



Universidad de Oviedo
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

**Efectos neuromoduladores de la luz cercana al
infrarrojo sobre el sistema nervioso central en desarrollo**

Alba Gutiérrez Menéndez

Tesis Doctoral

2022



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Efectos neuromoduladores de la luz cercana al infrarrojo sobre el sistema nervioso central en desarrollo	Inglés: Neuromodulation effects of the near infrared light on the central nervous system in development
2.- Autor	
Nombre: Alba Gutiérrez Menéndez	DNI/Pasaporte/NIE
Programa de Doctorado: Ciencias de la Salud	
Línea de investigación: Neurociencia experimental y conducta	
Órgano responsable: Comisión Académica del Programa de Doctorado	

RESUMEN (en español)

Durante la última década, la estimulación cerebral no invasiva se ha convertido en un modo de neuromodulación altamente empleado al ser capaz de inducir cambios en la plasticidad neuronal con ausencia de daños. Dentro de este enfoque no invasivo, una nueva variedad de técnicas ha emergido presentando un futuro prometedor. Entre dichas nuevas herramientas, se encuentran las técnicas de neuromodulación óptica cuya base es la utilización de luz y la interacción de esta con el tejido para modular su actividad. Así pues, la fotobiomodulación (FBM) surge como una herramienta prometedora definida como la aplicación de la luz roja o cercana al infrarrojo para estimular, curar, regenerar y proteger tejidos lesionados, en proceso de degeneración o en riesgo de muerte. Sus beneficios son logrados gracias a la absorción de la radiación por parte de la citocromo c oxidasa, enzima localizada en el interior de la membrana mitocondrial y que participa en la generación de energía. Actualmente la FBM está siendo empleada en la investigación y en el tratamiento de múltiples patologías de afectación principalmente encefálica. Los estudios evidencian la eficacia su eficacia en tres tipos principales de afecciones cerebrales: los eventos traumáticos, las enfermedades neurodegenerativas y los trastornos mentales. Sin embargo, son escasas las investigaciones dedicadas a examinar el efecto de la FBM en el desarrollo postnatal, etapa crítica en el desarrollo cerebral en mamíferos, debido a la alta expresión dinámica de genes y los cambios en la metilación del ADN.

Considerando todo lo planteado anteriormente, los objetivos de este trabajo han sido, en primer lugar revisar las investigaciones publicada acerca de los efectos de la FBM en la modulación de los procesos cognitivos y el tratamiento de los trastornos psicológicos. En segundo lugar, estudiar los efectos de la FBM con una longitud de onda de 810 nanómetros en la función cerebral y en la ejecución conductual de roedores jóvenes sanos de ambos sexos cuyo sistema nervioso continúa en proceso de desarrollo. Para ello, se evaluó el efecto de la FBM en el metabolismo oxidativo cerebral y en la expresión de genes de activación temprana, así como también el posible efecto de la radiación en la densidad de células gliales (astrocitos y microglía), índice de daño cerebral. A nivel conductual, se examinó el posible efecto de la FBM en la memoria de referencia espacial con una tarea de elevada dificultad, en las conductas de tipo ansioso, en la coordinación y la capacidad locomotora y en la preferencia por la novedad social. Finalmente, como objetivo adicional, se estudió el efecto de la FBM en sujetos adultos sanos controles y en sujetos adultos sanos sometidos a una tarea de aprendizaje reverso, índice de flexibilidad cognitiva.

Nuestros resultados mostraron que, en primer lugar, la literatura científica existente arroja efectos positivos de la FBM en la modulación de las funciones cognitivas en sujetos sanos y en el trastorno de múltiples desórdenes psicológicos, siendo de suma importancia la elección de los parámetros de estimulación. Por otro lado, a nivel experimental, tras la aplicación de la FBM no se encontraron cambios en la actividad metabólica oxidativa ni en la expresión de



genes de activación temprana en el córtex prefrontal ni en el hipocampo de los sujetos jóvenes. Además, no se reportaron cambios en la proporción de astrocitos y microglía en machos jóvenes tras el uso de la FBM. A nivel conductual, la aplicación de la FBM mediante el método de inmovilización mostró, en el caso de los machos jóvenes, una mejoría del grupo radiado y del grupo control de dispositivo (sometido a las mismas condiciones que el grupo radiado, pero con el dispositivo apagado) en la adquisición de la memoria de referencia espacial junto con una reducción de la actividad metabólica oxidativa cerebral en el grupo radiado con respecto al grupo control en el hipocampo y en los núcleos talámicos. En el caso de las hembras, no se encontraron mejorías en el aprendizaje, exhibiendo, sin embargo, el grupo radiado y el grupo control dispositivo, un aumento de la actividad metabólica cerebral en diversas regiones del sistema límbico, además de un efecto específico de la radiación en la amígdala y en la corteza retrosplenial agranular durante la realización de la tarea. Por otro lado, no se encontraron efectos del uso de la FBM en las conductas de tipo ansioso, ni en la locomoción de sujetos machos jóvenes, pero sí en la preferencia por la novedad social, existiendo una reducción de esta en los sujetos radiados al compararse con el grupo control. Finalmente, los estudios con sujetos adultos mostraron que, tras la aplicación de la FBM en animales sanos, existía una reducción de la actividad metabólica cerebral en numerosas regiones del sistema límbico y, además, la aplicación de la FBM en tareas de aprendizaje reverso conducía, de la misma manera, a una disminución de la actividad metabólica acompañada de una reducción en las latencias de escape.

RESUMEN (en Inglés)

During the last decade, non-invasive brain stimulation has become a highly employed mode of neuromodulation due to its ability to induce changes in neuronal plasticity with a lack of damage. Within this non-invasive approach, a new variety of techniques have emerged showing a promising future. Among these new tools, optical neuromodulation techniques that are based on the use of light and its interaction with the tissue to modulate its activity, are included. Thus, photobiomodulation (PBM) emerges as a promising tool defined as the use of red or near-infrared light to stimulate, heal, regenerate and protect tissues that are injured, degenerating or at risk of death. Its benefits are achieved due to the absorption of radiation by cytochrome c oxidase, an enzyme located inside the mitochondrial membrane and involved in energy generation. Currently, PBM is being used in research and in the treatment of several pathologies that mainly affect the brain. Studies show its efficacy in three main types of brain conditions: traumatic events, neurodegenerative diseases and mental disorders. However, little research has been devoted to examining the effect of PBM on postnatal development, a critical stage in mammalian brain development, due to the high dynamic gene expression and changes in DNA methylation.

Considering all of the above, the aims of this work have been, firstly, to review the published research on the effects of PBM in the modulation of cognitive processes and the treatment of psychological disorders. Secondly, to study the effects of an 810 nanometer PBM on brain function and behaviour of young healthy rodents of both sexes whose nervous system are still in development. For this purpose, we evaluated the effect of PBM on brain oxidative metabolism and the expression of early activation genes, as well as the possible effect of radiation on glial cells' density (astrocytes and microglia), brain damage index. Regarding the behaviour, we examined the effect of PBM on a difficult spatial reference memory task, on anxiety-like behaviours, coordination and locomotor ability, and preference for social novelty. Finally, as an additional objective, we studied the effect of FBM in healthy adult controls and healthy adult subjects subjected to a reversal-learning task, index of cognitive flexibility.

Our results showed that, firstly, the current scientific literature shows positive effects of PBM in the modulation of cognitive functions in healthy subjects and several psychological disorders, being the stimulation parameters highly important. On the other hand, at the experimental level, after the application of PBM no changes were found in oxidative metabolic activity nor in the expression of early activation genes in the prefrontal cortex nor in the hippocampus of young subjects. In addition, no changes in the density of astrocytes and microglia were reported in young males after PBM use. At the behavioural level, the application of PBM using the immobilization method showed, in the case of young males, an improvement in the acquisition of the spatial reference memory in the irradiated group and in the device control



Universidad de Oviedo

group (subjected to the same conditions as the irradiated group, but with the device turned off), along with a cerebral oxidative metabolic activity reduction in the irradiated group in comparison to the control group in the hippocampus and in the thalamic nuclei. In regard to the females, no improvements in learning were found, showing, however, an increase in brain metabolic activity in several regions of the limbic system in the irradiated group and in the control group, as well as a specific effect of radiation in the amygdala and in the dysgranular retrosplenial cortex during the performance of the task. On the other hand, no effects of PBM were found on anxious behaviour, nor on locomotion activity in young male subjects, but there was a reduction in the preference for social novelty in the irradiated subjects compared to the control group. Finally, studies with adult subjects showed that, after the application of PBM in healthy animals, there was a reduction in brain metabolic activity in several regions of the limbic system and, in addition, the application of PBM in the reverse learning tasks led, in the same way, to a decrease in metabolic activity along with a reduction in escape latencies.

**SRA. PRESIDENTA DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS DE LA SALUD**

Índice

Abreviaturas.....	3
1 Introducción.....	5
1.1 Técnicas de neuromodulación cerebral.....	7
1.2 Radiación óptica.....	8
1.3 Fotobiomodulación (FBM).....	11
1.3.1 Origen de la FBM.....	11
1.3.2 Definición de la FBM.....	12
1.3.3 Mecanismo de acción.....	13
1.3.4 Aplicaciones de la FBM.....	15
1.3.5 Periodo postnatal.....	16
1.3.6 Desarrollo y FBM.....	18
2 Planteamiento y objetivos.....	19
3 Material y métodos.....	23
3.1 Revisión sistemática.....	25
3.2 Animales de experimentación.....	25
3.3 Diseño de las investigaciones experimentales.....	25
3.4 Técnica de FBM.....	32
3.4.1 Protocolo de FBM en estudios con sujetos jóvenes.....	32
3.4.2 Protocolo de FBM en sujetos adultos pertenecientes al estudio I.....	33
3.5 Pruebas conductuales.....	35
3.5.1 Laberinto acuático de Morris (MWM).....	36
3.5.2 Laberinto en cero elevado.....	41
3.5.3 Rotarod.....	42
3.5.4 Test de tres cámaras (Three chamber test).....	43
3.6 Obtención del tejido.....	44
3.6.1 Eutanasia de los sujetos experimentales.....	44
3.6.2 Seccionado.....	45
3.7 Procesamiento histológico.....	46
3.7.1 Histoquímica de la citocromo c oxidasa.....	46
3.7.2 Inmunocitoquímica de la proteína c-Fos.....	47
3.7.3 Inmunocitoquímica de la GFAP.....	48
3.7.4 Inmunocitoquímica de la Iba-1.....	49
3.8 Procedimientos de cuantificación.....	50
3.8.1 Histoquímica de la citocromo c oxidasa.....	50
3.8.2 Inmunocitoquímica de la proteína c-Fos.....	52
3.8.3 Inmunocitoquímica de la GFAP.....	52
3.8.4 Inmunocitoquímica de la Iba-1.....	53
3.9 Análisis estadístico.....	54

3.9.1	Evaluación conductual	54
3.9.2	Histoquímica de la citocromo c oxidasa	55
3.9.3	Inmunocitoquímica de la proteína c-Fos.....	56
3.9.4	Inmunocitoquímica de la GFAP	56
3.9.5	Inmunocitoquímica de la Iba-1	56
4	Compendio de publicaciones	57
4.1	Publicación 1.....	59
4.2	Publicación 2.....	75
4.3	Publicación 3.....	89
5	Resultados.....	131
5.1	Bloque I: estudio II (Objetivo 3).....	133
5.2	Bloque I: estudios IV y V (Objetivo 5).....	133
5.3	Bloque I: estudio VI (Objetivo 6)	142
6	Discusión.....	145
6.1	Controversia inicial: mecanismo de acción.....	147
6.2	Controversia actual: falta estandarización de los parámetros	151
6.3	Eficacia de la técnica en la modulación cognitiva y los trastornos psicológicos.....	156
6.4	Modulación cerebral mediante fotobiomodulación	158
6.5	Modulación conductual mediante fotobiomodulación y actividad cerebral subyacente.....	163
6.6	Limitaciones del trabajo y perspectiva futura	175
7	Conclusiones	177
8	Conclusions.....	181
9	Referencias.....	185

Abreviaturas

ACCC: núcleo accumbens core	mg: miligramos
ACSH: núcleo accumbens shell	ml: mililitros
AD: tálamo anterodorsal	mm: milímetros
AM: tálamo anteromedial	MMM: medial mamilar
AV: tálamo anteroventral	MML: medial lateral mamilar
ACG: corteza cingulada anterior	MO: corteza orbitofrontal medial
APL: corteza prelímbica anterior	MR: memoria de referencia
ANOVA: análisis de varianza	MS: septum medial
AP-1: proteína activadora-1	mW: milivatios
ATP: adenosín trifosfato	MWM: laberinto acuático de Morris
AR: aprendizaje reverso	NAALT: Asociación estadounidense de fototerapia
BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro	NASA: Administración Nacional de Aeronáutica y el Espacio
BSA: amígdala basolateral	NF- κ B: factor nuclear de transcripción <i>kappa</i> B
CA1: asta de Amon 1	NIR: infrarrojo cercano
CA3: asta de Amon 3	Nm: nanómetros
cAMP: adenosín monofosfato cíclico	NMDA: N-metil-D-aspartato
CCO: citocromo c oxidasa	NO: óxido nítrico
CeA: amígdala central	PCG: corteza cingulada posterior
CG: corteza cingulada	PFC: corteza prefrontal
CIE: Comisión Internacional de Iluminación	PL: corteza prelímbica
cm: centímetros	PPL: corteza prelímbica posterior
DG: giro dentado	PRh: corteza perirrinal
DLO: corteza orbitofrontal dorsolateral	Redox: reacción de reducción-oxidación
DPN: día postnatal	ROS: especies reactivas de oxígeno
EEM: error estándar de la media	Rpm: revoluciones por minuto
ENT: corteza entorrinal	RSA: corteza retrosplenial agranular
FBM: fotobiomodulación	RSG: corteza retrosplenial granular
g: gramos	s: segundos
GFAP: proteína glial fibrilar ácida	SNC: sistema nervioso central
H: horas	STD: estriado dorsal
Hz: hercios	SuM: supramamilar
IEGs: gen de activación temprana inmediata	TFBM: terapia de fotobiomodulación
IES: Sociedad de Ingenieros de Iluminación	TRP: receptores de potencial transitorio
IL: corteza infralímbica	THz: terahercio
INS: Sociedad Internacional de Neuromodulación	TOC: Trastorno Obsesivo Compulsivo
IR: células inmunorreactivas	V: volumen
Kg: kilogramos	VO: corteza orbitofrontal ventral
LaA: amígdala lateral	VTA: área tegmental ventral
LASER: amplificación de la luz mediante la emisión estimulada de la radiación	WALT: Asociación Mundial de terapia con láser
LED: diodo emisor de luz	WOS: Web of Science
LLLT: terapia láser de bajo nivel o de baja intensidad	μ m: micrómetros
LO: corteza orbitofrontal lateral	
LS septum lateral	
M: masa	
m: metros	

1 Introducción

1.1 Técnicas de neuromodulación cerebral

El estudio del sistema nervioso tiene un inicio tardío en la historia de las ciencias. Desde su comienzo, los numerosos avances científicos han permitido comprender gran parte de la estructura y del funcionamiento encefálico. Dichos hallazgos han propiciado, a su vez, el creciente interés en el desarrollo y la investigación de técnicas para modular o influir en la actividad cerebral, emergiendo una nueva rama en las ciencias, la neuromodulación. Esta nueva rama científica es uno de los campos biomédicos con mayor crecimiento e interés actual y desde la Sociedad Internacional de Neuromodulación (*INS*, por sus siglas en inglés correspondientes a *International Neuromodulation Society*) es definida como “campo de la ciencia, de la medicina y de la bioingeniería que abarca tecnologías implantables y no implantables, eléctricas, ópticas o químicas, con el fin de mejorar la calidad de vida y el funcionamiento de los seres humanos” (H. S. Smith y Pilitsis, 2014). El término engloba cualquier tipo de intervención que interactúe en algún nivel con el sistema nervioso y permita modificar su función con el fin de obtener un beneficio (Arle y Shils, 2011). El desarrollo de la neuromodulación actual está siendo impulsado gracias a nuestro rápido avance en la comprensión de las aplicaciones clínicas y experimentales de los mecanismos artificiales de estimulación o depresión de la actividad cerebral en modelos humanos de salud-enfermedad (Lewis et al., 2016).

En la actualidad, la neuroestimulación es utilizada clínicamente para el tratamiento de diversas afecciones neurológicas tales como la enfermedad de Parkinson, el temblor esencial, el dolor crónico y la epilepsia. Desde el campo de la neuropsiquiatría, ha brotado un especial interés por el uso de estas técnicas y han emergido como opción terapéutica disponible en el manejo de la depresión resistente al tratamiento y en el trastorno obsesivo-compulsivo (Lewis et al., 2016). Las técnicas de neuroestimulación son comúnmente divididas en dos amplias clasificaciones, técnicas invasivas y técnicas no invasivas. Las técnicas invasivas requieren de sedación y de intervención quirúrgica para su correcta aplicación mientras que las técnicas no invasivas utilizan dispositivos que no requieren de su implantación para su correcto uso, no es necesario la utilización de sedantes o anestésicos y, generalmente, son aplicadas siguiendo protocolos intermitentes (Razza et al., 2021). Dichas técnicas de neuromodulación varían en función del contexto clínico, la localización y el tamaño preciso de las regiones diana y del objetivo que se desee alcanzar (Lewis et al., 2016). Sin embargo, entre la variedad de técnicas y enfoques, en términos generales, se podría concluir que la neuromodulación cerebral implica la neuroestimulación cortical y/o subcortical con el objetivo de eliminar las dificultades que impiden un funcionamiento cerebral óptimo y merman la calidad de vida (H. S. Smith y Pilitsis, 2014).

Durante la última década, la estimulación cerebral no invasiva se ha convertido en un modo de neuromodulación altamente empleado, al ser capaz de inducir cambios en la plasticidad neuronal con ausencia de daños (Hassanzahraee et al., 2018). Algunas de las técnicas no invasivas más utilizadas son la estimulación transcraneal por corriente continua o la estimulación magnética transcraneal, las cuales se aplican principalmente en el ámbito de la neurorrehabilitación (To et al., 2018). Dentro de este

enfoque no invasivo, una nueva variedad de técnicas de neuromodulación ha emergido presentando un futuro prometedor. Entre estas nuevas herramientas se encuentran las técnicas de neuromodulación óptica cuya base es la utilización de luz y la interacción de esta con el tejido para modular su actividad (Doronina-Amitonova et al., 2015). Este campo emergente ha experimentado una enorme aceleración durante la última década con la introducción de nuevas y potentes técnicas como son la optogenética (empleo de neuronas diana modificadas genéticamente y activadas por luz visible), la estimulación mediante el uso de infrarrojos, la estimulación óptica potenciada por macropartículas y una gran variedad de herramientas fotoquímicas (Hart et al., 2019).

El uso de la luz como fuente de modulación del sistema nervioso cobra especial sentido al contar nuestro organismo con células naturalmente sensibles a la luz tales como son los fotorreceptores (conos y bastones), así como las células ganglionares de la retina. Sin embargo, cabe destacar que se conoce hace más de un siglo que la luz no solo influye en dichos elementos sensibles, sino que también es capaz de modular la actividad de otras células neuronales y no neuronales que no presentan pigmentos proteicos sensibles a la luz (Jiang et al., 2022). Ante la importancia que la fuente lumínica adquiere, al ser capaz de modular nuestros sistemas, no es de extrañar, entonces, que el uso de las radiaciones lumínicas haya emergido como una nueva herramienta en el ámbito de la neuromodulación y haya despertado un especial interés en la comunidad científica.

1.2 Radiación óptica

La luz es una fuente de vida, energía y bienestar la cual está presente en gran parte de los eventos que ocurren en la tierra. La Comisión Internacional de Iluminación (*CIE*, por sus siglas en francés correspondientes a *Commission Internationale de l'Eclairage*) define la luz como “cualquier radiación capaz de excitar el sistema visual humano” mientras que desde la Sociedad de Ingenieros de Iluminación (*IES*, por sus siglas en inglés correspondientes a *Illuminating Engineering Society*) es definida como “energía radiante que es capaz de excitar la retina y de producir una sensación visual en humanos” (Bertani et al., 2021; Sliney, 2016).

Una de las propiedades más curiosas de la luz es su doble naturaleza como partícula (masa) y como onda (energía). Así pues, desde la física cuántica se ha identificado al fotón como la unidad, la partícula constituyente de la luz, carente de masa y de carga eléctrica. Dichas partículas se encuentran en el espacio en un movimiento oscilatorio constante lo que hace que asuman las características de onda electromagnética (Bertani et al., 2021). Las radiaciones electromagnéticas presentes en el universo son clasificadas según su longitud de onda, medida en nanómetros (nm), y su frecuencia, medida habitualmente en hercios (Hz), y todas ellas, en su conjunto, forman lo que se conoce como el espectro electromagnético. Dentro de este espectro, la región de la luz que es visible por el ojo humano está formada por radiaciones electromagnéticas cuyas longitudes de onda en el vacío se encuentran en un rango entre 380-780 nm, con frecuencias comprendidas entre 790 y 435 terahercios (THz). Las ondas

con longitudes inmediatamente inferiores a este espectro de luz visible son conocidas como radiación ultravioleta (100-400 nm) mientras que las radiaciones con longitudes superiores, las cuales se extienden desde los 780 nm, límite con el color rojo visible, hasta el milímetro (mm), se conocen como radiación infrarroja (Bertani et al., 2021; Björn, 2015). Dicho conjunto de radiaciones desde el inicio de la región ultravioleta hasta el final de la región infrarroja es conocido como radiaciones ópticas y presenta una naturaleza no ionizante, de baja energía (Sowa et al., 2013) (Figura 1). Cuando estas radiaciones chocan con un cuerpo material, adquieren un comportamiento diferente siendo refractadas o absorbidas en distintas proporciones en función de las características del objeto receptor y de la naturaleza de la radiación. Este mecanismo es, en realidad, la base de la percepción visual del ser humano, así como también de otras formas de interacción entre la radiación óptica y el cuerpo humano (Bertani et al., 2021). Así pues, la radiación óptica es capaz de causar dos tipos de reacciones en los tejidos biológicos, las reacciones fotoquímicas y las reacciones térmicas. Cabe reseñar que dicho efecto únicamente puede ser alcanzado cuando la radiación óptica es absorbida por del tejido y depende en gran medida de los parámetros físicos de la radiación (por ejemplo, su longitud de onda), la cantidad de radiación absorbida y, por último, de las características ópticas y biológicas del tejido expuesto (Mansdorf, 2019).

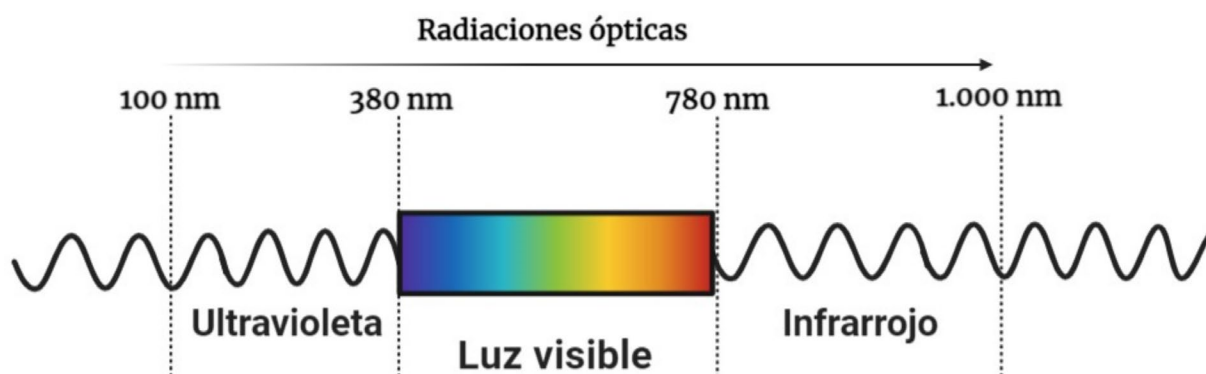


Figura 1. Imagen ilustrativa del espectro electromagnético.

Las fuentes de radiación óptica son divididas en fuentes naturales, eléctricas y tecnológicas (subproductos de procesos tecnológicos) (Mansdorf, 2019). La luz solar es la fuente natural de radiación óptica, la cual está formada por todas las radiaciones del espectro óptico (7% radiaciones ultravioleta, 43% radiaciones correspondientes a la región visual y 50% radiaciones infrarroja) (Mansdorf, 2019). Los efectos de la luz sobre los organismos biológicos son en la actualidad ampliamente conocidos. Su función en los sistemas y procesos biológicos puede observarse con claridad en ciclos como el circadiano, sueño-vigilia o en la absorción de vitaminas, entre otros (Dompe et al., 2020). Dada la función esencial que la luz ejerce en el organismo, ha propiciado que esta haya sido utilizada durante muchos años y en la actualidad, tal y como se mencionó anteriormente, como agente terapéutico. Así

pues, la radiación óptica natural ya fue empleada en la antigüedad en lugares tan diversos China, Egipto, India, Roma y Grecia como base de la helioterapia (exposición a la radiación solar con fines terapéuticos) y de la fototerapia (empleo de radiaciones ópticas para el tratamiento de enfermedades) (Liebert et al., 2019). La radiación óptica no es solo obtenida a través de la luz del sol sino que también puede ser generada artificialmente mediante otras fuentes tales como láseres, lámparas, calentadores radiantes, etc., los cuales son capaces de emitir radiaciones ópticas con longitudes específicas (Sloney, 2016). La primera fuente de luz artificial data del año 1894 cuando su inventor, Heinrich Lahmann, construyó por primera vez un dispositivo de luz ultravioleta para el tratamiento de los trastornos dérmicos (Sowa et al., 2013). Poco tiempo después, en 1903, Niels Ryberg Finsen recibió el premio Nobel de Fisiología y Medicina por su contribución en el tratamiento de la tuberculosis cutánea mediante luz ultravioleta y de la viruela mediante luz roja y sentó las bases de la helioterapia y fototerapia modernas utilizadas para tratar la viruela, la tuberculosis de la piel, los huesos y las articulaciones (Liebert et al., 2019; Sowa et al., 2013). En la actualidad, dicha fototerapia es utilizada en el ámbito clínico de manera habitual para tratar trastornos de diversa índole, como alérgicos, dermatológicos, reumatóides, respiratorios, cardiovasculares, neonatales, pediátricos y psiquiátricos y sigue siendo considerada terapia de primera línea para el tratamiento del trastorno afectivo estacional, para el desajuste del ritmo circadiano y para los trastornos del sueño, entre otros (Liebert et al., 2019; Sowa et al., 2013).

Tras la obtención del premio Nobel, la continuación en el estudio de los efectos lumínicos y sus beneficios reportados propiciaron en 1960 la “revolución del ámbito óptico” fomentada, en gran medida, por la construcción del primer dispositivo láser cuyo funcionamiento fue basado en el “efecto de la emisión estimulada” propuesto en 1917 por Albert Einstein (Ramezani et al., 2022; Sloney, 2016). Dicho dispositivo fue denominado con el término láser procedente de la palabra “*LASER*” en inglés, la cual es un acrónimo de las siglas “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”, es decir, amplificación de la luz mediante la emisión estimulada de la radiación (Ibarra Villalón et al., 2018). Este hito revitalizó el interés de los científicos por la estimulación óptica de las células nerviosas llevándose a cabo la primera demostración de estimulación laser en neuronas a principios de los años 70 (Jiang et al., 2022). Desde ese momento hasta la actualidad, la tecnología óptica ha experimentado un significativo progreso que ha propiciado el desarrollo de distintos tipos de lentes y filtros y la aparición de diodos emisores de luz (*LED*, por sus siglas en inglés correspondientes a *Light-Emitting Diode*) los cuales proporcionan luz no coherente, a diferencia de la radiación coherente por parte de los láseres, y una mayor eficiencia energética (Sloney, 2016). La introducción en el ámbito científico, entonces, de nuevos dispositivos ópticos permitió la emisión amplificada de radiaciones con longitudes de ondas y parámetros específicos (Dompe et al., 2020). En la actualidad, dichos dispositivos continúan siendo herramientas básicas y son empleados ampliamente en múltiples aspectos de la vida cotidiana, así como también en aplicaciones industriales, militares, astronómicas, medicas, etc. (Ramezani et al.,

2022). Así pues, su principal aplicación en biología es en la espectrofotometría de masas, mientras que en los campos biomédicos se emplean también para la eliminación de células cancerosas, la fijación de retinas desprendidas, o la ejecución de microdisecciones, entre otros usos (Björn, 2015).

Cabe destacar que no todas las longitudes de onda del espectro electromagnético son válidas para alcanzar el efecto biológico deseado. La penetración de la luz en el rango visible y en el rango inicial del infrarrojo, también conocido como infrarrojo cercano (*NIR*, por sus siglas en inglés correspondientes a *Near InfraRed*) (700-1.000 nm), está adecuadamente caracterizado en la mayoría de los tejidos biológicos, incluyendo el cerebro (Golovynskyi et al., 2018). Es por ello que, desde las últimas dos décadas, ha emergido un especial interés por el uso de la luz roja visible y la luz NIR dada la amplia variedad de efectos terapéuticos beneficiosos que ha reportado en múltiples campos biomédicos y en la investigación biológica (Salehpour et al., 2018a). Esto ha propiciado el surgimiento de lo que se conoce en la actualidad como fotobiomodulación (FBM), originalmente “*Photobiomodulation (PBM)*” y, más concretamente, ha emergido una nueva modalidad de tratamiento, la cual ha sido introducida en los campos de la neurología, la psicología y la psiquiatría, entre otros, conocida como terapia de fotobiomodulación (TFBM) (Salehpour, Cassano, et al., 2019).

1.3 Fotobiomodulación (FBM)

1.3.1 Origen de la FBM

El uso de las radiaciones ópticas ha estado siempre presente en la historia de la humanidad. No obstante, el origen de la que se conoce en la actualidad como FBM data del año 1967 y fue reportada por primera vez desde la Universidad de Budapest por el clínico Endre Mester (Serrage et al., 2019). Endre Mester trataba de replicar un experimento descrito por Paul Edward McGuff, el cual había utilizado el novedoso láser de rubí para el tratamiento de tumores experimentales implantados en hámsteres. A pesar de que el láser utilizado por el clínico Mester era de potencia menor e insuficiente para tratar cualquier tipo de tumor, este observó cambios en los animales tratados (Hamblin, 2018a). Al aplicar un láser de baja potencia con una longitud de onda de 694 nm en el lomo sin pelo de los ratones, existía un mayor crecimiento de pelo y una mayor cicatrización de las heridas en comparación con los animales no irradiados y denominó a este fenómeno como “fotobioestimulación” (Serrage et al., 2019). En 1970 se inició el tratamiento con luz láser roja de baja intensidad, conocido a partir de ese momento como terapia laser de bajo nivel o de baja intensidad (*LLLT*, por sus siglas en inglés correspondientes a *Low-Level Laser Therapy*), para estimular la cicatrización de heridas y para la reducción del dolor y de la inflamación en diversas afecciones ortopédicas (Hamblin, 2016b; Kim, 2014). A partir de ese momento, el interés por su uso se incrementó exponencialmente. Tanto es así que la Administración Nacional de Aeronáutica y el Espacio (*NASA*, por sus siglas en inglés correspondientes a *National Aeronautics and Space Administration*) desarrolló, alrededor de la década de los 90, un dispositivo LED para mejorar la atención médica de los astronautas en misiones espaciales (Whelan, 2000). Dicha introducción de los dispositivos LEDs propicio que la LLLT pasara a denominarse terapia con luz de

bajo nivel o baja intensidad, ya que se confirmó que el uso de láseres no era absolutamente necesario y que el uso de LEDs también era válido para la consecución del efecto biológico deseado (Hamblin, 2016b). Tras décadas de confusión entre diferentes términos (LLLT, láser frío, láser suave, baja potencia, baja intensidad, etc.), recientemente, se han acuñado los términos de FBM y TFBM, según se trate del proceso científico o de la terapia (Hamblin, 2019a; Serrage et al., 2019). Dichos términos son preferidos por la comunidad biomédica y han sido adoptados por múltiples razones: en primer lugar, no existía un acuerdo sobre el significado de “baja” utilizada en las diferentes denominaciones; por otro lado, tal y como se mencionó anteriormente, la introducción de los dispositivos LED hizo que se excluyera el término láser y, finalmente, la mayor comprensión de los efectos de esta técnica propiciaron que el término modulación fuese más adecuado (Hamblin, 2019a).

1.3.2 Definición de la FBM

La FBM es definida en términos generales como el proceso que implica la transformación de la energía lumínica en energía química, cinética o térmica para alcanzar un resultado fisiológico deseado (Berman et al., 2017). Desde el punto de vista biomédico, el consensuado término FBM describiría la aplicación terapéutica de la luz roja o NIR de para el tratamiento de múltiples trastornos y enfermedades (Liebert et al., 2019). Particularmente, Hamblin (2016b) define la FBM como el uso de la luz roja o NIR para estimular, curar, regenerar y proteger tejidos lesionados, en proceso de degeneración o en riesgo de muerte. Los especialistas del campo biomédico iniciaron el uso de la FBM en el tratamiento de numerosas condiciones cuando otros métodos no resultaron exitosos. Sin embargo, a pesar de su uso, actualmente la FBM no es incluida como parte de la medicina convencional al no considerarse un tratamiento estándar (Musstaf et al., 2019).

La FBM ha realizado grandes progresos con el objetivo de obtener el reconocimiento de las autoridades médicas, las revistas académicas, los medios de comunicación, los clínicos, terapeutas y organismos de la ciencia biomédica (Hamblin, 2016a). El tratamiento con FBM ha evolucionado a lo largo de los años y se está desarrollando como una herramienta terapéutica sofisticada. Sus tratamientos terapéuticos se basan en tres principios: minimizar la inflamación, el edema y los trastornos crónicos de las articulaciones, dirigiéndose al cerebro, la piel, las articulaciones, etc.; promover la curación de heridas de los tejidos superficiales y profundos y, por último, el tratamiento de los trastornos neurológicos y del dolor (Musstaf et al., 2019). Este cambio de percepción inducido en los últimos años puede atribuirse a diferentes factores, siendo el más significativo el progreso alcanzado en la comprensión de los mecanismos de acción a nivel molecular, celular y tisular (Hamblin, 2016a). Dicho avance se ha observado también en la emergencia y el creciente desarrollo de sociedades profesionales y científicas cuyo objeto principal es la FBM tales como la Asociación Mundial de terapia con láser (*WALT*, por sus siglas en inglés correspondientes a *World Association of Laser Therapy*) y la Asociación estadounidense de fototerapia (*NAALT*, *North American Association for Light Therapy*) (Hamblin,

2016a). En la actualidad muchas enfermedades y afecciones de distintos campos médicos se han visto beneficiadas por los efectos de la FBM (Dompe et al., 2020; Ross y Ross, 2009).

Recientemente la FBM se ha propuesto como un tratamiento innovador y potencial para tratar una amplia gama de trastornos neurológicos y psiquiátricos. Su uso directo en el sistema nervioso central (SNC) se inició al emplearse por primera vez para tratar de prevenir el daño neurológico a largo plazo tras la inducción de un ictus agudo (Hamblin, 2019b). Los trabajos pioneros del grupo Uri Oron, en Israel, demostraron que la aplicación de un láser NIR sobre la cabeza de diferentes modelos animales de ictus isquémico llevaba a la consecución de efectos beneficiosos (Hamblin, 2019b). En la FBM transcraneal, debido a la transmisión parcial de los fotones a través del cuero cabelludo y del cráneo, únicamente una pequeña cantidad de energía luminosa llega a la superficie cortical. No obstante, dicha cantidad es apropiada para garantizar efectos celulares, neurofisiológicos y terapéuticos (Salehpour, Mahmoudi, et al., 2019). Por el momento, el método de la irradiación transcraneal mediante FBM es un método experimental. Los estudios limitados realizados en humanos han mostrados resultados alentadores en el tratamiento de ictus, lesiones cerebrales traumáticas, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, trastorno depresivo mayor, etc. (M. Yang et al., 2021) y es cada vez más común su empleo en los centros especializados en FBM (Salehpour, Mahmoudi, et al., 2019).

1.3.3 Mecanismo de acción

La FBM resultaba, tal y como se mencionó previamente, cuestionada. El cambio de percepción que se ha producido durante los últimos años puede atribuirse a múltiples factores, siendo el más importante el progreso en la comprensión de sus mecanismos de acción a nivel molecular, celular y tisular (Hamblin, 2016a).

La FBM implica la transformación de energía luminosa en otros tipos de energía para alcanzar el resultado fisiológico deseado (Berman et al., 2017). Su acción se basa en la primera ley de la fotoquímica, también conocida como ley de *Grotthus-Draper*, la cual establece que las reacciones fotoquímicas dependen de la absorción de la luz por parte de un sistema (Serrage et al., 2019). En otras palabras, los fotones de la luz deben ser absorbidos por un enlace o por una molécula dentro del tejido para poder así iniciar un proceso químico o físico y alcanzar un efecto biológico (Hamblin, 2019b). Se ha demostrado que numerosas moléculas celulares poseen la capacidad de absorber diferentes longitudes de onda presentes en las radiaciones ópticas. La explicación más aceptada hasta la actualidad sobre los efectos beneficiosos de la FBM ha sido la “teoría de la citocromo c oxidasa (CCO)”, establecida en gran medida por la investigadora Tiina Karu en 1987 (Serrage et al., 2019). Tiina Karu planteó que en todas las células eucariotas está presente una molécula (fotoceptor) naturalmente fotosensible que reacciona a la FBM, la CCO, enzima localizada en el interior de las mitocondrias (Karu, 2014). La CCO es la cuarta unidad (complejo IV) de la cadena respiratoria de transporte de electrones localizada en el interior de la membrana mitocondrial. Dicha enzima es la responsable de

catalizar la reducción final del oxígeno molecular (O_2) en dos moléculas de agua (H_2O), utilizando los electrones generados en el metabolismo de la glucosa, y del bombeo de protones fuera de la matriz (Hamblin, 2018a). Dicho bombeo genera, a su vez, energía que permite la síntesis de adenosín trifosfato (ATP), principal molécula de energía del organismo (Hamblin, 2016b, 2018a).

Las investigaciones sugieren que la interacción luz-enzima se produce principalmente en los centros de cobre de la CCO. Sin embargo, se desconocen con exactitud los procesos que ocurren dentro de la cadena de transporte de electrones o de la CCO durante la radiación lumínica (Serrage et al., 2019). Se han propuesto multitud de hipótesis para tratar de explicar los efectos encontrados: la fotodisociación del óxido nítrico (NO), los cambios en las propiedades redox de la CCO con aceleración en la transferencia de electrones, la generación de superóxido y los cambios bioquímicos relacionados con el calentamiento transitorio de los fotorreceptores irradiados (Serrage et al., 2019). Una de las hipótesis más apoyadas para explicar el aumento de actividad de la CCO ante la luz sería la propuesta de la fotodisociación del NO. El NO es una molécula capaz de inhibir la actividad de la CCO al unirse a uno de sus centros. Según esta teoría, la luz absorbida por la CCO, sería capaz de disociar este NO aumentando así la tasa de respiración y por consiguiente, la producción de ATP (Hamblin, 2018a). Recientemente, sin embargo, la mayoría de los estudios justifican los efectos de la FBM mediante la aceleración de la transferencia de electrones. Así pues, estos mantienen que, tras la absorción de los fotones por parte de la CCO, se produciría la oxidación de esta enzima aumentando el potencial de membrana mitocondrial y acelerando el transporte de electrones. Dichos efectos conducirían a un aumento en la síntesis de ATP y de NO, a un mayor consumo de oxígeno y mayor flexibilidad de la membrana y a una breve generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés correspondientes a *Reactive Oxygen Species*), entre otros efectos (Ramezani et al., 2022). Muchos de estos mediadores secundarios implicados en el mecanismo de acción como son ROS o NO, serían capaces, a su vez, de activar vías de señalización y factores de transcripción, dando lugar a la expresión de genes relacionados con la proliferación y la migración celular, la inflamación y la apoptosis, además de generar efectos a largo plazo (Hamblin, 2018a; M. Yang et al., 2021). Existirían adicionalmente cambios en la liberación de calcio de las mitocondrias y en el metabolismo de este elemento químico (Ramezani et al., 2022) (Figura 2).

