla 12.Datos obtenidos para 806 nm para un tiempo de irradiación de 500 segundos.

Densidad de Energía depositada (J/cm ²)	Tiempo inicial To (min)	Tiempo final Tf (min)	Diferencia de tiempos (min)
0	99.37 ± 14.36	128.87 ± 17.97	29.50 ± 23.01
0.005	94.69 ± 8.45	116.32 ± 13.12	21.63 ± 15.61
0.05	79.43 ± 8.26	98.35 ± 11.61	18.91 ± 14.25
0.125	103.12 ± 7.43	139.40 ± 13.00	36.27 ± 14.97
0.25	119.14 ± 10.54	158.33 ± 10.13	39.19 ± 14.63

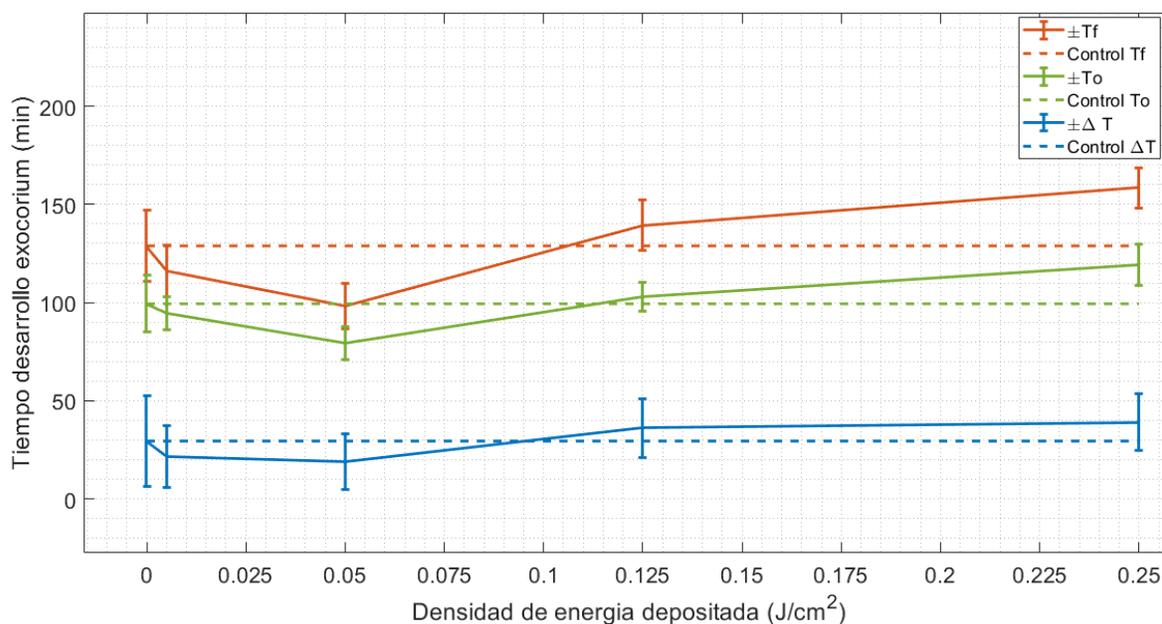


Figura 22. Datos 806 nm con un tiempo de irradiación de 500 seg. En la imagen Tf= tiempo final del desarrollo del *exocorium*; To: tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*, ΔT: diferencia de tiempos entre tiempo final y tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*.

Teniendo en cuenta los valores obtenidos en la tabla 12 y la gráfica de la figura 22, correspondientes a un tiempo de irradiación de 500 segundos, se observa que nuevamente las dos densidades de energía con valores de 0.005 y 0.05 (J/cm²) presentan un menor tiempo inicial respecto al tiempo inicial del control. Realizando sus respectivas diferencias de tiempo vemos que también el proceso de desarrollo del *exocorium* se adelanta 8 y 11 min, respectivamente.

Para el caso de la densidad de energía de 0.125 (J/cm²), su tiempo inicial también es mayor al tiempo inicial del control, así como también su tiempo final es mayor al tiempo final del control. Por consiguiente, cuando se realiza la diferencia de tiempo correspondiente, se obtiene que duro más el proceso de desarrollo.

Para el caso de una densidad de energía de 0.25 (J/cm²), se obtiene que tanto el tiempo inicial como final fueron mayores al del control, siendo ésta una de las densidades de energía que presentó una duración mayor de desarrollo.

4.4.3 Longitud de onda 561 nm

4.4.3.1 Tiempo de irradiación: 10 segundos.

Tabla 13. Datos obtenidos para 561 nm para un tiempo de irradiación de 10 segundos.

Densidad de Energía depositada (J/cm^2)	Tiempo inicial T_o (min)	Tiempo final T_f (min)	Diferencia de tiempos (min)
0	108.12 ± 11.54	130.11 ± 14.48	21.98 ± 18.52
0.0001	103.88 ± 10.35	126.00 ± 10.53	22.11 ± 14.77
0.001	114.07 ± 9.98	142.18 ± 11.20	28.11 ± 15.00
0.0025	89.94 ± 6.38	106.45 ± 10.77	16.50 ± 12.51
0.005	98.31 ± 7.25	115.82 ± 9.27	17.51 ± 11.77

