



**I
N
A
O
E**

Uso de fotobiomodulación para la proliferación de microorganismos modelo

Por:

Moisés Antonio García Sánchez

Tesis sometida como requisito parcial para la
obtención de grado de

**Maestro en Ciencias y Tecnologías
Biomédicas**

en el

**Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y
Electrónica**

Octubre de 2021

Tonantzintla, Puebla

Director de Tesis:

Dra. Teresita Spezzia Mazzocco

INAOE

©INAOE 2021

Derechos Reservados El autor otorga al INAOE el permiso
de reproducir y distribuir copias de esta tesis en su totalidad
o en partes mencionando la fuente



Agradecimientos

A mis papás Alberto y Diana, gracias a ustedes que siempre me han impulsado para seguir mis sueños, ustedes me han apoyado en todo lo que quiero y sin ustedes yo no podría haber llegado hasta aquí. Siempre dándome consejos, y ayudándome en todo lo posible para conseguir cualquier meta. Todo esto es gracias a ustedes, los amo.

A mi asesora, la Dra. Teresita Spezzia Mazzocco, por ayudarme durante la realización de este trabajo, al siempre ver como se podían solucionar todos los problemas dentro y fuera del laboratorio. Siempre dándome palabras de apoyo y alternativas para poder trabajar de la mejor forma posible y ayudándome a corregir hasta el más mínimo detalle de la investigación. Al Dr. Rubén Ramos García por ayudarme en la investigación dándonos acceso a su laboratorio y equipo, además de siempre tener comentarios acertados con respecto a la investigación, al Dr. Julio César Ramírez San Juan, por aportar observaciones y comentarios que fueron muy útiles, a la Dra. MA. Guadalupe Delgado López, a la M. en C. Marisol Sánchez Esgua y a la Dra. Anabel Socorro Sánchez Sánchez que me apoyaron durante la investigación.

A mi hermano Alberto, por ser una inspiración para mí y por siempre darme los mejores consejos de ciencia, además de haberme ayudado a conseguir todo lo necesario para poder continuar con la investigación. A mi hermana Amaranta, que siempre está para escucharme, apoyarme y cuidarme, haciéndome siempre mejorar y seguir adelante, pese a las discusiones sé que siempre estará cuando la necesite. A mi familia, especialmente a mi Tía Mary, Adelita y mi Yaya, ustedes me han apoyado muchísimo toda mi vida, siempre pensando en mí y dándome todo lo que estaba en sus posibilidades para poder crecer.

A Meredith, por acompañarme y ser parte de mi vida, por su amor incondicional y paciencia, además de apoyarme y motivarme para seguir adelante. A mis amigos y compañeros del INAOE Carlos, Fer, Caro, Kevin, Alex, Cristina, Iván, Diana, Fredy, Mike, Laura, David y a todos los de Biomédicas. Especialmente agradecerle a Juan Pablo y Joaquín por su ayuda en los laboratorios, a Mayra Salazar por siempre ayudarme en el laboratorio de Terapia Fotodinámica y facilitarme los días de trabajo, trayendo siempre café y una sonrisa al laboratorio, a la Dra. Anahí Zavala por siempre resolver mis dudas y haberme dado increíbles consejos para el laboratorio, además de sus buenos gustos musicales.

A todas mis amistades que he forjado en la vida y que siempre me apoyaron. A Katya, Raúl, Lalo, Wong, Anuar, Fredy, Emilio Juan Pablo, Víctor, Diana, Beto, Jessica, Nathalie, Ana, Mónica, Pefi, Juanpi, Serch, Luis, Ilse, el Dr. Guillermo y todos los demás.

Al INAOE y el CONACyT por los distintos apoyos otorgados, las becas de ayudantía y los apoyos que facilitaron mi estancia en el instituto, sin los cuales, me hubiese resultado complicado realizar este posgrado. Al Dr. Mariano Aceves y al Dr. Óscar Pérez, que me apoyaron en el laboratorio de Espectroscopía de Fluorescencia. Al Dr. Francisco Renero, por siempre estar al pendiente y promover el apoyo a la maestría.

A la comunidad del INAOE, compañeros de clase y de otros posgrados, al personal administrativo por todas las facilidades y apoyo brindados durante mi estancia en el instituto.

A todos quienes directa o indirectamente me apoyaron en la realización de este trabajo

Resumen

La Fotobiomodulación (FBM) es una terapia de luz de baja intensidad en la que se emplea luz en el rango del espectro visible e infrarrojo para producir un efecto biológico benéfico. Es una técnica ampliamente estudiada que ha mostrado buenos resultados en células animales y organismos vivos. Sin embargo, existe una falta de información con respecto a los efectos en microorganismos, como lo son bacterias y levaduras. Los microorganismos son vitales para la medicina moderna, ya que son necesarios para la producción de una gran parte de los biofármacos que se utilizan hoy en día a nivel mundial.

Con esta investigación se propuso utilizar la FBM en bacterias Gram negativo y Gram positivo, como lo son la *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, además de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, para evaluar el efecto proliferativo de la terapia empleando 4 diferentes tratamientos; luz azul, luz roja, luz verde y una mezcla de las 3 luces anteriores.

Los resultados demostraron que al utilizar FBM con luz roja en bacterias, se obtiene un gran efecto proliferativo, generando un incremento de 69% de unidades formadoras de colonia (UFC) comparado con el grupo control, del mismo modo la FBM con luz roja fue la que más promovió el incremento de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) producida por *E. coli* respecto al control, generando un incremento de 52.7%. Mientras que, para las levaduras, la FBM con mezcla de luces resultó promover un 160% el tamaño de las UFC con respecto al control

Los resultados demostraron que es posible incrementar la proliferación de los microorganismos *E. coli*, *B. subtilis* y *S. cerevisiae*, especies de gran interés biomédico e industrial al ser los principales productores de biofármacos a nivel mundial. Además de que, en *E. coli* se logró aumentar el ritmo de la proliferación de proteínas.

Abstract

Photobiomodulation (PBM) is a low-level light therapy in which a visible-NIR light is used to provoke a biological beneficial effect. It is a technique widely studied which has shown amazing results in animal cells and living organisms. However, there is a lack of information regarding the effects in microorganisms such as bacteria and yeast. Microorganisms are vital in modern medicine because they are necessary for a great part of the biopharmaceutical production used today worldwide.

With this investigation it was proposed the use of PBM in Gram-positive and Gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, to evaluate the proliferative effect of the therapy using 4 different treatments: blue light, red light, green light and a mixture of the previous 3 lights.

The results showed that when using the PBM with red light in bacteria, a proliferative effect is obtained, generating an increase of 69% in colony former units (CFU) with respect to the control groups. In the same way, the PBM with red light was the better therapy promoting an increase in the green fluorescent protein (GFP) production by *E. coli* in respect to the control group, generating an increase of 52.73%. Meanwhile, in the case of the yeasts, the PBM with light mixture promoted the size increase of the CFU 160% with respect to the control.

The results showed that it is possible to increase the proliferation of the microorganisms *E. coli*, *B. subtilis* and *S. cerevisiae*, species of great biomedical and industrial interest, being the principal biopharmaceutical producers worldwide. Furthermore, in *E. coli* it was possible to increase the protein proliferation rate.

Contenido

Capítulo 1	7
1. Introducción	7
1.1 Antecedentes	7
1.2 Problema de investigación	9
1.3 Justificación.....	10
1.4 Pregunta de investigación	11
1.5 Hipótesis	12
1.6 Objetivos	12
1.6.1 Objetivo general.....	12
1.6.2 Objetivos específicos	12
Capítulo 2	13
2. Marco Teórico	13
2.1 Organismos modelo	13
2.1.1 E. coli	14
2.1.2 Proteína verde fluorescente.....	15
2.1.3 B. subtilis	15
2.1.4 S. cerevisiae	16
2.2 La luz y el espectro electromagnético	18
2.2.1 El espectro visible	18
2.3 Fotobiomodulación.....	19
2.3.1 La ley de Arndt-Schultz o respuesta bifásica para fotobiomodulación ...	20
2.3.2 Efectos de la FBM en los sistemas biológicos	21
2.4 La mitocondria.....	22
2.4.1 Cadena de transporte de electrones.....	23
2.4.2 Cromóforos en células procariotas	24
2.5 Microorganismos para la producción de biofármacos	26
Capítulo 3	31
3. Materiales y métodos	31
3.1 Materiales	31
3.1.1 Material biológico.....	31
3.1.2 Medios de cultivo	31
3.1.3 Fuentes de luz	32

3.2 Métodos	33
3.2.1 Condiciones de cultivo	33
3.2.2 Proceso de aplicación de la FBM	34
3.2.3 Determinación del número de células por unidades formadoras de colonias.....	35
3.2.4 Cuantificación de las levaduras	35
3.2.5 Cuantificación de las bacterias	37
3.3 Pruebas de análisis estadístico.....	40
Capítulo 4.....	42
4.Resultados	42
4.1 Efecto de diferentes dosis de FBM sobre microorganismos modelo.....	42
4.2 Resultados de cuantificación de UFC de <i>B. subtilis</i>	44
4.3 Resultados de cuantificación de UFC de <i>E. coli</i>	47
4.3.1 Análisis de Fluorescencia de GFP en <i>E. coli</i>	50
4.4 Resultados de <i>S. cerevisiae</i>	54
Capítulo 5.....	62
5. Discusión.	62
Capítulo 6.....	66
6. Conclusión	66
6.1 Trabajo a futuro	67
7. Referencias	68
Apéndice A.....	77
Pruebas de normalidad Anderson – Darling	77
Pruebas ANOVA <i>B. subtilis</i>	80
Pruebas ANOVA <i>E. coli</i>	82
Pruebas ANOVA <i>S. cerevisiae</i>	84
Apéndice B.....	86
Segunda repetición pruebas de fluorescencia	86
Tercera repetición pruebas de fluorescencia	87

Capítulo 1

1.Introducción

1.1 Antecedentes

La luz ha influenciado en la evolución de la vida en la Tierra, siendo así que los animales y las plantas han desarrollado una variedad de respuestas fisiológicas a la radiación solar^{1,2}. Por ejemplo: cuando la luz es captada por el ojo humano, la retina activa señales eléctricas, que el cerebro interpreta como imágenes. La luz, en la piel, provoca reacciones químicas que permiten la síntesis de la vitamina D, para la asimilación del calcio en los huesos³. Por ello la humanidad ha tomado conciencia de los efectos benignos de la luz desde hace más de tres milenios; ya los antiguos egipcios, chinos e indios la utilizaban para tratar diferentes enfermedades, como psoriasis, raquitismo, vitiligo, entre otras.

La fotobiomodulación (FBM) fue descubierta en 1967 por Endre Mester en Hungría. Mester estaba intentando repetir un experimento realizado por primera vez por Paul McGuff en Boston, EE. UU., quien había utilizado con éxito el láser de rubí recién descubierto para curar tumores malignos en ratas⁴. Sin embargo, el láser de rubí hecho a medida de Mester poseía solo una fracción muy pequeña del poder que poseía el láser de McGuff. A pesar de no curar ningún tumor con su rayo láser de baja potencia, sí observó una mayor tasa de crecimiento del cabello y una mejor cicatrización de heridas en las ratas en las que había implantado quirúrgicamente tumores. Esta fue la primera indicación de que la luz láser de bajo nivel (en lugar de los láseres térmicos de alta potencia) podría tener sus propias aplicaciones beneficiosas en medicina^{5,6}.

Desde esos primeros días, se encontró que un LED podría mostrar los mismos efectos biológicos que un láser monocromático de baja potencia. Teniendo en cuenta que se demostró que los láseres no eran necesarios, y que el término “baja potencia” aún no estaba definido y considerando el hecho de que tanto la inhibición como la estimulación de procesos biológicos podrían ser terapéuticamente útiles, finalmente se tomó la decisión de cambiar el nombre a FBM⁷.

Los mecanismos de acción de la FBM se han investigado intensamente a partir del trabajo de Tina Karu en Rusia ⁸. Karu fue la primera en atribuir los efectos de la luz roja e infrarroja cercana (NIR, por sus siglas en inglés) a la absorción de fotones por la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias, y por la unidad IV citocromo c oxidasa (CCO) en particular⁹.

Dado que el CCO tiene picos de absorción en las regiones roja (600-700 nm) e NIR (760-900 nm) del espectro (dependiendo de su estado de oxidación preciso), la luz roja e NIR han sido las longitudes de onda empleadas con mayor frecuencia para FBM ¹⁰.

En los últimos años, se ha hecho evidente que hay otros cromóforos que operan en diferentes regiones del espectro^{2,11}. Los cromóforos alternativos más importantes parecen ser los canales iónicos del potencial receptor transitorio (TRP) que pueden activarse con la luz o el calor¹². Un ejemplo es el canal de calcio TRPV1 que se puede activar con luz azul o verde ^{13,14} y es crucial para activar rutas metabólicas celulares ¹⁵.

Diferentes enfermedades, afecciones y campos de tratamiento médico diferentes ahora se están volviendo susceptibles a los efectos beneficiosos de la FBM¹⁶. Existen muchos avances en estudios de cultivos celulares *in vitro* relacionados con los efectos benéficos de la FBM ¹⁷, entre estos:

Tuby et al.¹⁸ observó que la FBM promueve la proliferación de células madre cardiacas y mesénquimales. Moore¹⁹ demostró que los fibroblastos se proliferan más rápido utilizando FBM, al igual que Almeida-Lopes ²⁰ que descubrió que también se ha obtenido incremento en la producción de colágeno de estas células tras la terapia. Oron²¹ y Benedicenti ²² descubrieron que la cantidad de ATP en neuronas y linfocitos es superior a las células control.

En la década de los 1980, Karu ²³ observó que se podía inducir una estimulación en la proliferación de *E. coli* al utilizar FBM con luz azul y roja. Posteriormente, ella junto a Lyapunova ²⁴ determinaron que la terapia podría promover la activación del metabolismo celular en levaduras, así como una estimulación en la producción de síntesis proteica.

En el 2003 Nussbaum²⁵ encontró efectos proliferativos en *E. coli* utilizando luz IRC y luz roja. Y más recientemente, en el 2019, Lima ²⁶ obtuvo resultados significativos con respecto a la irradiación en bacterias utilizando una mezcla de longitudes de onda.

Dado que existe un efecto de proliferación evidente en la mayoría de los tratamientos realizados con FBM, se ha hecho posible utilizar una variedad de huéspedes no mamíferos que se han vuelto populares en biomedicina, biotecnología y en laboratorios de investigación en todo el mundo en los últimos años. Estos incluyen microorganismos modelo como levaduras y bacterias.

1.2 Problema de investigación

Aunque la FBM es actualmente utilizada en algunos tratamientos, aún se mantiene la controversia entre incluirla o no como una terapia, esto debido a dos sencillas razones: Primera, los mecanismos bioquímicos subyacentes siguen siendo poco conocidos, por lo tanto, la utilización sigue siendo bastante empírica. Segunda, una gran cantidad de parámetros como lo es la longitud de onda, dosis, densidad de energía, estructura de pulso, y sincronización de la luz aplicada deben de ser cuidadosamente optimizados para cada tratamiento. Una elección no óptima de parámetros puede resultar en la efectividad reducida del tratamiento, o en su defecto, en un resultado negativo²⁷.

Por consiguiente, muchos resultados de FBM incluyen respuestas nulas o negativas en las consecuencias del tratamiento, debido a la selección inapropiada de luz o de la dosis. Esta selección es particularmente importante, ya que hay una dosis óptima de luz para cada aplicación particular, y las dosis mayores o menores a este valor óptimo pueden desembocar en no crear ningún efecto o producir algún efecto fototérmico²⁸.

Uno de los problemas más relevantes relacionados con esta investigación es el de la falta casi total de estudios relacionados con los efectos de FBM para promover la proliferación de bacterias y levaduras, en la mayoría de los artículos, se busca realizar inhibición de microorganismos debido a las dosis utilizadas en estos

experimentos. Como lo menciona Hamblin²⁹ a pesar de la cantidad de artículos publicados, no se ha investigado mucho sobre los mecanismos moleculares involucrados. Teniendo en cuenta la amplia gama de células capaces de producir proteínas, esta parece ser una oportunidad perdida.

1.3 Justificación

Se ha demostrado que la FBM es una técnica que promueve la proliferación de células mamíferas²⁷, sin embargo, existe poca información con respecto a otros modelos biológicos, uno de estos sería el efecto sobre la proliferación de bacterias para promover la secreción de proteínas o antibióticos.

El uso de células microbianas recombinantes ha permitido la producción a gran escala de un gran número de productos de interés farmacéutico (hormonas, anticoagulantes, proteínas de alto valor, anticuerpos y antígenos, interferones o interleucinas, entre otros). Los principales microorganismos explotados como «biofábricas» son la especie bacteriana *E. coli*, seguida de la levadura *S. cerevisiae*³⁰.

En el área de la salud, uno de los productos de base biotecnológica más relevantes son los denominados biofármacos²⁹. Las proteínas y biofármacos, son producidos a partir de sistemas biológicos vivos (bacterias, hongos, levaduras, células de mamíferos, tejidos de origen vegetal o animal, animales de laboratorio)³¹.

Los resultados obtenidos permitirán añadir información y conocimiento respecto a las aplicaciones de la FBM, aportando herramientas que permitan un mejor aprovechamiento del potencial que ofrecen los microorganismos en la mejora de la calidad de vida de los seres humanos y otros seres vivos.

La producción de proteínas recombinantes para su uso como productos farmacéuticos, los denominados biofarmacéuticos representan una industria multimillonaria que ha incrementado grandemente la esperanza de vida humana en las últimas décadas³⁰. Se utilizan muchas fábricas de células diferentes para la producción de productos biofarmacéuticos, entre las que destacan la levadura *S. cerevisiae*³² y la bacteria *E. coli*³³ que se utilizan para la elaboración de varios

productos de gran volumen. La insulina y los análogos de la insulina son, con mucho, los biofarmacéuticos dominantes producidos por la levadura³⁴. Otros productos biofarmacéuticos importantes producidos por *S. cerevisiae* son la albúmina sérica humana, las vacunas contra la hepatitis y las partículas similares a virus utilizadas para la vacunación contra el virus del papiloma humano³⁵.

De los 374 biofármacos existentes aprobados en el 2018 por la FDA, 91 (25%) son producidos por bacterias como la *E. coli* o *B. subtilis*, mientras que 38 (10%) son producidos por la levadura *S. cerevisiae*³⁶.

La FBM está estudiada principalmente en la longitud de onda en el rango de IRC hasta el rojo, sin embargo, existen pocos estudios en microorganismos y aún menos relacionados con longitudes de ondas más pequeñas dentro del rango del espectro visible, como lo son: luz azul y luz verde. De aquí la importancia de este trabajo, ya que se realizará una comparación directa entre la FBM utilizando luz con longitudes de onda en los colores rojo, verde y azul sobre microorganismos modelo de diferentes grupos, como lo son levaduras, bacterias Gram positivo y Gram negativo.

Aquí se remarca la importancia de este proyecto, ya que se estudiará el efecto de la FBM en los microorganismos modelos mencionados, al poder influir en la proliferación celular y síntesis de proteínas se podría llegar a aumentar la producción de biofármacos incrementando su accesibilidad y reduciendo sus costos.

1.4 Pregunta de investigación

- ¿Es posible aumentar significativamente la proliferación y/o síntesis de proteínas de diferentes organismos modelo empleando FBM utilizando longitudes de onda roja, azul y verde?

1.5 Hipótesis

La aplicación de la FBM utilizando luz roja, azul y/o verde puede aumentar la proliferación celular de bacterias y levaduras además de la secreción de proteínas en bacterias.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Valorar la eficiencia de la FBM en 3 microorganismos de familias diferentes y con 3 diferentes longitudes de onda.

1.6.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la FBM sobre la proliferación bacteriológica al emplear diferentes tratamientos con luz roja (630 nm), verde (520 nm) y azul (450 nm) en *E. coli* utilizando dosis que varían de 0.3 – 10 J/ cm².
2. Determinar el efecto de la FBM sobre la secreción de la proteína verde fluorescente al emplear diferentes tratamientos con luz roja (630 nm), verde (520 nm) y azul (450 nm) en *E. coli* utilizando las mejores dosis obtenidas al realizar la FBM para la proliferación bacteriológica.
3. Determinar el efecto de la FBM sobre la proliferación bacteriológica al emplear diferentes tratamientos con luz roja (630 nm), verde (520 nm) y azul (450 nm) en *B. subtilis* utilizando dosis que varían de 0.3 – 10 J/ cm²
4. Determinar el efecto de la FBM sobre la proliferación de levaduras *S. cerevisiae* al emplear diferentes tratamientos con luz roja (630 nm), verde (520 nm) y azul (450 nm) utilizando dosis que varían de 0.3 – 10 J/ cm²
5. Analizar los resultados y comparar la eficiencia de las diferentes longitudes de onda en el cultivo de los organismos modelo

Capítulo 2

2. Marco Teórico

En este capítulo se describirán los temas más importantes para esta investigación, como los organismos modelo, los microorganismos *E. coli*, *B. subtilis* y *S. cerevisiae* hablando de sus organelos, morfología y cromóforos.

Además, se presentará el concepto y funcionamiento de la FBM, los elementos necesarios para que se lleve a cabo y el mecanismo de acción. Adicionalmente se presentan las fuentes de luz que se han utilizado en la aplicación de la FBM, el concepto de densidad óptica y la ley Arndt- Schulz. Y finalmente se lleva a cabo una síntesis de los trabajos relacionados a la aplicación de FBM en organismos modelo.

2.1 Organismos modelo

Los organismos modelo se definen como especies no humanas que se estudian ampliamente para comprender una variedad de fenómenos biológicos, con la esperanza de que los datos y teorías generados serán aplicables a otros organismos, particularmente aquellos que son de alguna manera más complejo que el original ³⁷.

El inventario de organismos modelo más reconocido, compilado por el Instituto Nacional de Salud de EE. UU., comprende solo trece especies, incluida la levadura *S. cerevisiae*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans*, la planta *Arabidopsis thaliana*, el pez cebra *Danio rerio*, el ratón *Mus musculus* y las bacterias *E. coli* y *B. subtilis* ³⁸.

El uso de organismos modelo para la investigación es un sello distintivo del esfuerzo científico³⁹. Estos organismos se utilizan porque a) pueden ayudar a superar las limitaciones éticas y experimentales que se aplican a la forma de vida objetivo, b) proporcionan un marco sobre el cual desarrollar y optimizar métodos analíticos que facilitan y estandarizan el análisis, c) se cree que puede ser representativo de una clase más amplia de seres vivos para cualquier fenómeno o proceso biológico en el que la comunidad esté interesada⁴⁰.

2.1.1 *E. coli*

La *E. coli* es una bacteria gramnegativa, no esporulante y facultativamente anaeróbica con forma de bastón, se puede observar en la Figura 1. Sus dimensiones son de aproximadamente 2.0 (μm) de longitud y su el diámetro es de 0.25-1.0 μm ⁴¹.

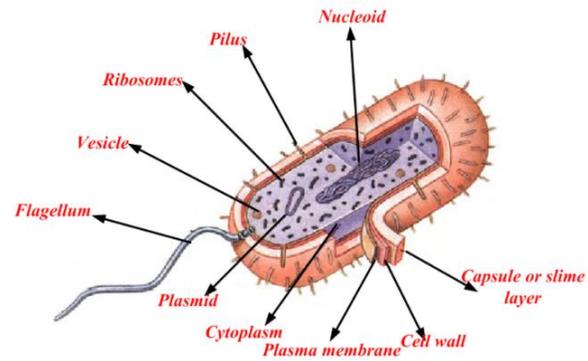
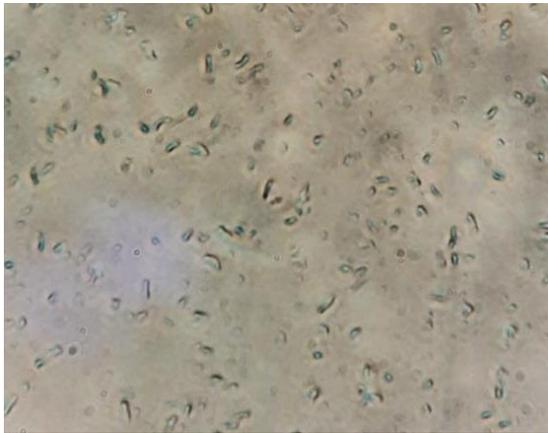


Figura 1. *E. coli* teñida con azul de metileno tomada en un microscopio invertido con un objetivo de microscopio 100X. Figura 2. Imagen que representa la estructura interna de la *E. coli*⁴².

E. coli ocupa una posición importante en la industria de microbiología e ingeniería biológica moderna debido a su fácil manipulación y proliferación, el trabajo de investigación de Herbert Boyer y Stanley Norman Cohen con respecto al uso de la restricción de enzimas y plásmidos con el fin de crear ADN recombinante por *E. coli* se convirtió en la base de la biotecnología⁴³.

Es considerada un microorganismo muy útil para la producción de proteínas heterólogas⁴⁴. La producción de proteínas recombinantes involucra la expresión de varias proteínas en la *E. coli*. Para poder realizar esto, se utilizan plásmidos, los cuales sirven para introducir genes en los microorganismos, y esto tiene como resultado una alta expresión de proteínas. Estas proteínas pueden ser producidas por el proceso de fermentación en masa a nivel industrial. Una aplicación muy importante de la tecnología recombinante de ADN en la *E. coli* es la producción de la insulina humana⁴⁵. En la Figura 2, se observa un diagrama de los organelos de la *E. coli*.

2.1.2 Proteína verde fluorescente

Otra proteína recombinante generada por *E. coli* es; la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés), esta es una proteína que proporciona un entorno único para tres aminoácidos en su secuencia primaria, estos tienden a doblarse entre ellos para actuar como un fluoróforo, esto es un grupo químico que absorbe y emite luz⁴⁶. Lo interesante de este grupo de aminoácidos es que no se requiere modificación adicional o cofactor para proporcionar fluorescencia. Estas proteínas tienen excitación / emisión máxima de 395/509 nm^{46,47}. Las características de fluorescencia de GFP se pueden cuantificar para estudios *in vivo* e *in vitro*, mediante una variedad de técnicas como lo son: microscopía de fluorescencia, citometría de flujo y espectrofluorimetría. Se observa la fluorescencia de la proteína verde en la Figura 3.

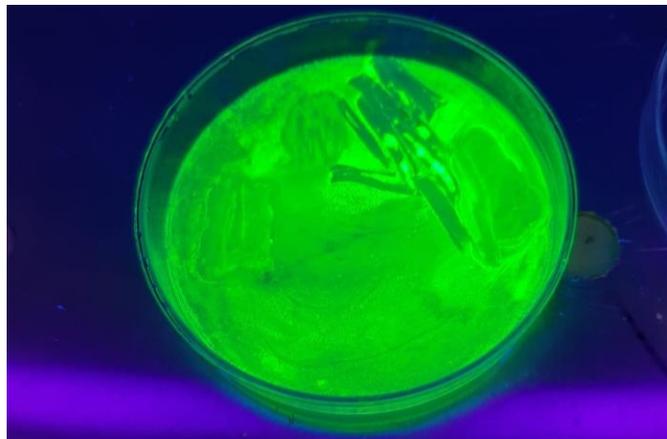


Figura 3. *E. coli* generadoras de GFP, crecidas en cajas Petri en agar de soya tripticaseina, observadas bajo los efectos de luz ultravioleta, la fotografía fue tomada 24 horas después de la siembra.