Gran parte de los investigadores sugieren entonces que los efectos positivos de la FBM en el cerebro podrían explicarse únicamente por el incremento del flujo sanguíneo cerebral, la mayor disponibilidad y consumo de oxígeno, la mejora de la producción de ATP y de la actividad mitocondrial. Sin embargo, hay estudios que muestran como exposiciones breves a la luz consiguen efectos duraderos (Hamblin, 2016b). En esta línea ya Tiina Karu introdujo el término “señalización mitocondrial retrógrada” para explicar cómo una sola exposición breve a la luz podía tener efectos en el organismo que durarían horas, días e incluso semanas (Hamblin, 2016a). Dicho efecto duradero, tal y como describe Hamblin (2016b), únicamente podría ser explicado por la activación de vías de señalización y

factores de transcripción que provocarían cambios en la expresión de proteínas cuyo duración en el tiempo sería considerable. Así pues, las investigaciones centradas en el estudio de la FBM han mostrado también otros efectos relevantes que parecen resultar tras el uso de esta técnica. Entre ellos destaca la activación del factor nuclear de transcripción *kappa* B (NF- κ B) el cual da lugar a la replicación del ADN mitocondrial y de genes de activación temprana, la reducción de la expresión de genes pro-apoptóticos, y el aumento en la expresión de genes anti-apoptóticos y el incremento en la expresión de factores neurotróficos (Henderson y Morries, 2017). Por tanto, la FBM sería capaz de reducir la neuroinflamación y la gliosis, de promover la sinaptogénesis, la neurogénesis y de modular las ondas cerebrales (Henderson y Morries, 2017; Nizamutdinov et al., 2020; Zomorodi et al., 2019) (Figura 2).

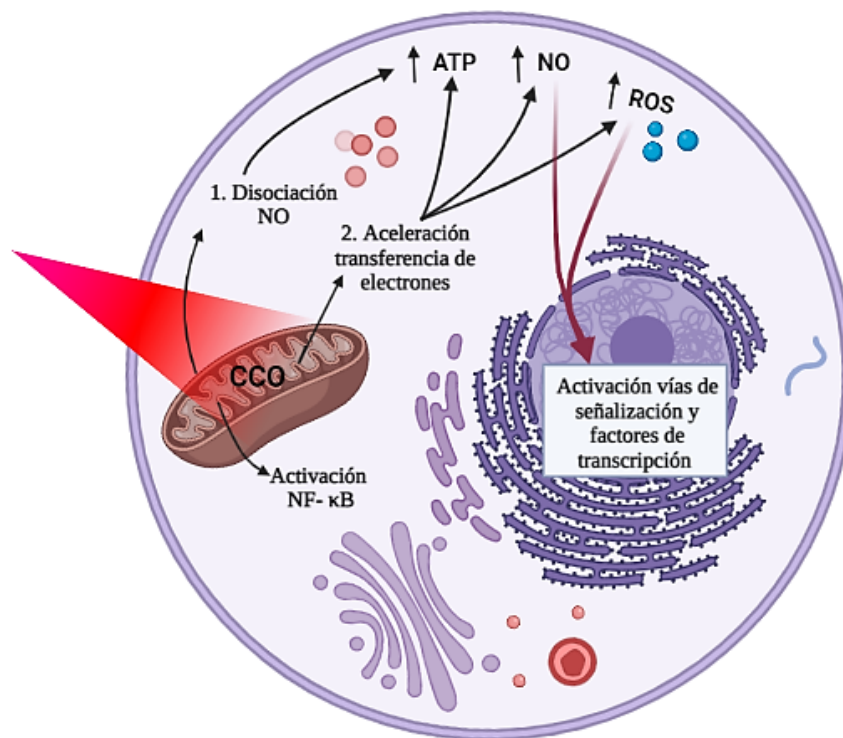


Figura 2. Imagen ilustrativa de las principales hipótesis propuestas acerca de la acción de la FBM en las células. ATP, adenosín trifosfato; CCO, citocromo c oxidasa; NF- κ B, factor nuclear de transcripción *kappa* B; NO, óxido nítrico; ROS, especies reactivas de oxígeno.

En resumen, Hamblin (2016b) agrupa los posibles efectos beneficiosos derivados de la FBM en tres grupos: a corto plazo (flujo sanguíneo, linfático, oxigenación cerebral, ATP, etc.), neuroprotectores (incremento proteínas antiapoptóticas, antioxidantes, menos excitotoxicidad, inflamación, etc.) y por último, efectos que ayudan al cerebro a repararse (neurotrofinas, neurogénesis y sinaptogénesis).

1.3.4 Aplicaciones de la FBM

La FBM está siendo empleada en la investigación y en el tratamiento de múltiples patologías de afectación principalmente encefálica. A día de hoy, los estudios evidencian la eficacia de la FBM en

tres tipos principales de afecciones cerebrales: los eventos traumáticos, las enfermedades neurodegenerativas y los trastornos mentales (Salehpour, Berman, et al., 2021).

El estudio de los efectos de la FBM en sujetos con lesiones cerebrales ha mostrado efectos positivos. La aplicación de la FBM en modelos animales de accidente cerebrovascular produce una mejoría en el funcionamiento general, asociada a un incremento de la proliferación celular. Además, se ha confirmado que su empleo permite la reparación de nervios dañados, la restauración del flujo sanguíneo cerebral y la estimulación de la neurogénesis, sinaptogénesis, migración de neuronas, etc. (Hamblin, 2018b; M. Yang et al., 2021). El uso de la FBM en humanos que han sufrido accidente cerebrovascular, sin embargo, ha arrojado únicamente una leve mejoría no significativa (M. Yang et al., 2021). Por otro lado, su aplicación en modelos de lesiones traumáticas ha mostrados una disminución de los síntomas asociados a la lesión, mejoras cognitivas y un incremento en la calidad de vida (Morries et al., 2015). Además, se ha visto que la FBM es capaz de acelerar la velocidad de regeneración de los nervios y mejorar la supervivencia de las neuronas axotomizadas (Ramezani et al., 2022).

El empleo de la FBM en las enfermedades neurodegenerativas ha reportado resultados beneficiosos. Múltiples estudios han mostrado una mejoría en las habilidades cognitivas, en el sueño y en la calidad de vida, junto con una reducción de la inflamación cortical, del estrés oxidativo y un aumento en la perfusión cerebral tras el uso de la FBM en sujetos con demencia (Salehpour, Khademi, et al., 2021). Del mismo modo, estudios con modelos animales de Alzheimer y Parkinson han comprobado un aumento de la función mitocondrial, una reducción en la acumulación de proteínas específicas y del estrés oxidativo y una supresión de la inflamación gracias a la FBM. Dichos cambios se acompañarían con mejoras en la función conductual y cognitiva, en la memoria y en el aprendizaje espacial (Bathini et al., 2020).

Estos estudios, junto con otros que no se han incluido en este apartado, muestran como la FBM parece inducir una amplia gama de beneficios en múltiples condiciones médicas sin ningún riesgo grave de efectos adversos. Adicionalmente, también se ha estudiado en profundidad el posible empleo de la FBM en el ámbito de los trastornos psicológicos o psiquiátricos arrojando efectos positivos. Sin embargo, todo parece indicar que los parámetros seleccionados, las características de la FBM, juegan un papel esencial en la consecución de dichos beneficios.

1.3.5 Periodo postnatal

El desarrollo del sistema nervioso depende de la interacción continua de numerosos procesos que tienen su inicio en la etapa fetal. Algunos de estos procesos son completados previo al nacimiento mientras que otros, sin embargo, continúan en el periodo postnatal extendiéndose, incluso, hasta la edad adulta (Tsujimoto, 2008). Durante dicha etapa, existe una enorme expresión dinámica de genes y cambios en la metilación del ADN que dan lugar a múltiples efectos en la neurogénesis, sinaptogénesis

y en la formación general de los circuitos neuronales (Simmons et al., 2013). Todo esto hace que el periodo postnatal sea considerado una fase crítica para el desarrollo cerebral de los mamíferos. Tanto es así que, en estos primeros momentos de la vida, el cerebro es extremadamente vulnerable y su desarrollo y funcionamiento pueden verse perturbados por las adversidades tempranas las cuales podrían inducir cambios dramáticos en la plasticidad del cerebro y precipitar el desarrollo de trastornos cognitivos y del estado de ánimo en periodos posteriores (Calabrese et al., 2013; Lopatina et al., 2021).

Los estudios realizados con modelo de roedor, concretamente con ratas, han mostrado como las tres primeras semanas postnatales son esenciales para el desarrollo del sistema neural de estos animales ya que se producen cambios radicales en la conectividad sináptica, en la respuesta neuroendocrina y en la expresión génica neural global (Simmons et al., 2013). En este periodo existe, además, un aumento en los niveles de ARN mensajero y del factor neurotrófico derivado del cerebro (*BDNF*, por sus siglas en inglés correspondientes a *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) en múltiples estructuras cerebrales, los cuales se ven disminuidos en la fase de envejecimiento, y se han registrado modificaciones en varios sistemas de neurotransmisores (Karege et al., 2002; Mengler et al., 2014; Miki et al., 2014). Así pues, los niveles adultos de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) de la corteza temporal son alcanzados en el día postnatal (DPN) 28 y existe un continuo incremento de los receptores de glutamato hasta el DPN 50 (Miki et al., 2014). Cabe señalar que la longevidad de los roedores y, concretamente de las ratas (*Rattus norvegicus*), las cuales han sido sujeto experimental en esta tesis doctoral, es de aproximadamente dos años. Al hacer referencia a periodos adultos se aludirá en este trabajo al periodo posterior a los dos meses de edad mientras que, si se refiere al periodo juvenil o a ratas jóvenes, se tratará de la etapa comprendida entre el DPN 18 y el DPN 41 (Bell, 2018).

Este periodo vital es caracterizado por la presencia de neurogénesis y gliogénesis, migración y diferenciación celular y la rápida formación de sinapsis junto con su remodelación y eliminación (V. S. Chen et al., 2017; Miki et al., 2014). Así pues, en el modelo de rata, el incremento más rápido en la densidad axonal se produce entre el DPN 6 y el DPN 18, seguido de un pico de desarrollo de las dendritas entre el DPN 18 y el DPN 24 (Eayrs y Goodhead, 1959). El aislamiento de las fibras nerviosas (mielinización) es más marcado en esta etapa y se extiende más allá de los dos meses de edad (Mengler et al., 2014). Se ha visto, además, que el metabolismo energético celular está madurando en este periodo y no alcanza las características de las mitocondrias adultas hasta alrededor del DPN 30 (Kalous et al., 2001). Sin embargo, todos estos procesos no se inician al mismo tiempo, sino que se ha demostrado que las regiones cerebrales tienen tiempos de maduración individuales, siendo la corteza prefrontal (PFC) una de las más tardías (Mengler et al., 2014; Tsujimoto, 2008). Por consiguiente, se ha determinado que entre el DPN 25 y el DPN 35 se produce la especialización, la maduración estructural, de las redes neuronales del PFC en el modelo de rata, maduración relativamente tardía en comparación con otras estructuras corticales (Kolk y Rakic, 2022; Miki et al., 2014). Finalmente, la

corteza cerebral de la rata no estaría completamente desarrollada hasta no alcanzar los tres meses de edad aproximadamente (Mengler et al., 2014; Miki et al., 2014).

Todos estos procesos previamente mencionados, además de otros no recogidos aquí, permiten la adaptación de un cerebro inmaduro particularmente vulnerable al nuevo entorno en el que va a desarrollarse y vivir (Calabrese et al., 2013).

1.3.6 Desarrollo y FBM

El empleo de la FBM en las primeras etapas del desarrollo constituye un nuevo campo de estudio el cual está aún por explorar y son escasas las investigaciones dedicadas a examinar el efecto de la luz roja o NIR en el desarrollo prenatal o postnatal. Sviridova-Chailakhyan et al. (2008) estudiaron los efectos de una luz artificial con un componente naranja-rojo sobre embriones de ratón in vitro. Los resultados mostraron una mayor estimulación del desarrollo y una mejor preimplantación embrionaria en el grupo que había sido radiado. En esta misma línea los estudios, de Buzzá et al. (2018) pusieron de manifiesto la capacidad de la FBM para modular el desarrollo de pollos en gestación y, a dichos resultados, el equipo de El-Hussein et al. (2019) añadieron la consecución de alteraciones irreparables en el desarrollo de pollos tras el uso de dosis altas de láser

Del mismo modo, la aplicación de la FBM en la etapa postnatal ha sido mínimamente estudiada, a pesar de que el estudio de Buzzá et al. (2019) ha mostrado resultados prometedores. Este equipo encontró que, tras la aplicación de luz roja en un modelo de rata desde el DPN dos hasta el DPN 13, se conseguía alcanzar un peso más elevado y una apertura de ojos más rápida, con ausencia de alteraciones sanguíneas, en el grupo radiado. Los resultados mostraban entonces, una maduración más temprana con ausencia de daños en los sujetos tratados con FBM.

2 Planteamiento y objetivos

Como puede derivarse de la introducción planteada, la FBM es una técnica relativamente reciente la cual ha mostrado efectos beneficiosos en múltiples campos biomédicos y ha arrojado resultados positivos en una gran variedad de patologías y trastornos de diferente naturaleza. Su aplicación en el sistema nervioso central, utilizando diversos parámetros de FBM, parece ser una herramienta óptima para modular la actividad cerebral y por consiguiente las funciones cognitivas y conductuales que de esta se deriva. Por otro lado, el periodo postnatal se presenta como una etapa de alta plasticidad y respuesta cerebral la cual podría ser un prometedor escenario de aplicación de la TFBM. Dadas dichas premisas presentadas, esta tesis doctoral tendrá como objetivo principal el desarrollo de diferentes estudios para tratar de aportar nuevos datos y de aumentar los conocimientos sobre los efectos de la TFBM sobre la actividad cerebral y la conducta de sujetos con ausencia de patologías. Para ello, se han planteado los subobjetivos que se presentan a continuación:

1. Revisar las investigaciones publicadas hasta el año 2019 acerca de los efectos de la FBM en la modulación de los procesos cognitivos y el tratamiento de los trastornos psicológicos para analizar sus resultados y recopilar las características de los parámetros de FBM empleados (Publicación 1).
2. Evaluar los efectos de la FBM sobre el sistema nervioso central en desarrollo de machos y hembras jóvenes (periodo juvenil) con ausencia de patologías a través del estudio cerebral de la actividad metabólica oxidativa y la activación de genes tempranos (Publicación 2).
3. Analizar la seguridad de la FBM sobre el tejido cerebral en desarrollo mediante el análisis de la densidad de células gliales (microglía y astrocitos) en machos jóvenes sanos (Publicación en preparación).
4. Evaluar la memoria de referencia espacial mediante dos protocolos espaciales con distinto grado de dificultad en machos y hembras jóvenes (Publicación 4).
5. Estudiar los efectos de la FBM sobre la ejecución de una tarea de memoria de referencia espacial con alto grado de dificultad, así como sobre el sistema nervioso central en desarrollo mediante el estudio del metabolismo oxidativo cerebral subyacente en machos y hembras jóvenes sin patologías (Publicación en preparación).
6. Examinar los resultados de la FBM sobre el sistema nervioso central en desarrollo a nivel emocional, motor y social en machos jóvenes (Publicación en preparación).
7. Estudiar los efectos de la FBM sobre redes cerebrales funcionalmente no activas y sobre redes cerebrales activas durante la realización de una tarea de aprendizaje reverso, mediante el análisis de la actividad metabólica cerebral en sujetos machos adultos (Publicación 3).

3 Material y métodos

3.1 Revisión sistemática

Para la consecución del *objetivo 1* (Publicación 1) de la presente Tesis Doctoral, se llevó a cabo una revisión sistemática en la que se incluyeron todo tipo de documentos publicados hasta el 1 de enero de 2020 cuya temática principal fuera la intervención de trastornos psicológicos y/o la modulación de las funciones cognitivas mediante FBM. Se utilizaron las palabras clave *Low Level Light Therapy; Low-Level Light Therapy; Photobiomodulation Therapy; Photobiomodulation Therapies; LLLT; Low Level Laser Therapy; Low Level Laser Therapies; Low-Level Laser Therapy; Low Power Laser Therapy; Low-Power Laser Therapy; Laser Biostimulation and Laser Phototherapy* las cuales fueron empleadas en las bases de datos *Pubmed, Scopus, Google Scholar, Web of Science (WOS)* y *ScienceDirect*. Una vez realizada la búsqueda, un total de 1.111 documentos fueron obtenidos los cuales, tras ser revisados en profundidad y siguiendo los criterios de inclusión y de exclusión, únicamente 36 fueron finalmente seleccionados (Publicación 1).

3.2 Animales de experimentación

Para la realización de los estudios experimentales llevados a cabo (*Objetivos 2, 3, 4, 5 y 6*) se emplearon ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa *Wistar*, machos y hembras, jóvenes, con edades comprendidas entre los 23 y los 29/30 DPN. Los machos presentaban un peso medio de 61,04 g en la finalización de los experimentos mientras que en el caso de las hembras el peso medio fue de 58,17 g. Adicionalmente, fueron también utilizadas ratas adultas macho de la cepa *Wistar* con tres meses de edad, cuyo peso medio a la finalización de los experimentos fue de 309,5 g (*Objetivo 7*). Los animales, procedentes del Bioterio de la Universidad de Oviedo y del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla, fueron estabulados en grupos de cuatro o cinco sujetos por jaula (55 x 38 x 22 cm) y ubicados en una sala con una temperatura constante de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, una humedad relativa de $65 \pm 75\%$ y un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (luz: 8:00-20:00 h; 20:00-8:00 h). La manipulación animal y los procedimientos realizados en este estudio fueron llevados a cabo de acuerdo con la Directiva Europea 2010/63/UE y el Real Decreto 53/2013 (BOE-A-2013-1337) del Gobierno de España y aprobados por el Comité de Ética del Principado de Asturias.

La ejecución de los procedimientos realizados se llevó a cabo en horario de mañana, entre las 8:00 h y las 14:00 h y, previo al inicio de cada estudio, los animales fueron habituados al investigador y al procedimiento correspondiente en cada caso.

3.3 Diseño de las investigaciones experimentales

El conjunto de estudios experimentales llevados a cabo en la presente tesis doctoral puede ser dividido en dos grandes bloques cuyos diseños experimentales serán resumidos en este apartado.

1) Estudio del efecto de la FBM en sujetos jóvenes

El primer bloque se refiere a los experimentos centrales de esta tesis doctoral cuyo objetivo es evaluar, tanto a nivel conductual como de funcionamiento cerebral, los posibles efectos moduladores de la FBM tras su aplicación en sujetos jóvenes. Dichos experimentos serán descritos en el orden que se muestra a continuación para facilitar la comprensión del lector:

- I. Estudio del funcionamiento cerebral mediante el análisis de la actividad metabólica y la activación de genes tempranos en las regiones prefrontales e hipocampales de ratas macho y hembra sanas con edades comprendidas entre los 23 DPN y los 29 DPN tras la aplicación de la FBM. Para ello, se administró la FBM de manera manual durante 5 días consecutivos (30 minutos/día) tratando de alcanzar regiones frontales y, al finalizar dicho procedimiento, se llevó a cabo la técnica histoquímica de la CCO y la inmunocitoquímica de la c-Fos para evaluar la actividad metabólica y la expresión de genes de activación temprana, respectivamente (Figura 3). Grupos de machos y hembras: PBM, administración de la FBM; PBMD, grupo control de la técnica: mismas condiciones que el grupo MFBM, pero con el dispositivo lumínico apagado; C, grupo control basal.

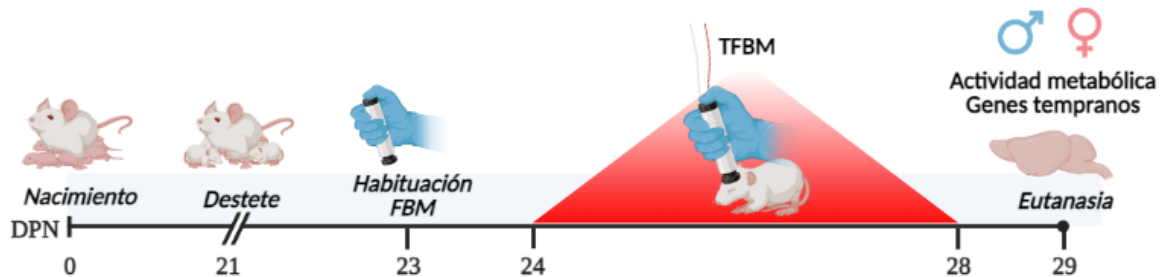


Figura 3. Diseño experimental del estudio del efecto de la FBM en el funcionamiento cerebral de jóvenes de ambos sexos. La aplicación de la FBM se realizó desde el DPN 24 al DPN 28, realizándose la eutanasia en el DPN 29. Posteriormente, se analizó la actividad metabólica y la expresión de genes tempranos. DPN, día postnatal; FBM, fotobiomodulación; TFBM, terapia de fotobiomodulación.

- II. Estudio de la seguridad de la FBM sobre el tejido cerebral mediante el análisis de la densidad de células gliales (microglía y astrocitos), marcadores de cambios dañinos en el sistema nervioso, en ratas macho sanas con edades comprendidas entre los 23 DPN y los 29 DPN (Figura 4). Grupos: MFBM-CG, administración de la FBM; MDFBM-CG, grupo control de la técnica: mismas condiciones que el grupo MFBM-CG, pero con el dispositivo lumínico apagado; MC-CG, grupo control basal.

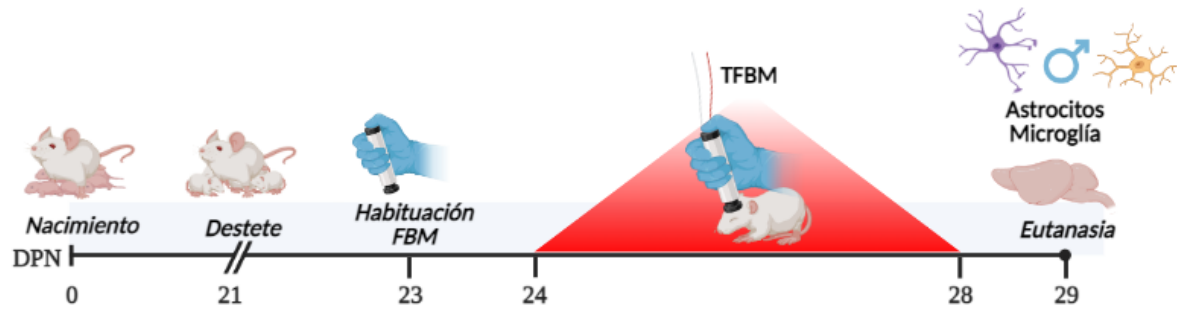


Figura 4. Diseño experimental del estudio de la seguridad de la FBM en el cerebro de ratas macho jóvenes. La aplicación de la FBM se realizó desde el DPN 24 al DPN 28, realizándose la eutanasia en el DPN 29. Posteriormente, se analizó la densidad de células gliales (microglía y astrocitos). DPN, día postnatal; FBM, fotobiomodulación; TFBM, terapia de fotobiomodulación.

- III. Evaluación de la memoria de referencia espacial mediante dos protocolos conductuales con distinto grado de dificultad (“fácil”/”difícil”) en machos y hembras sanas con edades comprendidas entre los 23 DPN y los 30 DPN. Para ello, se entrenaron ratas de ambos sexos en dos protocolos de memoria de referencia espacial utilizando el MWM: protocolo fácil en el que se realizaban cuatro ensayos al día durante cinco días consecutivos y protocolo de mayor dificultad (difícil) en el que se llevaban a cabo dos ensayos al día durante siete días consecutivos (Figura 5). Grupos protocolo fácil: M-MRF, machos; F-MRF, hembras. Grupos protocolo difícil: M-MRD, machos; F-MRD, hembras.

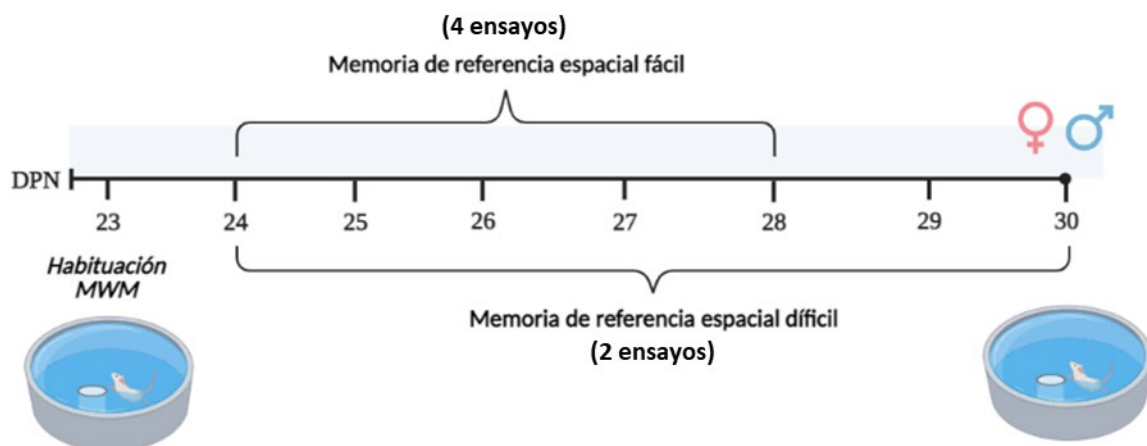


Figura 5. Diseño experimental de la evaluación de la memoria de referencia espacial mediante dos protocolos conductuales con distinto grado de dificultad (fácil/difícil) en machos y hembras. El protocolo fácil comprendía cuatro ensayos al día durante cinco días (DPN24-DPN28) mientras que el protocolo difícil constaba de dos ensayos al día durante siete días (DPN24-DPN30). DPN, día postnatal; MWM, laberinto acuático de Morris.

- IV. Análisis de los efectos de la FBM en la ejecución de una tarea de memoria de referencia espacial (protocolo difícil) y en la actividad cerebral subyacente, en una muestra de ratas macho con edades comprendidas entre los 23 DPN y los 29 DPN. Para ello, se administró la FBM de manera manual durante 5 días consecutivos (30 minutos/día) tratando de alcanzar regiones frontales y, simultáneamente, se llevó a cabo el entrenamiento de dichos animales durante cinco días, dos ensayos al día, en el MWM. Posteriormente, se realizó el análisis de la actividad metabólica cerebral subyacente a dicho aprendizaje, mediante la evaluación de la actividad de la CCO (Figura 6). Grupos: MFBM-MR, administración de la FBM simultáneo a la ejecución del protocolo conductual; MDFBM-MR, grupo control de la técnica: mismas condiciones que el grupo MFBM, pero con el dispositivo lumínico apagado; MC3, grupo control basal.
- V. Análisis de los efectos de la FBM en la ejecución de una tarea de memoria de referencia espacial (protocolo difícil) y en la actividad cerebral subyacente, en una muestra de ratas hembra con edades comprendidas entre los 23 DPN y los 29 DPN. Para ello, se administró la FBM de manera manual durante 5 días consecutivos (30 minutos/día) tratando de alcanzar regiones frontales y, simultáneamente, se llevó a cabo el entrenamiento de dichos animales durante cinco días, dos ensayos al día, en el MWM. Posteriormente, se realizó el análisis de la actividad metabólica cerebral subyacente a dicho aprendizaje, mediante la evaluación de la actividad de la CCO (Figura 6). Grupos: FFBM-MR, administración de la FBM simultáneo a la ejecución del protocolo conductual; FDFBM-MR, grupo control de la técnica: mismas condiciones que el grupo MFBM, pero con el dispositivo lumínico apagado; FC2, grupo control basal.

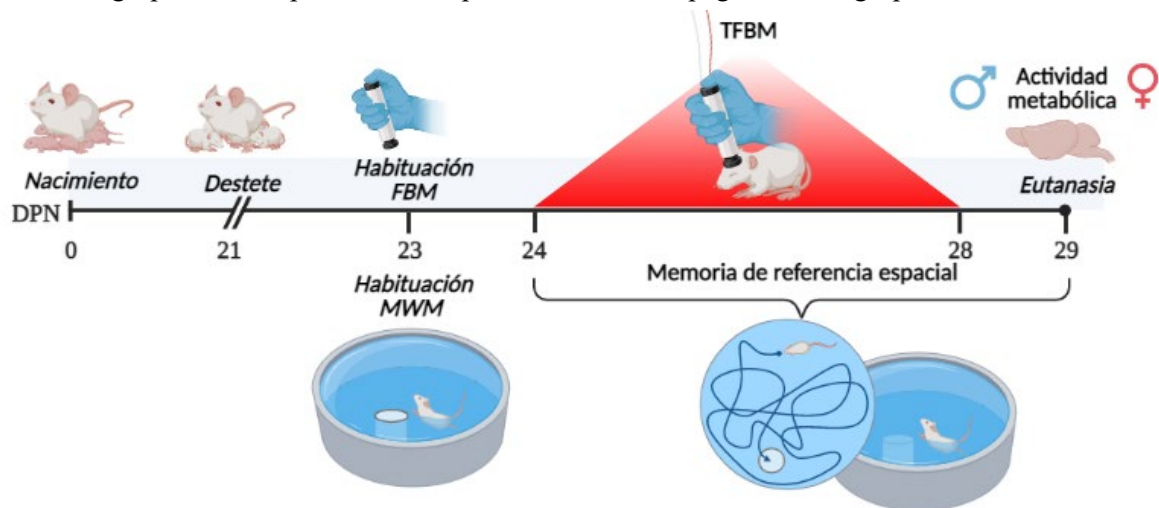


Figura 6. Diseño experimental del análisis de los efectos de la FBM en la ejecución de una tarea de memoria de referencia espacial (protocolo difícil) y en la actividad cerebral subyacente en ambos sexos. La aplicación de la FBM se realizó desde el DPN 24 al DPN 28, realizándose la eutanasia en el DPN 29. Simultáneamente los animales se entrenaron en una prueba de memoria de referencia espacial y finalmente, se analizó la actividad metabólica subyacente. DPN, día postnatal; FBM, fotobiomodulación; MWM, laberinto acuático de Morris; TFBM, terapia de fotobiomodulación.

VI. Evaluación de los efectos de la FBM sobre conductas de tipo ansioso, motoras y de reconocimiento social en ratas macho con edades comprendidas entre los 23 DPN y los 29 DPN. Para ello, se administró la FBM de manera manual durante 5 días consecutivos (30 minutos/día) tratando de alcanzar regiones frontales. Durante los últimos días de tratamiento se llevó a cabo la evaluación de las conductas de tipo ansioso mediante el uso del laberinto en cero elevado, el examen de la actividad y la coordinación motora utilizando el rotarod y finalmente, la evaluación de la preferencia por la novedad social mediante el uso del test de las tres cámaras (Figura 7). Grupos: MFBM-AMS, administración de la FBM simultáneo a la ejecución de los paradigmas conductuales; MDFBM-AMS, grupo control de la técnica: mismas condiciones que el grupo MFBM, pero con el dispositivo lumínico apagado; MCC-AMS, grupo control aprendizaje sometido a los mismos test conductuales.

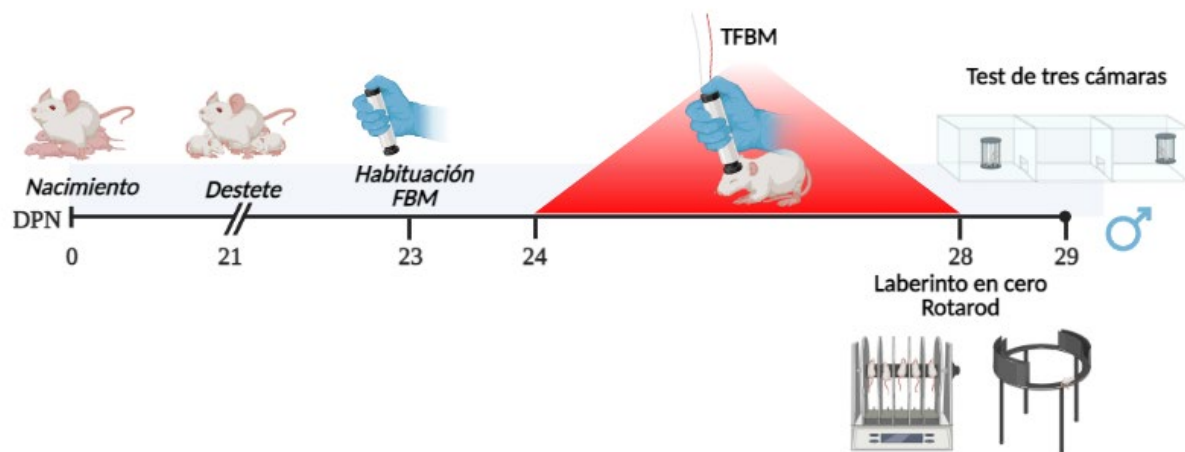


Figura 7. Diseño experimental del estudio de los efectos de la FBM sobre conductas de tipo ansioso, motoras y de reconocimiento social en ratas macho. La aplicación de la FBM se realizó desde el DPN 24 al DPN 28 y en los últimos días, DPN 28 y 29, los animales se sometieron al laberinto en cero elevado, rotarod y el test de tres cámaras. DPN, día postnatal; FBM, fotobiomodulación; TFBM, terapia de fotobiomodulación.

2) Estudio del efecto de la FBM en sujetos adultos

El segundo, y último bloque, se refiere al estudio adicional realizado con el objetivo de evaluar tanto a nivel conductual como de funcionamiento cerebral, los posibles efectos moduladores de la FBM en sujetos adultos. Se llevó a cabo la investigación que se describe brevemente a continuación:

I. Análisis de los efectos de la FBM sobre la actividad metabólica cerebral de machos adultos controles y de machos adultos entrenados en una tarea de aprendizaje reverso, índice de flexibilidad cognitiva. Para ello, se aplicó la FBM en el primer tercio encefálico de todos los sujetos durante 5 días consecutivos (60 minutos/día). Simultáneamente a la aplicación de la

técnica, parte de la muestra de este estudio fue sometida a un entrenamiento en una tarea de aprendizaje reverso en el MWM. Finalmente se realizó el análisis de la actividad metabólica cerebral de todos los sujetos mediante la evaluación de la actividad de la CCO (Figura 8). Grupos: BC+PBM: administración de la FBM simultaneo a la realización del protocolo de aprendizaje reverso; BC: ejecución del protocolo de aprendizaje reverso, control conductual del grupo BC+PBM; C+PBM: administración de la FBM; C: control basal del grupo C+PBM.

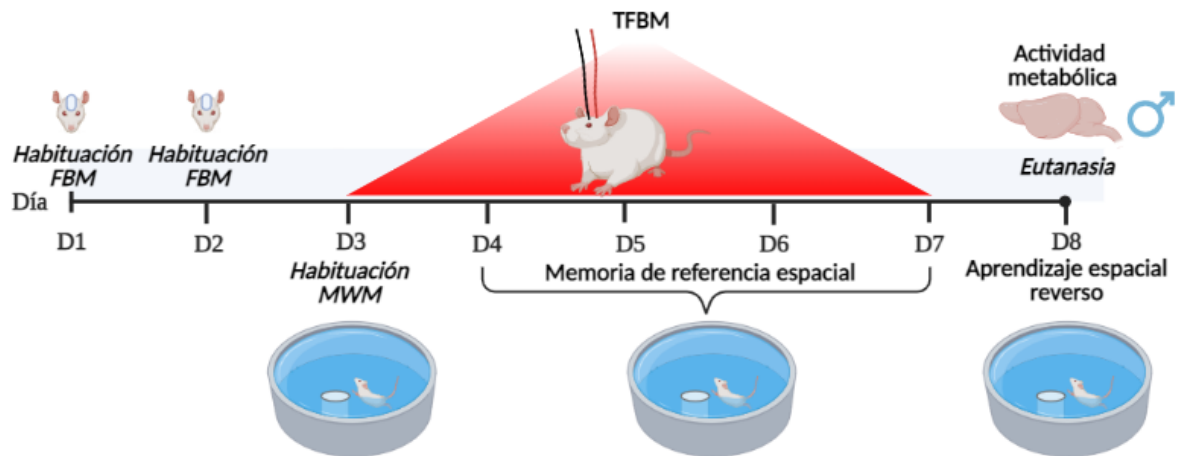


Figura 8. Diseño experimental del estudio de los efectos de la FBM en la actividad metabólica cerebral de machos adultos controles y de machos adultos entrenados en una tarea de aprendizaje reverso. La FBM fue aplicada en todos los sujetos durante cinco días. Los grupos conductuales fueron sometidos a una tarea de aprendizaje reverso tras cuatro días de entrenamiento simultáneos a la aplicación de la FBM. D, día; FBM, fotobiomodulación; MWM, laberinto acuático de Morros; TFBM, terapia de fotobiomodulación.

Para facilitar la comprensión de las investigaciones llevadas a cabo, así como de los grupos de sujetos utilizados, el tipo de muestra y los objetivos en cada estudio, en la tabla 1 presentada a continuación, se resume la información esencial de cada trabajo.

Tabla 1: Resumen de las investigaciones desarrolladas en la presente tesis doctoral.

Experimentos	Muestra	Estudio	Grupos/Sujetos	Sexo	Investigación/ Objetivo
Bloque I	<i>Jóvenes</i>	I (P.2)	C: <i>n</i> =11 PBMD: <i>n</i> =10 PBM: <i>n</i> =10	Machos	FBM: efecto en actividad metabólica cerebral y activación genes tempranos (Obj. 2)
			C: <i>n</i> =10 PBMD: <i>n</i> =10 PBM: <i>n</i> =10	Hembras	
		II	MC-CG: <i>n</i> =6 MDFBM-CG: <i>n</i> =6 MFBM-CG: <i>n</i> =6	Machos	FBM: análisis astrocitos y microglía cerebral (Obj. 3)
		III (P. 4)	M-MRF: <i>n</i> =9 M-MRD: <i>n</i> =9	Machos	MR dos grados de dificultad (fácil/difícil) (Obj. 4)
			F-MRF: <i>n</i> =8 F-MRD: <i>n</i> =13	Hembras	
		IV	MC: <i>n</i> =10 MDFBM-MR: <i>n</i> =10 MFBM-MR: <i>n</i> =11	Machos	FBM: efecto en MR protocolo difícil y en actividad CCO subyacente (Obj. 5)
V	FC: <i>n</i> =11 FDFBM-MR: <i>n</i> =12 FFBM-MR: <i>n</i> =12	Hembras	FBM: efecto en MR protocolo difícil y actividad CCO subyacente (Obj. 5)		
VI	MCC-AMS: <i>n</i> =8 MDFBM-AMS: <i>n</i> =8 MFBM-AMS: <i>n</i> =8	Machos	FBM: examen conductas ansiosas, motoras y de reconocimiento social (Obj. 6)		
Bloque II	<i>Adultos</i>	I (P. 3)	C: <i>n</i> =7 C+PBM: <i>n</i> =8 BC: <i>n</i> =6 BC+PBM: <i>n</i> =7	Machos	FBM: análisis conductual y de CCO en muestra control y en muestra ejecutando tarea de AR (Obj. 7)

AR: aprendizaje reverso; CCO: citocromo C oxidasa; FBM: fotobiomodulación; Obj: objetivo; MR: memoria de referencia.

3.4 Técnica de FBM

El procedimiento de aplicación de la técnica de FBM, así como algunos de los parámetros lumínicos, sufrieron variaciones entre los trabajos recogidos en esta tesis doctoral con el fin de alcanzar un modo óptimo de aplicación y, adicionalmente, en algunos casos, fueron adaptados al tamaño y al momento del desarrollo en el que se encontraban los individuos. Los factores comunes a todos ellos fueron los elementos que formaban el sistema de estimulación lumínica: un generador que proporcionaba la estimulación a través de una red de cables, un interruptor que permitía iniciar la administración de la luz y finalmente, un estimulador que permitía el suministro de láser con un tipo de onda pulsátil.

Previo a la aplicación de la técnica, todos los animales pertenecientes a los grupos experimentales FBM/PBM y a los grupos control de la técnica (DFBM/PBMD), tanto jóvenes como adultos, fueron sometidos a un proceso de habituación. Dicha habituación, así como el completo proceso de FBM, se realizaron en el periodo matutino y su uso no conllevó ninguna alteración en los animales siendo bien tolerada por todos ellos. A continuación, siguiendo los estudios presentados en el apartado 3.3, se procederá a describir de manera detallada el modo de administración en cada caso.

3.4.1 Protocolo de FBM en estudios con sujetos jóvenes

Los animales jóvenes de los grupos FBM/PBM y DFBM/PBMD de los estudios I, II, IV, V y VI, fueron sometidos a un protocolo de siete días de FBM el cual se inició en el DPN 22. Los primeros dos días fueron dedicados a la habituación de los animales al experimentador y al procedimiento, y en los cinco días restantes se procedió a la aplicación de la técnica.

