

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 SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, 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.

CICESE© 2025. Todos los derechos reservados

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



---

**Maestría en Ciencias  
en Óptica con orientación  
en Óptica Física**

---

**Estudio in vitro de los efectos de la fotobiomodulación sobre  
la viabilidad de fibroblastos humanos**

Tesis

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

Presenta:

**Diana Isela Cruz Gallegos**

Ensenada, Baja California, México

2025

Tesis defendida por

**Diana Isela Cruz Gallegos**

y aprobada por el siguiente Comité

**Dr. Israel Rocha Mendoza**  
Co-director de tesis

**Dra. Carolina Álvarez Delgado**  
Co-directora de tesis

**Dr. Jacob Licea Rodríguez**

**Dr. Eugenio Rafael Méndez Méndez**

**Dr. Víctor Ruíz Cortés**

**Dra. Johanna Bernáldez Sarabia**



**Dr. Daniel Jáuregui Vázquez**  
Coordinador del Posgrado en Óptica

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Diana Isela Cruz Gallegos** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Óptica con orientación en Óptica Física.

### **Estudio in vitro de los efectos de la fotobiomodulación sobre la viabilidad de fibroblastos humanos**

Resumen aprobado por:

**Dr. Israel Rocha Mendoza**  
Co-director de tesis

**Dra. Carolina Álvarez Delgado**  
Co-directora de tesis

La piel es el órgano más grande de nuestro cuerpo y nuestra primera capa de protección al exterior. Cuando se produce una herida, el proceso de cicatrización de la piel varía según la gravedad de las heridas; además, esto puede verse afectado por enfermedades crónicas. Esto ha impulsado la búsqueda de métodos más eficaces de cicatrización, como la fotobiomodulación, una terapia basada en luz láser de baja intensidad que estimula procesos biológicos sin causar daño celular. Esta técnica ha mostrado beneficios médicos y terapéuticos, especialmente en inflamación, regeneración y cicatrización, dependiendo de parámetros como la longitud de onda o el tiempo de exposición. En esta tesis se presenta el estudio *in vitro* de los efectos de la fotobiomodulación en células de la línea CCD-1112Sk. Las células se irradiaron con un diodo láser con una longitud de onda de 790 nm, una potencia de 10 mW y un área de 0.32 cm<sup>2</sup>, a diferentes dosis de fluencia. Las células se evaluaron 24 horas después de la irradiación mediante análisis de la actividad metabólica, utilizando un ensayo de viabilidad celular. Los resultados indican estimulación e inhibición en la misma línea celular, utilizando los mismos parámetros a diferentes tiempos de exposición.

**Palabras clave: Fibroblastos, Viabilidad, Absorbancia, Diodo láser, reactivo MTS.**

Abstract of the thesis presented by **Diana Isela Cruz Gallegos** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Optics with orientation in Physical Optics.

**In vitro study of the effects of photobiomodulation on the viability of human fibroblasts.**

Abstract approved by:

**Dr. Israel Rocha Mendoza**  
Thesis Co-director

**Dra. Carolina Álvarez Delgado**  
Thesis co-director

The skin is the largest organ of our body and our first layer of protection against the external environment. When a wound occurs, the skin's healing process varies depending on the severity of the injury, and this can be affected by chronic diseases. This has driven the search for more effective healing methods, such as photobiomodulation, a therapy based on low-intensity laser light that stimulates biological processes without causing cellular damage. This technique has shown medical and therapeutic benefits, particularly in inflammation, regeneration, and healing, depending on parameters such as wavelength or exposure time. This thesis presents an *in vitro* study of the effects of photobiomodulation on CCD-1112Sk cell line. The cells were irradiated with a laser diode with a wavelength of 790 nm, a power of 10 mW, and an area of 0.32 cm<sup>2</sup> at different fluence doses. The cells were evaluated 24 hours after irradiation through metabolic activity analysis using a cell viability assay. The results indicate both stimulation and inhibition in the same cell line using the same parameters at different exposure times.

**Keywords: Fibroblasts, Viability, Absorbance, Laser diode, MTS reagent.**

## **Dedicatoria**

**A mi mamá y a mi familia.**

## Agradecimientos

Por mi formación en la maestría, agradezco al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Departamento de Física Aplicada por darme la oportunidad y los recursos para continuar con mis estudios, así como al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), hoy SECIHTI (Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación), por brindarme el apoyo económico que hizo posible esta maestría.

A mis directores de tesis, el Dr. Israel Rocha Mendoza, líder del grupo del Laboratorio de Microscopía Avanzada, por su guía, confianza y paciencia durante este proceso de aprendizaje; y a la Dra. Carolina Álvarez Delgado, por su apoyo, enseñanza y orientación en temas biológicos. A los miembros del grupo de investigación "LAMAVA" por sus observaciones a lo largo de este proyecto, y a las estudiantes de Biomédica del equipo de trabajo "Mitoteam" por su apoyo durante las pruebas de laboratorio.

A mi pareja, David, por su apoyo constante, paciencia, palabras de aliento y por estar a mi lado en los momentos más difíciles.

A mis amigos y amigas, gracias por su compañía; en especial a Iridian y Dayanne, por las charlas que me ayudaron a despejar la mente, por los consejos sinceros, por escucharme, apoyarme, animarme y aguantarme en todo este proceso.

A mi familia y a Dios, quienes con su apoyo y empuje me han permitido llegar hasta este momento.

Por último, le agradezco en especial a mi madre, Rosa Isela Gallegos Álvarez. Hoy no estás entre nosotros, pero el agradecimiento será por siempre. Tu fe, fuerza y amor en mí son mi mayor guía para poder continuar. Cada logro te pertenece a ti.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas .....	x
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	2
1.2 Justificación .....	4
1.3 Hipótesis.....	5
1.4 Objetivos .....	5
Objetivo general.....	5
Objetivos específicos.....	5
1.5 Estructura de la tesis .....	5
<b>Capítulo 2. Conceptos Básicos .....</b>	<b>7</b>
2.1 Fundamentos de la luz y su interacción con materia.....	7
2.1.1 El láser y sus características .....	7
2.1.2 Espectroscopía de absorción.....	8
2.1.3 Ley de Beer-Lambert.....	10
2.2 Glosario de términos utilizados en fotobiología .....	14
2.3 Fotobiomodulación .....	15
2.3.1 Rol del Óxido Nítrico (NO) y los Iones de Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) .....	16
2.3.2 Efectos en la Homeostasis Mitocondrial y Estrés Oxidativo .....	16
2.3.3 Efectos de la fluencia y el rango espectral en el infrarrojo cercano .....	17

2.4	Viabilidad Celular .....	18
2.5	Fibroblastos Dérmicos.....	19
2.5.1	Origen, Morfología y Diferenciación .....	19
2.5.2	Funciones Principales.....	20
<b>Capítulo 3.</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>22</b>
3.1	Descripción general de la metodología.....	23
3.2	Arreglo óptico para la irradiación de células.....	24
3.3	Caracterización del perfil del haz láser .....	25
3.4	Automatización del tiempo de exposición.....	26
3.5	Cultivo y preparación de muestras .....	27
3.6	Condiciones de irradiación de células.....	28
3.7	Distribución de las irradiaciones en las placas de cultivo .....	29
3.8	Ensayo de viabilidad (MTS) .....	33
3.9	Análisis estadísticos.....	34
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Resultados y Discusiones .....</b>	<b>35</b>
4.1	Caracterización del perfil del haz láser .....	35
4.2	Resultados de la irradiación celular .....	39
4.2.1	Resultados de absorbancia .....	39
4.2.2	Comparación de la absorbancia dentro y fuera del arreglo experimental.....	42
4.2.3	Integración de resultados de absorbancia.....	43
4.3	Resultados de viabilidad.....	45
<b>Capítulo 5.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>47</b>
5.1	Trabajo a futuro .....	48
<b>Literatura citada</b>	<b>.....</b>	<b>49</b>
<b>Anexos</b>	<b>.....</b>	<b>54</b>

## Lista de figuras

	Página
Figura 1. Diagrama representativo de densidad óptica. ....	10
Figura 2. Esquema del mecanismo de acción de la fotobiomodulación (FBM). La luz roja e infrarroja cercana activa rutas celulares mediante la absorción por citocromo c oxidasa y canales iónicos, lo que incrementa $Ca^{2+}$ , ROS, ATP y cAMP, favoreciendo procesos como diferenciación, proliferación y migración celular. (Dompe et al., 2020). ....	18
Figura 3. Representación de las bases de la piel, en la capa superficial se encuentra la epidermis; (1) basal, (2) espinosa, (3) granular y (4) cornea, y debajo de ella se encuentra la capa dermis. Los fibroblastos, señalados con flechas, se encuentran encerrados en una red de colágeno de tipo I proporcionan soporte dérmico a la epidermis. Barra 44 $\mu$ m (Sorrell & Caplan, 2004). ....	20
Figura 4. Proceso para determinar la respuesta biológica de una línea celular. ....	22
Figura 5. Sistema óptico de irradiación para inducir la FBM en los fibroblastos. ....	24
Figura 6. Diagrama de la técnica de la navaja: a) Perfil transversal del haz; b) Distribución de intensidad acumulada al desplazar la navaja; c) Perfil del haz obtenido al derivar (b). ....	26
Figura 7. Distribución de fluencias en la placa 1. ....	30
Figura 8. Distribución de fluencias en la placa 2. ....	31
Figura 9. Distribución de fluencias en la placa 3. ....	32
Figura 10. Distribución de fluencias en la placa 4. ....	33
Figura 11. Resultados de la prueba de la navaja. Trazo de intensidad acumulada medido a una distancia de 5 cm (a) y 10 cm (b), respectivamente. Los cuadros negros presentan los datos experimentales, y los trazos rojos se muestra el ajuste. Perfiles del haz c) y d), obtenidos mediante la derivada (trazos negros) de los ajustes obtenidos en a) y b), respectivamente. En rojo se muestra el ajuste gaussiano. ....	36
Figura 12. Medición de la uniformidad del haz. Proyección del haz sobre un papel milimétrico: (a) con luz de fondo y b) sin luz de fondo. c) y d), muestran la distribución de la intensidad del haz del área iluminada. El eje z corresponde a la intensidad del haz. ....	37
Figura 13. Caracterización del haz mediante la prueba de la navaja, utilizando un diafragma. Trazo de intensidad acumulada medido a una distancia de 5 cm (a) y 10 cm (b), respectivamente. En cuadros negros se presentan los datos experimentales, mientras que en trazos rojos se muestra el ajuste. Perfiles del haz c) y d), obtenidos mediante la derivada (trazos negros) de los trazos mostrados en a) y b), respectivamente. En rojo se muestra el ajuste gaussiano. ....	38
Figura 14. Confirmación de la uniformidad del haz utilizando un diafragma. Proyección del haz sobre un papel milimétrico (a) con luz y b) sin luz. ....	39

Figura 15. Resultados de absorbancia de la placa 1, representación de la a) distribución de los pozos irradiados y b) gráfica de los valores de absorbancia obtenidos. ....	40
Figura 16. Resultados de absorbancia de la placa 2, representación de la a) distribución de los pozos irradiados y b) gráfica de los valores de absorbancia obtenidos. ....	41
Figura 17. Resultados de absorbancia de la placa 3, representación de la a) distribución de los pozos irradiados y b) gráfica de los valores de absorbancia obtenidos. ....	42
Figura 18. Representación gráfica de los datos obtenidos de a) medio de cultivo y b) células de control. ....	42
Figura 19. Representación logarítmica de los valores de absorbancia de cada fluencia. ....	44
Figura 20. Viabilidad celular (%) a las 24 hrs de exposición con y sin medio de cultivo. Viabilidad normalizada con el control. ....	45
Figura 21. Viabilidad celular (%) a las 24 hrs de exposición. Viabilidad normalizada con el control. Datos analizados por medio de ANOVA de una vía con prueba Dunnett, $P < 0.05$ (*) y $P < 0.01$ (**). .	46

## Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Condiciones de irradiación correspondiente para una potencia de 10mW y una distancia de 10cm.....	28
Tabla 2. Condiciones de irradiación correspondiente para la placa 1. ....	30
Tabla 3. Condiciones de irradiación correspondiente para la placa 2. ....	31
Tabla 4. Condiciones de irradiación correspondiente para la placa 3. ....	32
Tabla 5. Valores de absorbancia de cada prueba y su promedio. ....	44

## Capítulo 1. Introducción

---

La piel, el órgano más grande de nuestro cuerpo y el único en contacto directo con el exterior, juega un papel fundamental en nuestra protección. Cuando se produce una herida, el proceso y el periodo de curación y cicatrización varía según la magnitud y gravedad de la zona afectada. Debido al aumento de enfermedades crónicas que pueden afectar la cicatrización, así como el creciente interés en los aspectos estéticos (Han et al., 2017; Soares et al., 2022), ha surgido la necesidad de encontrar e implementar técnicas más efectivas que aceleren este proceso. Entre ellas, destacan las terapias que emplean luz, como la fotobiomodulación.

La fotobiomodulación (FBM), también conocida como terapia láser de baja intensidad, es un fenómeno biofotónico que ocurre cuando las células o los tejidos son irradiados con luz roja o infrarroja por debajo del umbral de daño celular (Freitas et al., 2016; Tripodi et al., 2021).

La FBM ocurre cuando la luz en rangos de longitud de onda en las regiones roja (600-700 nm) o infrarroja cercana (760-900 nm) es absorbida por fotorreceptores, principalmente la enzima citocromo c oxidasa (COX) ubicada en la mitocondria. Esta absorción estimula la actividad de la cadena de transporte de electrones, lo que induce un aumento en la producción de energía a través de la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP, por sus siglas en inglés). Lo que a su vez promueve la generación controlada de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de factores de transcripción, como NF- $\kappa$ B y AP-1, lo que incrementa la actividad mitocondrial y favorece procesos celulares como la proliferación y el aumento de viabilidad celular. (Hamblin et al., 2019; Dompe et al., 2020, Huang et al., 2009; Greco et al., 1989; Karu, 1999). El proceso de la FBM se explicará con más detalle en el Capítulo 2.

La FBM ha sido aplicada en estudios de diversos campos, especialmente, en la medicina clínica. En el ámbito clínico, ha demostrado ser eficaz en el tratamiento y control del dolor e inflamación (Michael et al. 2017), enfermedades neurológicas (Salehpour et al., 2016), regeneración ósea (Escudero et al., 2016) y, particularmente relevante para nuestro interés, en la cicatrización de heridas (Han et al., 2017).

Una herida en la piel es, básicamente, un daño que afecta al tejido conectivo (como piel, tendones, cartílagos, etc.), el cual está compuesto principalmente por fibroblastos. Los fibroblastos son células especializadas encargadas de sintetizar y mantener los componentes de la matriz extracelular, como el colágeno y otras proteínas estructurales. Estos desempeñan un papel esencial en la cicatrización, ya que

reparan el tejido dañado al promover su regeneración. El proceso de regeneración pasa por diferentes fases, una de las cuales es la proliferación celular de los fibroblastos que favorece la reparación del tejido conectivo (Plikus et al., 2021, Velnar et al., 2009). Dependiendo de las condiciones fisiológicas del tejido dañado y de la gravedad de la herida, el proceso de cicatrización puede tardar desde semanas hasta meses en completarse, pudiendo ser parcial o total.

Para un adecuado funcionamiento de la FBM, es crucial ajustar correctamente los parámetros de la luz y las dosis según el tipo de muestra a tratar. Los parámetros más relevantes incluyen la longitud de onda, la energía o potencia, la densidad de energía, la fluencia, el tiempo de irradiación y los intervalos de tratamiento (Freitas et al., 2016; Zein et al., 2018). En la mayoría de los estudios, principalmente aquellos que examinan procesos de proliferación y viabilidad celular, se ha demostrado que la longitud de onda y la dosis de irradiación son factores clave en la respuesta biológica. No obstante, estos factores pueden variar dependiendo del tipo de célula.

En este proyecto, se propone estudiar el efecto biológico de la fotobiomodulación inducida en fibroblastos dérmicos humanos bajo diversas condiciones de irradiación. Como ya se mencionó anteriormente, estas células son responsables de mantener la estructura de los tejidos conectivos mediante la secreción continua de la matriz extracelular, además de producir colágeno, la cual tiene una función importante en el proceso de cicatrización de heridas (Rahbar et al., 2020). Estudios previos han demostrado resultados favorables en muestras de fibroblastos dérmicos humanos de donantes con diabetes tipo II (Rahbar et al., 2020; Oyedoda et al., 2018) y en odontología como herramienta terapéutica (Henriques et al., 2010). Por lo tanto, la terapia láser de baja intensidad se considera una herramienta prometedora para tratamientos como la cicatrización de heridas, lo que constituye el enfoque central de este proyecto de tesis.

## **1.1 Antecedentes**

Cabe resaltar que, a diferencia de otras aplicaciones biofotónicas que emplean irradiaciones de alta potencia y/o calentamiento, la FBM se realiza generalmente a niveles de irradiancia y densidad de energía relativamente bajos y por debajo del umbral de daño, típicamente menores a  $200 \text{ mW/cm}^2$  y con fluencias de  $0.1$  a  $30 \text{ J/cm}^2$  (Sadatmansonuri et al., 2021; Kasowanjete et al., 2023; Hawkins et al., 2006; Houreld & Abrahamse, 2008). Se han realizado numerosos estudios sobre los efectos de la FBM en fibroblastos,

utilizando diferentes líneas celulares y aplicando irradiación a diversas longitudes de onda (en el rango los 600 nm a los 1000 nm), fluencias y tiempos de exposición.

Entre los primeros estudios sobre los efectos de los láseres en tejidos biológicos se destaca el trabajo del Dr. Endre Mester, quien inicialmente intentó tratar tumores malignos en ratas. Sin embargo, observó que la luz de baja potencia de un láser de rubí, de una longitud de onda de alrededor de 694 nm, tenía un efecto estimulante en el crecimiento del pelo de los ratones y favorecía la cicatrización rápida de heridas por escisión (Winkler et al., 2019; Hamblin et al., 2019).

Más recientemente, Sadatmansonuri y colaboradores realizaron una investigación sobre los efectos de la irradiación con láser de baja potencia, utilizando una longitud de onda de 915 nm en fibroblastos gingivales. En este estudio se aplicaron fluencias de 1 a 4 J/cm<sup>2</sup>, evaluando la viabilidad celular al primer, tercer y quinto día tras la irradiación. Los resultados mostraron un aumento significativo de la viabilidad celular en los grupos irradiados con 2 y 3 J/cm<sup>2</sup> a partir del tercer día, y en todos los grupos irradiados a partir del quinto día (Sadatmansonuri et al., 2021).

Por su parte, Kasowanjete y colaboradores investigaron los efectos de la irradiación en fibroblastos de piel sana y diabética, a una longitud de onda de 660 nm y a una fluencia de 5 J/cm<sup>2</sup>. Los resultados mostraron una estimulación significativa de la cicatrización en fibroblastos de heridas de piel diabética, lo cual se asoció a la activación de la vía de señalización Ras/MAPK, promoviendo un aumento de migración, viabilidad y proliferación celular (Kasowanjete et al., 2023).