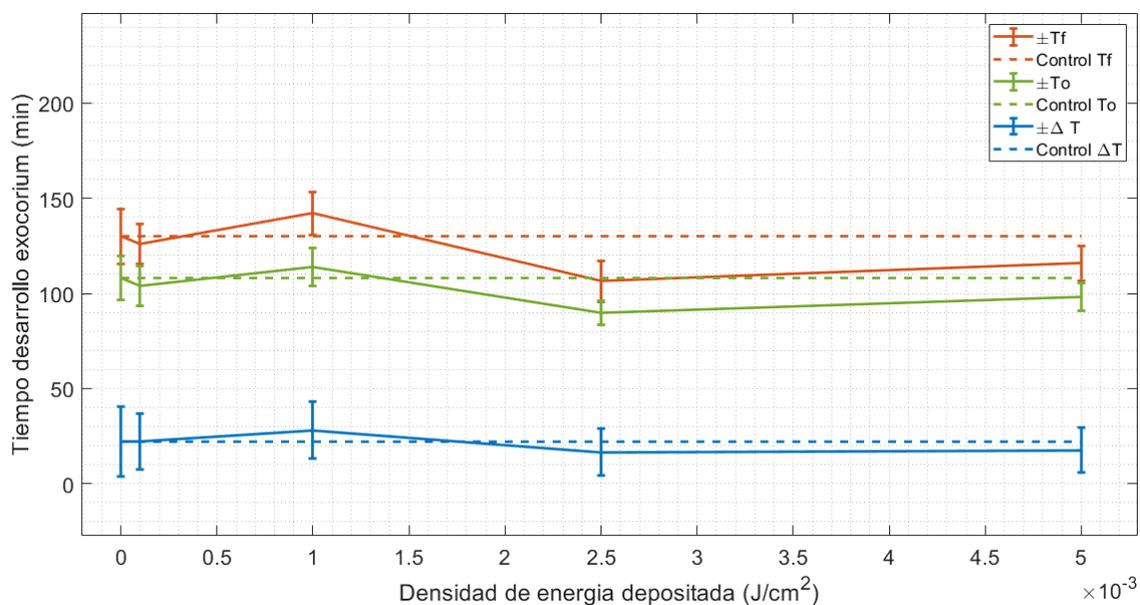


Figura 23. Datos 561 nm con un tiempo de irradiación de 10 seg. En la imagen T_f = tiempo final del desarrollo del *exocorium*; T_o : tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*, ΔT : diferencia de tiempos entre tiempo final y tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*.

Observamos que, para esta longitud de onda en un tiempo de irradiación de 10 segundos (Ver tabla 13) se presenta un comportamiento diferente a las otras longitudes de onda. En este caso se tiene una disminución en la diferencia de tiempos para las densidades de energía mayores. Estos tiempos fueron menores para los valores de densidad de energía de 0.0025 y 0.005 (J/cm^2).

Ya en los casos menores de la densidad de energía lo que ocurrió fue un aumento en estos tiempos respecto al control. En la gráfica de la figura 23, se observa como para densidades de energía menores, es decir 0.0001 y 0.001 (J/cm^2), los tiempos se mantienen mayores con respecto al control, mientras que para la densidad de energía de 0.0025 y 0.005 (J/cm^2), se encuentran por debajo de esta.

4.4.3.2 Tiempo de irradiación: 100 segundos.

Tabla 14. Datos obtenidos para 561 nm para un tiempo de irradiación de 100 segundos.

Densidad de Energía depositada (J/cm^2)	Tiempo inicial T_0 (min)	Tiempo final T_f (min)	Diferencia de tiempos (min)
0	95.43 \pm 8.38	113.62 \pm 9.55	18.18 \pm 12.71
0.001	100.72 \pm 8.79	126.20 \pm 11.16	25.47 \pm 14.21
0.01	96.81 \pm 15.00	118.03 \pm 17.08	21.22 \pm 22.73
0.025	81.23 \pm 6.28	101.96 \pm 7.14	20.73 \pm 9.51
0.05	88.86 \pm 3.88	106.99 \pm 5.18	18.13 \pm 6.35

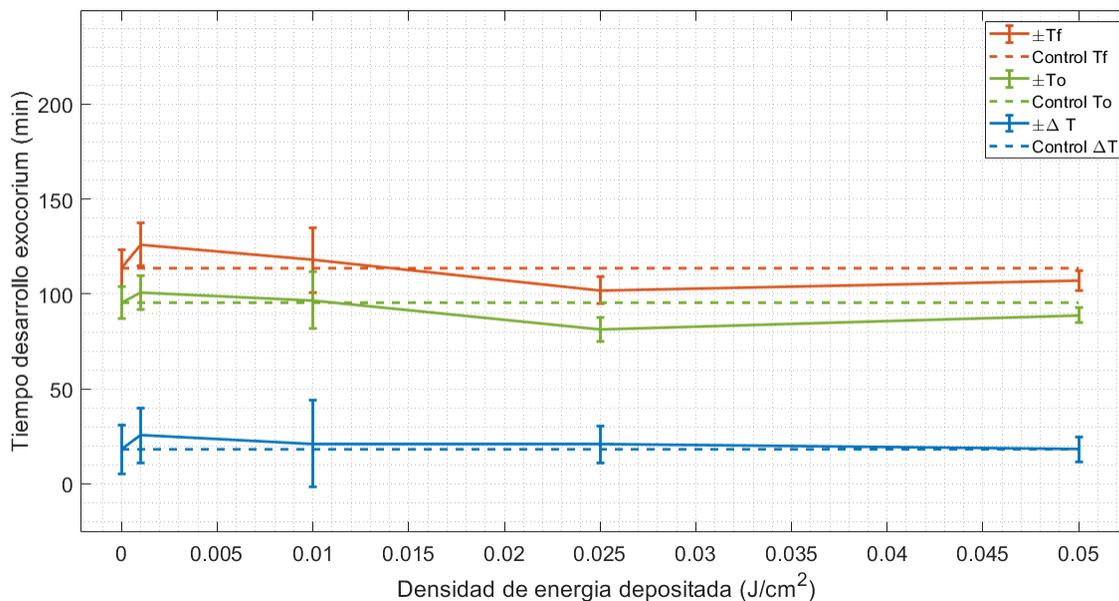


Figura 24. Datos 561 nm con un tiempo de irradiación de 100 seg. En la imagen T_f = tiempo final del desarrollo del *exocorium*; T_0 : tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*, ΔT : diferencia de tiempos entre tiempo final y tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*.

En este caso, de la tabla 14 y gráfica de la figura 24, se observa que, para las densidades de energía con valores de 0.001, 0.01 y 0.025 (J/cm^2), se obtiene valores de diferencia de tiempos mayores con respecto

a la diferencia de tiempo de control, teniendo como consecuencia que la duración del tiempo de desarrollo de *exocorium* sea mayor. Para la densidad de energía con el valor de $0.05 \text{ (J/cm}^2\text{)}$ aunque su tiempo inicial como final se mantuvo con valores por debajo de los respectivos tiempos del control, observamos que su diferencia de tiempo dio un valor muy parecido a las del control, con una diferencia de solo 5 segundos.