2.1.3 *B. subtilis*

B. subtilis es el organismo modelo mejor estudiado del linaje Gram positivo. Es naturalmente transformable y tiene una caja de herramientas genética extremadamente poderosa. Es de crecimiento rápido y fácil de cultivar. Es un organismo industrial importante, que es competente en la secreción de proteínas y

la producción de pequeñas sustancias químicas finas, además de actuar como promotor del crecimiento de las plantas.

B. subtilis es una bacteria aeróbica grampositiva de crecimiento rápido con células en forma de bastón que suelen tener entre 2 y 6 μm de largo y poco menos de 1 μm de diámetro. La temperatura de crecimiento óptima es de unos 30 a 35°C, lo que da un tiempo de duplicación de tan solo 20 min. Se pueden observar los *B. subtilis* en la Figura 4.

Otro importante impulsor de interés en *B. subtilis* se basa en su importancia como organismo industrial, principalmente a través de su prodigiosa capacidad para secretar varias enzimas hidrolíticas importantes directamente en el medio de cultivo, pero también como productor de productos químicos finos, como la riboflavina, conocida también como vitamina B2.

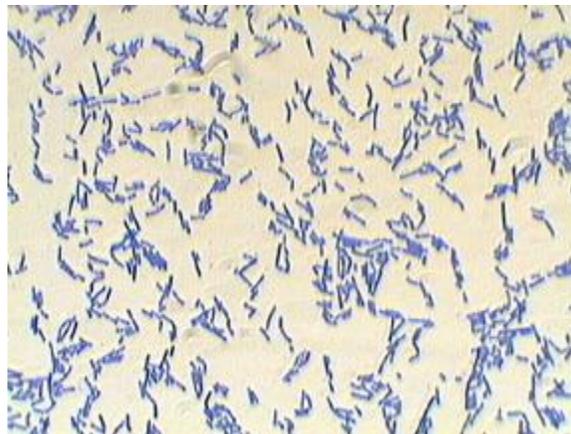


Figura 4. *B. subtilis* observados desde un microscopio 100X, cultivados en caldo de soya tripticaseína, la imagen fue capturada 24 horas después del cultivo.

2.1.4 *S. cerevisiae*

S. cerevisiae es un hongo unicelular, un tipo de levadura que se ha desarrollado como organismo eucariota modelo por varias razones, por ejemplo:

S. cerevisiae es una pequeña célula redonda u ovoide, de 5 a 10 μm de diámetro con un tiempo de duplicación de 1,25 a 2 h a 30° C y, lo que es más importante, se puede cultivar fácilmente. En consecuencia, esto permite la producción rápida y el

mantenimiento de múltiples cepas a bajo costo. Además de que *S. cerevisiae* puede manipularse genéticamente permitiendo tanto la adición de nuevos genes como la delección a través de una plétora de técnicas de recombinación homóloga⁴⁸.

S. cerevisiae fue el primer genoma eucariota en ser completamente secuenciado. La secuencia del genoma se publicó en 1996 y se ha actualizado periódicamente en la base de datos del genoma de *Saccharomyces*^{40,48}. Actualmente, se considera que el genoma está compuesto por 12 156 677 pares de bases y 6275 genes organizados en 16 cromosomas. La capacidad de cultivar esta especie de levadura como haploide simplifica el aislamiento de mutantes e híbridos haploides-diploides⁴⁹.

Como eucariota, *S. cerevisiae* tiene una estructura celular interna similar a la de las plantas y los animales, como se observa en la Figura 5.

Los estudios sobre organelos intracelulares en *S. cerevisiae* (membranas, vacuola, núcleo, retículo endoplásmico y mitocondrias) han contribuido considerablemente al conocimiento básico de los organelos eucariotas³⁹.

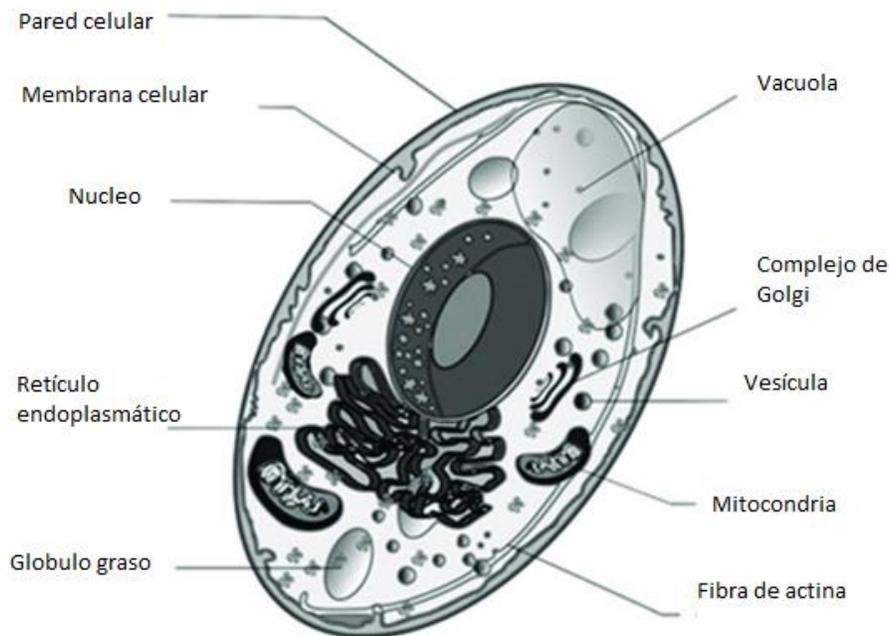


Figura 5. Imagen de célula de *S. cerevisiae*, mostrando los organelos de esta⁵⁰

2.2 La luz y el espectro electromagnético

La luz es una onda electromagnética que tiene la capacidad de ser detectada por el ojo humano y cuya frecuencia determina su color⁵¹. Es llamado espectro electromagnético a la agrupación de ondas electromagnéticas que absorbe o emite un objeto.

La forma en la que se organiza el espectro electromagnético es dada por su longitud de onda (la distancia existente entre dos crestas o valles consecutivos), las ondas agrupadas de menor a mayor longitud son: los rayos cósmicos, los rayos gamma, rayos X, luz ultravioleta, luz visible, infrarroja, microondas y ondas de radio⁵². Como se observa en la Figura 6.

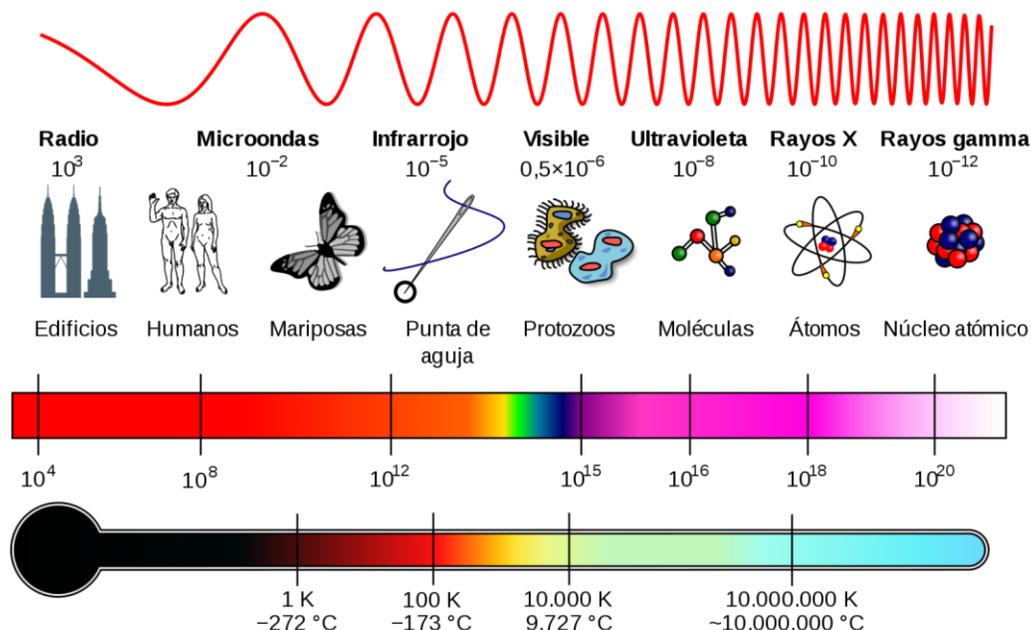


Figura 6. Diagrama del espectro electromagnético, mostrando el tipo, longitud de onda con ejemplos, frecuencia y temperatura de emisión de cuerpo negro⁵³.

2.2.1 El espectro visible

La luz visible forma parte de una franja que va desde longitudes de onda de 380 nm (violeta) hasta los 780 nm (rojo). Los colores del espectro se ordenan como en el arco iris, formando el llamado espectro visible⁵¹. Frecuencia y longitud de onda se

relacionan por la expresión: $c = \lambda v$ donde c es la velocidad de la luz en el vacío, v es la frecuencia, y λ es la longitud de onda⁵².

La luz es la región del espectro electromagnético la cual puede ver el ojo humano. En el extremo azul el límite está en la longitud onda de 390 nm (una frecuencia de 770 THz) para el extremo violeta. En el extremo rojo, está alrededor de 700 nm (430 THz). El espectro se muestra en la Figura 7.

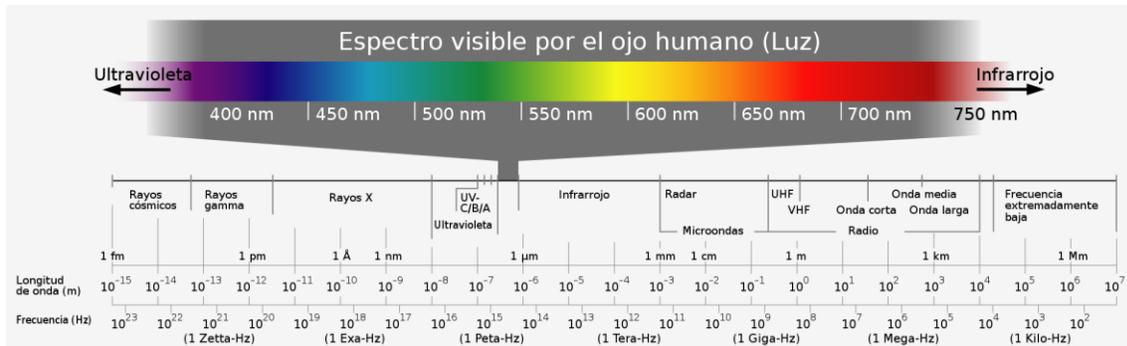


Figura 7. Espectro visible de la luz. Las ondas con frecuencia mayor que el extremo violeta son llamadas ultravioletas y aquellas con frecuencia menores que el extremo rojo se llaman infrarrojas⁵⁴.

2.3 Fotobiomodulación

La FBM es una terapia de luz de baja intensidad. El efecto es fotoquímico, no térmico. La luz desencadena cambios bioquímicos dentro de las células y se puede comparar con el proceso de fotosíntesis en las plantas, donde los fotones son absorbidos por los fotorreceptores celulares y desencadenan cambios químicos⁵⁵.

La FBM es la aplicación de luz (generalmente un láser de baja potencia o un LED con rango de potencia de 10 mW-500 mW)⁵⁶. Comúnmente se utiliza luz con una longitud de onda en la región del rojo al IRC del espectro (660 nm-905 nm) esto debido a que los organelos celulares tienen mayor absorción en estas longitudes de onda⁵⁷. Sin embargo, esta no es la única longitud de onda que puede ser absorbida por las células. También se han informado algunos experimentos con muchas otras longitudes de onda en el rango de 300 a 800 nm obteniendo resultados positivos con respecto a la aceleración transitoria de la división celular⁸.

2.3.1 La ley de Arndt-Schultz o respuesta bifásica para fotobiomodulación

El concepto de Ley de Arndt-Schulz data de los años en torno al final del siglo XIX, cuando H. Schulz publicó una serie de artículos que examinaban la actividad de varios tipos de venenos (yodo, bromo, cloruro de mercurio, ácido arsenioso, etc.) en la levadura, lo que demuestra que casi todos estos agentes tienen un efecto ligeramente estimulante sobre el metabolismo de la levadura cuando se administra en dosis bajas^{58,59}. Entonces él entró en contacto con el psiquiatra R. Arndt y juntos desarrollaron un principio que más tarde se conoció como la "ley de Arndt-Schulz o respuesta bifásica", que establece que los estímulos débiles aceleran ligeramente la actividad vital, los estímulos más fuertes aumentan más, pero se alcanza un pico y estímulos aún más fuertes lo suprimen, hasta que finalmente se logra una respuesta negativa⁶⁰. En la Figura 8 se observa un ejemplo de la curva de Arndt-Schulz.

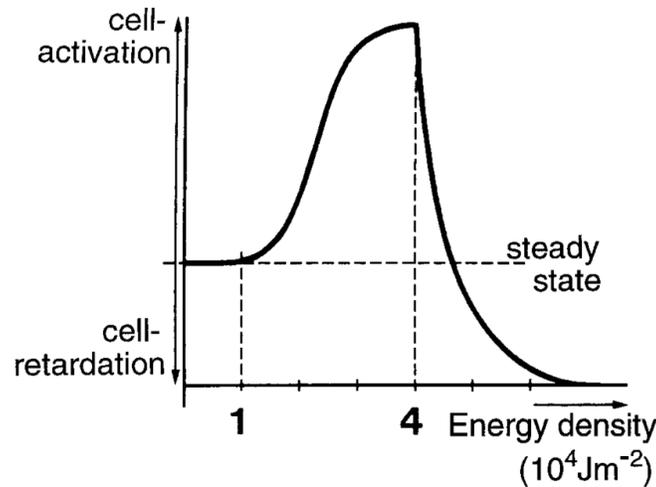


Figura 8. Gráfica mostrando la curva característica de ley de Arndt-Schulz⁶¹.

Esto se ha observado en estudios de cicatrización de heridas en los que una dosis demasiado baja no tuvo impacto y una dosis demasiado alta prolongó la cicatrización de la herida, mientras que la dosis óptima resultó en una cicatrización más rápida^{62,63}.

2.3.2 Efectos de la FBM en los sistemas biológicos

Para que la luz visible o IRC de baja potencia tenga un efecto sobre un sistema biológico, el fotón debe ser absorbido por bandas de absorción electrónicas pertenecientes a un aceptor de fotón o cromóforo⁵⁵. Un cromóforo es una molécula (o parte de una molécula) que imparte un color a un compuesto (por ejemplo, clorofila, hemoglobina, mioglobina, CCO, otros citocromos, flavina, flavoproteínas o porfirinas)⁵⁶. La “ventana óptica” en un tejido describe un rango de longitudes de onda donde la penetración de la luz en el tejido se maximiza mediante el empleo de longitudes de onda del espectro visible y del IRC⁵⁷. Las mitocondrias son "las plantas de energía celular" en las células eucariotas y, como tales, convierten las moléculas de los nutrientes y el oxígeno en energía (ATP) por fosforilación oxidativa. Se ha propuesto que el CCO es el fotoceptor principal para el rango de longitud de onda del rojo-NIR en células de eucariotas⁵⁶. El óxido nítrico (NO) producido en las mitocondrias puede inhibir la respiración al unirse al CCO y desplazar el oxígeno, especialmente en las células lesionadas o hipóxicas⁵⁷. Se propone que la FBM puede foto-disociar NO de CCO y revertir la inhibición mitocondrial de la respiración debido a la unión excesiva de NO⁶⁴.

Independientemente de si el CCO se activa con luz roja / IRC, o si los canales iónicos TRP se activan con luz azul / verde /infrarroja, los resultados celulares tienen algunos aspectos en común, pero también muestran algunas diferencias. Ambas vías dan lugar a un aumento de ATP y un breve estallido de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, es más probable que la vía CCO conduzca a la liberación de óxido nítrico y la vía PRT a que genere cambios en los niveles de calcio citosólico y mitocondrial¹⁰. La FBM es capaz de producir un cambio en el potencial redox celular general en la dirección de una mayor oxidación al aumentar las especies reactivas de oxígeno (ROS) y disminuir las especies reactivas de nitrógeno (RNS)^{55-57,64,65}. Se cree que los efectos a largo plazo de la FBM se deben a la activación de varios factores de transcripción por las moléculas de señalización química inmediata producidas por la estimulación mitocondrial por la FBM. Se cree que las más

importantes de estas moléculas de señalización son ATP, AMP cíclico, NO y ROS⁹. El mecanismo de acción se observa en la Figura 9.

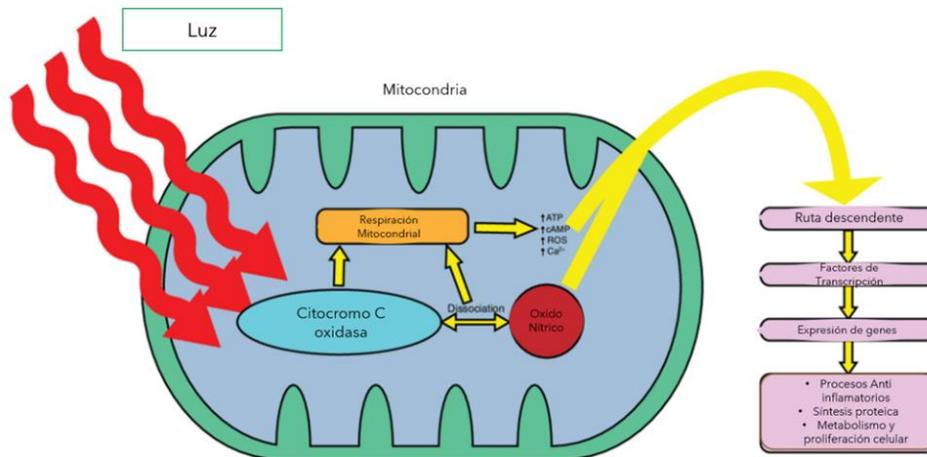


Figura 9. Esquema que muestra la mitocondria siendo irradiada por luz visible, se muestran los metabolitos y efectos de cascada descendente que pueden ser generados por la FBM⁶⁶.

2.4 La mitocondria

En las mitocondrias se produce la mayor parte del ATP de las células eucariotas. Metabolizan el acetil coenzima A mediante el ciclo enzimático del ácido cítrico, dando como productos al CO₂ y al NADH. Es el NADH el que cede electrones a una cadena de transportadores de electrones que se encuentra en la membrana interna⁶⁷. Estos electrones pasan de un transportador a otro llegando como último paso al O₂, resultando H₂O. Este transporte de electrones se acopla al transporte de protones desde la matriz hasta el espacio intermembranoso. Es este gradiente de protones el que permite la síntesis de ATP gracias a la ATP sintasa. Por unir fosfato al ADP y por usar el oxígeno como aceptor final de electrones, a este proceso se le llama fosforilación oxidativa. En las bacterias aeróbicas, que no poseen mitocondrias, este proceso ocurre en su única membrana celular⁶⁸.

Las mitocondrias están rodeadas por una membrana lisa en el exterior que permite el paso de diferentes moléculas, y por una membrana interna con una gran cantidad de pliegues, y se encarga de regular el tipo de moléculas que pueden atravesarla. Estos pliegues proporcionan una gran superficie que contiene muchas proteínas

con actividad enzimática necesarias para las reacciones químicas que transforman la energía química de las moléculas alimenticias en ATP⁶⁹.

2.4.1 Cadena de transporte de electrones

La forma de transportar a los electrones para realizar la síntesis de ATP se encuentra en la membrana interior mitocondrial, este mecanismo es denominado como cadena de transporte de electrones. Y está formada por una serie de enzimas que pueden pasar por estados de reducción y oxidación con el fin de recibir y ceder electrones. El último receptor de electrones en esta cadena es el oxígeno.

La mayor parte del oxígeno que respiran los seres vivos se usa para aceptar los electrones que pasan por la cadena respiratoria; después de que un átomo de oxígeno recibe dos electrones, éste reacciona con dos H⁺ y forma una molécula de agua⁷⁰. El trayecto de los electrones mediante de la cadena respiratoria es la fuente energética para la síntesis de ATP. Una parte de los elementos que conforman a la cadena respiratoria poseen un color característico⁷¹, denominados citocromos, y estos absorben luz a longitudes de onda específicas se muestra en la Figura 10.

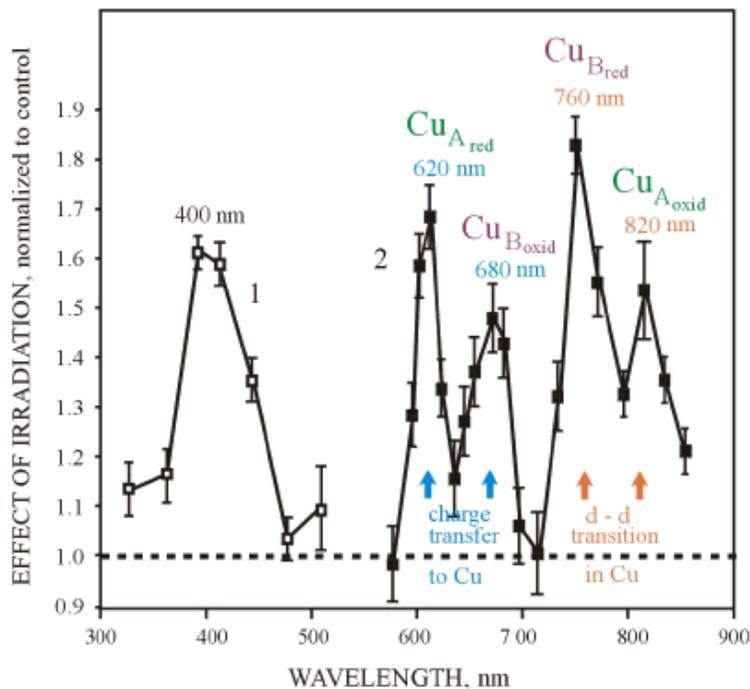


Figura 10. Los espectros de extinción de los citocromos absorbentes en la cadena de transporte de electrones en el visible y NIR. Visualizado entre 400 y 1000 nm ⁷².

La cadena de transporte de electrones mitocondrial (Figura 11) utiliza electrones desde un donador ya sea NADH o FADH₂ y los pasa a un aceptor de electrones final, como el O₂, mediante una serie de reacciones redox ⁷¹. Estas reacciones están acopladas a la creación de un gradiente de protones generado por los complejos I, III y IV. Dicho gradiente es utilizado para generar ATP mediante la ATP sintasa⁷⁰.

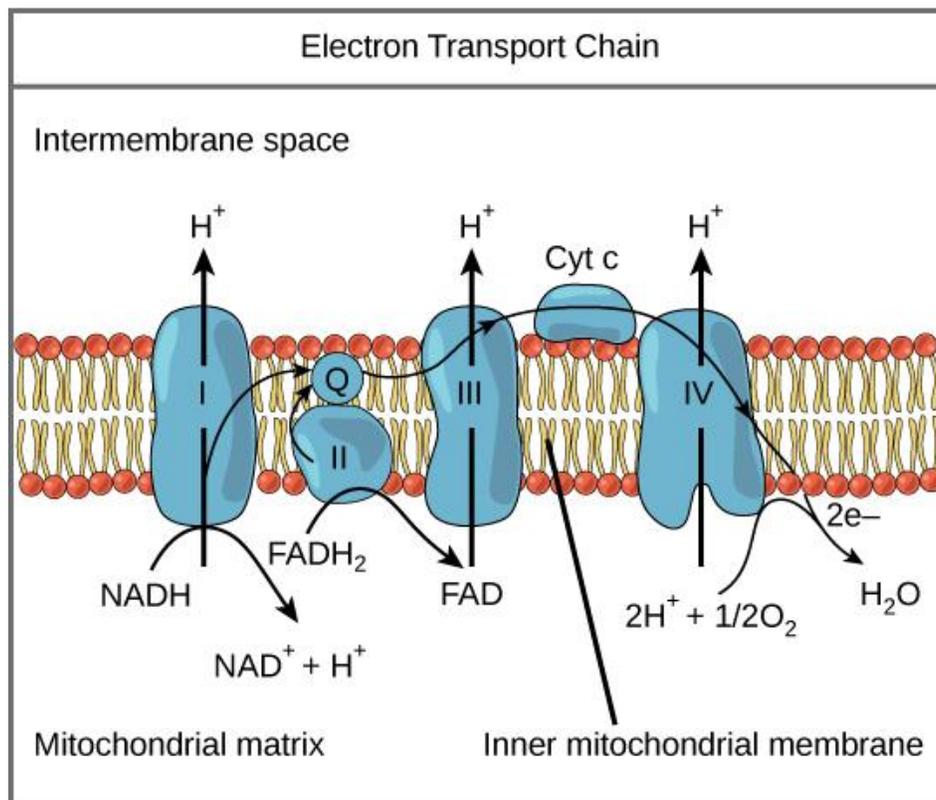


Figura 11. Diagrama del funcionamiento de la cadena transportadora de electrones⁷³.

2.4.2 Cromóforos en células procariontas

La cadena respiratoria aeróbica de *B. subtilis* está compuesta por varias deshidrogenasas, a saber, NADH deshidrogenasa de tipo 2 (NADH), succinato deshidrogenasa (SDH) y glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, que reduce la reserva de menaquinona, que es una vitamina antihemorrágica. Varios complejos

respiratorios están involucrados en la oxidación de menaquinol. Los electrones pueden fluir a un complejo b6c, un citocromo c550 unido a membrana y un citocromo caa3 oxidasa^{74,75}. Como se ha observado anteriormente, los citocromos pueden actuar como cromóforos y tienen espectros de absorción en distintas longitudes de onda.

Otro cromóforo del *B. subtilis*, el YtvA, se encuentra involucrado en la respuesta general al estrés, regulada por un mecanismo de cambio de pareja en el que la fosforilación de serina y treonina controla las interacciones de las proteínas en la vía de señalización del estrés⁷⁶. La rama ambiental de esta vía contiene una familia de cinco proteínas parálogas que funcionan como reguladores negativos. Y una sexta proteína paróloga actúa como un regulador positivo en la misma rama de señalización ambiental, esta proteína es denominada YtvA⁷⁶. Esta fue encontrada como el primer fotorreceptor procariota sensible a la luz azul, y actúa de una manera similar a la fototropina, la cual es una flavoproteína que permite alterar el crecimiento de las células en respuesta a la luz ambiental⁷⁷.

En el caso de *E. coli*, se ha afirmado que los citocromos b y d juegan un papel activo como un desencadenante de la foto estimulación cuando las células de *E. coli* se exponen a 632,8 nm de luz de un láser HeNe^{78,79}.