Asimismo, Nowak-Terpiłowska y colaboradores exploraron la influencia de tres longitudes de onda de láser (1064 nm, 980 nm y 635 nm) a dosis de fluencia de 3, 25 y 64 J/cm<sup>2</sup> en la actividad mitocondrial de fibroblastos gingivales humanos cultivados *in vitro*. Utilizando el ensayo Cell Counting Kit-8 para medir la actividad mitocondrial, encontraron que la longitud de onda de 1064 nm tuvo el efecto más positivo en la viabilidad celular, aumentando la actividad mitocondrial y promoviendo la proliferación de los fibroblastos (Nowak-Terpiłowska et al., 2023).

Por otro lado, Hawkins y colaboradores, estudiaron los efectos de la irradiación en fibroblastos cutáneos humanos heridos, utilizando una longitud de onda de 632.8 nm y fluencias de entre 0.5 a 16 J/cm<sup>2</sup> durante dos días consecutivos. Este estudio demostró que las fluencias más bajas (0.5 J/cm<sup>2</sup> y 5 J/cm<sup>2</sup>) favorecieron un aumento en la migración celular en la zona central de la herida, mientras que a fluencias más altas (10

J/cm<sup>2</sup> y 16 J/cm<sup>2</sup>) mostraron un efecto inhibitor, acompañado de un daño celular y estrés morfológico (Hawkins et. al, 2006).

Hourelid y Abrahamse descubrieron que la luz láser puede estimular la cicatrización de heridas en fibroblastos, inducidos a un modelo de herida diabética *in vitro*, pero solo a ciertas longitudes de onda y fluencias específicas. Probaron longitudes de onda de 632.8 nm, 830 nm y 1064 nm, con fluencias de 5 J/cm<sup>2</sup> y 16 J/cm<sup>2</sup>, encontrando que la longitud de onda de 632.8 nm, a una fluencia de 5 J/cm<sup>2</sup>, fue la más efectiva para promover la cicatrización de heridas, aumentar la viabilidad celular y estimular la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos. Sin embargo, las fluencias más altas, a 16 J/cm<sup>2</sup>, inhibieron la cicatrización de heridas y provocaron un aumento en la apoptosis. (Hourelid & Abrahamse, 2008).

Por último, en el grupo de microscopía óptica avanzada del Departamento de Óptica se han realizado estudios sobre el efecto de FBM en el modelo entomológico *Aedes aegypti*. En estos estudios, se utilizaron longitudes de onda, 561 nm, 785 nm y 806 nm, obteniéndose resultados relevantes pero solos a ciertas longitudes de onda, fluencias específicas y relativamente bajas (del orden de 1 mJ/cm<sup>2</sup>). Los resultados sugieren que las longitudes de onda de 785 nm y 806 nm tienen un impacto positivo en el proceso de FBM, particularmente en el desarrollo de la capa externa (exocorium) de los huevecillos del mosquito debido a su mayor penetración (Rodríguez Pérez, 2024).

## 1.2 Justificación

El desarrollo de este proyecto de investigación incorpora la colaboración entre los Departamentos de Óptica y el de Innovación Biomédica (DIB) del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Como ya se mencionó, en el grupo de microscopía óptica avanzada del departamento de Óptica se han realizado estudios del efecto de FBM en el modelo entomológico *Aedes aegypti*, en donde se han obtenido resultados relevantes. Por otro lado, parte de las actividades de investigación que actualmente se desarrollan en el Departamento de Innovación Biomédica, particularmente en el grupo de investigación liderado por la Dra. Carolina Álvarez Delgado, se enfocan en estudios sobre la función mitocondrial en células humanas en cultivo. En este sentido, la motivación de esta propuesta de tesis es inducir y estudiar el efecto de FBM para evaluar la respuesta biológica estimuladora (o inhibitoria) en la viabilidad, proliferación y muerte celular de fibroblastos humanos *in vitro*.

### **1.3 Hipótesis**

El efecto biofotónico de la fotobiomodulación inducido en fibroblastos dérmicos humanos al irradiar con luz láser en el infrarrojo cercano (785 nm) tendrá un efecto estimulador en la viabilidad celular.

### **1.4 Objetivos**

#### **Objetivo general**

El objetivo general del proyecto es realizar estudios del efecto biológico de la fotobiomodulación en fibroblastos dérmicos humanos (CCD-1112Sk) para medir la respuesta estimuladora (o inhibitoria) ante diversas condiciones de irradiación con luz láser, en el infrarrojo cercano, durante su proceso de viabilidad, proliferación y muerte celular.

#### **Objetivos específicos**

- Inducir el efecto de fotobiomodulación en fibroblastos dérmicos humanos utilizando luz infrarroja a 785nm en el régimen continuo bajo distintas condiciones de irradiación (potencia y tiempo de exposición).
- Evaluar la respuesta biológica de los efectos de la luz sobre mediante pruebas de viabilidad celular.

### **1.5 Estructura de la tesis**

Esta tesis está conformada por cinco capítulos y está organizada de la siguiente manera: En el Capítulo 1 se presenta una introducción al trabajo, unos breves antecedentes, la justificación, la hipótesis, los objetivos y la estructura de la tesis. En el Capítulo 2 se describen los conceptos básicos para entender la fotobiomodulación, así como algunos mecanismos ópticos como la densidad óptica, la absorbancia, la fluencia y la interacción de la luz con materia biológica. En el Capítulo 3, se muestra la metodología

experimental utilizada; se explica el proceso de preparación y cultivo celular, los parámetros de irradiación, el montaje experimental y el análisis de viabilidad. En el Capítulo 4 se presentan los resultados obtenidos y su discusión sobre la caracterización del haz de luz, la absorbancia, la viabilidad y las imágenes. Por último, en el capítulo 5 se presentan las conclusiones de esta tesis y el trabajo propuesto a futuro.

## Capítulo 2. Conceptos Básicos

---

En este capítulo se proporciona una descripción general de los fenómenos que rigen las interacciones entre la luz y la materia, así como los conceptos clave relacionados con la fotobiomodulación y la viabilidad celular útiles para la comprensión de esta tesis.

### 2.1 Fundamentos de la luz y su interacción con materia

#### 2.1.1 El láser y sus características

En 1960, el físico estadounidense Theodore H. Maiman desarrolló el primer láser (Maiman, 1960), cuyo acrónimo en inglés LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation). Existen láseres cuya emisión puede ser continua o pulsada, un láser de emisión continua genera un haz de luz con un ancho de banda espectral estrecho, amplificado, monocromático (de una longitud de onda específica), altamente colimado (casi unidireccional), coherente (con fase constante en el espacio y tiempo) y con una alta densidad de energía (capaz de concentrar energía en áreas pequeñas). Estas propiedades hacen del láser una herramienta de gran utilidad en áreas como la biología y medicina, por mencionar algunas. Existe una gran variedad de láseres cuyas longitudes de onda van desde el ultravioleta (UV) hasta el infrarrojo (IR); sin embargo, los láseres que más comúnmente se utilizan en aplicaciones biológicas y biomédicas son aquellos cuya emisión se encuentran en el rango espectral conocido como la primera ventana biológica (650-900 nm). El uso de longitudes de onda en este rango ofrecen varias ventajas, de las cuales destacan una mayor penetración en los tejidos, debido a la baja absorción de agua, y una menor dispersión de la luz. Por estas razones, en este trabajo se planteó utilizar un láser con una longitud de onda de 785 nm.

#### *Parámetros de irradiación de un láser*

Los parámetros de irradiación del láser utilizados en este trabajo son: la potencia, la irradiancia y la fluencia, los cuales se definen a continuación:

**Potencia ( $P$ ):** La potencia es uno de los parámetros más importantes en la caracterización de un láser. Su valor determina la capacidad del láser para entregar una cierta cantidad de energía por unidad de tiempo y se expresa como

$$P = \frac{E}{t}, \quad (1)$$

donde  $E$  es la energía (en Joules) emitida por el láser y  $t$  es el tiempo (en segundos) durante el cual se emite la energía. La unidad de potencia es el Watt.

**Irradiancia ( $I$ ):** La irradiancia describe la potencia incidente de la fuente de láser por unidad de área y se mide en watts/m<sup>2</sup>. La irradiancia se expresa como

$$I = \frac{P}{S}, \quad (2)$$

donde  $P$  es la potencia de la luz incidente y  $S$  es el área de la superficie donde se distribuye la radiación. De esta relación es fácil ver que la irradiancia puede ajustarse variando el área donde se está concentrando la potencia, es decir, variando el ancho del haz incidente.

**Fluencia ( $F$ ):** La fluencia de un láser se refiere a la cantidad de energía entrega por unidad de área y se mide en J/cm<sup>2</sup>. Ésta se expresa como

$$F = \frac{E}{S}. \quad (3)$$

Nótese que, usando las expresiones (1) y (2), la fluencia puede expresarse como  $F = It$ ; por lo que la fluencia también puede expresarse como la irradiancia integrada en el tiempo. Este parámetro es importante en la interacción del láser con materiales ya que indica la cantidad de energía que se concentra en un área específica durante la exposición láser, lo que puede determinar la efectividad de la interacción.

En tratamientos con láser, como la fotobiomodulación, la fluencia debe controlarse cuidadosamente para evitar daños a los tejidos circundantes y obtener los efectos terapéuticos deseados. La fluencia determina la intensidad con la que la energía del láser es absorbida por los tejidos, lo que influye en la profundidad de penetración y en los efectos biológicos inducidos por la irradiación láser.

### 2.1.2 Espectroscopía de absorción

El estudio de la interacción de la radiación de la luz con la materia es parte fundamental para medir

propiedades moleculares de muestras biológicas. Esta interacción puede estudiarse a través de la espectroscopía de absorción, que se basa en el tercer postulado de Bohr (Bohr, 1913; Lakowicz, 2006). Este postulado establece que un electrón puede absorber (o emitir) energía al realizar transiciones entre órbitas permitidas. Durante este proceso, se emite o absorbe un fotón cuya energía corresponde a la diferencia de energías entre el nivel energético superior e inferior. Específicamente, al absorber luz, una molécula pasa de un estado de menor a mayor energía tal que:

$$E_2 - E_1 = h\nu, \quad (4)$$

donde  $E_2$  y  $E_1$  corresponden a los estados energéticos mayor y menor respectivamente,  $\nu$  es la frecuencia de la radiación electromagnética y  $h$  es la constante de Planck ( $6.626 \times 10^{-34}$  Js). Este cambio energético también puede describirse en función de la longitud de onda  $\lambda$ , si se usa la expresión  $\nu = c/\lambda$  en la ecuación (1); con  $c = 3 \times 10^8$  m/s como la velocidad de la luz en el vacío.

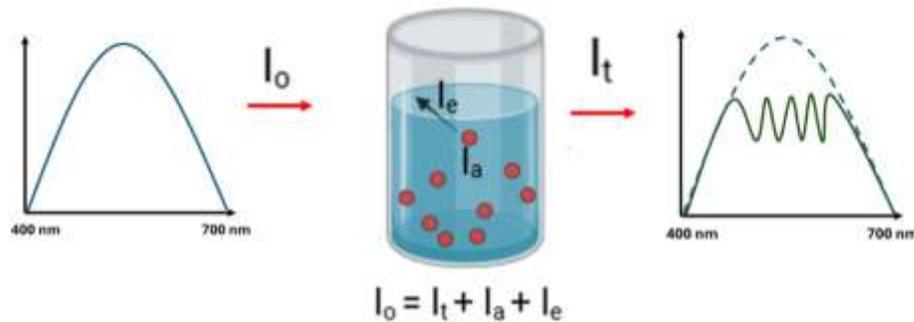
Cada molécula posee una serie de estados excitados que le son característicos, por lo que la absorción de luz a diferentes longitudes de onda (esto es, a diferentes energías) genera un espectro de absorción único para medios compuestos con diferentes moléculas y átomos. Este principio permite identificar y analizar biomoléculas específicas, facilitando estudios en aplicaciones biomédicas.

La espectroscopía de absorción es una técnica clave para analizar la absorción de radiación ultravioleta (200-400 nm) y visible (400-800 nm) por parte de las moléculas de una muestra. Los espectrofotómetros, instrumentos utilizados en esta técnica, incluyen una fuente de radiación (como lámparas de deuterio, tungsteno o xenón), un monocromador que selecciona la longitud de onda incidente y detectores que miden la intensidad de la radiación. Los datos generados forman un espectro único de absorción o transmisión.

La espectroscopía tiene aplicaciones diversas en el campo biológico y biomédico, incluyendo la cuantificación de proteínas, la medición de actividad enzimática y la evaluación de viabilidad celular. Además, facilita la determinación de concentraciones a través de la ley de Beer-Lambert, permitiendo calcular la absorción molar y el coeficiente de extinción como se describe a continuación.

### 2.1.3 Ley de Beer-Lambert

La Ley de Beer-Lambert, una de las bases fundamentales en espectroscopía, describe la relación entre la intensidad de la luz transmitida a través de una sustancia y las propiedades físicas y químicas del medio que la absorbe (Mayerhöfer et al., 2020; Myers et al., 2013; Muller-Karger et al., 2002; Aphalo, 2020; Calvillo-Vazquez et al., 2019; Oshina & Spigulis, 2021). Esta ley es ampliamente utilizada para caracterizar sistemas ópticos y cuantificar la concentración de compuestos químicos o sólidos (nano- o micro-estructuras) en soluciones a través de la absorbancia, también conocida como la Densidad Óptica, tal y como se explica a continuación.



**Figura 1.** Diagrama representativo de la densidad óptica.

Cuando un haz de luz colimado, como la de un haz láser, de intensidad inicial  $I_0$  y una longitud de onda determinada incide sobre una muestra líquida contenida en una cubeta de cuarzo (cuya transmitancia en el visible es de  $\sim 85\%$ ) como se muestra en la Figura 1, y además ignorando los efectos inherentes a la reflexión de la luz en las interfaces aire-cuarzo-muestra, se tiene que parte de la radiación es absorbida por la muestra (cuya intensidad será  $I_a$ ), otra parte es esparcida (con intensidad  $I_{es}$ ) y el resto, la cual llega al detector será transmitida (con intensidad  $I_t$ ). Esto puede describirse matemáticamente mediante la siguiente relación de conservación de energía:

$$I_0 = I_a + I_{es} + I_t, \quad (5)$$

donde  $I_0$ ,  $I_a$ ,  $I_{es}$  y  $I_t$ , son la intensidad incidente, absorbida, esparcida y transmitida, respectivamente.

Los primeros dos términos representan la pérdida de energía (o la extinción) del haz de luz al propagarse a través de la muestra. En esta pérdida están involucrados dos mecanismos, pérdidas por la absorción y

pérdidas por el esparcimiento. La suma de estas pérdidas es a lo que se le conoce como la Atenuancia o Densidad Óptica (Myers et al., 2013).

De acuerdo con Mayers (2013), a través de la medición específica de las pérdidas por esparcimiento y por absorción de luz, se pueden estimar, respectivamente, concentraciones de biomasa y niveles de pigmentos. Para el caso de soluciones homogéneas de una sola fase, el proceso absorción contribuye más significativamente a la atenuancia de la luz, por lo que los efectos de esparcimiento suelen ignorarse; dicho de manera más simple, en palabras de Calvillo-Vázquez, “*La atenuancia se reduce a la absorbancia en ausencia de esparcimiento*”. En contraste, para suspensiones con múltiples fases, el esparcimiento debido a las diferencias en el índice de refracción también juega un papel clave en la atenuancia.

Experimentalmente, estas dos contribuciones de extinción pueden medirse a través de una esfera integradora (Ortega Salazar, 2021). No obstante, en esta tesis consideraremos que el posible esparcimiento de la luz por las células es despreciable, además dado que la Ley de Beer-Lambert se aplica rigurosamente a soluciones homogéneas. Por lo tanto, de aquí en adelante se omitirán los efectos de esparcimiento y se considerarán sólo efectos debido a la absorción (absorbancia) de las muestras. Por lo que para fines prácticos usaremos los términos *Absorbancia* y *Atenuancia* (así como de Densidad Óptica y Extinción) de manera indistinta.

### ***Transmitancia***

La transmitancia  $T$  es la fracción de luz transmitida que llega al detector entre cantidad de luz que incidió sobre esta. Puede expresarse en términos de la potencia o intensidades (potencia por unidad de área) incidentes y transmitidas del haz; esto es:

$$T = \frac{I_t}{I_o} = \frac{P_t}{P_o}, \quad (6)$$

donde  $P_t$  y  $P_o$  son la potencia transmitida e incidente, respectivamente.

### ***Orígenes de la Ley de Beer-Lambert***

Aunque la formulación histórica ha sido un objeto de debate (Mayerhöfer et al., 2020), basados en el artículo de revisión por Oshina y Spigulus (2021), la cronología para llegar a esta Ley de Lambert puede

contarse como se explica a continuación.

*Ley de Bouguer (Bouguer, 1729)*: Para hablar de los orígenes de la ley de Beer-Lambert, o simplemente BLL (por sus siglas en inglés), debemos considerar la Ley de Bouguer Pierre. Bouguer, fue el primero en afirmar que en un medio de transparencia uniforme, la luz que permanece en un haz colimado es una función exponencial de la longitud de la trayectoria. Siendo esto válido si el medio es homogéneo, sin dispersión y la luz incidente  $I_0$  es monocromática y colimada (como la de un láser).

*Ley de Lambert (Lambert, 1760)*: Posteriormente, Johann Heinrich Lambert, formuló la Ley que lleva su nombre, que no es más que una afirmación matemática de la ley de Bouguer. Es decir, que la absorbancia es directamente proporcional al grosor del medio ( $A \propto L$ ), mientras que la intensidad de la radiación transmitida  $I_t$  disminuye exponencialmente con el aumento del grosor:

$$I_t = I_0 e^{-\alpha_a L}, \quad (7)$$

donde  $\alpha_a$  es el coeficiente de absorción del medio con unidades en  $cm^{-1}$ .

*Ley de Beer (Beer, 1852)*: Casi un siglo después, Beer extendió la Ley de Lambert para incluir la concentración de soluciones, afirmando que la absorbancia es proporcional a la concentración molar del soluto  $C$  en un medio homogéneo ( $A \propto C$ ).

Este punto es justo el centro del debate. Si bien en 1852, August Beer estudió la absorción de luz en líquidos coloreados y concluyó que la transmitancia de una solución depende de la fracción volumétrica del soluto y el grosor de la muestra. Sin embargo, Mayerhöfer et al. (2020) argumentan que Beer nunca formuló explícitamente la relación entre absorbancia y concentración tal y como se conoce hoy en día. Según estos autores, dicha interpretación se desarrolló en los 50 años posteriores al trabajo de Beer, a través de estudios de otros investigadores, entre ellos, Bunsen y Roscoe (Bunsen & Roscoe, 1857), quienes acuñaron el término de *absortividad*; Hurter (Hurter et al., 1920), que introdujo el concepto de *densidad óptica* y Luther (Luther, 1900), quien incorporó el término alemán *Extinktion* (extinción).