4.4.3.3 Tiempo de irradiación: 500 segundos.

Tabla 15. Datos obtenidos para 561 nm para un tiempo de irradiación de 500 segundos.

Densidad de Energía depositada (J/cm^2)	Tiempo inicial T_0 (min)	Tiempo final T_f (min)	Diferencia de tiempos (min)
0	92.83 ± 10.64	115.44 ± 14.70	22.61 ± 18.15
0.005	93.09 ± 19.65	119.53 ± 24.74	26.44 ± 31.59
0.05	86.96 ± 6.43	110.39 ± 12.42	23.43 ± 13.99
0.125	92.781 ± 11.53	112.50 ± 15.94	19.72 ± 19.68
0.25	94.38 ± 19.74	112.57 ± 21.48	18.18 ± 29.17

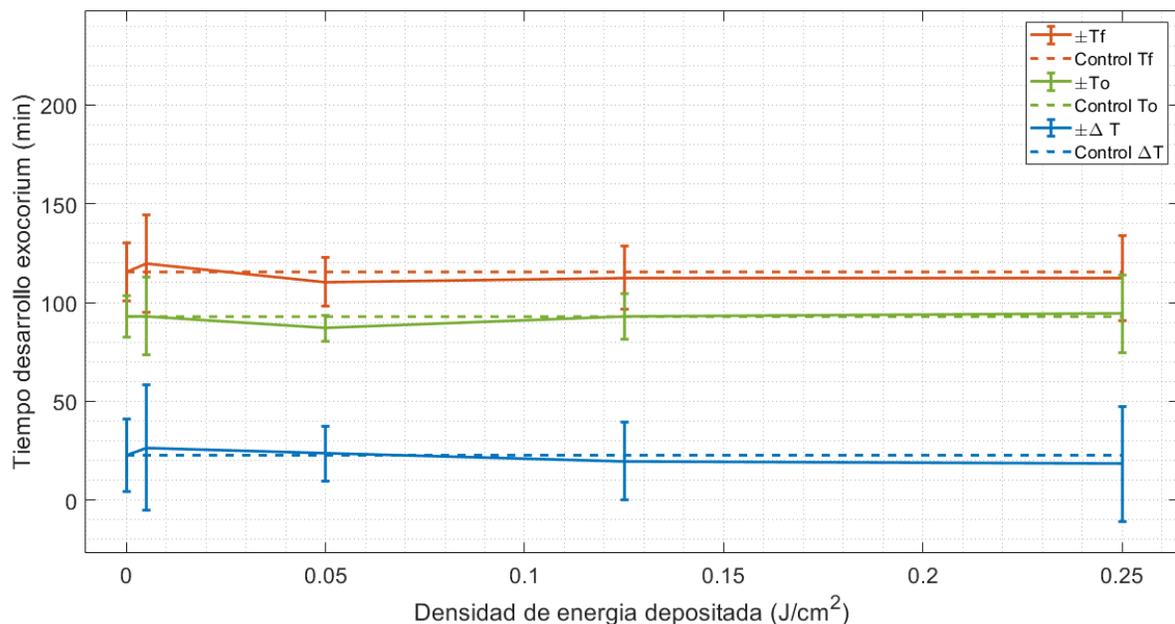


Figura 25. Datos 561 nm con un tiempo de irradiación de 500 seg. En la imagen T_f = tiempo final del desarrollo del *exocorium*; T_0 : tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*, ΔT : diferencia de tiempos entre tiempo final y tiempo inicial del desarrollo del *exocorium*.

Finalmente, para este caso, se observa en la tabla 15 y en la gráfica de la figura 25, que las densidades de energía con valores de 0.005 y $0.05 \text{ (J/cm}^2\text{)}$, presentan una diferencia de tiempo mayor respecto a la

diferencia de tiempo del control. Mientras que para densidades de energía como 0.125 y 0.25 (J/cm²) se observan valores menores que en el control. Siendo la densidad de energía de 0.25 J/cm² con la menor diferencia de tiempos entre inicio y fin de desarrollo del *exocorium*, es decir, fue la densidad de energía que presentó menor tiempo en el desarrollo del *exocorium*.

4.4.4 Discusión de resultados de los segundos parámetros

Se observa que, a pesar de la temperatura de 21°C utilizada en el laboratorio, que pudo haber prolongado el proceso de desarrollo del *exocorium* más allá de los resultados previamente observados de aprox. 90 minutos, esto no impidió, (como también que al ser irradiados) que el desarrollo del *exocorium* se efectuara. Además, se pudo observar un proceso estimuladorio en este desarrollo. Este proceso puede asociarse con la aparición de una disminución significativa en la diferencia de tiempos en ciertas densidades de energía. Este fenómeno se puede apreciar en las figuras 17, 20 y 23, correspondientes a las longitudes de onda de 785, 806 y 561 nm, respectivamente. Estas figuras comparten el tiempo de irradiación de 10 segundos, donde solo la longitud de onda de 785 nm muestra una reducción en las diferencias de tiempos para las densidades de 0.0001, 0.001 y 0.0025 J/cm² en comparación con el control. Para las longitudes de onda de 806 nm y 561 nm, la densidad de energía que presenta una reducción en la diferencia de tiempos es de 0.005 J/cm². Para un tiempo de irradiación de 100 segundos (ver figuras 18, 21 y 24), tanto para las longitudes de onda de 785, 806 y 561 nm, la densidad de energía de 0.05 J/cm² es la que muestra el menor valor en la diferencia de tiempos respecto al control. Finalmente, para un tiempo de irradiación de 500 segundos, las longitudes de onda de 785 nm y 806 nm (ver figuras 19 y 22) comparten en común que, para una densidad de energía de 0.005 y 0.05 J/cm², presentan la menor diferencia de tiempos. Sin embargo, para una longitud de onda de 561 nm (ver figura 25), las densidades de energía de 0.125 y 0.25 J/cm² muestran valores menores. Para el caso del proceso inhibitorio se podría asociar a dichas diferencias de tiempos es que fueron mucho mayores respecto a los controles, en el caso general específicamente para densidades de energía mayores a 0.125 J/cm². Ahora, si bien este trabajo de investigación se enfoca únicamente en el comportamiento de la parte externa del huevo, es importante considerar que también podrían haber ocurrido procesos estimulantes e inhibitorios en su interior. Estos procesos podrían proporcionarnos información detallada sobre la viabilidad del desarrollo completo de la larva dentro de cada huevo. Es plausible suponer que nuestros resultados podrían reflejar una situación en la que las diferencias de tiempos menores obtenidas en dichas densidades de energía podrían haber

contribuido a la aceleración del desarrollo de la cascara del huevo y del embrión, preparándolo para una eclosión rápida e incluso un incremento en la resistencia a la desecación. Del mismo modo, en los casos en los que las diferencias de tiempo que fueron mayores y ralentizaron el desarrollo del *exocorium*, esto podría no haber representado ningún impedimento para la eclosión, comportamiento que debe estudiarse a profundidad.