En el primer día de habituación, se llevó a cabo la familiarización de los animales con el experimentador a través del manejo y manipulación de estos. A continuación, se procedió a la rasuración del pelo y localización del área craneal deseada para la colocación manual del dispositivo de FBM. La región seleccionada fue el área localizada entre los ojos del animal, tratando así de focalizar nuestra intervención en el córtex prefrontal de los sujetos. Finalmente, en el segundo y último día de habituación (DPN 23), los animales fueron habituados al procedimiento que requiere la FBM mediante el manejo, inmovilización y colocación del dispositivo apagado en la zona objetivo. Dicha habituación al dispositivo se realizó de manera manual en una sala contigua al bioterio, la cual fue utilizada durante el resto de los días para la continuación del estudio. La investigadora era la encargada de inmovilizar manualmente a cada sujeto de manera individual encima de una superficie blanda y de situar en la zona de interés el dispositivo de radiación apagado, tratando de reducir al máximo posible cualquier factor estresante y evitando ocasionar cualquier daño a los sujetos. Este dispositivo estaba formado por un tubo circular (colimador) dentro del cual se encontraba el estimulador laser. Además, en la parte final del colimador se encontraba una lente y una almohadilla que evitaba, si existiesen, problemas térmicos al impedir el contacto directo del colimador con la piel del animal. La duración y el proceso de

habituaación al dispositivo se llevó a cabo de manera idéntica a la futura aplicación de la técnica: cada animal recibió tres sesiones de 10 minutos cada una, durante el periodo matutino, hasta alcanzar un total de 30 minutos por animal. Entre cada sesión, el animal correspondiente era devuelto a su caja hogar con el resto de sus congéneres y otro sujeto era tomado para continuar con la habituaación.

El día posterior a la finalizaación de la habituaación de los animales se procedió a la aplicaación de la TFBM durante 5 días consecutivos (periodo comprendido entre los DPN 24 y DPN 28). El procedimiento llevado a cabo fue idéntico al realizado durante el segundo día de habituaación en los sujetos pertenecientes al grupo control dispositivo (DFBM). En el caso de los grupos experimentales (FBM), se introdujo una única variación y fue que el dispositivo lumínico se encontraba encendido durante todo el procedimiento. Tal y como se describió anteriormente, los sujetos eran inmovilizados de manera individual en una superficie blanda durante tres sesiones de 10 minutos cada una (30 minutos por animal) y el dispositivo era situado entre los ojos, tratando de alcanzar el córtex prefrontal de los individuos (Figura 9).

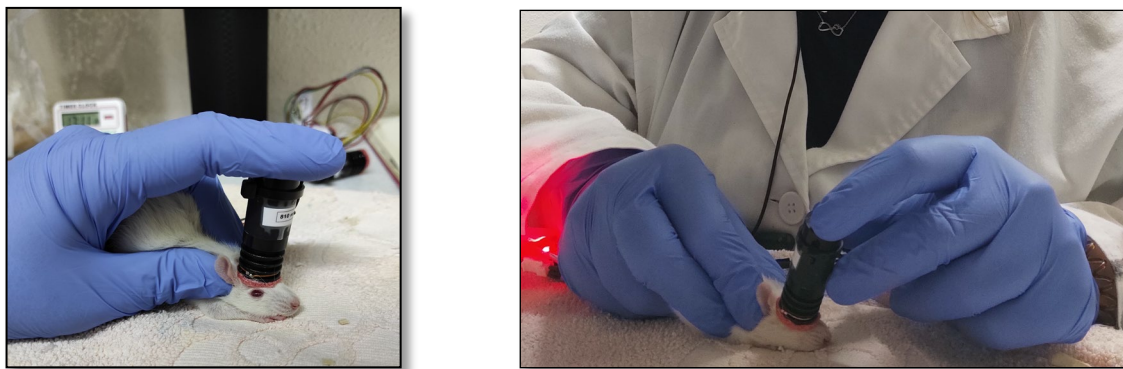


Figura 9. Modo de aplicaación de la FBM en sujetos jóvenes. La FBM era aplicaada entre los ojos del animal mediante su inmovilizaación manual por parte de la investigaadora durante cinco días.

El láser suministrado a los grupos experimentales de FBM estaba constituido por una onda continua cuya longitud era de 810 nm y un tamaño de haz de 0,0495 cm². Durante cada sesión de 30 min, los animales recibían 36 ciclos de estimulaación en los cuales el dispositivo se encontraba 40 segundos (s) encendido y 10 s apagado, alcanzando un tiempo total de radiación de 24 minutos. La densidad de energía aplicaada en estos ciclos era de 46,50 J/cm² con una potencia de salida de 40 mW y una irradiancia de 65,60 W/m². Aproximadamente, el 0,8% de la potencia aplicaada alcanzaría el tejido encefálico.

3.4.2 Protocolo de FBM en sujetos adultos pertenecientes al estudio I.

Los animales adultos pertenecientes a los grupos C+PBM y BC+PBM del estudio I, fueron sometidos a un protocolo de radiación el cual presentaba variaciones, con respecto al resto de estudios, en el modo de aplicaación y en los parámetros a utilizar. Este protocolo tuvo una duración de ocho días,

siendo los tres primeros días dedicados a la habituación de los animales y los cinco días restantes a la aplicación de la terapia.

En el primer día de habituación, se llevó a cabo la familiarización de los animales con la experimentadora a través del manejo y manipulación de estos y se procedió a la estabulación individual de los sujetos. Dicha estabulación se realizó en jaulas de metacrilato (55 cm x 45 cm x 45 cm) situadas en una sala contigua al bioterio en las cuales los animales podían moverse libremente y disponían de agua y comida *ad libitum*. Estas jaulas contaban con dos accesos, uno en la parte frontal que permitía el contacto con el animal y otro en la zona superior a través del cual se introducía y se retiraba el dispositivo de luz.

En el segundo día de habituación, se procedió a la rasuración del cuero cabelludo de la zona de interés siendo esta el primer tercio de la cabeza, región posterior a la zona ocular, tratando de alcanzar regiones frontales. Tras la rasuración del pelo, se continuó con la adhesión de una pieza de velcro negra en la zona de interés de la cabeza a la cual, durante los días siguientes de terapia, fue conectado el dispositivo lumínico. El tercer y último día de habituación, se examinó el estado de los animales para asegurar que la adhesión de la pieza no había producido ningún tipo de daño o de situación estresante.

Durante los cinco días siguientes, se procedió a la aplicación de la TFBM. El suministro de luz se realizó mediante la conexión directa del estimulador laser a la pieza de velcro situada en la cabeza del animal, la cual presentaba una pequeña abertura que permitía el paso de la luz (Figura 10). Los animales recibieron una hora de terapia al día (10 am – 11 am) durante la cual se administraron 60 ciclos lumínicos en los que el dispositivo se encontraba 20 s encendido y 40 s apagado. La longitud de onda utilizada fue de 1064 nm, la potencia de 30 mW y la densidad de energía de 20 J/cm². Aproximadamente, el 1,1% de la potencia aplicada alcanzaría el tejido encefálico. Durante la aplicación de la luz, los animales podían moverse por la jaula dado que el dispositivo contaba con un extenso cable conectado al generador, que les permitía total libertad de movimientos. Al finalizar la hora de tratamiento, el dispositivo era retirado del velcro.



Figura 10. Modo de aplicación de la FBM en sujetos adultos. La FBM era aplicada mediante la conexión directa del estimulador laser a la pieza de velcro situada en la cabeza del animal, la cual presentaba una pequeña abertura que permitía el paso de la luz, durante cinco días.

3.5 Pruebas conductuales

En el desarrollo de la presente tesis doctoral se llevaron a cabo diversas pruebas conductuales con el fin de conseguir los objetivos planteados.

En el primer bloque de estudios (muestra de animales jóvenes) se evaluó, en primer lugar, la memoria espacial de referencia en dos condiciones distintas: en una muestra de machos y hembras controles utilizando un protocolo con dos grados diferentes de dificultad (fácil/difícil) (Estudio III, publicación 4, *objetivo 4*) y en una muestra de machos y hembras tratados con la TFBM y sometidos a un protocolo de memoria de referencia espacial difícil (Estudio IV y V, *objetivo 5*). Por último, se examinó el efecto de la TFBM en conductas de tipo ansioso, motoras y de reconocimiento social en machos jóvenes (Estudio VI, *objetivo 6*).

En el caso del segundo bloque compuesto por una muestra de animales adultos, se llevó a cabo una prueba conductual de aprendizaje espacial reverso con sujetos tratados con TFBM con el objetivo de analizar si existía alguna alteración en el aprendizaje de este paradigma tras el uso de la técnica (Estudio I, *objetivo 7*). La descripción de todas las pruebas realizadas se presenta en los apartados siguientes.

3.5.1 Laberinto acuático de Morris (MWM)

Para la evaluación de la memoria de referencia espacial en jóvenes (Estudios III, IV y V; *objetivos 4 y 5*) y el aprendizaje de tipo reverso en adultos (Estudio I, *objetivo 7*), se utilizó el laberinto acuático de Morris (MWM). El MWM es un paradigma experimental desarrollado por Richard Morris en 1983 como método de evaluación del aprendizaje espacial en roedores (Morris, 1984). Dicha piscina circular es actualmente uno de los métodos validados más utilizados para la evaluación de diferentes tipos de memoria y aprendizaje espacial, tanto en sujetos adultos como en desarrollo (Tan et al., 2017; Vorhees y Williams, 2006). A continuación, se describe pormenorizadamente el MWM y el protocolo conductual llevado a cabo en cada estudio.

3.5.1.1 Aparato

La evaluación de las diferentes funciones cognitivas se llevó a cabo en un tanque cilíndrico de fibra de vidrio negra con un diámetro de 150 cm y una altura de 40 cm y colocado sobre una plataforma a 35 cm sobre el suelo (Figura 11A). Esta piscina se rellenaba de agua, mantenida siempre a una temperatura constante (22 ± 1 °C), hasta alcanzar una profundidad de 30 cm y en su interior se situaba una plataforma de escape cilíndrica negra de 10 cm de diámetro y 28 cm de altura la cual se mantenía dos cm oculta bajo el nivel del agua. Adicionalmente, en la fase de habituación de los animales, se utilizaba la misma plataforma, pero en este caso, encima de esta era colocada una superficie blanca que hacía a la plataforma visible. La piscina se dividía de manera virtual en cuatro cuadrantes imaginarios (A, B, C y D) en los cuales, en el caso de los ensayos con plataforma, esta era colocada en el centro de uno de ellos. Excepcionalmente en el estudio III y IV perteneciente al bloque I, la piscina fue también dividida imaginariamente en dos regiones adicionales, “zona focal” que correspondía a un área circular de 20 cm de diámetro alrededor de la plataforma y “zona periférica” (Figura 11B). En el estudio IV del bloque I se añadió también una “zona central” la cual comprendería el resto de la piscina que no formaba la zona periférica, incluyendo la zona focal.

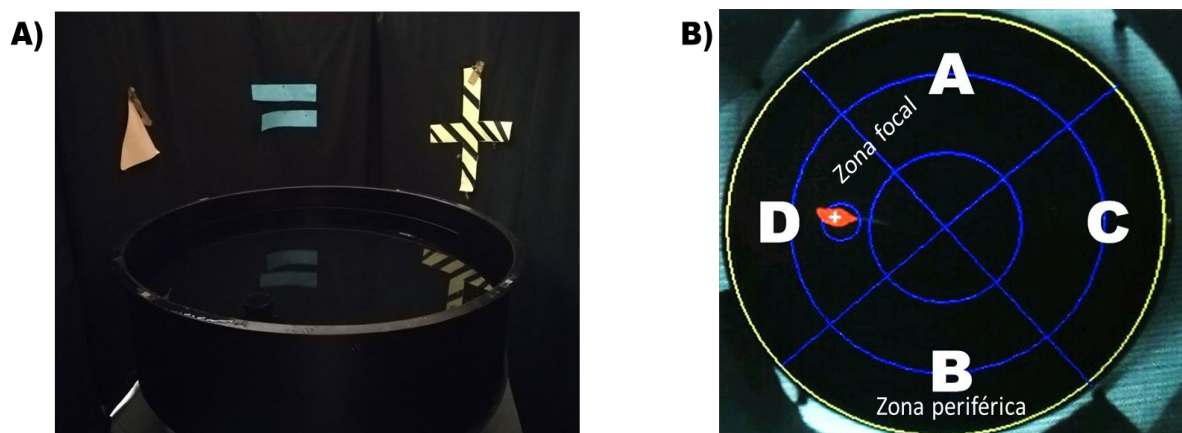


Figura 11. Piscina de Morris empleada en los estudios de memoria de referencia y aprendizaje reverso espacial. A) Vista general del tanque utilizado y su ubicación en la sala. B) Representación de los cuadrantes virtuales en los que se divide la piscina. El elemento rojo indica una rata situada en la plataforma de escape, dentro del cuadrante reforzado.

El tanque estaba situado en el centro de una habitación rectangular de 16 m² iluminada mediante dos lámparas orientadas hacia las paredes las cuales proporcionaban 4.000 lx de luz indirecta. Alrededor de la piscina se colaban paneles negros que servían de soporte de múltiples pistas distales con distintas formas geométricas, volúmenes y colores. Además, en el caso de los estudios con muestras de sujetos jóvenes con el objetivo de facilitar la orientación en el espacio, se utilizaban únicamente dos paneles en los que se colocaban dos pistas distales para que el resto de la habitación fuera visible. En estas paredes también se situaban objetos con diferentes colores, tamaños y volúmenes para que sirvieran como referencia. Todas las pistas permanecían inmutables durante todo el protocolo espacial. La conducta de los sujetos era registrada mediante el uso de una videocámara cenital (*Sony CCD-V88E, España*) situada en el techo de la habitación y conectada a un ordenador equipado con un sistema de seguimiento de video computarizado (*Ethovision XT 14.0, Noldus Information Technologies, Wageningen, Países Bajos*).

Los protocolos empleados en los diferentes estudios compartían una serie de fases y variables básicas las cuales se describirán a continuación, y será en los siguientes apartados donde se podrá encontrar la descripción detallada de cada protocolo. Las medidas conductuales registradas como variables dependientes en todos los estudios fueron la duración o permanencia en cada uno de los cuadrantes, en la zona focal y en la zona periférica (s), la latencia de llegada a la plataforma (s), la velocidad total (cm/s) y la distancia recorrida por los animales (cm).

3.5.1.2 Fase de habituación

Inicialmente, los grupos M-MRF, M-MRD, F-MRF y F-MRD (Estudio III), MDFBM-MR y MFBM-MR (Estudio IV), FDFBM-MR y FFBM-MR (Estudio V) del bloque I y los grupos BC y BC+PBM (Estudio I) del bloque II eran sometidos a una fase de habituación que permitía a los sujetos familiarizarse con el contacto del agua, la actividad de nado y la subida a la plataforma. Esta constaba de cuatro ensayos en los cuales en el centro de la piscina se colocaba una plataforma con una superficie blanca que sobresalía dos cm por encima del nivel del agua y permitía hacerla visible. En todos los ensayos realizados durante los estudios, los animales eran siempre introducidos y colocados en la piscina mirando hacia la pared. En cada ensayo de la habituación, el sujeto era introducido en un cuadrante diferente siguiendo un orden pseudoaleatorio. El tiempo de duración máximo de cada ensayo era de 60 s, tiempo el cual si el animal no era capaz de encontrar la plataforma era guiado hasta esta. Una vez en la plataforma, se le permitía permanecer allí durante 15 s, siendo posteriormente trasladado a un cubo negro hasta el siguiente ensayo el cual comenzaba tras 30 s de espera. Al finalizar la habituación, los animales eran secados cuidadosamente y devueltos a sus respectivas jaulas.

3.5.1.3 Fase de adquisición del aprendizaje de referencia espacial

Al día siguiente tras finalizar la habituación, todos los sujetos de los grupos mencionados anteriormente (M-MRF, M-MRD, F-MRF y F-MRD (Estudio III), MDFBM-MR y MFBM-MR

(Estudio IV), FDFBM-MR y FFBM-MR (Estudio V), BC y BC+PBM (Estudio I)) eran sometidos a un protocolo de adquisición del aprendizaje de referencia espacial de duración variable en función del estudio realizado. Cada día de la fase de adquisición, los animales recibían un número de ensayos determinados (número variable dependiendo del objetivo del estudio) en los cuales la plataforma se mantenía oculta, no visible, al permanecer dos cm por debajo del nivel del agua en el centro del cuadrante D, denominado cuadrante reforzado u objetivo. La entrada a la piscina en cada ensayo se realizaba siguiendo un orden pseudoaleatorio y el tiempo de duración de cada ensayo, el tiempo en la plataforma y el tiempo entre ensayos se mantuvo constante con respecto a la fase de habituación, siendo 60 s, 15 s y 30 s, respectivamente. Tras finalizar los ensayos de esta primera fase, se llevaba a cabo un ensayo de prueba o transferencia del aprendizaje en el cual la plataforma era retirada de la piscina y se liberaba a los sujetos desde el cuadrante C, cuadrante opuesto al cuadrante reforzado (D) donde permanecía la plataforma en los ensayos anteriores. La duración de este ensayo de transferencia fue de 25 s tras los cuales el animal era sacado de la piscina y colocado en el cubo negro durante 30 s. Finalmente, se realizaba un ensayo adicional, ensayo de recuerdo, con la plataforma oculta disponible de nuevo en la posición habitual (cuadrante D) para evitar la posible extinción del aprendizaje. Al igual que en los ensayos anteriores con plataforma, los animales eran liberados cada día desde distintos puntos de la piscina siempre orientados hacia la pared y se les permitía nadar durante 60 s. Tras los ensayos de cada día, los animales eran secados cuidadosamente y devueltos a sus respectivas jaulas.

3.5.1.4 Protocolo de memoria de referencia espacial (bloque I)

Los sujetos jóvenes pertenecientes al bloque I fueron sometidos a un protocolo de memoria de referencia espacial cuya duración y número de ensayos de adquisición fue variable entre los diferentes estudios realizados. El criterio de aprendizaje se mantuvo inmutable durante estos estudios, considerándose alcanzado cuando, durante el ensayo de prueba o transferencia del aprendizaje, los animales permanecían un tiempo significativamente mayor en el cuadrante objetivo (D) que en el resto de los cuadrantes.

En el estudio III, los animales pertenecientes a los grupos M-MRF y F-MRF fueron sometidos a un protocolo de adquisición denominado “protocolo fácil”. Este protocolo tenía una duración total de seis días: un día de habituación el cual se realizó en el DPN 23 y cinco días de adquisición del aprendizaje (DPN24-DPN 28). Cada día se realizaban cuatro ensayos de adquisición seguidos del ensayo de transferencia y de recuerdo. Dicho protocolo fue escogido y denominado “fácil” al ser un protocolo habitual utilizado previamente en nuestro laboratorio y con una alta tasa de éxito en roedores (Méndez, Méndez-López, López, Aller, Arias, y Arias, 2008; Méndez, Méndez-López, López, Aller, Arias, Cimadevilla, et al., 2008) (Figura 12A). Los sujetos de los grupos restantes de este estudio III, M-MRD y F-MRD, realizaron un protocolo de adquisición denominado “protocolo difícil”. En este caso, únicamente se realizaban dos ensayos al día en la fase de adquisición, seguidos del ensayo de transferencia y recuerdo, y la duración total era de ocho días (un día de habituación en el DPN 23 y

siete días de adquisición (PND24-PND30)) (Figura 12B). En este protocolo se redujo el número de ensayos al día con el objetivo de analizar si los animales en desarrollo eran capaces de alcanzar el criterio de aprendizaje con un protocolo más restrictivo en el que recibían un menor número de reforzamientos al día, al mismo tiempo que se añadieron dos días adicionales para examinar minuciosamente su posible mejoría conductual a lo largo del estudio.

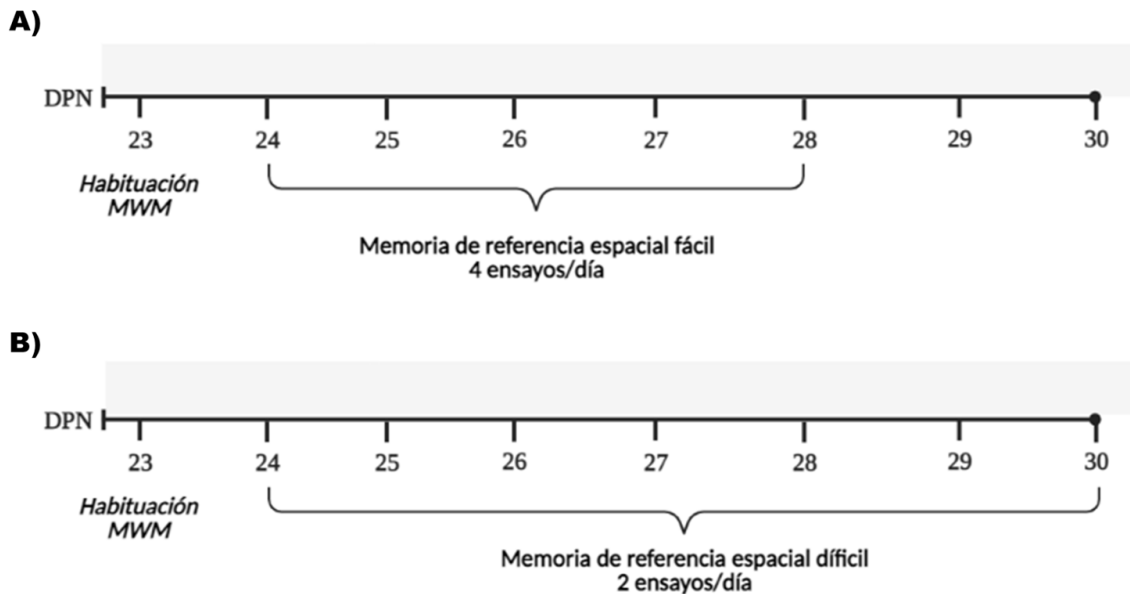


Figura 12. Protocolo de memoria de referencia espacial empleado en el estudio III con muestras de machos y hembras jóvenes. A) Protocolo fácil: cuatro ensayos al día durante cinco días. B) Protocolo difícil: dos ensayos al día durante siete días. DPN, día postnatal; MWM, laberinto acuático de Morris.

Finalmente, los grupos MDFBM-MR y MFBM-MR (Estudio IV) y los grupos FDFBM-MR y FFBM-MR (Estudio V), al igual que los grupos M-MRD y F-MRD del estudio III, fueron sometidos a un “protocolo difícil” de memoria de referencia espacial con dos ensayos al día, pero, en este caso, la duración total del protocolo fue de siete días (un día de habituación (DPN 23) y seis días de adquisición del aprendizaje (DPN24-DPN 29)). Dicho “protocolo difícil” se redujo en el tiempo para hacerlo coincidir con los días del protocolo de FBM al que estos animales fueron sometidos. Así pues, en ambos protocolos las respectivas habituaciones se llevaron a cabo en el DPN23 y los cinco días restantes (PND24-PND28) de aplicación de la FBM en los sujetos MFBM-MR y FFBM-MR o de colocación manual del dispositivo en los sujetos MDFBM-MR y FDFBM-MR, se realizaron simultáneamente coincidiendo con los cinco días del protocolo de memoria de referencia espacial (Figura 13).

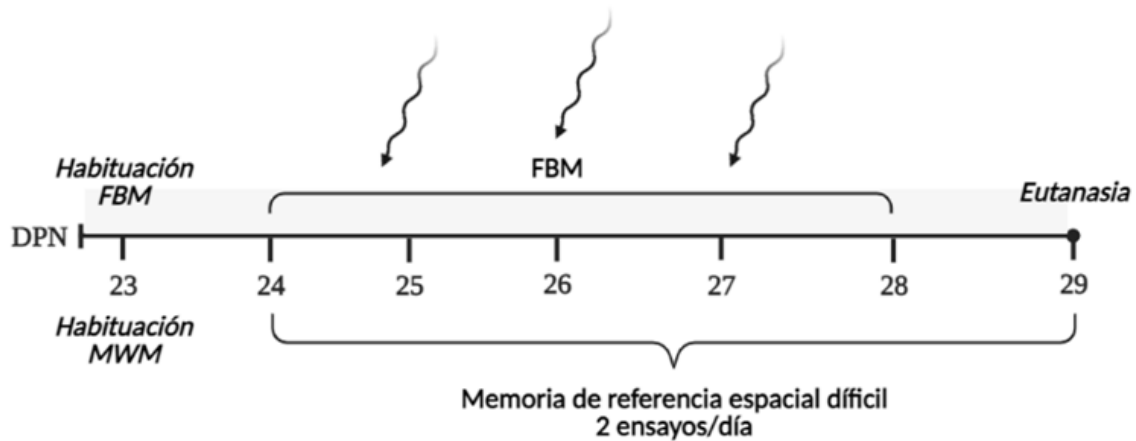


Figura 13. Protocolo de memoria de referencia espacial empleado en el estudio IV y V con muestras de machos y hembras jóvenes, respectivamente. Todos los sujetos fueron sometidos al protocolo difícil: dos ensayos al día durante seis días, coincidiendo con los cinco días de aplicación de la técnica de fotobiomodulación. DPN, día postnatal; FBM, fotobiomodulación; MWM, laberinto acuático de Morris.

3.5.1.5 Protocolo de aprendizaje espacial reverso (bloque II)

Los sujetos adultos del bloque II pertenecientes a los grupos BC y BC+PBM del estudio I, realizaron un protocolo de aprendizaje espacial reverso, índice de flexibilidad cognitiva, cuya duración fue de seis días. El primer día se llevó a cabo la habituación al paradigma y los cuatro días siguientes los animales fueron sometidos a un entrenamiento de memoria de referencia espacial en el que se realizaban cuatro ensayos al día. El sexto y último día, se realizaba la prueba de aprendizaje espacial reverso. En esta prueba, la plataforma visible se trasladaba del cuadrante reforzado (D), donde se localizaba los días anteriores durante el protocolo de memoria de referencia espacial, al cuadrante opuesto, cuadrante (C), en el cual continuaba sumergida y oculta (Figura 14). Se llevaban a cabo ocho ensayos en los que los sujetos eran liberados desde cada cuadrante de manera pseudoaleatoria y en los cuales las condiciones experimentales se mantenían inmutables con respecto a la fase de adquisición del aprendizaje de referencia espacial. Al finalizar dichos ensayos, se realizaba un ensayo de transferencia sin plataforma cuya duración continuó siendo de 25 s, y la salida de los animales se realizaba desde el cuadrante D (cuadrante anteriormente reforzado en el protocolo de memoria de referencia). En este caso, el criterio de éxito fue una permanencia significativamente mayor en el cuadrante objetivo (C) que en el resto de los cuadrantes. El grupo BC+PBM recibió la TFBM coincidiendo, simultáneamente, con la habituación al protocolo espacial y con los cuatro días de entrenamiento en el protocolo de memoria de referencia espacial.

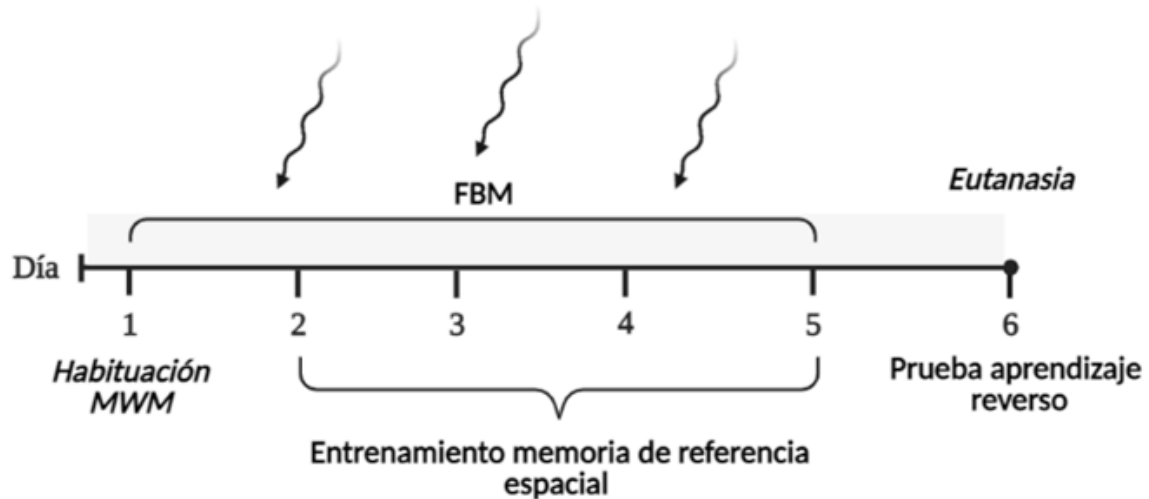


Figura 14. Protocolo de aprendizaje espacial reverso empleado en el estudio I con muestras de machos adultos. Todos los sujetos fueron sometidos al protocolo difícil: dos ensayos al día durante seis días, coincidiendo con los cinco días de aplicación de la técnica de fotobiomodulación. DPN, día postnatal; FBM, fotobiomodulación; MWM, laberinto acuático de Morris.

3.5.2 Laberinto en cero elevado

Las conductas de tipo ansioso de todos los sujetos del estudio VI-bloque I (MCC-AMS, MDFBM-AMS, MFBM-AMS) se evaluaron utilizando el laberinto en cero elevado. Dicho paradigma se basa en la preferencia de los roedores por los espacios pequeños, oscuros y cerrados y en su tendencia a evitar espacios abiertos y bien iluminados (Zorzo, Méndez-López, et al., 2019).

El aparato utilizado fue un laberinto circular fabricado en metacrilato negro, con un diámetro de 81 cm y situado en una plataforma a 82 cm del suelo (*Panlab, Barcelona, España*). Está formado por cuatro pasillos o secciones de 65 cm de largo y 10 cm de ancho, dos de los cuales presentaban paredes de 35 cm de alto que hacían que el pasillo estuviera cerrado y dos brazos restantes que se encontraban abiertos. El aparato se situaba en el centro de una habitación rectangular iluminada con dos lámparas de 4000 lx y encima de este, una video cámara cenital (*Sony V88E, España*) conectada a un ordenador equipado con un sistema de seguimiento de video computarizado (*Ethovision XT 8,5, Noldus Information Technologies, Wageningen, Países Bajos*) registraba la conducta de los animales (Figura 15). La sesión de evaluación tuvo una duración de cinco minutos en los cuales los animales eran introducidos aleatoriamente en uno de los brazos abiertos de manera individual y se les permitía moverse libremente. Tras finalizar este tiempo, el animal se devolvía a su jaula y el laberinto era limpiado cuidadosamente con etanol 70% para eliminar posibles rastros de olor. Las variables registradas fueron la duración total de la permanencia en los pasillos abiertos y cerrados (s), la frecuencia o número de entradas a los pasillos abiertos y cerrados, la velocidad media (cm/s), la distancia total recorrida (cm) y, finalmente, el número de heces. El cálculo del valor de ansiedad final

fue corregido por la conducta exploratoria de cada animal mediante la ratio de la duración total de la permanencia (s) en los pasillos abiertos entre la raíz cuadrada del promedio del número de entradas en los mismos, obteniendo entonces la ansiedad corregida (Sampedro-Piquero et al., 2013).

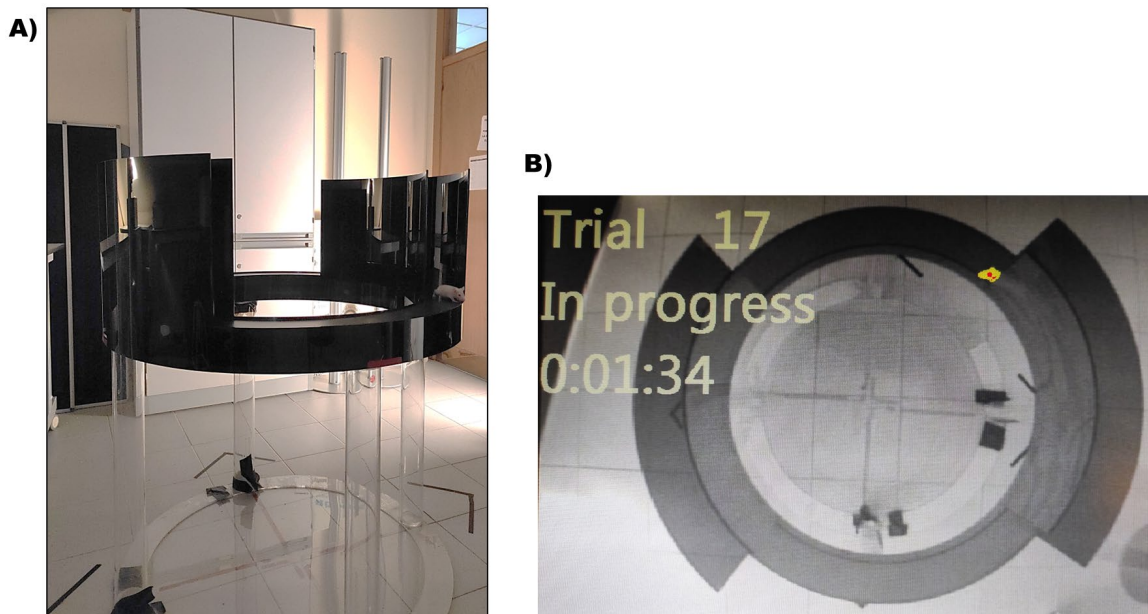


Figura 15. *Laberinto en cero elevado utilizado para la evaluación de las conductas de tipo ansioso. A) Vista general del aparato utilizado y su ubicación en la sala. B) Vista a través del ordenador de la posición de los animales (elemento amarillo) en los diferentes pasillos del laberinto.*

3.5.3 Rotarod

El equilibrio, la actividad y la coordinación motora de los sujetos MCC-AMS, MDFBM-AMS, y MFBM-AMS del estudio VI- bloque I, se evaluaron utilizando el Rotarod. Dicho paradigma es usado como herramienta básica para obtener una medida general de la habilidad locomotora en roedores (Pritchett y Mulder, 2003).

El aparato utilizado estaba compuesto por una barra cilíndrica giratoria situada de manera horizontal la cual estaba dividida, mediante paredes de metacrilato blanco, en cuatro espacios, compartimentos aislados y se encontraba conectada a un motor que permitía acelerar la velocidad del giro de manera constante (7752- Ugo Basile, Italia). Este instrumento se encontraba situado en una superficie plana elevada un metro desde el suelo en una habitación iluminada.

La prueba se realizó en dos fases diferenciadas: en un primer momento, se programó el aparato para que mantuviese una velocidad constante de cuatro revoluciones por minuto (rpm). Los animales eran colocados en la barra orientados en la dirección contraria a donde se encontraba el experimentador y se les permitía caminar libremente durante un máximo de 60 s. A continuación, se continuó con la segunda fase en la que se introducía la variable aceleración. En este caso, el animal se situó en la barra con una velocidad inicial de cuatro rpm. Estas rpm se incrementaron de manera constante,

aumentándose una rpm cada ocho minutos hasta alcanzar un total de 40 rpm. La duración total de esta segunda fase fue de cinco minutos. En ambas fases, se registró el tiempo que el animal era capaz de permanecer en la barra y, en la segunda fase, además, se registraba la velocidad final alcanzada.

3.5.4 Test de tres cámaras (*Three chamber test*)

El test de tres cámaras, más comúnmente conocido como *Three Chamber test*, es un paradigma conductual utilizado para evaluar la preferencia de los roedores por la novedad social. Está basado en el Test de Interacción Social de Crawley, pero con una importante modificación del estímulo social familiar, siendo en este caso, un congénere de la misma jaula que el animal que se está evaluando (C. J. W. Smith et al., 2015).

En nuestro trabajo, se evaluó la preferencia por la novedad social de los sujetos MCC-AMS, MDFBM-AMS, y MFBM-AMS del estudio VI- bloque I siguiendo el protocolo descrito en el estudio de Smith et al. (2015). El aparato estaba formado por un rectángulo de 59 cm largo y 39,5 cm de ancho con paredes de metacrilato transparentes y se encontraba dividido en tres cámaras diferentes de igual tamaño (59 x 19 cm) a las cuales se permitía el acceso a través de una pequeña abertura rectangular. La cámara central se encontraba vacía y se consideraba el punto inicial donde se situaba al animal por primera vez, mientras que, en las dos cámaras laterales, se situaban dos pequeños compartimentos formados por barras traslucidas de metacrilato en los cuales se situaban los congéneres, animales que servirían como estímulos. En uno de los compartimentos se introducía un sujeto familiar (conviviente en la misma jaula que el sujeto evaluado) y en el otro compartimento un sujeto extraño, no conocido por el animal que realizaba la prueba, al habitar en una jaula diferente y al no haber entrado nunca en contacto con este. Los compartimentos restringían los movimientos de los animales, al mismo tiempo que permitían al individuo experimental investigar ambos estímulos. Los individuos utilizados como sujetos familiares o extraños fueron sujetos de mismo sexo y edad y la colocación en los compartimentos se realizó de manera aleatoria evitando así, el posible sesgo de preferencia por un único compartimento. El aparato se localizaba encima de una superficie plana elevada un metro del suelo en el centro de una habitación rectangular iluminada con lámparas de 4.000 lx y encima de este, una video cámara cenital (*Sony V88E, España*) conectada a un ordenador equipado con un sistema de seguimiento de video computarizado (*EthovisionXT 8,5, Noldus Information Technologies, Wageningen, Países Bajos*) registraba la conducta de los animales. Para ello, el modelo virtual del test estaba dividido en las tres cámaras (central, izquierda y derecha) y, además, se delimitó dos zonas *target* o focales que correspondían a un área circular de 15 cm de diámetro alrededor de los dos compartimentos donde se situaban los animales estímulos (Figura 16).



Figura 16. Test de las tres cámaras utilizado para evaluar la preferencia de los roedores por la novedad social.

La evaluación de la preferencia por la novedad social se realizó en una única sesión cuya duración fue de 10 minutos. Cada sujeto experimental era situado en la cámara central y se le permitía explorar libremente. En las dos cámaras laterales, tal y como se describió anteriormente, se situaba un congénere familiar y un congénere extraño. Tras finalizar este tiempo, el animal se devolvía a su jaula y el paradigma era limpiado cuidadosamente con etanol 70% para eliminar posibles rastros de olor. Las variables registradas fueron la frecuencia, el número de entradas a cada una de las cámaras (central, izquierda y derecha), la duración de la permanencia en cada una de ellas (s), primera cámara de entrada escogida por el animal y latencia de entrada (s), frecuencia de interacción con los sujetos estímulos, duración de la interacción (s), velocidad (cm/s) y distancia recorrida (cm). La interacción del sujeto experimental con los sujetos estímulos fue definida como la orientación de la nariz del animal a menos de 2 cm de estos y su interacción con ellos. Finalmente, el porcentaje del valor de preferencia por la novedad social fue obtenido mediante la ratio de tiempo dedicado a explorar el sujeto extraño (s) entre el tiempo dedicado a explorar el sujeto extraño más el tiempo dedicado a explorar el sujeto familiar (s), multiplicado todo ello por 100. La preferencia por la novedad social fue considerada cuando el porcentaje anterior fue significativamente mayor que el azar, considerado con el valor del 50% (C. J. W. Smith et al., 2015).

3.6 Obtención del tejido

3.6.1 Eutanasia de los sujetos experimentales

La eutanasia de los sujetos se llevó a cabo mediante dos procedimientos diferentes en función de la técnica posterior elegida para tratar el tejido. Así pues, para evaluar la actividad metabólica oxidativa mediante la histoquímica de la citocromo c oxidasa (CCO) y para estudiar la activación de

genes de activación temprana mediante la inmunocitoquímica de la proteína c-Fos realizado en los estudios I, IV y V del bloque I y I del bloque II, los animales fueron eutanasiados mediante el método de decapitación con guillotina. Dicho sacrificio fue realizado al día siguiente de finalizar la aplicación de la TFBM y, en el caso de los estudios con evaluación conductual, se realizó 90 minutos después de la última sesión de la tarea de conducta realizada. Tras ello, el encéfalo fue rápidamente extraído, pesado y congelado durante dos minutos en N-metilbultano (*Sigma-Aldrich, España*) y almacenado, seguidamente, a una temperatura de -40°C hasta el posterior seccionado.