### **Absorbancia**

La versión moderna de la Ley de Bouguer–Lambert–Beer, donde se combinan formalmente la relación de

Bouguer-Lambert con la dependencia de la concentración, apareció por primera vez en otro artículo de Luther (Luther & Nikolopoulos, 1913). En este trabajo, Luther integró explícitamente estos principios en la ecuación matemática que hoy se utiliza para describir la absorbancia (*atenuancia*) en medios homogéneos, consolidando así la formulación actual. La ecuación resultante establece la relación entre la concentración y el grosor de la siguiente manera:

$$A = \log_{10} \frac{I_o}{I_t} = \varepsilon CL, \quad (8)$$

donde  $\varepsilon$  es el coeficiente de extinción molar.

Nótese que usando las ecuaciones (6) y (7) la transmitancia queda como  $T = e^{-\alpha_a L}$  (Calvillo-Vazquez et al., 2019). Por lo tanto, la ecuación (8) queda como  $A = \log_{10} \frac{1}{T} = \alpha_a \ln(e)L = \varepsilon CL$ . Con lo cual se llega a que el coeficiente de absorción es proporcional coeficiente de extinción y a la concentración molar del solvente; esto es,  $\alpha_a = \varepsilon C / \ln(e)$ .

### **Absorbancia en la mezcla de dos medios**

En esta tesis se mide la absorbancia  $A_M$  de las muestras irradiadas a diferentes fluencias, las cuales contienen los fibroblastos dérmicos inmersos en medio de cultivo. En la práctica, los ensayos de MTS registran la absorbancia total, que es la suma de la contribución de las células y el medio de cultivo:

$$A_M = A_{Cel} + A_{MC}, \quad (9)$$

donde  $A_{Cel}$  es la absorbancia atribuida a la biomasa de los fibroblastos y  $A_{MC}$  corresponde a la absorbancia del medio de control.

Si bien en algunos estudios la absorbancia del medio de control se considera despreciable, en este trabajo se ha optado por medirla de manera independiente. Esto permite evaluar su impacto en la viabilidad celular y, al mismo tiempo, obtener la absorbancia real de las células eliminando la contribución del medio. Una vez medida la absorbancia del medio de control, la absorbancia celular se obtiene mediante la resta  $A_{Cel} = A_M - A_{MC}$ . Esta corrección garantiza una cuantificación más precisa de la viabilidad celular, minimizando la influencia de la absorbancia del medio de cultivo en los resultados experimentales. No

obstante, como se mostrará más adelante en el capítulo de resultados, se observará que la viabilidad celular obtenida es muy similar considerando y sin considerar la absorbancia del medio de control, lo que confirma que su impacto en los cálculos es mínimo.

## 2.2 Glosario de términos utilizados en fotobiología

Antes de abordar el tema de la fotobiomodulación, se presenta un breve glosario con definiciones básicas de los términos clave necesarios para su comprensión (Alberts et al., 2022).

- **ATP (trifosfato de adenosina):** Molécula que almacena y transporta energía en las células, utilizada en procesos como la contracción muscular, la síntesis de proteínas y la señalización celular.
- **Apoptosis:** Mecanismo de muerte celular programada, esencial para la eliminación de células dañadas o no funcionales sin causar inflamación.
- **Cromóforo:** Molécula que absorbe luz y puede desencadenar cambios bioquímicos, como los que ocurren en la fotobiomodulación.
- **Enzima:** Proteína que acelera reacciones químicas dentro de la célula, facilitando procesos como la producción de energía y la síntesis de moléculas.
- **Fotodisolución:** Fenómeno en el que una molécula, como el óxido nítrico (NO), se libera de un complejo molecular debido a la absorción de luz.
- **Formazán:** Producto de la reducción de sales de tetrazolio por enzimas deshidrogenasas en células viables. Su formación genera un cambio de color, permitiendo cuantificar la viabilidad celular mediante espectrofotometría.
- **Homeostasis:** Capacidad de una célula o un organismo para mantener un equilibrio interno estable a pesar de cambios en el entorno.

- **Proliferación celular:** Proceso mediante el cual las células se dividen y multiplican, contribuyendo al crecimiento y reparación de tejidos.
- **ROS (especies reactivas de oxígeno):** Moléculas derivadas del oxígeno que pueden actuar como mensajeros celulares, pero en exceso pueden causar daño oxidativo.
- **Sales de tetrazolio:** Compuestos químicos utilizados en ensayos de viabilidad celular para evaluar la actividad metabólica. Son reducidas por enzimas celulares a compuestos de formazán, que pueden cuantificarse mediante espectrofotometría UV-Vis.
- **Viabilidad celular:** Capacidad de las células para mantenerse vivas y funcionales bajo ciertas condiciones experimentales o fisiológicas.

## 2.3 Fotobiomodulación

La fotobiomodulación, también conocida como terapia con luz láser de baja intensidad (LLLT, por sus siglas en inglés) (Chen et al., 2011; Huang et al., 2011; Hamblin & Huang, 2019), se define como el uso de energía electromagnética, por debajo del umbral de daño, para inducir cambios en las estructuras celulares.

El mecanismo de acción de la FBM, representado en la Figura 2, se basa en la interacción de la luz con moléculas fotorreceptoras, principalmente en la mitocondria, lo que induce un aumento en la producción de ATP. Este proceso ocurre mediante la activación del cromóforo Citocromo C Oxidasa (COX), un componente clave de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. La estimulación de la COX mejora el transporte de electrones a través de la cadena mitocondrial, esto aumenta el gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Este gradiente activa la ATP sintasa lo que resulta en un incremento en la síntesis de ATP, que es la principal fuente de energía celular. Además, este proceso libera óxido nítrico (NO), mejorando la respiración celular, y genera una pequeña cantidad de especies reactiva de oxígeno (ROS). Estas ROS, en niveles controlados debido a la FBM, actúan como moléculas que facilitan la producción de ATP, promoviendo procesos celulares esenciales como la proliferación, viabilidad y apoptosis (Dompe et al., 2020, Huang et al., 2009; Greco et al., 1989; Karu et al., 1999).

Múltiples estudios han demostrado que la irradiación con luz roja o infrarroja no solo modula la actividad

mitocondrial, sino que también desencadena una serie de reacciones bioquímicas que favorecen la proliferación celular y la viabilidad, al tiempo que pueden inducir apoptosis en función de la dosis aplicada. Estos efectos están mediados por la activación de rutas metabólicas que influyen en el equilibrio entre la supervivencia y la muerte celular, regulando el estrés oxidativo y la homeostasis mitocondrial (Avcı et al., 2013; Topaloglu et al., 2016; Topaloglu et al., 2021; Tripodi et al., 2021; Hawkins et al., 2006).

### **2.3.1 Rol del Óxido Nítrico (NO) y los Iones de Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ )**

La FBM también influye en moléculas clave como el óxido nítrico y los iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). La FBM incrementa el nivel de óxido nítrico debido a la liberación de complejos metálicos en la COX, lo que impacta en la regulación de la respiración celular y la vasodilatación. Bajo la irradiación con luz infrarroja, se ha observado que la fotodisolución del NO permite una mayor actividad mitocondrial al liberar los sitios de la COX bloqueados por esta molécula, promoviendo un aumento en la producción de ATP (Desmet et al., 2006).

Por otro lado, la modulación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  es otro mecanismo esencial en la FBM. Se ha demostrado que la irradiación en el infrarrojo cercano puede influir en los canales de calcio dependientes de voltaje (VDAC), facilitando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria y modulando la señalización celular. Esta variación en la homeostasis del calcio juega un papel central en la regulación de la apoptosis, la proliferación y la diferenciación celular (Khan & Arany, 2016).

### **2.3.2 Efectos en la Homeostasis Mitocondrial y Estrés Oxidativo**

La homeostasis celular es el equilibrio dinámico que mantiene las condiciones internas estables dentro de la célula, regulando procesos como la producción de energía, el control de ROS y la señalización de iones como  $\text{Ca}^{2+}$ . La FBM influye directamente en estos mecanismos al modular la actividad mitocondrial y la expresión de genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo.

Estudios recientes han evidenciado que la FBM no solo estimula la producción de ATP, sino que también puede regular la homeostasis del calcio y la actividad de los VDAC, que desempeñan un papel crucial en la señalización apoptótica y en la regulación del metabolismo mitocondrial (Khan & Arany, 2016). Asimismo,

la modulación de las ROS inducida por FBM puede activar la vía de señalización PI3-K/Akt, promoviendo la supervivencia celular y la proliferación (Serrage et al., 2020).

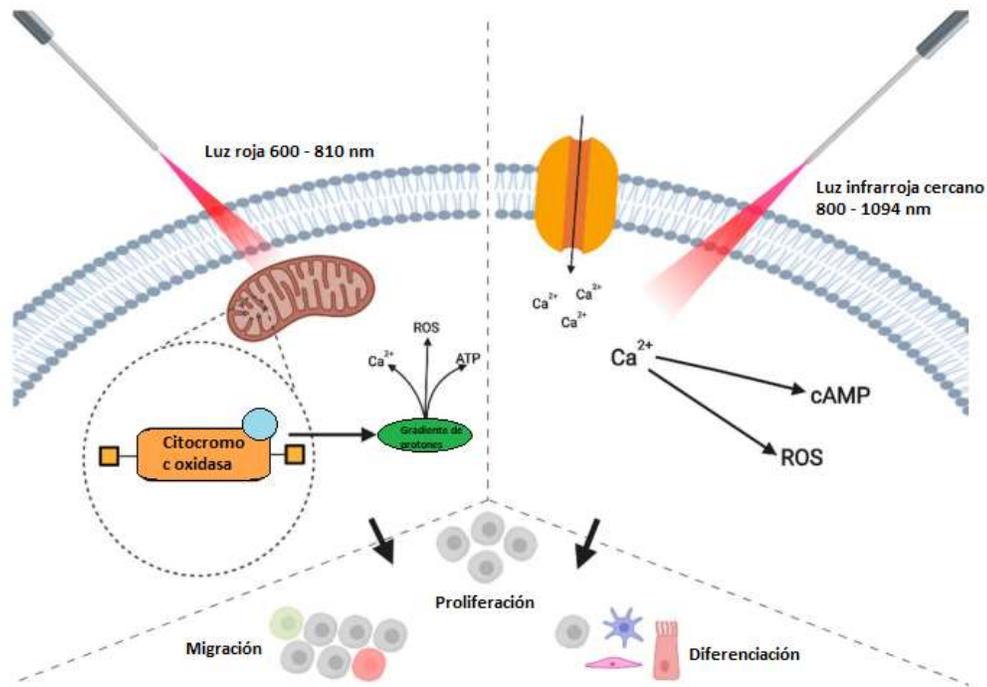
### **2.3.3 Efectos de la fluencia y el rango espectral en el infrarrojo cercano**

Es importante destacar que, a diferencia de otras aplicaciones biofotónicas que utilizan altas potencias y generan calentamiento tisular, la FBM se lleva a cabo con niveles de irradiancia y densidad de energía relativamente bajos. Generalmente, los parámetros utilizados oscilan por debajo de los 200 mW/cm<sup>2</sup>, con dosis energéticas entre 0.1 y 30 J/cm<sup>2</sup>, asegurando un efecto bioestimulante sin provocar daño térmico.

La COX presenta dos bandas de absorción en las regiones del espectro rojo (600-750 nm) e infrarrojo cercano (750-900 nm) (Hamblin et al., 2019; Dompe et al., 2020). En particular, la radiación en el infrarrojo cercano (NIR) ha sido ampliamente estudiada debido a su capacidad de penetración en los tejidos y su impacto en la modulación de la actividad mitocondrial (Desmet et al., 2006). Se ha demostrado que la irradiación en el rango de 600-810 nm puede inducir estrés oxidativo, potenciar la apoptosis y alterar la función mitocondrial en células tumorales expuestas a densidades de energía de 9.45 J/cm<sup>2</sup> (Khokhlova et al., 2018).

Estudios como el de Hawkins & Abrahamse (Hawkins & Abrahamse, 2006), utilizando un láser de 632.8 nm, han demostrado que fluencias en torno a 5 J/cm<sup>2</sup> favorecen la proliferación celular en fibroblastos dérmicos humanos, mientras que fluencias más altas podrían no ser igual de beneficiosas. Por otro lado, Chen et al. (2011), con un láser de 810 nm de longitud de onda encontraron que fluencias extremadamente bajas (0.003 J/cm<sup>2</sup> a 0.3 J/cm<sup>2</sup>) activan NF-κB y aumentan la producción de ROS, un mecanismo que puede estar relacionado con señalización celular y regulación del metabolismo mitocondrial, más que con efectos citotóxicos directos.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en esta tesis se realizaron irradiaciones de fibroblastos dérmicos humanos con luz NIR a 785 nm, seguidas de un cultivo celular para permitir que los efectos de la fotobiomodulación se manifiesten antes de la evaluación de la viabilidad celular mediante ensayos MTS a diferentes fluencias. Se busca analizar si la irradiación con NIR a 785 nm tiene un efecto estimulador o inhibitorio en la viabilidad celular, dependiendo de la dosis de energía aplicada y, con ello, evaluar su potencial aplicación en terapias regenerativas o moduladoras del metabolismo celular.



**Figura 2.** Esquema del mecanismo de acción de la fotobiomodulación (FBM). La luz roja e infrarroja cercana activa rutas celulares mediante la absorción por citocromo c oxidasa y canales iónicos, lo que incrementa  $\text{Ca}^{2+}$ , ROS, ATP y cAMP, favoreciendo procesos como diferenciación, proliferación y migración celular. (Dompe et al., 2020).

## 2.4 Viabilidad Celular

La viabilidad celular se puede definir como la proporción de células sanas dentro de una muestra biológica (Maldonado, et al, 2018). Existen diversos métodos para evaluar la viabilidad celular *in vitro*, los cuales se pueden clasificar en cuatro categorías principales:

1. *Ensayos de proliferación celular*, que evalúan el crecimiento y división de las células.
2. *Ensayos de síntesis de ADN*, que miden la actividad replicativa de las células.
3. *Ensayos de permeabilidad de membrana*, que detectan integridad celular.
4. *Ensayos de actividad metabólica*, que evalúan la viabilidad celular a través de la actividad enzimática.

Uno de los métodos más utilizados es la reducción de sales de tetrazolio, donde células metabólicamente activas convierten estas sales en formazán, un compuesto que puede cuantificarse mediante espectrofotometría UV-Vis.

El reactivo MTS (*3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio*) es ampliamente empleado para la evaluación de la viabilidad celular en estudios de FBM. En este método, las células se incuban con el reactivo MTS durante un período de 1 a 4 horas. Las células viables reducen el tetrazolio del MTS a formazán, generando un cambio de color de amarillo a morado. La cuantificación del formazán se realiza mediante espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 490 nm, lo que permite correlacionar la absorbancia con la cantidad de células viables.

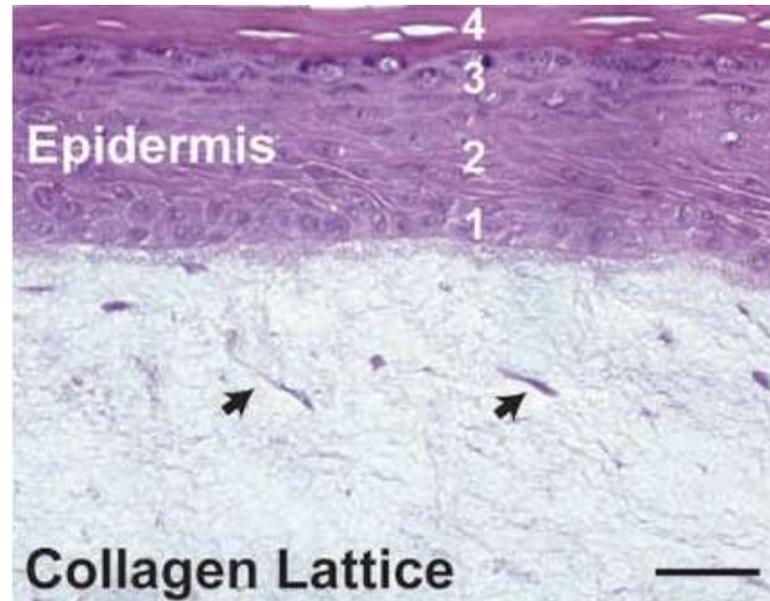
La FBM ha demostrado ser un método efectivo para modular la viabilidad celular, ya que influye en la actividad mitocondrial y en la regulación de ROS y NO. Dependiendo de la dosis de luz utilizada, la FBM puede inducir proliferación celular en condiciones fisiológicas o apoptosis en células dañadas o tumorales (Khokhlova et al., 2018).

## **2.5 Fibroblastos Dérmicos**

Los fibroblastos dérmicos son células esenciales en la piel, responsables de la síntesis y organización de la matriz extracelular. Además de mantener la estructura de la dermis, estas células regulan procesos biológicos como la reparación de heridas y la homeostasis de la piel (Lynch & Watt, 2018). Su capacidad de interacción con otras células y su variabilidad funcional los convierten en un elemento clave para el mantenimiento de la fisiología cutánea (Sorrell & Caplan, 2004).

### **2.5.1 Origen, Morfología y Diferenciación**

Los fibroblastos dérmicos provienen de células madre mesenquimales y pueden clasificarse en diferentes subtipos según su localización en la dermis como se muestra en la Figura 3. Se han identificado fibroblastos papilares, ubicados en la dermis superior, y fibroblastos reticulares, en la dermis profunda, cada uno con características bioquímicas y funcionales distintas (Sorrell & Caplan, 2004).



**Figura 3.** Representación de las bases de la piel, en la capa superficial se encuentra la epidermis; (1) basal, (2) espinosa, (3) granular y (4) cornea, y debajo de ella se encuentra la capa dermis. Los fibroblastos, señalados con flechas, se encuentran encerrados en una red de colágeno de tipo I proporcionan soporte dérmico a la epidermis. Barra 44 $\mu$ m (Sorrell & Caplan, 2004).

Morfológicamente, los fibroblastos son células fusiformes con prolongaciones citoplasmáticas, un núcleo ovalado y una alta proporción de retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi, reflejando su intensa actividad en la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (Grinnell, 2003). Durante la reparación tisular, algunos fibroblastos pueden diferenciarse en miofibroblastos, caracterizados por la expresión de actina de músculo liso y la capacidad contráctil necesaria para la cicatrización de heridas (Hinz et al., 2007).