Considerando la complejidad de los procesos estimuladores e inhibitorios que podrían estar ocurriendo dentro de los huevos de la especie *Aedes aegypti*, es evidente que hay múltiples resultados posibles que podrían surgir. Esta investigación proporciona una visión inicial del efecto de la fotobiomodulación sobre el *exocorium* de los huevos de mosquito, pero queda claro que aún hay mucho por seguir investigando. Es crucial continuar explorando más a fondo cómo estos procesos internos podrían influir en el desarrollo embrionario y, por lo tanto, en el éxito de la eclosión.

4.5 Análisis visual del desarrollo del *exocorium*

Durante el proceso de monitorio y adquisición de datos se evidencio que el inicio del desarrollo del *exocorium* se presentaba en diferentes ubicaciones del huevo. En la figura 26 se muestra las tres frecuentes y diferentes maneras que se observaron. El circulo azul señala el inicio del desarrollo del *exocorium* y las flechas la dirección del mismo.

Las tres diferentes maneras de desarrollo que se observaron fueron el desarrollo de polo a polo; (entiéndase la referencia polo a polo como un extremo del huevo a otro) (PP), este desarrollo se presenta de manera uniforme de un polo hacia el otro hasta que el *exocorium* del huevo queda completamente desarrollado.

El segundo desarrollo es desde el centro a uno de los polos (CP_1P_2), aquí se observó como el inicio del desarrollo ya no se presenta desde un polo del huevo sino desde el centro extendiéndose primero hacia uno de los polos y luego hacia el otro. Por último, se evidencia un desarrollo de manera uniforme, extendiéndose simultáneamente desde el centro del huevo hacia ambos polos (CPP).

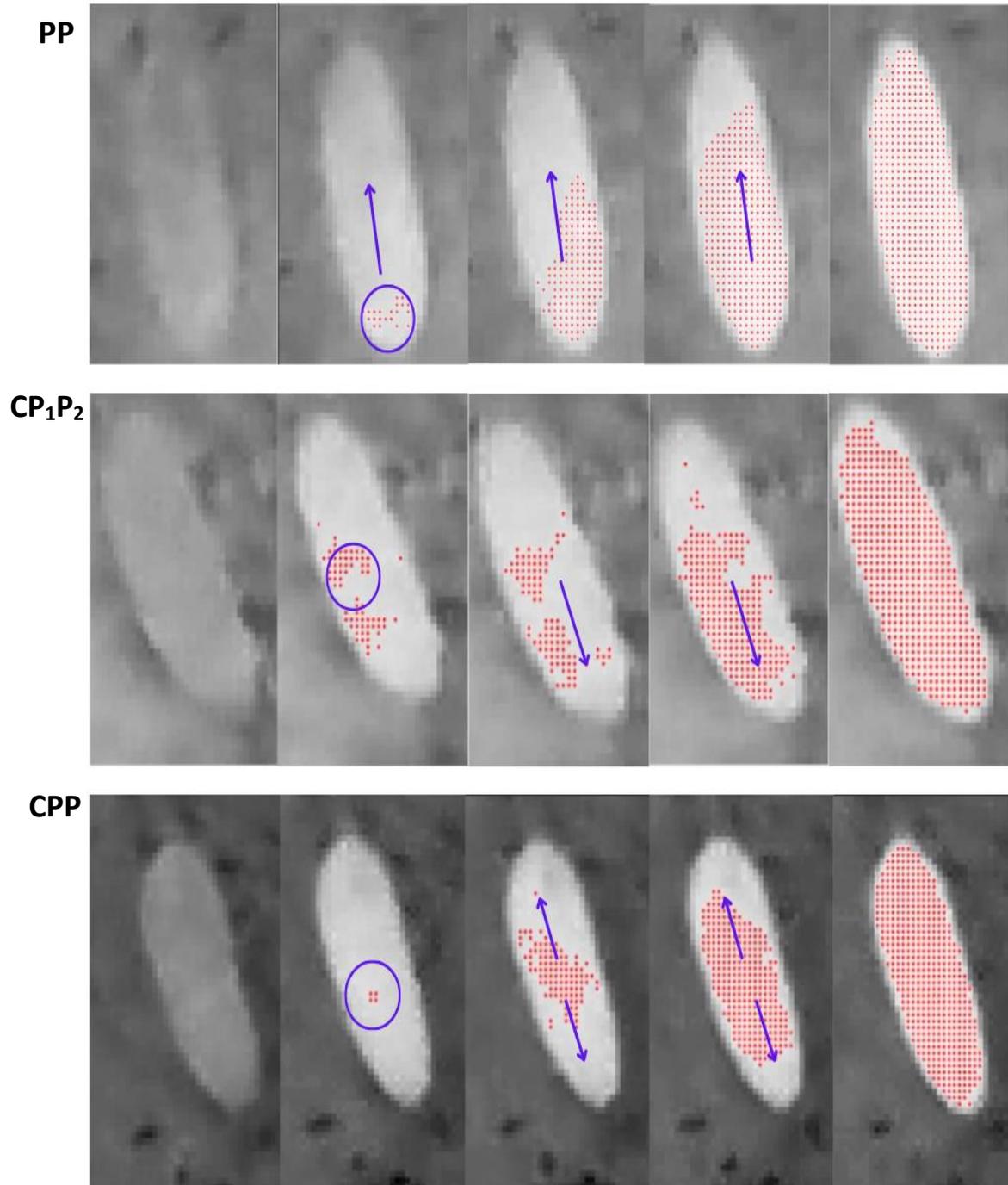


Figura 26. Diferente desarrollo visual del *exocorium* de los huevos. Desarrollo de polo a polo (PP); Desarrollo desde el centro a uno de los polos (CP₁P₂); Desarrollo uniforme desde el centro hasta los dos polos (CPP). En la imagen el círculo azul señala el inicio.