Por otro lado, en el estudio II del bloque I con el objetivo de estudiar la densidad de astrocitos y células de microglía mediante la inmunocitoquímica de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP, por sus siglas en inglés correspondientes a *Glial Fibrillary Acidic Protein*) y la inmunocitoquímica de la Iba-1, respectivamente, se llevó a cabo la eutanasia de los animales mediante el método de perfusión vascular. Para ello, los sujetos fueron previamente anestesiados (ketamina 80 mg/kg; concentración 100 mg/ml y xilacina 10 mg/kg; concentración 20 mg/ml) y se perfundieron vascularmente mediante el paso de una solución salina al 0,9% (M/v) (*Sigma-Aldrich, España*) durante cinco minutos a través del sistema circulatorio utilizando el bombeo cardíaco. A continuación, se infundió una solución de paraformaldehído tamponado al 4% (M/v) (0,1M, pH 7,4) (*Fisher Scientific, España*) durante 20 minutos y posteriormente, los cerebros fueron extraídos. Tras ello, se mantuvieron inmersas en una solución de paraformaldehído tamponado al 4% (M/v) (0,1M, pH 7,4) (*Fisher Scientific, España*) durante toda la noche a una temperatura de 4°C y al día siguiente, se transfirieron a tampón fosfato con sacarosa al 30% (M/v) (0,1M; pH 7,4) (*Sigma-Aldrich, España*) durante 48 h mantenido a la misma temperatura. Finalmente, el tejido se deshidrató mediante una cadena de alcoholes etílicos de graduación ascendente (70%-80%-96%-96%-100%-100%) (*VWR, España*) y dos inmersiones en acetato de butilo (*J.T. Baker, Estados Unidos*) y, seguidamente, fueron embebidos en parafina (*PanReac AppliChem, Estados Unidos*) para la confección de bloques dedicados al estudio glial.

3.6.2 Seccionado

El tejido destinado al estudio de la histoquímica de la CCO y a la inmunocitoquímica de la proteína c-Fos se seccionó mediante cortes de orientación coronal con 30 µm (micrómetros) de grosor utilizando un microtomo de congelación (*HM-505-E – Microm, Alemania*) a una temperatura de -20° C. Además, se cortaron estándares de tejido encefálico homogeneizado a diferentes grosores (10, 30, 50 y 70 µm) para la técnica de la CCO y secciones de tejido encefálico de áreas de no interés para el estudio con un grosor de 30 µm para actuar como controles en el caso de la c-Fos.

Por otro lado, el tejido dirigido al estudio de la inmunocitoquímica de la GFAP e Iba-1, se seccionó de manera coronal con un grosor de 30 µm en un microtomo de rotación (*RM2135 – Microm, Alemania*) obteniéndose dos series de secciones para cada una de las técnicas. En ambos tipos de seccionados, el tejido fue adherido a portaobjetos los cuales, en el caso de los estudios de la proteína c-

Fos, GFAP e Iba-1, fueron previamente tratados con una solución de gelatina (*Panreac, España*) y dicromato de potasio (*Sigma-Aldrich, España*). Al igual que en el caso de la c-Fos, se incluyeron secciones de tejido cerebral de regiones no relevantes que actuarían como control de las técnicas los cuales fueron cortados a igual grosor (30 μm).

3.7 Procesamiento histológico

3.7.1 Histoquímica de la citocromo c oxidasa

El estudio de la actividad metabólica oxidativa cerebral se llevó a cabo mediante el método histoquímico de la CCO, indicador idóneo del nivel de actividad funcional de las neuronas (Wong-Riley, 1989), descrito por Gonzalez-Lima y Cada (1994), versión modificada del procedimiento descrito previamente por Wong-Riley (1989). Previo al inicio de la técnica y con el objetivo de controlar y minimizar al máximo la variabilidad entre los distintos baños que iban a ser realizados, se cortaron estándares de tejido encefálico homogeneizado a diferentes grosores (10, 30, 50 y 70 μm) los cuales fueron incluidos en cada lote de portaobjetos y cuya actividad CCO fue previamente determinada por espectrofotometría (González-Pardo et al., 1996).

Las secciones y los estándares se fijaron inicialmente con una solución de glutaraldehído al 0,5% (v/v) (*Merck, España*) y sacarosa al 10% (M/v) (*Sigma-Aldrich, España*) en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,6) durante 5 minutos y a continuación, pasaron por tres baños consecutivos en una solución de sacarosa al 10% (M/v) (*Sigma-Aldrich, España*) en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,6), durante 5 minutos cada uno. Posteriormente, se introdujeron en una solución de tampón Tris (0,05 M, pH 7,6) (*Sigma-Aldrich, España*) compuesto por trizma base al 0,6 % (M/v) (*Sigma-Aldrich, España*), dimetilsulfóxido al 0,5% (v/v) (*Fisher Scientific, España*), sacarosa al 10% (M/v) (*Sigma-Aldrich, España*) y cloruro de cobalto hexahidratado al 0,0275% (M/v) (*Sigma-Aldrich, España*) durante 8 minutos. Tras sumergir las secciones en un baño de sacarosa al 10% (M/v) (*Sigma-Aldrich, España*) en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,6), se incubaron en oscuridad en una solución de tampón fosfato (0,1 M, pH 7,6) que contenía citocromo c al 0,0075% (M/v) (*Sigma-Aldrich, España*), catalasa al 0,002% (M/v) (*Alfa Aesar, Estados Unidos*), 5% sacarosa (M/v) (*Sigma-Aldrich, España*), dimetilsulfóxido al 0,25% (v/v) (*Fisher Scientific, España*) y tetracloruro de diaminobencidina al 0,05% (M/v) (*Sigma-Aldrich, España*), durante 1 hora en agitación lenta y a una temperatura de 37°C. La reacción fue detenida mediante la fijación del tejido en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,6) con sacarosa al 10% (M/v) (*Sigma-Aldrich, España*) y formaldehído al 4% (v/v) (*Fisher Scientific, España*) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, las secciones se deshidrataron en una cadena de concentraciones crecientes de etanol (*VWR, España*) (30%-50%-70%-80%-96%I-96%II-100%I-100%II) permaneciendo 5 minutos en cada uno, se aclararon con xileno durante 10 minutos y se montaron posteriormente con Entellan (*Merck, España*) y cubreobjetos de vidrio. Las secciones fueron etiquetadas y almacenadas hasta su cuantificación.

3.7.2 Inmunocitoquímica de la proteína c-Fos

La proteína c-Fos es una proteína de rápida producción la cual es codificada por el protooncogén c-fos, gen de activación temprana inmediata (IEGs, por sus siglas en inglés correspondientes a *Immediate Early Genes*), el cual es expresado en el núcleo de las neuronas en circunstancias normales y patológicas como una de las primeras respuestas celulares ante la estimulación directa por parte de neurotransmisores y factores de crecimiento (Méndez-Couz et al., 2014; Sagar et al., 1988). El mapeo funcional basado en la técnica inmunocitoquímica c-Fos ha sido validado como una poderosa técnica para revelar neuronas activadas (índice de actividad neuronal), ofrece información sobre la plasticidad neuronal que subyace a la estimulación dada y permite caracterizar grupos celulares que pueden asociarse con circuitos funcionales en una situación específica (Mendez et al., 2015; Sagar et al., 1988).

El protocolo empleado para el marcaje de la proteína c-Fos fue una variación del método descrito previamente por Banqueri et al. (2018). En primer lugar, las secciones de tejido encefálico de interés junto con los controles que habían sido previamente seccionados se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% (M/v) (*Fisher Scientific, España*) en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) durante 30 minutos en leve y constante agitación. A continuación, se realizaron dos baños en tampón fosfato (0,01 M, pH 7,4) con una duración de 10 minutos cada uno, pasando, posteriormente, a su incubación en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) y tampón fosfato (0,01 M, pH 7,4) durante 30 minutos, con el fin eliminar la actividad de la peroxidasa endógena. Tras esto, se sumergieron de nuevo en dos baños consecutivos de tampón fosfato (0,01 M, pH 7,4) durante 10 minutos cada uno, en un baño de 10 minutos de Triton X-100 al 1% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) en una solución de tampón fosfato (0,01 M, pH 7,4) y en un baño de tampón fosfato (0,01 M, pH 7,4) durante 10 minutos para eliminar los posibles restos de Triton. Tras el bloqueo de la inmunoreactividad inespecífica mediante la incubación de las secciones en una solución de tampón fosfato (0,01 M, pH 7,4) con suero de oveja al 3% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) durante una hora en una cámara húmeda a temperatura ambiente, las secciones fueron incubadas en una solución de anticuerpo policlonal anti-c-Fos hecho en conejo (1:7500) (*Sigma Aldrich, España*) diluido en una solución de tampón fosfato (0,01 M, pH 7,4), suero de oveja al 3% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) y Triton X-100 al 1% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) en una cámara húmeda a una temperatura de 4°C. Las secciones tomadas como controles no fueron incubadas en anticuerpo policlonal, sino que se incubaron en tampón fosfato (0,01 M, pH 7,4). Trascorridas 24 horas de incubación, todas las secciones se sumergieron en dos baños consecutivos de tampón fosfato (0,01 M, pH 7,4) durante 10 minutos cada uno para ser, posteriormente, incubadas en anticuerpo secundario de cabra α -conejo biotilado IgG (1:480) (*Fisher Scientific, España*) diluido en una solución de tampón fosfato (0,01 M, pH 7,4), suero de oveja al 3% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) y Triton X-100 al 1% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente, tras realizar dos baños de tampón fosfato (0,01 M, pH 7,4) durante 10 minutos cada uno, las secciones se trataron con una solución de complejo

peroxidasa avidina-biotina (*Vectastain ABC kit elite ultrasensitivo*) (*Fisher Scientific, España*) durante una hora en una cámara húmeda a temperatura ambiente. A continuación, se sumergieron en dos baños de tampón fosfato (0,01 M, pH 7,4) durante 10 minutos cada uno, previo al tratado de las secciones con una solución de tampón fosfato (0,01 M, pH 7,4), tetracloruro de diaminobencidina al 0,05% (M/v) (*Sigma-Aldrich, España*), peróxido de hidrógeno al 33% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) y sulfato de amonio- níquel (II) hexahidratado al 0,05% (M/v) (*Sigma-Aldrich, España*) durante 4 minutos en completa oscuridad. Finalmente, las secciones se lavaron en dos baños de tampón fosfato (0,01 M, pH 7,4) durante 10 minutos cada uno, en un baño de agua destilada de cinco minutos y, a continuación, se deshidrataron en una cadena de concentraciones crecientes de etanol (*VWR, España*) (80%-96%-100%) permaneciendo 5 minutos en cada uno. Como último paso, se aclararon con xileno durante 10 minutos, se montaron con Entellan (*Merck, España*) y cubreobjetos de vidrio y fueron etiquetadas y almacenadas hasta su posterior cuantificación.

3.7.3 *Inmunocitoquímica de la GFAP*

La astrogliosis reactiva es una respuesta fisiológica de los astrocitos que se observa ante la presencia de un daño cerebral. En comparación con los astrocitos no patológicos, los astrocitos reactivos muestran una expresión alterada de múltiples genes y exhiben funciones distintas. El aumento de la expresión de la proteína GFAP ha sido el marcador molecular mayormente empleado para el marcaje de los astrocitos reactivos (Xuan et al., 2016).

El protocolo seguido para el marcaje la proteína GFAP fue previamente descrito por Zorzo, Higarza, et al. (2019). Primeramente, las secciones fueron desparafinadas en xileno durante 15 minutos y a continuación se hidrataron en una cadena de concentraciones decrecientes de alcohol (*VWR, España*) (100%-96%-80°-70°) permaneciendo 5 minutos en cada uno y se finalizó con un aclarado en agua destilada. A continuación, se introdujeron en tres baños compuestos por una solución de tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) con Triton X-100 al 0,1% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) durante 5 minutos cada uno y se pre-incubaron durante 30 minutos en suero humano al 1% (M/v) (*Sigma Aldrich, España*) diluido en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) con Triton X-100 al 0,1% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*). Posteriormente, se realizó otro lavado en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) con Triton X-100 al 0,1% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) durante 5 minutos y se continuó con la incubación en anticuerpo primario policlonal de conejo para la GFAP (1:800) (*Dako, Dinamarca*) diluido en tampón fosfato (0,1M, pH 7,4) con albúmina bovina al 0,25 % (M/v) (*Sigma Aldrich, España*) en una cámara húmeda a 4°C. Las secciones tomadas como controles no fueron incubadas en anticuerpo policlonal, sino que se incubaron en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4). Tras 24 horas, las secciones se lavaron tres veces en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) con Triton X-100 al 0,1% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) durante 5 minutos cada uno y se incubaron en un anticuerpo secundario de cabra α -conejo biotilado IgG (1:480) (*Pierce, Estados Unidos*) diluido en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) con albúmina bovina al 0,25 % (M/v) (*Sigma Aldrich, España*) durante 30 minutos. Después, se llevaron a cabo tres lavados en tampón fosfato (0,1

M, pH 7,4) con Triton X-100 al 0,1% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) durante 5 minutos cada uno, y se trataron con una solución de complejo peroxidasa avidina-biotina (*Vectastain ABC kit ultrasensitivo*) (*Fisher Scientific, España*) durante 30 minutos. A continuación, se realizaron tres lavados, dos de ellos en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) con Triton X-100 al 0,1% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) durante 5 minutos cada uno y un último lavado en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) durante otros 5 minutos. Seguidamente, se realizó el tratamiento de las secciones con una solución de tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4), tetracloruro de diaminobencidina al 0,05% (M/v) (*Sigma-Aldrich, España*) y peróxido de hidrógeno al 33% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) durante 4 minutos en completa oscuridad. Finalmente, las secciones se aclararon en agua destilada, se deshidrataron en una cadena de concentraciones crecientes de etanol (*VWR, España*) (70°-80%-96%-100%) permaneciendo 5 minutos en cada uno. Como último paso, se aclararon con xileno durante 15 minutos, se montaron con Entellan (*Merck, España*) y cubreobjetos de vidrio y fueron etiquetadas y almacenadas hasta su posterior cuantificación.

3.7.4 Inmunocitoquímica de la Iba-1

Iba-1 es un conocido marcador de la activación microglial. La microglía actúa como sensor de la inmunidad innata en el cerebro y por ello, desempeñan un papel clave en la secreción de mediadores proinflamatorios (Vogel et al., 2021).

El protocolo seguido para el marcaje la proteína Iba-1 fue previamente descrito por Zorzo, Higarza, et al. (2019). Primeramente, las secciones fueron desparafinadas en xileno durante 15 minutos y a continuación se hidrataron en una cadena de concentraciones decrecientes de alcohol (*VWR, España*) (100%-96%-80%-70°) permaneciendo 5 minutos en cada uno y se finalizó con un aclarado en agua destilada. A continuación, se introdujeron en tres baños compuestos por una solución de tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) con Triton X-100 al 0,1% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) durante 5 minutos cada uno y se pre-incubaron durante 30 minutos en suero humano al 1% (M/v) (*Sigma Aldrich, España*) diluido en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) con Triton X-100 al 0,1% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*). Posteriormente, se realizó otro lavado en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) con Triton X-100 al 0,1% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) durante 5 minutos y se continuó con la incubación en anticuerpo primario policlonal para la Iba-1 hecho en conejo (1:480) (*Fujifilm Wako Chemicals Europe, Alemania*) diluido en tampón fosfato (0,1M, pH 7,4) con albúmina bovina al 0,25 % (M/v) (*Sigma Aldrich, España*) en una cámara húmeda a 4°C. Las secciones tomadas como controles no fueron incubadas en anticuerpo policlonal, sino que se incubaron en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4). Tras 24 horas, las secciones se lavaron tres veces en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) con Triton X-100 al 0,1% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) durante 5 minutos cada uno y se incubaron en un anticuerpo secundario de cabra α -conejo biotilado IgG (1:480) (*Pierce, Estados Unidos*) diluido en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) con albúmina bovina al 0,25 % (M/v) (*Sigma Aldrich, España*) durante 30 minutos. Después, se llevaron a cabo tres lavados en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) con Triton X-100 al 0,1% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) durante 5 minutos cada uno, y se trataron con una solución de complejo peroxidasa avidina-

biotina (*Vectastain ABC kit ultrasensitivo*) (*Fisher Scientific, España*) durante 30 minutos. A continuación, se realizaron tres lavados, dos de ellos en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) con Triton X-100 al 0,1% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) durante 5 minutos cada uno y un último lavado en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) durante otros 5 minutos. Seguidamente, se realizó el tratamiento de las secciones con una solución de tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4), tetracloruro de diaminobencidina al 0,05% (M/v) (*Sigma-Aldrich, España*) y peróxido de hidrógeno al 33% (v/v) (*Sigma Aldrich, España*) durante 4 minutos en completa oscuridad. Finalmente, las secciones se aclararon en agua destilada, se deshidrataron en una cadena de concentraciones crecientes de etanol (*VWR, España*) (70°-80%-96%-100%) permaneciendo 5 minutos en cada uno. Como último paso, se aclararon con xileno durante 15 minutos, se montaron con Entellan (*Merck, España*) y cubreobjetos de vidrio y fueron etiquetadas y almacenadas hasta su posterior cuantificación.

3.8 Procedimientos de cuantificación

3.8.1 Histoquímica de la citocromo c oxidasa

La intensidad de la tinción histoquímica de la citocromo c oxidasa se cuantificó mediante densitometría óptica, utilizando para ello una estación de análisis de imagen (*MCID, Interfocus Imaging, Reino Unido*) compuesta por un iluminador de alta precisión (*lightbox, Northern Light Illuminator, Estados Unidos*), una cámara digital y un ordenador con el programa específico de análisis de imagen, *MCID*.

En primer lugar, se tomaron medidas de los estándares presentes en cada uno de los baños de incubación realizados con el objetivo de conformar una curva de regresión que permitiera comparar secciones que proviniesen de distintos momentos de procesamiento histoquímico. A continuación, la densidad óptica de cada región y sujeto fue medida en tres secciones consecutivas. En cada una de ellas, se realizaron cuatro lecturas no solapadas, cuya forma y tamaño se ajustaban a la región de muestreo obteniendo, finalmente, doce medidas por área y sujeto de las que se extrajo un promedio estadístico. Los valores de densidad óptica media para cada región/sujeto se convirtieron en unidades de actividad CCO (μmol de citocromo c oxidado/minutos/peso en g del tejido húmedo), actividad previamente determinada a través de espectrofotometría por González-Pardo et al. (1996) mediante la actividad enzimática de los estándares. Dicha conversión consiste en transformar un dato cualitativo de densidad óptica media de las imágenes, en un valor cuantitativo (unidades de actividad de CCO) mediante una ecuación de regresión entre la densidad óptica y la actividad enzimática de las secciones estándares.

Las regiones de interés y su distancia en milímetros desde Bregma fueron definidas anatómicamente de acuerdo con el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007) y dependieron de los distintos objetivos experimentales planteados en cada estudio. Así pues, en el estudio I, las áreas de interés fueron +3,24 mm para la corteza cingulada (CG), la corteza prelímbica (PL) y la corteza infralímbica (IL) y -3,24 mm para el hipocampo dorsal (asta de Amon 1 (CA1), asta de Amon 3 (CA3) y giro dentado (DG)). En los estudios IV y V del bloque I las áreas de interés fueron: +5,16 mm para

la corteza orbitalfrontal (medial (MO), ventral (VO), lateral (LO) y dorsolateral (DLO)); +4,20 mm para la corteza cingulada anterior (ACG) y la corteza prelímbica anterior (APL); +3,24 mm para la corteza cingulada posterior (PCG), la corteza prelímbica posterior (PPL) y la corteza infralímbica (IL); +1,92 mm para el estriado dorsal (STD) y las subáreas del núcleo accumbens (Accumbens core, ACCC y accumbens shell, ACSH); -1,44 mm para las subáreas del tálamo anterior (anterodorsal (AD), anteroventral (AV) y anteromedial (AM)); -2,28 mm para las subáreas de la amígdala: central (CeA), lateral (LaA) y basolateral (BLA) y, finalmente, -3,24 mm para el hipocampo dorsal (asta de Amon 1 (CA1), asta de Amon 3 (CA3) y giro dentado (DG)), corteza retrosplenial granular (RSG) y corteza retrosplenial agranular (RSA). Finalmente, el estudio I del bloque II contó con las siguientes regiones de interés: +3,24 mm para la corteza cingulada (CG), la corteza prelímbica (PL) y la corteza infralímbica (IL); +1,92 mm para el estriado dorsal (STD) y las subáreas del núcleo accumbens (Accumbens core, AccC y accumbens shell, AccSH); +1,44 para el septum (medial, MS y lateral, LS); -1,44 mm para las subáreas del tálamo anterior (anterodorsal (AD), anteroventral (AV) y anteromedial (AM)); -2,28 mm para las subáreas de la amígdala: central (CeA), lateral (LaA) y basolateral (BLA); -3,24 mm para el hipocampo dorsal (asta de Amon 1 (CA1), asta de Amon 3 (CA3) y giro dentado (DG)) y la corteza perirrinal (PRh) y, finalmente, -4,56 m para las subáreas de los cuerpos mamilares (supramamilar (SuM), medial mamilar (MMM) y medial lateral mamilar (MML), el área tegmental ventral (VTA) y la corteza entorrinal (ENT). Dicha información puede encontrarse resumida en la tabla 2 presentada a continuación.

Tabla 2. Resumen de las áreas de interés de análisis de la actividad CCO en cada estudio.

Experimentos	Estudio	Regiones de interés
	I	Corteza cingulada, prelímbica e infralímbica (CG, PL, IL) Hipocampo dorsal (CA1, CA3 y DG)
Bloque I	IV	Corteza orbitofrontal (MO, VO, LO, DLO) Corteza cingulada y prelímbica anterior (ACG y APL) Corteza cingulada y prelímbica posterior y corteza infralímbica (PCG, PPL e IL) Estriado dorsal y ventral (STD, ACCC y ACSH) Tálamo anterior (AD, AV y AM) Amígdala (CeA, LaA y BLA)
	V	Hipocampo dorsal (CA1, CA3 y DG) Corteza retrosplenial granular y agranular (RSG y RSA)
Bloque II	I	Corteza cingulada, prelímbica e infralímbica (CG, PL, IL) Estriado dorsal y ventral (STD, AccC y AccSh) Septum (MS y LS) Tálamo anterior (AD, AV y AM) Amígdala (CeA, LaA y BLA) Hipocampo dorsal (CA1, CA3 y DG) Corteza perirrinal y entorrinal (PRh y ENT) Cuerpos mamilares (MMM, MML y SuM) Área tegmental ventral (VTA)

3.8.2 *Inmunocitoquímica de la proteína c-Fos*

El número total de núcleos positivos c-Fos cuantificado en el estudio I del bloque I se llevó a cabo mediante un muestreo sistemático aleatorio sobre cada región de interés, tomando muestras representativas en cada una de ellas. Dicho muestreo se realizó en dos secciones alternas con una distancia constante y conocida entre ellas de 30 μm de grosor. La identificación de los núcleos c-Fos se definió en base a un criterio visual, que respondía a un elemento homogéneo y oscuro con bordes bien definidos. Se cuantificó de manera manual, mediante el empleo de un microscopio óptico (*Leica DFC490, Alemania*), acoplado a un ordenador con el programa informático *Leica Application Suite X (Leica, Alemania)*, y empleando un objetivo de 5 X de apertura con una magnificación total de 192 X.

Las regiones de interés y su distancia en milímetros desde Bregma, definidas anatómicamente de acuerdo con el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007), fueron +3,24 mm para la corteza cingulada (CG), la corteza prelímbica (PL) y la corteza infralímbica (IL) y -3,24 mm para las subáreas CA1, CA3 y giro dentado (DG) del hipocampo dorsal. Para cada región de interés, la cuantificación de los núcleos c-Fos fue llevada a cabo empleando distintos marcos, disectores de recuento, con área conocida, superpuestos y adaptados a cada región en particular. En concreto, los tamaños de dichos disectores fueron 250.000 μm^2 para CG, PL y IL y 72.000 μm^2 para CA1, CA3 y DG. El área total muestreada por dichos marcos en cada región de cada sección fue de 500.000 μm^2 en CG, PL and IL; 144.000 μm^2 en CA1 y CA3 y finalmente, 72.000 μm^2 en DG. Se emplearon un total de cuatro disectores por sujeto para CG, PL, IL, CA1 y CA3 y dos disectores para DG.

3.8.3 *Inmunocitoquímica de la GFAP*

El número total de células inmunorreactivas (IR) cuantificado en el estudio II del bloque I se llevó a cabo mediante un muestreo sistemático aleatorio sobre cada región de interés, tomando muestras representativas en cada una de ellas. Dicho muestreo se realizó en tres secciones alternas con una distancia constante y conocida entre ellas de 90 μm de grosor. La identificación de las células GFAP-IR se definió en base a un criterio visual y se contaban cuando mostraban un núcleo claramente definido dentro del área del disector. Se cuantificó de manera manual, mediante el empleo de un microscopio óptico (*Leica DFC490, Alemania*), acoplado a un ordenador con el programa informático *Leica Application Suite X (Leica, Alemania)*, y empleando un objetivo de 20 X de apertura con una magnificación total de 987 X (Figura 17A).

Las regiones de interés y su distancia en milímetros desde Bregma, definidas anatómicamente de acuerdo con el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007), fueron +3,24 mm para la corteza cingulada (CG), la corteza prelímbica (PL) y la corteza infralímbica (IL). Para cada región de interés, la cuantificación células GFAP-IR fue llevada a cabo empleando distintos marcos, disectores de recuento, con área conocida, superpuestos y adaptados a cada región en particular. En concreto, los tamaños de dichos disectores fueron 40.000 μm^2 y el área total muestreada por dichos marcos en cada

región de cada sección fue de $480.000 \mu\text{m}^2$. Se emplearon un total de 12 disectores por sujeto para cada una de las áreas a cuantificar.

3.8.4 Inmunocitoquímica de la Iba-1

El número total de células inmunorreactivas (IR) cuantificado en el estudio II del bloque I se llevó a cabo mediante un muestreo sistemático aleatorio sobre cada región de interés, tomando muestras representativas en cada una de ellas. Dicho muestreo se realizó en tres secciones alternas con una distancia constante y conocida entre ellas de $90 \mu\text{m}$ de grosor. La identificación de las células Iba-1-IR se definió en base a un criterio visual y se contaban cuando mostraban un núcleo claramente definido dentro del área del disector. Se cuantificó de manera manual, mediante el empleo de un microscopio óptico (*Leica DFC490, Alemania*), acoplado a un ordenador con el programa informático *Leica Application Suite X (Leica, Alemania)*, y empleando un objetivo de 20 X de apertura con una magnificación total de 987 X (Figura 17B).

Las regiones de interés y su distancia en milímetros desde Bregma, definidas anatómicamente de acuerdo con el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007), fueron +3,24 mm para la corteza cingulada (CG), la corteza prelímbica (PL) y la corteza infralímbica (IL). Para cada región de interés, la cuantificación células Iba-1-IR fue llevada a cabo empleando distintos marcos, disectores de recuento, con área conocida, superpuestos y adaptados a cada región en particular. En concreto, los tamaños de dichos disectores fueron $40.000 \mu\text{m}^2$ y el área total muestreada por dichos marcos en cada región de cada sección fue de $480.000 \mu\text{m}^2$. Se emplearon un total de 12 disectores por sujeto para cada una de las áreas a cuantificar.

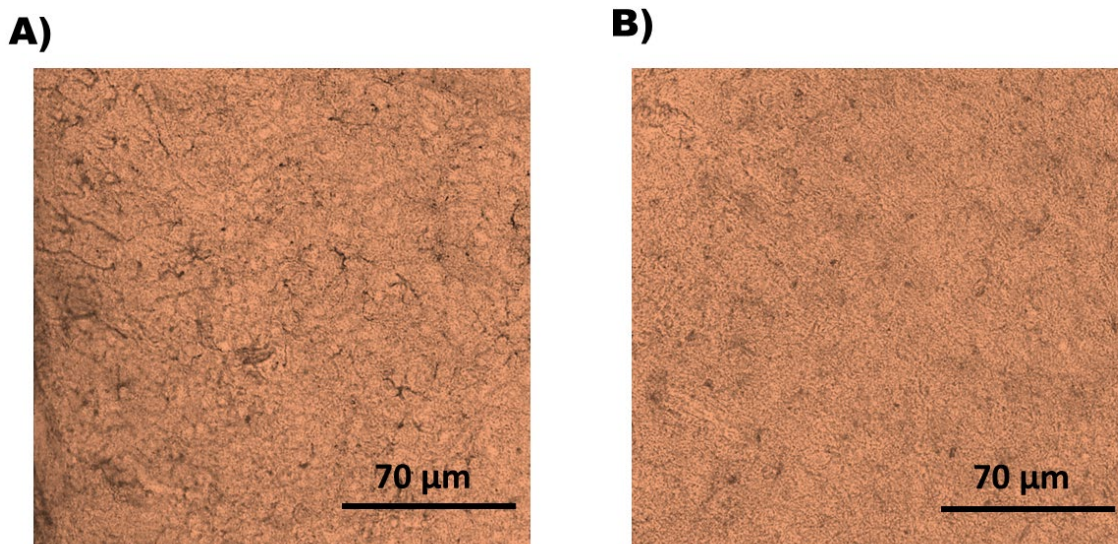


Figura 17. Imágenes representativas de las diferentes pruebas inmunocitoquímicas realizadas. **A.** Inmunocitoquímica de la GFAP. **B.** Inmunocitoquímica de la Iba-1.

3.9 Análisis estadístico

Los datos derivados de los estudios llevados a cabo en esta tesis doctoral se analizaron mediante el uso del programa estadístico SigmaPlot 12.5 (*Systat Software Inc., Richmond, Estados Unidos*). Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando el *p*-valor era igual o menor de ,05. Previo a la aplicación de las pruebas estadísticas se probó el supuesto estadístico de normalidad, mediante la prueba de *Shapiro- Wilk* ($p > ,05$) y el supuesto de homocedasticidad u homogeneidad de varianzas mediante la prueba de *Levene* ($p > ,05$). Cuando los datos se ajustaban a la distribución normal se empleaban pruebas de análisis paramétricas mientras que, en caso de no cumplirse, se escogían pruebas estadísticas no paramétricas. Finalmente, la representación gráfica de los resultados se llevó a cabo utilizando el mismo software anteriormente mencionado, SigmaPlot 12,5. Los datos se representaron mediante la media \pm error estándar de la media (EEM o SEM, por sus siglas en inglés correspondientes a *Standard Error of the Mean*).

3.9.1 Evaluación conductual

3.9.1.1 Laberinto acuático de Morris

Los estudios pertenecientes al bloque I en los cuales se empleó el laberinto acuático de Morris para el análisis del aprendizaje de referencia espacial fueron los estudios III (Publicación 4), IV y V. Así pues, en primer lugar, se promediaron las latencias de escape de los ensayos de la fase de adquisición del aprendizaje en cada día y se compararon entre los grupos mediante un análisis de varianzas (*ANOVA*, por sus siglas en inglés correspondientes a *Analysis of Variance*) de medidas repetidas de dos factores (Factor A: *grupo*, Factor de repetición: *día*). En el caso del estudio III (Publicación 4) mismos análisis se llevaron a cabo para analizar las diferencias entre los grupos a lo largo de los días en las siguientes variables: velocidad, distancia recorrida y permanencia en la zona focal, zona periférica y en el cuadrante objetivo o reforzado (cuadrante D). En el estudio IV, adicionalmente, se repitieron dichos análisis mencionados para examinar las diferencias de permanencia en la zona periférica. Ante la presencia de diferencias estadísticamente significativas, se realizaron análisis de comparaciones múltiples *post hoc* utilizando el método *Holm-Sidak*. El análisis de la permanencia en el cuadrante reforzado (D) en comparación con el resto de los cuadrantes (A, B, C) en los estudios III, IV y V, se llevó a cabo mediante el empleo de un *ANOVA* de medidas repetidas de dos factores (Factor A: *cuadrante*, Factor de repetición: *día*), de manera independiente para cada grupo experimental. Los análisis de comparaciones múltiples se realizaron mediante el método *Holm-Sidak*. Para finalizar con el bloque I, en el estudio IV se comparó el porcentaje de permanencia entre los grupos en la zona periférica y en la zona central en los ensayos del último día de prueba (día sexto) mediante un *ANOVA* de dos factores (Factor A: *grupo*, Factor B: *zona*). Ante la presencia de diferencias estadísticamente significativas, se realizaron análisis de comparaciones múltiples *post hoc* utilizando el método *Holm-Sidak*.

En el estudio I (Publicación 3) perteneciente al bloque II de esta tesis doctoral, se llevó a cabo, primeramente, el análisis de las latencias de escape en cada grupo experimental mediante el promedio de las latencias de los ensayos de la fase de adquisición del aprendizaje en cada día y la utilización posterior del método estadístico *ANOVA* de medidas repetidas de un factor (Factor de repetición: *día*). Las comparaciones múltiples *post hoc* al ser encontradas diferencias significativas se realizaron mediante la prueba de *Tukey*. El tiempo de permanencia en cada cuadrante se analizó de manera individual en cada grupo cada día mediante la prueba *t de Student (t-test)* comparando la permanencia en el cuadrante reforzado u objetivo (cuadrante D en la fase de adquisición del aprendizaje de referencia espacial y cuadrante C en el protocolo de aprendizaje espacial reverso) con la permanencia en el resto de los cuadrantes. La prueba *U de Mann-Whitney* fue empleada cuando era violado el supuesto de normalidad.

3.9.1.2 Laberinto en cero elevado, rotarod y test de tres cámaras

En el estudio VI del bloque I se empleó el método estadístico *ANOVA* de un factor para analizar las diferencias entre los grupos en las variables registradas en el laberinto en cero elevado (distancia total recorrida, velocidad media, heces, porcentaje de ansiedad corregida con exploración), en el rotarod (tiempo en el aparato y velocidad) y en el test de tres cámaras (distancia recorrida, velocidad media y el porcentaje de preferencia por la novedad social). En caso de no cumplirse el supuesto de normalidad, la prueba de *Kruskal-Wallis* fue utilizada como prueba no paramétrica para el análisis de los datos.

3.9.2 Histoquímica de la citocromo c oxidasa

La actividad metabólica oxidativa cerebral en los estudios I (Publicación 2), IV y V del bloque I fue analizada en cada grupo experimental mediante el método *ANOVA* de un factor para cada región de interés. En caso de no cumplirse el supuesto de normalidad, la prueba de *Kruskal-Wallis* fue utilizada como prueba no paramétrica para el análisis de los datos. En el caso estudio I (Publicación 2), adicionalmente, se empleó el método *ANOVA* de dos factores (Factor A: *grupo*, Factor B: *sexo*) en cada región cuantificada para examinar las diferencias entre los grupos. En todos los casos cuando se encontraron diferencias significativas, se empleó el método *Holm-Sidak* para el análisis de las comparaciones múltiples ante el cumplimiento del supuesto de normalidad y el método *Dunn* cuando ocurría el caso contrario.

En el estudio I (Publicación 3) del bloque II la actividad metabólica cerebral fue analizada mediante el uso del método *t-test* para cada región de interés. Cuando no se cumplía el supuesto de normalidad, se empleó la prueba *U de Mann-Whitney*. En este mismo estudio, las diferencias entre los grupos en cada área examinada fueron analizadas utilizando el método *ANOVA* de un factor. Si existían diferencias significativas, se evaluaron las comparaciones múltiples mediante el método *Holm-Sidak*. Finalmente, si el supuesto de normalidad no se cumplía, se utilizó la prueba de *Kruskal-Wallis* y el método *Dunn* para realizar las comparaciones múltiples *post-hoc*.

3.9.3 *Inmunocitoquímica de la proteína c-Fos*

El conteo de los núcleos positivos de c-Fos realizado en el estudio I del bloque I (Publicación 2), fue analizado mediante el método *ANOVA* de un factor para cada región de interés con el fin de examinar las diferencias entre los grupos experimentales en cada uno de los sexos. Adicionalmente, se realizó un *ANOVA* de dos factores (Factor A: *grupo*, Factor B: *sexo*) en cada región cuantificada. Ante la existencia de diferencias significativas, el método *Holm-Sidak* fue empleado para el análisis de las comparaciones múltiples.

3.9.4 *Inmunocitoquímica de la GFAP*

El conteo de las células GFAP-IR realizado en el estudio II del bloque I, fue analizado mediante el método *ANOVA* de un factor para cada región de interés con el fin de examinar las diferencias entre los grupos experimentales. Los resultados se expresaron como número promedio de células inmunopositivas x 1000 /área de interés. En caso de no cumplirse el supuesto de normalidad, la prueba de *Kruskal-Wallis* fue utilizada como prueba no paramétrica para el análisis de los datos.

3.9.5 *Inmunocitoquímica de la Iba-1*

El conteo de las células Iba-1-IR realizado en el estudio II del bloque I, fue analizado mediante el método *ANOVA* de un factor para cada región de interés con el fin de examinar las diferencias entre los grupos experimentales. Los resultados se expresaron como número promedio de células inmunopositivas x 1000 /área de interés.

4 Compendio de publicaciones

4.1 *Publicación 1*

Título: Photobiomodulation as a promising new tool in the management of psychological disorders: A systematic review.

Autores: Alba Gutiérrez-Menéndez, Marta Marcos-Nistal, Marta Méndez; Jorge L. Arias.

Revista: Neuroscience y Biobehavioral Reviews.

Campo de la revista: Neurociencias

Factor de impacto: 8,9

Neuroscience and Biobehavioral Reviews

Photobiomodulation as a promising new tool in the management of psychological disorders: a systematic review

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Review Article
Keywords:	Photobiomodulation; Near-infrared light; Psychopathology; Therapy; Treatment
Corresponding Author:	Alba Gutiérrez-Menéndez University of Oviedo Oviedo, Asturias SPAIN
First Author:	Alba Gutiérrez-Menéndez
Order of Authors:	Alba Gutiérrez-Menéndez Marta Marcos-Nistal Marta Méndez Jorge L. Arias
Abstract:	<p>Photobiomodulation is a brain modulation technique that has become a promising treatment for multiple pathologies. This systematic review collects studies up to 2019 about the beneficial effects of photobiomodulation as a therapy for treating psychological disorders and a tool for modulating cognitive processes. This technique is mostly used for the treatment of depression and stress, as well as to study its effects on psychological variables in healthy subjects. Despite the lack of parameters used, photobiomodulation seems to achieve enough brain penetration to produce beneficial effects in healthy subjects and patients with multiple pathologies. The best parameters are the wavelengths of 810 nm for the treatment of depression and 1064 nm for cognitive enhancement, along with an irradiance of 250 mW/cm² and a yield of 60 J/cm². It weekly application on the bilateral prefrontal area and the default mode network (DMN) seems to be ideal for the maintenance of the effects. Photobiomodulation could be used as an effective and safe therapy for the treatment of multiple psychological pathologies.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Milagros Gallo Torre University of Granada mgallo@ugr.es Milagros Gallo has worked in the Neuroscience field from her beginning. Her works study in-depth neuroplasticity and learning processes. Our review collects articles that use the photobiomodulation technique as a tool to modulate cognitive functions. Hence, our theme may be of interest to Milagros and she could be an excellent reviewer.</p> <p>Paolo Cassano Massachusetts General Hospital pcassano@mgh.harvard.edu Paolo Cassano is an assistant professor of psychiatry and Director of Photobiomodulation. His work is widely aimed to study the effects of photobiomodulation technique in the psychological field. Our systematic review collects many articles of this researcher so, he could be an excellent reviewer due to his large career and his knowledge in this extensive realm.</p> <p>Quanguang Zhang Medical College of Georgia at Augusta University qzhang@augusta.edu Quanguang has numerous articles focused on the study of the photobiomodulation' effects. His knowledge in this field is appropriated to review our article.</p>

Photobiomodulation as a promising new tool in the management of psychological disorders: a systematic review

Highlights

1. Photobiomodulation achieves enough brain penetration to produce beneficial effects.
2. Wavelengths of 810 nm are suitable for the treatment of depression.
3. Wavelengths of 1064 nm obtain cognitive enhancement.
4. Irradiance of 250 Wm/ cm² and fluency of 60 J/ cm² improve cognitive functions.
5. Weekly application on bilateral prefrontal cortex maintains the effects.

Abstract

Photobiomodulation is a brain modulation technique that has become a promising treatment for multiple pathologies. This systematic review collects studies up to 2019 about the beneficial effects of photobiomodulation as a therapy for treating psychological disorders and a tool for modulating cognitive processes. This technique is mostly used for the treatment of depression and stress, as well as to study its effects on psychological variables in healthy subjects. Despite the lack of parameters used, photobiomodulation seems to achieve enough brain penetration to produce beneficial effects in healthy subjects and patients with multiple pathologies. The best parameters are the wavelengths of 810 nm for the treatment of depression and 1064 nm for cognitive enhancement, along with an irradiance of 250 mW/cm² and a yield of 60 J/cm². It weekly application on the bilateral prefrontal area and the default mode network seems to be ideal for the maintenance of the effects. Photobiomodulation could be used as an effective and safe therapy for the treatment of multiple psychological pathologies.

Keywords: photobiomodulation, near-infrared light, psychopathology, therapy, treatment.