Por otro lado, todavía existe un grado de incertidumbre en lo que respecta a la naturaleza de los procesos que son responsables de la conversión de la foto señal en los efectos biológicos y fisiológicos, los mecanismos considerados hasta ahora incluyen: un calentamiento localizado transitorio en el microambiente de los cromóforos absorbentes de luz^{78,80}, un cambio en las propiedades redox de moléculas críticas como consecuencia de la foto excitación de los cromóforos absorbentes iniciales (similar a lo que se sabe que ocurre en el caso de sistemas fotosintéticos)⁸¹ y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la transferencia de energía o de electrones desde los estados excitados electrónicamente del cromóforo absorbente en dioxígeno molecular⁸². Estos últimos procesos conducirían a la generación de especies potencialmente dañinas, como el superóxido anión ($O_2 \cdot^-$), el radical hidroxilo ($OH \cdot$) y oxígeno singlete

($^1\text{O}_2$). Si el daño oxidativo es de naturaleza subletal, como cabría esperar en el caso de condiciones de irradiación leve, la célula puede reaccionar activamente con una aceleración de su metabolismo general.

2.5 Microorganismos para la producción de biofármacos

Las moléculas de baja masa molecular se denominan genéricamente fármacos, mientras que los fármacos de alta masa molecular, que están representados por polímeros de nucleótidos (ARN o ADN) o aminoácidos (péptidos y proteínas), se denominan biofarmacéuticos⁸³.

Los biofármacos están revolucionando el mundo médico, salvando miles de vidas todos los días. Los pacientes que padecen cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades inmunitarias y otros problemas de salud se han beneficiado de los medicamentos biológicos, que brindan tratamientos específicos y menos efectos secundarios⁸⁴.

El problema con los medicamentos a menudo es que, una vez que se descubren, no están inmediatamente disponibles en grandes cantidades. Ahí radica una gran oportunidad para la biotecnología. Los microorganismos ya han demostrado que pueden funcionar como poderosas fábricas de medicamentos⁸⁵. Así es como la insulina para diabéticos, una vez adquirida con gran dificultad del páncreas de los cerdos, ahora puede ser producida en grandes cantidades por hongos y bacterias fermentadoras. Los fermentadores son grandes reactores en las que se pueden cultivar microorganismos en condiciones controladas.

El uso de proteínas como fármacos se ha destacado principalmente por la alta versatilidad de estas biomoléculas, que tienen diferentes roles fisiológicos en el cuerpo humano como catalizadores, receptores, canales de membrana, portadores de macromoléculas y agentes de defensa celular^{83,86}. Algunas terapias proteicas proporcionan una alta especificidad, como la sustitución de la proteína defectuosa de un paciente o incluso cumplir con su ausencia debido a defectos genéticos o complicaciones inmunológicas.

Con los avances de la biología molecular y el ADN recombinante, las proteínas humanas pueden obtenerse mediante expresión heteróloga utilizando *E. coli*, así como otras bacterias. El ejemplo clásico es la insulina humana, que se usa para tratar la diabetes mellitus tipo I y II (DMI y DMII). Inicialmente, la insulina se purificó a partir de extractos de páncreas bovino y porcino. Sin embargo, el proceso fue costoso y se reportaron muchos casos de respuestas inmunes causadas por insulina animal en pacientes^{87,88}. Luego se aisló el gen de la insulina y la proteína humana obtuvo mediante expresión heteróloga usando *E. coli*. gracias al trabajo conjunto de investigadores de la firma Genentech Inc., en San Francisco, y del centro médico Nacional City of Hope de Los Ángeles, el 6 de septiembre de 1978.

Los responsables del hallazgo habían empezado por sintetizar las dos cadenas de ADN correspondientes al gen de la insulina humana y por separado realizaron un proceso de producción para cada una. Primero las insertaron en sendos plásmidos (moléculas circulares de ADN) y luego introdujeron esos plásmidos en las *E. coli*. Luego, al reproducirse normalmente esas bacterias sintetizan las proteínas codificadas en sus propios genes y también multiplican y expresan el ADN humano que se les ha inoculado, para generar hileras de aminoácidos idénticas a las de nuestra insulina. Finalmente, mediante métodos químicos se purifican y enlazan las dos cadenas para crear la insulina humana en su forma activa⁸⁹.

Actualmente, las ventas totales del mercado de productos microbianos recombinantes alcanzaron aproximadamente \$ 50 mil millones, lo que representa un tercio de las ventas totales de productos biofarmacéuticos⁹⁰. La elección del microorganismo en la producción de productos biofarmacéuticos se basa en muchos factores, incluida la producción de bajo costo, la fácil manipulación y propagación, y los métodos de biología molecular⁹¹. Algunos de los biofarmacéuticos más importantes obtenidos por expresión heteróloga se muestran en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Ejemplos de biofármacos producidos por *E. coli*⁹²

Biofármacos	Uso clínico	Biofármacos	Uso clínico	Biofármacos	Uso clínico
Aldelesleucina (interleucina-2)	Tratamiento de melanoma y cáncer renal	Insulina (Rápida)	Diabetes	Nesiritidio (Péptido natriuretico tipo B)	Descompensación aguda
Ancira (interleucina 1 (IL1) receptor antagonista)	Tratamiento de artritis reumatoide	Insulina (extendida con zinc)	Tratamiento para diabetes mellitus	Nesiritidio (Péptido natriuretico tipo B)	Insuficiencia cardíaca aguda descompensada
Calcitonina (calcitonina de Salmon)	Tratamiento de osteoporosis post menopáusico	interferón- α 2a	Hepatitis C y leucemia	Oprelvecina (interleucina 11)	Prevención de trombocitopenia
Denleucina diftotox (interleucina-2 y toxina fusionada con difteria)	Tratamiento de linfoma de células T	interferón- α 2b	Hepatitis C y leucemia	Palifermina	Tratamiento de mucositis oral
Filgrastim	Tratamiento de neutropenia	interferón- α 2b pegilada	Hepatitis C y leucemia	Hormona Paratiroidea	Tratamiento de osteoporosis e hipoparatiroidismo
Filgrastim pegilado	Tratamiento de neutropenia	interferón- β 1b	Esclerosis múltiple	Pegvisomant, Hormona de crecimiento modificada	Tratamiento de acromegalia
Hormona de crecimiento (HDC)	Prader-Willi and Turner syndromes	Interferon- γ 1b	Enfermedad crónica granulomatosa	Ranibizumab	Degeneración macular relacionada con la edad
Glucagón	Hipoglicemia	Mecasermin (factor de crecimiento 1 similar a la insulina)	Deficiencia de hormona de crecimiento	Retepase (activador plasminógeno)	Tratamiento a infarto miocárdial agudo
Glucarpidasa (carboxypeptidasa bacteriana G2)	Tratamiento para deficiencia renal	Mecasermin rinfabato (factor de crecimiento 1 similar a la insulina y su proteína de acoplamiento IGFBP-3)	Deficiencia de hormona de crecimiento	Somatropin,	Tratamiento a deficiencia de hormona de crecimiento
Insulina (inhalable)	Diabetes mellitus	Teriparatida. Hormona paratiroidea.	Osteoporosis severa	Tasonermin (citoquina)	Tratamiento de sarcoma blando

Tabla 2. Ejemplos de biofármacos producidos por *Saccharomyces*⁹²

Biofármaco	Uso clínico	Biofármaco	Uso clínico	Biofármaco	Uso clínico
Albumina	Proteína transportadora	Insulina detemir (Insulina de acción alargada)	Diabetes mellitus	Insulina aspart; insulina glulisina; insulina lispro (análogo de insulina de acción rápida)	Tratamiento de diabetes mellitus
Anticuerpo de hepatitis B	Vacuna de hepatitis B	Insulina Isophane (Insulina de acción intermedia)	Diabetes mellitus	Péptidos similares al glucagón	Tratamiento de diabetes mellitus
Antígeno		Factor de crecimiento derivado de plaquetas	Tratamiento de úlcera diabética	Insulina	Tratamiento de diabetes mellitus
Anticuerpo de hepatitis B	Vacuna de hepatitis A y B	Hormona tiroidea	Tratamiento de osteoporosis y paratiroidismo	Rasburicasa	Tratamiento de leucemia y linfomas
Hirudina	Anticoagulante	Vacuna de VPH	Vacuna de VPH	Somatropina	Tratamiento de deficiencia de hormona de crecimiento

La tecnología de fabricación de productos biofarmacéuticos se puede dividir en procesos ascendentes y descendentes⁹³. El proceso ascendente se define como el crecimiento microbiano necesario para producir biofármacos u otras biomoléculas e implica una serie de eventos que incluyen la selección de la línea celular, los medios de cultivo, los parámetros de crecimiento y la optimización del proceso para lograr las condiciones óptimas para el crecimiento celular y la producción biofarmacéutica. El objetivo principal del proceso ascendente es la transformación de sustratos en los productos metabólicos deseados⁹⁴. Esto requiere condiciones bien controladas e implica el uso de biorreactores a gran escala. Se deben considerar varios factores, como el tipo de proceso, lote, control de temperatura, pH y suministro de oxígeno,

esterilización de materiales y equipos empleados y mantenimiento del medio ambiente para garantizar que esté libre de microorganismos contaminantes⁹⁵.

El procesamiento descendente incluye todos los pasos necesarios para purificar un producto biológico desde el caldo de cultivo celular hasta el producto purificado final⁹³. Implica varios pasos para capturar la biomolécula diana y eliminar las impurezas relacionadas con la célula huésped (p. Ej., Proteínas de la célula huésped, ADN, etc.), impurezas relacionadas con el proceso (p. Ej., Tampones, ligandos lixiviados, antiespumante, etc.) e impurezas relacionadas con el producto (por ejemplo, agregados, fragmentos, especies recortadas, etc.). Cada paso de purificación es capaz de eliminar una o más clases de impurezas⁹⁶.

Capítulo 3.

3. Materiales y métodos

En este capítulo se presenta la información correspondiente a los materiales utilizados en esta investigación, así como la descripción de los métodos que se llevaron a cabo. Los métodos incluyen el cultivo y mantenimiento de las cepas, el procedimiento para realizar la FBM, y los métodos para realizar la evaluación del efecto de la FBM en la proliferación de las cepas y la producción de GFP.

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

Se utilizaron 3 cepas diferentes: *B. subtilis*, *E. coli* y *S. cerevisiae*, la primera fue donada por el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA) - IPN Tlaxcala, estas células fueron aisladas y obtenidas de un cultivo apícola. La cepa de *E. coli* fue donada por el laboratorio de microbiología del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey campus Puebla. La levadura *S. cerevisiae* fue obtenida de la marca comercial Tradipan esta es una levadura seca instantánea que requirió ser añadida a 100 ml de agua tibia para poder ser hidratada y activada.

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Terapia Fotodinámica y el Laboratorio de Líneas Celulares del Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica.

3.1.2 Medios de cultivo

Un medio de cultivo es una sustancia diseñada para aportar nutrientes para el crecimiento de microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas⁹⁷, este puede ser en forma líquida (caldo) o en forma sólida (agar). Para los microorganismos modelo empleados en este trabajo se utilizaron los siguientes medios:

Levaduras:

- Agar dextrosa Sabouraud (SDA) (MCD Laboratorios)
- Solución buffer fosfato salino (PBS) compuesto por Sodio Fosfato dibásico Na_2HPO_4 (Gran), cloruro de sodio NaCl (Omnichem Cristal), Potasio Fosfato monobásico KH_2PO_4 (Omnichem Cristal) y cloruro de potasio KCl (Gran)

Bacterias:

- Agar de soya tripticaseína (TSA, MCD laboratorios)
- Caldo de soya tripticaseína (TSB, MCD laboratorios)

Materiales:

- Placas Petri marca SYM Laboratories de 60 x 15 mm.

3.1.3 Fuentes de luz

Se utilizaron tres dispositivos a base de LED rojo, azul y verde como fuente de luz para la FBM, Figura 12. El rango de la longitud de onda de los dispositivos puede observarse en la Figura 13. Cada dispositivo cuenta con un arreglo de 12 LEDs ultrabrillantes de 3W de potencia (Vollong Electronics), estos dispositivos fueron diseñados y construidos por el grupo de biofotónica del INAOE.

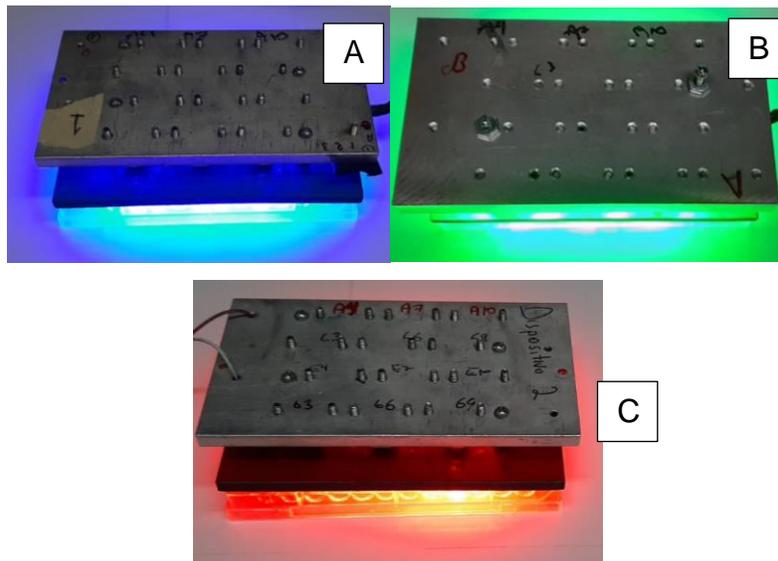


Figura 12. A) Fuente de luz Azul B) Fuente de luz verde C) Fuente de luz roja. se muestran los espectros de emisión de los dispositivos que se tomaron con un espectrofotómetro HR4C2564 Ocean Optics.

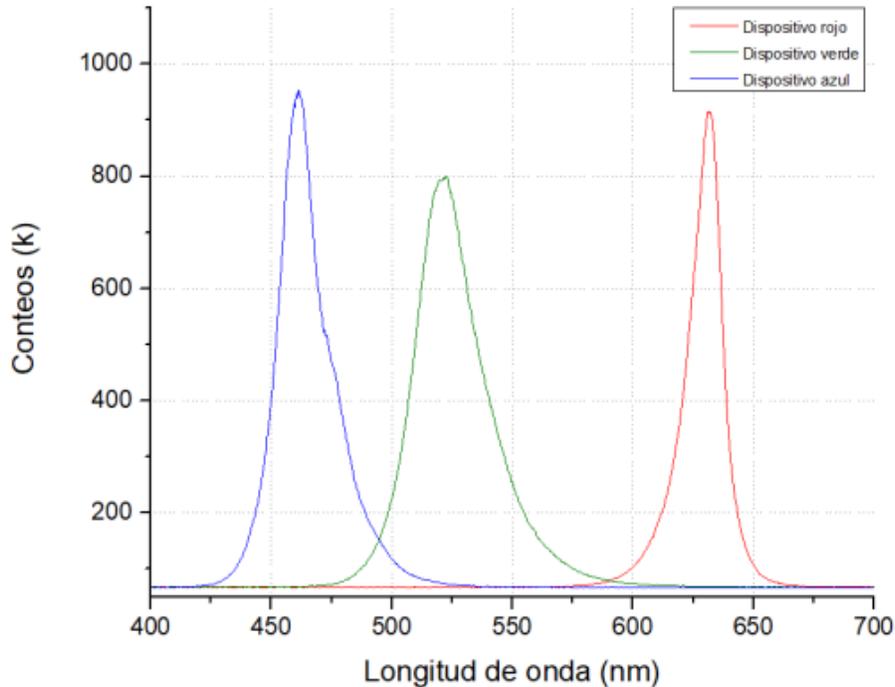


Figura 13. Espectros de emisión de los dispositivos LED utilizados durante la FBM⁹⁸, el espectro de luz roja está centrado en $\lambda = 630$ nm, el del dispositivo verde en $\lambda = 520$ nm, y el espectro de emisión del dispositivo azul en $\lambda = 460$ nm

3.2 Métodos

3.2.1 Condiciones de cultivo

Para el crecimiento de las células en el medio agar, se sembró en la placa de agar por el método de estría masiva, una vez estriadas las células incubaron en una incubadora (Quincy Lab, 8FHK9) durante un periodo de incubación de 24 horas a 30°C para las levaduras, y 37°C para las bacterias.

En el caso del cultivo en el caldo de cultivo, se recolectaron las células utilizando un asa bacteriológica 1/1000 y luego se introdujo el asa en el caldo de cultivo, posteriormente fueron agitadas ligeramente hasta que dispersaron las células, y se procedió a incubarlas en una incubadora (RIOSSA, E41).

3.2.2 Proceso de aplicación de la FBM

Los tratamientos se realizaron teniendo un medio líquido y sobre placas de 96 pozos se vertieron 100 μl , en el caso de las bacterias se realiza en el mismo caldo en el que fueron cultivadas, mientras que en las levaduras se realizó un raspado de la cepa ,posteriormente fueron contadas e introducidas en 20ml de buffer de PBS, las células fueron cuantificadas como se detalla en la sección 3.2.3, y se procedió a verter 100 μl en las placas de 96 pocitos , los experimentos de FBM se muestran en la Tabla 3:

Tabla 3. Tipos de luz, dosis y tiempo empleados en los experimentos de FBM con los diferentes microorganismos modelo.

Luz roja	Tiempo	Luz verde	Tiempo	Luz azul	Tiempo
0.3 J/cm ²	6 s	0.3 J/cm ²	9 s	0.3 J/cm ²	9 s
0.5 J/cm ²	9 s	0.5 J/cm ²	14 s	0.5 J/cm ²	14 s
1 J/cm ²	20 s	1 J/cm ²	28 s	1 J/cm ²	28 s
3 J/cm ²	60 s	3 J/cm ²	1 min 28 s	3 J/cm ²	1 min 28 s
5 J/cm ²	1 min 40 s	5 J/cm ²	2 min 28 s	5 J/cm ²	2 min 28 s
10 J/cm ²	3 min 20 s	10 J/cm ²	4 min 56 s	10 J/cm ²	4 min 56 s

Para la evaluación y análisis de la FBM se propusieron 2 grupos experimentales:

- Control: grupo en ausencia de luz
- Tratamiento: exposición de luz

Se realizaron 3 repeticiones de cada experimento por triplicado (9 repeticiones en total para cada tratamiento o control).

3.2.3 Determinación del número de células por unidades formadoras de colonias

Una unidad formadora de colonia (UFC) es una unidad utilizada en microbiología para estimar el número de bacterias viables o células fúngicas en una muestra. El recuento con unidades formadoras de colonias requiere cultivar los microorganismos y contar solo las células viables⁹⁹.

El método de conteo por UFC se realizó en *S. cerevisiae*, una vez que se llevó a cabo la FBM, se tomaron los 100 μL de la placa de 96 pocitos con una micropipeta y se estriaron en las placas de SDA, posteriormente fueron incubadas durante 24 horas a 30°C, concluidas estas, se realizó el conteo de UFC directo desde la placa.

3.2.4 Cuantificación de las levaduras

Para realizar la cuantificación celular de células de *S. cerevisiae*, se llevó a cabo un conteo utilizando una cámara de Neubauer marca JF LAREN. Inicialmente se tenía la cepa en una placa de SDA, se realizó un raspado y se procedió a introducir las células en un frasco que contenía 20ml de PBS estéril. Posteriormente se tomó la cámara de Neubauer y se vaciaron 20 μl de la solución sobre esta

Se realizó un acercamiento a la zona intermedia de la cámara, debido a que las células de *S. cerevisiae* tienen un diámetro de 5 a 10 μm , se contaron en esta zona haciendo un barrido como se muestra en la Figura 14, se realizaron conteos de al menos 10 cuadros.

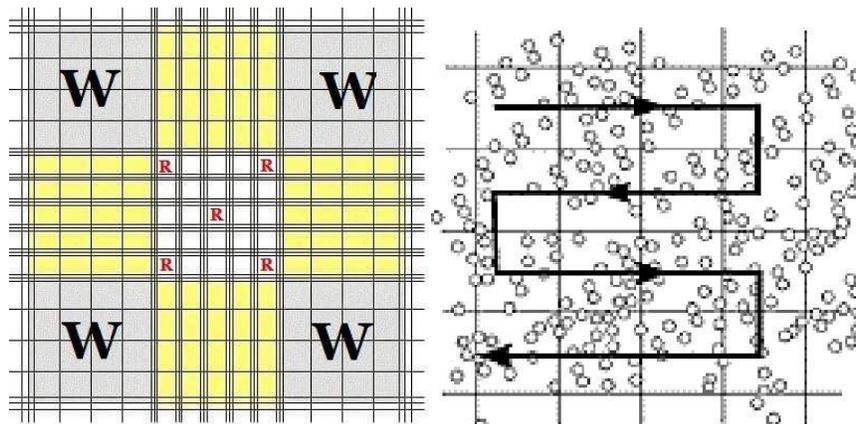


Figura 14. A) Se muestran las divisiones de la cámara de Neubauer, las células de *S. cerevisiae* deben de observarse en la zona central. B) Método de conteo para la cuantificación celular en la cámara de Neubaer. Se debe de llevar ese orden respetando los márgenes de esta ⁷³.

Una vez contadas las células, se realizaron las operaciones mostradas en la ecuación 1 para poder determinar cuál es el promedio de células por mililitro (C_i) obteniendo así la concentración.

$$\text{Promedio de células contadas} * 250,000 = C_i$$

Ecuación 1

Obteniendo este resultado se hicieron los cálculos necesarios para poder ajustar la concentración final con la que se pudo trabajar para poder realizar conteos de UFC sin que se encuentre completamente saturada la placa de SDA, se llevó a cabo el concepto de dilución. La dilución consiste en rebajar la cantidad de soluto por unidad de volumen de disolución. Se logró adicionando más diluyente a la misma cantidad de soluto.

En el caso de los experimentos con *S. cerevisiae*, se estandarizaron las 1000 células /ml, para este experimento. Así que tomaron los μl necesarios y se depositaron en otro frasco con volumen de 20ml para poder ajustar la cantidad de células y normalizar los experimentos. En la ecuación 2, se despejó el volumen necesario para poder obtener la concentración final necesaria.

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$V_i = \frac{(1000 \text{ células/ml})(20\text{ml})}{C_i}$$

Ecuación 2

En donde:

C_i = concentración inicial

V_i = volumen inicial

C_f = concentración final

V_f = volumen final

Después de que las células fuesen irradiadas por los tratamientos. Se determinó que, para poder tomar las fotografías de las células, fue necesario dejar transcurrir al menos 72 horas, de este modo se logró observar de mejor manera el crecimiento con respecto al tamaño celular. Posteriormente, las imágenes fueron analizadas mediante la aplicación del programa de análisis de imágenes Image J (ImageJ es un programa de procesamiento de imágenes basado en Java desarrollado en los Institutos Nacionales de Salud y el Laboratorio de Instrumentación Óptica y Computacional), con el cual se determinó la cantidad de UFC y al mismo tiempo se analizó el tamaño de cada una de estas, obteniendo así el tamaño relativo cubierto por las células con respecto al área total de la placa Petri.

3.2.5 Cuantificación de las bacterias

En cuanto a las mediciones realizadas para cuantificación de *E. coli*, se realizó una metodología diferente, dado que las dimensiones de la *E. coli* son de 1.0-2.0 μm de largo, con un radio de 0.5 μm resulta ser muy complicado realizar un conteo de estas células bajo microscopía óptica utilizando una cámara de Neubauer.

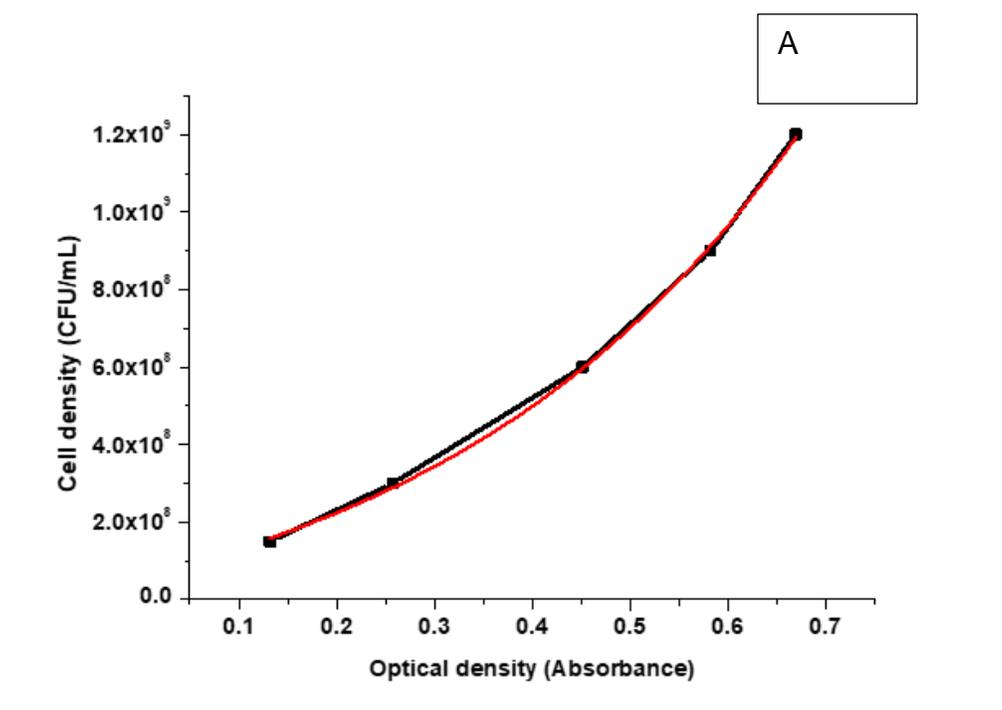
Es debido a esto que se recurrió a realizar un método de cuantificación utilizando la absorción de las células. Empleando un lector de absorbancia de microplacas modelo iMark de la marca BIORAD, con un rango de lectura de 400-750 nm.

Se utilizaron los modelos de absorción de bacterias del estándar de McFarland¹⁰⁰, estos datos son una correlación entre la absorbancia de las bacterias al ser medidas con una longitud de onda de 600nm y la densidad celular, la cual es la cantidad de UFC por ml, como se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Equivalencia de estándar de McFarland con la absorbancia obtenida por un espectrómetro ¹⁰⁰

# Estándar de McFarland	0.5		1	2	3	4
Densidad celular aproximada (1×10^8 /ml)	1.5		3	6	9	12
Absorbancia a una longitud de onda de 600nm	0.132		0.257	0.451	0.582	0.669

Teniendo esta información, se realizó la tabulación para obtener una gráfica que se comporta de manera exponencial. Y posteriormente se procedió a obtener una gráfica con una ecuación definida mediante el programa Origin (este es un programa informático para gráficos científicos interactivos y análisis de datos, es producido por OriginLab Corporation). Habiendo obtenido esta ecuación, los cálculos de la densidad celular pudieron obtenerse de una manera sencilla sustituyendo el valor de x, como la absorción obtenida en el lector de microplacas, como se muestra en la Figura 15.



Model	Exponential	B
Equation	$y = y_0 + A \cdot \exp(R_0 \cdot x)$	
Reduced Chi-	2.26E+14	
Adj. R-Squa	0.99877	

Figura 15. A) Línea negra, son los puntos obtenidos con la información de la Tabla 4. La línea roja es el ajuste de los puntos empleando la ecuación ajustada a los puntos mostrada en la Figura B, obteniendo una R^2 de .99877 B) Ecuación obtenida de la gráfica ajustada. Se debe de sustituir X como el valor obtenido por la absorción del lector de microplacas.