Es así, como en la figura 27, se muestra el número total de huevos irradiados que se utilizaron en las longitudes de onda de 785 nm, 806 nm y 561 nm. Además, el número total de huevos irradiados para cada longitud de onda, se dividió en las tres clasificaciones: PP (color azul), CP₁P₂(color amarillo) y CPP (color naranja). Se evidencia que el para cada uno de las longitudes de onda, el mayor comportamiento que se presento fue el desarrollo de polo a polo (PP).

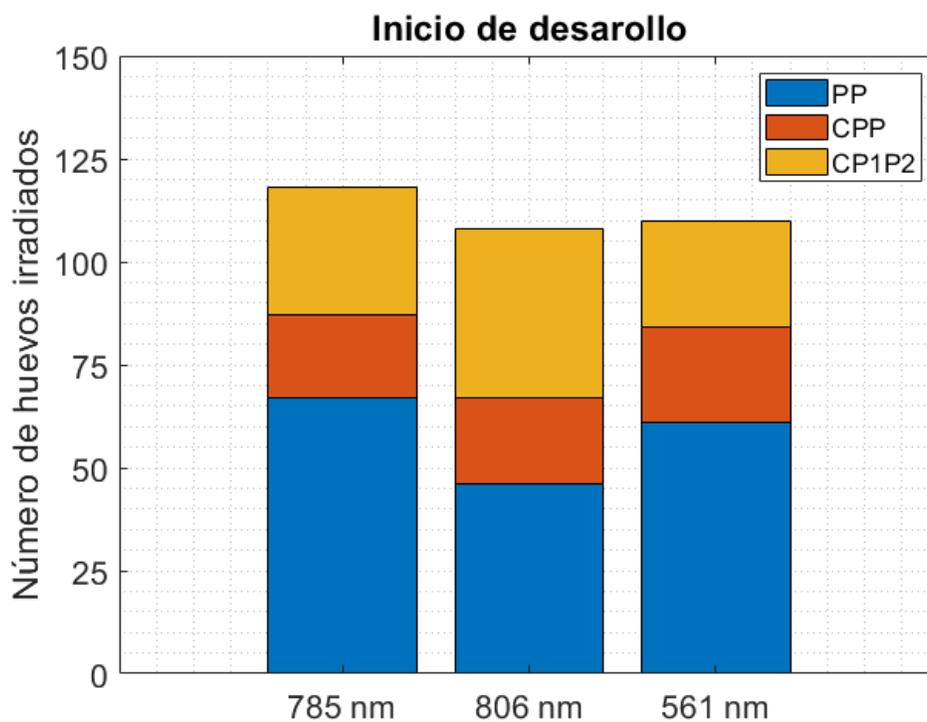


Figura 27. Número de huevos que presenta cada una etiqueta de desarrollo para cada una de las diferentes longitudes de onda. En la gráfica: (PP) desarrollo de polo a polo; (CP₁P₂) desarrollo desde el centro a uno de los polos; (CPP) Desarrollo uniforme desde el centro hasta los dos polos.

Capítulo 5. Conclusiones

La investigación se centró en analizar las variaciones en los tiempos de desarrollo del *exocorium* de los huevos de mosquito *Aedes aegypti* para diferentes tiempos de irradiación y densidades de energía producidas con longitudes de onda específicas (561 nm, 785 nm y 806 nm). La elección de las densidades de energía y tiempos de irradiación se fundamentó ya que la fotobiomodulación trabaja a niveles de irradiancia y densidad superficial de energía relativamente bajos (típicamente menores a 200 mW/cm² y de 0.1 a 100 J/cm²).

Los resultados revelaron que, para la longitud de onda de 785 nm, se observó una reducción significativa en la diferencia de tiempos solo para densidades de 0.0001, 0.001 y 0.0025 (J/cm²) durante un tiempo de irradiación de 10 segundos. Para un tiempo de irradiación de 100 segundos, la densidad de energía de 0.001 y 0.05 (J/cm²) muestra la menor diferencia de tiempos en comparación con otras densidades. Para un tiempo de irradiación de 500 segundos, las densidades de energía de 0.005 y 0.05 (J/cm²) presentan las menores diferencias de tiempos.

Los resultados revelaron que, para la longitud de onda de 806 nm, se observó que, para un tiempo de irradiación de 10 segundos, la reducción en la diferencia de tiempos se tiene solo para densidades de 0.005 (J/cm²) en comparación con el control. Para un tiempo de irradiación de 100 segundos, la densidad de energía de 0.05 (J/cm²) muestra la menor diferencia de tiempos en comparación con otras densidades. Para un tiempo de irradiación de 500 segundos, las densidades de energía de 0.005 y 0.05 (J/cm²) presentan las menores diferencias de tiempos

Se observó que, para un tiempo de irradiación de 10 segundos, la longitud de onda de 561 nm muestra una reducción en la diferencia de tiempos únicamente para densidades de energía de 0.0025 y de 0.005 (J/cm²). Para un tiempo de irradiación de 100 segundos, la densidad de energía de 0.05 (J/cm²) muestra la menor diferencia de tiempos en comparación con otras densidades. Para un tiempo de irradiación de 500 segundos, las densidades de energía de 0.125 y 0.25 (J/cm²) muestran las menores diferencias de tiempos, siendo contrario a las otras longitudes de onda.

Estos hallazgos sugieren que la longitud de onda de 785 nm y 806 nm puede tener un impacto diferencial en los procesos de fotobiomodulación. La reducción en la diferencia de tiempos se evidencio

especialmente para 785 nm en un tiempo de irradiación de 10 seg y para 806 nm fue para los tiempos de irradiación de 100 seg y 500 seg., donde esta reducción específica tiene implicaciones importantes para aplicaciones prácticas mencionadas en el marco de referencia.

Las diferencias en los tiempos de desarrollo del *exocorium*, parecen depender tanto de la longitud de onda como de la densidad de energía, y estas variaciones son más notables en algunos casos específicos según la combinación de longitud de onda, tiempo de irradiación y densidad de energía.