Abbreviations: ABM, attention bias modification; ADHD, attention deficit hyperactivity disorder; ASLMS, American Society for Laser Medicine and Surgery; ATP, adenosine triphosphate; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CCO, cytochrome c oxidase; CNS, central nervous system; DMN, default mode network; LED, light-emitting diode; OCD, obsessive-compulsive disorder; PBM, photobiomodulation; PBMT, photobiomodulation therapy; ROS, reactive oxygen species; SAD, seasonal affective disorder; WOS, Web of Science.

Photobiomodulation as a promising new tool in the management of psychological disorders: a systematic review

Alba Gutiérrez-Menéndez^{*ab}, Marta Marcos-Nistal^a, Marta Méndez^{ab}, Jorge L. Arias^{ab}

^a Laboratory of Neuroscience, Department of Psychology. University of Oviedo, Plaza Feijóo, s/n, E-33003, Oviedo, Spain.

^b Instituto de Neurociencias del Principado de Asturias (INEUROPA), Oviedo, Spain.

.

* **Corresponding author:** Laboratory of Neuroscience, Department of Psychology. University of Oviedo, Plaza Feijóo, s/n, E-33003, Oviedo, Spain. E-mail: gutierrezalba@uniovi.es. Phone number: +34 985

10 32 12

Introduction

Currently, there is an increase in the use of non-invasive brain stimulation techniques that modulate the central nervous system's (CNS) activity using safe application mechanisms. These techniques include the use of faint electric flows, magnetic fields in the brain (Bravo-Esteban and López Larraz, 2016), and photobiomodulation therapy (PBMT) (Chan et al., 2019). The latter therapy, previously known as low-level laser therapy or low-level light therapy (Michael R Hamblin, 2019), was first applied in 1967 by Endre Mester. He used a low-level laser to study its effects on cancer cells, achieving better healing and hair growth in the application area (Hamblin, 2016a). In recent years, this technique has evolved into a clinical tool in therapies designed to treat various pathologies (Musstaf et al., 2019). In addition, it has obtained the recognition of academic journals, clinical professionals, and entities related to biomedical science, including the constitution of professional societies dedicated to photobiomodulation (WALT and NAALT) (Hamblin, 2016a).

Michael Hamblin defines photobiomodulation (PBM) as: “the use of red or near-infrared light to stimulate, heal, regenerate, and protect tissue that has either been injured, is degenerating, or else is at risk of dying” (Hamblin, 2016b). PBM modulates biological functions of our biosystems without damaging them (Liu et al., 2009). These effects are made possible by the absorption of photons by the cytochrome c oxidase (CCO), an enzyme located in the mitochondrial inner membrane that is responsible for catalysing the transformation of oxygen into water for the production of adenosine triphosphate (ATP), the main energy molecule in the body (Hamblin, 2018a). This direct increase in ATP improves reactive oxygen species (ROS) generation, in addition to producing nitric oxide dissociation by the CCO, leading to greater metabolic activity (Michael R. Hamblin, 2019), which enhances chronic brain and neurological functions (Kuffler, 2016). Moreover, PBM induces stem cell activation, triggering an increase in migration, differentiation, proliferation, and neuronal viability (de Freitas and Hamblin, 2016),

and it is involved in the expression of more than 100 protector genes (Mathewson, 2015; Mitrofanis and Jeffery, 2018).

The application of PBMT has achieved optimal results in several medical fields, and it is widely used in dentistry (Prasad et al., 2019; Ross and Ross, 2009; Zúñiga et al., 2018), pain reduction, dermatology (Hamblin, 2017), wound healing by triggering the immune response (Landaeta et al., 2008; Salehpour and Rasta, 2017), and the treatment of several inflammatory conditions (Gavish and Houreld, 2018). The mechanism of this therapy makes it optimal for application on energy availability sensitive systems, such as the nervous system (Kuffler, 2016). For this reason, PBM has become one of the most dynamic and promising fields in Neurotherapy (Rojas and Gonzalez-Lima, 2013). The use of PBM on the brain began after confirming its benefits in acute stroke (Michael R. Hamblin, 2019), and since then, numerous studies have confirmed its advantageous effects: repairing damaged nerves in the CNS and restoring brain blood flow, the stimulation of neuron and glial cell neurogenesis, synaptogenesis, and migration, as well as the secretion of nerve growth factors, such as the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Hamblin, 2018b; Michael R. Hamblin, 2019; Mitrofanis and Jeffery, 2018). Likewise, it has been shown to be effective in the treatment of traumatic brain injury and neurodegenerative diseases (Cassano et al., 2016). In the psychological realm, it has displayed effects on learning and memory, attention, executive functions, and several psychiatric disorders (Cassano et al., 2016). Therefore, PBM can be considered an innovative and potential treatment for a wide range of neurological, psychological, and psychiatric disorders (Salehpour et al., 2018a) from a non-invasive, inexpensive, and safe perspective (Rojas and Gonzalez-Lima, 2013).

Near-infrared light has also been applied in many pathologies to examine whether deleterious effects are found after its use, or whether, in contrast, it can be considered a potential alternative treatment. The pathology mostly chosen for these studies has been depression. According to the World Health Organization, this pathology is the leading cause of worldwide disability, affecting more than 300 million people (World Health Organization (WHO), 2017).

Depression has been found to display several brain changes, such as hippocampal atrophy and dentate gyrus apoptosis, changes in oxygenation and mitochondrial dysfunction, weakening of neuronal networks (Salehpour and Rasta, 2017), and deficits in prefrontal brain flow, with the latter dysfunction being a common alteration in other mental disorders (Schiffer et al., 2009). An increase in oxidative stress, neuroinflammation, apoptosis, and hypometabolism (Caldieraro and Cassano, 2019), and a decrease in BDNF, have also been found (Caruncho Michinel and Rivera Baltanás, 2010). The usual depression treatments are pharmacological (Caruncho Michinel and Rivera Baltanás, 2010) and psychological (Arrarás and Manrique, 2019). For this reason, PBMT is considered a strong alternative anti-depressive treatment because it acts on the dysfunctional brain mechanisms of this disorder (Cassano et al., 2018).

PBMT has not only shown beneficial effects on depressive disorders. It has also been regarded as a useful treatment for other disorders that exhibit prefrontal lobe dysfunctions, including autism, obsessive-compulsive disorder (OCD), schizophrenia, or attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) (Hamblin, 2016b). Cassano et al. (2018) add panic attacks, claustrophobia, and social anxiety to these disorders. Moreover, other pathologies such as bipolar disorder, seasonal affective disorder (SAD), or sleep disturbances that have been associated with circadian rhythm dysregulations (Ashkenazy et al., 2009) could be restored through the use of PBMT (Santana-Blank and Rodríguez-Santana, 2018), showing its evident neurobiological functionality.

PBMT, like other transcranial techniques, is questioned because its efficacy and reproducibility are unknown, even though satisfactory results have been noted in different applications and its technology has been verified by the Food and Drug Administration (USA) (Rojas and Gonzalez-Lima, 2013). These positive results, along with the minimum presence of secondary effects, have led to an increase in experimental studies whose objective is to achieve quality and methodological rigour of PBM as a therapeutic tool, resulting in a body of solid knowledge that makes it possible to go beyond basic studies and normalize its use in human

treatments. Thus, it is important to carry out reviews that show the discrepancies and similarities of the studies, in order to determine the most appropriate methodology and dosimetry and establish application procedures in multiple psychological disorders. Therefore, the purpose of this systematic review is to compare the different parameters used in PBMT, analyse the beneficial effects of PBM as a potential therapy in the field of psychological disorders and a tool for modulating cognitive processes, and discuss its use as a restorative technique for brain function, by reviewing the scientific literature published until the year 2019.

Method

The present systematic review was carried out following the PRISMA Statement for reporting systematic reviews (Moher et al., 2014, 2009). Study selection included all types of documents whose main topic was the intervention in psychological disorders using PBM, excluding reviews.

Search Strategy

First, the PubMed MeSH Database was used to define the keywords (MeSH terms) that would be used as a search index, selecting a total of 12 keywords: *Low Level Light Therapy*; *Low-Level Light Therapy*; *Photobiomodulation Therapy*; *Photobiomodulation Therapies*; *LLLT*; *Low Level Laser Therapy*; *Low Level Laser Therapies*; *Low-Level Laser Therapy*; *Low Power Laser Therapy*; *Low-Power Laser Therapy*; *Laser Biostimulation* and *Laser Phototherapy*. Then, PubMed, Scopus, Google Scholar, Web of Science (WOS), and ScienceDirect were searched on 1 January of 2020 for articles published in English or Spanish before this date, with no time deadline to gather relevant articles. For this purpose, the MeSH terms were combined with the following terms: “*psychology*”, “*stress*”, “*depression*”, “*cognitive*”, or “*brain*”, and excluded articles that used PBMT to treat medical conditions by using the Boolean operator “NOT” with the keywords: “*diabetes*”, “*cancer*”, “*skin*”, “*retinal*”, “*wound*”, “*muscle*”, “*traumatic*”, “*fibromyalgia*”, “*dental*”, “*weight*”, “*pain*”, and “*oral*”.

Study Selection

The PubMed, Scopus, and WOS databases were first searched, gathering 222, 242, and 275 articles, respectively. In the same way, ScienceDirect and Google Scholar databases yielded 136 and 236 publications, reaching a total of 1,111 documents. A manual selection was carried out after reading the title and/or the abstract, and duplicated publications in the different databases were removed, obtaining 96 articles. Additionally, 11 articles extracted from other publications were added. Finally, 71 articles that did not meet the inclusion criteria were deleted, selecting a total of 36 studies (Figure 1) (Insert Figure 1 here).

Data analysis

An exhaustive analysis of each article of interest was carried out to extract relevant information about PBMT functioning and application in the psychological field (Table 1). Because there is no administration protocol, the different application parameters: type of light-emitting device (laser or light-emitting diode (LED)), wavelength, irradiance, fluency, wave type, and the mode of application of the treatment (application area, number of sessions, time of each session, and duration of the treatment) were taken into account. The type of sample used (human/animal) in each study and the presence of pathologies were also taken into consideration.

Results

Sample

Most of the articles ($n=26$) used human populations, and the number of female participants ($n=164$) was higher than the number of male participants ($n=155$). More than half of these studies were carried out with healthy people with no pathologies ($n=15$), and three of them used elderly participants. The rest of the publications included samples of patients diagnosed with depression ($n=7$), bipolar disorder ($n=1$), anxiety ($n=1$), phobias ($n=1$), and Gulf War syndrome ($n=1$).

The remaining 10 articles used an animal sample, with the use of males ($n=209$) prevailing over females ($n=30$). Two of these articles chose healthy subjects with no pathologies, subjecting the animal, in one of these publications, to sleep deprivation. Most of the articles used subjects with depressive pathology ($n=5$), and in the rest ($n=3$), the animals were subjected to different stress protocols (early stress/ mild chronic stress).

Irradiation and light dose parameters

Most of the studies used a laser light ($n=23$) as opposed to the use of LEDs ($n=13$). The prevailing wavelengths were 810 nm ($n=12$) and 1,064 nm ($n=12$), followed by wavelengths of around 800 nm ($n=11$). The shortest wavelength was 630 nm, and the longest was 1,072 nm (Figure 2) (Insert Figure 2 here).

The irradiance, also known as power density (power (W) divided by the area cm^2), shows greater variability in the values used. The 250 mW/cm^2 irradiance was the most frequently used value ($n=10$), following by the values of 100 mW/cm^2 ($n=3$) and 25 mW/cm^2 ($n=3$) (Figure 3) (Insert Figure 3 here).

Regarding the fluency or the energy density, as in the case mentioned above, there is great heterogeneity, with the fluency of 60 J/cm^2 being the most frequently used value ($n=11$).

Finally, articles chose different types of waves. The majority of the studies used a continuous wave ($n=17$) versus the use of 10 Hz pulse waves ($n=7$). Two of the analysed articles chose a 40 Hz wave, and only one used a 100 Hz wave.

Area and mode of application

The majority of the analysed articles chose the prefrontal cortex as a point of application ($n=23$), with the right prefrontal cortex being the most predominant area ($n=9$). In addition to this direct brain application, intranasal administration was also highlighted ($n=5$).

Regarding the application mode, there is great diversity in the irradiation time in each session and the treatment interval. Thus, the irradiation time most widely used was eight minutes ($n=9$), followed by 20 minutes ($n=6$) and 30 minutes ($n=5$). With regard to the treatment interval, three weeks ($n=4$) and eight weeks ($n=4$) were the most commonly used application times. The longest period of use was nine months ($n=1$), and the shortest was only three days ($n=1$).

Intervention effects

Depression. Schiffer et al., (2009) carried out the first study that analysed the effects of PBMT in depressed patients. The sample was composed of 10 patients who were resistant to common depression treatments. After two weeks of application, they achieved significant improvements in anxiety and depression symptoms and 60% remission, a higher percentage than other treatments, accompanied by a cerebral blood flow increase in both hemispheres. After this research, Cassano et al., (2015) performed a pilot study where PBMT was applied to four patients diagnosed with treatment-resistant major depression, resulting in a reduction in depressive scores and great treatment tolerance after three weeks of application. Then, in 2018, this author, using 21 patients diagnosed with depression disorder, achieved a reduction in symptoms in 18 patients after four weeks of LED administration (Cassano et al., 2018). In addition, in the same year, together with Caldieraro, Sani and Bui, the author carried out a case study in which this technique was applied intranasally and intracranially to a 78-year-old woman with heart disease who had been diagnosed with anxiety depressive disorder for more than nine months. Results showed that intranasal application improved only the anxiety symptoms, but not the depressive ones, whereas intracranial administration improved both types of symptoms and enhanced quality of life. During the therapy, the patient reported headaches that increased with the administration of two daily doses of PBMT (Caldieraro et al., 2018). The same results were found by Henderson and Morris (2017), whose study achieved a decrease in depression scores and remission of suicidal ideation after laser administration. Recently, Cassano et al., (2019) examined photobiomodulation's effects on the blood pressure of depressed patients and found a slight increase in diastolic blood

pressure in these patients, compared to untreated patients. Disner, Beevers and Gonzalez-Lima (2016) combined PBMT with other techniques. In this case, they combined this therapy with Attention bias modification (ABM), a therapy used to avoid focusing on negative aspects. Both applications were carried out in 51 adults with depression, and results showed improvements in attention and learning, with greater efficacy if the light emission was applied in the right prefrontal cortex and before the ABM session.

Basic research has shown similar results. Salehpour, Rasta, Mohaddes, Sadigh-Eteghad and Salarirad (2016), using an experimental rat model of depression, found reductions in anxiety and depressive behaviours and cortisol and glucose levels, as well as body weight improvements, after PBMT. Recently, this author, considering PBMT's actions on inflammatory factors, combined coenzyme Q₁₀, an essential cofactor for mitochondrial complexes, with the emission of laser light in an induced depression rat model. Results showed a reduction in anxiety symptoms and oxidative factors, along with a neurotrophin increase (Salehpour et al., 2019). In the same way, Mohammed (2016) achieved improvements in escape behaviour and brain frequencies in rats with drug-induced depression.

Furthermore, Eshaghi, Sadigh-Eteghad, Mohaddes, and Rasta (2019), using a mouse animal model, achieved reductions in anxiety and depression levels, as well as reductions in cortisol and nitric oxide levels in the prefrontal cortex and hippocampus, along with an increase in serotonin. Likewise, Xu et al., (2017) showed an increase in ATP production and a decrease in depressive symptoms in induced depression mice.

Stress. Near-infrared light has also been used to treat multiple types of stress. Wu et al., (2012) applied laser light to animals with mild chronic stress, and they obtained a reduction in stress symptoms and body-weight maintenance after three weeks of treatment. Similarly, Meynaghizadeh-Zargar, Sadigh-Eteghad, Mohaddes, Salehpour and Rasta (2019) used PBMT and infusion of methylene blue in animals with mild chronic stress. Both therapies, together and separately, restored cognitive and molecular damage that had been found. Finally, Banqueri et al.

(2019) showed that the use of laser light re-established cognitive flexibility and oxidative metabolism levels, which had been altered in subjects subjected to early stress.

Additional applications. Recently, Maiello et al., (2019) carried out a pilot study to evaluate the anxiolytic effects of PBMT, and their results showed anxiety reduction and sleep improvement. At the same time, Mannu, Saccaro, Spera and Cassano (2019) applied this therapy in patients diagnosed with bipolar disorder and found anhedonia reductions along with increases in libido and improvements in sleep, anxiety, impulsivity, and irritability. Chao, (2019) used LEDs to treat two patients diagnosed with Gulf War Syndrome, characterized by the presence of multiple concurrent symptoms, including headaches, joint pain, gastrointestinal problems, fatigue, and even cognitive problems. Results showed a decrease in symptoms after 12 weeks of use. Moreover, Zaizar, Gonzalez-Lima and Telch (2018) described a randomized clinical design whose aim was to determine whether PBMT would be a useful technique for the extinction of phobias.

Application in healthy subjects. Studies designed to elucidate the effects of this technique have not only applied it to subjects diagnosed with several psychological disorders, but also to healthy subjects with no clinical symptoms. The first authors to use near-infrared light in healthy subjects were Barrett and Gonzalez-Lima, (2013). In this study, they reported an increase in positive affective states and improvements in attention and memory that were maintained for two weeks after treatment. Subsequently, Gonzalez-Lima, (2017) found an increase in CCO and oxygenated haemoglobin concentrations in the prefrontal cortex, along with an improvement in cognitive performance after the use of 1,064 nm laser light on the subject's forehead. The same results were obtained by Blanco, Saucedo and Gonzalez-Lima (2016), who optimized prefrontal rule-based categorical learning. These previous results were confirmed by Blanco, Maddox and Gonzalez-Lima (2017), who concluded that there were improvements in executive functions, evaluated by the Wisconsin Test, after the use of laser light in healthy subjects. Likewise, Moghadam, Nazari, Jahan, Mahmoudi and Moghadam Salimi (2017) found improvements in

attentional capacity. It should be noted that the study carried out by Hwang, Castelli and Gonzalez-Lima (2016) combined aerobic exercise with laser emission and obtained improvements in attention, working memory, and executive tasks.

Brain wave modulation after the use of near-infrared light was achieved by Wang, Dmochowki, Husain, Gonzalez-Lima and Lui (2017), who found changes in the alpha frequency in the ipsilateral fronto-parieto-occipital network and the contralateral parieto-occipital network. Moreover, Zomorodi, Loheswaran, Pushparaj and Lim (2019) showed similar results through the increase in alpha, beta, and gamma frequencies.

Currently, several groups continue their studies in healthy people. Thus, Gonzalez-Lima et al., (2019) describe a study in which they found improvements of up to 50% in memory, learning, and attention, with a significantly higher effect on young adults after 1,064 nm laser light. This cognitive achievement was also seen in the study by Jahan, Nazari, Mahmoudi, Salehpour and Salimi (2019), where they obtained improvements in attention performance in addition to brain activity modification. Similarly, Holmes et al., (2019) found an improvement in cognitive performance, along with brain oxygenation changes, and Heinrich et al., (2019) showed no differences between treated and control groups after the application of LEDs in the prefrontal cortex.

Several teams have tested the effects of this technique in elderly subjects. Thus, Chan, Lee, Yeung and Hamblin (2019) achieved improvements in selection actions, inhibition ability, and cognitive flexibility after seven and half minutes of the use of LED light in a single session. Sinha, John, Woods and Bowers (2019) also obtained an increase in functional connectivity in the cingulate cortex, and Vargas et al., (2017) found an improvement in cognitive measures and an increase in alpha, beta, and gamma frequencies in the resting-state of elderly subjects with risk of cognitive impairment.

Regarding the use of this therapy in animal models, Michalikova, Ennaceur, van Rensburg, and Chazot (2007) found better spatial performance, memory improvement, and anxiety reduction after the use of lasers on female rats. Additionally, Salehpour et al., (2018) found that PBM stops cognitive decline caused by sleep deprivation in mice, in addition to increasing hippocampal mitochondrial activity and reducing oxidative damage.

Discussion

This systematic review aimed to evaluate the effectiveness of near-infrared light as a modulator of cognitive processes and possible treatment for psychological disorders, in addition to analysing the different parameters in an attempt to unify the current methodology. The review included 36 articles in which this technique was applied in healthy subjects and subjects with psychological symptoms, and its analysis highlights the possible use of PBM as a promising future technique in the treatment of psychological disorders.

PBM is a technique that uses radiant energy with wavelengths ranging from red to near-infrared, administered by a laser or LED light, to modulate biological functions and /or induce a therapeutic effect in a non-invasive way (Rojas and Gonzalez-Lima, 2013). The studies compiled, as described above, chose mainly human samples, recruiting a low number of experimental subjects. The studies carried out by Blanco et al. (2016), Gonzalez-Lima, (2017 and 2019), and Zaizar et al. (2018) have a broad sample of healthy subjects consisting of more than 100 participants. The target population is chosen in a non-random way, and, generally, there are no control groups for comparison. Moreover, there is a lack of adequate follow-up of the subjects to evaluate the long-term effects of this technique. Despite these limitations, the results show numerous beneficial effects, with no significant adverse effects. For this reason, authors such as Salehpour and Rasta (2017) highlight the growing interest in the study and application of PBMT as a tool to enhance cognitive processes in healthy subjects.

Near-infrared light administration is usually carried out using a laser light source. This source supplies energy through a single wavelength with high penetration into small tissue areas. However, the large amount of supplied energy can produce tissue warming, which increases the risk of damage (Rojas and Gonzalez-Lima, 2013). Thus, LEDs are increasingly used because they emerge as a safer and less expensive alternative (Berman et al., 2017). This source can combine different wavelengths by emitting a non-coherent light beam, and it shows greater amplitude than the laser source, allowing its application on larger areas. However, it is less efficient and difficult to manipulate in terms of position, size, etc., limiting its use to superficial treatment (Musstaf et al., 2019; Rojas and Gonzalez-Lima, 2013). Despite this, it has been described as a safe source because it generates a minimum amount of thermal energy, which leads to a reduction in the risk of tissue damage. Likewise, LED devices are programmable, rechargeable, low-cost, easy to use (Rojas and Gonzalez-Lima, 2013), and suitable for the treatment of acute and chronic conditions (Musstaf et al., 2019). Thus, both sources, laser and LED, could be alternative treatments to the current ones because they provide beneficial effects with safe and affordable applications (Rojas and Gonzalez-Lima, 2013).

The importance of choosing an appropriate source lies in the biological effects they entail because it has been observed that the effects on the organism are completely different depending on the chosen source. Thus, some studies find that, although the light beams from lasers are limited to smaller areas, they are more effective and achieve deeper beneficial therapeutic effects (Musstaf et al., 2019). In this regard, Tatmatsu-Rocha et al., (2018) found beneficial effects on the production of collagen in diabetic animals after the use of laser, but not after LEDs. These authors associate these differences with the type of wave used, pulsed in the case of the laser source and continuous in the case of LEDs. Therefore, the type of wave used, pulsed or continuous, also seems to be a relevant parameter that must be taken into account. Previous rodent studies have shown that the use of pulsed wave laser has been more effective than the continuous wave because it achieves improvements on behavioural tasks and a greater reduction in the

amyloid protein in the hippocampus (Rojas and Gonzalez-Lima, 2013). Similarly, the administration of pulsed laser light could avoid the thermal effect, in addition to facilitating its coordination with different biological variables (Karu, 2014).

Wavelength is another relevant parameter whose variability is shown in the abundant bibliography analysed. The wavelength is chosen from the range of values where it has been verified that the CCO has greater absorption and there is adequate tissue penetration (Carroll, 2019). This range is between 600 and 1,200 nm, except for an efficacy reduction between 700 and 780 nm, thus establishing the functional limit and the therapeutic window (Carroll, 2019; de Freitas and Hamblin, 2016; Henderson and Morries, 2017). For these reasons, most studies agree that the lengths of 810 and 1,064 nm would be versatile and adequate values to achieve effects in the body. Likewise, several authors, such as Caldieraro, Sani, Bui and Cassano (2018), Chan et al. (2019), Henderson and Morries, (2017), and Salehpour and Rasta, (2017), combine different wavelengths to activate different biological mechanisms.

Irradiance is another significant parameter whose determination is complex because it depends on the emission watts and the size of the treatment area. The usual value employed in transcranial human studies is 250 mW/cm², and it descends to 10 and 30 mW/cm² in intranasal applications. Despite this, the value typically used in the medical field is usually lower, around 10-70 mW/cm² per session, to guarantee patient safety (Gavish and Houreld, 2018). Unfortunately, it is difficult to reach a consensus on the ideal value and develop a standardized protocol due to the heterogeneity of the data presented in the analysed articles.

Regarding fluency, the most commonly used values are situated in a range from 10 to 30 J/cm² for the treatment of neurological problems, from 12 to 84 J/cm² for psychological disorders, and from 15 to 60 J/cm² for use in healthy subjects (Gavish and Houreld, 2018; Salehpour and Rasta, 2017). Thus, recent research by Eshaghi et al., (2019) shows that the administration of 1.8 J/cm² on the cortical surface achieves an attenuation of depressive symptoms. Conversely, it has been verified that with the most commonly used value, 60 J/cm², only 2.1 J/cm² of this total

fluency reaches the cortex (Schiffer et al., 2009). Despite this reduction, the supply from 1 to 3 J/cm² seems sufficient and ideal for triggering ATP production (Hamblin, 2018c).

The calibration and appropriate parameters seem to be highly relevant, taking into consideration the tissue properties, condition, amount of water, or type of receptors that absorb the light. Thus, studies have shown that the PBM response in our organism is biphasic, known as the Arndt-Schulz rule: the election of lower parameters does not produce effects in the organism; however, as these values increase, responses achieve a peak of maximum efficiency from which the effects are detrimental due to excessive product generation (de Freitas and Hamblin, 2016). Therefore, by choosing an adequate emission, a significant percentage will be able to pass through the external layers and reach the interested area, showing penetrations of 20 and 30 mm (Salehpour and Rasta, 2017) and even up to 50 mm and 2 cm (Hamblin, 2016b; Santos et al., 2019). Other authors such as Henderson and Morries, (2017), however, find that transcranial emissions do not exceed 10 mm, and they prefer to choose a multi-watt emission combining different parameters, which can be up to 3 cm in human brains. In this regard, Mitrofanis and Jeffery (2018) mention that transcranial stimulation will not exceed 10 mm, but it will reach deeper structures through indirect pathways such as circulation. In contrast, Berman, Hamblin and Chazot (2017) opt for the intranasal application, due to the large number of capillaries that facilitate stimulation. Salehpour et al., (2018) also describe exposure through the oral cavity or ears. Additionally, the implantation of LED fibres in macaques has also provided a safe long-term alternative with no damage (Moro et al., 2017). Regarding the application of the PBMT directly on the skin, the energy absorption will vary depending on the pigmentation, with some authors having to increase the emission force on dark skin and reduce it on lighter skin (Conde Quintero et al., 2011). For other authors, such as Barrett and Gonzalez-Lima (2013), this emission adjustment based on skin pigmentation is not important.

Regarding the treatment area, emission on the forehead is the most commonly chosen area due to the absence of hair, with the frontal area usually selected. Naeser et al., (2016),

however, apply the laser on three specific brain networks: the default mode network (DMN), the central executive network, and the salience network. These interrelated networks play a key role in cognitive function and include the prefrontal, parietal, and even temporal areas (Naeser et al., 2016). Conversely, numerous authors focus these light applications on several distant points or bilaterally, which enhances the effect because the penetration can vary depending on the area. Thus, it has been verified that the application of light on a specific area of the body can have implications for other areas apart from the application site. This attribute is called systemic PBM, and it occurs due to the transmission of the biological effect (Caldieraro and Cassano, 2019). In this regard, a reduction in depressive symptoms has been found in patients with PBM treatment for back pain (Caldieraro and Cassano, 2019; Salehpour and Rasta, 2017). Ganeshan et al., (2019) also find that emission on the back of the rat produces a neuroprotective effect on dopaminergic neurons.

The emission distance also seems to be a variable to consider. Thus, Hamblin, Pires de Sousa, Arany, Carroll and Patthoff (2015) show that light directly applied to the skin contact seems to be the most effective option because it presses on the tissues, modifying blood flow and achieving better penetration. Regarding the irradiation time and the treatment interval, it is difficult to reach a consensus that allows the standardization of this technique because there is high heterogeneity and a lack of specificity in the administration time. In humans, the administration time varies between two and 30 minutes, and authors such as Lapchak (2012) recommend the repetition of these applications to maintain the benefits. Thus, it should be acceptable to repeat the treatment to maintain its effect, due to the absence of long-term damage, but always taking into account the type of dysfunction and its severity.

Regarding questions related to the safety of the technique, the use of LED devices does not seem to produce harmful effects, but it always requires eye protection. In addition, the American Society for Laser Medicine and Surgery (ASLMS) recommends not using this therapy on visible skin lesions, pregnant woman, or people with haematological problems. Several studies

have described transient side effects in humans, such as the presence of headaches (Caldieraro et al., 2018; Cassano et al., 2018). Other studies have also described harmful effects: Yang, Zong, Sun, Jia and Zhao (2017) showed the existence of apoptotic processes after 24 hours of light emission in a non-photosensitive hippocampal cell culture. Additionally, Xuan, Huang and Hamblin (2016) found a delay in the positive effects after 14 daily applications of PB on the mouse brain with traumatic injury, and, recently, a study carried out by Cassano et al., (2019) in patients diagnosed with depression found weight gain and increases in diastolic pressure in the treated group.

From a psychopathological point of view, this technique has been used as a possible therapeutic strategy to treat multiple psychological disorders. In the treatment of depression, Mathewson (2015) concludes that results reported after its use are greater than the results of electroconvulsive therapies or magnetic stimulation. Along these lines, Wu et al., (2012) and Salehpour et al., (2016) compare the effects of PBMT with those of fluoxetine and citalopram, drugs typically used in the treatment of depression symptoms, and they found similar effects of both treatments, but weight gain and a greater reduction in cortisol only occurred with the use of PBM. The combination of PBMT with other pharmacological, physical, or psychotherapeutic treatments is highly recommended because PBM is useful for optimizing states that enhance the action of other treatments (Disner et al., 2016). In this regard, the combination of light and antidepressants seems to accelerate the effectiveness and speed of pharmacological effects (Huang et al., 2009), in addition to achieving superior mitochondrial functions and higher neuronal protection when this technique is combined with metabolic products such as exogenous glucose (Dong et al., 2015).

There is evidence of the existence of mitochondrial dysfunction in many psychological disorders and the importance of oxygenation for the correct functioning of the organism. Duong, Beaulieu and Andreazza (2018) suggest the existence of alterations in genes related to oxidative phosphorylation and bioavailability of ATP, along with a deterioration in mitochondrial

functioning, in bipolar disorder. These alterations make this disorder an ideal target for PBM application. In other ways, lack of sunlight and vitamin D deficiency are related to various disorders, such as depression, SAD, dementia, and schizophrenia (Mathewson, 2015), and so it is expected that the role of PBM will be taken into consideration in their treatment. Likewise, PBM could be used in cases of autism, OCD, ADHD, panic attacks, and claustrophobia (Hamblin, 2016b; Zaizar et al., 2018), and it even seems to produce beneficial effects in premenstrual syndrome, postpartum, and bulimia (Berman et al., 2017). The possible use of PBT in the treatment of all these disorders highlights the therapeutic role of this brain modulation. However, it would be necessary to develop new lines of research to evaluate the possible risks and benefits after their particular use.

Limitations

The articles included in this review describe a wide range of methodologies that are not very specific, and, in some cases, lack details about the parameters used. These disadvantages hinder the possibility of replicating studies and, therefore, developing standardized protocols for the correct, beneficial, and homogeneous use of this technique.

Conclusions

PBM achieves enough brain penetration to produce beneficial effects in healthy subjects and subjects with multiple pathologies. LED devices have reported higher safety and versatility than lasers, despite their lower penetration, and pulsed emission is more effective than continuous emission. Likewise, wavelengths of 810 nm and 1,064 nm achieve the best results in depression treatment and cognitive enhancement, respectively, and there is a consensus about an irradiance of 250 Wm/ cm² and a fluency of 60 J/ cm² to improve cognitive functions. Anatomically, light projection is recommended in the bilateral prefrontal cortex and the DMN, and weekly repetition seems ideal to maintain the effects. The psychological benefits of light exposure are evident, and the preventive effect of this technique is an advantage in many clinical fields because it is able to

reduce healthcare costs and become a possible sustainable, safe, and economical therapy that can easily be accessed and applied. Nevertheless, it will be necessary to overcome the lack of consensus administratively, in order to develop standardized protocols focused on the psychopathological characteristics of each patient. To achieve this goal, companies that produce the administration devices should provide concise and detailed information that allows the research team to adequately describe the parameters. This unification will allow the use of PBM as an effective and safe therapy for the treatment of multiple psychological disorders.

Financial Support

This work was supported by Projects Grants of the MINECO (Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España) PSI2017-83893-R, PSI2017-90806-REDT and PSI 2015-73111-EXP, Ayudas para contratos predoctorales (FPI). Subprograma Estatal de Formación en I+D+i dentro del marco del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2017-2020. MCIU-19-PRE2018-086220 to A.G.M.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest to disclose.

Acknowledgements

We thank AINDACE Foundation (Ayuda a la Investigación del Daño y Enfermedades Cerebrales).

References

- Arrarás, J.I., Manrique, E., 2019. La percepción de la depresión y de su tratamiento. *An. Sist. Sanit. Navar.* 42, 5–8. <https://doi.org/10.23938/ASSN.0591>
- Ashkenazy, T., Einat, H., Kronfeld-Schor, N., 2009. Effects of bright light treatment on depression- and anxiety-like behaviors of diurnal rodents maintained on a short daylight schedule. *Behav. Brain Res.* <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.03.005>
- Banqueri, M., Martínez, J.A., Prieto, M.J., Cid-Duarte, S., Méndez, M., Arias, J.L., 2019. Photobiomodulation rescues cognitive flexibility in early stressed subjects. *Brain Res.* 1720, 146300. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146300>
- Barrett, D.W., Gonzalez-Lima, F., 2013. Transcranial infrared laser stimulation produces beneficial cognitive and emotional effects in humans. *Neuroscience* 230, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.11.016>
- Berman, M.H., Hamblin, M.R., Chazot, P., 2017. Photobiomodulation and Other Light Stimulation Procedures, Rhythmic Stimulation Procedures in Neuromodulation. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803726-3.00004-3>
- Blanco, N.J., Maddox, W.T., Gonzalez-Lima, F., 2017. Improving executive function using transcranial infrared laser stimulation. *J. Neuropsychol.* 11, 14–25. <https://doi.org/10.1111/jnp.12074>
- Blanco, N.J., Saucedo, C.L., Gonzalez-Lima, F., 2016. Transcranial infrared laser stimulation improves rule-based, but not information-integration, category learning in humans. *Neurobiol. Learn. Mem.* 139, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.016>
- Bravo-Esteban, E., López Larraz, E., 2016. Potenciación del reaprendizaje motor y la recuperación funcional en pacientes con ictus: estrategias no invasivas de modulación del sistema nervioso central. *Rev. Neurol.* 62, 273. <https://doi.org/10.33588/rn.6206.2015309>

- Caldieraro, M.A., Cassano, P., 2019. Transcranial photobiomodulation for major depressive and anxiety disorders and for posttraumatic stress disorder, in: *Photobiomodulation in the Brain*. Elsevier Inc., pp. 479–487. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815305-5.00035-x>
- Caldieraro, M.A., Sani, G., Bui, E., Cassano, P., 2018. Long-Term Near-Infrared Photobiomodulation for Anxious Depression Complicated by Takotsubo Cardiomyopathy. *J. Clin. Psychopharmacol.* 38, 268–270. <https://doi.org/10.1097/JCP.0000000000000883>
- Carroll, J.D., 2019. Light sources and dosimetry for the brain and whole body, *Photobiomodulation in the Brain*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815305-5.00007-5>
- Caruncho Michinel, H.J., Rivera Baltanás, T., 2010. Biomarcadores de la depresión. *Rev. Neurol.* 50, 470. <https://doi.org/10.33588/rn.5008.2010177>
- Cassano, P., Caldieraro, M.A., Norton, R., Mischoulon, D., Trinh, N.H., Nyer, M., Dording, C., Hamblin, M.R., Campbell, B., Iosifescu, D. V., 2019. Reported Side Effects, Weight and Blood Pressure, after Repeated Sessions of Transcranial Photobiomodulation. *Photobiomodulation, Photomedicine, Laser Surg.* 37, 651–656. <https://doi.org/10.1089/photob.2019.4678>
- Cassano, P., Cusin, C., Mischoulon, D., Hamblin, M.R., De Taboada, L., Pisoni, A., Chang, T., Yeung, A., Ionescu, D.F., Petrie, S.R., Nierenberg, A.A., Fava, M., Iosifescu, D. V., 2015. Near-Infrared Transcranial Radiation for Major Depressive Disorder: Proof of Concept Study. *Psychiatry J.* 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/352979>
- Cassano, P., Petrie, S.R., Hamblin, M.R., Henderson, T.A., Iosifescu, D. V., 2016. Review of transcranial photobiomodulation for major depressive disorder: targeting brain metabolism, inflammation, oxidative stress, and neurogenesis. *Neurophotonics* 3, 31404. <https://doi.org/10.1117/1.nph.3.3.031404>

- Cassano, P., Petrie, S.R., Mischoulon, D., Cusin, C., Katnani, H., Yeung, A., De Taboada, L., Archibald, A., Bui, E., Baer, L., Chang, T., Chen, J., Pedrelli, P., Fisher, L., Farabaugh, A., Hamblin, M.R., Alpert, J.E., Fava, M., Iosifescu, D. V., 2018. Transcranial Photobiomodulation for the Treatment of Major Depressive Disorder. the ELATED-2 Pilot Trial. *Photomed. Laser Surg.* 36, 634–646. <https://doi.org/10.1089/pho.2018.4490>
- Chan, A.S., Lee, T.L., Yeung, M.K., Hamblin, M.R., 2019. Photobiomodulation improves the frontal cognitive function of older adults. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 34, 369–377. <https://doi.org/10.1002/gps.5039>
- Chao, L.L., 2019. Improvements in Gulf War Illness Symptoms After Near-Infrared Transcranial and Intranasal Photobiomodulation: Two Case Reports. *Mil. Med.* 0, 17–19. <https://doi.org/10.1093/milmed/usz037>
- Conde Quintero, M., de Sande, J.C.G., Toscano Arroyo, M.J., 2011. Terapia por láser de baja potencia: Consideraciones óptico-físicas y biológicas determinantes en su aplicación clínica. *Fisioterapia* 33, 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.ft.2010.11.002>
- de Freitas, L.F., Hamblin, M.R., 2016. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* 22, 348–364. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2016.2561201>
- Disner, S.G., Beevers, C.G., Gonzalez-Lima, F., 2016. Transcranial Laser Stimulation as Neuroenhancement for Attention Bias Modification in Adults with Elevated Depression Symptoms. *Brain Stimul.* 9, 780–787. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2016.05.009>
- Dong, T., Zhang, Q., Hamblin, M.R., Wu, M.X., 2015. Low-level light in combination with metabolic modulators for effective therapy of injured brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 1435–1444. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.87>
- Duong, A., Beaulieu, M., Andreatza, A., 2018. Targeting Mitochondria in Bipolar Disorder:

- Brain Bioenergetics and Photobiomodulation. *Bipolar Disord.* 20, 45–46.
https://doi.org/10.1111/bdi.32_12616
- Eshaghi, E., Sadigh- Eteghad, S., Mohaddes, G., Rasta, S.H., 2019. Transcranial photobiomodulation prevents anxiety and depression via changing serotonin and nitric oxide levels in brain of depression model mice: A study of three different doses of 810 nm laser . *Lasers Surg. Med.* 51, 634–642. <https://doi.org/10.1002/lsm.23082>
- Ganeshan, V., Skladnev, N. V., Kim, J.Y., Mitrofanis, J., Stone, J., Johnstone, D.M., 2019. Pre-conditioning with Remote Photobiomodulation Modulates the Brain Transcriptome and Protects Against MPTP Insult in Mice. *Neuroscience* 400, 85–97.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.12.050>
- Gavish, L., Houreld, N.N., 2018. Therapeutic Efficacy of Home-Use Photobiomodulation Devices: A Systematic Literature Review. *Photomed. Laser Surg.* 37, 1–13.
<https://doi.org/10.1089/pho.2018.4512>
- Gonzalez-Lima, F., 2017. Transcranial Photobiomodulation: Controlled Evidence for Cerebrovascular and Cognitive Enhancement. *Biol. Psychiatry* 81, S156.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.02.398>
- Gonzalez-Lima, F., Barrett, D., Saucedo, C., Alexander, C., Liu, H., Haley, A., 2019. Transcranial Photobiomodulation in Healthy Subjects: Cognitive Enhancement. *Biol. Psychiatry* 85, S80–S81. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.03.208>
- Hamblin, M.R., 2019. How to Write a Good Photobiomodulation Article. *Photobiomodulation, Photomedicine, Laser Surg.* XX, 1–2. <https://doi.org/10.1089/photob.2019.4648>
- Hamblin, M.R., 2019. Mechanisms of photobiomodulation in the brain, in: *Photobiomodulation in the Brain*. Elsevier, pp. 97–110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815305-5.00008-7>
- Hamblin, M.R., 2018a. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation.