En el caso de las *E. coli* secretoras de GFP, se realizaron pruebas con un espectrómetro de fluorescencia (Horiba, FluoroMax-3). Para poder obtener el espectro de emisión de las proteínas GFP al ser excitadas bajo una longitud de onda de 330 nm.



Figura 16. espectrómetro de fluorescencia FluoroMAx-3 utilizado para realizar las mediciones de fluorescencia de las GFP.

Se realizaron FBM utilizando luz roja, verde, azul y la mezcla de las 3 en placas de 96 pozos, y posteriormente se colocaron en una celda para espectrofotómetro con el fin de medir la excitación de fluorescencia.

Finalmente, fueron desplegados los datos y se obtuvieron las curvas de absorción correspondientes. Se procedió a hacer una deconvolución mediante el programa PeakFit, para poder obtener la contribución real de la excitación de las proteínas GFP en la longitud de onda ≈ 510 nm.

3.3 Pruebas de análisis estadístico

Para realizar las comparaciones entre los mismos tratamientos de cada microorganismo, se obtuvieron las medias estadísticas, así como la desviación estándar para cada grupo control experimental y grupo de tratamiento.

Con el fin de determinar si existe o no una diferencia significativa entre tratamientos utilizando la misma longitud de onda, pero en diferentes repeticiones. Se llevó a cabo una comparación estadística entre grupos mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de Tukey utilizando el programa estadístico Minitab 19 (este es un software de análisis estadístico, que automatiza los cálculos y la creación de gráficos).

Para poder realizar el análisis de Anova, inicialmente se tienen que analizar los datos, por lo que se requieren el cumplimiento de los siguientes supuestos:

- Las poblaciones (distribuciones de probabilidad de la variable dependiente correspondiente a cada factor) son normales. Por lo que se realizó las pruebas de normalidad de Anderson-Darling de cada uno de los tratamientos (luz roja, verde, azul y mezcla de luces) para cada organismo biológico (*E. coli*, *B. subtilis* y *S. cerevisiae*) las cuales puede encontrarse en el anexo A. En estas se demostró que, para todos los casos, el valor p encontrado fue superior al del nivel de significancia ($P > 0.05$) por lo que se aceptó la hipótesis nula, por lo que los datos siguen una distribución normal especificada.
- Las K muestras sobre las que se aplican los tratamientos son independientes. Las repeticiones entre tratamientos fueron realizadas por triplicado en días diferentes con microorganismos distintos entre las repeticiones, en ningún momento se realizó FBM sobre células previamente tratadas. Una vez transcurrido el tiempo de crecimiento, se procedió a obtener los datos pertinentes y se inactivaron las células, para después almacenarse en un contenedor y posteriormente descharcharlas. Las variables independientes fueron: medio de cultivo, temperatura, longitud de onda y fluencia.

- Las poblaciones tienen todas igual varianza (homocedasticidad). Dada la naturaleza de los microorganismos, no se puede contar con la misma cantidad de CFU en cada experimento. Es debido a esto que las cantidades y la varianza puede ser ligeramente mayor o menor, sin embargo, en las Figuras 17, 20 y 31 se observan las medias con sus respectivos rangos de varianza, todos estos intervalos se encuentran dentro de los márgenes de varianza, por lo que se determina que las varianzas son estadísticamente similares.

El valor de significancia con el que se realizaron los análisis estadísticos fue de 0.05, si el valor p obtenido en el análisis ANOVA es inferior al de significancia, se concluye que las diferencias entre alguna de las medias son estadísticamente significativas. En el caso contrario, si el valor p es mayor al de significancia, se concluye que las diferencias entre las medias no son estadísticamente significativas.

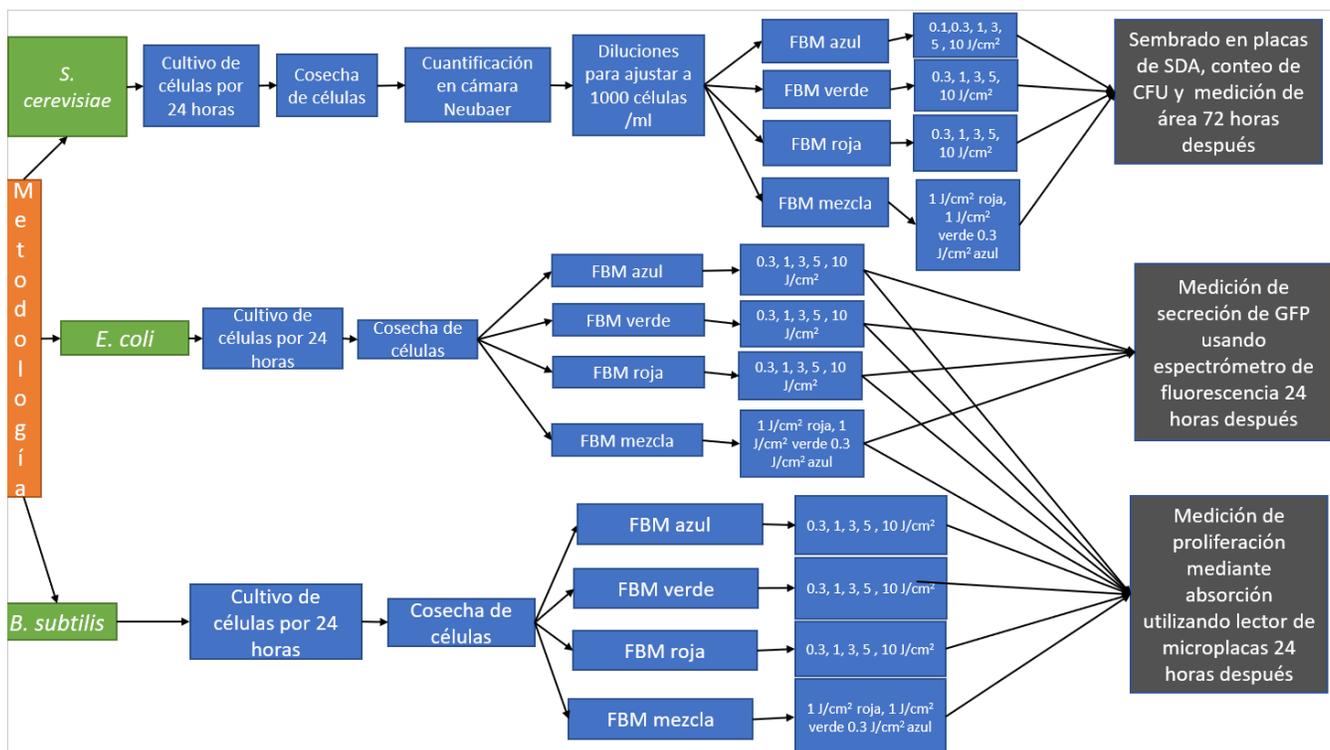


Figura 17. Diagrama de metodología.

Capítulo 4.

4.Resultados

Se observa el efecto de la FBM en los 3 microorganismos modelo para la bacteria *E. coli*, *S. cerevisiae* y *B. subtilis*, en la sección 4.1 se encuentran las Tablas con los tratamientos realizados según lo descrito en la metodología, en donde se muestra cual es el mejor resultado utilizando una misma longitud de onda, pero en una dosis diferente. Ese valor de dosis seleccionado se utilizó en las siguientes secciones.

En la sección 4.2 se muestran los experimentos realizados con *B. subtilis*, en donde se presentan los resultados de la cuantificación de UFC utilizando las dosis obtenidas en la sección 4.1, y se lleva a cabo una comparación entre las repeticiones de los tratamientos.

Del mismo modo, en la sección 4.3 se exponen los resultados con *E. coli* de la cuantificación de UFC y la comparación entre las repeticiones de los tratamientos. Y, además, se muestran los resultados de absorción obtenidos por la emisión de fluorescencia de la GFP. Finalmente, la sección 4.4 consta de los resultados obtenidos del tamaño de las UFC en *S. cerevisiae* expuestas a los tratamientos de FBM.

4.1 Efecto de diferentes dosis de FBM sobre microorganismos modelo

Al analizar la información aportada en la Tabla 5. se observó que en *B. subtilis* utilizando la luz roja, la terapia que obtuvo el mayor número de UFC resultó ser la de dosis de 1 J /cm^2 , en cuanto a la luz verde el tratamiento con dosis de 1 J /cm^2 también fue el que obtuvo la mayor cantidad de UFC, finalmente para la luz azul se observa que el tratamiento que destaca es el de $.3\text{ J /cm}^2$.

Para el caso de *E. coli* que se expuso que en la Tabla 6, los resultados fueron similares a los de *B. subtilis*, se obtuvo que, para la luz roja y verde, las dosis que generan una mayor cantidad de UFC son de 1 J /cm^2 , mientras que para la luz azul la de 3 J/cm^2 fue la que tuvo mejores resultados.

Finalmente, se denota en la Tabla 7, que en el caso de *S. cerevisiae*, al utilizar la luz roja y verde, las dosis que generaron el mayor incremento en el tamaño de la colonia en mm² fueron las de 1 J/cm². Mientras que para el color azul se observó que existen 2 dosis en las que no se observaron diferencias significativas, por lo que se procedió a tomar la dosis de .3 J/ cm² por fines de practicidad y equivalencia de dosis en comparación con las de *B. subtilis* y *E. coli*.

Tabla 5. Efecto de la FBM sobre la proliferación celular en *B. subtilis*.

Promedio de media de UFC de <i>B. subtilis</i> en diferentes tratamientos							
Rojo .1 J/cm ²	Rojo .3 J/cm ²	Rojo .5 J/cm ²	Rojo 1 J/cm ²	Rojo 3 J/cm ²	Rojo 5 J/cm ²	Rojo 10 J/cm ²	controles
3.23E+08	3.59E+08	4.88E+08	5.19E+08	4.28E+08	3.55E+08	2.84E+08	3.55E+08
Verde .1 J/cm ²	Verde .3 J/cm ²	Verde .5 J/cm ²	Verde 1 J/cm ²	Verde 3 J/cm ²	Verde 5 J/cm ²	Verde 10 J/cm ²	Controles
3.10E+08	3.57E+08	4.79E+08	5.04E+08	3.93E+08	3.08E+08	2.54E+08	3.48E+08
Azul 0.1 J/cm ²	Azul 0.3 J/cm ²	Azul 0.5 J/cm ²	Azul 1 J/cm ²	Azul 3 J/cm ²	Azul 5 J/cm ²	Azul 10 J/cm ²	controles
3.80E+08	4.14E+08	3.74E+08	3.33E+08	3.10E+08	2.87E+08	2.29E+08	3.51E+08

Nota: Se remarca en amarillo los mejores resultados obtenidos.

Tabla 6. Efecto de la FBM sobre la proliferación celular en *E. coli*.

Promedio de media de UFC de <i>E. coli</i> en diferentes tratamientos							
Rojo .1 J/cm ²	Rojo .3 J/cm ²	Rojo .5 J/cm ²	Rojo 1 J/cm ²	Rojo 3 J/cm ²	Rojo 5 J/cm ²	Rojo 10 J/cm ²	Controles
4.56E+08	4.95E+08	5.64E+08	7.00E+08	5.72E+08	4.08E+08	3.27E+08	4.30E+08
Verde 0.1 J/cm ²	Verde .3 J/cm ²	Verde .5 J/cm ²	Verde 1 J/cm ²	Verde 3 J/cm ²	Verde 5 J/cm ²	Verde 10 J/cm ²	controles
3.76E+08	4.17E+08	4.80E+08	5.79E+08	4.37E+08	3.72E+08	3.03E+08	3.83E+08
Azul 0.1 J/cm ²	Azul 0.3 J/cm ²	Azul 0.5 J/cm ²	Azul 1 J/cm ²	Azul 3 J/cm ²	Azul 5 J/cm ²	Azul 10 J/cm ²	controles
5.02E+08	5.50E+08	5.12E+08	4.34E+08	3.86E+08	2.46E+08	2.23E+08	4.25E+08

Nota: Se remarca en amarillo los mejores resultados obtenidos.

Tabla 7. Efecto de la FBM sobre la proliferación celular en *S. cerevisiae*.

Promedio de medias de tamaño de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en diferentes tratamientos							
	Rojo .3 J/cm ²	Rojo .5 J/cm ²	Rojo 1 J/cm ²	Rojo 3 J/cm ²	Rojo 5 J/cm ²	Rojo 10 J/cm ²	control
	4.8270	5.3281	5.76719	4.6872	4.2518	4.1115	4.2394
Verde .1 J/cm ²	Verde .3 J/cm ²	Verde .5 J/cm ²	Verde 1 J/cm ²	Verde 3 J/cm ²	Verde 5 J/cm ²	Verde 10 J/cm ²	control
	4.22168	4.6533	5.1022	4.7696	4.3822	4.1775	4.2540
Azul 0.1 J/cm ²	Azul 0.3 J/cm ²	Azul 0.5 J/cm ²	Azul 1 J/cm ²	Azul 3 J/cm ²	Azul 5 J/cm ²	Azul 10 J/cm ²	control
4.27856	4.2726	4.2689	4.4466	4.4710	4.147	4.0873	3.8664

Nota: Se remarca en amarillo los mejores resultados obtenidos.

4.2 Resultados de cuantificación de UFC de *B. subtilis*

A continuación, se muestran los resultados graficados del promedio de UFC/ml de cada una de las repeticiones de un mismo tratamiento (Figura 17), obtenidos del análisis de absorción. Todos los resultados se encuentran anexados en el apéndice A. Los resultados para cada uno de los tratamientos comparados entre ellos arrojaron que no existen diferencias significativas. Por lo que se pudieron agrupar los datos y obtener la media para cada tratamiento como se observa en la Figura 18. Se destaca con (*) los resultados con diferencias significativas respecto al control.

Dado que se obtuvieron diferentes valores de medias, se quiere determinar qué resultados son estadísticamente diferentes, por lo que se realizó la prueba de ANOVA sobre las medias como se observa en la Tabla 8, donde se obtuvo que existe una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos de FBM. Por lo que se realizó la prueba de Tukey para determinar cuáles fueron los tratamientos que son significativamente diferentes entre ellos. Como se observa en la Tabla 9 y Figura 19, los únicos resultados que presentan similitudes son al utilizar la FBM con luz roja y luz verde, mientras que los demás resultados arrojan diferencias significativas. En la Tabla 9 se destaca que los tratamientos en los que se obtuvo una mayor proliferación celular fueron los de luz roja y verde generando una cantidad de UFC de 69% y 65% respectivamente, superiores al grupo control. Posteriormente el de la mezcla de luces se considera como el tercer mejor generando un incremento de UFC del 47% superior al control, y finalmente el de luz azul promoviendo un 20% las UFC más que en el tratamiento control. Todos estos tratamientos generaron una diferencia significativa de UFC /ml con respecto al control.

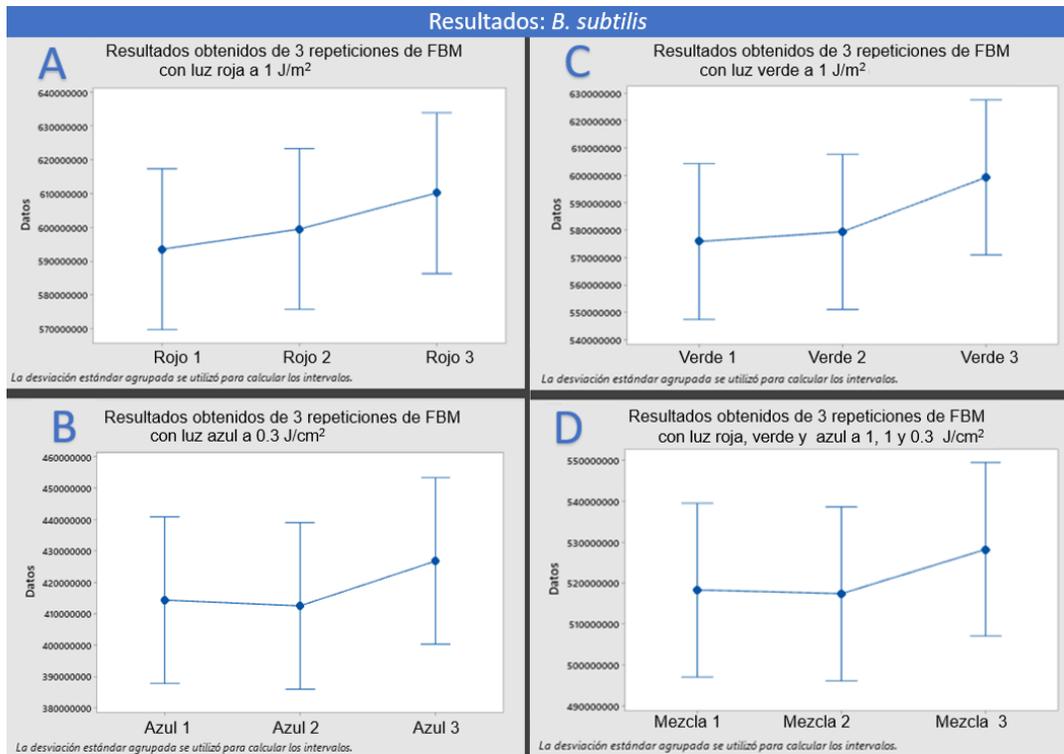


Figura 17. Resultados de cantidad de UFC/ml obtenidos para la cepa *B. subtilis*, realizando FBM con A) Luz roja (630 nm) a 1 J/cm² B) Luz azul (450 nm) a 0.3 J/cm² C) Luz verde (520 nm) a 1 J/cm² D) Mezcla de luces roja (1 J/cm²), verde (1 J/cm²) y azul (0.3 J/cm²). Las gráficas muestran las medias estadísticas de los tratamientos, habiéndose hecho 3 repeticiones por triplicado para cada color. Se observan los intervalos de confianza de cada una de las medias. Escala vertical en 10^x

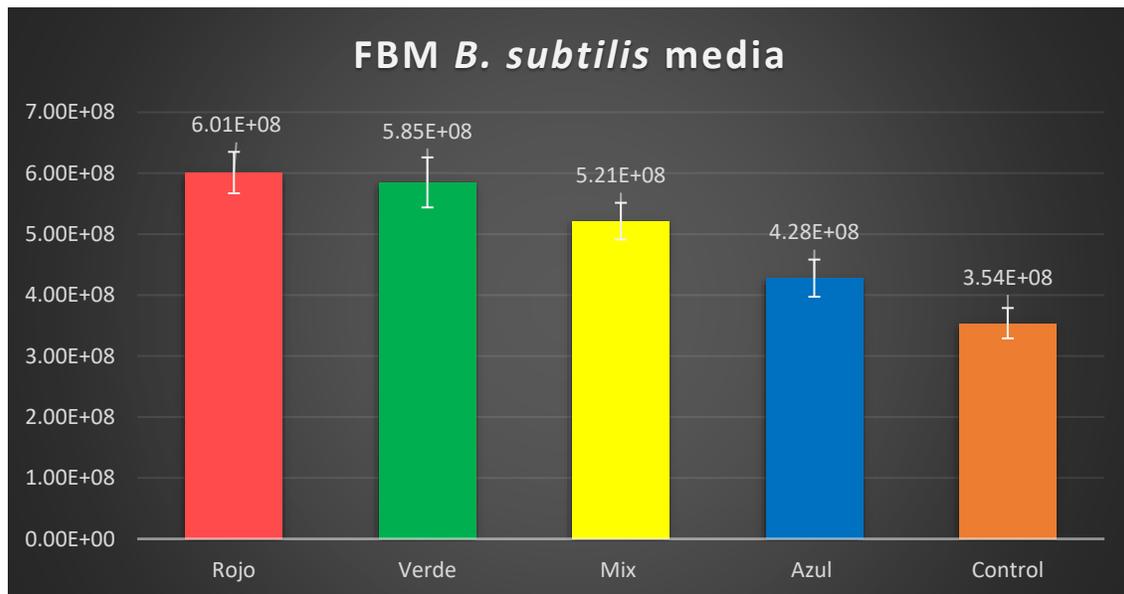


Figura 18. Comparativa de medias de UFC/ml aplicando FBM en *B. subtilis*. Se agruparon todos los valores obtenidos para cada tratamiento. Se destaca con (*) los resultados con diferencias significativas respecto al control.

Tabla 8. Análisis de varianzas, se observa que el valor p es menor que el nivel de significancia, por lo que se concluye que no todas las medias de población son iguales.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	4	7.09904E+17	1.77476E+17	142.75	0.000
Error	108	1.34277E+17	1.24330E+15		
Total	112	8.44181E+17			

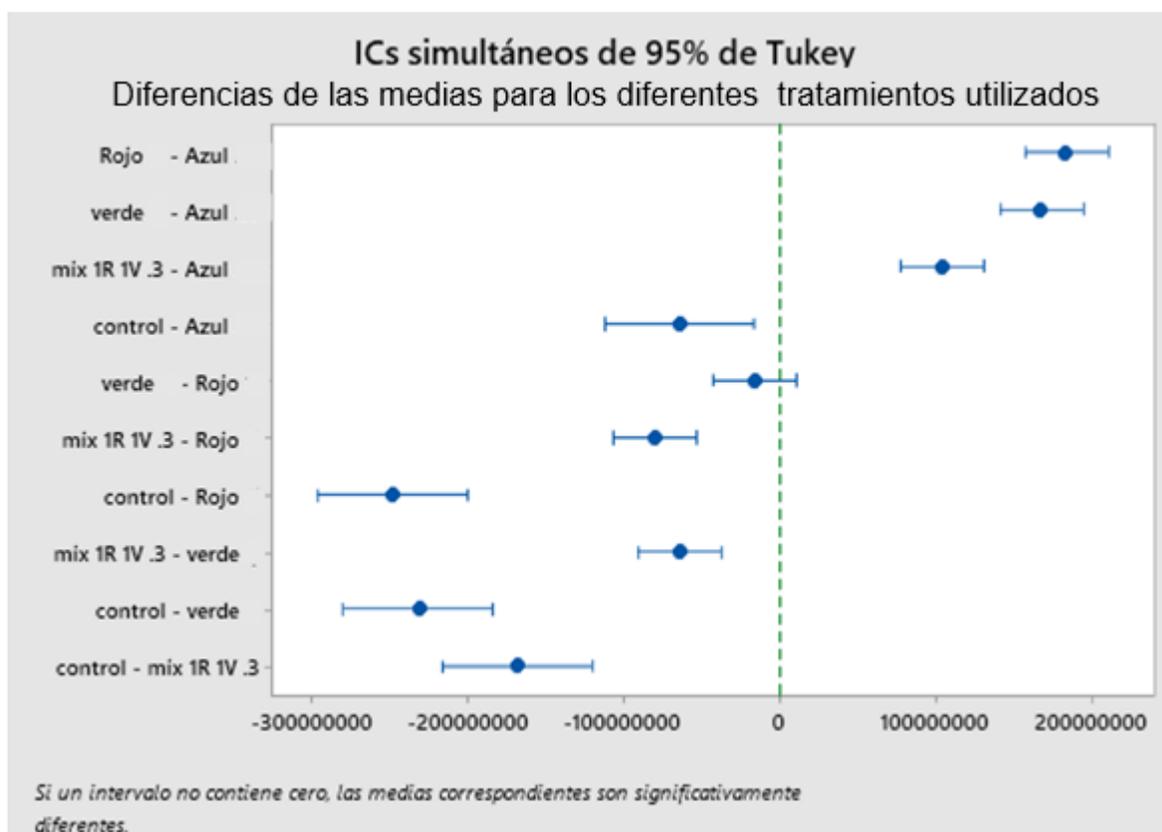


Figura 19. Intervalos de comparación simultáneos con 95% de confianza, en donde se muestran todos los tratamientos y se comparan las medias. Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.

Tabla 9. Comparación de parejas de Tukey con confianza del 95% para experimentos de FBM con diferentes longitudes de onda. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Factor	N	Media	Agrupación
Rojo	27	600975921	A
verde	27	584836724	A
Mixta	27	521314974	B
Azul	27	417763904	C
control	5	353637163	D

4.3 Resultados de cuantificación de UFC de *E. coli*

A continuación, se muestran los resultados graficados del promedio de UFC/ml en *E. coli* de cada una de las repeticiones de un mismo tratamiento (Figura 20) obtenidos del análisis de absorción. Todos los resultados se encuentran anexados en el apéndice B. Los resultados para cada uno de los tratamientos comparados entre ellos arrojaron que no existen diferencias significativas entre ellos. Por lo que se pudieron agrupar los datos y obtener la media para cada tratamiento como se observa en la Figura 21. Se destaca con (*) los resultados con diferencias significativas respecto al control.

Como se observa en la Tabla 10, se realizó la prueba de ANOVA sobre las medias, donde se obtuvo que existe una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos de FBM. Por lo que se realizó la prueba de Tukey para determinar qué tratamientos son significativamente diferentes entre ellos. Se observan los resultados en la Tabla 11 y Figura 22, se denota que no existen similitudes entre los mismos tratamientos, por lo que todos presentaron diferencias significativas. Se destaca que el tratamiento en el que se obtuvo una mayor proliferación celular fue el de luz roja generando un 69% de mayor cantidad de UFC a comparación del control, seguido del tratamiento de mezcla de luces con un 55% de mayor cantidad de UFC que el control, después el de luz verde generando un 42% de mayor cantidad de UFC respecto al control, y finalmente el de luz azul promoviendo un 32% de cantidad de UFC respecto al control. Todos estos tratamientos generaron una diferencia significativa de UFC /ml con respecto al control.