El análisis detallado de los datos reveló aspectos intrigantes en el desarrollo del *exocorium* de los huevos bajo diferentes longitudes de onda y tiempos de irradiación. Más allá de las variaciones en los tiempos iniciales y finales, se destacó la singularidad del inicio del desarrollo, evidenciando patrones específicos en la distribución del huevo. La definición del inicio, basada en la condición de oscuridad establecida, permitió la identificación y marcado de píxeles con marcadores rojos, revelando tres distintas modalidades en las que los huevos exhibieron este crucial momento inicial de desarrollo. Este enfoque innovador de análisis proporciona una comprensión más detallada de la dinámica del desarrollo del *exocorium*, brindando perspectivas valiosas para futuras investigaciones en este campo.

Contrastando con investigaciones anteriores en fotobiomodulación, nuestros resultados muestran un efecto biológico significativo en densidades de energía mucho menores a las cantidades frecuentemente reportadas en estudios fotobiomodulatorios. Esta observación es una muestra de cómo la presentación específica y detallada de los valores de densidades de energía pueden ser de gran utilidad para investigaciones futuras. Esto es relevante ya que otros estudios no ofrecen esta información de manera explícita dejando evidencia de la importancia de reportar adecuadamente los parámetros que determinan la dosis óptica para evitar incertidumbres con respecto a la metodología utilizada.

Trabajo a Futuro

Se recomienda realizar investigaciones adicionales para profundizar la relación entre la longitud de onda, densidad de energía y tiempo de irradiación en una siguiente etapa posterior como la eclosión. Esta aproximación nos permitirá no solo entender mejor los resultados observados, sino también identificar posibles puntos de intervención para futuras investigaciones, las cuales podrían dirigirse a aspectos como el crecimiento y desarrollo, lo que podría ofrecer una comprensión más completa de los mecanismos involucrados de la especie estudiada en esta tesis.

Literatura citada

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. (4th ed). New York: Garland Science. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26882/>
- Berry, E. A., Guergova-Kuras, M., Huang, L. S., & Crofts, A. R. (2000). Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annual Review of Biochemistry*, 69. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.1005>
- Cassano, P., Cusin, C., Mischoulon, D., Hamblin, M. R., De Taboada, L., Pisoni, A., Chang, T., Yeung, A., Ionescu, D. F., Petrie, S. R., Nierenberg, A. A., Fava, M., & Iosifescu, D. V. (2015). Near-Infrared Transcranial Radiation for Major Depressive Disorder: Proof of Concept Study. *Psychiatry Journal*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/352979>
- Chaves, M. E. de A., Piancastelli, A. C. C., de Araújo, A. R., & Pinotti, M. (2014). Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. In *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 89(4). <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142519>
- Cusack, L. M., Mayer, J., Cutler, D. C., Rissi, D. R., & Divers, S. J. (2018). Gross and histologic evaluation of effects of photobiomodulation, silver sulfadiazine, and a topical antimicrobial product on experimentally induced full-thickness skin wounds in green iguanas (*Iguana iguana*). *American Journal of Veterinary Research*, 79(4). <https://doi.org/10.2460/ajvr.79.4.465>
- De Freitas, L. F., & Hamblin, M. R. (2016). Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 22(3). <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2016.2561201>
- Disner, S. G., Beevers, C. G., & Gonzalez-Lima, F. (2016). Transcranial Laser Stimulation as Neuroenhancement for Attention Bias Modification in Adults with Elevated Depression Symptoms. *Brain Stimulation*, 9(5). <https://doi.org/10.1016/j.brs.2016.05.009>
- Dompe, C., Moncrieff, L., Matys, J., Grzech-Leśniak, K., Kocherova, I., Bryja, A., Bruska, M., Dominiak, M., Mozdziak, P., Skiba, T. H. I., Shibli, J. A., Volponi, A. A., Kempisty, B., & Dyszkiewicz-Konwińska, M. (2020). Photobiomodulation—underlying mechanism and clinical applications. In *Journal of Clinical Medicine*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/jcm9061724>
- Escudero, J. S. B., Perez, M. G. B., de Oliveira Rosso, M. P., Buchaim, D. V., Pomini, K. T., Campos, L. M. G., Audi, M., & Buchaim, R. L. (2019). Photobiomodulation therapy (PBMT) in bone repair: A systematic review. In *Injury*, 50(11), 1853–1867. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2019.09.031>
- Esmat, S. M., Hegazy, R. A., Gawdat, H. I., Abdel Hay, R. M., Allam, R. S., El Naggar, R., & Moneib, H. (2017). Low level light-minoxidil 5% combination versus either therapeutic modality alone in management of female patterned hair loss: A randomized controlled study. *Lasers in Surgery and Medicine*, 49(9). <https://doi.org/10.1002/lsm.22684>
- Glass, G. E. (2021). Photobiomodulation: The clinical applications of low-level light therapy. *Aesthetic Surgery Journal*, 41(6), 723–738. <https://doi.org/10.1093/asj/sjab025>