### 2.5.2. Funciones Principales

#### *Producción y Mantenimiento de la Matriz Extracelular*

Los fibroblastos dérmicos sintetizan colágeno tipo I y III, elastina y proteoglicanos, los cuales conforman la matriz extracelular proporcionando soporte mecánico y funcional a la piel (Lynch & Watt, 2018). Se ha demostrado que los fibroblastos papilares y reticulares tienen distintas capacidades de síntesis y remodelación de la matriz extracelular (Sorrell & Caplan, 2004). Además, estas células producen

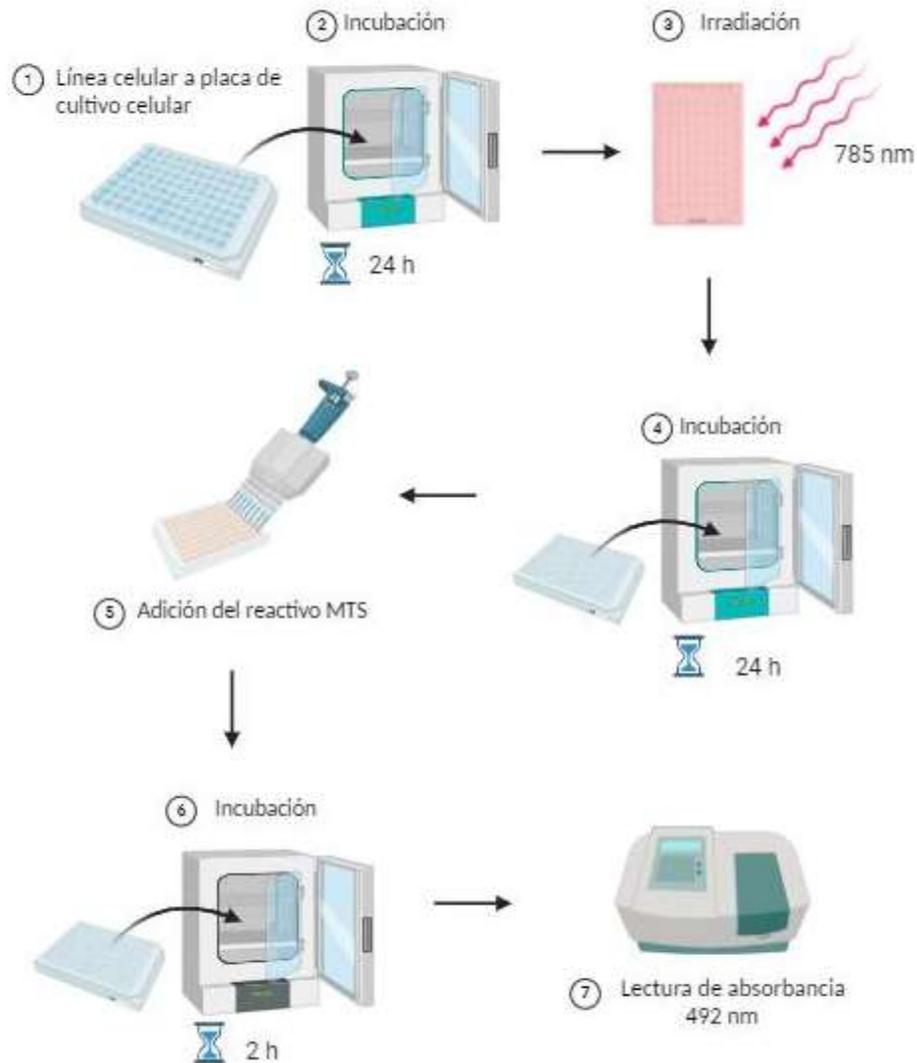
metaloproteinasas, enzimas que regulan el equilibrio entre la formación y degradación de la matriz extracelular (Kalluri & Zeisberg, 2006).

### ***Cicatrización y Regeneración***

En respuesta a una lesión, los fibroblastos migran hacia la herida estimulados por citoquinas y factores de crecimiento. Durante este proceso, secretan colágeno y otros componentes extracelulares para facilitar la reparación del tejido dañado (Hinz et al., 2007). Se ha observado que los fibroblastos reticulares contribuyen más activamente a la remodelación del tejido lesionado debido a su capacidad para contraer la matriz y promover la reepitelización (Sorrell & Caplan, 2004).

## Capítulo 3. Metodología

Este capítulo detalla la metodología empleada en el desarrollo de esta tesis, la cual se resume a modo de introducción en la Figura 4. Posteriormente, se describe en detalle el diseño e implementación del arreglo óptico experimental utilizado para las pruebas de irradiación *in vitro* de fibroblastos dérmicos humanos. Se incluye la caracterización del perfil del haz de luz, cuyo objetivo es garantizar una distribución uniforme de la irradiación sobre las muestras. Además, se explica el sistema de automatización implementado para controlar de manera precisa el tiempo de irradiación. Finalmente, se describe el proceso de cultivo y preparación de muestras celulares, seguido de los ensayos de viabilidad, los cuales permitirán evaluar la respuesta biológica de los fibroblastos frente a las diferentes condiciones de irradiación.



**Figura 4.** Proceso para determinar la respuesta biológica de una línea celular.

### 3.1 Descripción general de la metodología

La metodología empleada para determinar la respuesta biológica de fibroblastos dérmicos humanos (línea celular CCD-1112Sk, derivadas de prepucio de neonato humano) consta de siete pasos, como se muestra en la Figura 4, los cuales se describen a continuación:

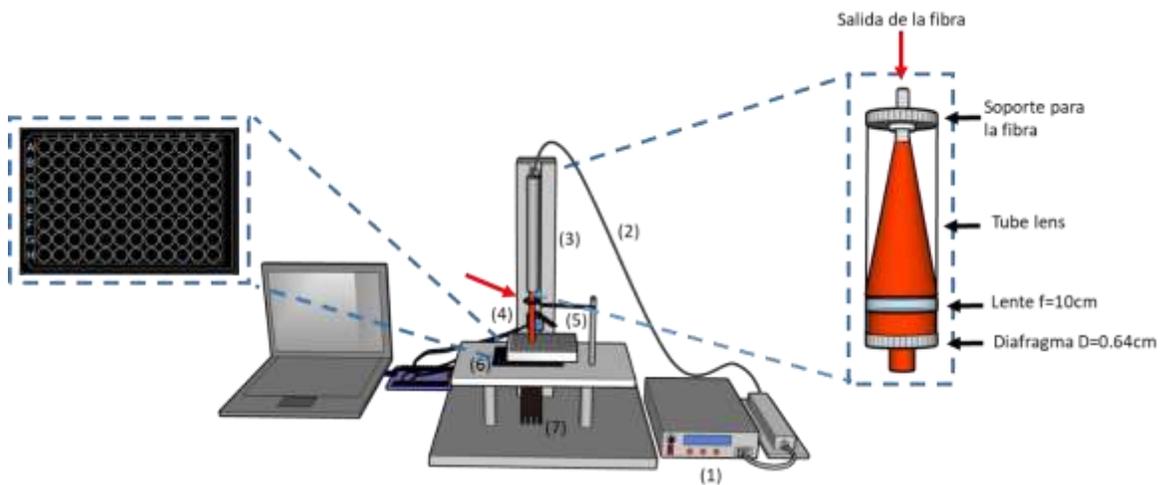
1. *Cultivo Celular*: En el primer paso, las células se incuban, lavan y cuantifican según los procedimientos descritos más adelante en la sección 3.5.
2. *Incubación Previa*. El segundo paso, las células se incuban durante 24 horas antes de la irradiación.
3. *Irradiación*. El tercer paso, las células se exponen a la irradiación de luz infrarroja a 785 nm mediante el arreglo experimental descrito en la sección 3.2, siguiendo los protocolos de irradiación diseñados específicamente para estos experimentos, como se explican en las secciones 3.3 y 3.4.
4. *Incubación Posterior*. Tras la irradiación, el cuarto paso consiste en incubar nuevamente las células por 24 horas antes de evaluar la respuesta biológica, permitiendo una adecuada recuperación y reacción al tratamiento. Esta segunda incubación es necesaria para evaluar cómo la irradiación afecta la capacidad de las células para sobrevivir y proliferar y, con ello, obtener resultados confiables.
5. *Adición del reactivo MTS*. El quinto paso consiste en añadir el reactivo MTS para evaluar la actividad metabólica y viabilidad celular tal y como se explica en la sección 3.8.
6. *Incubación final*. Se incuban nuevamente las células con el reactivo MTS durante un lapso de dos horas para permitir la reducción de tetrazolio del MTS a formazán, generando un cambio de color de amarillo a morado.
7. *Lectura de absorbancia*. Se cuantifica la viabilidad celular mediante espectrofotometría de absorción a 492 nm.

Este procedimiento se desarrolló para diferentes placas de cultivo en las cuales se aplican diferentes fluencias de irradiación. Posteriormente, se analizan los resultados de la absorbancia y se cuantifica la

viabilidad, para finalmente aplicar pruebas estadísticas y determinar diferencias significativas entre los grupos experimentales.

### 3.2 Arreglo óptico para la irradiación de células

Para evaluar el efecto de la FBM inducido en fibroblastos por los efectos de la irradiación, se diseñó un montaje experimental que permite irradiar cada pozo de una caja de cultivo celular de manera homogénea, sin afectar pozos contiguos cargados con células. En la Figura 5 se presenta el esquema del sistema de irradiación, compuesto por un diodo láser de 785 nm (CNI, MDL-III-785-500mW) con salida acoplada a una fibra óptica. La potencia de salida es ajustable entre 0 y 500 mW. La fibra óptica se conecta a un tubo de lente, el cual contiene un sistema de colimación compuesto por una lente ( $L$ ) plano-convexa con una distancia focal,  $f$ , de 10 cm y un diafragma con una apertura,  $D$ , de 6.3mm. Este sistema de colimación se muestra en detalle el recuadro derecho dentro de la Figura 5. El haz divergente que emite la fibra es colimado por la lente, mientras que el diafragma delimita el área del haz con un diámetro que coincide con el diámetro de los pozos de la placa de cultivo.



**Figura 5.** Sistema óptico de irradiación para inducir la FBM en los fibroblastos.

En la Figura 5 se enumeran los componentes del sistema, los cuales corresponden a: (1) Diodo láser y controlador de potencia; (2) Fibra óptica; (3) Sistema de colimación (ver recuadro a la derecha); (4) Sistema automatizado de obturación del haz; (5) Placa de cultivo celular (donde se depositan las muestras

celulares); (6) Base perforada con plantilla de la placa de cultivo; y (7) Trampa de luz (“beam trap”). Derecha: Sistema de colimación compuesto de una lente colimadora y un diafragma. Izquierda: Plantilla para situar las coordenadas de cada pozo en la placa de cultivo de 92 pozos.

El sistema de colimación se posiciona de forma transversal a la caja de cultivo celular, la cual se coloca sobre una base metálica pintada de color negro para disminuir las reflexiones de luz. A esta base metálica se le adhiere una plantilla que reproduce la distribución real de los pozos. La placa de cultivo es una microplaca de 96 pozos, distribuidos en 12 columnas y 8 filas, donde cada pozo tiene un diámetro de 6.3 mm. La plantilla permite posicionar manualmente el pozo a irradiar en las coordenadas correspondientes, como se muestra en el recuadro izquierdo de la Figura 5. Finalmente, en el trayecto del haz hacia la placa de cultivo, se añadió un segundo diafragma para reducir el esparcimiento producido por el primer diafragma. Este segundo diafragma se indica con una flecha roja y en la figura se ubica antes del sistema de obturación.

El tiempo de irradiación se controla mediante un sistema automatizado de obturación, operado por una computadora a través de una tarjeta Arduino. Debajo de la base, justo en la apertura por donde el haz atraviesa el pozo de cultivo, se coloca una trampa de haz (“beam trap”, Thorlabs), que absorbe la energía del haz láser y reduce posibles efectos de retrorreflexión.

Para la realización de los experimentos, el sistema de irradiación se colocó dentro de una campana de flujo laminar en un ambiente estéril, con el fin de preservar la viabilidad de las células.

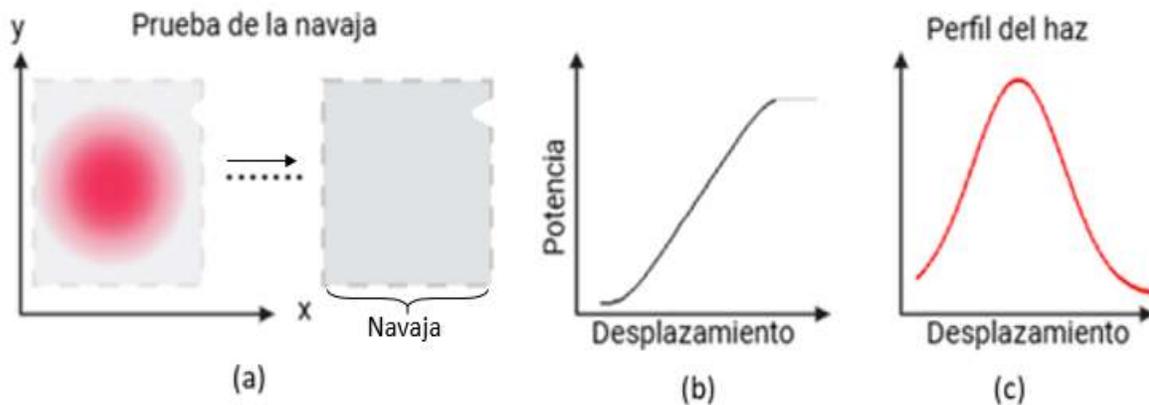
### **3.3 Caracterización del perfil del haz láser**

Para asegurar una distribución uniforme de la irradiación sobre las muestras, se colimó el haz infrarrojo proveniente de la fibra (ver recuadro derecho de la Figura 5). Se probaron dos lentes planoconvexas, con diferentes distancias focales (75 y 100 mm), con el fin de determinar cuál de ellas amplificaba más el perfil del haz, de tal manera que irradiara homogéneamente el área de los pozos.

Para la caracterización del perfil del haz láser se utilizó la técnica de la navaja (DeGroot & Schervish, 2012), ilustrado en la Figura 6. La cual consiste en bloquear (o desbloquear) progresivamente el haz del láser mediante un borde plano desplazado en pasos micrométricos (ver Figura 6a). Durante este proceso, se

mide la variación de la potencia del haz obteniéndose un perfil de intensidad que se asemeja a una función de distribución de probabilidad gaussiana mostrada en la Figura 6b. Al integrar este perfil, finalmente se reconstruye la distribución gaussiana del haz tal y como se muestra en la Figura 6c.

Para determinar la colimación del haz, se midió su cintura utilizando el criterio del “ancho total medido a la mitad de la intensidad máxima” del haz (FWHM, por sus siglas en inglés). Este procedimiento se realizó a las distancias de 5cm, 10cm y 30 cm después de la lente colimadora. Se consideró que el haz está colimado cuando su ancho es aproximadamente la misma en estas tres distancias. Como se detallará en el capítulo de resultados, el perfil óptimo del haz se obtuvo con la lente de 100 mm de distancia focal. Con ella se logró una cintura del haz de aproximadamente de 12 mm. Este diámetro cubre completamente los pozos de la placa de cultivo, las cuales miden 6.3 mm de diámetro.



**Figura 6.** Diagrama de la técnica de la navaja: a) Perfil transversal del haz; b) Distribución de intensidad acumulada al desplazar la navaja; c) Perfil del haz obtenido al derivar (b).

### 3.4 Automatización del tiempo de exposición

Para garantizar un control preciso de la exposición de la luz infrarroja, se implementó un sistema de obturación que permitía pasar y bloquear el haz del láser por tiempos determinados. El movimiento del obturador fue ejecutado por un servomotor (MOT-100, Steren) controlado por una tarjeta Arduino UNO, utilizando su lenguaje de programación (Arduino IDE 1.8.19).

El tiempo de apertura del obturador se ajustó progresivamente según el tiempo de exposición requerido

para suministrar cada fluencia del haz sobre las células.

Cada fluencia de irradiación se administró en tres pozos distintos, manteniendo el mismo tiempo de exposición para cada pozo y un tiempo “muerto” (sin luz) entre cada irradiación para cambiar de pozo, según se explica más adelante en la sección 3.7. Después de completar la irradiación de tres pozos, se incrementó el tiempo de exposición para la siguiente triada de irradiaciones.

El algoritmo programado en Arduino ejecutó las aperturas y cierres del obturador en secuencia, garantizando el aumento en los tiempos de irradiación para incrementar las fluencias cada tres irradiaciones. El código del programa se muestra de manera detallada en la sección de anexos.

### **3.5 Cultivo y preparación de muestras**

Las células se cultivaron en cajas Petri utilizando medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Minimum Essential Medium) suplementado con 10% suero fetal bovino (BioWest™) y 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco™). Se incubaron a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió regularmente hasta que las células alcanzaron una confluencia mínima del 80%.

Una vez lograda la confluencia deseada, se despegaron las células de la placa mediante el reemplazo del medio de cultivo y se eliminaron los restos celulares con dos lavados de 6 ml de solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) ajustada a un pH de 7.4. Luego, se agregó 1 ml de tripsina para facilitar el desprendimiento de las células adheridas y se colocan en incubación por 5 minutos a 37°C. Tras este paso, se agregó medio de cultivo para inactivar la enzima y las células se centrifugaron durante cinco minutos, para asegurar la eliminación completa de las interacciones que mantenían a las células adheridas al fondo de las cajas de cultivo.

Para realizar el conteo celular, se tomó 20 µL de la solución y se le agregó 20 µL de azul tripano, el cual permite diferenciar entre las células vivas y muertas, también se utilizó una cámara de Neubauer donde se contó la cantidad de células vivas por cuadrante. Con este procedimiento se determinó un promedio de células por ml.

### 3.6 Condiciones de irradiación de células

Se aplicaron irradiaciones en un rango exponencial de 0.05 a 8 J/cm<sup>2</sup>, basadas en la literatura. Los tiempos de exposición fueron definidos utilizando una progresión geométrica con razón  $r = 2$ , de acuerdo a la ecuación:

$$t_n = t_0 \cdot 2^{n-1}, \quad (10)$$

donde  $t_n$  es el tiempo de exposición (que incrementa con  $n$ ),  $t_0 = 1.6$  s es el tiempo de irradiación inicial y  $n = 1, 2, \dots, 8$ , es el número de irradiaciones.