- Photochem. Photobiol. 94, 199–212. <https://doi.org/10.1111/php.12864>
- Hamblin, M.R., 2018b. Photobiomodulation for traumatic brain injury and stroke. *J. Neurosci. Res.* <https://doi.org/10.1002/jnr.24190>
- Hamblin, M.R., 2018c. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochem. Photobiol.* <https://doi.org/10.1111/php.12864>
- Hamblin, M.R., 2017. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys.* <https://doi.org/10.3934/biophy.2017.3.337>
- Hamblin, M.R., 2016a. Photobiomodulation or low-level laser therapy. *J. Biophotonics.* <https://doi.org/10.1002/jbio.201670113>
- Hamblin, M.R., 2016b. Shining light on the head: Photobiomodulation for brain disorders. *BBA Clin.* <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.09.002>
- Hamblin, M.R., Pires de Sousa, M. V., Arany, P.R., Carroll, J.D., Patthoff, D., 2015. Low level laser (light) therapy and photobiomodulation: the path forward, in: *Mechanisms for Low-Light Therapy X.* <https://doi.org/10.1117/12.2084049>
- Heinrich, M., Sanguinetti, J., Hicks, G., Gibson, B., Mullins, T., Aragon, D., Spinks, J., Lamphere, M., Yu, A., Clark, V., 2019. Photobiomodulation for Cognitive Enhancement in Healthy Adults. *Brain Stimul.* 12, 506. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2018.12.658>
- Henderson, T.A., Morries, L.D., 2017. Multi-Watt Near-Infrared Phototherapy for the Treatment of Comorbid Depression: An Open-Label Single-Arm Study. *Front. Psychiatry* 8. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2017.00187>
- Holmes, E., Barrett, D.W., Saucedo, C.L., O'Connor, P., Liu, H., Gonzalez-Lima, F., 2019. Cognitive Enhancement by Transcranial Photobiomodulation Is Associated With Cerebrovascular Oxygenation of the Prefrontal Cortex. *Front. Neurosci.* 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01129>

- Huang, Y., Mroz, P., Hamblin, M.R., 2009. Basic photobiomedicine [WWW Document]. URL <http://photobiology.info/Photomed.html>
- Hwang, J., Castelli, D.M., Gonzalez-Lima, F., 2016. Cognitive enhancement by transcranial laser stimulation and acute aerobic exercise. *Lasers Med. Sci.* 31, 1151–1160. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-1962-3>
- Jahan, A., Nazari, M.A., Mahmoudi, J., Salehpour, F., Salimi, M.M., 2019. Transcranial near-infrared photobiomodulation could modulate brain electrophysiological features and attentional performance in healthy young adults. *Lasers Med. Sci.* 34, 1193–1200. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-02710-3>
- Karu, T.I., 2014. Cellular and molecular mechanisms of photobiomodulation (low-power laser therapy). *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* 20, 143–148. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2013.2273411>
- Kuffler, D.P., 2016. Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. *Regen. Med.* 11, 107–122. <https://doi.org/10.2217/rme.15.82>
- Landaeta, B.M.J., Suazo, G.I.C., Cantín, L.M., Roa, H.I.J., Zavando, M.D.A., 2008. Efecto de la terapia láser de baja potencia sobre el hueso alveolar dañado. *Int. J. Morphol.* <https://doi.org/10.4067/S0717-95022008000300021>
- Lapchak, P.A., 2012. Transcranial near-infrared laser therapy applied to promote clinical recovery in acute and chronic neurodegenerative diseases. *Expert Rev. Med. Devices* 9, 71–83. <https://doi.org/10.1586/erd.11.64>
- Liu, T.C., Liu, R., Zhu, L., Yuan, J., Hu, M., Liu, S., 2009. Homeostatic photobiomodulation. *Front. Optoelectron. China* 2, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12200-009-0010-3>
- Maiello, M., Losiewicz, O.M., Bui, E., Spera, V., Hamblin, M.R., Marques, L., Cassano, P., 2019. Transcranial Photobiomodulation with Near-Infrared Light for Generalized Anxiety

- Disorder: A Pilot Study. *Photobiomodulation, Photomedicine, Laser Surg.* 37, 644–650. <https://doi.org/10.1089/photob.2019.4677>
- Mannu, P., Saccaro, L.F., Spera, V., Cassano, P., 2019. Transcranial Photobiomodulation to Augment Lithium in Bipolar-I Disorder. *Photobiomodulation, Photomedicine, Laser Surg.* 37, 577–578. <https://doi.org/10.1089/photob.2019.4674>
- Mathewson, I., 2015. Did human hairlessness allow natural photobiomodulation 2 million years ago and enable photobiomodulation therapy today? This can explain the rapid expansion of our genus's brain. *Med. Hypotheses.* <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2015.01.032>
- Meynaghizadeh-Zargar, R., Sadigh-Eteghad, S., Mohaddes, G., Salehpour, F., Rasta, S.H., 2019. Effects of transcranial photobiomodulation and methylene blue on biochemical and behavioral profiles in mice stress model. *Lasers Med. Sci.* <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02851-z>
- Michalikova, S., Ennaceur, A., van Rensburg, R., Chazot, P.L., 2008. Emotional responses and memory performance of middle-aged CD1 mice in a 3D maze: Effects of low infrared light. *Neurobiol. Learn. Mem.* 89, 480–488. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.07.014>
- Mitrofanis, J., Jeffery, G., 2018. Does photobiomodulation influence ageing? *Aging (Albany, NY).* <https://doi.org/10.18632/aging.101556>
- Moghadam, H.S., Nazari, M.A., Jahan, A., Mahmoudi, J., Moghadam Salimi, M., 2017. Beneficial Effects of Transcranial Light Emitting Diode (LED) Therapy on Attentional Performance: An Experimental Design. *Iran. Red Crescent Med. J.* 19. <https://doi.org/10.5812/ircmj.44513>
- Mohammed, H.S., 2016. Transcranial low-level infrared laser irradiation ameliorates depression induced by reserpine in rats. *Lasers Med. Sci.* 31, 1651–1656. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-2033-5>

- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D., Group, T.P., 2009. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med.* <https://doi.org/10.1371/journal.pmed1000097>
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Douglas G, A., PRISMA, G., 2014. Ítems de referencia para publicar Revisiones Sistemáticas y Metaanálisis: La Declaración PRISMA. *Rev. Española Nutr. Humana y Dietética- Spanish J. Hum. Nutr. Diet.* 18, 172–181.
- Moro, C., Torres, N., Arvanitakis, K., Cullen, K., Chabrol, C., Agay, D., Darlot, F., Benabid, A.L., Mitrofanis, J., 2017. No evidence for toxicity after long-term photobiomodulation in normal non-human primates. *Exp. Brain Res.* 235, 3081–3092. <https://doi.org/10.1007/s00221-017-5048-7>
- Musstaf, R.A., Jenkins, D.F.L., Jha, A.N., 2019. Assessing the impact of low level laser therapy (LLLT) on biological systems: a review. *Int. J. Radiat. Biol.* 95, 120–143. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1524944>
- Naeser, M.A., Martin, P.I., Ho, M.D., Krengel, M.H., Bogdanova, Y., Knight, J.A., Yee, M.K., Zafonte, R., Frazier, J., Hamblin, M.R., Koo, B.B., 2016. Transcranial, red/near-infrared light-emitting diode therapy to improve cognition in chronic traumatic brain injury. *Photomed. Laser Surg.* 34, 610–626. <https://doi.org/10.1089/pho.2015.4037>
- Prasad, S.M.V., Prasanna, T.R., Kumaran, V., Venkatachalam, N., Ramees, M., Abraham, E.A., 2019. Low-level laser therapy: A noninvasive method of relieving postactivation orthodontic pain-a randomized controlled clinical trial. *J. Pharm. Bioallied Sci.* https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_303_18
- Rojas, J.C., Gonzalez-Lima, F., 2013. Neurological and psychological applications of transcranial lasers and LEDs. *Biochem. Pharmacol.* 86, 447–457. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.06.012>

- Ross, G., Ross, A., 2009. Photobiomodulation: An Invaluable Tool for All Dental Specialties, *Journal of Laser Dentistry*.
- Salehpour, F., De Taboada, L., Cassano, P., Kamari, F., Mahmoudi, J., Ahmadi-Kandjani, S., Rasta, S.H., Sadigh-Eteghad, S., 2018a. A protocol for transcranial photobiomodulation therapy in mice. *J. Vis. Exp.* 2018. <https://doi.org/10.3791/59076>
- Salehpour, F., Farajdokht, F., Cassano, P., Sadigh-Eteghad, S., Erfani, M., Hamblin, M.R., Salimi, M.M., Karimi, P., Rasta, S.H., Mahmoudi, J., 2019. Near-infrared photobiomodulation combined with coenzyme Q10 for depression in a mouse model of restraint stress: reduction in oxidative stress, neuroinflammation, and apoptosis. *Brain Res. Bull.* 144, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.10.010>
- Salehpour, F., Farajdokht, F., Erfani, M., Sadigh-Eteghad, S., Shotorbani, S.S., Hamblin, M.R., Karimi, P., Rasta, S.H., Mahmoudi, J., 2018b. Transcranial near-infrared photobiomodulation attenuates memory impairment and hippocampal oxidative stress in sleep-deprived mice. *Brain Res.* 1682, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.12.040>
- Salehpour, F., Mahmoudi, J., Kamari, F., Sadigh-Eteghad, S., Rasta, S.H., Hamblin, M.R., 2018c. Brain Photobiomodulation Therapy: a Narrative Review. *Mol. Neurobiol.* 55, 6601–6636. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0852-4>
- Salehpour, F., Rasta, S.H., 2017. The potential of transcranial photobiomodulation therapy for treatment of major depressive disorder. *Rev. Neurosci.* 28, 441–453. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2016-0087>
- Salehpour, F., Rasta, S.H., Mohaddes, G., Sadigh-Eteghad, S., Salarirad, S., 2016. Therapeutic effects of 10-Hz Pulsed wave lasers in rat depression model: A comparison between near-infrared and red wavelengths. *Lasers Surg. Med.* 48, 695–705. <https://doi.org/10.1002/lsm.22542>

- Santana-Blank, L., Rodríguez-Santana, E., 2018. Photobiomodulation in Light of Our Biological Clock's Inner Workings. *Photomed. Laser Surg.* <https://doi.org/10.1089/pho.2018.4445>
- Santos, L., Olmo-Aguado, S. del, Valenzuela, P.L., Winge, K., Iglesias-Soler, E., Argüelles-Luis, J., Álvarez-Valle, S., Parcero-Iglesias, G.J., Fernández-Martínez, A., Lucia, A., 2019. Photobiomodulation in Parkinson's disease: A randomized controlled trial. *Brain Stimul.* 12, 810–812. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2019.02.009>
- Schiffer, F., Johnston, A.L., Ravichandran, C., Polcari, A., Teicher, M.H., Webb, R.H., Hamblin, M.R., 2009. Psychological benefits 2 and 4 weeks after a single treatment with near infrared light to the forehead: a pilot study of 10 patients with major depression and anxiety. *Behav. Brain Funct.* 5, 46. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-5-46>
- Sinha, P., John, J.P., Woods, A.J., Bowers, D., 2019. Dose response relationship between Near Infrared (NIR) light stimulation and functional brain activity in healthy older adults. *Brain Stimul.* 12, 547. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2018.12.806>
- Tatmatsu-Rocha, J.C., Roberta Tim, C., Avo, L., Bernardes-filho, R., Brassolatti, P., Wilian, H., Hamblin, M.R., Antonio, N., 2018. Mitochondrial dynamics (fission and fusion) and collagen production in a rat model of diabetic wound healing treated by photobiomodulation: comparison of 904 nm laser and 850 nm light-emitting diode (LED). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 187, 41–47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.07.032>
- Vargas, E., Barrett, D.W., Saucedo, C.L., Huang, L. Da, Abraham, J.A., Tanaka, H., Haley, A.P., Gonzalez-Lima, F., 2017. Beneficial neurocognitive effects of transcranial laser in older adults. *Lasers Med. Sci.* 32, 1153–1162. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2221-y>
- Wang, X., Dmochowski, J., Husain, M., Gonzalez-Lima, F., Liu, H., 2017. Proceedings #18. Transcranial Infrared Brain Stimulation Modulates EEG Alpha Power. *Brain Stimul.* 10, e67–e69. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2017.04.111>

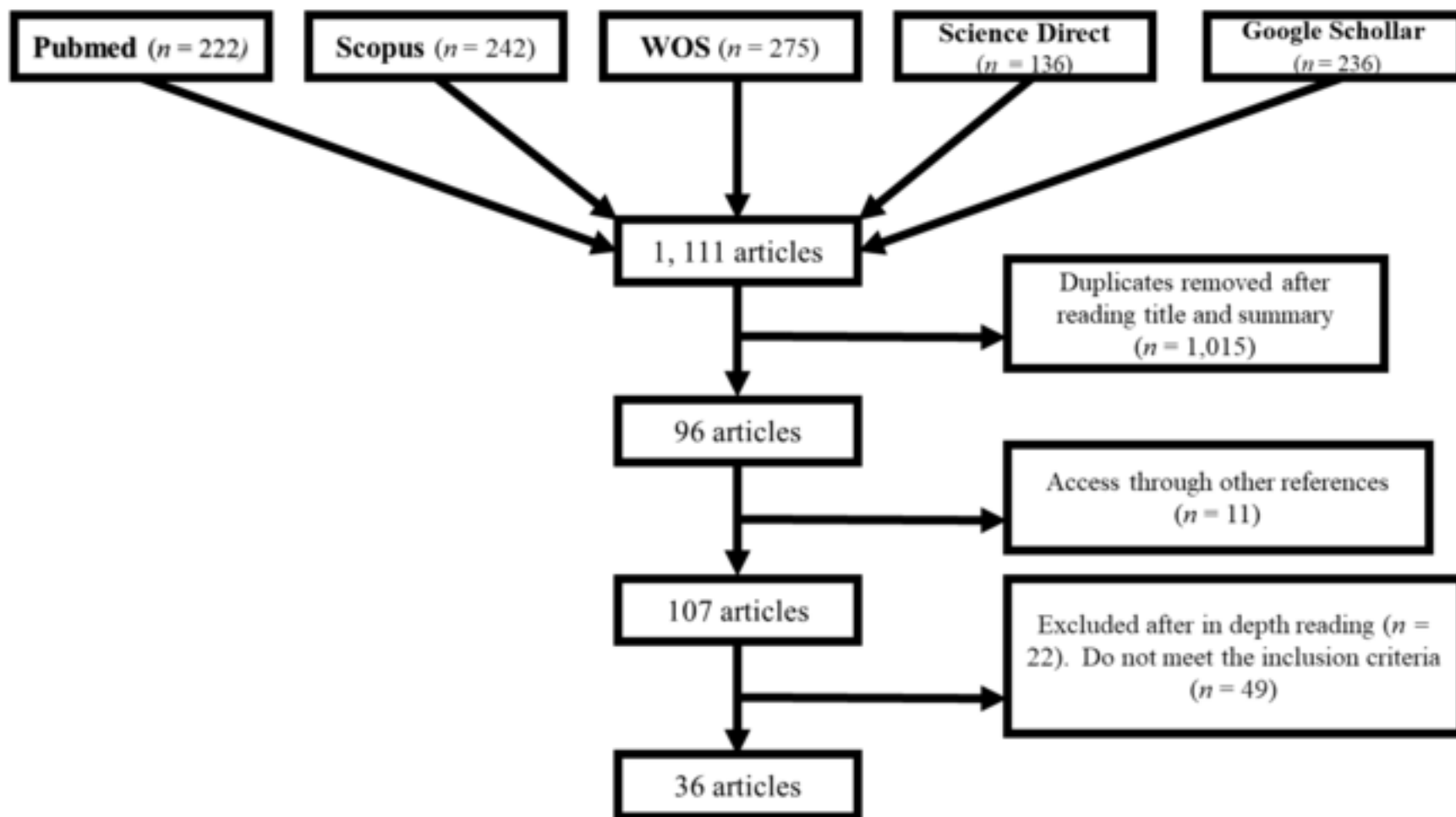
- World Health Organization (WHO), 2017. Depression and Other Common Mental Disorders-Global Health Estimates, Obstetrics and gynecology.
- Wu, X., Alberico, S.L., Moges, H., De Taboada, L., Tedford, C.E., Anders, J.J., 2012. Pulsed light irradiation improves behavioral outcome in a rat model of chronic mild stress. *Lasers Surg. Med.* 44, 227–232. <https://doi.org/10.1002/lsm.22004>
- Xu, Z., Guo, X., Yang, Y., Tucker, D., Lu, Y., Xin, N., Zhang, G., Yang, L., Li, J., Du, X., Zhang, Q., Xu, X., 2017. Low-Level Laser Irradiation Improves Depression-Like Behaviors in Mice. *Mol. Neurobiol.* 54, 4551–4559. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9983-2>
- Xuan, W., Huang, L., Hamblin, M.R., 2016. Repeated transcranial low-level laser therapy for traumatic brain injury in mice: biphasic dose response and long-term treatment outcome. *J. Biophotonics* 9, 1263–1272. <https://doi.org/10.1002/jbio.201500336>
- Yang, Y., Zong, Y., Sun, Q., Jia, Y., Zhao, R., 2017. White light emitting diode suppresses proliferation and induces apoptosis in hippocampal neuron cells through mitochondrial cytochrome c oxidase-mediated IGF-1 and TNF- α pathways. *Free Radic. Biol. Med.* 113, 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.382>
- Zaizar, E.D., Gonzalez-Lima, F., Telch, M.J., 2018. Singular and combined effects of transcranial infrared laser stimulation and exposure therapy: A randomized clinical trial. *Contemp. Clin. Trials* 72, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2018.07.012>
- Zomorodi, R., Loheswaran, G., Pushparaj, A., Lim, L., 2019. Pulsed Near Infrared Transcranial and Intranasal Photobiomodulation Significantly Modulates Neural Oscillations: a pilot exploratory study. *Sci. Rep.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42693-x>
- Zúñiga, S.C., Manuel, A., Gil, C., Fernández, E., 2018. Low-level laser in orthodontics. *Rev Cuba. Estomatol* 55 (3), 1–11.

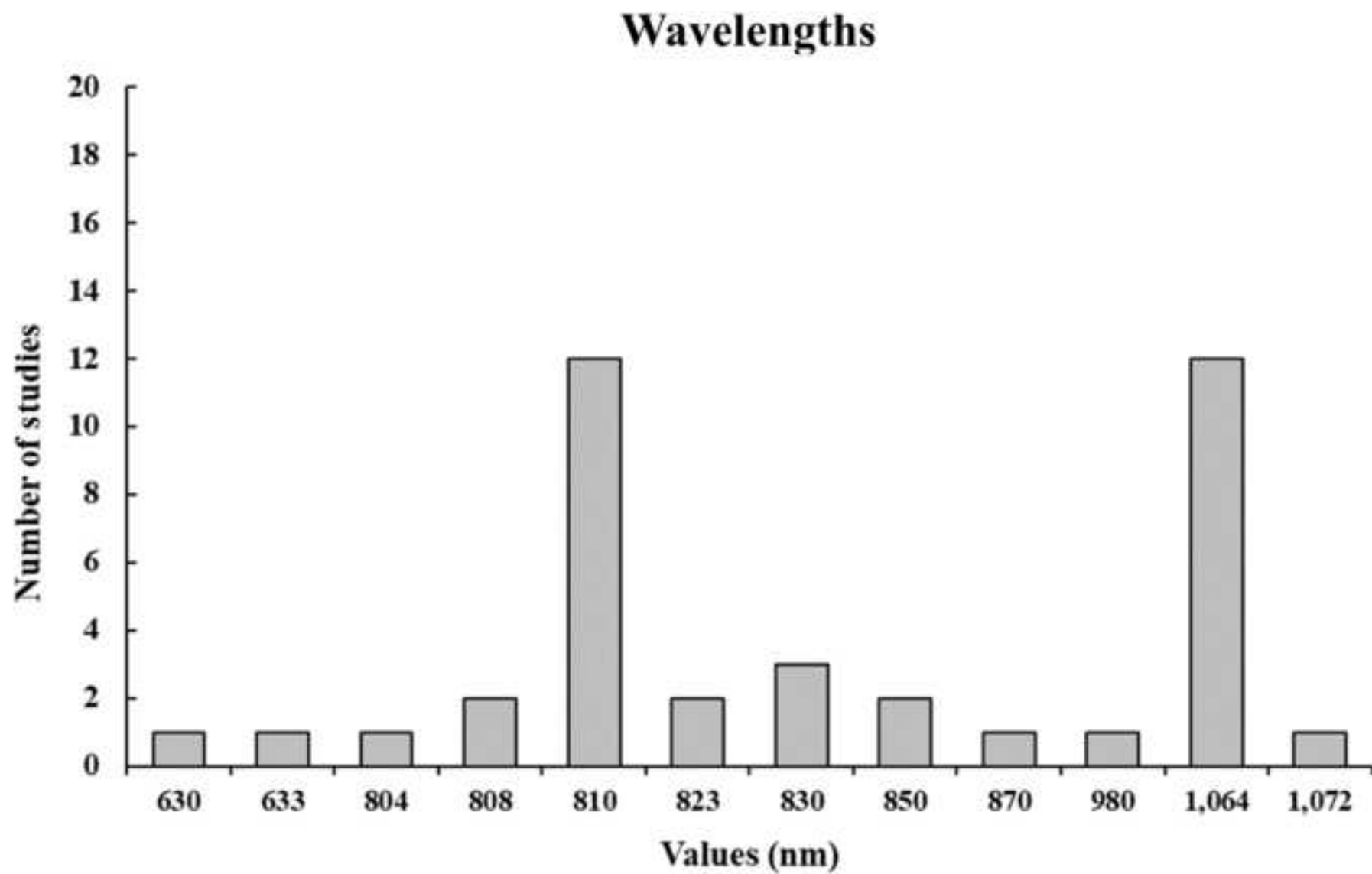
Figure captions

Figure 1. Literature Flow diagram of the selection process in the different phases of the systematic review.

Figure 2. Frequency of use of the different wavelengths (nm) in the selected articles.

Figure 3. Frequency of use of the different power densities (irradiance) (mW / cm^2) in the selected articles.





Irradiance

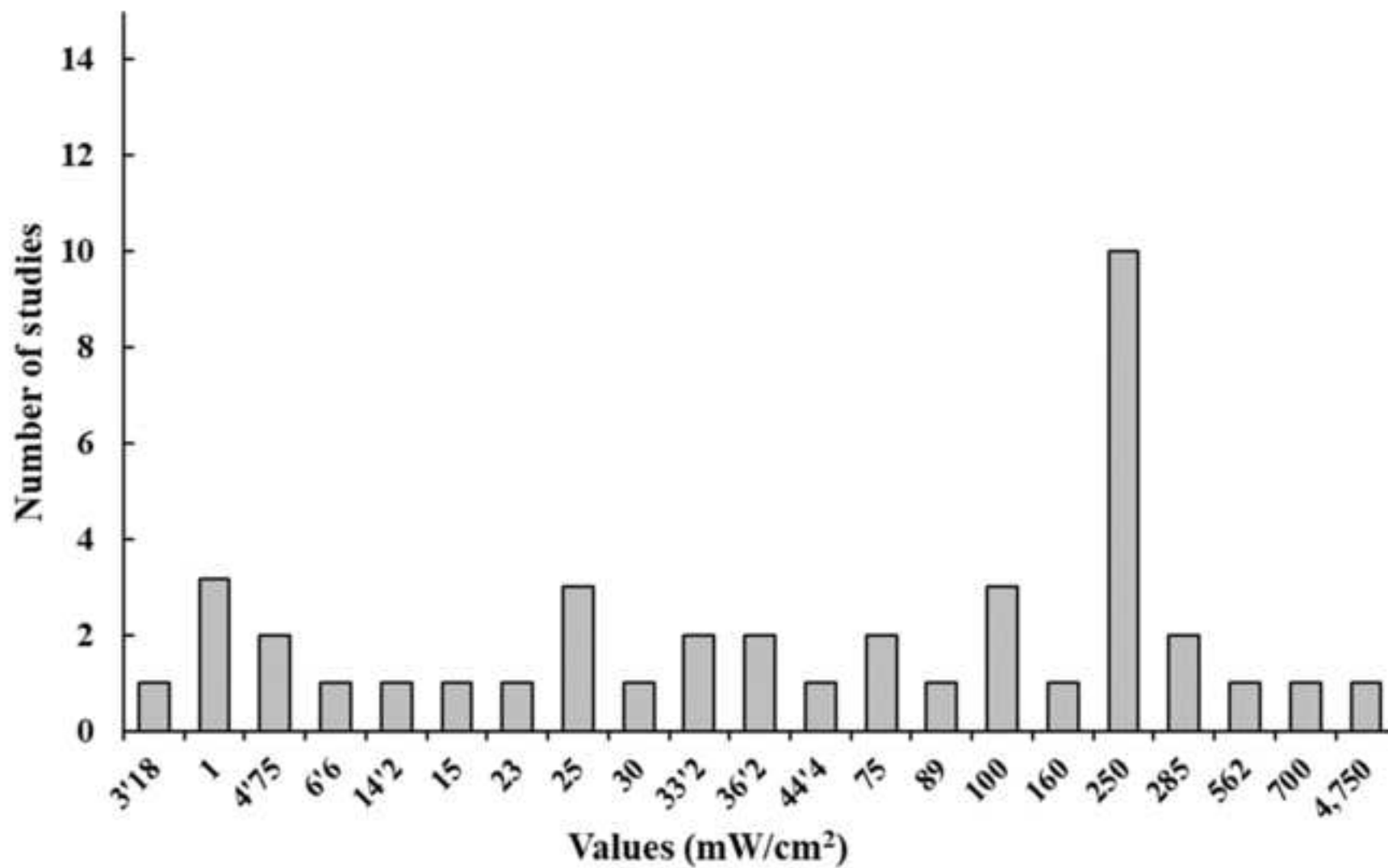


Table 1. Description of the PBMT parameters used in the psychology field and main results of the review.

<i>Source</i>	<i>Population/ Sample</i>	<i>Pathological conditions</i>	<i>Light- emitting device</i>	<i>Wavelength (nm)</i>	<i>Irradiance (mW/cm²)</i>	<i>Fluency (J/cm²)</i>	<i>Wave type</i>	<i>Area</i>	<i>Treatment period</i>	<i>Results</i>
Banqueri et al., (2019)	Animal (n= 41) Males	Early stress	Laser	1,064	-	20	-	Prefrontal	One hour Once/day Five days	Cognitive flexibility and oxidative metabolism level restoration.
Barrett y Gonzalez-Lima, (2013)	Human (n= 40) <i>Control:</i> 10 men 10 women <i>Treatment:</i> 10 men 10 women	Healthy subjects	Laser	1,064	250	60	Continuous	Right prefrontal	Eight minutes	Cognitive and emotional functions enhancement: increase and maintenance of positive affective states and attentional improvement after two weeks.
Blanco et al., (2016)	Human (n=118) 51 men 60 women	Healthy subjects	Laser	1,064	250	60	Continuous	Right DLPFC and VLPFC ¹	Eight minutes	Cognitive enhancement: improvement of prefrontal rule-based learning and lack of effects on information-integration learning.
Blanco et al., (2017)	Human (n=30) 17 men 13 women	Healthy subjects	Laser	1,064	250	60	Continuous	Right DLPFC and VLPFC ¹	Eight minutes	Executive function improvements evaluated by the Wisconsin Test.
Caldiedaro et al., (2018)	Human (n=1) Women	Heart disease Depression	LED	810 830	14'2 33'2	10'65 49'8	10 Hz	Intranasal. Intracranial	50-60 minutes Two/Seven times/week Over nine months	Intranasal application improved only anxiety symptoms, but not depressive symptoms. Intracranial administration improved both types of symptoms.
Cassano et al., (2015)	Human (n=4) Three men One women	Depression	Laser	808	700	84	Continuous	Bilateral prefrontal	Six sessions Four minutes	Reduction in depressive scores and great treatment tolerance.

¹ DLPFC, dorsolateral prefrontal cortex; VLPFC, ventrolateral prefrontal cortex.

									Twice/week Three weeks	
Cassano et al., (2018)	Human (<i>n</i> =21)	Depression	LED	823	36'2	65'2	Continuous	Bilateral DLPFC ²	16 sessions 20-30 minutes Twice/week Eight weeks	Medium antidepressant effect and great treatment tolerance
Cassano et al., (2019)	Human (<i>n</i> = 18) <i>Control</i> : nine subjects <i>Treatment</i> : nine subjects	Depression	LED	823	36'2	65'2	Continuous	Bilateral DLPFC ²	16 sessions 20-30 minutes Twice/week Eight weeks	Absence of significant differences between groups in weight and systolic blood pressure and a slight increase in diastolic blood pressure in the treated group. Greater number of side effects in the treated group.
Chan et al., (2019)	Human (<i>n</i> =30) <i>Control</i> : 15 subjects <i>Treatment</i> : 15 subjects	Elderly healthy subjects	LED	633 870	44'4	20	Continuous	Bilateral prefrontal. Posterior medial parietal	One session Seven and a half minutes	Improvements in selection actions, inhibition ability, and cognitive flexibility.
Chao, (2019)	Human (<i>n</i> =2)	Gulf War Syndrome	LED Vielight	810	100, 75 y 25	-	10 Hz	Intranasal. Intracranial	20 minutes 12 weeks	Decrease in Gulf War Syndrome symptoms: headaches, joint pain, gastrointestinal problems, etc.
Disner et al., (2016)	Human (<i>n</i> = 51) <i>Control</i> : 15 subjects <i>Treatment</i> : 36 subjects	Depression	Laser ABM	1,064	250	60	-	Right or left medial and lateral prefrontal	Eight minutes	Improvements in attention and learning, and greater efficacy if the light emission was applied in the right prefrontal cortex and before the ABM session.

² DLPFC, dorsolateral prefrontal cortex.

Eshaghi et al., (2019)	Animal (<i>n</i> = 55) <i>Control</i> : 11 subjects <i>Treatment</i> : 44 subjects.	Depression Anxiety	Laser	810	4*75	4, 8, and 16	10 Hz	Midline dorsal surface	Nine sessions Three times/week Three weeks	Reductions in anxiety, depression, cortisol, and nitric oxide levels in prefrontal cortex and hippocampus, and increase in serotonin. The 8 J/cm ² fluency had the maximum behavioural and molecular effect.
Gonzalez-Lima, (2017)	Human (<i>n</i> =328)	Healthy subjects	Laser	1,064	250	60	-	Bilateral prefrontal	-	Improvement in CCO ³ activity and cerebral oxygenation in prefrontal cortex. Cognitive and emotional benefits after right prefrontal application in healthy and depressed subjects.
Gonzalez-Lima et al., (2019)	Human (<i>n</i> =154)	Healthy subjects	Laser	1,064	250	60	Continuous	Right prefrontal	-	Significant enhancement of cognitive performance in young adults and slight improvement in adults.
Heinrich et al., (2019)	Human	Healthy subjects	LED	810	100	-	40 Hz	Intranasal. Medial prefrontal and parietal	20 minutes	Lack of differences between treated and control groups.
Henderson et al., (2017)	Human (<i>n</i> =39)	Depression	Laser	810 980	-	55 81	-	Bilateral prefrontal and temporal	30 minutes Eight weeks	Depression scores decrease and remission of suicidal ideation.

³ CCO, cytochrome c oxidase.

Holmes et al., (2019)	Human (<i>n</i> = 34) <i>Control:</i> Seven men Nine women <i>Treatment:</i> Nine men Nine women	Healthy subjects	Laser	1,064	250	120	-	Right prefrontal	One session Eight minutes	Cognitive performance enhancement on attentional and working memory tasks and brain oxygenation changes in prefrontal cortex.
Hwang et al., (2016)	Human (<i>n</i> =60)	Healthy subjects	Laser Aerobic exercise	1,064	250	60	Continuous	Right prefrontal	Eight minutes	Improvements in attention, working memory, and executive tasks after both PBMT and aerobic exercise.
Jahan et al., (2019)	Human (<i>n</i> =30) 15 men 15 women	Healthy subjects	LED	850	285	60	-	Right prefrontal	150 seconds	Attentional performance improvement and electric brain activity modification.
Maiello et al., (2019)	Human (<i>n</i> = 15)	Anxiety	LED	830	30	36	Continuous	Prefrontal	20 minutes Once/day Eight weeks Autoadministration	Anxiety reduction and sleep improvement in the absence of significant adverse effects.
Mannu et al., (2019)	Human (<i>n</i> = 4) Two men Two women	Bipolar disorder	LED	830	33'2	40	Continuous	Bilateral dorsal prefrontal	20 minutes Twice/week Four weeks	Anhedonia reductions, libido increase, and improvements in sleep, anxiety, impulsivity, and irritability. Lithium levels increase.
Meynaghizadeh-Zargar et al., (2019)	Animal (<i>n</i> =60) Males	Mild chronic stress	Laser	810	4750	8	10 Hz	-	Three times/week Four weeks	Restoration of cognitive and molecular damages after the use of PBMT, methylene blue, and the combination of both treatments.
Michalikova et al., (2007)	Animal (<i>n</i> =30) Females	Healthy subjects	Laser	1,072	-	-	Continuous	Full body	Six minutes 10 dias	Lack of significant effects on exploratory activity and anxiety responses. Significant effects on working memory.

Moghadam et al., (2017)	Human (<i>n</i> = 34) <i>Control:</i> 17subjects <i>Treatment:</i> 17subjects	Healthy subjects	LED	850	285	60	Continuous	Right frontal	150 seconds	Attention improvement.
Mohammed, (2016)	Animal (<i>n</i> = 48) <i>Control:</i> 24 subjects <i>Treatment:</i> 24 subjects	Depression	Laser	804	3'18	4'8; 12; 24	Continuous	Bilateral from the interaural line to the eyes	Six minutes One week	Lowest dose increases animal activity and improves depressive symptoms. Higher dose causes greater immobility.
Salehpour et al., (2016)	Animal (<i>n</i> = 50) Males	Depression	Laser	630 810	89 562	1'18 14'4	10 Hz	Midline of the dorsal surface in prefrontal	12 sessions Four times/week Three weeks	Immobility and anxious behaviour reductions. Decrease in cortisol levels and normalization of glucose levels. 810 nm laser more effective.
Salehpour et al., (2018a)	Animal (<i>n</i> = 40) Males	Healthy subjects Sleep deprivation	Laser	810	4'75	8	10 Hz	Midline of the dorsal surface between the eyes and ears	Three sessions Five seconds Once/day Three days	Prevention of cognitive damage induced after sleep deprivation. Improvement in antioxidant state and increase in hippocampal mitochondrial activity, reducing its oxidative damage.
Salehpour et al., (2019)	Animal (<i>n</i> =27) Males	Depression	Laser Q ₁₀	810	6'66	33'3	10 Hz	Midline of the dorsal surface between the eyes and ears	Five seconds Once/day Five days	Depressive behaviour improvement after PBMT, Q ₁₀ , and combination. Both treatments and the combination showed lipid peroxidation reduction and an improvement in antioxidant capacity in prefrontal cortex and hippocampus. In both areas, Neuroinflammatory activity, cortisol, corticosterone, TNF and IL levels, and apoptotic biomarkers were reduced.

Schiffer et al., (2009)	Human (<i>n</i> =10) Five men Five women	Depression	LED	810	250	60	Continuous	Bilateral dorsal prefrontal	Eight minutes	Reduction in depressive and anxious scores in more than 50% of patients and brain flow increase in both hemispheres.
Sinha et al., (2019)	Human (<i>n</i> = 23) 12 men 11 women	Elderly healthy subjects	LED	-	-	Intracranial 52 and 26 Intranasal 44 and 22	-	Intranasal. Intracranial	30 minutes Once/day Six months	Functional connectivity increase in the posterior cingulate cortex using the lowest dose.
Vargas et al., (2017)	Human (<i>n</i> =12) Five men Seven women	Elderly subjects with risk of cognitive impairment	Laser	1,064	250	60	-	Right prefrontal	Eight minutes Once/week Five weeks	Improvement in cognitive measures, and alpha, beta, and gamma frequency increases in resting-state in prefrontal cortex.
Wang et al., (2017)	Human (<i>n</i> =20)	Healthy subjects	Laser	1,064	160	9*7	-	Right prefrontal	11 minutes	Changes in alpha frequency in the ipsilateral fronto-parieto-occipital network and in the contralateral parieto-occipital network.
Wu et al., (2012)	Animal (<i>n</i> =32) Males <i>Control</i> : 8 subjects <i>Treatment</i> : 24 subjects	Mild chronic stress	Laser	810	15	120	100 Hz	Midline of the dorsal surface between the eyes and ears	Nine sessions Two minutes Three times/week Three weeks	Immobility reduction and maintenance of body-weight.
Xu et al., (2016)	Animal Males	Depression	Laser	808	23	-	Continuous	Medial surface	30 minutes 28 days	Depressive behaviour improvement, reducing immobility. ATP biosynthesis gain and increase in level of expression and activity of complex IV of the mitochondria in the prefrontal area.

Zaizar et al., (2018)	Human (<i>n</i> =120)	Phobia extinction	Laser	1,064	25	120	Continuous	Bilateral ventromedial prefrontal	Eight minutes	Fear reduction.
Zomorodi et al., (2019)	Human (<i>n</i> =20) Nine men 11 women	Healthy subjects	LED Vielight	810	75, 25, and 100	240	40 Hz	Intranasal DMN ⁴	20 minutes Once/week Two weeks	Alpha, beta, and gamma frequency increments, and reductions in delta and theta frequencies.

⁴ DMN, Default Mode Network.

4.2 *Publicación 2*

Título: No Effects of Photobiomodulation on Prefrontal Cortex and Hippocampal Cytochrome C Oxidase Activity and Expression of c-Fos Protein of Young Male and Female Rats.

Autores: Alba Gutiérrez-Menéndez, Juan A. Martínez, Marta Méndez López y Jorge L. Arias.

Revista: Frontiers in Neuroscience.

Campo de la revista: Neurociencias.

Factor de impacto: 4,677.



No Effects of Photobiomodulation on Prefrontal Cortex and Hippocampal Cytochrome C Oxidase Activity and Expression of c-Fos Protein of Young Male and Female Rats

Alba Gutiérrez-Menéndez^{1,2,3*}, Juan A. Martínez^{2,3,4}, Marta Méndez^{1,2,3} and Jorge L. Arias^{1,2,3}

¹ Laboratory of Neuroscience, Department of Psychology, University of Oviedo, Oviedo, Spain, ² Instituto de Neurociencias del Principado de Asturias (INEUROPA), Oviedo, Spain, ³ Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Spain, ⁴ Electronic Technology Area, University of Oviedo, Gijón, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Gregory Wohl Kirschen,
Johns Hopkins Medicine,
United States

Reviewed by:

Farzad Salehpour,
University of Texas at Austin,
United States
Adrian Rodriguez-Contreras,
City College of New York (CUNY),
United States

*Correspondence:

Alba Gutiérrez-Menéndez
gutierrezalba@uniovi.es

Specialty section:

This article was submitted to
Neurodevelopment,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 15 March 2022

Accepted: 15 April 2022

Published: xx xx 2022

Citation:

Gutiérrez-Menéndez A,
Martínez JA, Méndez M and Arias JL
(2022) No Effects
of Photobiomodulation on Prefrontal
Cortex and Hippocampal Cytochrome
C Oxidase Activity and Expression
of c-Fos Protein of Young Male
and Female Rats.
Front. Neurosci. 16:897225.
doi: 10.3389/fnins.2022.897225

The role of light in our biological processes and systems is extensively known. In addition, the use of light devices has been introduced in the field of healthcare as an opportunity to administer power light at specific wavelengths to improve our body functions and counteract light deficiency. One of these techniques is photobiomodulation (PBM), which uses red to infrared light in a non-invasive way to stimulate, heal, regenerate, and protect tissue. The main proposed mechanism of action is the stimulation of the cytochrome c oxidase (CCO), the terminal enzyme in the mitochondrial electron transport chain. PBM has achieved positive effects on brain activity and behavioral function of several adult animal models of health and disease, the potential use of this technique in developing stages is not surprising. This research aims to examine the effects of PBM on the prefrontal cortex and hippocampus of 23 day-old healthy male ($n = 31$) and female ($n = 30$) Wistar rats. Three groups of each sex were used: a PBM group which received 5 days of PBM, a device group submitted to the same conditions but without light radiation, and a control basal group. CCO histochemistry and c-Fos immunostaining were used to analyze brain metabolic activity and immediate early genes activation, respectively. Results displayed no metabolic differences between the three groups in both sexes. The same results were found in the analysis of c-Fos positive cells, reporting no differences between groups. This research, in contrast to the PBM consequences reported in healthy adult subjects, showed a lack of PBM effects in the brain markers we examined in young healthy rat brains. At this stage, brain function, specifically brain mitochondrial function, is not disturbed so it could be that the action of PBM in the mitochondria may not be detectable using the analysis of CCO activity and c-Fos protein expression. Further studies are needed to examine in depth the effects of PBM in brain development, cognitive functions and postnatal disorders, along with the exploration of the optimal light parameters.