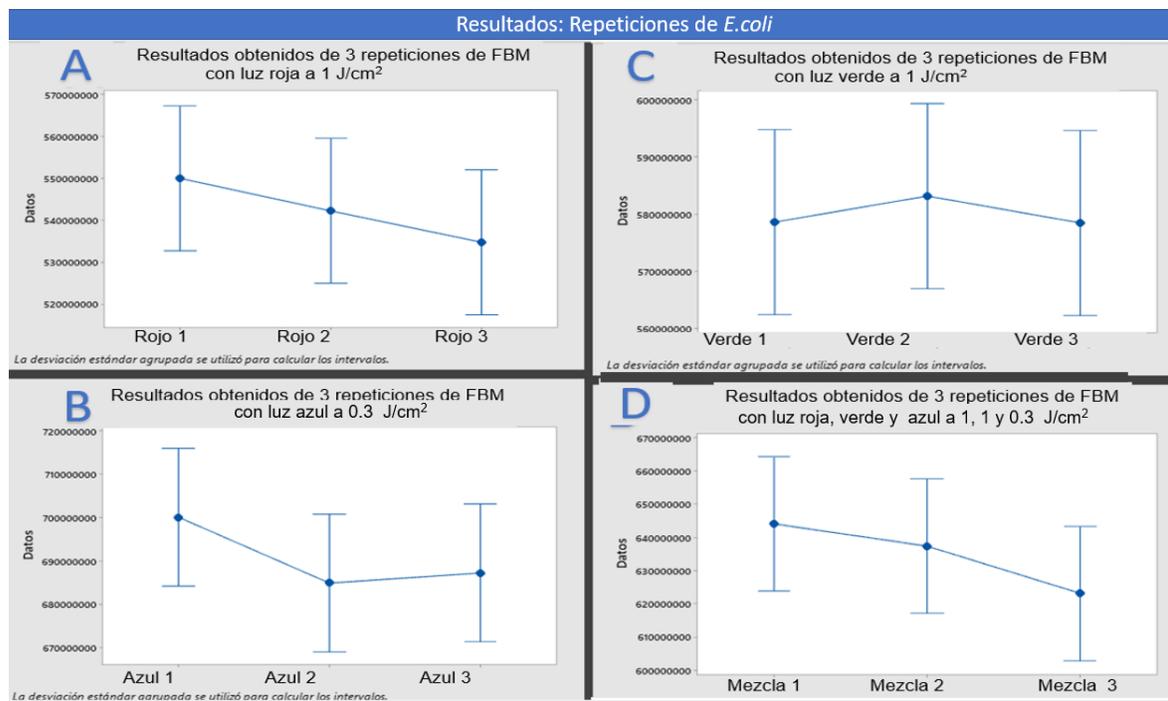


Figura 20. Resultados de cantidad de UFC/ml obtenidos para la cepa *E. coli*, realizando FBM con A) Luz roja (630 nm) a 1 J/cm² B) Luz azul (420 nm) a 0.3 J/cm² C) Luz verde (520 nm) a 1 J/cm² D) Mezcla de luces roja (1 J/cm²), verde (1 J/cm²) y azul (0.3 J/cm²). Las gráficas muestran las medias estadísticas de los tratamientos, habiéndose hecho 3 repeticiones por triplicado para cada color. Se observan los intervalos de confianza de cada una de las medias. Escala vertical en 10⁸x

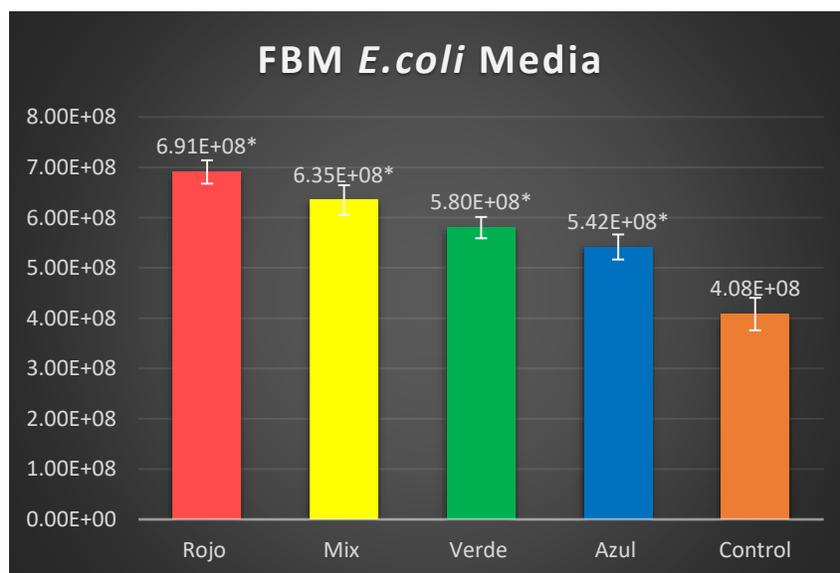


Figura 21. Comparativa de medias de UFC/ml de *E. coli*. Se agruparon todos los valores obtenidos para cada tratamiento. Se destaca con (*) resultados con diferencias significativas respecto al control.

Tabla 10. Se muestra el análisis de ANOVA realizando la comparación entre todos los tratamientos incluidos el control. Se observa que el valor p es menor que el nivel de significancia, por lo que se concluye que no todas las medias de población son iguales.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	4	1.46174E+18	3.65434E+17	493.57	0.000
Error	139	1.02914E+17	7.40387E+14		
Total	143	1.56465E+18			

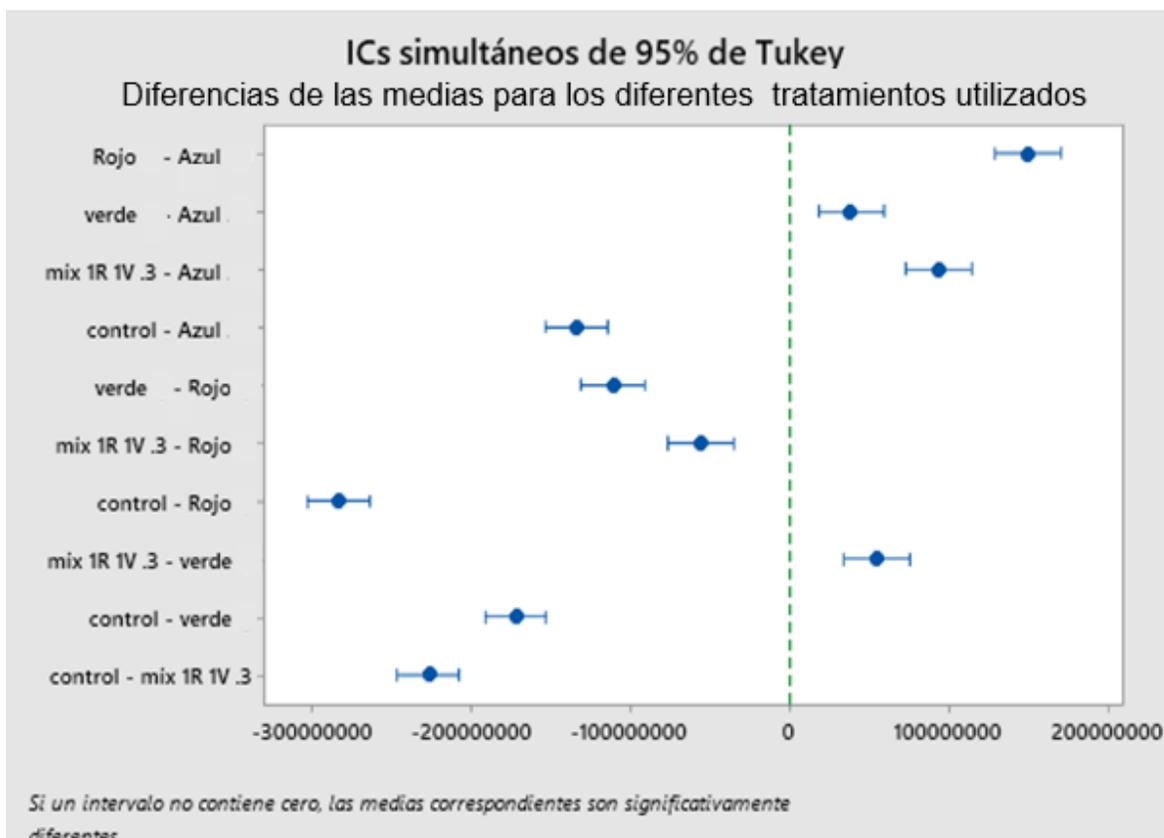


Figura 22. Intervalos de comparación simultáneos con 95% de confianza, en donde se muestran todos los tratamientos y se comparan las medias. Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes

Tabla 11. Comparación de parejas de Tukey con confianza del 95% para experimentos de FBM con diferentes longitudes de onda. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Factor	N	Media	Agrupación
Rojo 1 J /cm ²	27	690701183	A
Mixta 1R 1V .3A	27	634793621	B
verde 1 J /cm ²	27	580048259	C
Azul .3 J /cm ²	27	541555120	D
control	36	408202001	E

4.3.1 Análisis de Fluorescencia de GFP en *E. coli*

Se muestran los resultados correspondientes al espectro de fluorescencia de la proteína GFP al ser irradiados a 395nm se obtuvo el espectro de excitación de las proteínas y, posteriormente, se procedió a realizar un análisis realizando una deconvolución de la gráfica, para obtener las contribuciones de la excitación en diferentes longitudes de onda. El resultado que se debe destacar es el de la integral de la gráfica que se encuentra entre 500 y 530 nm, (se marcó con una flecha amarilla como se observa en la Figura 23), debido a que en este rango es el de la fluorescencia de la GFP.

Como se ve en la Figura 23 se muestran 5 gráficas obtenidas, que equivalen a la primera medición: la de irradiación con luz roja, verde, azul, mixta y su comparación con un control, las demás repeticiones pueden observarse en el apéndice C.

Se obtuvieron los resultados por triplicado y se analizaron, se determinó que no existe una diferencia significativa entre las repeticiones, dicho esto, se promediaron los datos y se obtuvo la gráfica mostrada en la Figura 24.

Posteriormente, se muestra el análisis de ANOVA (Tabla 12) y con la prueba de Tukey (Imagen 25) en los datos de la fluorescencia, para determinar si algún tratamiento cuenta con un valor medio mostrando diferencias significativas, Se observa en la Tabla 13 que la terapia que estimula la mayor concentración de proteínas es la de luz roja generando un 52% más proteínas que el control, seguida de la mezcla de luces al igual que la luz verde, en las cuales se determinó mediante la prueba de Tukey que no existen diferencias entre ellas, la concentración de proteínas para estos dos tratamientos fue de 40% y 33% mayores que el control respectivamente y finalmente la luz azul muestra que es la que menor efecto tiene en cuanto a la estimulación de secreción de proteínas siendo solamente el 19%. Todos estos tratamientos generan una diferencia significativa de UFC /ml con respecto al control.

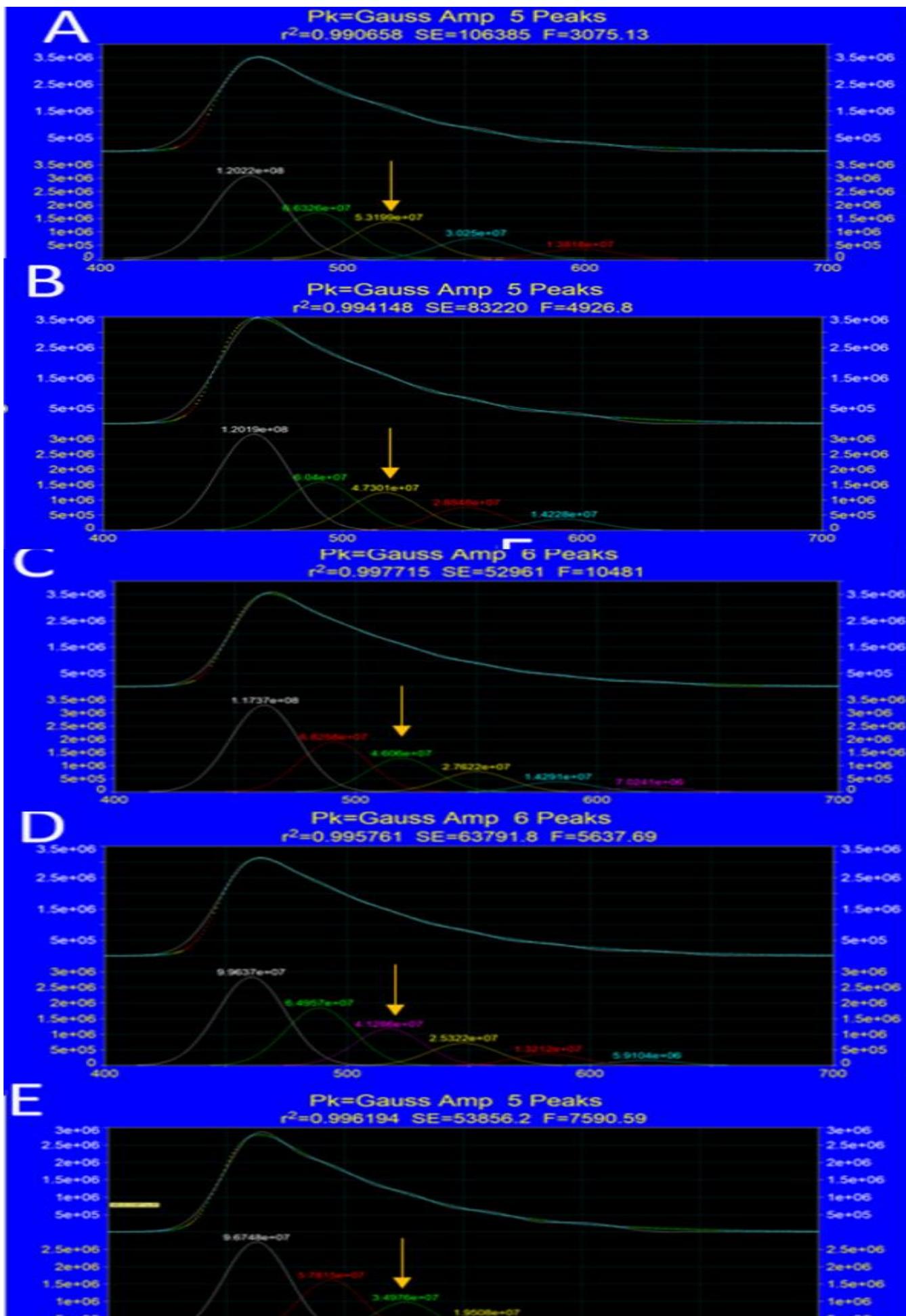


Figura 23. Curvas de absorción obtenidas al realizar espectroscopía de fluorescencia de muestras conteniendo *E. coli* y GFP, se pueden apreciar diferentes curvas, y marcan una contribución de los componentes de la muestra y de la celda espectroscópica, la que se debe destacar es la tercera curva, ya que en esta se muestra la fluorescencia en 515 nm, el rango de emisión de la GFP. Los valores encima de las curvas son los de la integral de esta. Siendo así un equivalente para la concentración. Fluorescencias obtenidas al realizar FBM en *E. coli* utilizando A) luz roja (630 nm) Dosis: 1 J/cm², Integral: 5.3199 x10⁷. B) mezcla de luces azul, verde y roja, integral: 4.7301 x10⁷. C) luz verde (520 nm) Dosis: 1 J/cm², integral: 4.606 x10⁷ D)) luz azul (450 nm) Dosis: 0.3 J/cm², integral: 4.1286 x10⁷ E) Muestra control. Integral 3.4976 x10⁷.

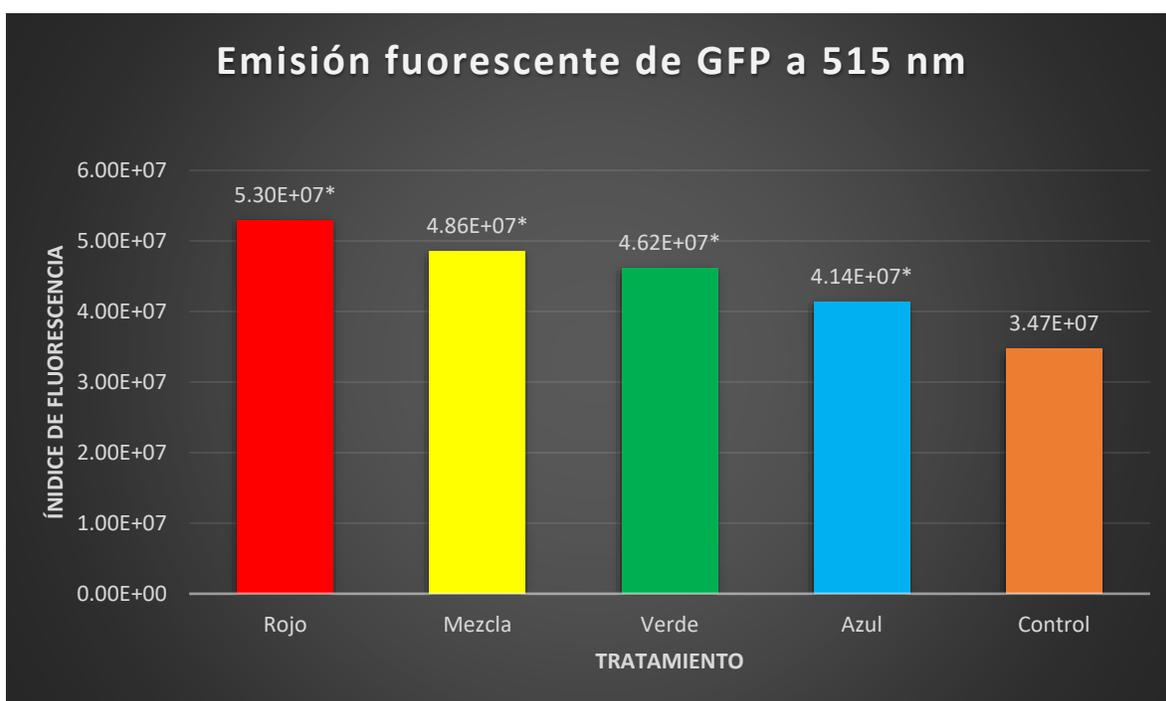


Figura 24. Se muestran las medias de los datos de fluorescencia observados en la figura 23. Cada experimento se hizo por triplicado, denotando como 1, 2, y 3 las diferentes repeticiones Se destacan con (*) los resultados con diferencias significativas respecto al control.

Tabla 12. Análisis de varianza de los datos de fluorescencia. Se observa que el valor p, es menor al nivel de significancia por lo que no todas las medias de población son iguales

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	4	5.89546E+14	1.47386E+14	64.57	0.000
Error	10	2.28244E+13	2.28244E+12		
Total	14	6.12370E+14			

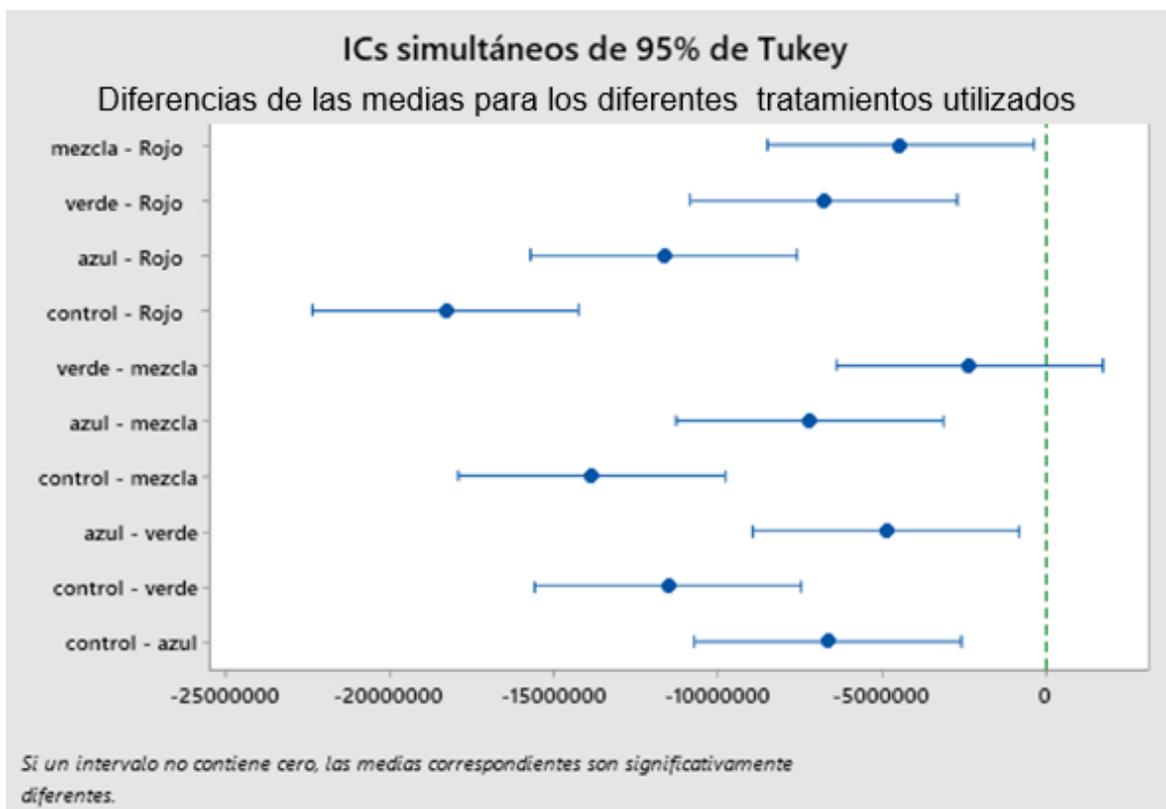


Figura 25. Prueba de Tukey para análisis de fluorescencia. Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes. Por lo que los únicos tratamientos estadísticamente similares son el de FBM con luz verde y FBM con mezcla de luces.

Tabla 13. Análisis por método de Tukey a resultados de fluorescencia. Se realiza una agrupación mostrando las categorías de eficacia del tratamiento. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Factor	N	Media	Agrupación	
Rojo	3	52987667	A	
mezcla	3	48563333	B	
verde	3	46224333	B	
azul	3	41361333		C
control	3	34727000		D

4.4 Resultados de *S. cerevisiae*

Se presentan los resultados para cada tratamiento de FBM realizado para *S. cerevisiae* y evaluando a través de UFC. En la Figura 26 se observan las repeticiones del tratamiento de FBM utilizando una mezcla de luces roja ($1\text{J}/\text{cm}^2$), verde ($1\text{J}/\text{cm}^2$), azul ($.3\text{J}/\text{cm}^2$). Se obtuvo que los resultados que presentaron el mayor incremento en el tamaño de UFC fue el de la terapia con mezcla de luces, siendo estas 160% mayores que el control. Mientras que en la Figura 27 se muestran los resultados de la FBM utilizando luz azul, esta resultó ser la terapia que generó el menor crecimiento en las UFC, teniendo solamente un 16% de crecimiento respecto al control. Del mismo modo, en la Figura 28 se presentan los resultados del tratamiento de FBM con luz roja siendo esta de 35% mayores que el control, y en la Figura 29 el de la luz verde que generó un crecimiento del 23% respecto al control (Figura 30).

Después de realizar el análisis de las imágenes, en la Figura 31, se muestran los resultados graficados del promedio de tamaño en mm^2 de cada una de las repeticiones de un mismo tratamiento. Los resultados para cada uno de los tratamientos comparados entre ellos arrojaron que no existen diferencias significativas. Por lo que se pudieron agrupar los datos y obtener la media para cada tratamiento como se observa en la Figura 32.

Estos valores fueron comparados con el análisis ANOVA mostrado en la Tabla 14, para determinar si las medias son estadísticamente diferentes. Se observa que el valor p es inferior al nivel de significancia de 0.5, por lo que se concluye que no todas las medias son estadísticamente similares, así que se procede a realizar en análisis de Tukey, el cual se muestra en la Figura 33 y en la Tabla 15. Se determina que la FBM que generó el mayor incremento en el tamaño de las UFC fue sin lugar a duda la terapia de mezcla de luces. Seguida por FBM con luz roja, luego la de luz verde y finalmente la de luz azul

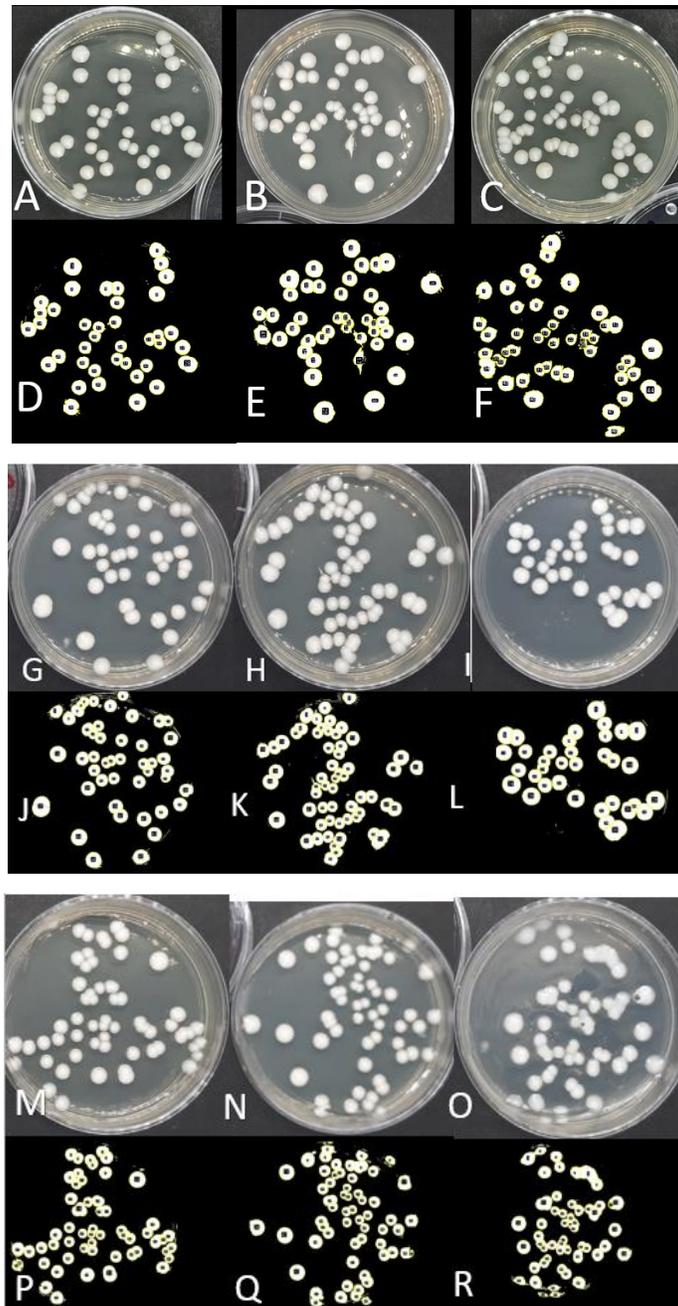


Figura 26. FBM en cepas de *S. cerevisiae* utilizando mezcla de luces roja (1 J/cm^2) verde (1 J/cm^2) azul (0.3 J/cm^2). A), B), C) Primera, segunda y tercera repetición del primer experimento. D), E), F) Cuantificación de UFC y cálculo del tamaño de cada UFC respectivamente. G), H), I) Primera, segunda y tercera repetición del segundo experimento. J), K), L) Cuantificación de UFC y cálculo del tamaño de cada UFC respectivamente. M), N), O) Primera, segunda y tercera repetición del tercer experimento. P), Q), R) Cuantificación de UFC y cálculo del tamaño de cada UFC respectivamente