Dado que la fluencia está dada por la expresión  $F = t_n P / S_{circ}$ ; con  $P$  como la potencia promedio del haz y  $S_{circ}$  como el área circular del haz láser cuyo diámetro es el ancho al FWHM del perfil del haz. Entonces, sustituyendo la ecuación (10) en esta expresión, la fluencia queda expresada de la siguiente forma:

$$F = \frac{P}{S_{circ}} t_0 \cdot 2^{n-1} \quad (11)$$

**Tabla 1.** Condiciones de irradiación correspondiente para una potencia de 10mW y una distancia de 10cm.

n	Tiempo (s)	Fluencia (J/cm <sup>2</sup> )
1	1.6	0.05
2	3.2	0.1
3	6.4	0.2
4	12.8	0.4
5	25.6	0.8
6	51.2	1.6
7	102.4 (1m 42 s)	3.2
8	204.8 (3m 24s)	6.4
9	256 (4m 16s)	8

Considerando una potencia de irradiación de 10 mW, medida en el plano de la muestra, y un área de los pozos de  $S_{circ} = 0.31 \text{ cm}^2$ , se obtienen las fluencias que se detallan en la Tabla 1. Nótese que el último tiempo de exposición, para cuando  $n = 9$ , no cumple con la progresión geométrica de la ecuación (11). En su lugar, se utilizó un tiempo de exposición  $t_9 = 256 \text{ s}$  para ajustar el tiempo total irradiado las tres placas, como se explicará en la siguiente sección.

### 3.7 Distribución de las irradiaciones en las placas de cultivo

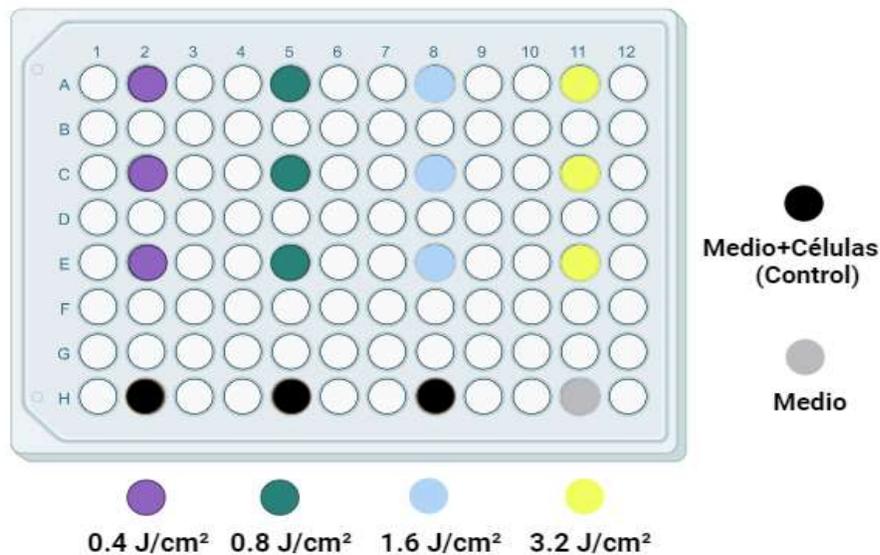
Para evaluar el efecto de la irradiación se sembraron las células en una microplaca de 96 pozos, en la cual se colocaron 5,000 células por pozo en 100  $\mu\text{l}$  de medio DMEM F-12 libre de rojo fenol, suplementado con 10% de suero fetal bovino (BioWest™) y con un 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco™). Las células se incubaron por 24 horas antes de la irradiación a una temperatura a 37°C en una atmósfera con un 5% de  $\text{CO}_2$ .

La distribución de las células en la caja de cultivo se organizó considerando las condiciones de irradiación, el tiempo de exposición de cada fluencia y el tiempo total de exposición cada caja de cultivo. Para garantizar la validez de los resultados de viabilidad celular, los ensayos se realizaron por triplicado. La distribución detallada de las células en la caja de cultivo se presenta en las Figuras 8, 9, 10 y 11. Tres placas se utilizaron para las distintas fluencias de irradiación, de manera tal que el tiempo total de la placa fuera similar (ver Tablas 2, 3 y 4). La cuarta caja se utilizó para determinar si el medio y el control estando afuera del sistema óptico presentan alguna diferencia con respecto al medio y control dentro del sistema óptico.

En la Figura 7, se muestra la distribución de la primera placa de cultivo, donde los pozos expuestos a fluencias de 0.4, 0.8, 1.6 y 3.2  $\text{J}/\text{cm}^2$  están identificados con colores distintos. Los círculos morados corresponden a las células irradiadas durante 12.8 segundos para una fluencia de 0.4  $\text{J}/\text{cm}^2$ ; los círculos verdes a las irradiadas por 25.6 segundos para a una fluencia de 0.8  $\text{J}/\text{cm}^2$ ; los círculos azules fueron expuestos a 51.2 segundos para suministrar 1.6  $\text{J}/\text{cm}^2$ ; y, finalmente, los círculos amarillos fueron expuestos por 102.4 segundos para suministrar 3.2  $\text{J}/\text{cm}^2$ . La Tabla 2 muestra el tiempo total que dura esta prueba de exposición, siendo este un tiempo de 11 minutos 26 segundos.

**Tabla 2.** Condiciones de irradiación correspondiente para la placa 1.

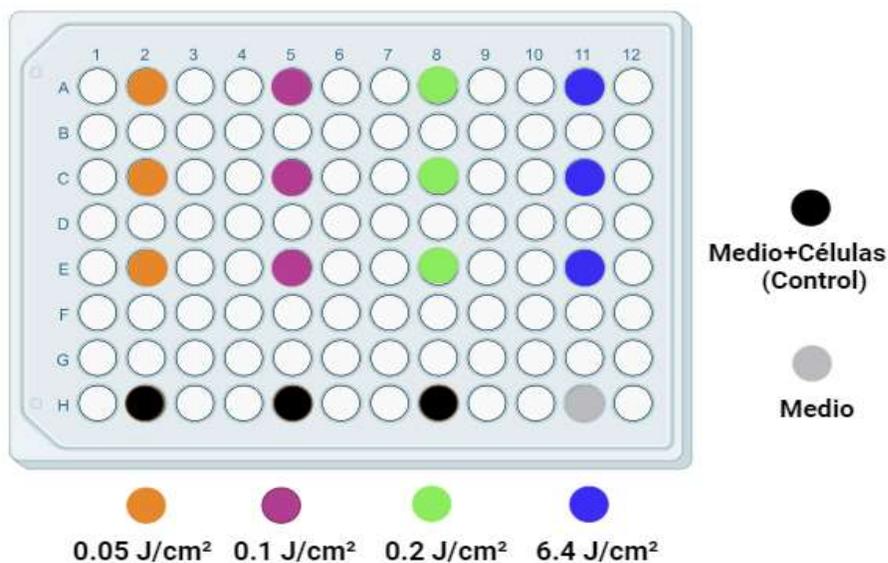
n	Fluencia (J/cm <sup>2</sup> )	Tiempo (s) por pozo	Tiempo (s) por los tres pozos
4	0.4	12.8	<b>38.4</b>
5	0.8	25.6	<b>76.8 (1m 16s)</b>
6	1.6	51.2	<b>153.6 (2m 33s)</b>
7	3.2	102.4 (1m 42 s)	<b>307.2 (5 m 7s)</b>
Tiempo de movimiento de placa			<b>1m 50s</b>
<b>Tiempo Total</b>			<b>11m 26s</b>

**Figura 7.** Distribución de fluencias en la placa 1.

La Figura 8, muestra la distribución de fluencias de la segunda placa de cultivo, donde los pozos son expuestos a 0.05, 0.1, 0.2 y 6.4 J/cm<sup>2</sup>. Y cuyos respectivos tiempos de irradiación se representan de la siguiente manera: los círculos naranjas representan las células irradiadas por 1.6 segundos para suministrar una fluencia de 0.05 J/cm<sup>2</sup>; los círculos rosas a las irradiadas por 3.2 segundos para a una fluencia de 0.1 J/cm<sup>2</sup>; los círculos verdes fueron expuestos a 6.4 segundos para suministrar 0.2 J/cm<sup>2</sup>; y, finalmente, los círculos azules fueron expuestos por 204.8 segundos para suministrar 6.4 J/cm<sup>2</sup>. La Tabla 3 resume esta distribución de irradiaciones dando un tiempo total de 12 minutos 8 segundos.

**Tabla 3.** Condiciones de irradiación correspondiente para la placa 2.

n	Fluencia (J/cm <sup>2</sup> )	Tiempo (s) por pozo	Tiempo (s) por los tres pozos
1	0.05	1.6	4.8
2	0.1	3.2	9.6
3	0.2	6.4	19.2
8	6.4	204.8 (3m 24s)	614.4 (10m 14s)
Tiempo de movimiento de placa			1m 20s
<b>Tiempo Total</b>			<b>12m 8s</b>

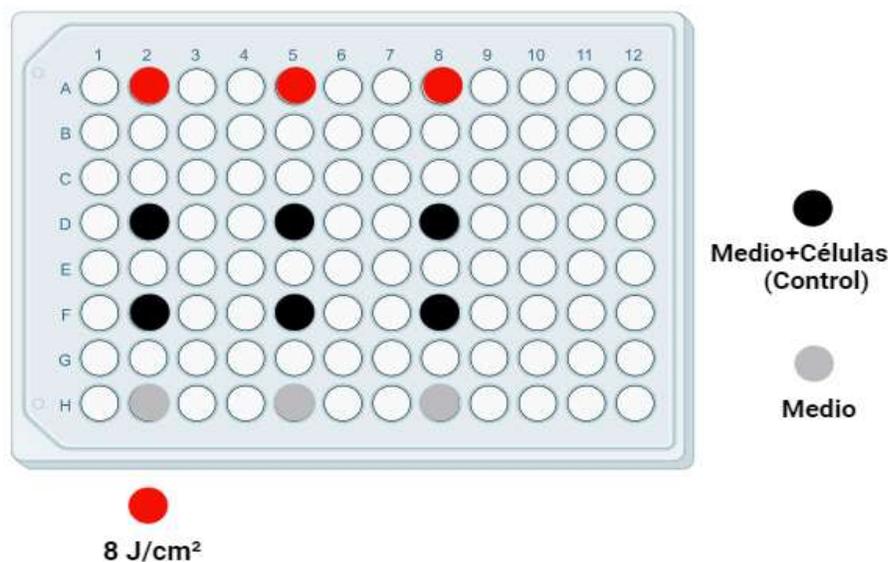
**Figura 8.** Distribución de fluencias en la placa 2.

En la tercera placa, ilustrada en la Figura 9, sólo tres pozos fueron irradiados. Estos están representados por círculos rojos, que corresponden a las células expuestas a una fluencia de 8 J/cm<sup>2</sup> irradiados por 256 segundos (ver Tabla 4). La irradiación de estos tres pozos dio un tiempo total de 13 minutos, 8 segundos. Además, en la misma caja se monitorearon seis pozos con células de control, representada con círculos negros, y tres pozos con medio de cultivo, indicados con círculos grises. El objetivo es monitorear estos

últimos nueve pozos en ausencia de exposición directa, pero aún dentro del arreglo experimental. Esto debido a que pudiera existir luz esparcida proveniente desde la primera hilera de pozos durante su irradiación. Con esto se buscó medir si tal luz esparcida, por mínima que esta fuera, afecta la viabilidad de las células.

**Tabla 4.** Condiciones de irradiación correspondiente para la placa 3.

n	Fluencia (J/cm <sup>2</sup> )	Tiempo (s) por pozo	Tiempo (s) por los tres pozos
	8	256	768
Tiempo de movimiento de placa			20s
<b>Tiempo Total</b>			<b>13m 8s</b>



**Figura 9.** Distribución de fluencias en la placa 3.

En la cuarta y última placa, mostrada en la Figura 10, se monitorearon tres pozos con células de control, representada con círculos negros, y tres pozos con medio de cultivo, indicados con círculos grises. A diferencia de la placa 3, aquí el objetivo es monitorear estos pozos en completa obscuridad, fuera del arreglo experimental. Esto para derivar conclusiones sobre la posible influencia del medio de cultivo en las mediciones de absorbancia.

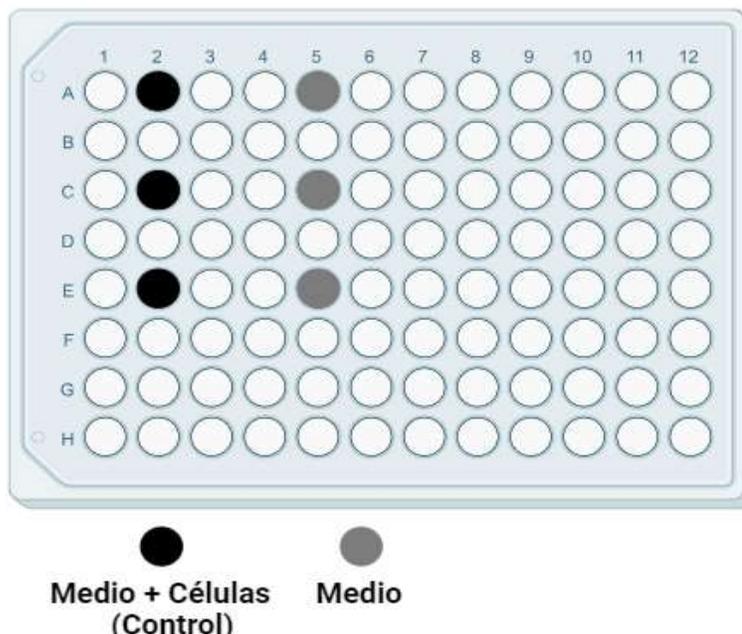


Figura 10. Distribución de fluencias en la placa 4.

### 3.8 Ensayo de viabilidad (MTS)

Para evaluar la viabilidad celular (de la línea celular CCD-1112Sk) tras la irradiación, se utilizó el ensayo de viabilidad MTS (CellTiter 96®, Promega). Este ensayo mide la actividad metabólica de las células a través de la reducción del reactivo MTS a formazán soluble en medios acuosos, el cual es directamente proporcional a la cantidad de células viables.

Las células irradiadas y de control fueron incubadas durante 24 horas. Posteriormente se agregaron 20µL del reactivo MTS directamente a cada pozo que contenía células y medio de cultivo. Las placas se incubaron a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 horas para permitir la conversión de MTS a formazán. Luego se midió la absorbancia a 492 nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas (EPOCH, BioTek). Para evaluar la morfología de las células antes y después de la irradiación, se les tomaron fotografías a las células expuestas al tratamiento y de control.

Con los resultados de absorbancia se calculó el porcentaje de viabilidad mediante la siguiente ecuación

$$\%Viabilidad = \frac{A_{Cel}}{A_{Cont}} \times 100\%, \quad (12)$$

donde es  $A_{Cel}$  la absorción de las células irradiadas (a diferentes fluencias) y  $A_{Cont}$  es la absorción de las células de control (sin irradiar).

### 3.9 Análisis estadísticos

Para comparar los resultados de viabilidad celular (%) de las distintas dosis de luz infrarroja suministradas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnett.

El ANOVA de una vía permite evaluar si hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las medias de los distintos grupos de irradiación y el grupo de control, pero no especifica cuáles son esos grupos. En caso de encontrar diferencias significativas, se aplicó la prueba de Dunnett, que compara individualmente cada grupo experimental contra el control, determinando cuáles tratamientos tienen un efecto estadísticamente relevante.

El valor  $p$  nos indica el nivel de significancia observado en una prueba estadística y se utiliza para evaluar la evidencia en contra de la hipótesis nula (que no existe una diferencia significativa) (Mendenhall et al., 2006). En este caso, se utilizó  $p < 0.05$ . Si se obtiene un valor de  $p$  menor a 0.05, se considera que los resultados son estadísticamente significativos, es decir, se rechaza la hipótesis nula.

Los análisis estadísticos se realizaron en GraphPad Prism 10.2.3. Se reportaron los valores de  $p$ , así como los intervalos de confianza y las desviaciones estándar de cada grupo. Además, los datos fueron representados en gráficos de barras con medias y errores estándar para visualizar mejor las diferencias en viabilidad celular entre las distintas condiciones experimentales.

## Capítulo 4. Resultados y Discusiones

---

En este capítulo se presentan y discuten los principales resultados obtenidos a lo largo de esta investigación. La estructura del capítulo sigue el orden cronológico de la metodología experimental para facilitar la comprensión de los resultados en relación con los objetivos planteados. Primero, se exponen los resultados de la caracterización del haz de luz utilizado en los experimentos, lo cual es fundamental para asegurar su uniformidad y estabilidad, aspectos clave para la reproducibilidad y confiabilidad de los experimentos de irradiación celular. A continuación, se presentan los resultados de absorbancia y viabilidad celular en células de fibroblastos, lo cual permiten evaluar el efecto del tratamiento, proporcionando información sobre sus efectos inhibitorios e estimulatorios en la viabilidad celular y ofreciendo una medida directa del impacto en la supervivencia celular. Finalmente, se muestran las imágenes de campo abierto obtenidas, que complementan los análisis cuantitativos y permiten observar posibles cambios morfológicos de interés.

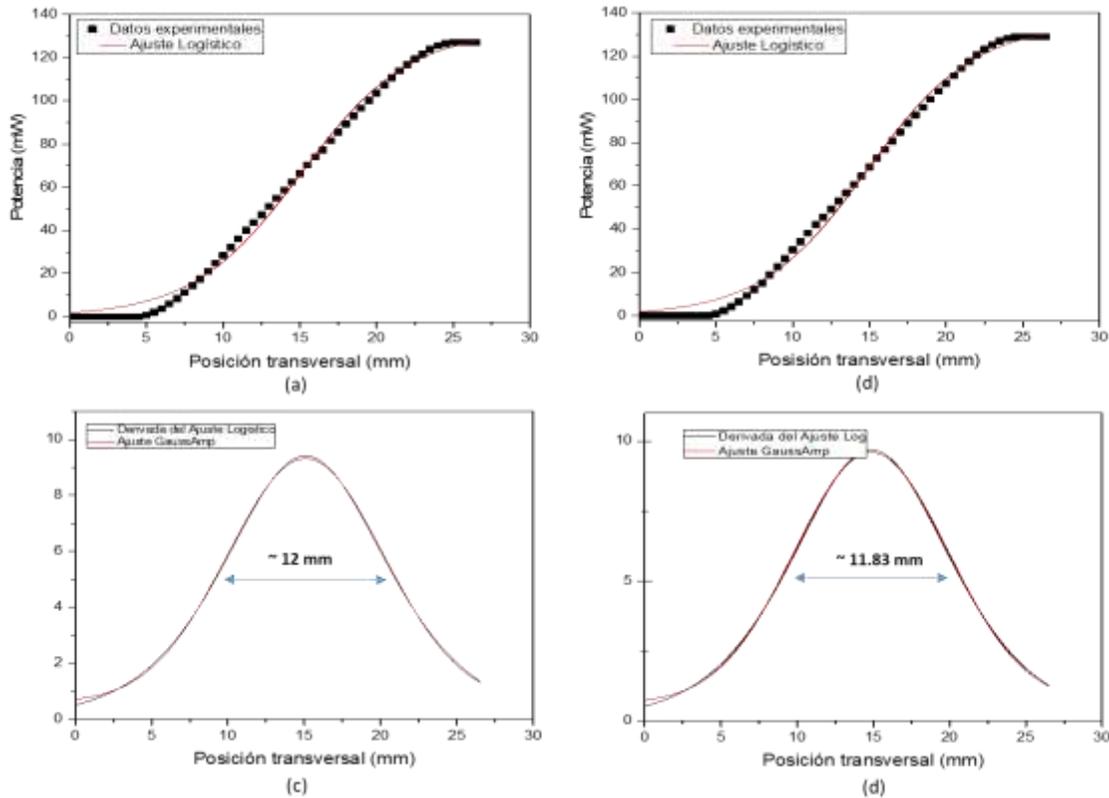
### 4.1 Caracterización del perfil del haz láser

Para realizar los experimentos de irradiación celular, se requiere un haz uniforme. Para esto, se colimó el haz divergente emitido por la fibra óptica mediante una lente plano-convexa con una distancia focal de  $f=100$  mm (ver figura 5).