- Hamblin, M. R. (2016). History of low-level laser (light) therapy. In *Handbook of Low-Level Laser Therapy*. Pan Stanford Publishing Pte. Ltd. <https://doi.org/10.4032/9789814669610>
- Hamblin, M. R. (2017). Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. In *AIMS Biophysics*, 4(3),337–361. American Institute of Mathematical Sciences. <https://doi.org/10.3934/biophy.2017.3.337>
- Hamblin, M. R., Huang, Y. Y., & Heiskanen, V. (2019). Non-mammalian Hosts and Photobiomodulation: Do All Life-forms Respond to Light? In *Photochemistry and Photobiology*, 95(1). <https://doi.org/10.1111/php.12951>
- Hunter, D. J. B., Oganessian, V. S., Salerno, J. C., Butler, C. S., Ingledew, W. J., & Thomson, A. J. (2000). Angular dependences of perpendicular and parallel mode electron paramagnetic resonance of oxidized beef heart cytochrome c oxidase. *Biophysical Journal*, 78(1). [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76606-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76606-9)
- Liebert, A., & Kiat, H. (2021). The history of light therapy in hospital physiotherapy and medicine with emphasis on Australia: Evolution into novel areas of practice. *Physiotherapy Theory and Practice*, 37(3). <https://doi.org/10.1080/09593985.2021.1887060>
- Maksimovich, I. V. (2015). Dementia and Cognitive Impairment Reduction after Laser Transcatheter Treatment of Alzheimer's Disease. *World Journal of Neuroscience*, 05(03). <https://doi.org/10.4236/wjns.2015.53021>
- Maver-Biscanin, M., Mravak-Stipetic, M., Jerolimov, V., & Biscanin, A. (2004). Fungicidal effect of diode laser irradiation in patients with denture stomatitis. *Lasers in Surgery and Medicine*, 35(4). <https://doi.org/10.1002/lsm.20075>
- Moro, C., Massri, N. E., Torres, N., Ratel, D., De Jaeger, X., Chabrol, C., Perraut, F., Bourgerette, A., Berger, M., Purushothuman, S., Johnstone, D., Stone, J., Mitrofanis, J., & Benabid, A. L. (2014). Photobiomodulation inside the brain: a novel method of applying near-infrared light intracranially and its impact on dopaminergic cell survival in MPTP-treated mice. *Journal of neurosurgery*, 120(3), 670–683. <https://doi.org/10.3171/2013.9.JNS13423>
- Morries, L. D., Cassano, P., & Henderson, T. A. (2015). Treatments for traumatic brain injury with emphasis on transcranial near-infrared laser phototherapy. In *Neuropsychiatric Disease and Treatment*,11. <https://doi.org/10.2147/NDT.S65809>
- Nadimi, M., Sun, D. W., & Paliwal, J. (2021). Recent applications of novel laser techniques for enhancing agricultural production. In *Laser Physics*, 31(5). IOP Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1088/1555-6611/abebda>
- NASA Official Dave Williams. (2022, November 17). *Sun Fact Sheet*. <https://nssdc.gsfc.nasa.gov/planetary/factsheet/sunfact.html>. Consultado el día 15 noviembre del 2023.
- Neustadt, J., & Pieczenik, S. R. (2008). Medication-induced mitochondrial damage and disease. In *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(7). <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700075>

- Peplow, P. V., Chung, T. Y., & Baxter, G. D. (2010). Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: A review of human and animal studies. In *Photomedicine and Laser Surgery*, 28(1). <https://doi.org/10.1089/pho.2010.2771>
- Salehpour, F., Mahmoudi, J., Kamari, F., Sadigh-Eteghad, S., Rasta, S. H., & Hamblin, M. R. (2018). Brain Photobiomodulation Therapy: A Narrative Review. In *Molecular Neurobiology*, 55(8), 6601–6636). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0852-4>
- Wang, Y., Huang, Y. Y., Wang, Y., Lyu, P., & Hamblin, M. R. (2016). Photobiomodulation (blue and green light) encourages osteoblastic-differentiation of human adipose-derived stem cells: Role of intracellular calcium and light-gated ion channels. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep33719>
- Watson, A. H., & Brundage, C. M. (2019). Photobiomodulation as an Inflammatory Therapeutic Following Dental Prophylaxis in Canines. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, 37(5). <https://doi.org/10.1089/photob.2018.4614>
- Winkler, C. J. (2019). Laser surgery in veterinary medicine. In *Laser Surgery in Veterinary Medicine*. <https://doi.org/10.1002/9781119486053>
- Xiang, X. Y., Chen, J., Xu, W. X., Qiu, J. R., Song, L., Wang, J. T., Tang, R., Chen, D., Jiang, C. Z., & Huang, Z. (2021). Dehydration-induced wrky transcriptional factor mfwrky70 of myrothamnus flabellifolia enhanced drought and salinity tolerance in arabidopsis. *Biomolecules*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/biom11020327>