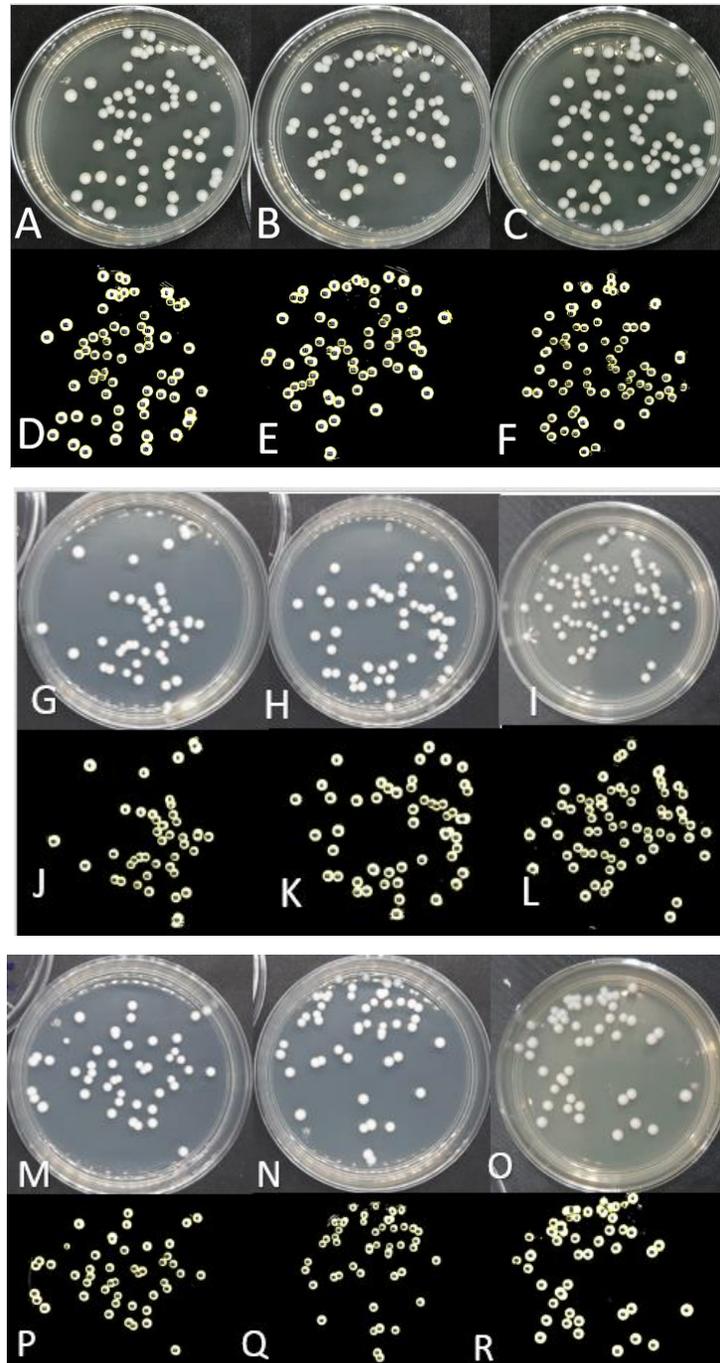


Figura 27. FBM en cepas de *S. cerevisiae* utilizando luz azul con dosis de 0.3 J/cm^2 . A), B), C) Primera, segunda y tercera repetición del primer experimento. D), E), F) Cuantificación de UFC y cálculo del tamaño de cada UFC respectivamente. G), H), I) Primera, segunda y tercera repetición del segundo experimento. J), K), L) Cuantificación de UFC y cálculo del tamaño de cada UFC respectivamente. M), N), O) Primera, segunda y tercera repetición del tercer experimento. P), Q), R) Cuantificación de UFC y cálculo del tamaño de cada UFC respectivamente

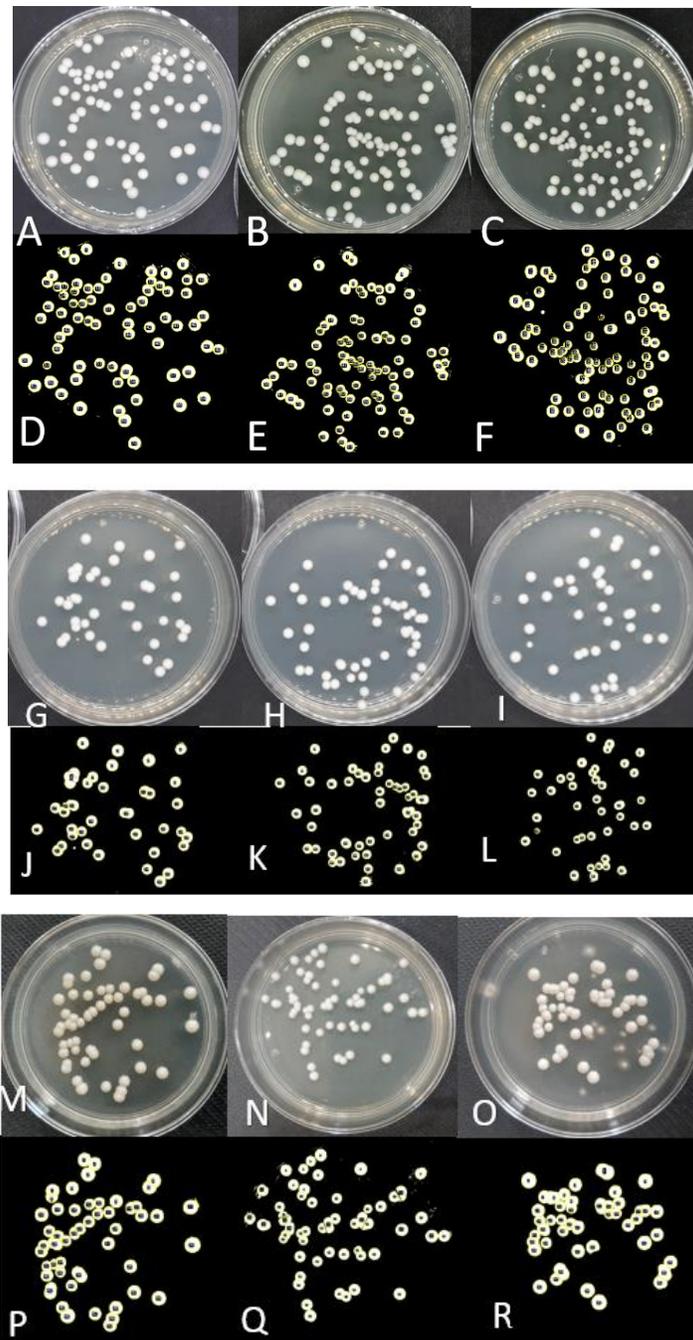


Figura 28. FBM en cepas de *S. cerevisiae* utilizando luz roja con dosis de 1 J/cm^2 . A), B), C) Primera, segunda y tercera repetición del primer experimento. D), E), F) Cuantificación de UFC y cálculo del tamaño de cada UFC respectivamente. G), H), I) Primera, segunda y tercera repetición del segundo experimento. J), K), L) Cuantificación de UFC y cálculo del tamaño de cada UFC respectivamente. M), N), O) Primera, segunda y tercera repetición del tercer experimento. P), Q), R) Cuantificación de UFC y cálculo del tamaño cada UFC respectivamente

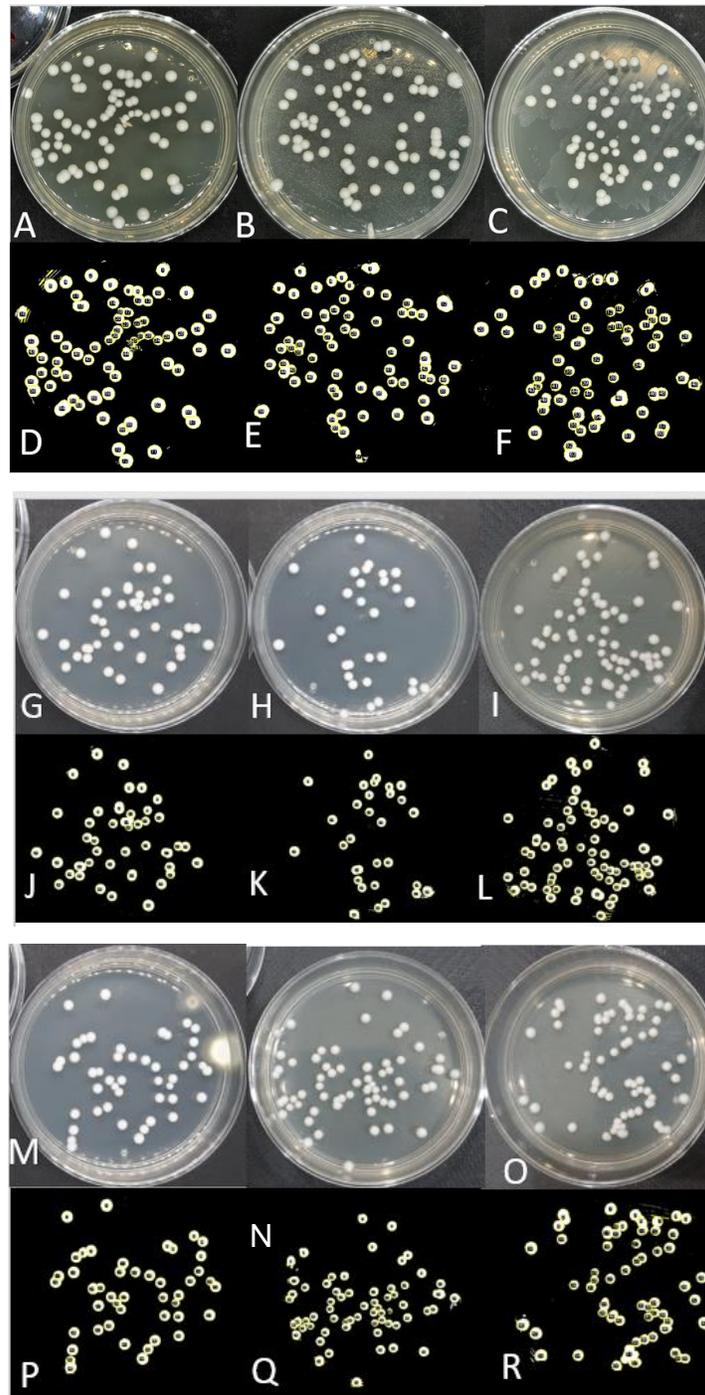


Figura 29. FBM en cepas de *S. cerevisiae* utilizando luz verde con dosis de 1 J/cm^2 . A), B), C) Primera, segunda y tercera repetición del primer experimento. D), E), F) Cuantificación de UFC y cálculo del tamaño de cada UFC respectivamente. G), H), I) Primera, segunda y tercera repetición del segundo experimento. J), K), L) Cuantificación de UFC y cálculo del tamaño de cada UFC respectivamente. M), N), O) Primera, segunda y tercera repetición del tercer experimento. P), Q), R) Cuantificación de UFC y cálculo del tamaño de cada UFC respectivamente

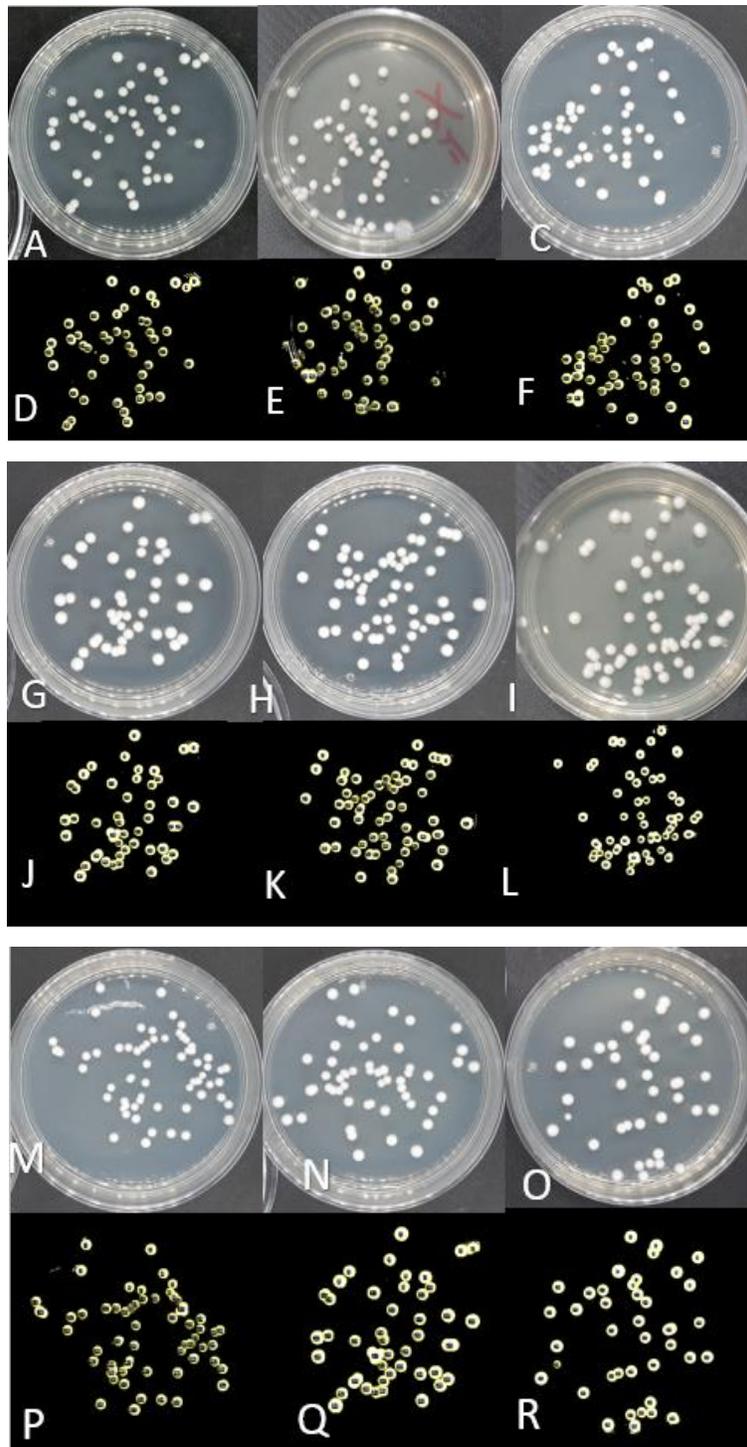


Figura 30. Control de cepas de *S. cerevisiae*. A), B), C) Primera, segunda y tercera repetición. D), E), F) Cuantificación de UFC y cálculo del tamaño de cada UFC respectivamente. G), H), I) Primera, segunda y tercera repetición del segundo experimento. J), K), L) Cuantificación de UFC y cálculo del tamaño de cada UFC respectivamente. M), N), O) Primera, segunda y tercera repetición del tercer experimento. P), Q), R) Cuantificación de UFC y cálculo del tamaño de cada UFC respectivamente

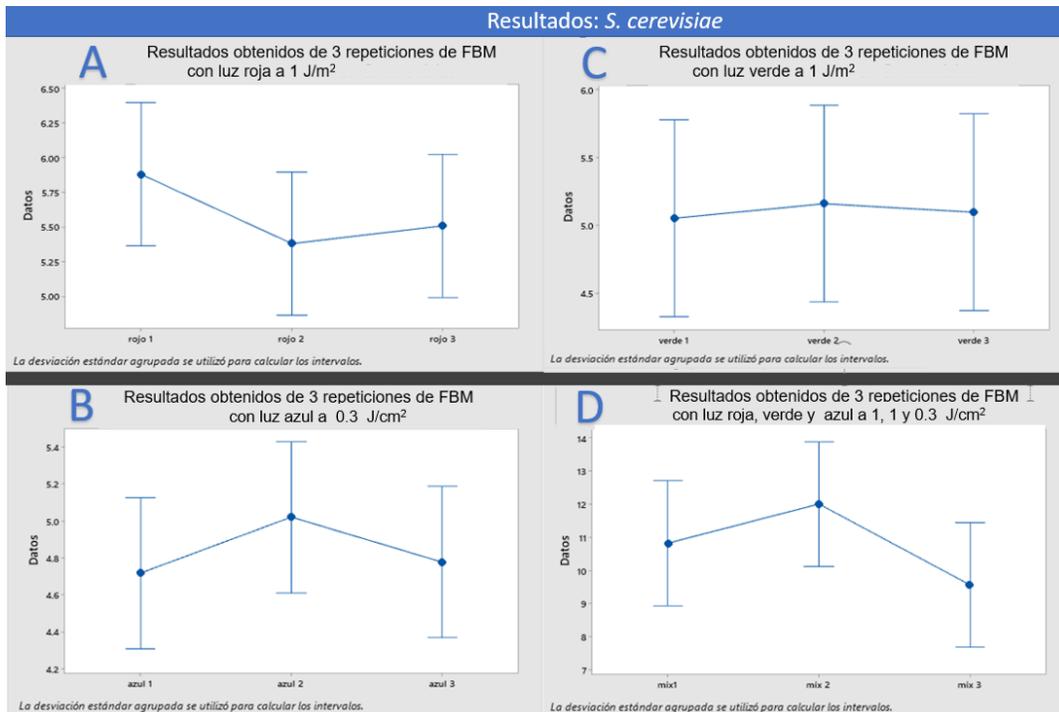


Figura 31. Gráfica mostrando las medias de crecimiento en mm² de los valores obtenidos al realizar tratamientos de FBM A) roja con dosis de 1 J/cm² B) azul con dosis de 0.3 J/cm². C) verde con dosis de 1 J/cm². D) mezcla de luces con dosis de 1 J/cm² para la roja y verde, y .3 J/cm² para la luz azul. Escala vertical en mm²

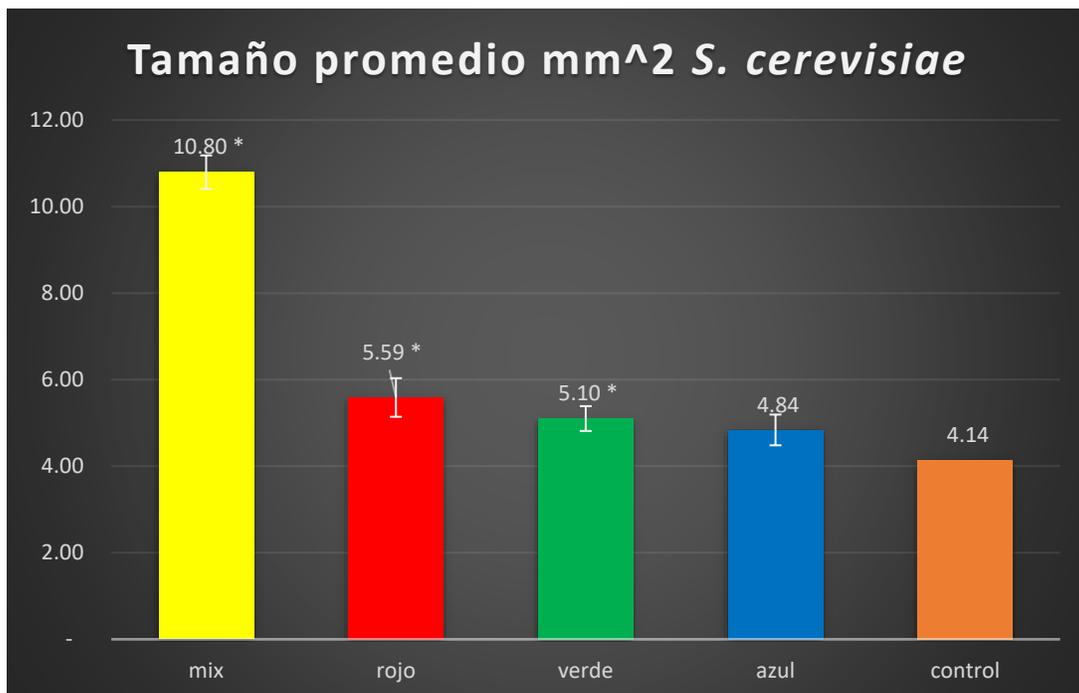


Figura 32. Tamaño promedio de las UFC de *S. cerevisiae* posteriormente a los tratamientos señalados.

Tabla 14. Análisis de varianza de medias de tamaño de *S. cerevisiae* post tratamiento

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	4	258.51	64.6267	107.22	0.000
Error	40	24.11	0.6028		
Total	44	282.62			

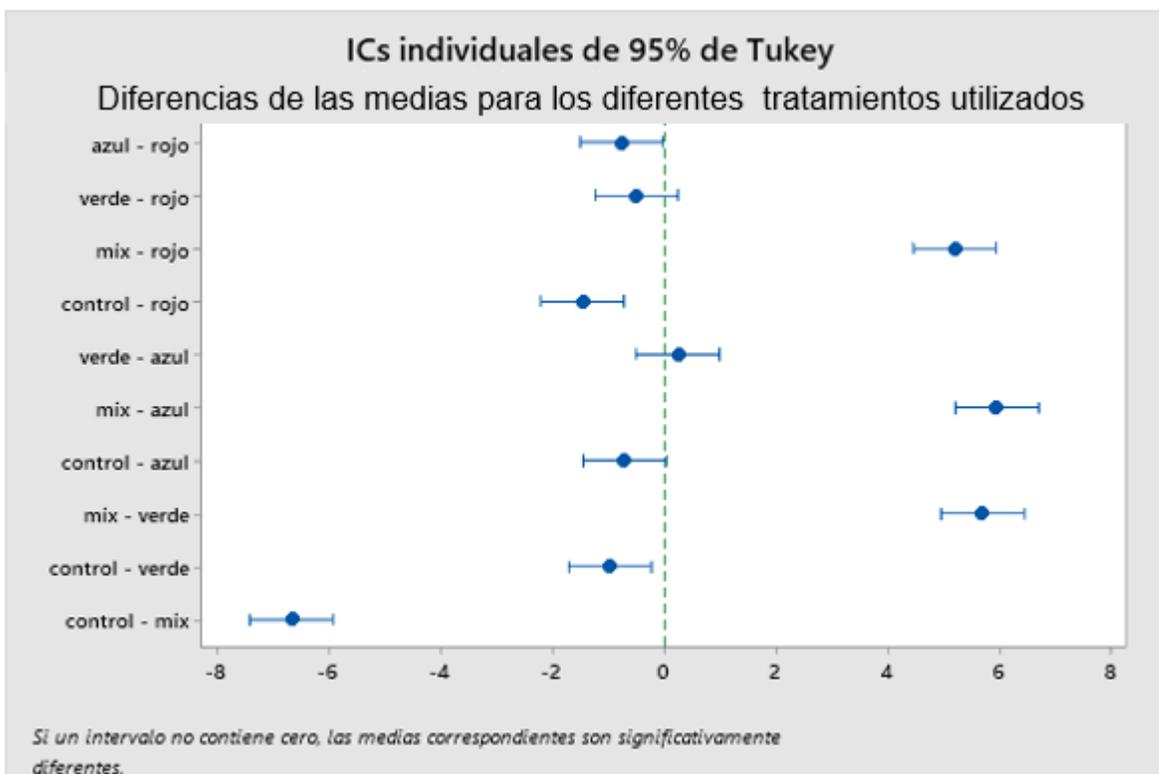


Imagen 33. Prueba de Tukey para análisis de las medias de tamaños de UFC de *S. cerevisiae* después de los tratamientos. Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes. Por lo que los únicos tratamientos estadísticamente similares son el de FBM con luz verde y FBM con mezcla de luces.

Tabla 15. Comparación en parejas de Tukey de las medias del tamaño de UFC de *S. cerevisiae* post tratamiento. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Factor	N	Media	Agrupación		
Mixta 3R 3V .3A	9	10.795	A		
rojo	9	5.588	B		
verde	9	5.102	B	C	
azul	9	4.8381		C	D
control	9	4.144			D

Capítulo 5.

5. Discusión.

Uno de los resultados más significativos de esta investigación fue el resultado obtenido en el caso de la *E. coli* secretora de GFP, ya que como se observa en las Figuras 21 y 25, Se detectó que la FBM utilizando luz roja con una dosis de $1\text{J}/\text{cm}^2$ resultó tener los mejores resultados tanto en proliferación celular promoviendo una proliferación de UFC 69% superior al control , así como en síntesis de GFP 52% mayor al control , este resultado era de esperarse ya que como lo menciona Trushin¹⁰¹ la luz roja e IRC de baja intensidad estimula el crecimiento de la bacteria *E. coli* , además Karu ²⁴ discutió varios mecanismos que pueden ser responsables del efecto estimulante de la luz sobre las células de *E. coli* , donde se menciona la foto excitación de ciertos centros de reacción en los complejos cyt bd y bo de *E. coli*.

Se sabe que la radiación de diferentes longitudes de onda puede inducir varios cambios físicos y químicos en foto aceptores y los componentes de las vías de las cadenas respiratorias, modificando así la homeostasis celular¹⁰². El Desplazamiento foto inducido del estado redox de las células hacia la oxidación estimula su actividad metabólica, mientras que el cambio hacia la reducción lo inhibe¹⁰¹. En particular, la luz roja e IRC cambia el estado redox de las células hacia la oxidación y mejora la síntesis de ATP y ADN ^{97,103}. Esto puede explicar la estimulación del crecimiento de las células y mejora de la síntesis de GFP en las células observadas en los experimentos. Estos resultados coinciden con lo reportado por Karu¹⁰⁴ donde se informa que el láser He-Ne rojo aumenta la síntesis de proteínas celulares totales.

Del mismo modo, también se observan incrementos significativos con respecto al control en todos los otros tratamientos, esto está respaldado con lo observado por Tiphlova²³ que cuando se irradia a 404, 454, 530, 619 nm las células comienzan a dividirse más rápidamente, se sugiere que los componentes de la cadena respiratoria de la bacteria, como las deshidrogenasas y el cyt d, podrían ser los foto aceptores implicados. Se cree que el efecto de estimulación del crecimiento se debe a la capacidad de la cadena respiratoria activada por irradiación para producir el

gradiente de pH necesario más rápidamente, lo que permite que las células comiencen a dividirse ¹⁰³.

Al centrarse en los resultados obtenidos con la FBM con luz verde en *B. subtilis* se observa que difiere con los obtenidos en la FBM con luz verde en *E. coli*. Se cree que estos resultados se deben a que una gran parte de los citocromos de esta bacteria, como lo son: cyt caa 3, cyt aa 3 cyt b-558/sdh cyt b-558/cta cyt c-550 (13 kDa) tienen un pico de absorción justamente en el rango de 510-560 nm¹⁰⁵, esto podría explicar el alto índice de proliferación al utilizar esta terapia. Sin embargo, se menciona que aún existen muchas incógnitas con respecto a los cromóforos bacterianos y las funciones de estos. De aquí la importancia de poder realizar análisis más detallados de todas las proteínas involucradas en el proceso de FBM.

En el caso de los resultados de la FBM con luz mixta, se ha reportado que la exposición a láser de baja potencia de longitud de onda dual (radiación secuencial o simultánea) es capaz de inducir efectos biológicos, que difieren de los inducidos por cada radiación láser sola, lo que sugiere que otros efectos terapéuticos podrían obtenerse utilizando irradiación láser de baja potencia de longitud de onda dual o de longitud de onda múltiple^{106,107}. Los resultados obtenidos con la FBM con luz mixta en las bacterias estudiadas (*E. coli*, *B. subtilis*) demostraron que esta terapia resultó menos estimulante a comparación de la luz roja, tanto en proliferación como en generación de proteínas. Por lo que suponemos que pudiera deberse a un proceso de saturación en los cromóforos¹⁰² ya que no se observan diferencias significativas a comparación de la luz verde. Inicialmente se realizó la hipótesis en la que se creía que habría una suma en las respuestas estimulantes como ocurre en el caso de la terapia mixta con *S. cerevisiae*.

Analizando estos resultados en las levaduras, se puede mencionar que existe una gran diferencia con respecto al efecto de la FBM sobre las bacterias ya que se observa que la terapia con mayor eficiencia resultó ser la mixta, los diferentes comportamientos podrían deberse a que las levaduras son un organismo de mayor complejidad a comparación de las bacterias^{55,56} cuentan con mayor cantidad de cromóforos membranales e internos, y teniendo mayor importancia la cadena

transportadora de electrones mencionada en el capítulo 2.12, esta cadena es encontrada en la mitocondria y forma parte del proceso central de la generación de energía celular⁵⁷.