La caracterización del perfil del haz se llevó a cabo utilizando la técnica de la navaja a tres distancias diferentes, posteriores a la lente de colimación, siendo estas de 5 cm, 10 cm y 30cm, respectivamente. En ese rango de distancias se obtuvo, una colimación del haz óptima, manteniéndose una cintura del haz aproximadamente constante, particularmente entre 5 y 10 cm. Se consideró que 10 cm es una distancia adecuada para mantener un arreglo óptico lo más compacto posible.

La Figura 11 muestra los resultados obtenidos con la técnica de la navaja para las distancias de 5 y 10 cm. En las Figuras 11a y 11b se observa la distribución de intensidad obtenida en estas dos distancias. Los cuadros negros corresponden a los datos experimentales, mientras que los trazos rojos son los ajustes obtenidos mediante *Origin* usando la función *signmodal Slogistic* mediante la expresión 13:

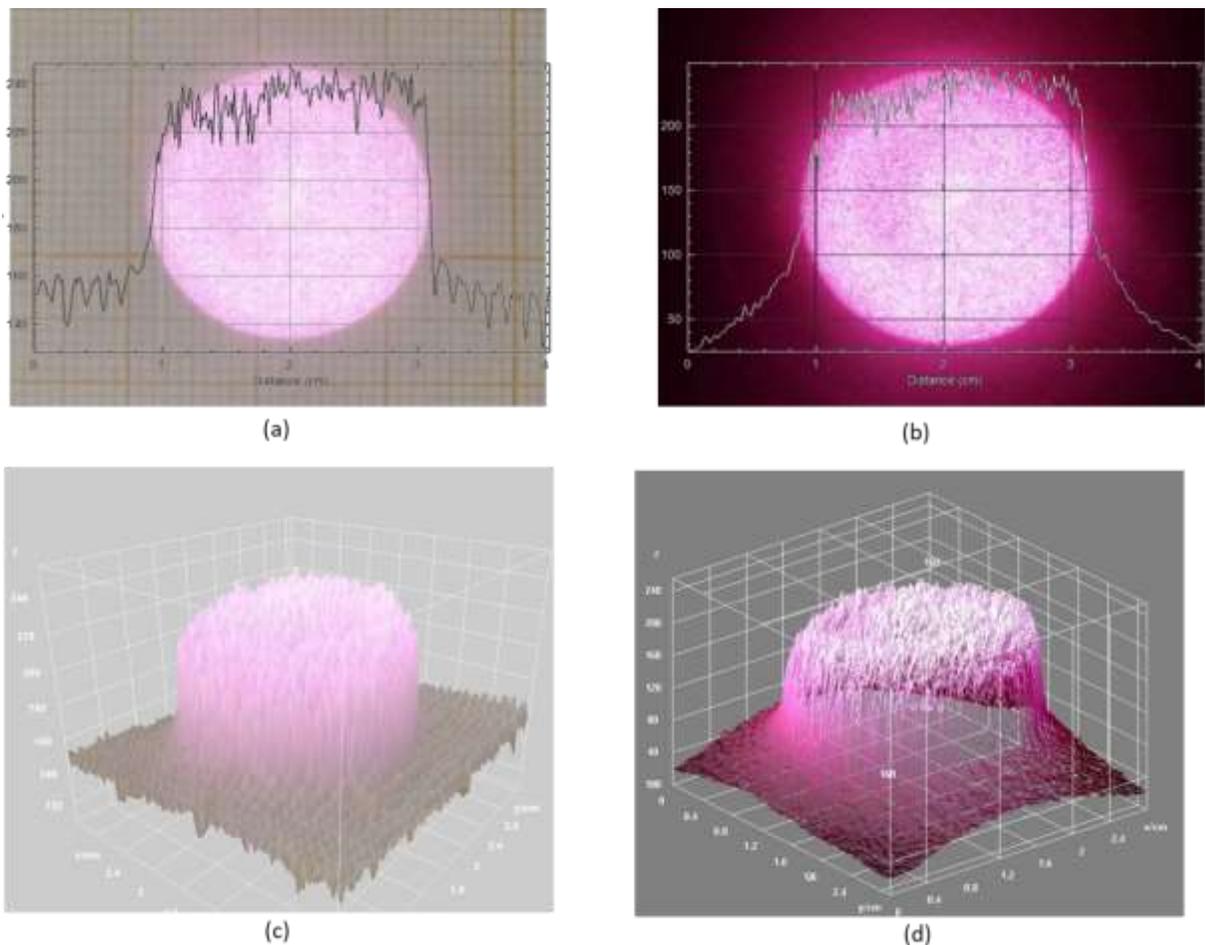
$$y = \frac{a}{(1 + \exp(-k * (x - xc)))}, \quad (13)$$



**Figura 11.** Resultados de la prueba de la navaja. Trazo de intensidad acumulada medido a una distancia de 5 cm (a) y 10 cm (b), respectivamente. Los cuadros negros presentan los datos experimentales, y los trazos rojos se muestra el ajuste. Perfiles del haz c) y d), obtenidos mediante la derivada (trazos negros) de los ajustes obtenidos en a) y b), respectivamente. En rojo se muestra el ajuste gaussiano.

Las Figuras 11c y 11d, muestra las respectivas derivadas de los ajustes obtenidos en las Figuras 11a y 11b, respectivamente, evidenciando un perfil casi gaussiano. Mediante un ajuste numérico, los valores obtenidos para el ancho del haz a distancias de 5 cm y 10 cm fueron de  $FWHM_1 = 12.01 \pm 0.01$  y  $FWHM_2 = 11.83 \pm 0.01$ , respectivamente. Aunque se observa un ligero desenfoque, reflejado en una disminución aproximada del diámetro del haz en aproximadamente un 2%, este puede considerarse colimado en dicho rango de distancia. Además, en ambos casos, los trazos gaussianos se extienden de 0 a 25.5 mm, lo cual es coherente con el diámetro de la lente de 1 pulgada (24.54mm). Esta consistencia en el rango también indica que el haz está efectivamente colimado.

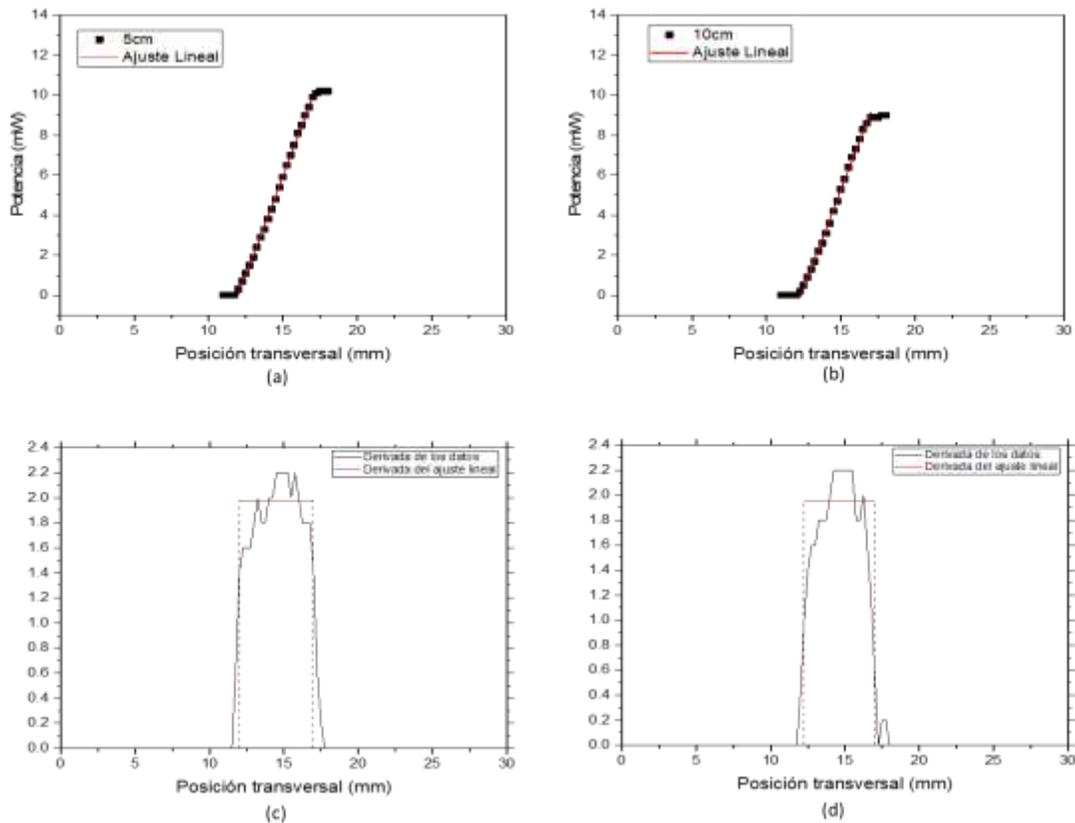
Mediante una captura fotográfica aérea de la intensidad del haz IR proyectado sobre la superficie donde se coloca la muestra, es posible verificar la uniformidad del haz. Las Figuras 12a y 12b muestran la proyección del haz sobre un papel milimétrico y la distribución de intensidad con y sin luz de fondo, respectivamente. Las Figuras 12c y 12d muestran este mismo experimento, sin luz de fondo. En la Figura 12a se aprecia una distribución de intensidad uniforme y casi circular, con diámetro de aproximadamente 2.16 cm en la base, y una intensidad casi constante debido a la luz de fondo (laboratorio iluminado). En contraste, en la Figura 12d revela que el haz presenta un leve decaimiento más allá del diámetro de 3.2 cm, lo cual es atribuible al decaimiento típico del haz gaussiano.



**Figura 12.** Medición de la uniformidad del haz. Proyección del haz sobre un papel milimétrico: (a) con luz de fondo y b) sin luz de fondo. c) y d), muestran la distribución de la intensidad del haz del área iluminada. El eje z corresponde a la intensidad del haz.

Dada la homogeneidad del haz obtenida, se realizó una segunda medición del perfil del haz utilizando un diafragma con una apertura de 6.3 mm en la lente de tubo, logrando una distribución uniforme del haz.

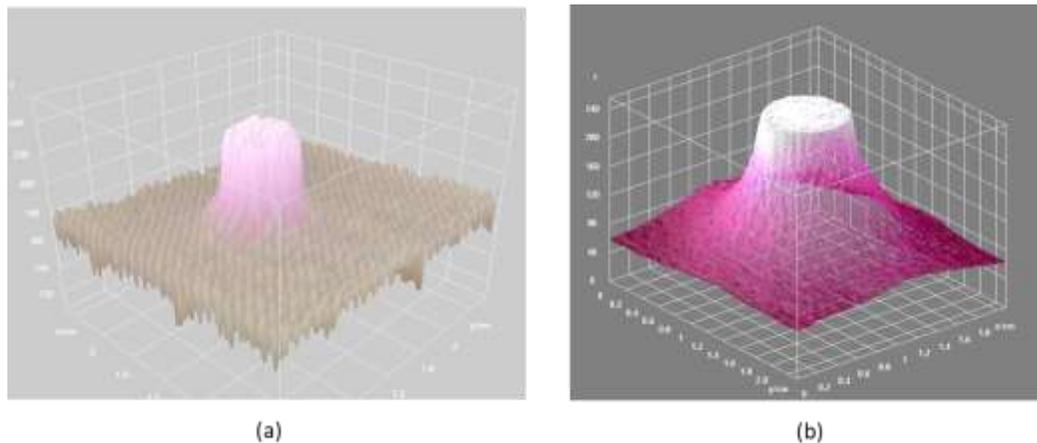
Este procedimiento asegura que todas las muestras sean irradiadas homogéneamente, garantizando una densidad de energía uniforme en las áreas de irradiación. La Figura 13 presenta los resultados. En las Figuras 13a y 13b se muestran los valores de potencia obtenidos al desplazar la navaja justo a 5 cm y 10 cm de distancia respecto a la lente de colimación. Los cuadros negros indican los datos experimentales y los trazos rojos son los ajustes respectivos. En este caso, dado que el perfil gaussiano es truncado por el diafragma, no se obtiene una distribución acumulada típica de un haz gaussiano, por lo que no es posible ajustar una función signmodal. En su lugar, se optó por hacer un ajuste lineal únicamente en la zona de subida de las trazas experimentales de intensidad acumulada. Las Figuras 13c y 13d muestran las derivadas de los datos (en cuadros negros) y de los ajustes (trazo rojo) obtenidos en las figuras 13a y 13b, respectivamente.



**Figura 13.** Caracterización del haz mediante la prueba de la navaja, utilizando un diafragma. Trazo de intensidad acumulada medido a una distancia de 5 cm (a) y 10 cm (b), respectivamente. En cuadros negros se presentan los datos experimentales, mientras que en trazos rojos se muestra el ajuste. Perfiles del haz c) y d), obtenidos mediante la derivada (trazos negros) de los trazos mostrados en a) y b), respectivamente. En rojo se muestra el ajuste gaussiano.

Con base en estos resultados, se puede resumir que el uso del diafragma genera un haz circular plano con

una uniformidad de aproximadamente 5 cm, como se observa en la Figura 14. En la Figura 14a, se aprecia una distribución de intensidad uniforme con un diámetro de aproximadamente 5 cm en la base y una intensidad constante debido a la iluminación de fondo del laboratorio. Cabe destacar que, a pesar del diafragma, en la Figura 14b aún se observa intensidad en los bordes del círculo, con un ligero decaimiento. Esto puede atribuirse al esparcimiento del haz al pasar por el diafragma, debido al truncado del perfil gaussiano. Por lo tanto, es importante evitar que dos pozos de cultivo sean consecutivos, ya que la luz esparcida podría influir en las mediciones.



**Figura 14.** Confirmación de la uniformidad del haz utilizando un diafragma. Proyección del haz sobre un papel milimétrico (a) con luz y b) sin luz.

## 4.2 Resultados de la irradiación celular

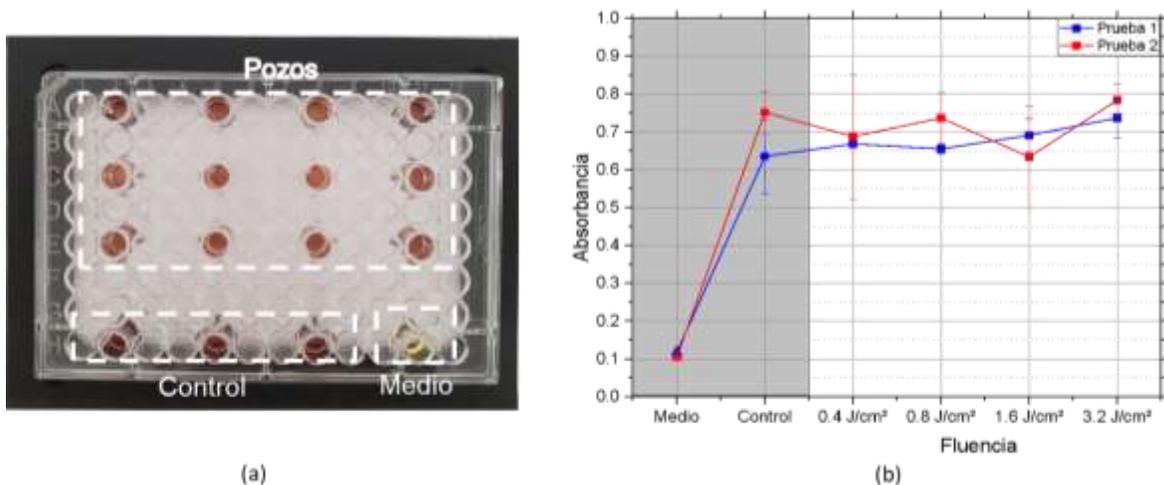
A continuación, se presentan los resultados obtenidos de absorbancia en dos pruebas de viabilidad celular. Para ello, en cada prueba se distribuyeron las células en las cuatro placas de cultivo según el protocolo descrito en la sección 3.7 del capítulo de metodología. Las primeras tres placas contienen distintas fluencias, manteniendo un tiempo de exposición similar para cada una (ver las tablas 2, 3 y 4). La cuarta placa se utilizó como control para evaluar las diferencias entre células con y sin irradiación bajo condiciones ópticas controladas.

### 4.2.1 Resultados de absorbancia

Los resultados de la primera placa se presentan en la Figura 15 donde las células fueron expuestas a

fluencias de 0.4, 0.8, 1.6 y 3.2 J/cm<sup>2</sup>. El tiempo total de irradiación en esta placa fue de 11 minutos. La Figura 15a muestra la imagen de la placa, adquirida después de las pruebas de irradiación, mientras que la Figura 15b muestra el gráfico con los valores de absorbancia obtenidos. Los datos de la primera prueba están en azul y los de la segunda, en rojo. Para facilitar la comparación, la sección sombreada de la gráfica incluye los valores de absorbancia correspondientes al medio y al control (ver la parte izquierda de la gráfica); estos corresponden a los pozos que no han sido radiados, por lo que esta zona gris del gráfico en realidad corresponde a cero J/cm<sup>2</sup>. Mientras que la sección en blanco (parte derecha de la gráfica) muestra los resultados obtenidos a las distintas fluencias utilizadas en la irradiación infrarroja. Este mismo esquema de graficado se aplica en las Figuras 16, 17 y 18.