Keywords: photobiomodulation, development, brain stimulation, nervous system, low-level light therapy

INTRODUCTION

The role of light in our biological processes and systems is extensively known. It is a potent regulator of body functions that can activate other complex biological pathways. Light controls our sleep-wake cycles, our circadian rhythms, impacts our mental health, and provides us with essential vitamins (Dompe et al., 2020; Bertani et al., 2021). In this regard, the use of light devices has been introduced in the field of healthcare as an opportunity to administer power light at specific wavelengths to improve our body functions and counteract light deficiency (Dompe et al., 2020). One of these techniques is photobiomodulation (PBM) which uses red to infrared light, wavelengths between 600 and 1,100 nm, to stimulate, heal, regenerate, and protect tissue (Hamblin, 2016; Mitrofanis and Jeffery, 2018). PBM is a non-invasive, inexpensive and safe technique (Gutiérrez-Menéndez et al., 2020).

At present, PBM therapy is widely used in several clinical conditions: diabetes, ulcers, blood disorders, coronary artery diseases, and musculoskeletal complications, among others, and presents well supported neurobiological effects, such as the improvement of wound healing, the regeneration of damaged tissues, and the reduction of pain and inflammation (Salehpour et al., 2019a; dos Santos Cardoso et al., 2021b). However, this therapy is not only used in peripheral tissues, it can also be applied to the nervous system. In this regard, the first evidence of PBM's beneficial effects on the brain was after its application for ischemic stroke in different animal models (Hamblin, 2019). After that, numerous studies have documented a large number of positive brain effects resulting from this therapy, suggesting PBM as a new modality for neural activity stimulation to improve brain functions (Salehpour et al., 2018; Arias et al., 2019). The most supported outcomes of the use of PBM on the brain are the increase of intracellular ATP production, along with the improvement of metabolic function; changes in cerebral oxygenation and blood flow; anti-inflammatory effects; upregulation of anti-apoptotic proteins, increment of antioxidants and less excitotoxicity, the stimulation of neurons and glial cell neurogenesis, synaptogenesis, migration, and the secretion of brain neurotrophins (Hamblin, 2016, 2019; Dompe et al., 2020; Gutiérrez-Menéndez et al., 2020; dos Santos Cardoso et al., 2021a). The main proposed mechanism of action to achieve such changes is the stimulation of the cytochrome c oxidase (CCO), the terminal enzyme in the mitochondrial electron transport chain (Salehpour et al., 2019b; Dompe et al., 2020; Gutiérrez-Menéndez et al., 2021). However, PBM effects without adverse outcomes can only be reached with optimum parameters (wavelength, energy density, irradiance, area, mode of administration, etc.) and that is the current issue: the lack of consensus on which parameters are appropriate for each situation (Salehpour et al., 2018; Gutiérrez-Menéndez et al., 2020). Most of the studies support that the use of wavelengths between 810 nm and 1,064 nm in adult human and animal models of health and disease, are versatile and adequate to achieve several effects on brain activity and behavioral function (Gutiérrez-Menéndez et al., 2020).

The postnatal period is a critical phase for the development of the mammal brain. During this period, the dynamic gene expression and the methylation changes generate several effects on neurogenesis, synaptogenesis and neural circuit formation (Simmons et al., 2013). Studies using rat models have shown that the first three postnatal weeks are essential for the development of the neural system, with radical changes happening in terms of synaptic connectivity, neuroendocrine response and global neural gene expression (Simmons et al., 2013). Moreover, the cell energy metabolism is maturing and adult mitochondria characteristics are reached around postnatal day (PND) 30 (Kalous et al., 2001). Changes in BDNF mRNA and protein levels are also reported during this period, the profile of changes shows an increase in brain structures in the postnatal period and a decrease in the aging phase (Karege et al., 2002). All these processes allow immature brains which are particularly vulnerable to different insults (toxic, traumatic, vascular, etc.) to adapt (Calabrese et al., 2013).

Taking into account the high plasticity and the responsiveness of the postnatal brain, the use of PBM could be an effective technique for the modulation of the developing nervous system and could even be considered a potential treatment for several developmental disorders. Therefore, this study aims to analyze the effects of PBM on the young prefrontal cortex (PFC) and hippocampus of healthy male and female Wistar rats. Three groups between PND23 and PND29 of each sex were used: a PBM group that received 5 days of PBM, a device group that was submitted to the same conditions as the experimental group but without light radiation, and a control basal group. After PBM administration, we analyzed the three groups and compared each sex according to brain metabolic activity and the activation of immediate early genes through a CCO histochemistry and c-Fos immunostaining, respectively.

MATERIALS AND METHODS

Animals

A total of 61 Wistar rats, 31 males and 30 females aged between 23 and 29 days old from the Oviedo University vivarium were used in this research. Animals were sorted by sex in transparent polycarbonate cages located in a room at a constant temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), 65–70% of relative humidity and an artificial light-dark cycle of 12 h (8:00–20:00/20:00–8:00). They had *ad libitum* access to food and tap water.

Animals were randomly separated by sex into three different groups: male (PBM; $n = 10$) and female (PBM; $n = 10$) PBM groups that received the radiation; male (PBMD; $n = 10$) and female (PBMD; $n = 10$) device PBM groups which were submitted to the same conditions as the PBM group but with the light switched off and finally, male (C; $n = 11$) and female (C; $n = 10$) control groups that were kept in their cages.

The animal manipulation and all the procedures carried out in this study were according to the European Communities Committee 2010/63/EU and Royal decree N° 53/2013 of the Ministry of the Presidency related to the protection of animals used for experimentation and other scientific purposes.

229 The study was approved by the Ethics Committee of the
230 Principality of Asturias.

231 Photobiomodulation Therapy

232 The following procedure was carried out with both sexes for 7
233 days. The first 2 days, coinciding with PND22 and PND23, were
234 devoted to getting the animal habituated to the researcher and
235 the procedure. At PND22, animals were handled for 5 min and
236 the first third of their head, just between the eyes, was shaved to
237 maximize light penetration across prefrontal areas. The next day
238 (PND23), animals were immobilized by the researcher one by one
239 on a soft surface and the PBM device was placed on the shaved
240 region for 10 min in OFF mode. This process was done 3 times
241 until each animal had undergone 30 min. During the following
242 5 days (PND24-PND28), the same immobilized procedure was
243 carried out, but the light device was in ON mode. DPBM and
244 PBM groups were submitted to the same procedures, but the
245 PBM device was kept OFF during all the studies in the DPBM
246 group. A laser with a continuous wave at 810 nm wavelength
247 was used for irradiation in PBM groups. The device was operated
248 at an output power of 40 mW and irradiance of 65.6 W/m²,
249 with a beam size of 0.0495 cm². PBM groups received 15 cycles
250 of PBM (40 s ON and 10 s OFF) reaching a total irradiation
251 time of 12.5 min and an average fluence of 19.39 J/cm² per
252 day. Approximately 0.8% of the applied power reaches the brain
253 tissue. This value was previously determined in rat skulls using
254 a PM 160 optical power meter (ThorLabs, United States). Skull
255 was placed on a bench designed for this purpose wherein at the
256 top was the radiation laser and at the bottom, below the skull, the
257 optical power meter.

259 Tissue Processing

260 The day after finishing the light procedure, on PND29, animals
261 were euthanized and brains were removed, frozen rapidly using
262 *N*-methyl butane (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), and stored
263 at -40°C. Coronal brain sections (30 μm) were cut at -20°C
264 in a cryostat (Microm HM 505-E, Germany). Two series were
265 obtained from each brain, one was mounted on non-gelatinized
266 slides to conduct the CCO histochemistry and the other one on
267 gelatinized slides to carry out the *c*-Fos immunostaining.

270 Cytochrome c Oxidase Histochemistry

271 The procedure carried out for the tissue treatment was previously
272 described by Zorzo et al. (2019). To quantify enzymatic activity
273 and to control staining variability across the baths, sets of tissue
274 homogenate standards from Wistar rat brains in PND29 were cut
275 at different thicknesses (10, 30, 50, and 70 μm) and included with
276 each bath of slides. Sections were fixed for 5 min using 0.1 M
277 phosphate buffer (pH 7.6) with 10% (w/v) sucrose and 25% (v/v)
278 glutaraldehyde. Then, three baths of 0.1 M phosphate buffer with
279 10% (w/v) sucrose were carried out for 5 min each, and one bath
280 of 0.05 M Tris buffer, pH 7.6 for 8 min [0,275 mg/l cobalt chloride
281 (Aldrich, Germany), 10% (w/v) sucrose (Sigma, Germany), 6 g/l
282 Trizbase (Sigma, United States), and 0.5 (v/v) dimethyl-
283 sulfoxide (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain)]. After that, sections
284 and standards were maintained in a 0.1 M phosphate buffer,
285 pH 7.6, for 5 min and incubated in a solution of 0.0075% (w/v)

286 cytochrome *c* (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain); 0.002% (w/v)
287 catalase (Sigma, Spain); 5% (w/v) sucrose (Sigma, Germany);
288 0.25% (v/v) dimethyl-sulfoxide (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain);
289 and 0.05% (w/v) diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-
290 Aldrich, Madrid, Spain) in 800 ml of 0.1 M phosphate buffer at
291 37°C for 1 h. Next, the reaction was stopped by fixing the tissue
292 in a buffered 4% (v/v) formalin with a 0.1 M phosphate buffer,
293 pH 7.6, 10% (w/v) sucrose, and 37% (v/v) formalin for 30 min at
294 room temperature. Finally, the slides were dehydrated through a
295 series of graded alcohols, cleared with xylene (Avanter, Poland),
296 and cover slipped with Entellan (Merck, Germany).

298 *c*-Fos Immunohistochemistry

299 Sections were fixed in a 0.1 M 4% (w/v) paraformaldehyde buffer
300 (pH 7.4) for 30 min, in continuous agitation, and rinsed in two
301 baths of 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4). After
302 that, they were incubated for 30 min with 3% (v/v) hydrogen
303 peroxidase (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) in PBS (0.01 M, pH
304 7.4) to remove endogenous peroxidase activity, and washed twice
305 in PBS (0.01 M, pH 7.4) for 10 min. Sections were maintained in a
306 solution of 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich, United States)
307 in PBS (0.01 M, pH 7.4) for 10 min and, subsequently, washed
308 in PBS (0.01 M, pH 7.4). After blocking with a phosphate buffer
309 (0.01 M, pH 7.4) solution containing 3% (v/v) bovine serum
310 albumin (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) for 30 min, sections
311 were incubated with a rabbit polyclonal anti-*c*-Fos antibody
312 solution (1:7,500) (Merck, Spain) diluted in a solution of PBS
313 (0.01 M, pH 7.4), bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Madrid,
314 Spain), and Triton X-100 (Sigma-Aldrich, United States) for 24 h
315 at 4°C in a humid chamber. Next, slides were washed in two
316 baths of PBS (0.01 M, pH 7.4) for 10 min each, and incubated
317 in a goat anti-rabbit biotinylated IgG secondary antibody (Pierce,
318 United States; diluted 1:480 in incubating solution) for 1 h
319 at room temperature in a humid chamber. After two washes
320 of PBS (0.01 M, pH 7.4) for 10 min each, sections were
321 reacted with avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC
322 Ultrasensitive Elite Kit, Pierce, United States) for 1 h in a humid
323 chamber. They were rinsed with two baths of PBS (0.01 M, pH
324 7.4), and the reaction was visualized by treating the sections
325 for 4 min in a solution of PBS (0.01 M, pH 7.4), 0.05% w/v
326 diaminobenzidine tetra-hydrochloride (Sigma-Aldrich, Madrid,
327 Spain), 33% (v/v) hydrogen peroxidase solution and 0.05%
328 (w/v) ammonium nickel (II) sulfate hexahydrate (Sigma-Aldrich,
329 Madrid, Spain) in total darkness. The reaction was terminated
330 by washing the sections twice in PBS (0.01 M, pH 7.4), and
331 they were dehydrated through a series of graded alcohols, cleared
332 with xylene (Avanter, Poland) and cover slipped with Entellan
333 (Merck, Germany). All the immunohistochemistry procedures
334 included sections that served as controls where the primary
335 antibody was not added.

337 Cytochrome c Oxidase Optical Density 338 Quantification

339 The CCO histochemical intensity was quantified by
340 densitometric analysis, using a computer-assisted image
341 analysis workstation (MCID, Interfocus Imaging Ltd., Linton,
342

England) which consisted of a high precision illuminator, a digital camera, and a computer with the specific image analysis software MDCID Core 7.0. The mean optical density (OD) of each region was measured using three consecutive sections in each subject. In each section, four non-overlapping readings were taken, using a square-shaped dissector adjusted for each region size. A researcher who was blind to the groups registered a total of 12 measurements per region/animal. Then, OD values were converted to CCO activity units, determined by the enzymatic activity of the standards measured spectrophotometrically.

We defined the regions of interest according to the atlas of Paxinos and Watson (2007). The regions and their distances in mm counted from bregma were: +3.24 mm for the cingulate cortex (CG), prelimbic cortex (PL) and infralimbic cortex (IL) and -3.24 mm for the CA1, CA3, and the dentate gyrus (DG) subfields of the dorsal hippocampus.

c-Fos Cells Counting

Quantification was performed by systematically sampling each selected region using counting frames superimposed over the region with a microscope (Leica Microsystems DFC490, Germany) coupled to a computer with the Leica Application Suite X software (Leica Microsystems, Germany) with a total magnification of 192X. The sizes of the counting frames were 250,000 μm^2 for CG, PL and IL and 72,000 μm^2 for CA1, CA3 and DG. The total area sampled by these frames per region in each section was: 500,000 μm^2 for CG, PL and IL; 144,000 μm^2 for CA1 and CA3 and finally, 72,000 μm^2 for DG. c-Fos-positive nuclei were defined based on homogenous gray-black stained elements with a well-defined border. Finally, the mean c-Fos positive nuclei count in two sections was calculated for each subject and region.

The regions of interest and their distances (mm) counted from bregma according to the atlas of Paxinos and Watson (2007) were: +3.24 mm for the cingulate cortex (CG), prelimbic cortex (PL) and infralimbic cortex (IL) and -3.24 mm for the CA1, CA3, and the dentate gyrus (DG) sub-fields of the dorsal hippocampus. In these regions, we quantified the number of c-Fos positive nuclei in two alternate sections 30 μm apart. The slides were coded so that the researcher who performed the entire analysis did not know the treatment of the individual subjects.

Statistical Analysis

The data were analyzed using the Sigma-Stat 12.5 program (Systat, Richmond, United States). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. We used a Shapiro-Wilk test to test the normality assumption ($p > 0.05$). When the data fit a normal distribution, we used parametric tests. Otherwise, we used non-parametric tests. The SigmaPlot 12.5 software program (SPSS Inc. and IBM Company, United States) was also used for the graphic representation of the results. We presented data as mean + SEM.

Cytochrome c Oxidase Results

Statistical groups comparisons (PBM, PBMD and C) of CCO activity in each sex were analyzed using a one-way ANOVA for each region of interest. We carried out a two-way ANOVA [*Sex* \times *Group* (PBM, PBMD and C)] to examine differences

between sexes for each region of interest. *Post hoc* comparisons using the Holm-Sidak method were carried out when significant differences were found.

c-Fos Activity

The results of the c-Fos quantification were expressed as the average of c-Fos positive cells/ μm^2 for the two consecutive sections of each region of interest. We analyzed differences between the three groups (PBM, DPBM and C) in each sex using a one-way ANOVA. Additionally, a two-way ANOVA [*Sex* \times *Group* (PBM, PBMD and C)] was performed to examine c-Fos activity differences between sexes for each region of interest. Holm-Sidak method was used when significant differences were found.

RESULTS

Cytochrome c Oxidase Activity

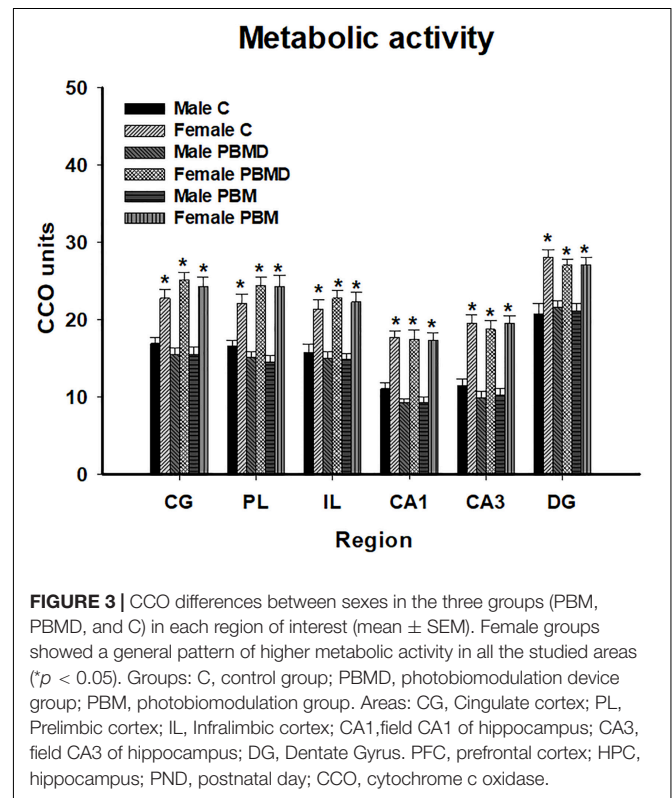
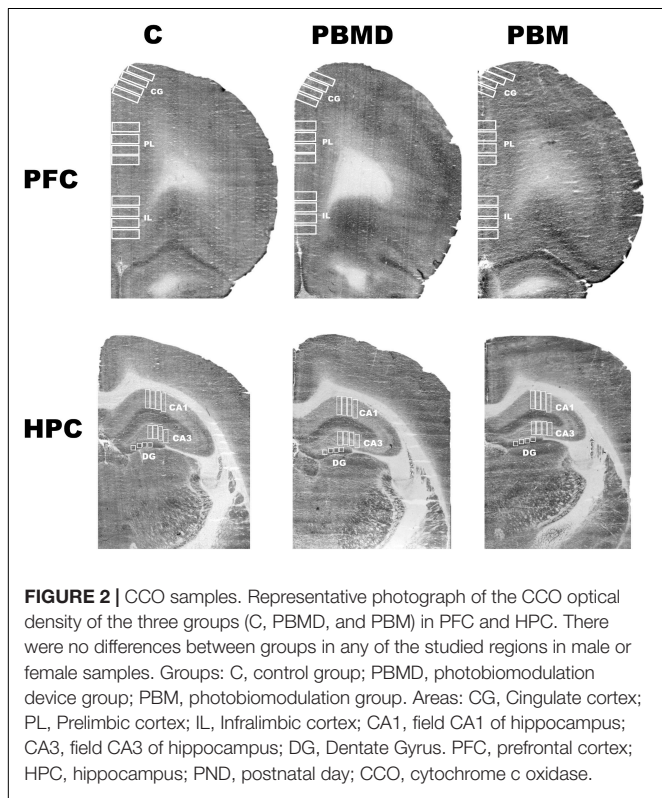
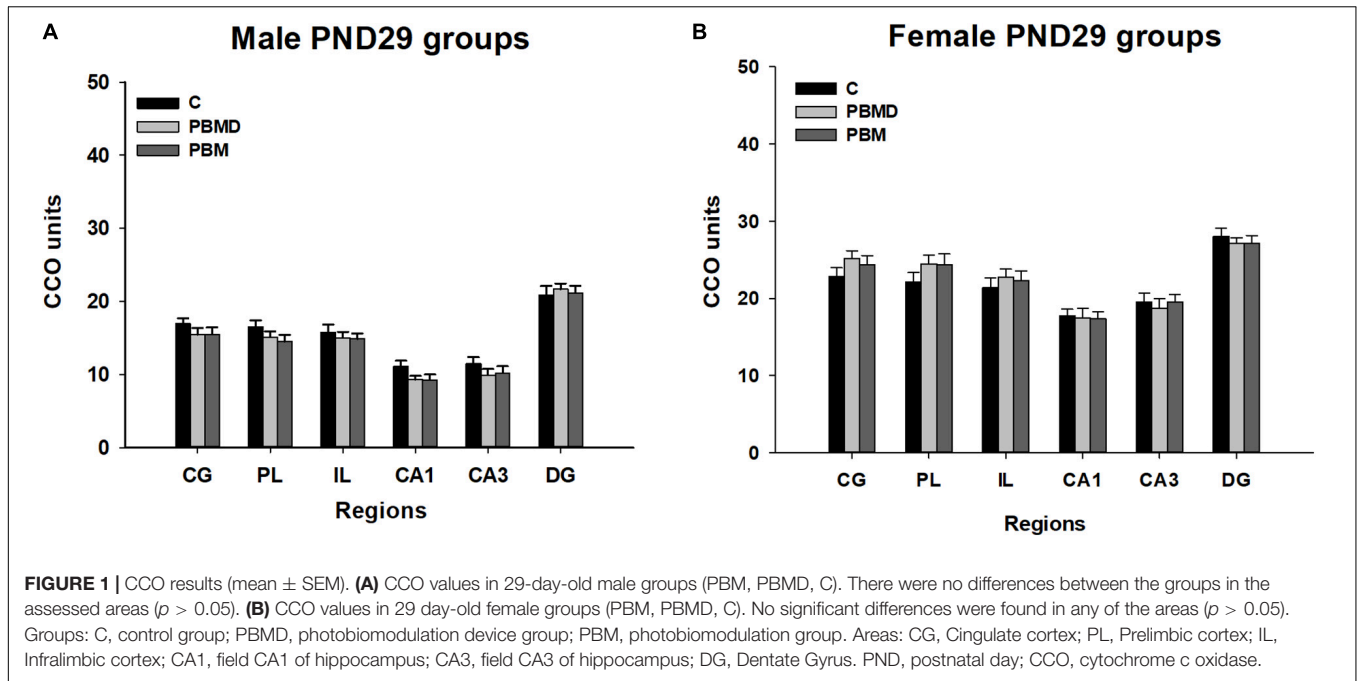
The analysis of the metabolic activity in male and female groups showed the same pattern of CCO activity in both sexes. The three studied groups (PBM, PBMD, and C) did not show CCO differences in any of the regions of interest in the male group [CG: $F_{(2, 27)} = 0.973$, $p = 0.391$; PL: $F_{(2, 28)} = 1.677$, $p = 0.205$; IL: $F_{(2, 28)} = 0.283$, $p = 0.756$; CA1: $F_{(2, 27)} = 2.268$, $p = 0.123$; CA3: $F_{(2, 27)} = 0.901$; $p = 0.418$; DG: $F_{(2, 27)} = 0.162$, $p = 0.851$; **Figure 1A**] or in the female group [CG: $F_{(2, 28)} = 1.112$, $p = 0.343$; PL: $F_{(2, 28)} = 1.196$, $p = 0.317$; IL: $F_{(2, 28)} = 0.366$, $p = 0.697$; CA1: $H_2 = 0.294$, $p = 0.864$; CA3: $F_{(2, 28)} = 0.161$; $p = 0.852$; DG: $F_{(2, 28)} = 0.322$, $p = 0.727$; **Figures 1B, 2**]. Regarding the analysis of the differences in CCO activity between sexes, the two-way ANOVA showed that only the *Sex* factor was significant in all the studied regions [CG: $F_{(1, 55)} = 96.286$, $p < 0.001$; PL: $F_{(1, 56)} = 92.622$, $p < 0.001$; IL: $F_{(1, 56)} = 64.901$, $p < 0.001$; CA1: $F_{(1, 56)} = 123.085$, $p < 0.001$; CA3: $F_{(1, 56)} = 115.807$, $p < 0.001$; DG: $F_{(1, 56)} = 58.533$, $p < 0.001$]. *Post hoc* comparisons showed a general pattern of higher metabolic activity in the female groups in all the studied regions [CG: $t = 9.813$, $p < 0.001$; PL: $t = 9.624$, $p < 0.001$; IL: $t = 8.056$, $p < 0.001$; CA1: $t = 11.094$, $p < 0.001$; CA3: $t = 10.761$, $p < 0.001$; DG: $t = 7.651$, $p < 0.001$; **Figure 3**].

c-Fos Results

The number of c-Fos positive nuclei, as in the CCO analysis, reported no differences between any of the three groups (PBM, PBMD, and C) in the male [CG: $F_{(2, 19)} = 0.869$, $p = 0.425$; PL: $F_{(2, 19)} = 0.451$, $p = 0.644$; IL: $F_{(2, 19)} = 0.304$, $p = 0.741$; CA1: $F_{(2, 27)} = 0.571$, $p = 0.572$; CA3: $F_{(2, 27)} = 0.522$; $p = 0.599$; DG: $F_{(2, 27)} = 1.500$, $p = 0.241$; **Figure 4A**] or female groups [CG: $H_2 = 3.144$, $p = 0.208$; PL: $F_{(2, 26)} = 0.680$, $p = 0.516$; IL: $F_{(2, 26)} = 0.373$, $p = 0.692$; CA1: $F_{(2, 26)} = 0.279$, $p = 0.759$; CA3: $F_{(2, 26)} = 0.363$; $p = 0.699$; DG: $F_{(2, 26)} = 0.069$, $p = 0.933$; **Figure 4B**] in any of the quantified regions (**Figure 5**). Regarding the differences in c-Fos positive nuclei between sexes, results showed that only the *Sex* factor was significant in CG [$F_{(1, 45)} = 7.544$, $p = 0.009$], PL [$F_{(1, 45)} = 6.939$, $p = 0.012$], IL [$F_{(1, 45)} = 9.186$, $p = 0.004$], and CA3 [$F_{(1, 53)} = 13.919$, $p < 0.001$] but not in CA1 [$F_{(1, 53)} = 0.738$, $p = 0.394$] and DG [$F_{(1, 53)} = 2.326$, $p = 0.128$].

457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513

514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570



$p = 0.133$]. *Post hoc* comparisons showed more c-Fos positive nuclei in male groups in CG ($t = 2.747, p = 0.009$), PL ($t = 2.634, p = 0.012$) and IL ($t = 3.031, p = 0.004$) while, in contrast, female groups had greater c-Fos expression in CA3 ($t = 3.731, p < 0.001$) (Figure 6).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first research to examine PBM effects in the postnatal brain of healthy male and female rats. In our study, we applied an 810 nm near-infrared light to the scalp

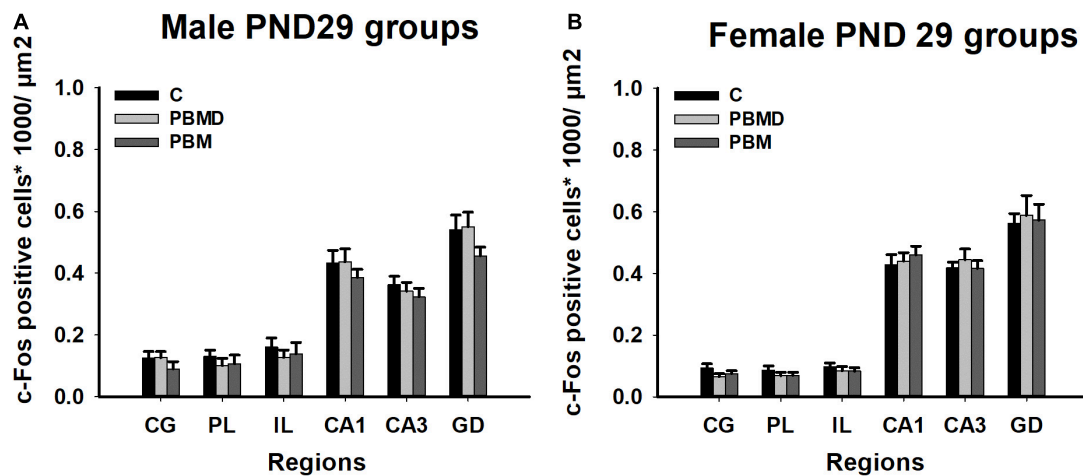


FIGURE 4 | c-Fos-positive cells (positive cells of c-Fos/ μm^2) results in the regions of interest. **(A)** c-Fos results in 29 day-old male groups (C, PBMD, and PBM). No significant differences were found in any of the areas ($p > 0.05$). **(B)** c-Fos results in 29 day-old female groups (C, PBMD, PBM). There were no differences between the groups in the assessed areas ($p > 0.05$). Groups: C, control group; PBMD, photobiomodulation device group; PBM, photobiomodulation group. Areas: CG, Cingulate cortex; PL, Prelimbic cortex; IL, Infralimbic cortex; CA1, field CA1 of hippocampus; CA3, field CA3 of hippocampus; DG, Dentate Gyrus. PND, postnatal day.

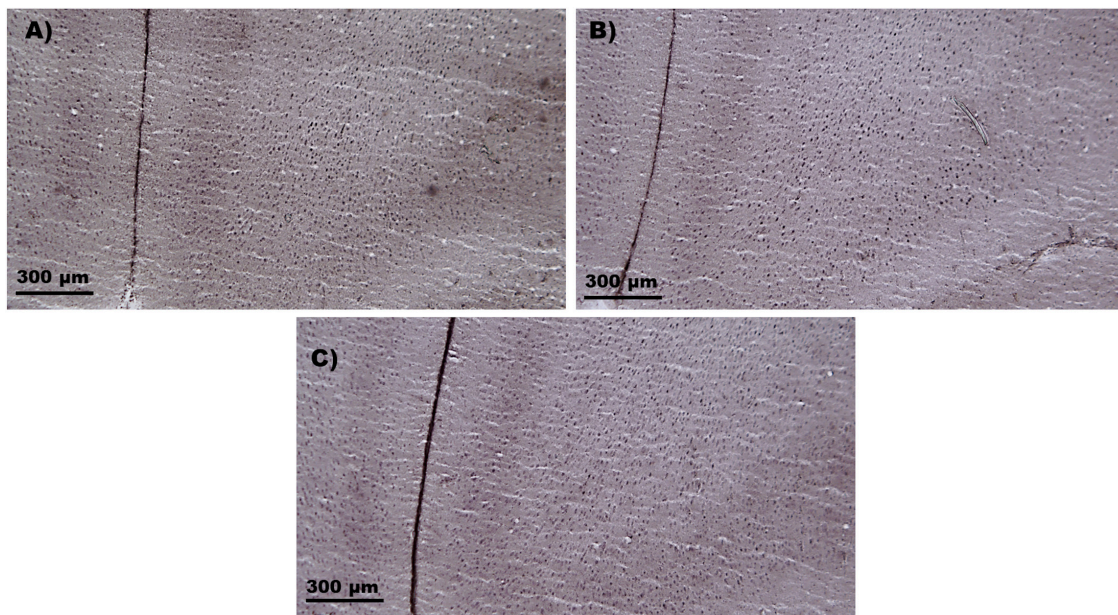
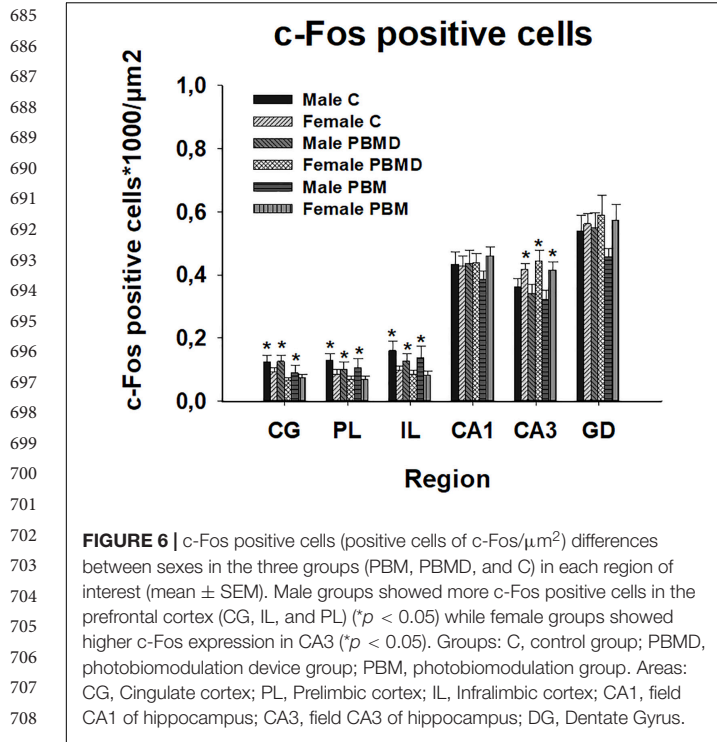


FIGURE 5 | c-Fos samples. Representative microphotograph of the c-Fos immunostaining in the IL cortex. **(A)** c-Fos sample of the control group. **(B)** c-Fos sample of the photobiomodulation device group. **(C)** c-Fos sample of the photobiomodulation group. No differences in c-Fos protein expression were found between the three groups in the male or female groups. IL, Infralimbic cortex.

surface over the prefrontal region of 24 day-old male and female Wistar rats in order to analyze its potential alterations in brain metabolic activity and c-Fos protein expression. Results showed that both brain activity markers were not disturbed after the use of light in any of the sexes.

PBM is a relatively new technique that uses light in the red or red infrared range to heal, restore, stimulate physiological

processes, normalize cellular function, and repair injury or disease damages (de Pauli Paglioni et al., 2019; Ramezani et al., 2021). The most support mechanism of action is the light particles absorption by the CCO enzyme particularly in stressed/damaged cells (Martin et al., 2021). CCO is localized in the electron transport chain of the mitochondrial membrane and it is involved in the production of the main energy molecule, the



adenosine triphosphate (ATP) (Gutiérrez-Menéndez et al., 2020). PBM has been employed since the 1990s for therapeutic purposes such as inflammatory, infectious, traumatic or autoimmune lesions (de Pauli Paglioni et al., 2019). At present, PBM is also being used in the treatment of many pathological disorders and diseases such as Parkinson's and Alzheimer's diseases, depression, traumatic brain injury, etc., as a non-invasive non-thermal and painless therapy, achieving positive cognitive and brain effects (Meynaghizadeh-Zargar et al., 2019; Salehpour and Hamblin, 2020; Salehpour et al., 2021). Despite light absorption is supposed to occur particularly in stressed/damaged cells, it has been also studied the effects of this technique on healthy adult subjects with no clinical symptoms, finding positive effects. Human research reported an overall improvement in cognitive functions after the use of PBM most of them by using a wavelength of 1,064 nm (Barrett and Gonzalez-Lima, 2013; Blanco et al., 2016, 2017; Hwang et al., 2016; Gonzalez-Lima, 2017; Wang et al., 2017; Gonzalez-Lima et al., 2019; Holmes et al., 2019; Saucedo et al., 2021). Regarding brain activity markers, Gonzalez-Lima (2017) found an increase of CCO and oxygenated hemoglobin concentrations in the prefrontal cortex and Wang et al. (2017) and Zomorodi et al. (2019) showed variations in the brain waves frequency. Moreover, healthy animal studies achieved better behavioral outcomes and brain changes after PBM radiation (Michalikova et al., 2008; Arias et al., 2020; Gutiérrez-Menéndez et al., 2021; **Table 1**).

The development of the nervous system depends on the continuous interaction of several processes that start during the fetal period. Some of these developmental processes are completed before birth and others continue in the postnatal

period, extending into adulthood (Tsujimoto, 2008). The postnatal stage is a sensitive period of brain development. It is characterized by the presence of neurogenesis and gliogenesis, cell's migration and differentiation, and the rapid formation of synapses (synaptogenesis) and their remodeling and elimination (Bandeira et al., 2009; Miki et al., 2014; Chen et al., 2017). However, all these processes do not start at the same time. Individual brain regions have been shown to have individual time scales for maturation, being the PFC and also the hippocampus ones of the latest (Tsujimoto, 2008; Mengler et al., 2014). Likewise, cell metabolism also matures after birth. Mitochondria exhibit an increment of CCO activity and higher content of cytochrome in the first month of postnatal life, increasing their oxidative capacity (Kalous et al., 2001). According to these claims and taking into account all the positive PBM outcomes on brain function and activity, the potential use of this technique not only in healthy adult brains but also in developing stages is not surprising. However, little research is focused on PBM administration in these periods. In order to contribute to increasing the knowledge of the effects of PBM in the postnatal period, we applied 5 days of PBM therapy in healthy male and female Wistar rats starting at PND 24. As we mentioned before, the choice of the light parameters is an essential component that we have to consider in the use of this technique. In our study, we choose a near-infrared light of 810 nm due to the high support of this wavelength from other research (Gutiérrez-Menéndez et al., 2020; dos Santos Cardoso et al., 2021a), as well as previous pilot studies in young subjects that our team carried out. Regarding the treatment duration and the way of application, we decided to administer PBM manually for 30 min in order to reduce stress during the application. After PBM administration, we analyzed differences between groups according to metabolic activity and the activation of immediate early genes in each sex. In this developmental stage, there is an increment of cytochrome content and CCO activity (Kalous et al., 2001). As PBM has its potential effect on the CCO, as a result, its redox status and its functional activity would be modulated (Karu, 2014; Dompe et al., 2020) so in our research, changes in the metabolic activity of our subjects would be expected. However, we did not find CCO differences between male groups nor female groups in the PFC or the hippocampus. Little research has focused specifically on the analysis of the metabolic activity after PBM administration. Most of the studies were carried out using adult samples and they support the idea that the photon absorption by CCO leads to an increase in enzyme activity, oxygen consumption and ATP production due to the photodissociation of inhibitory nitric oxide (Gonzalez-Lima, 2017; Hamblin, 2017, 2019; Hennessy and Hamblin, 2017; Hamblin, 2017; Arias et al., 2020). However, the contrary effect was also found, a reduction in the oxidative metabolic activity in several limbic regions of adult control rats after PBM administration (Gutiérrez-Menéndez et al., 2021; **Table 1**). It should be noted that despite the results being directly dependent on which parameters have been chosen and there was high variability between these studies (Gutiérrez-Menéndez et al., 2020), PBM administration achieves CCO modifications in adult control subjects. Moreover, CCO changes after PBM have been identified in adult healthy subjects, in several models of

TABLE 1 | Comparison of PBM parameters used in previous research.