Sin embargo, estos no son los únicos cromóforos, también se sabe que se encuentran involucrados los canales del potencial receptor transitorio (TRP)¹⁰², estos son sensores celulares pleiotrópicos que median la respuesta a una amplia gama de estímulos externos (calor, frío, presión, gusto, olfato) e implicados en muchos procesos celulares diferentes¹⁰⁸. Se propone que la luz azul (en la región de 420 nm) o la luz verde en la región de 540 nm pueden activar opsinas como la melanopsina (OPN5) mediante una isomerización retiniana cis-trans. La activación de OPN5 puede, a su vez, abrir los canales iónicos de calcio de TRPV a través de la señalización de GαQ, fosfolipasa C y fosfoinositida. Se sabe que la activación de las opsinas retinianas por la luz azul puede generar ROS y desencadenar los procesos metabólicos mencionados anteriormente¹⁰⁹⁻¹¹¹.

Observando los resultados, se nota que la FBM menos efectiva fue la de la luz azul, ya que en el caso de los *B. subtilis* solo promovió un 20% de crecimiento respecto al control, y en las *E. coli* fue de 32%, mientras que para las levaduras *S. cerevisiae* solamente se promovió un 16% de crecimiento.

Esto podría justificarse con los resultados obtenidos de Wang¹¹² donde se menciona que la luz azul en el espectro de 400 a 470 nm ha demostrado sus propiedades antimicrobianas intrínsecas como resultado de la presencia de cromóforos foto sensibilizantes endógenos en microbios. Sin embargo, en la mayoría de los experimentos de esta índole, las dosis utilizadas son letales superando los 30J/cm². Como se mencionó en el capítulo 2.9 la dosis juega un papel importante a la hora de determinar los efectos de la FBM⁶³, es por eso que para cada experimento es preciso realizar una comparativa empleando diferentes dosis, para poder determinar las respuestas idóneas y poder obtener una gráfica de respuesta bifásica correspondiente a la cepa y el dispositivo que se está utilizando.

La relevancia en la biología de esta propiedad es de suma importancia porque hasta que no se estudien suficientes variaciones de dosis y longitud de onda, puede ser

difícil saber si realmente nos encontramos en el rango de dosis óptima. Además, plantea la pregunta de que si hay un punto en el que la misma dosis efectiva y el mismo momento lograrán una respuesta de proliferación máxima y luego comenzarán a causar una respuesta inhibitoria. Hasta ahora, la mayoría de los ensayos realizados en esta investigación se encuentran como modelo para poder promover la generación de proteínas recombinantes y biofármacos, sin embargo, aún son muy pocos los trabajos que se han elaborado en esta área y se desconoce si al realizar esta terapia de FBM alguna de las proteínas generadas sufra cambios significativos y no funcionen de la manera óptima.

De aquí la importancia de esta investigación, ya que se plantean bases del efecto de la FBM con diferentes longitudes de onda sobre microorganismos modelo de bacterias Gram positivo, Gram negativo y de levaduras. Además, puede abrir las puertas a trabajos futuros en los que se podrían utilizar cepas con la capacidad de secretar proteínas y biofármacos.

Aunque el mecanismo subyacente de la FBM todavía no está completamente entendido, los estudios *in vitro* realizados en este trabajo han tendido a indicar que la FBM con luz roja, verde y azul puede mejorar la proliferación celular.

Ciertamente parece ser el caso de que todas las cepas irradiadas en esta investigación pueden responder a intervenciones de tipo FBM de una forma u otra. La razón de esto es probablemente que todas las formas de vida dependen de los citocromos para una gran parte de sus funciones y la mayoría de ellas contienen una cadena respiratoria en las mitocondrias o en la membrana plasmática en el caso de las bacterias.

Durante la elaboración de esta investigación pudimos darnos cuenta de que existe una falta casi total de estudios de FBM en células bacterianas o fúngicas. La explicación obvia es que gran parte de las investigaciones están orientadas a la FBM para promoción de la cicatrización de heridas en tejidos en organismos *in vivo*, por lo que las dosis utilizadas son superiores a las presentadas en esta investigación. Sin embargo, existe información relevante que demuestra el efecto

proliferativo de los microorganismos y la promoción de la síntesis de proteínas utilizando dosis bajas.

Cabe recalcar que con respecto a la irradiación de bacterias y hongos por FBM, a pesar de la cantidad de artículos publicados, no se ha investigado mucho sobre los mecanismos moleculares involucrados ¹¹. Teniendo en cuenta la amplia gama de microorganismos bacterianos o fúngicos secretores de biofármacos, esta parece ser una oportunidad perdida.

Aunque gran parte de la industria farmacéutica está basada en la generación de biofármacos resulta increíble que no se encuentre casi ninguna investigación relacionada a la FBM, teniendo en cuenta los resultados presentados durante esta investigación parecería que podría ser una oportunidad de suma importancia para el crecimiento de las empresas relacionadas con el área de la farmacéutica.

Capítulo 6.

6. Conclusión

Finalmente, a manera de conclusión se recalcan los siguientes puntos:

- El tiempo de crecimiento óptimo para poder observar cambios significativos en las cepas bacterianas fueron 24 horas después del tratamiento, mientras que para las levaduras fue de 72 horas después del tratamiento.
- Se determinó que los mejores resultados para cada FBM fueron: luz roja (630 nm) 1 J/cm², luz verde (520 nm) 1 J/cm², luz azul (450 nm) .3 J/cm².
- La FBM generó resultados favorables en *B. subtilis* siendo la FBM con luz roja y verde las que promovieron la mayor proliferación respecto al control, (69.77% y 65.25% respectivamente)
- La FBM generó resultados favorables en *E. coli* siendo la luz roja la que promovió el mejor resultado, siendo este 69.36% mayor respecto al control
- LA FBM con luz roja fue la que más promovió el incremento de la proteína GFP producida por *E. coli* respecto al control, generando un incremento de

52.73%, mientras que la mezcla de luces, verde y azul promovieron un 40.05%, 33.14% y 19.3% respecto al control.

- La FBM generó resultados favorables en *S. cerevisiae* siendo la mezcla de luces la que promovió el mayor tamaño promedio de UFC siendo este de 160% respecto al control, mientras que las luces roja, verde y azul incrementaron el tamaño un 35%, 23% y 16% respectivamente.

6.1 Trabajo a futuro

- Hacer un análisis molecular, para poder determinar los cromóforos endógenos relacionados con los tratamientos de FBM
- Realizar terapias de FBM en cepas capaces de producir biofármacos y cuantificarlas
- Emplear FBM en otros organismos modelo (con el fin de observar crecimiento celular y secreción de proteínas), como lo pueden ser: hongos, plantas, células de fibroblastos y ratones.

7. Referencias

1. Hessen D. Solar radiation and the evolution of life. *Solar Radiation and Human Health*. Published online 2008.
2. Hamblin MR. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochemistry and Photobiology*. 2018;94(2). doi:10.1111/php.12864
3. Nair R, Maseeh A. Vitamin D: The “sunshine” vitamin. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*. Published online 2012:118-126.
4. MgGuff PE, Deterling RA, Gottlieb LS. Tumoricidal Effect of Laser Energy on Experimental and Human Malignant Tumors. *New England Journal of Medicine*. 1965;273(9). doi:10.1056/NEJM196508262730906
5. Mester E, Szende B, Gärtner P. The effect of laser beams on the growth of hair in mice. *Radiobiol Radiother* . 1968;9(5):621-undefined.
6. Mester E, Ludany G, Selyei M, Szende B. The stimulating effect of low power laser rays on biological systems. *Medical Univ, Budapest*. Published online 1968.
7. Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-Level Light/Laser Therapy Versus Photobiomodulation Therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2015;33(4). doi:10.1089/pho.2015.9848
8. Karu T. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser irradiation. *Dokl Akad Nauk SSSR*. Published online 1986:1245-1249.
9. Karu TI. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. *IUBMB Life*. 2010;62(8). doi:10.1002/iub.359
10. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang Y-Y, Carroll JD, Hamblin MR. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Annals of Biomedical Engineering*. 2012;40(2). doi:10.1007/s10439-011-0454-7
11. Hamblin MR. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochemistry and Photobiology*. 2018;94(2). doi:10.1111/php.12864
12. Jerônimo R, Moraes MN, de Assis LVM, Ramos BC, Rocha T, Castrucci AM de L. Thermal stress in *Danio rerio* : a link between temperature, light, thermo-TRP channels, and clock genes. *Journal of Thermal Biology*. 2017;68. doi:10.1016/j.jtherbio.2017.02.009

13. Wang Y, Huang Y-Y, Wang Y, Lyu P, Hamblin MR. Photobiomodulation (blue and green light) encourages osteoblastic-differentiation of human adipose-derived stem cells: role of intracellular calcium and light-gated ion channels. *Scientific Reports*. 2016;6(1). doi:10.1038/srep33719
14. Wang Y, Huang Y-Y, Wang Y, Lyu P, Hamblin MR. Red (660 nm) or near-infrared (810 nm) photobiomodulation stimulates, while blue (415 nm), green (540 nm) light inhibits proliferation in human adipose-derived stem cells. *Scientific Reports*. 2017;7(1). doi:10.1038/s41598-017-07525-w
15. Chai B, Yoo H, Pollack GH. Effect of Radiant Energy on Near-Surface Water. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2009;113(42). doi:10.1021/jp908163w
16. Hamblin M, de Sousa M. *Handbook of Low-Level Laser Therapy*. (Hamblin MR, Agrawal T, de Sousa M, eds.). Jenny Stanford Publishing; 2016. doi:10.1201/9781315364827
17. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers in Medical Science*. 2012;27(1). doi:10.1007/s10103-011-0885-2
18. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2007;39(4). doi:10.1002/lsm.20492
19. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2005;36(1). doi:10.1002/lsm.20117
20. Almeida-Lopes L, Rigau J, Amaro Zângaro R, Guidugli-Neto J, Marques Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence*. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2001;29(2). doi:10.1002/lsm.1107
21. Oron U, Ilic S, de Taboada L, Streeter J. Ga-As (808 nm) Laser Irradiation Enhances ATP Production in Human Neuronal Cells in Culture. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2007;25(3). doi:10.1089/pho.2007.2064
22. Benedicenti S, Pepe IM, Angiero F, Benedicenti A. Intracellular ATP Level Increases in Lymphocytes Irradiated with Infrared Laser Light of Wavelength 904 nm. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2008;26(5). doi:10.1089/pho.2007.2218
23. Tiphlova O, Karu T. STIMULATION OF Escherichia coli DIVISION BY LOW-INTENSITY MONOCHROMATIC VISIBLE LIGHT. *Photochemistry and Photobiology*. 1988;48(4). doi:10.1111/j.1751-1097.1988.tb02847.x

24. Karu T, Lyapunova N. The activation of yeast metabolism with He.-Ne laser radiation. IV. Relationship between the activity of catalase and protein synthesis. *Lasers Life Science*. 1993;5:251-258.
25. Nussbaum EL, Lilge L, Mazzulli T. Effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) of 810 nm upon *in Vitro* Growth of Bacteria: Relevance of Irradiance and Radiant Exposure. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. 2003;21(5). doi:10.1089/104454703322564497
26. Lima AMCT, da Silva Sergio LP, de Souza da Fonseca A. Photobiomodulation via multiple-wavelength radiations. *Lasers in Medical Science*. 2020;35(2). doi:10.1007/s10103-019-02879-1
27. Hamblin MR. Photobiomodulation or low-level laser therapy. *Journal of Biophotonics*. 2016;9(11-12). doi:10.1002/jbio.201670113
28. B Cotler H. The Use of Low Level Laser Therapy (LLLT) For Musculoskeletal Pain. *MOJ Orthopedics & Rheumatology*. 2015;2(5). doi:10.15406/mojor.2015.02.00068
29. Hamblin MR, Huang Y-Y, Heiskanen V. Non-mammalian Hosts and Photobiomodulation: Do All Life-forms Respond to Light? *Photochemistry and Photobiology*. 2019;95(1). doi:10.1111/php.12951
30. Matar P. Biofármacos y biosimilares - Riesgos y desafíos en los nuevos desarrollos. *Hematología*. 2008;12:57-59.
31. López M, Suarez F. Los microorganismos como elementos clave de la bioeconomía. . *Universidad de Almería*. Published online 2018.
32. Nielsen J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast. *Bioengineered*. 2013;4(4). doi:10.4161/bioe.22856
33. Berlec A, Štrukelj B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli* , yeasts and mammalian cells. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2013;40(3-4). doi:10.1007/s10295-013-1235-0
34. Ferrer-Miralles N, Domingo-Espín J, Corchero J, Vázquez E, Villaverde A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories*. 2009;8(1). doi:10.1186/1475-2859-8-17
35. Martínez JL, Liu L, Petranovic D, Nielsen J. Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012;23(6). doi:10.1016/j.copbio.2012.03.011
36. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology*. 2018;36(12). doi:10.1038/nbt.4305

37. Leonelli S, Ankeny RA. What makes a model organism? *Endeavour*. 2013;37(4). doi:10.1016/j.endeavour.2013.06.001
38. National Institutes of Health. Model organisms for biomedical research. Bethesda.
39. Altmann K, Dürr M, Westermann B. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism to Study Mitochondrial Biology. In: ; 2007. doi:10.1007/978-1-59745-365-3_6
40. Karathia H, Vilaprinyo E, Sorribas A, Alves R. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *PLoS ONE*. 2011;6(2). doi:10.1371/journal.pone.0016015
41. Kubitschek HE. Cell volume increase in *Escherichia coli* after shifts to richer media. *Journal of Bacteriology*. 1990;172(1). doi:10.1128/jb.172.1.94-101.1990
42. Self-adaptive Bacterial Foraging Optimization Algorithm Based On Evolution Strategies. *Revista Tecnica De La Facultad De Ingenieria Universidad Del Zulia*. Published online November 25, 2016. doi:10.21311/001.39.8.43
43. Russo E. Special Report: The birth of biotechnology. *Nature*. 2003;421(6921). doi:10.1038/nj6921-456a
44. Cornelis P. Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Current Opinion in Biotechnology*. 2000;11(5). doi:10.1016/S0958-1669(00)00131-2
45. Tof I. Recombinant DNA Technology in the Synthesis of Human Insulin. *Little Tree Pty Ltd*. Published online 1994.
46. Weber JT. Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols. 2nd Edition Edited by M. Chalfie (Columbia University) and S. R. Kain (Agilent Technologies). Wiley-Interscience, Hoboken. 2006. xv + 443 pp. 7 x 10 in. \$89.95. ISBN 0-471-73682-1. *Journal of Natural Products*. 2007;70(1). doi:10.1021/np068247i
47. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W, Prasher D. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994;263(5148). doi:10.1126/science.8303295
48. Batt C, Tortorello M. Food Microbiology . In: *Encyclopedia of Food Microbiology* . Second Edition. Academic Press; 2014:309-315.
49. Galibert F, Alexandraki D, Baur A, Boles E, Chalwatzis N. Complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X. *EMBO J*. Published online 1996:2031-2049.

50. Gaillardin C, Helslot H. La levure. *La Recherche*. Published online 1987:586-596.
51. Báez J. Colorimetría. In: *Coordinación de Óptica*. ; 2014:1-4.
52. Valenzuela. D. Espectro Electromagnético. Published online 2017.
53. Horst Frank J. Electromagnetic spectrum. *Wikipedia*.
54. Wikimedia. EM Spectrum Properties. *Wikipedia*.
55. Hamblin MR, Demidova-Rice TN. Cellular chromophores and signaling in low level light therapy. In: Hamblin MR, Waynant RW, Anders J, eds. ; 2007. doi:10.1117/12.712885
56. Hamblin MR, Demidova TN. Mechanisms of low level light therapy. In: Hamblin MR, Waynant RW, Anders J, eds. ; 2006. doi:10.1117/12.646294
57. Brown GC. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Letters*. 1995;369(2-3). doi:10.1016/0014-5793(95)00763-Y
58. Schulz H. Über die Theorie der Arzneimittelwirkung. *Virchows Archiv* . 1877;108:423-434.
59. Schulz H. Über Hefegiste. *Archiv Gesamte Physiologie* . 1888;42:517-541.
60. Martius F. Das Amdt-Schulz Grandgesetz. *Munch Med Wschr* . 1923;70:1005-1006.
61. Sommer AP, Pinheiro ALB, Mester AR, Franke R-P, Whelan HT. Biostimulatory Windows in Low-Intensity Laser Activation: Lasers, Scanners, and NASA's Light-Emitting Diode Array System. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. 2001;19(1). doi:10.1089/104454701750066910
62. Huang Y-Y, Chen AC-H, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy. *Dose-Response*. 2009;7(4). doi:10.2203/dose-response.09-027.Hamblin
63. Keene SA. The Science of Light Biostimulation and Low Level Laser Therapy (LLLT). *International Society of Hair Restoration Surgery*. 2014;24(6). doi:10.33589/24.6.0201
64. Lane N. Power games. *Nature*. 2006;443(7114). doi:10.1038/443901a
65. Karu TI, Kolyakov SF. Exact Action Spectra for Cellular Responses Relevant to Phototherapy. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2005;23(4). doi:10.1089/pho.2005.23.355
66. Sun G, Tunér J. Low-level laser therapy in dentistry. *Dental Clinics of North America*. 2004;48(4). doi:10.1016/j.cden.2004.05.004

67. Friedman J, Nunnari J. Mitochondrial form and functions. *Nature*. 2014;505:335-343.
68. Amada A. *Biología Celular*.; 2009.
69. Lomelí A. Efecto de la estimulación láser de 650nm utilizando dosis de uso clínico sobre la proliferación de fibroblastos humanos cultivados. *Revista Mexicana de medicina física y rehabilitación*. 2003;15:69-71.
70. Vélez A, Arias D. Una mirada al estrés oxidativo en la célula. *Revista Médica de Risaralda*. 2012;18(2):145-154.
71. Bale G, Elwell CE, Tachtsidis I. From Jöbsis to the present day: a review of clinical near-infrared spectroscopy measurements of cerebral cytochrome-c-oxidase. *Journal of Biomedical Optics*. 2016;21(9). doi:10.1117/1.JBO.21.9.091307
72. Verhaeghe C, Lapage K, Moerman A. Quantitative assessment of cytochrome C oxidase patterns in muscle tissue by the use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in healthy volunteers. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*. Published online January 18, 2021. doi:10.1007/s10877-021-00648-6
73. Rye C, Wise R, Jurujovski V. *Biology*. Openstax; 2016.
74. García Montes de Oca LYJ, Chagolla-López A, González de la Vara L, Cabellos-Avelar T, Gómez-Lojero C, Gutiérrez Cirlos EB. The composition of the Bacillus subtilis aerobic respiratory chain supercomplexes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2012;44(4). doi:10.1007/s10863-012-9454-z
75. Lauraeus M, Wikström M. The terminal quinol oxidases of Bacillus subtilis have different energy conservation properties. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(15). doi:10.1016/S0021-9258(18)82147-0
76. Mansurova M, Scheercousse P, Simon J, Kluth M, Gärtner W. Chromophore Exchange in the Blue Light-Sensitive Photoreceptor YtvA from Bacillus subtilis. *ChemBioChem*. 2011;12(4). doi:10.1002/cbic.201000515
77. Gaidenko TA, Kim T-J, Weigel AL, Brody MS, Price CW. The Blue-Light Receptor YtvA Acts in the Environmental Stress Signaling Pathway of Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*. 2006;188(17). doi:10.1128/JB.00691-06
78. Karu TI, Tiphlova OA, Matveyets YuA, Yartsev AP, Letokhov VS. Comparison of the effects of visible femtosecond laser pulses and continuous wave laser radiation of low average intensity on the clonogenicity of Escherichia coli. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1991;10(4). doi:10.1016/1011-1344(91)80019-E

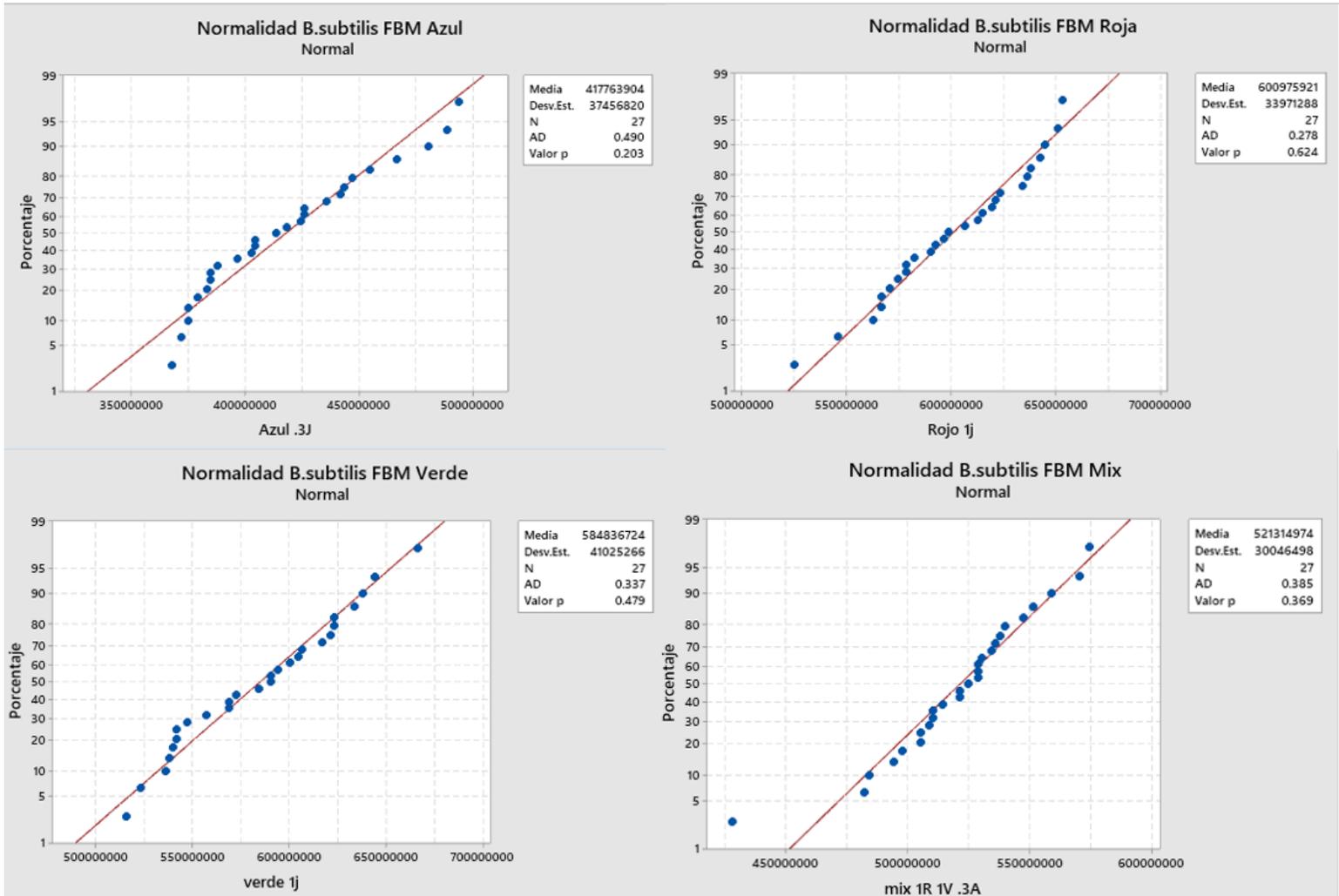
79. Dube A, Gupta P, Bharti S. Redox absorbance changes of the respiratory chain components of *E. coli* following He-Ne laser irradiation . *Laser Life Sci.* 1997;7:173-180.
80. Karu T. Laser Applications in Medicine and Surgery. *Plenum Press.* Published online 1992:225-258.
81. Karu T. Laser Systems in Photobiology and Photomedicine . *Plenum Press.* Published online 1991:88-113.
82. Friedmann H, Lubart R, Laulich I, Rochkind S. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 1991;11(1). doi:10.1016/1011-1344(91)80271-I
83. Crommelin DJA, Storm G, Verrijck R, de Leede L, Jiskoot W, Hennink WE. Shifting paradigms: biopharmaceuticals versus low molecular weight drugs. *International Journal of Pharmaceutics.* 2003;266(1-2). doi:10.1016/S0378-5173(03)00376-4
84. Thermal Products Solutions. What is Bio-Pharma and Why Is It Important to Our Future?
85. Micropia. Microbes in medicine.
86. Zawaira A, Pooran A, Barichievy S, Chopera D. A Discussion of Molecular Biology Methods for Protein Engineering. *Molecular Biotechnology.* 2012;51(1). doi:10.1007/s12033-011-9448-9
87. Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2008;7(1). doi:10.1038/nrd2399
88. Rosenfeld L. Insulin: Discovery and Controversy. *Clinical Chemistry.* 2002;48(12). doi:10.1093/clinchem/48.12.2270
89. Nuñez R. 1978: logran sintetizar la insulina humana. *Muy Interesante.* Published online 2018.
90. Garl R. Biosimilars: Reviewing US law and US/EU patents; bottom up model suggests 12 products and \$7-\$8B market by 2020. *Bernstein Research.* 2012.
91. Dezzani L. Top 25 Pharmaceutical Products in 2015.2015.
92. BIOPHARMA. Biopharmaceutical Products in the U.S. and European Markets. This is a list of new full FDA approvals for biopharmaceutical products (unless otherwise noted. Approvals.