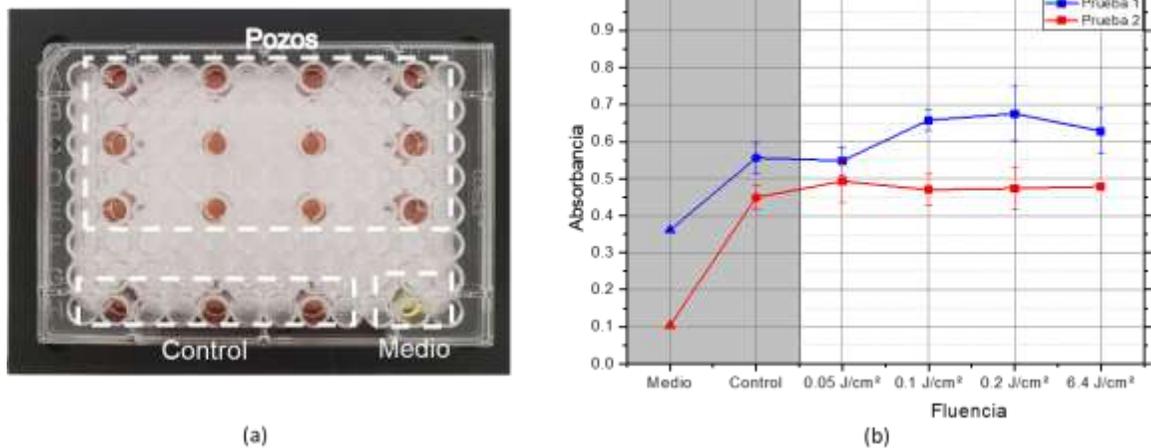
A primera vista, ambas pruebas parecen seguir una tendencia similar; sin embargo, un análisis detallado revela diferencias importantes. En la sección sombreada, el medio presenta una absorbancia prácticamente constante, como era de esperarse, dado que no contiene células ni fue expuesto a irradiación infrarroja. En contraste, el control muestra un cambio notable, lo cual podría deberse a que las células se encontraban en diferentes fases celulares, siendo la primera prueba en fase 20 y la segunda prueba en fase 24. En los resultados de las distintas fluencias (lado derecho de la gráfica) no se observan cambios significativos en las células irradiadas a 0.4 J/cm<sup>2</sup>. Sin embargo, en el caso de las células irradiadas a fluencias de 0.8, 1.6 y 3.2 J/cm<sup>2</sup>, se aprecian ligeras diferencias en el rango de 6.3 a 12.3 % entre ambas pruebas, pero estos valores se mantienen dentro del rango de la desviación de los datos (ver barras de error).



**Figura 15.** Resultados de absorbancia de la placa 1, representación de la a) distribución de los pozos irradiados y b) gráfica de los valores de absorbancia obtenidos.

Los resultados de absorbancia de la placa 2 se muestran en la Figura 16, donde las células fueron expuestas a fluencias de 0.05, 0.1, 0.2 y 6.4 J/cm<sup>2</sup> y el tiempo de irradiación total es de 12 minutos. A diferencia de la primera placa, en la Figura 16b se observan diferencias en los valores de absorbancia, tanto en el medio de cultivo como en las células de control (zona gris). Nótese aquí, que el pozo correspondiente al medio de cultivo en la prueba 1, que no fue irradiado y no contiene células, muestra un aumento considerable en la absorbancia. Este resultado es inconsistente y, como se demostrará más adelante, podría deberse a un error de procedimiento en el manejo de ese pozo de cultivo.

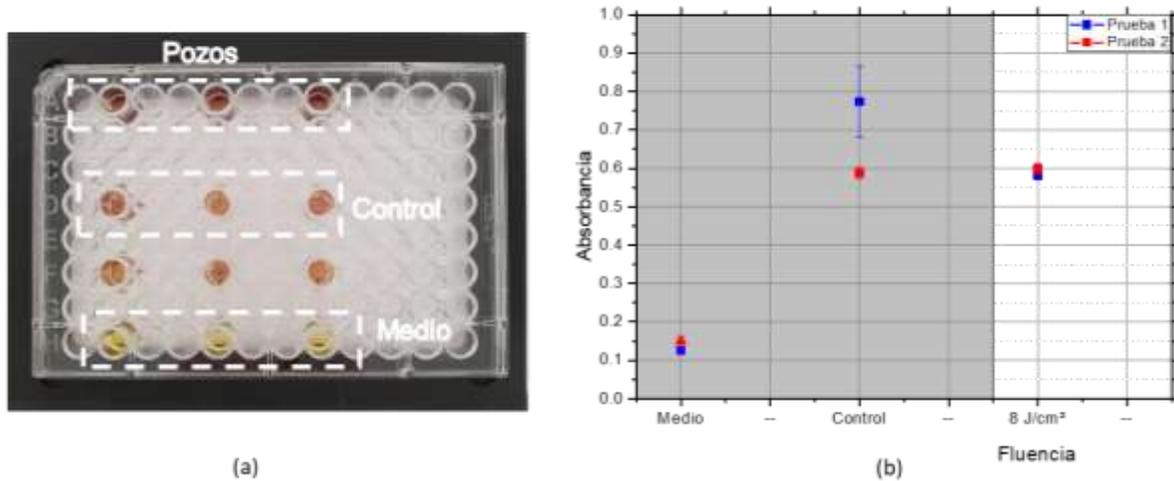
Por otro lado, en el caso de las células irradiadas (zona blanca), los valores de absorbancia en la prueba 1 son, en general, mayores en comparación con los de la prueba 2. Con excepción a la fluencia de 0.05 J/cm<sup>2</sup>, las absorbancias en las demás fluencias no se superponen en absoluto y no caen dentro del rango de dispersión de las respectivas mediciones. Esto sugiere, en primera instancia, que hay una variación en la respuesta entre las dos pruebas. Esta discrepancia podría ser atribuida a errores de cultivo ya que de igual manera se encuentra un aumento en el medio de cultivo.



**Figura 16.** Resultados de absorbancia de la placa 2, representación de la a) distribución de los pozos irradiados y b) gráfica de los valores de absorbancia obtenidos.

Los resultados de absorbancia de la placa 3 se muestran en la Figura 17. En esta placa se irradiaron células a una fluencia de 8 J/cm<sup>2</sup>, cuyo el tiempo de exposición de irradiación tan solo en esta fluencia es de 13 minutos. Se puede ver que la absorbancia del medio presenta un valor parecido en ambas pruebas, con un valor de absorbancia prácticamente igual a las obtenidas en la placa 1. Por su parte, el control muestra un cambio notable, en este caso a la baja, entre las pruebas, lo cual podría deberse nuevamente a que las

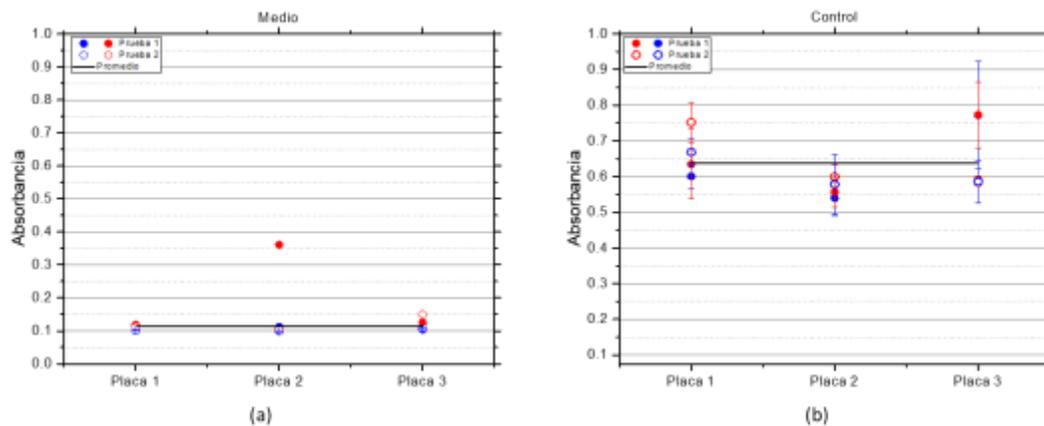
células se encontraban en diferentes fases. En cuanto a la absorbancia obtenida en la única irradiación aplicada en esta placa, es de destacarse que se obtiene un valor muy parecido en ambas pruebas.



**Figura 17.** Resultados de absorbancia de la placa 3, representación de la a) distribución de los pozos irradiados y b) gráfica de los valores de absorbancia obtenidos.

#### 4.2.2 Comparación de la absorbancia dentro y fuera del arreglo experimental

Las pruebas en medio de cultivo y en células de control de la placa 4 se llevaron a cabo fuera del arreglo experimental, sin exposición a ningún tipo de luz. Esta prueba se realizó con el fin de evaluar la posible influencia de la luz infrarroja esparcida hacia los pozos dedicados al control. Los resultados de esta placa se muestran en la Figura 18.



**Figura 18.** Representación gráfica de los datos obtenidos de a) medio de cultivo y b) células de control.

La Figura 18a presenta los datos de absorbancia del medio de cultivo, comparando los valores obtenidos dentro del arreglo (exposición a luz IR esparcida, en rojo) y fuera del arreglo (sin exposición a este esparcimiento, en azul). En esta figura, los círculos cerrados indican la primera prueba, mientras que los círculos abiertos representan la segunda prueba. Con excepción de un resultado correspondiente a la prueba 1 de la placa 2, en todos los casos la absorbancia se mantiene en torno a un valor de aproximadamente 0.1 (indicado por la línea horizontal), lo que sugiere que la luz IR esparcida no influye entre los pozos irradiados y en aquellos que contienen medio de cultivo sin irradiar durante el proceso. Además, estos resultados indican que la absorbancia del medio de cultivo permanece constante con el tiempo, permitiendo descartar al medio como un factor que afecte los valores de absorbancia observados en las células irradiadas.

Este resultado respalda lo mencionado anteriormente, al indicar que la absorbancia medida en la prueba 1 de la placa 2 probablemente se debe a un error en el llenado del pozo, debido a que al pipetear ese medio no se realizó un cambio adecuado de micropipeta utilizada en pozos con contenido celular. De manera similar, la Figura 18b muestra los valores de absorbancia para las células de control, tanto las que estuvieron expuestas a la luz como las que no. Los resultados reflejan variaciones en absorbancia entre placas, que se deben a los diferentes tiempos de exposición; sin embargo, se observa que estos valores son consistentes entre las dos pruebas realizadas, ya que se encuentran dentro de los límites de desviación estándar de cada placa.

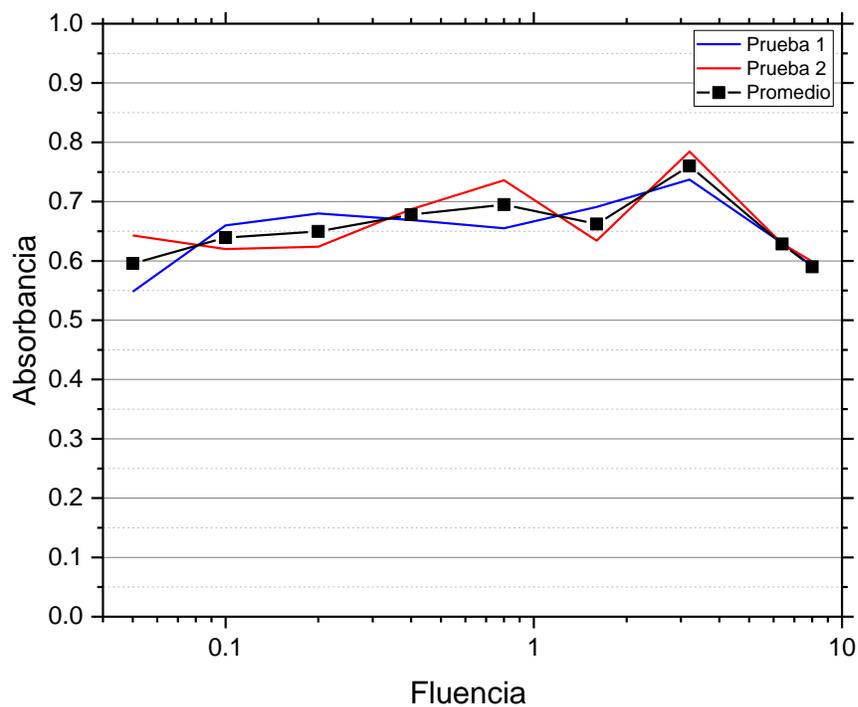
#### **4.2.3 Integración de resultados de absorbancia**

Para obtener una perspectiva completa del comportamiento de la absorbancia en todas las fluencias utilizadas, la Tabla 5 resume los valores promedio obtenidos en las cuatro placas para las dos pruebas realizadas (ver cuarta columna de la tabla).

En la Figura 19 se muestran los promedios de estas absorbancias en función de la fluencia en escala logarítmica. La línea horizontal continua indica el valor promedio de la absorbancia del medio, mientras que la línea segmentada representa los valores promedio de la absorbancia del control. Con esta referencia, se observa una aparente tendencia ascendente seguida de un descenso en torno al valor promedio de la absorbancia del control.

**Tabla 5.** Valores de absorbancia de cada prueba y su promedio.

Fluencia	Absorbancia		
	Prueba 1	Prueba 2	Promedio
Control	0.655	0.646	0.6505
0.05 J/cm <sup>2</sup>	0.548	0.643	0.5955
0.1 J/cm <sup>2</sup>	0.66	0.62	0.64
0.2 J/cm <sup>2</sup>	0.68	0.624	0.652
0.4 J/cm <sup>2</sup>	0.669	0.687	0.678
0.8 J/cm <sup>2</sup>	0.655	0.736	0.6955
1.6 J/cm <sup>2</sup>	0.691	0.634	0.6625
3.2 J/cm <sup>2</sup>	0.737	0.784	0.7605
6.4 J/cm <sup>2</sup>	0.63	0.629	0.6295
8 J/cm <sup>2</sup>	0.581	0.599	0.59

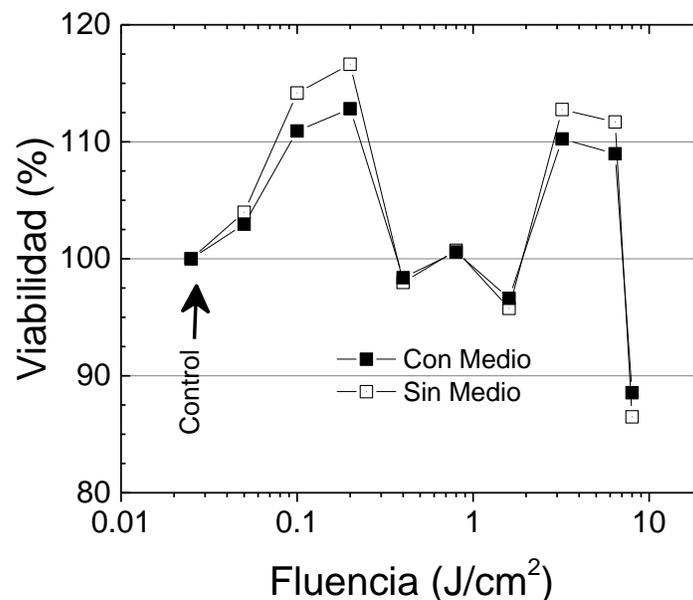


**Figura 19.** Representación logarítmica de los valores de absorbancia de cada fluencia.

### 4.3 Resultados de viabilidad

Otra forma de representar la gráfica de la Figura 19 es mediante la viabilidad celular, que se obtiene dividiendo los datos de absorbancia por el promedio de la absorbancia del control. Recordando que el control se compone de las células más el medio de cultivo, es posible quitar la contribución en la absorbancia del medio, como se muestra en la Figura 20 la contribución del medio de cultivo representa una aportación máxima del 8% en la viabilidad de las células sin afectar la tendencia de viabilidad.

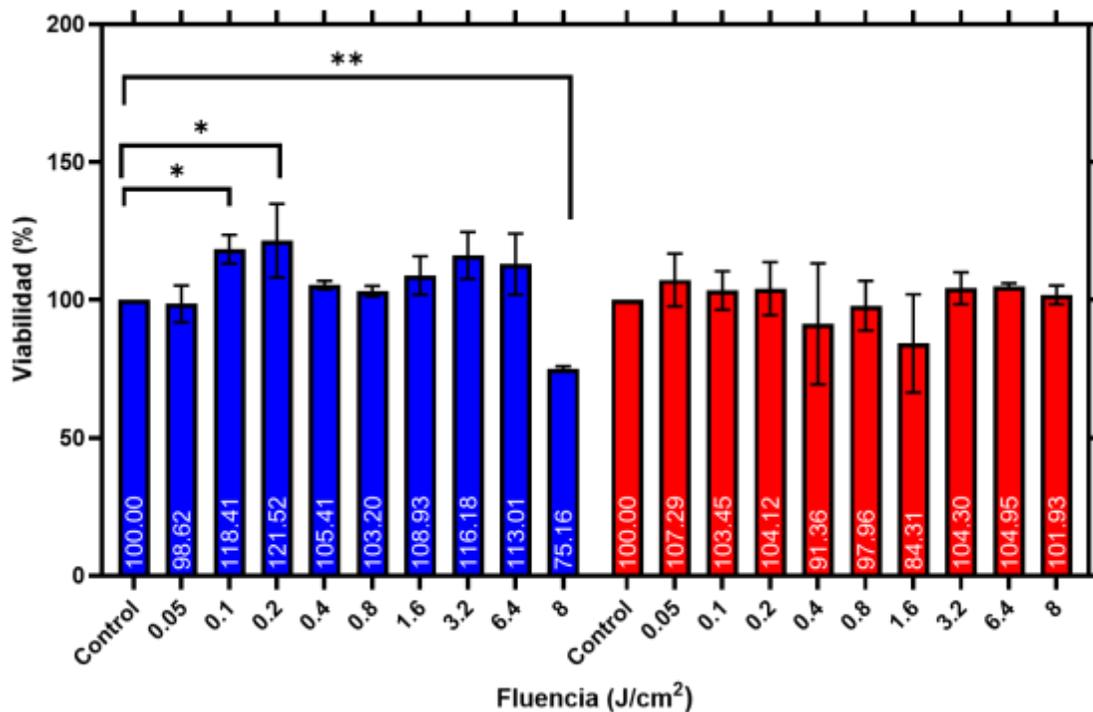
La Figura 20 muestra el porcentaje viabilidad obtenido sin restar (cuadros negros) y restando (cuadros blancos) el medio de cultivo. Donde cada punto representa el promedio de los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en las dos pruebas realizadas. Ambas gráficas exhiben una tendencia de dos picos de estimulación en la viabilidad celular; esto es, por encima del 100% de la viabilidad de las células de control, siendo más evidente al restar el medio de cultivo. El primer pico en el aumento de viabilidad va desde la fluencia más baja utilizada, es decir, de 0.05 J/cm<sup>2</sup>, hasta 0.2 J/cm<sup>2</sup>, seguido de una disminución entre las dosis de 0.4 J/cm<sup>2</sup> y 1.6 J/cm<sup>2</sup>. El segundo pico de viabilidad se presenta en la dosis de 3.2 J/cm<sup>2</sup>, seguido de una nueva disminución a partir de 6.4 J/cm<sup>2</sup>. Asimismo, es posible observar una inhibición en la viabilidad en la máxima fluencia utilizada en ambas pruebas de este experimento; es decir a 8 J/cm<sup>2</sup>.



**Figura 20.** Viabilidad celular (%) a las 24 hrs de exposición con y sin medio de cultivo. Viabilidad normalizada con el control.