Anexos

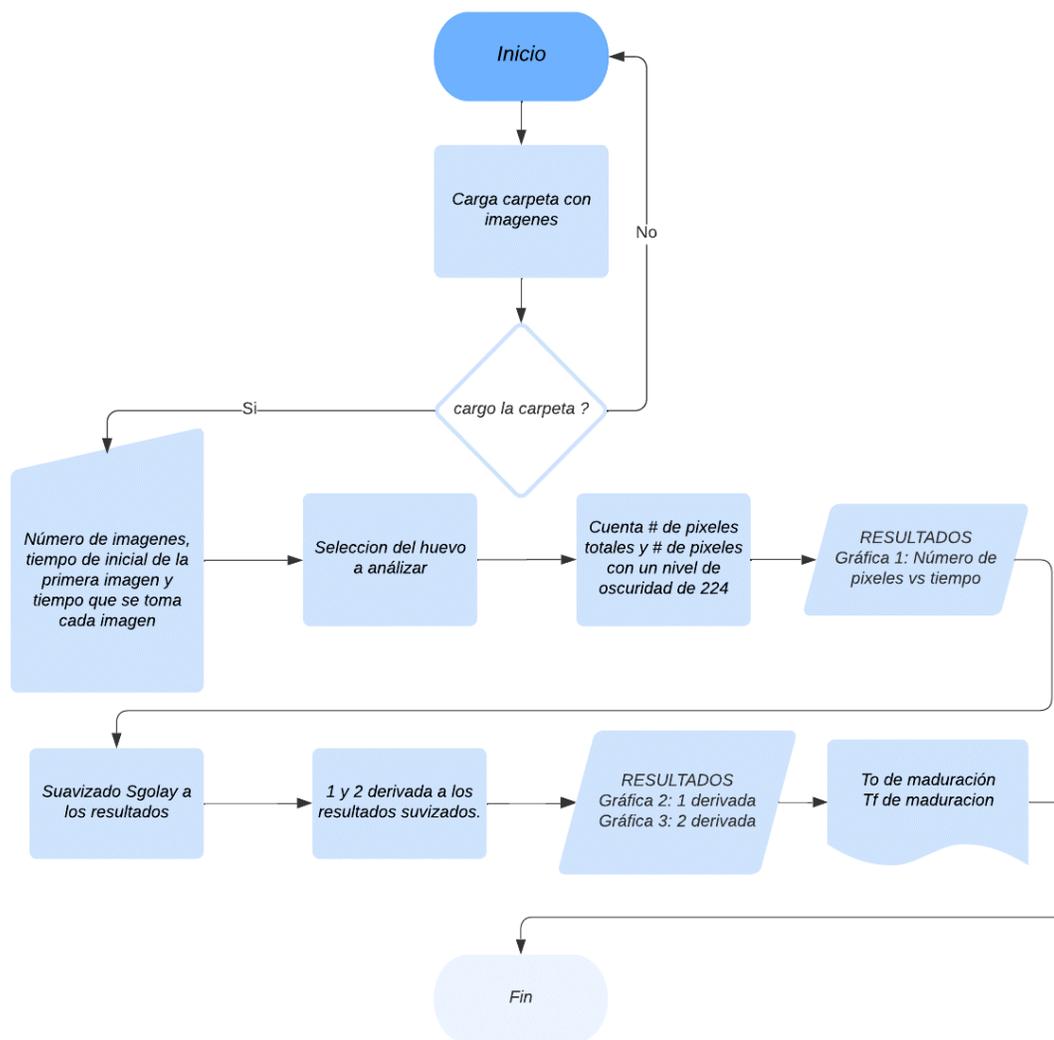


Figura 28.Diagrama de flujo del programa de análisis de imágenes.

```

clc; clear; close all

%% Imagen referencia
%Se elige la última imagen de cada carpeta
FotoReferencia=('Huevo (317).png');
[signal] = imread(FotoReferencia);
[fi,co,dim]=size(signal);
figure('units','normalized','outerposition',[0 0 1 1]);
imagesc (signal); grid on; grid minor;

%% Seleccionar Huevo con dos puntos
[xo,yo] = ginput(2); xo=round(xo); yo=round(yo);
close all;
filasH=min(yo):max(yo);
columH=min(xo):max(xo);

%% Tiempo de cada imagen
CantidadImágenes=317; % Cantidad de imágenes en la carpeta
t0=15.76; % tiempo (seg) imagen inicial
delt=34.28; % tiempo (seg) que se toma cada foto
T1=(t0+(CantidadImágenes-1)*delt)/60; % tiempo final en min
T2=linspace(t0,T1,CantidadImágenes)'; % ' cambia fila por columna o viceversa
T_final=size(T2);
T_final=T_final(1);

%% Variables inicializadas
Resultados=zeros(T_final,1);
time=zeros(T_final,1);
pixel_blancos=zeros(T_final,1);

%%
for p=2:T_final
    %analiza cada imagen
    filename=(['Huevo(' num2str(p) ').png']);
    [signal2] = imread(filename);
    %vuelve la imagen original en blanco-negro
    signalbw=rgb2gray(signal2);
    %cambia lo negro a blanco solo la region seleccionada
    I=imcomplement(signalbw);
    % Matriz del Huevo recortado
    Huevo=I(filasH,columH);

    %% Número de pixeles totales
    % Obtiene las dimensiones del huevo cortado
    [filas, columnas, ~] = size(Huevo);
    % Calcula el número total de píxeles
    num_Pixeles = filas * columnas;
    % Muestra número total de píxeles
    disp([num2str(num_Pixeles), ' # pixeles totales.']);

```



```

%% FIGURAS
%% RESULTADOS ORIGINALES
figure (2)
subplot(2,1,1); % Dividir la ventana en 2 filas y 1 columna
plot(T2, Resultados, 'k'); % Graficar y1 en rojo con una línea sólida
title('Resultados Originales '); % Título de la primera gráfica
xlabel('Tiempo (min)'); % Etiqueta del eje x
ylabel('Número de Pixeles'); % Etiqueta del eje y
ylim([0 max(num_Pixeles)])

%% RESULTADOS SUVIZADOS SGOLAY
subplot(2,1,2);
plot(time_s1, smoothed, 'b');
title('Resultados Suavizados'); % Título de la primera gráfica
xlabel('Tiempo (min)'); % Etiqueta del eje x
ylabel('Número de Pixeles'); % Etiqueta del eje y
ylim([0 max(num_Pixeles)])
subplot(2,1,1);
% Obtener el objeto de los ejes de la primera gráfica
ax1 = gca;
% Reducir el ancho de los ejes
ax1.Position(3) = ax1.Position(3) - 0.02;
%% 1 DERIVADA PARA EL SUAVIZADO
figure (3)
%subplot(2,1,1);
plot(time_suavizado, first_derivativeS, 'b');
line([xMaxI1 xMaxI1], [0 maxV1], 'LineWidth', 1, 'LineStyle', '--', 'Color', 'k') ;
line([0 xMaxI1], [maxV1 maxV1], 'LineWidth', 1, 'LineStyle', '--', 'Color', 'k') ;
hold on;
legend('f'(x)');
% Punto rojo en el máximo
scatter(xMaxI1, maxV1, 'r', 'filled', 'DisplayName', 'Vo');
% Marcar el segundo punto en azul
scatter(posVf1, max_Vf1, 'm', 'filled', 'DisplayName', 'Vf');
title('Primera Derivada Resultados Suavizados');
xlabel('Tiempo (min)');
ylabel('(Número de pixeles/min)');
%% 2 DERIVADA PARA EL SUAVIZADO
figure (4)
%subplot(2,1,2);
plot(time_suavizado, second_derivativeS, 'b');
line([xMaxI2 xMaxI2], [0 maxV2], 'LineWidth', 1, 'LineStyle', '--', 'Color', 'k') ;
line([0 xMaxI2], [maxV2 maxV2], 'LineWidth', 1, 'LineStyle', '--', 'Color', 'k') ;
hold on;
legend('f''(x)');
% Punto rojo en el máximo
scatter(xMaxI2, maxV2, 'k', 'filled', 'DisplayName', 'Ao');
title('Segunda Derivada Resultados Suavizados');
xlabel('Tiempo (min)');
ylabel('(Número de pixeles/min^2)');

%% ARCHIVO PARA GUARDAR LOS DATOS
nombreArchivo = 'datos.txt';
% Abre el archivo en modo de escritura en modo de agregar (append)
fileID = fopen(nombreArchivo, 'a');
% Verifica si el archivo se abrió correctamente
if fileID == -1
    error('No se pudo abrir el archivo para escritura.');
```

Figura 29. Código del programa.