93. Jozala AF, Gerald DC, Tundisi LL, et al. Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016;47. doi:10.1016/j.bjm.2016.10.007
94. Gronemeyer P, Ditz R, Strube J. Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. *Bioengineering*. 2014;1(4). doi:10.3390/bioengineering1040188
95. Schmidell W, Lima U. *Biotecnologia Industrial*. 1st ed. Engenharia Bioquímica; 2001.
96. Azevedo AM, Rosa PAJ, Ferreira IF, Aires-Barros MR. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. *Trends in Biotechnology*. 2009;27(4). doi:10.1016/j.tibtech.2009.01.004
97. Schmauder H-P. H. G. Schlegel, Allgemeine Mikrobiologie (6., überarbeitete Auflage). XIV — 571 S., 240 zum Teil zweifarbige Abb., 39 Tab. Stuttgart 1985. Georg Thieme Verlag. DM 34,00. ISBN 3-13-444606-5. *Journal of Basic Microbiology*. 1986;26(6). doi:10.1002/jobm.3620260621
98. Sen D. Efecto de la inactivación fotodinámica en la inhibición de biopelículas formadas por Candida . Published online 2021.
99. Goldman E, Green L. Microbiology. In: *Practical Handbook of Microbiology*. 2nd ed. ; 2008:864-undefined.
100. Sotoudeh M. *Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests.*; 2016.
101. Trushin M v. Microbiology. *Journal of Microbiology*. 2002;71(4). doi:10.1023/A:1019877023168
102. Karu T. Primary and Secondary Mechanisms of Action of Visible to Near-IR Radiation on Cells. *Journal of Photobiology*. 1999;49:1-17.
103. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1995;27(3). doi:10.1016/1011-1344(94)07078-3
104. Karu T. Activation of metabolism of nonphotosynthesizing microorganisms with monochromatic visible (laser) light: A critical review. *Laser in the life sciences*. 1996;7:11-34.
105. Hederstedt L. Molecular Biology of Bacillus subtilis Cytochromes anno 2020. *Biochemistry (Moscow)*. 2021;86(1). doi:10.1134/S0006297921010028
106. Thomé AMC, Souza BP, Mendes JPM, Soares LC, Trajano ETL, Fonseca AS. Dichromatic and monochromatic laser radiation effects on survival and morphology of *Pantoea agglomerans*. *Laser Physics*. 2017;27(5). doi:10.1088/1555-6611/aa637c

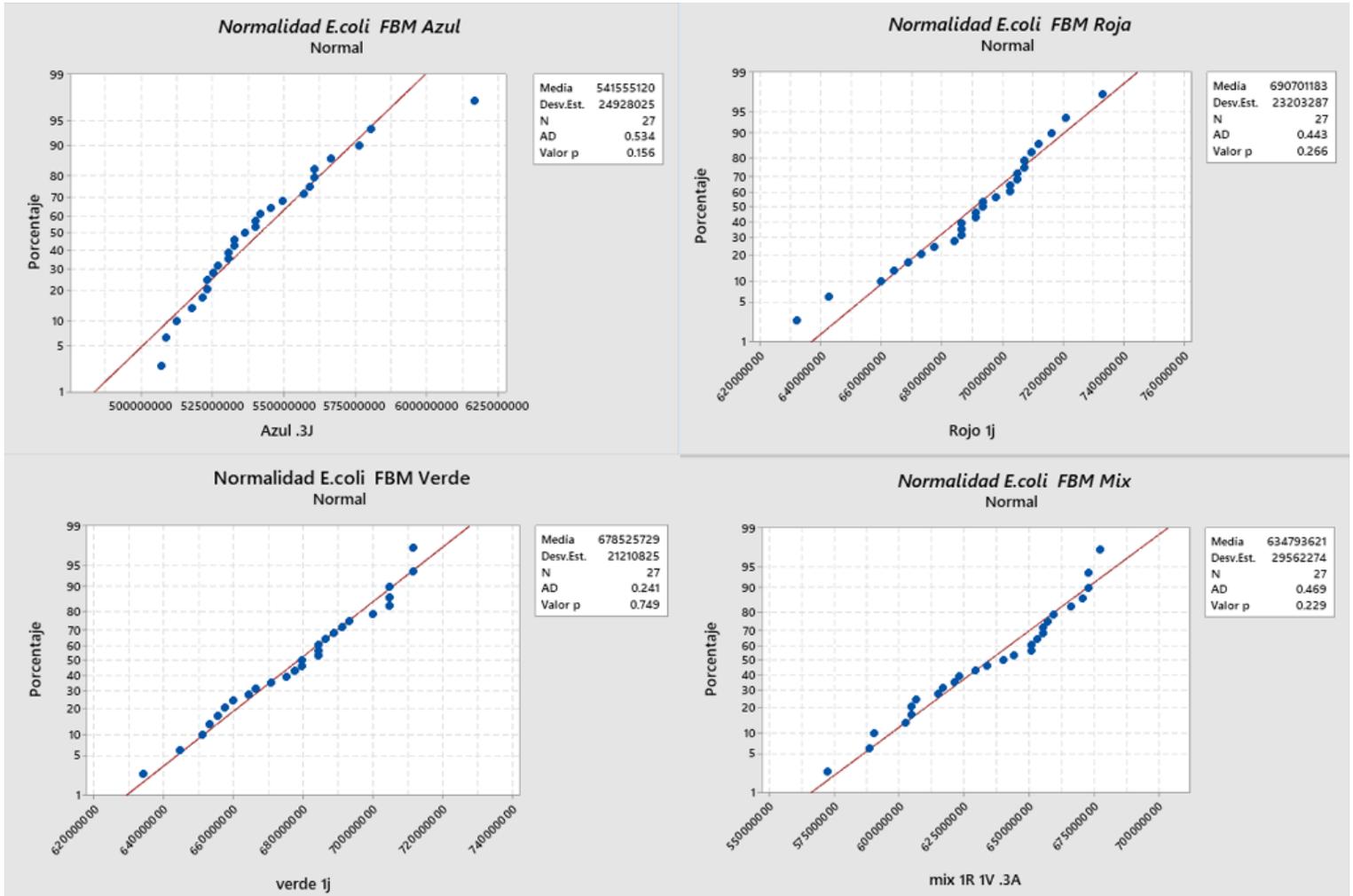
107. Martins WA, Polignano GAC, Guimarães OR, Geller M, Paoli F, Fonseca AS. Dichromatic laser radiation effects on DNA of *Escherichia coli* and plasmids. *Laser Physics*. 2015;25(4). doi:10.1088/1054-660X/25/4/045603
108. Caterina M, Pang Z. TRP Channels in Skin Biology and Pathophysiology. *Pharmaceuticals*. 2016;9(4). doi:10.3390/ph9040077
109. Mainster MA. Violet and blue light blocking intraocular lenses: photoprotection versus photoreception. *British Journal of Ophthalmology*. 2006;90(6). doi:10.1136/bjo.2005.086553
110. Diani-Moore S, Labitzke E, Brown R, Garvin A, Wong L, Rifkind AB. Sunlight Generates Multiple Tryptophan Photoproducts Eliciting High Efficacy CYP1A Induction in Chick Hepatocytes and In Vivo. *Toxicological Sciences*. 2006;90(1). doi:10.1093/toxsci/kfj065
111. Smirnova A, Wincent E, Vikström Bergander L, et al. Evidence for New Light-Independent Pathways for Generation of the Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Agonist FICZ. *Chemical Research in Toxicology*. 2016;29(1). doi:10.1021/acs.chemrestox.5b00416
112. Wang Y, Wang Y, Wang Y, et al. Antimicrobial blue light inactivation of pathogenic microbes: State of the art. *Drug Resistance Updates*. 2017;33-35. doi:10.1016/j.drug.2017.10.002

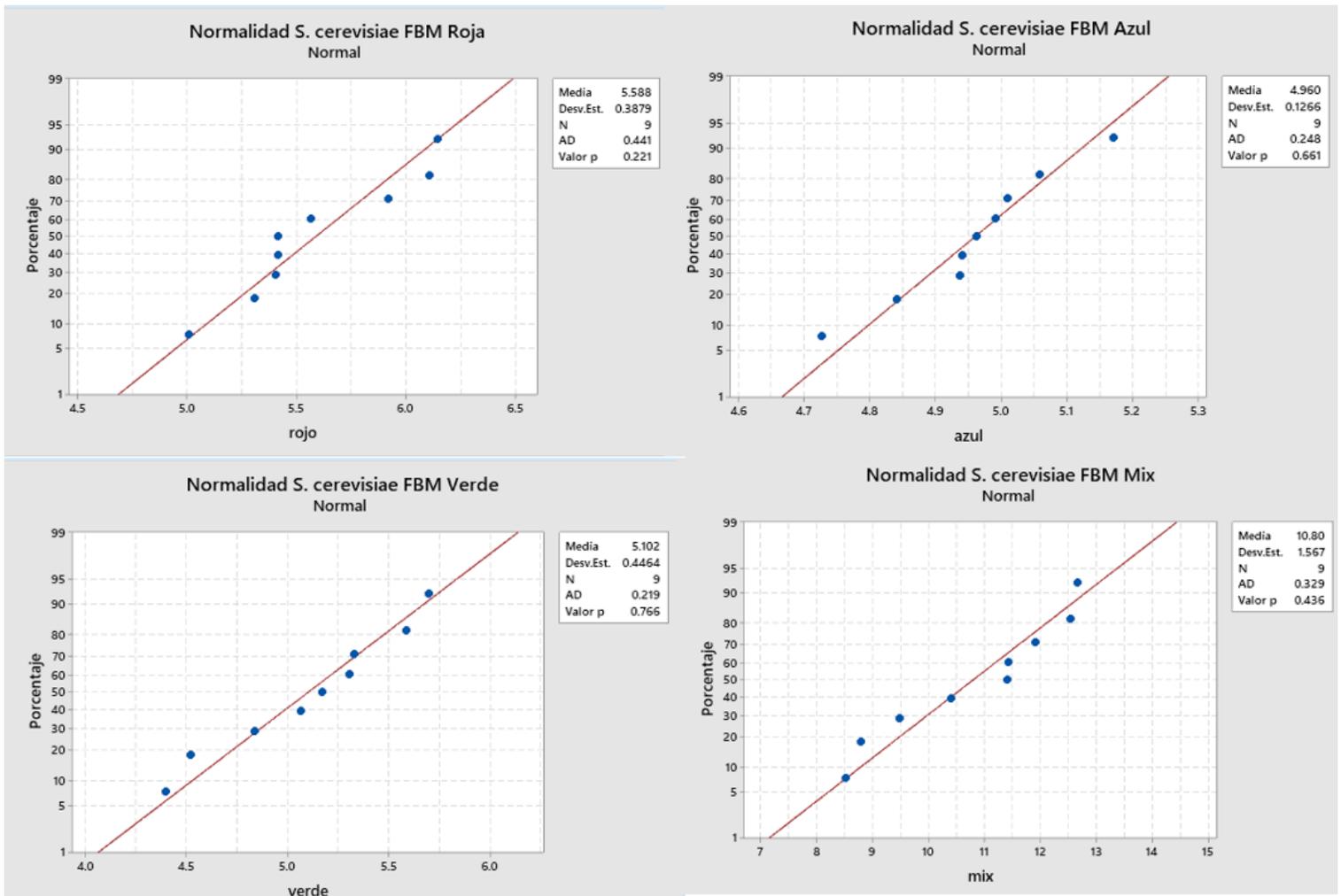
Apéndice A. Pruebas de normalidad Anderson – Darling

Normalidad en datos de B. subtilis

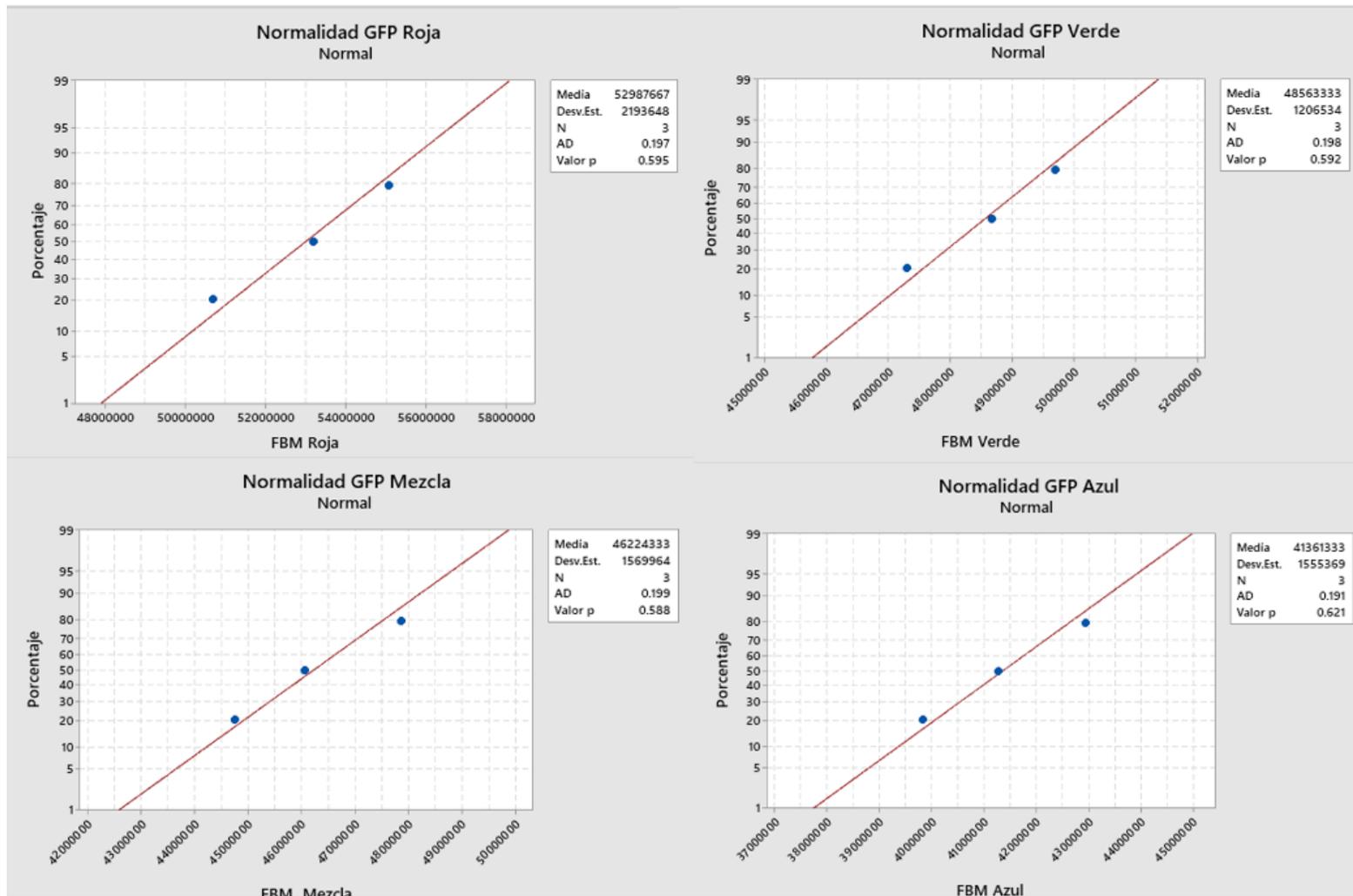


Normalidad en datos de E. coli



Normalidad en datos de *S. cerevisiae*

Normalidad en datos de GFP

Pruebas ANOVA *B. subtilis*

FBM con luz azul

Información del factor

Factor	Niveles Valores
Factor	3 Azul .3J, Azul .3J_1, Azul .3J_2

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	1.07631E+15	5.38154E+14	0.36	0.698
Error	24	3.54020E+16	1.47509E+15		
Total	26	3.64783E+16			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Azul .3J	9	414238578	26581277	(387815974, 440661182)
Azul .3J_1	9	412422068	38597382	(385999464, 438844673)
Azul .3J_2	9	426631066	47211575	(400208462, 453053670)

FBM con luz roja

Información del factor

Factor	Niveles Valores
Factor	3 Rojo 1j, Rojo 1j_1, Rojo 1j_2

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	1.28288E+15	6.41439E+14	0.54	0.592
Error	24	2.87224E+16	1.19677E+15		
Total	26	3.00053E+16			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Rojo 1j	9	593427030	36044302	(569627319, 617226742)
Rojo 1j_1	9	599408861	43474154	(575609150, 623208573)
Rojo 1j_2	9	610091871	20027576	(586292160, 633891583)

FBM con mezcla de luces

Información del factor

Factor	Niveles Valores
Factor	3 verde 1j, verde 1j_1, verde 1j_2

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	2.87660E+15	1.43830E+15	0.84	0.442
Error	24	4.08833E+16	1.70347E+15		

Total 26 4.37599E+16

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Mixta 1	9	575826196	47003041	(547431689, 604220704)
Mixta 2	9	579396177	34517693	(551001670, 607790685)
Mixta 3	9	599287798	41347950	(570893291, 627682305)

Verde

Información del factor

Factor	Niveles Valores
Factor	3 Mixta 1R 1V .3A, Mixta 1R 1V .3A_1, Mixta 1R 1V .3A_2

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	6.46315E+14	3.23158E+14	0.34	0.715
Error	24	2.28263E+16	9.51095E+14		
Total	26	2.34726E+16			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Verde 1	9	518332180	43243041	(497115422, 539548938)
Verde 2	9	517399558	28188805	(496182800, 538616316)
Verde 3	9	528213183	13737367	(506996425, 549429941)

Pruebas ANOVA *E. coli*

FBM con luz azul

Información del factor

Factor	Niveles Valores
Factor	3 Azul .3J, Azul .3J_1, Azul .3J_2

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
--------	----	-----------	-----------	---------	---------

Factor	2	1.04438E+15	5.22192E+14	0.83	0.447
Error	24	1.50573E+16	6.27387E+14		
Total	26	1.61017E+16			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Azul .3J	9	549961015	17591591	(532729050, 567192979)
Azul .3J_1	9	542196726	21661966	(524964762, 559428691)
Azul .3J_2	9	534727624	33218303	(517495659, 551959588)

FBM con luz roja

Información del factor

Factor	Niveles Valores
Factor	3 Rojo 1j, Rojo 1j_1, Rojo 1j_2

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	1.20554E+15	6.02768E+14	1.13	0.339
Error	24	1.27927E+16	5.33028E+14		
Total	26	1.39982E+16			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Rojo 1j	9	700054797	13050808	(684171449, 715938145)
Rojo 1j_1	9	684859599	33588066	(668976251, 700742947)
Rojo 1j_2	9	687189154	17337872	(671305806, 703072502)

FBM con luz verde

Información del factor

Factor	Niveles Valores
Factor	3 Verde 1, Verde 2, Verde 3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	1.29003E+14	6.45013E+13	0.12	0.890
Error	24	1.32650E+16	5.52707E+14		
Total	26	1.33940E+16			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
verde 1j	9	578571227	23286540	(562397329, 594745126)
verde 1j_1	9	583138495	20784360	(566964597, 599312394)
verde 1j_2	9	578435053	26150898	(562261154, 594608951)

FBM con mezcla de luces

Información del factor

Factor	Niveles Valores
Factor	3 Mixta 1, Mixta 2, Mixta 3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	2.04569E+15	1.02285E+15	1.19	0.322
Error	24	2.06764E+16	8.61518E+14		
Total	26	2.27221E+16			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Mixta 1	9	643987828	25976123	(623794900, 664180756)
Mixta 2	9	637285212	32263256	(617092284, 657478140)
Mixta 3	9	623107822	29476731	(602914893, 643300750)

Pruebas ANOVA *S. cerevisiae*

FBM con luz roja

Información del factor

Factor	Niveles Valores
Factor	3 rojo 1, rojo 2, rojo 3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0.4044	0.2022	1.52	0.293
Error	6	0.7996	0.1333		
Total	8	1.2039			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
rojo 1	3	5.878	0.292	(5.363, 6.394)
rojo 2	3	5.3786	0.0618	(4.8629, 5.8943)
rojo 3	3	5.507	0.557	(4.991, 6.022)

FBM con luz azul

Información del factor

Factor	Niveles Valores
Factor	3 azul 1, azul 2, azul 3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0.1551	0.07757	0.92	0.447
Error	6	0.5033	0.08389		
Total	8	0.6585			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
azul 1	3	4.717	0.398	(4.308, 5.126)
azul 2	3	5.0206	0.0345	(4.6114, 5.4297)
azul 3	3	4.777	0.304	(4.367, 5.186)

FBM con luz verde

Información del factor

Factor	Niveles Valores
Factor	3 verde 1, verde 2, verde 3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0.01752	0.008762	0.03	0.967
Error	6	1.57642	0.262737		
Total	8	1.59395			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
verde 1	3	5.051	0.604	(4.327, 5.775)
verde 2	3	5.158	0.276	(4.434, 5.882)
verde 3	3	5.095	0.590	(4.371, 5.820)

FBM con mezcla de luces

Información del factor

Factor	Niveles Valores
Factor	3 Mixta1, Mixta 2, Mixta 3

Análisis de Varianza

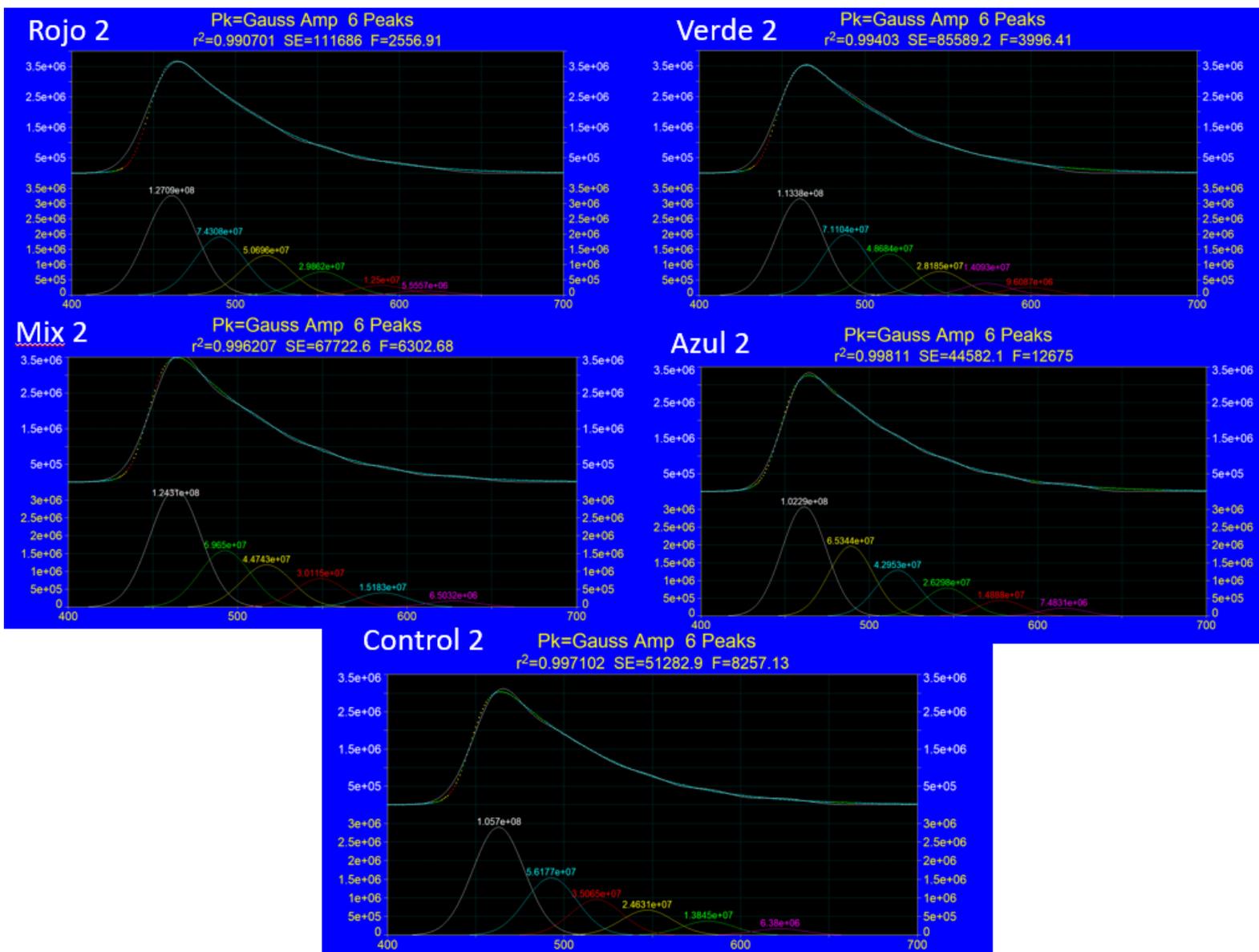
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	8.963	4.481	2.52	0.161
Error	6	10.683	1.780		
Total	8	19.645			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Mixta1	3	10.82	2.07	(8.93, 12.70)
Mixta 2	3	12.005	0.628	(10.120, 13.890)
Mixta 3	3	9.561	0.810	(7.676, 11.446)

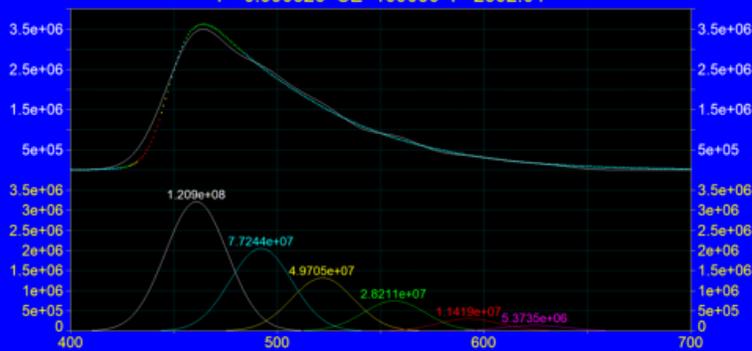
Apéndice B.

Segunda repetición pruebas de fluorescencia

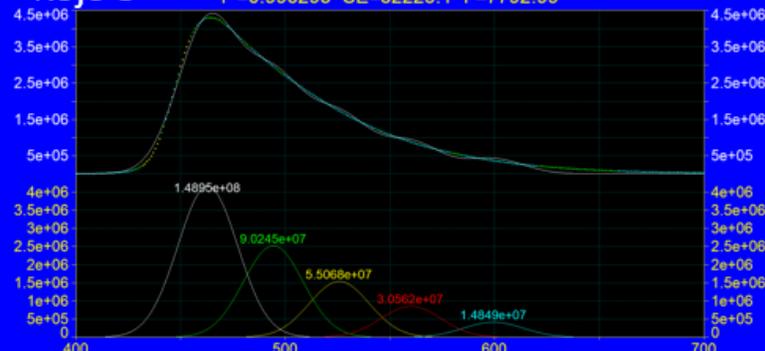


Tercera repetición pruebas de fluorescencia

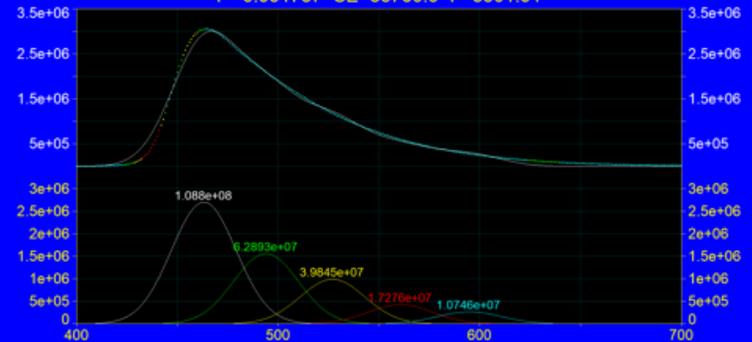
Verde 3

Pk=Gauss Amp 6 Peaks
 $r^2=0.990826$ SE=109030 F=2592.04

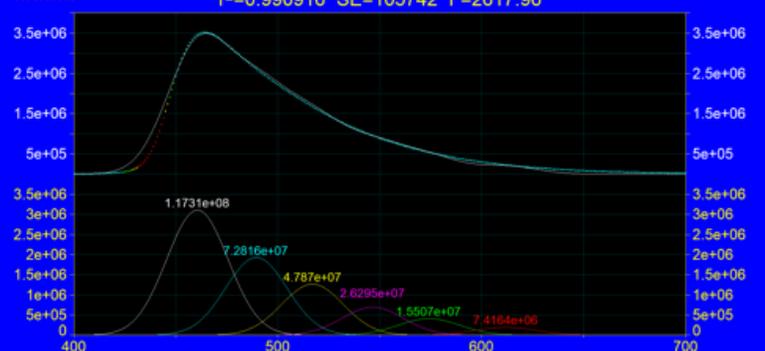
Rojo 3

Pk=Gauss Amp 5 Peaks
 $r^2=0.996293$ SE=82225.1 F=7792.99

Azul 3

Pk=Gauss Amp 5 Peaks
 $r^2=0.991787$ SE=86760.9 F=3501.91

Mix 3

Pk=Gauss Amp 6 Peaks
 $r^2=0.990916$ SE=105742 F=2617.96

Control 3

Pk=Gauss Amp 6 Peaks
 $r^2=0.997564$ SE=44194.9 F=9828.5