El análisis de varianza (ANOVA) reveló diferencias significativas en la viabilidad celular únicamente en la prueba 1., como se muestra en la Figura 21. La viabilidad celular se mantuvo en niveles similares en las células tratadas con fluencias de 0.05, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 y 6.4 J/cm<sup>2</sup>; sin embargo, se observó una diferencia significativa en las células tratadas con fluencias de 0.1, 0.2 y 8 J/cm<sup>2</sup>. Se detectó un aumento significativo en la viabilidad celular a dosis de 0.1 y 0.2 J/cm<sup>2</sup> (P = 0.0348 y P = 0.0112, respectivamente), y una disminución significativa de viabilidad solo en las células tratadas a 8 J/cm<sup>2</sup> (P = 0.0065) en comparación con el control. Estos resultados confirman un pico de estimulación en fluencias de 0.1 y 0.2 J/cm<sup>2</sup> y una inhibición de la viabilidad celular a partir de fluencias de 8 J/cm<sup>2</sup>.

En conjunto, los resultados del ensayo MTS muestran cambios significativos en la viabilidad celular de las células CCD-1112Sk a diferentes dosis de fluencia con irradiación láser de 785 nm.



**Figura 21.** Viabilidad celular (%) a las 24 hrs de exposición. Viabilidad normalizada con el control. Datos analizados por medio de ANOVA de una vía con prueba Dunnett, P < 0.05 (\*) y P < 0.01 (\*\*).

## Capítulo 5. Conclusiones

---

Los estudios realizados en este trabajo mostraron que el montaje experimental diseñado permite obtener una respuesta significativa en la viabilidad en la línea celular CCD-1112Sk, la caracterización detallada muestra que utilizando un diodo láser de 785 nm y una potencia de 10 mW se puede generar estimulación celular.

Los resultados obtenidos en las pruebas de absorbancia, muestran que la luz infrarroja esparcida en las placas de cultivo no produce un cambio significativo en los valores de absorbancia. La consistencia de los valores del medio de cultivo, tanto dentro como fuera del experimento, respaldan la precisión de las mediciones. Aunque se detectaron variaciones en las células de control debido a diferentes tiempos de exposición, los valores se mantienen dentro del rango aceptable de desviación estándar.

Los resultados de los experimentos de irradiación realizadas se determinaron dos picos de estimulación aumentando alrededor del 10% en el porcentaje de viabilidad, el primer pico de aumento de viabilidad se presenta desde la dosis más baja desde fluencias de 0.05 J/cm<sup>2</sup> hasta 0.2 J/cm<sup>2</sup>, mientras que el segundo pico de viabilidad se presenta en la dosis de 3.2 J/cm<sup>2</sup>. Sin embargo, se observó que, a fluencias mayores, a una dosis de 8 J/cm<sup>2</sup>, se presenta una disminución en la viabilidad, lo que podría deberse a daño celular afectando su capacidad de regeneración celular. Estos resultados fueron respaldados por un análisis de varianza, ANOVA, de donde se deduce que existe una estimulación en fluencias de 0.1 y 0.2 J/cm<sup>2</sup> y una inhibición de la viabilidad celular a partir de fluencias de 8 J/cm<sup>2</sup>.

Los resultados de este proyecto de investigación muestran la posibilidad de utilizar la técnica de fotobiomodulación como herramienta para tratamientos de regeneración celular, como la aplicación en la cicatrización de heridas.

En contraste con trabajos previos que exploran los efectos de las fotobiomodulación en diversas líneas celulares, esta tesis presenta como aporte principal el diseño y caracterización de un sistema experimental preciso para irradiación con luz infrarroja en placas de cultivo. El montaje permitió controlar la irradiación de manera efectiva y la evaluación de la viabilidad celular en la línea CCD-112Sk, una línea poco estudiada en estudios de FMB, así como utilizar valores de fluencias menores a comparación de otros estudios.

## **5.1 Trabajo a futuro**

Este proyecto de tesis da paso a estudios a futuro en investigaciones orientadas a una comprensión más profunda del efecto de la irradiación a nivel molecular. Se propone estandarizar el protocolo de obtención de los datos de absorbancia e incluir un ensayo de proliferación celular para contrastar y analizar los datos obtenidos de viabilidad. Además se propone un análisis morfológico utilizando técnicas de microscopía y un análisis de proteínas del ciclo celular. Esto para asegurar la comparabilidad de los resultados y la reproducibilidad.

## Literatura citada

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell* (4th ed.). Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26882/>
- Aphalo, P. J. (2020). *Absorbance, absorptance and friends*. *UV4Plants Bulletin*, 1, 45-60. <https://doi.org/10.19232/uv4pb.2020.1.12>
- Avci, P., Gupta, A., Sadasivam, M., Vecchio, D., Pam, Z., Pam, N., & Hamblin, M. R. (2013). Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: Stimulating, healing, restoring. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 32(1), 41–52. <https://doi.org/10.12788/j.sder.0023>
- Beer, A. (1852). Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Annalen der Physik*, 162(5), 78–88. <https://doi.org/10.1002/andp.18521620505>
- Bohr, N. (1913). "On the Constitution of Atoms and Molecules". *Philosophical Magazine Series 6*, 26(151), 1–25. <https://doi.org/10.1080/14786441308634955>
- Bouguer, P. (1729). *Essai d'optique sur la gradation de la lumière*. Available from: <https://www.amazon.com/Essai-DOptique-Gradation-Lumiere-French/dp/116603044X>.
- Bunsen, R. W., & Roscoe, H. E. (1857). Photo-chemical researchers. Part 3: Optical and chemical extinction of the chemical rays. *Annalen der Physik*, 102, 235–263. <https://doi.org/10.1039/CT9007700513>
- Calvillo-Vázquez, J. G., Guillén-Ramírez, H. A., DiazDuarte-Rodríguez, M., Licea-Claverie, A., & Méndez, E. R. (2019). Particle size distribution from extinction and absorption data of metallic nanoparticles. *Applied Optics*, 58(36), 9955-9966. <https://doi.org/10.1364/AO.58.009955>
- Chen, A. C., Arany, P. R., Huang, Y. Y., Tomkinson, E. M., Sharma, S. K., Kharkwal, G. B., Saleem, T., Mooney, D., Yull, F. E., Blackwell, T. S., & Hamblin, M. R. (2011). Low-level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS one*, 6(7), e22453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022453>
- 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>
- Desmet, K. D., Paz, D. A., Corry, J. J., Eells, J. T., Wong-Riley, M. T., Henry, M. M., Buchmann, E. V., Connelly, M. P., Dovi, J. V., Liang, H. L., Henshel, D. S., Yeager, R. L., Millsap, D. S., Lim, J., Gould, L. J., Das, R., Jett, M., Hodgson, B. D., Margolis, D., & Whelan, H. T. (2006). Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. *Photomedicine and laser surgery*, 24(2), 121–128. <https://doi.org/10.1089/pho.2006.24.121>
- 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. *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. *Injury*, *50*(11), 1853–1867. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2019.09.031>
- Greco, M., Guida, G., Perlino, E., Marra, E., & Quagliariello, E. (1989). Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. *Biochemical and biophysical research communications*, *163*(3), 1428–1434. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(89\)91138-8](https://doi.org/10.1016/0006-291x(89)91138-8)
- Grinnell F. (2003). Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends in cell biology*, *13*(5), 264–269. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(03\)00057-6](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(03)00057-6)
- Hamblin, M. R. (2016). History of low-level laser (light) therapy. In *Handbook of low-level laser therapy*, 3–20. Jenny Stanford Publishing. <https://doi.org/10.1201/9781315364827>
- Hamblin, M. R., & Huang, Y. Y. (2019). Photobiomodulation in the brain: Low-level laser (light) therapy in neurology and neuroscience. *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-02758-1>
- Han, G., & Ceilley, R. (2017). Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Advances in therapy*, *34*(3), 599–610. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>
- Hawkins, D. H., & Abrahamse, H. (2006). The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers in surgery and medicine*, *38*(1), 74–83. <https://doi.org/10.1002/lsm.20271>
- Hawkins, D., & Abrahamse, H. (2006). Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomedicine and laser surgery*, *24*(6), 705–714. <https://doi.org/10.1089/pho.2006.24.705>
- Henriques, A., Casal, C., Castro, J. (2010). *Effects of low level laser therapy on cell proliferation and differentiation: a review of the literature*, *37*(4), 295-302. <https://doi.org/10.1590/s0100-69912010000400011>
- Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M. L., & Gabbiani, G. (2007). The myofibroblast: one function, multiple origins. *The American journal of pathology*, *170*(6), 1807–1816. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070112>
- Hourelid, N.N., Abrahamse, H. (2008). Laser light influences cellular viability and proliferation in diabetic-wounded fibroblast cells in a dose- and wavelength-dependent manner. *Lasers Med Sci*, *23*, 11–18. <https://doi.org/10.1007/s10103-007-0445-y>
- Hu, C., Muller-Karger, F. E., Zepp, R. G. (2002). Absorbance, absorption coefficient, and apparent quantum yield: A comment on common ambiguity in the use of these optical concepts. *Limnology and Oceanography*, *47*(4), 1261-1267. <https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.4.1261>
- Huang, Y. Y., Chen, A. C., Carroll, J. D., & Hamblin, M. R. (2009). Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy. *Dose-response: a publication of International Hormesis Society*, *7*(4), 358–383. <https://doi.org/10.2203/dose-response.09-027.Hamblin>

- Huang, Y. Y., Sharma, S. K., Carroll, J., & Hamblin, M. R. (2011). Biphasic dose response in low level light therapy-an Update. *Dose-response: a publication of International Hormesis Society*, 9(4), 602–618. <https://doi.org/10.2203/dose-response.11-009.Hamblin>
- Hurter, F., & Driffield, V. C. (1920). The photographic researches of Ferdinand Hurter & Vero C. Driffield (W. B. Ferguson, Ed.). *Royal Photographic Society of Great Britain*. <https://dn790004.ca.archive.org/0/items/memorialvolumeco00hurtiala/memorialvolumeco00hurtiala.pdf>
- Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 6(5), 392–401. <https://doi.org/10.1038/nrc1877>
- Karu T. (1999). Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 49(1), 1–17. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00219-X)
- Kasowanjete, P., Abrahamse, H., & Houreld, N. N. (2023). Photobiomodulation at 660 nm Stimulates In Vitro Diabetic Wound Healing via the Ras/MAPK Pathway. *Cells*, 12(7), 1080. <https://doi.org/10.3390/cells12071080>
- Khan, I., & Arany, P. R. (2016). Dosimetry for photobiomodulation therapy: response to Sommers et al. *Annals of translational medicine*, 4(10), 208. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.05.34>
- Khokhlova, A., Zolotovskii, I., Stoliarov, D., Vorsina, S., Liamina, D., Pogodina, E., & Rafailov, E. U. (2018). The photobiomodulation of vital parameters of the cancer cell culture by low dose of Near-IR laser irradiation. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 25(1), 1-10. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2018.2854539>
- Lakowicz, J. R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Springer Science & Business Media*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
- Luther R. (1900). Referate. *Z. Phys. Chem.* 33U(1), 245-255. <https://doi.org/10.1515/zpch-1900-3316>
- Luther, R. & Nikolopoulos, A. (1913). Über die Beziehungen zwischen den Absorptionsspektren und der Konstitution der komplexen Kobaltamminsalze. *Z. Phys. Chem.* 82U(1), 361-384. <https://doi.org/10.1515/zpch-1913-8229>
- Maiman, T. H. (1960). Stimulated optical radiation in ruby. *Nature*, 187, 493-494. <https://doi.org/10.1038/187493a0>
- Maldonado Cubas, J., Casañas Pimentel, R., Enrique Martínez, I., & San Martín-Martínez, E. (2018). La espectroscopia UV-Vis en la evaluación de la viabilidad de células de cáncer de mama. *Latin-American Journal of Physics Education*, 12(1), 1–7. [https://www.researchgate.net/publication/340915352\\_La\\_espectroscopia\\_UV-Vis\\_en\\_la\\_evaluacion\\_de\\_la\\_viabilidad\\_de\\_celulas\\_de\\_cancer\\_de\\_mama](https://www.researchgate.net/publication/340915352_La_espectroscopia_UV-Vis_en_la_evaluacion_de_la_viabilidad_de_celulas_de_cancer_de_mama)
- Mayerhöfer, T. G, Pahlow, S., Popp, J. (2022). The Bouguer-Beer-Lambert Law: Shining Light on the Obscure. *ChemPhysChem*, 21(18), 2029-2046. <https://doi.org/10.1002/cphc.202000464>.

- Michael R.H. (2017). Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophysics*, 4(3), 337-361. <https://doi.org/10.3934/biophy.2017.3.337>
- Myers, J.A., Curtis, B.S., Curtis, W.R. (2013) Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophysics*, 6, 4. <https://doi.org/10.1186/2046-1682-6-4>.
- Nowak-Terpiłowska, A., Zeyland, J., Hryhorowicz, M., Śledziński, P., & Wyganowska, M. (2023). Influence of Three Laser Wavelengths with Different Power Densities on the Mitochondrial Activity of Human Gingival Fibroblasts in Cell Culture. *Life*, 13(5), 1136. <https://doi.org/10.3390/life13051136>
- Ortega Salazar, J. M. (2021). *Síntesis y caracterización de nanopartículas con resonancias plasmónicas en la primera ventana biológica*. [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio Institucional <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3653>
- Oshina, I., & Spigulis, J. (2021). Beer-Lambert law for optical tissue diagnostics: current state of the art and the main limitations. In *Journal of biomedical optics*, 26(10), 100901. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.26.10.100901>
- Oyebode O., Houreld N. A. (2018). A comparison between photobiomodulation at 830 nm and 660 nm on differentiation in diabetic human skin fibroblast cells. 253-258. <https://saip.org.za/Proceedings/Track%20C/41.pdf>
- Plikus, M. V., Wang, X., Sinha, S., Forte, E., Thompson, S. M., Herzog, E. L., Driskell, R. R., Rosenthal, N., Biernaskie, J., & Horsley, V. (2021). Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell*, 184(15), 3852–3872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.024>
- Rahbar Layegh, E., Fadaei Fathabadi, F., Lotfinia, M., Zare, F., Mohammadi Tofigh, A., Abrishami, S., & Piryaeei, A. (2020). Photobiomodulation therapy improves the growth factor and cytokine secretory profile in human type 2 diabetic fibroblasts. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 210. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111962>
- Rodríguez Pérez, A. D. (2024). *Estudio de la fotobiomodulación en huevos de mosquito de Aedes aegypti*. [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.]. Repositorio Institucional <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/4081>
- Sadatmansouri, S., Agahikesh, B., Karimi, M., Etemadi, A., & Saberi, S. (2022). Effect of Different Energy Densities of 915 nm Low Power Laser on the Biological Behavior of Human Gingival Fibroblast Cells In Vitro. *Photochemistry and photobiology*, 98(4), 969–973. <https://doi.org/10.1111/php.13577>
- 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>
- Serrage, H., Heiskanen, V., Palin, W. M., Cooper, P. R., Milward, M. R., Hadis, M., & Hamblin, M. R. (2019). Under the spotlight: mechanisms of photobiomodulation concentrating on blue and green light. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry*

- Association and the European Society for Photobiology*, 18(8), 1877–1909. <https://doi.org/10.1039/c9pp00089e>
- Soares Dantas, J., Silva, C. C. M., Nogueira, W. P., de Oliveira E Silva, A. C., de Araújo, E. M. N. F., da Silva Araújo, P., & Freire, M. E. M. (2022). Health-related quality of life predictors in people with chronic wounds. *Journal of tissue viability*, 31(4), 741–745. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2022.07.017>
- Sorrell, J. M., & Caplan, A. I. (2004). Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *Journal of cell science*, 117(5), 667–675. <https://doi.org/10.1242/jcs.01005>
- Topaloglu, N., Guney, M., Aysan, N., Gulsoy, M., & Yuksel, S. (2016). The role of reactive oxygen species in the antibacterial photodynamic treatment: photoinactivation vs proliferation. *Letters in applied microbiology*, 62(3), 230–236. <https://doi.org/10.1111/lam.12538>
- Topaloglu, N., Özdemir, M., & Çevik, Z. B. Y. (2021). Comparative analysis of the light parameters of red and near-infrared diode lasers to induce photobiomodulation on fibroblasts and keratinocytes: An in vitro study. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 37(3), 253–262. <https://doi.org/10.1111/phpp.12645>
- Tripodi, N., Corcoran, D., Antonello, P., Balic, N., Caddy, D., Knight, A., Meehan, C., Sidiroglou, F., Fraser, S., Kiatos, D., Husaric, M., Apostolopoulos, V., & Feehan, J. (2021). The effects of photobiomodulation on human dermal fibroblasts in vitro: A systematic review. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 214, 112100. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112100>
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of international medical research*, 37(5), 1528–1542. <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>
- Winkler, C. J. (2019). Laser surgery in veterinary medicine. *In Laser Surgery in Veterinary Medicine*. <https://doi.org/10.1002/9781119486053>
- Zein, R., Selting, W., & Hamblin, M. R. (2018). Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity. *Journal of biomedical optics*, 23(12), 1–17. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.23.12.120901>

## Anexos

Programa para controlar el tiempo de exposición a través de un obturador realizado con un motor servo y una tarjeta Arduino.

Se definen las **posiciones** (columna y fila) de las células a irradiar y los tiempos de exposición para cada placa

```
PLACA 1 Y 2
char* Columna[3] = {"A", "C", "E"};
int Fila[4] = {2,5,8,11};
long Tiempo[4] = {12800,25600,51200,102400}; //PLACA 1
long Tiempo[4] = {1600,3200,6400,204800}; //PLACA 2
```

```
PLACA 3
char* Columna[2] = {"X", "A"};
int Fila[5] = {0,2,5,8};
long Tiempo[2] = {0,256000}; //PLACA 3
```

Se define la velocidad de movimiento

```
void setup() {
  myservo.attach(servoPin);
  myservo.write(0);
  delay(72);
  Serial.begin(9600);
}
```

Se define el movimiento del servomotor el cual bloquea y desbloquea el haz laser a durante un tiempo determinado

```
void loop() {
  for (int fil=0; fil <= 3; fil += 1) { // fila
    for (int col=0; col <= 2; col += 1) { // columna

// Servomotor se coloca en 0 grados (se bloquea el haz)
myservo.write(0);

// Se imprime la posición del pozo a irradiar
Serial.println("\nTiempo de bloqueo, colocarte en:");
Serial.print("Columna: ");
Serial.println(Columna[col]);
Serial.print("fila: ");
Serial.println(Fila[fil]);

// Tiempo traslación de la placa durante la pausa del servomotor en 0 grados
delay(8000);

// Servomotor se coloca en 45 grados (se desbloquea el haz)
myservo.write(45);

// Se imprime el tiempo de irradiación y el momento de finalización
Serial.println("\nTiempo de Irradiacion");
delay(Tiempo[fil]);
Serial.println("Fin de Irradiacion");
}
}
exit(0); }
```