References	Sample	Age period	PBM device	Wave type	Wavelength (nm)	Irradiance (mW/cm ²)
Arias et al. (2016)	Portal hypertension animals	Adulthood	LED	–	610 ± 10	50
Arias et al. (2020)	Healthy animals	Adulthood	LED	–	610 ± 10	50
Banqueri et al. (2019)	Early stressed animals	Adulthood	Laser	–	1,064	(Power: 30 mW)
Barrett and Gonzalez-Lima (2013)	Healthy humans	Adulthood	Laser	Continuous	1,064	250
Blanco et al. (2016, 2017)	Healthy humans	Adulthood	Laser	Continuous	1,064	250
Buzzá et al. (2019)	Healthy animal	Newborn	LED	–	630	4
De Taboada and Hamblin (2019)	Alzheimer disease animal model	Adulthood	Laser	Pulsed	810	(Powers: 40, 200, and 400 mW)
dos Santos Cardoso et al. (2021a)	Healthy animals	Adolescence/Adulthood	Laser	Continuous	810	(Power: 100 mW)
Gonzalez-Lima (2017); Gonzalez-Lima et al. (2019)	Healthy humans	Adulthood	Laser	Continuous	1,064	250
Gutiérrez-Menéndez et al. (2021)	Healthy animals	Adulthood	Laser	–	1,064	(Power: 30 mW)
Holmes et al. (2019)	Healthy humans	Adulthood	Laser	–	1,064	250
Hwang et al. (2016)	Healthy humans	Adulthood	Laser	–	1,064	250
Li et al. (2021)	Posttraumatic stress disorder animal model	Adulthood	Laser	Continuous	808	25
Méndez et al. (2021)	Hepatic encephalopathic animals	Adulthood	LED	–	610 ± 10	50
Michalikova et al. (2008)	Healthy animals	Adulthood	Laser	Continuous	1,072	–
Nadur-Andrade et al. (2016)	Bothrops moojeni venom in animals	Adulthood	Laser	–	685	(Power: 30 mW)
Saucedo et al. (2021)	Healthy humans	Adolescence/Adulthood	Laser	Continuous	1,064	250
Shinhmar et al. (2020)	Healthy humans	Adulthood	LED	–	670	40
Shinhmar et al. (2020)	Healthy humans	Adulthood	Laser	–	1,064	160
Zomorodi et al. (2019)	Healthy humans	Adulthood	LED	Pulsed	810	75, 25, and 100

disease and also in cognitive tasks, reporting a general decrease in metabolic activity in the radiated groups (Arias et al., 2016; Banqueri et al., 2019; Gutiérrez-Menéndez et al., 2021; Méndez et al., 2021). Nevertheless, in our study, after the application of PBM in young healthy subjects, we did not find any alterations in metabolic activity in male or female groups. Additionally, the analysis of the metabolic activity differences between sexes in the three groups (PBM, PBMD, C), showed higher CCO activity in the three female groups than male groups in the prefrontal cortex and the hippocampus. These results are according with the previous study of Spivey et al. (2008) that showed lower

male regional metabolic activity in prefrontal and parietal cortex of healthy juvenile rats compared to the juvenile female group. Similar results using adult samples were found by González-Pardo et al. (2020). In the same way, the c-fos proto-oncogene expression has been less studied after the application of PBM. This immediate early gene is one of the first groups of genes that express within minutes after synaptic and neuronal activation triggered by extracellular stimulation and it is involved in cell proliferation and differentiation (Velazquez et al., 2015; Li et al., 2021). As in the CCO studies, results are controversial: several research studies have achieved an increase of c-Fos protein

913 expression but others found a decrease of its expression in several
 914 brain areas in healthy and disease models (Nadur-Andrade et al.,
 915 2016; De Taboada and Hamblin, 2019; Arias et al., 2020; Li et al.,
 916 2021; **Table 1**). By contrast, in our study, we did not achieve
 917 any alterations in the c-Fos protein expression between young
 918 groups in males or females after light application. However,
 919 differences in the c-Fos expression between sexes in the three
 920 groups (PBM, PBMD, and C) were found. The three male groups
 921 displayed greater c-Fos positive cells than females in the three
 922 studied areas of the prefrontal cortex while, in contrast, female
 923 groups showed higher c-Fos expression in the CA3 subregion of
 924 the hippocampus.

925 Our results are in accordance with the studies of Shinhmar
 926 et al. (2020), dos Santos Cardoso et al. (2021a), and Saucedo
 927 et al. (2021) (**Table 1**), who compared light administration
 928 effects on retinal function, CCO and hemodynamic activity
 929 and neuroinflammatory response, respectively, between young
 930 and aged subjects. They found that after radiation, PBM effects
 931 were greater in the older subject groups. It is known that in
 932 brain aging several neurodegeneration processes, such as local
 933 inflammation and energy metabolism reduction, take place (dos
 934 Santos Cardoso et al., 2021b,c). Therefore, these researchers
 935 speculated that the age-related mitochondrial decline, which is
 936 not present in young populations, plays a key role in the outcomes
 937 of PBM therapy (Shinhmar et al., 2020; dos Santos Cardoso et al.,
 938 2021a; Saucedo et al., 2021). The same reasons can explain our
 939 findings, as we applied PBM therapy in young subjects without
 940 any apparent health issues and in the developing brain. At this
 941 stage, brain function, specifically brain mitochondrial function,
 942 is not disturbed so, the action of PBM in the mitochondria
 943 is not detectable using the analysis of CCO activity and c-Fos
 944 protein expression. We can suspect that PBM therapy would
 945 be more effective in mitochondrially-compromised individuals
 946 such as in adult/older subjects and even in several diseases,
 947 than in young healthy subjects (Scaglia, 2010; Saucedo et al.,
 948 2021). Nevertheless, there is a study by Buzzá et al. (2019)
 949 which found high weight, faster eye-opening, and normal blood
 950 count in the developmental postnatal stage after applying red
 951 light in postnatal rats from PND2 until PND13. Despite the
 952 chosen subjects being healthy and newborn rats, results showed
 953 earlier maturity without damage in the radiated group, showing
 954 the potential applications of PBM in the first developing stages
 955 (Buzzá et al., 2019; **Table 1**). The study of Buzzá et al. (2019) used
 956 PBM at an earlier developmental stage compared to the present
 957 study and did not examine any brain modification, differing
 958 from our functional assessment of metabolic activity's and c-Fos
 959 expression's alterations. However, it should be pointed out that
 960 our study has several limitations that could lead to the results we
 961 found. The analysis of CCO and c-Fos variations could be not
 962 enough to detect PBM changes in these healthy young brains and
 963 the addition of other functional or behavioral methods could have
 964 helped to show PBM effects. Additionally, despite we included
 965 a device group submitted to the same conditions as the PBM
 966 group but without the light radiation for each sex in an attempt
 967 to control any stress influences, the inclusion of a positive control
 968 group would be relevant to show that the histological methods
 969 used are sensitive to changes. These markers of brain function

suffer modifications in demanding conditions such as in an
 early stress period (Banqueri et al., 2019) or under cognitive
 requirements (Gonzalez-Lima, 2017; Gutiérrez-Menéndez et al.,
 2021; **Table 1**).

In conclusion, we applied 5 days of 810 nm-PBM therapy in
 the frontal area of the brain of male and female rats from PND
 24 to PND 28 and we did not find any changes in metabolic
 activity nor c-Fos protein expression in any of the studied groups
 in the PFC nor the hippocampus. Taking into account the positive
 effects reported in the developmental stage in healthy subjects,
 the analysis of CCO and c-Fos variations carried out in our study
 could be not enough to detect PBM changes in these healthy
 young brains. More studies are necessary to examine in depth
 PBM outcomes in brain development, cognitive functions and
 postnatal disorders, along with the exploration of the optimal
 light parameters.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included
 in the article/supplementary material, further inquiries can be
 directed to the corresponding author/s.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Ethics
 Committee of the Principality of Asturias.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AG-M, MM, and JA designed the experiments. JM designed and
 developed the PBM device. AG-M performed the experiments,
 analyzed the data, and drafted the manuscript. MM and JA helped
 with the experimental steps. All authors revised the manuscript
 and approved its final version to be published and agreed to be
 accountable for all aspects of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by Projects Grants of the
 MINECO (Ministerio de Economía y Competitividad del
 Gobierno de España) PID2020-117259RB-I00, Gobierno
 del Principado de Asturias FICYT AYUD/2021/51378
 and Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades
 MCIU-19-PRE2018-086220 to AG-M.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the laboratory technician Begoña Valdés
 for their essential contribution to this work and the
 AINDACE Foundation (Ayuda a la Investigación del Daño
 y Enfermedades Cerebrales).

REFERENCES

- 1027 Arias, J. L., Mendez, M., Martínez, J. Á., and Arias, N. (2020). Differential effects
1028 of photobiomodulation interval schedules on brain cytochrome c-oxidase and
1029 of proto-oncogene expression. *Neurophotonics* 7, 1–11. doi: 10.1117/1.nph.74.
1030 045011
- 1032 Arias, N., González, J. D., Pernía, A. M., and Arias, J. L. (2019). Hepatic
1033 encephalopathy and photobiomodulation: experimental models and clinical
1034 features. *Photobiomodul. Brain Low Level Laser Ther. Neurol. Neurosci.* 2019,
253–263. doi: 10.1016/B978-0-12-815305-5.00020-8
- 1035 Arias, N., Méndez, M., and Arias, J. L. (2016). Low-light-level therapy as
1036 a treatment for minimal hepatic encephalopathy: behavioural and brain
1037 assessment. *Lasers Med. Sci.* 2016:4. doi: 10.1007/s10103-016-2042-4
- 1038 Bandeira, F., Lent, R., and Herculano-Houzel, S. (2009). Changing numbers of
1039 neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat.
1040 *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106, 14108–14113. doi: 10.1073/pnas.0804650106
- 1041 Banqueri, M., Martínez, J. A., Prieto, M. J., Cid-Duarte, S., Méndez, M., and Arias,
1042 J. L. (2019). Photobiomodulation rescues cognitive flexibility in early stressed
1043 subjects. *Brain Res.* 1720:146300. doi: 10.1016/j.brainres.2019.146300
- 1044 Barrett, D. W., and Gonzalez-Lima, F. (2013). Transcranial infrared laser
1045 stimulation produces beneficial cognitive and emotional effects in humans.
1046 *Neuroscience* 230, 13–23. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.11.016
- 1047 Bertani, D. E., De Novelli, A. M. P., Farina, R., Latella, E., Meloni, M., Scala, C.,
1048 et al. (2021). “Shedding light on light”: a review on the effects on mental health
1049 of exposure to optical radiation. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18, 1–16.
1050 doi: 10.3390/ijerph18041670
- 1051 Blanco, N. J., Maddox, W. T., and Gonzalez-Lima, F. (2017). Improving executive
1052 function using transcranial infrared laser stimulation. *J. Neuropsychol.* 11,
1053 14–25. doi: 10.1111/jnp.12074
- 1054 Blanco, N. J., Saucedo, C. L., and Gonzalez-Lima, F. (2016). Transcranial infrared
1055 laser stimulation improves rule-based, but not information-integration,
1056 category learning in humans. *Neurobiol. Learn. Mem.* 139, 69–75. doi: 10.1016/
1057 j.nlm.2016.12.016
- 1058 Buzzá, H. H., Zangirolami, A. C., Kurachi, C., and Vanderlei, S.
1059 (2019). Acceleration of Newborn Rats Development with the use of
1060 photobiomodulation and the near possibility of application in human
1061 premature babies. *J. Biophotonics* 2019:201800461. doi: 10.1002/jbio.201800461
- 1062 Calabrese, E., Badea, A., Watson, C., and Johnson, G. A. (2013). A quantitative
1063 magnetic resonance histology atlas of postnatal rat brain development with
1064 regional estimates of growth and variability. *Neuroimage* 71, 196–206. doi:
1065 10.1016/j.neuroimage.2013.01.017
- 1066 Chen, V. S., Morrison, J. P., Southwell, M. F., Foley, J. F., Bolon, B., and Elmore,
1067 S. A. (2017). Histology Atlas of the Developing Prenatal and Postnatal Mouse
1068 Central Nervous System, with Emphasis on Prenatal Days E7.5 to E18.5.
1069 *Toxicol. Pathol.* 45, 705–744. doi: 10.1177/0192623317728134
- 1070 de Pauli Paglioni, M., Araújo, A. L. D., Arboleda, L. P. A., Palmier, N. R.,
1071 Fonsêca, J. M., Gomes-Silva, W., et al. (2019). Tumor safety and side effects of
1072 photobiomodulation therapy used for prevention and management of cancer
1073 treatment toxicities. A systematic review. *Oral Oncol.* 93, 21–28. doi: 10.1016/j.
1074 oraloncology.2019.04.004
- 1075 De Taboada, L., and Hamblin, M. R. (2019). *Transcranial Photobiomodulation*
1076 *Treats Alzheimer’s Disease in Amyloid-B Protein Precursor Transgenic Mice.*
1077 Amsterdam: Elsevier Inc, doi: 10.1016/B978-0-12-815305-5.00015-4
- 1078 Dompe, C., Moncrieff, L., Matys, J., Grzech-Leśniak, K., Kocherova, I., Bryja,
1079 A., et al. (2020). Photobiomodulation—underlying mechanism and clinical
1080 applications. *J. Clin. Med.* 9:1724. doi: 10.3390/jcm9061724
- 1081 dos Santos Cardoso, F., de Souza Oliveira Tavares, C., Araujo, B. H. S., Mansur,
1082 F., Lopes-Martins, R. ÁB., and Gomes da Silva, S. (2021a). Improved spatial
1083 memory and neuroinflammatory profile changes in aged rats submitted
1084 to photobiomodulation therapy. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2021:4. doi: 10.1007/
1085 s10571-021-01069-4
- 1086 dos Santos Cardoso, F., dos Santos, J. C. C., Gonzalez-Lima, F., Araújo,
1087 B. H. S., Lopes-Martins, R. ÁB., and Gomes da Silva, S. (2021b). Effects of
1088 chronic photobiomodulation with transcranial near-infrared laser on brain
1089 metabolomics of young and aged rats. *Mol. Neurobiol.* 58, 2256–2268. doi:
1090 10.1007/s12035-020-02247-z
- 1091 dos Santos Cardoso, F., Mansur, F., Araújo, B., Gonzalez-Lima, F., and Gomes
1092 da Silva, S. (2021c). Photobiomodulation improves the inflammatory response
1093 and intracellular signaling proteins linked to vascular function and cell survival
1094 in the brain of aged rats. *Mol. Neurobiol.* 2021, 1–9. doi: 10.1007/s12035-021-
1095 02606-4
- 1096 Gonzalez-Lima, F. (2017). Transcranial photobiomodulation: controlled evidence
1097 for cerebrovascular and cognitive enhancement. *Biol. Psychiatry* 81:S156. doi:
1098 10.1016/j.biopsych.2017.02.398
- 1099 Gonzalez-Lima, F., Barrett, D., Saucedo, C., Alexander, C., Liu, H., and Haley,
1100 A. (2019). Transcranial photobiomodulation in healthy subjects: cognitive
1101 enhancement. *Biol. Psychiatry* 85, S80–S81. doi: 10.1016/j.biopsych.2019.03.208
- 1102 Gonzalez-Pardo, H., Arias, J. L., Gómez-Lázaro, E., Taboada, I. L., and Conejo,
1103 N. M. (2020). Sex-specific effects of early life stress on brain mitochondrial
1104 function, monoamine levels and neuroinflammation. *Brain Sci.* 10, 1–17. doi:
1105 10.3390/brainsci10070447
- 1106 Gutiérrez-Menéndez, A., Cid-Duarte, S., Banqueri, M., Martínez, J. A., Méndez,
1107 M., and Arias, J. L. (2021). Photobiomodulation effects on active brain networks
1108 during a spatial memory task. *Physiol. Behav.* 230:113291. doi: 10.1016/j.
1109 physbeh.2020.113291
- 1110 Gutiérrez-Menéndez, A., Marcos-Nistal, M., Méndez, M., and Arias, J. L.
1111 (2020). Photobiomodulation as a promising new tool in the management of
1112 psychological disorders: a systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 119,
1113 242–254. doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.10.002
- 1114 Hamblin, M. R. (2016). Shining light on the head: photobiomodulation for brain
1115 disorders. *BBA Clin.* 6, 113–124. doi: 10.1016/j.bbaci.2016.09.002
- 1116 Hamblin, M. R. (2017). Mechanisms and applications of the anti-inflammatory
1117 effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys.* 4, 337–361. doi: 10.3934/biophy.
1118 2017.3.337
- 1119 Hamblin, M. R. (2019). “Mechanisms of photobiomodulation in the brain,”
1120 in *Photobiomodulation in the Brain*, eds M. Hamblin and Y.-Y. Huang
1121 (Amsterdam: Elsevier), 97–110. doi: 10.1016/B978-0-12-815305-5.00008-7
- 1122 Hennessy, M., and Hamblin, M. R. (2017). Photobiomodulation and the brain: a
1123 new paradigm. *J. Opt.* 19:13003. doi: 10.1088/2040-8986/19/1/013003
- 1124 Holmes, E., Barrett, D. W., Saucedo, C. L., O’Connor, P., Liu, H., and Gonzalez-
1125 Lima, F. (2019). Cognitive Enhancement by Transcranial Photobiomodulation
1126 Is Associated With Cerebrovascular Oxygenation of the Prefrontal Cortex.
1127 *Front. Neurosci.* 13:1129. doi: 10.3389/fnins.2019.01129
- 1128 Hwang, J., Castelli, D. M., and Gonzalez-Lima, F. (2016). Cognitive enhancement
1129 by transcranial laser stimulation and acute aerobic exercise. *Lasers Med. Sci.* 31,
1130 1151–1160. doi: 10.1007/s10103-016-1962-3
- 1131 Kalous, M., Rauchová, H., and Drahotka, Z. (2001). Postnatal development of energy
1132 metabolism in the rat brain. *Physiol. Res.* 50, 315–319.
- 1133 Karege, F., Schwald, M., and Cisse, M. (2002). Postnatal developmental profile of
1134 brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci. Lett.* 328,
1135 261–264. doi: 10.1016/S0304-3940(02)00529-3
- 1136 Karu, T. I. (2014). Cellular and molecular mechanisms of photobiomodulation
1137 (low-power laser therapy). *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* 20, 143–148.
1138 doi: 10.1109/JSTQE.2013.2273411
- 1139 Li, Y., Dong, Y., Yang, L., Tucker, L., Yang, B., Zong, X., et al. (2021). Transcranial
1140 photobiomodulation prevents PTSD-like comorbidities in rats experiencing
1141 underwater trauma. *Transl. Psychiatry* 11:5. doi: 10.1038/s41398-021-01389-5
- 1142 Martin, P. I., Chao, L., Kregel, M. H., Ho, M. D., Yee, M., Lew, R., et al. (2021).
1143 Transcranial Photobiomodulation to Improve Cognition in Gulf War Illness.
1144 *Front. Neurol.* 11:1–19. doi: 10.3389/fneur.2020.574386
- 1145 Méndez, M., Fidalgo, C., Arias, J. L., and Arias, N. (2021). Methylene
1146 blue and photobiomodulation recover cognitive impairment in hepatic
1147 encephalopathy through different effects on cytochrome c-oxidase. *Behav. Brain*
1148 *Res.* 403:113164. doi: 10.1016/j.bbr.2021.113164
- 1149 Mengler, L., Khmelinskii, A., Diedenhofen, M., Po, C., Staring, M., Lieveldt,
1150 B. P. F., et al. (2014). Brain maturation of the adolescent rat cortex and striatum:
1151 changes in volume and myelination. *Neuroimage* 84, 35–44. doi: 10.1016/j.
1152 neuroimage.2013.08.034
- 1153 Meynaghizadeh-Zargar, R., Sadigh-Eteghad, S., Mohaddes, G., Salehpour, F., and
1154 Rasta, S. H. (2019). Effects of transcranial photobiomodulation and methylene
1155 blue on biochemical and behavioral profiles in mice stress model. *Lasers Med.*
1156 *Sci.* 2019:2851–z. doi: 10.1007/s10103-019-02851-z
- 1157 Michalikova, S., Ennaceur, A., van Rensburg, R., and Chazot, P. L. (2008).
1158 Emotional responses and memory performance of middle-aged CD1 mice in a
1159 3D maze: effects of low infrared light. *Neurobiol. Learn. Mem.* 89, 480–488.
1160 doi: 10.1016/j.nlm.2007.07.014

- 1141 Miki, T., Yokoyama, T., Kusaka, T., Suzuki, S., Ohta, K., Warita, K., et al. (2014).
1142 Early postnatal repeated maternal deprivation causes a transient increase
1143 in OMPg and BDNF in rat cerebellum suggesting precocious myelination.
1144 *J. Neurol. Sci.* 336, 62–67. doi: 10.1016/j.jns.2013.10.007
- 1145 Mitrofanis, J., and Jeffery, G. (2018). Does photobiomodulation influence ageing?
1146 *Aging* 10, 2224–2225. doi: 10.18632/aging.101556
- 1147 Nadur-Andrade, N., Dale, C. S., Oliveira, V. R., da, S., Toniolo, E. F., Feliciano,
1148 R., et al. (2016). Analgesic effect of photobiomodulation on bothrops moojeni
1149 venom-induced hyperalgesia: a mechanism dependent on neuronal inhibition,
1150 cytokines and kinin receptors modulation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:1–14. doi:
1151 10.1371/journal.pntd.0004998
- 1152 Paxinos, G., and Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th
1153 Edn. Amsterdam: Elsevier.
- 1154 Ramezani, F., Neshasteh-riz, A., Ghadaksaz, A., and Fazeli, S. M. (2021).
1155 Mechanistic aspects of photobiomodulation therapy in the nervous system.
1156 *Lasers Med Sci.* 37, 11–18. doi: 10.1007/s10103-021-03277-2
- 1157 Salehpour, F., and Hamblin, M. R. (2020). Photobiomodulation for Parkinson's
1158 disease in animal models: a systematic review. *Biomolecules* 10, 1–19. doi: 10.
1159 3390/biom10040610
- 1160 Salehpour, F., Gholipour-Khalili, S., Farajdokht, F., Kamari, F., Walski,
1161 T., Hamblin, M. R., et al. (2019a). Therapeutic potential of intranasal
1162 photobiomodulation therapy for neurological and neuropsychiatric disorders: a
1163 narrative review. *Rev. Neurosci.* 31, 269–286. doi: 10.1515/revneuro-2019-0063
- 1164 Salehpour, F., Khademi, M., and Hamblin, M. R. (2021). Photobiomodulation
1165 therapy for dementia: a systematic review of pre-clinical and clinical studies.
1166 *J. Alzheimer's Dis.* 83, 1431–1452. doi: 10.3233/JAD-210029
- 1167 Salehpour, F., Mahmoudi, J., Kamari, F., Sadigh-Eteghad, S., Rasta, S. H., and
1168 Hamblin, M. R. (2018). Brain photobiomodulation therapy: a narrative review.
1169 *Mol. Neurobiol.* 55, 6601–6636. doi: 10.1007/s12035-017-0852-4
- 1170 Salehpour, F., Mahmoudi, J., Sadigh-Eteghad, S., and Cassano, P. (2019b).
1171 "Photobiomodulation for depression in animal models," in *Photobiomodulation*
1172 *in the Brain*, eds M. Hamblin and Y. Y. Huang (Amsterdam: Elsevier), 189–205.
1173 doi: 10.1016/B978-0-12-815305-5.00014-2
- 1174 Saucedo, C. L., Courtois, E. C., Wade, Z. S., Kelley, M. N., Kheradbin, N.,
1175 Barrett, D. W., et al. (2021). Transcranial laser stimulation: mitochondrial and
1176 cerebrovascular effects in younger and older healthy adults. *Brain Stimul.* 14,
1177 440–449. doi: 10.1016/j.brs.2021.02.011
- 1178 Scaglia, F. (2010). The role of mitochondrial dysfunction in psychiatric disease.
1179 *Dev. Disabil. Res. Rev.* 16, 136–143. doi: 10.1002/ddrr.115
- 1180 Shinhmar, H., Grewal, M., Sivaprasad, S., Hogg, C., Chong, V., Neveu, M., et al.
1181 (2020). Optically improved mitochondrial function redeems aged human visual
1182 decline. *J Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 75, e49–e52. doi: 10.1093/gerona/
1183 glaa155
- 1184
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196
1197
- 1198 Simmons, R. K., Stringfellow, S. A., Glover, M. E., Wagle, A. A., and
1199 Clinton, S. M. (2013). DNA methylation markers in the postnatal
1200 developing rat brain. *Brain Res.* 1533, 26–36. doi: 10.1016/j.brainres.2013.0
1201 8.005
- 1202 Spivey, J. M., Colorado, R. A., Conejo-Jimenez, N., Gonzalez-Pardo, H., and
1203 Gonzalez-Lima, F. (2008). Juvenile male rats display lower cortical metabolic
1204 capacity than females. *Neurosci. Lett.* 440, 255–259. doi: 10.1016/j.neulet.2008.0
1205 5.104
- 1206 Tsujimoto, S. (2008). Review: the prefrontal cortex: Functional neural
1207 development during early childhood. *Neuroscientist* 14, 345–358.
1208 doi: 10.1177/1073858408316002
- 1209 Velazquez, F. N., Caputto, B. L., and Boussin, F. D. (2015). c-Fos importance for
1210 brain development. *Aging* 7, 1028–1029. doi: 10.18632/aging.100862
- 1211 Wang, X., Dmochowski, J., Husain, M., Gonzalez-Lima, F., and Liu, H. (2017).
1212 Proceedings #18. transcranial infrared brain stimulation modulates EEG alpha
1213 power. *Brain Stimul.* 10, e67–e69. doi: 10.1016/j.brs.2017.04.111
- 1214 Zomorodi, R., Loheswaran, G., Pushparaj, A., and Lim, L.
1215 (2019). Pulsed near infrared transcranial and intranasal
1216 photobiomodulation significantly modulates neural oscillations: a
1217 pilot exploratory study. *Sci. Rep.* 9, 1–11. doi: 10.1038/s41598-019-42
1218 693-x
- 1219 Zorzo, C., Méndez-López, M., Méndez, M., and Arias, J. L. (2019). Adult social
1220 isolation leads to anxiety and spatial memory impairment: brain activity pattern
1221 of COx and c-Fos. *Behav. Brain Res.* 365, 170–177. doi: 10.1016/j.bbr.2019.03.
1222 011
- 1223 **Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the
1224 absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a
1225 potential conflict of interest.
- 1226 **Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors
1227 and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of
1228 the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in
1229 this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or
1230 endorsed by the publisher.
- 1231 *Copyright © 2022 Gutiérrez-Menéndez, Martínez, Méndez and Arias. This is an*
1232 *open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution*
1233 *License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted,*
1234 *provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the*
1235 *original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic*
1236 *practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply*
1237 *with these terms.*
- 1238
1239
1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254

4.3 *Publicación 3*

Título: Photobiomodulation effects on active brain networks during a spatial memory task.

Autores: Alba Gutiérrez-Menéndez, Sandra Cid-Duarte, María Banqueri, Juan A. Martínez, Marta Méndez López y Jorge L. Arias.

Revista: Physiology y Behavior.

Campo de la revista: Behavioral Sciences.

Factor de impacto: 3,244

Journal Pre-proof

Photobiomodulation effects on active brain networks during a spatial memory task

Alba Gutiérrez-Menéndez , Sandra Cid-Duarte , María Banqueri ,
Juan A. Martínez , Marta Méndez , Jorge L. Arias

PII: S0031-9384(20)30605-3
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113291>
Reference: PHB 113291



To appear in: *Physiology & Behavior*

Received date: 2 October 2020
Revised date: 9 December 2020
Accepted date: 14 December 2020

Please cite this article as: Alba Gutiérrez-Menéndez , Sandra Cid-Duarte , María Banqueri , Juan A. Martínez , Marta Méndez , Jorge L. Arias , Photobiomodulation effects on active brain networks during a spatial memory task, *Physiology & Behavior* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113291>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 Published by Elsevier Inc.

Photobiomodulation effects on active brain networks during a spatial memory task

Highlights

1. Photobiomodulation decreases CCO activity in many brain areas of control rats.
2. Both behavioural groups perform reversal memory task correctly.
3. Photobiomodulation decreases CCO levels in some brain areas involved in the task.
4. Photobiomodulation technique has more effects on active brain networks.

Photobiomodulation effects on active brain networks during a spatial memory task

Alba Gutiérrez-Menéndez^{*ab}, Sandra Cid-Duarte^a, María Banqueri^{bc}, Juan A. Martínez^{bd}, Marta Méndez^{ab}, Jorge L. Arias^{ab}.

^a Laboratory of Neuroscience, Department of Psychology. University of Oviedo, Plaza Feijóo, s/n, E-33003, Oviedo, Spain.

^b Instituto de Neurociencias del Principado de Asturias (INEUROPA), Oviedo, Spain.

^c Molecular Neurobiology laboratory. Nencki Institute of Experimental Biology. Polish Academy of Sciences. Ludwika Pasteura 3, 02-093 Warsaw, Poland.

^d Electronic Technology Area. University of Oviedo, 33204 Gijón, Spain.

*** Corresponding author:** Laboratory of Neuroscience, Department of Psychology. University of Oviedo, Plaza Feijóo, s/n, E-33003, Oviedo, Spain. E-mail: gutierrezalba@uniovi.es. Phone number: +34 985 10 32 12

Abstract

Photobiomodulation (PBM) or the use of red to near-infrared irradiation spectrum, is a non-invasive intervention that produces neurostimulatory effects and reaches benefits in several pathologies as well as in healthy subjects. The main objective of this study was to evaluate and compare the effects of PBM in a rat brain network on basal state and functional activity during the execution of a reversal task. Twenty-eight rats were divided into four groups: control group ($n=7$), control photobiomodulation group ($n=8$), behavioural group ($n=6$) and behavioural photobiomodulation group ($n=7$). Reversal memory was assessed using a Morris water maze and cytochrome c oxidase (CCO) was used as a brain metabolic activity marker. After five days of PBM, the control photobiomodulation group showed a decrease of CCO levels in the striatum, medial septum, entorhinal, hippocampus, amygdala, thalamus, mammillary nuclei and VTA. Both behavioural groups performed the task correctly, however, the behavioural photobiomodulation group displayed CCO reduction in some regions involved in the execution of the reversal task: septum, entorhinal, CA1, CA3, central amygdala and supramammilar, along

with higher levels in accumbens. These results could show the effect of PBM on active brain networks. Further studies will be necessary to elucidate its effects in different brain networks that are involved in the execution of other memory tasks.

Keywords: photobiomodulation, near-infrared light, spatial memory, brain networks, cytochrome c oxidase.

Abbreviations: AccC, Accumbens Core; AccSh, Accumbens Shell; AD, Thalamus anterodorsal; AM, Thalamus anteromedial; ATP, adenosine triphosphate; AV, Thalamus anteroventral; BC, behavioural control group; BC+PBM, behavioural photobiomodulation control group; BLA, Basolateral Amygdala; C, control group; CCO, cytochrome c oxidase; CeA, Central Amygdala; CG, Cingulate cortex; C+ PBM, control photobiomodulation group; DG, Dentate Gyrus; ENT, Entorhinal cortex; IL, Infralimbic cortex; LaA, Lateral Amygdala; LS, Lateral Septum; MML, Medial Lateral Mammillary; MMM, Medial Medial Mammillary; MS, Medial Septum; MWM, Morris water maze; PBM, photobiomodulation; PL, Prelimbic cortex; PRh, Perirhinal cortex; ROS, reactive oxygen species; STD, Dorsal Striatum; SuM, Supramammillar; VTA, Ventral Tegmental Area.

1. Introduction

Currently, photobiomodulation (PBM) is one of the most promising therapies based on the use of red to near-infrared irradiation spectrum (600-1100 nm) [1]. This non-invasive intervention produces neurostimulatory effects and reaches numerous beneficial results in a significant number of varied fields [2]. Thus, it is widely used to treat inflammatory conditions, pain, wound healing of deep and superficial tissues and even for aesthetic purposes and welfare [3,4]. Similarly, PBM has been proven effective in dentistry, dermatology and as well as clinical pathologies such as traumatic brain injuries, neurodegenerative diseases, cancer, tumours and in several psychiatric disorders [5–8]. Thus, PBM could become one of the most significant light therapies in the near future [9].

The action mechanism of this therapy is the absorption of the light by the mitochondria, specifically by the enzyme cytochrome c oxidase complex (CCO), the terminal enzyme in the

respiratory electron transport chain. This absorption has a large range of significant effects being the improvement of metabolic function and the increase of adenosine triphosphate (ATP) synthesis the most supported mechanisms of action [10]. Furthermore, it has been found that PBM increases DNA synthesis, intracellular calcium, Delta CCO and oxygenated haemoglobin concentrations and it activates many signalling pathways, such as the anti-apoptotic and pro-survival signalling [3,6,10]. PBM also leads to a dissociation of nitric oxygen species that follows the generation of reactive oxygen species (ROS) resulting in greater oxidation and the activation of many transcription factors causing long-lasting cell effects [3,11]. In addition, this technique can regulate the immune system response and stimulate neurogenesis, synaptogenesis and neuroplasticity [6,12]. However, some studies have also described some adverse effects induced by the use of PBM such as the increase of oxidative stress and the damage of DNA, the existence of apoptosis in an hippocampal cell culture, a delay on brain repair on traumatic injury in the mouse brain and increased diastolic pressure in major depression [13–16].

The assessment of the CCO activity in numerous studies has shown that the brain energy demand involved in neuronal activity during a specific behavioural task is increased in the brain areas that are involved in the task execution and, also, this brain activity is related to the difficulty of task performance [17–20]. Conversely, it has been found that after a learning process in a behavioural task, there is a reduction in CCO activity, therefore increasing the efficiency of the region's activity in regard to metabolic costs [21]. Thus, Olson et al. [22] showed a correlation between a decrease in blood flow and the improvement of the performance in a serial response time task and, Gobel et al. [23] found a pattern of deactivation in several areas, improving the efficiency of the visuomotor processing in the Serial Interception Sequence Learning task. In the same way, El Khoury et al. [24] using PBM to examine its effects in normal subjects after two different tasks, found an activity reduction in several brain areas involved in one of the tasks. Consequently, they suggested that near-infrared light had significant effects on brain activity but only when the brain region is functionally active executing an specific task and, this activity reduction could be a light protective effect [24].

Taking into account these potential benefits reached by PBM during a task and its effects on the CCO activity, the use of this therapy could have a differential effect on the brain networks if the areas are functionally active and these effects could be positive, prompting an enhanced efficiency of the metabolic process. Our study aimed to assess and compare the metabolic effects of PBM in a basal state network and in a functionally active neural brain network during the execution of a spatial reversal memory test. This behavioural protocol entails the ability to flexibly shift response patterns after a change in environmental conditions [25], a process that is mainly mediated by the prefrontal cortex [26]. Reversal memory is mostly impaired in several pathologies such as attention deficit hyperactivity disorder, autism, schizophrenia, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease [27,28]. It therefore becomes crucial to determine if PBM could be a potential treatment that could modulate brain activity underlying this cognitive function. Thus, rats of the behavioural groups performed a reversal memory test in the Morris water maze (MWM) and then, both experimental groups, one that performed the task and another without learning, received PBM just behind the eyes to target mostly frontal areas. Brain function was compared with control conditions studying brain metabolic activity of the areas involved in the task by means of CCO histochemistry.

2. Materials and Method

2.1 Subjects

A total of 28 3-month-old male Wistar rats were used. All the animals were maintained at constant room temperature (22 ± 2 °C), with a relative humidity of 65–70% with an artificial light-dark cycle of 12 h (8:00–20:00/20:00–8:00) and *ad libitum* access to food and tap water. The procedures and manipulation of the animals were carried out according to European Communities Council Directive 2010/63/ EU and Royal decree N° 53/2013 of the Ministry of the Presidency related to the protection of animals used for experimentation and other scientific purposes. The local committee for animal studies of the Oviedo University approved the study.

Animals were randomly distributed into four groups: control group (C, $n=7$), control photobiomodulation group (C+PBM, $n=8$), behavioural control group (BC, $n=6$) and behavioural photobiomodulation control group (BC+PBM, $n=7$). We carried out two different experiments in order to assess the metabolic effects of photobiomodulation therapy. In experiment 1, we compared C and C+PBM groups to assess the effects of PBM on basal control rats and, in experiment 2 we evaluated its effects on animals subjected to behavioural procedures, comparing results of BC and BC+PBM groups.

2.2. Reversal task in the Morris water maze

Animals of BC and BC+PBM groups were trained in the MWM, a circular pool of 150 cm diameter placed in the centre of a 16 m² lit room (two lamps of 4000 lx) surrounded by black panels on which different spatial cues were placed. The water level was 30 cm, at a temperature of 22 ± 2 °C. The scape platform used was a cylinder, 10 cm in diameter, placed 2 cm below the water. The pool was divided into four equal imaginary quadrants (A, B, C and D) to locate start positions and platforms. The behaviour of the animal in the MWM was recorded using a video camera (Sony V88E) connected to a computer with the software EthoVision Pro (Noldus Information Technologies, Wageningen, the Netherlands).

Behavioural procedures carried out were described in Banqueri et al. [29] and the learning protocol consisted of six days. The first day was devoted to the habituation of the animals to the task in which the animals carried out four trials with a visible platform situated in the centre of the pool. On the following four days, animals were training with a reference memory test where they received four acquisition trials per training session or day, in which the platform was hidden in the centre of quadrant D. Each animal was placed in the water in one pseudo-randomized quadrant and then, given 60 seconds to find the platform. If the rat did not reach the platform after this time, it was placed on the platform for 15 seconds. During the inter-trial interval, they were placed in a black bucket for 30 seconds. Daily, at the end of the session, a 25-second transfer learning trial was performed, where the platform was removed to measure the percentage of time spent in each quadrant.

On the last day, the sixth day, reversal learning was tested. The rats carried out eight acquisition trials where the scape hidden platform was moved to the quadrant opposite to its previous location, quadrant C. Experimental conditions were the same as in the memory training. Escape latencies and the time of permanence in each quadrant were recorded during the acquisition.

2.3. Photobiomodulation Therapy

The photobiomodulation therapy performed was described in Banqueri et al. [29]. Animals of C+PBM and BC+PBM groups were housed in individual cages and received photobiomodulation for five days coinciding with the habituation day and the four days of the reference memory test. Three days before therapy, animals were habituated to photobiomodulation. In this habituation, we attached Velcro to their previously shaved heads, on the first third of the head just behind the eyes, in attempts to target mostly frontal areas. During the following five days, the animals received 60 cycles (20 seconds ON and 40 seconds OFF) with a total duration of one hour, daily, using a wavelength of 1,064nm with an applied power of 30mW. Approximately 1.1% of the applied power reaches the brain tissue and the applied dose was 20J/cm².

2.4. Cytochrome oxidase histochemistry

Ninety minutes after the end of the reversal task, the animals were decapitated. Brains were removed, frozen rapidly in N-methyl butane (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), and stored at -40°C. The protocol carried out for the tissue treatment was described by Banqueri et al. [29]. Coronal sections (30 µm) of the brain were cut at -22 °C in a cryostat (Leica CM1900, Germany). To quantify enzymatic activity and control staining variability across different baths, sets of tissue homogenate standards from the Wistar rats' brains were cut at different thicknesses (10, 30, 50 and 70 µm) and included with each bath of slides.

Sections and standards were fixed for 5 min in 0.1 M phosphate buffer with 10% (w/v) sucrose and 25% glutaraldehyde, pH 7.6. Next, baths of 0.1M phosphate buffer with 10% (w/v) sucrose were given for 5 min each, and one bath of 0.05M Tris buffer, pH 7.6 (0.275 mg/l

cobalt chloride (Aldrich, Germany), 10% (w/v) sucrose (Sigma, Germany), 6 g/l Trizma base (Sigma, USA), and 0.5% (v/v) dimethyl-sulfoxide (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) for 10 min. Then, they were maintained in 0.1M phosphate buffer, pH 7.6, for 5 min and incubated in a solution of 0.0075% (w/v) cytochrome c oxidase (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain); 0.002% (w/v) catalase (Sigma, Spain); 5% (w/v) sucrose (Sigma, Germany); 0.25% (v/v) dimethyl-sulfoxide (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain); and 0.05% (w/v) diaminobenzidine tetra-hydrochloride (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) in 800 ml of 0.1M phosphate buffer at 37 °C for 1 h. Subsequently, the reaction was stopped by fixing the tissue in buffered 4% (v/v) formalin. Finally, sections were dehydrated, cleared with xylene (Avanter, Poland), and cover-slipped with Entellan (Merck, Germany).

2.5. CCO optical density quantification

The densitometric quantification of CCO activity was carried out by means of analysing the images of the regions of interest of the brain using a high precision illuminator, a digital camera and a computer equipped with the MCID Core 7.0 program (MCID, Interfocus Imaging Ltd., Linton, England). The mean optical density of each region was measured using three consecutive sections from each subject. In each section, four non-overlapping readings were taken, using a square-shaped sampling window adjusted for each region size. These measurements were averaged to obtain one mean per region for each subject. Then, optical density values were converted to CCO activity units, determined by the enzymatic activity of the standards measured spectrophotometrically [30].

The regions of interest were defined according to the stereotactic atlas of Paxinos and Watson [31], and the distance in mm of the regions counted from bregma was the following: +3.20mm for the cingulate (CG), prelimbic (PL) and infralimbic (IL) cortices; +1.56 mm for the dorsal striatum (STD) and the ventral striatum (Accumbens Core; AccC, Accumbens Shell; AccSh), +1.92 for septum (medial; MS and lateral; ML); -1.20 for the anterodorsal, anteromedial and anteroventral thalamus (AD, AM, AV); -2.28 mm for the CA1, CA3, and dentate gyrus (DG) subfields of the dorsal hippocampus, perirhinal cortex (PRh) and amygdala

(Basolateral; BLA, Central; CeA, Lateral; LaA) and -4.56 mm for the supramammillary (SuM), medial medial mammillary (MMM), medial lateral mammillary (MML), ventral tegmental area (VTA) and entorhinal cortex (ENT) (Fig. 1).

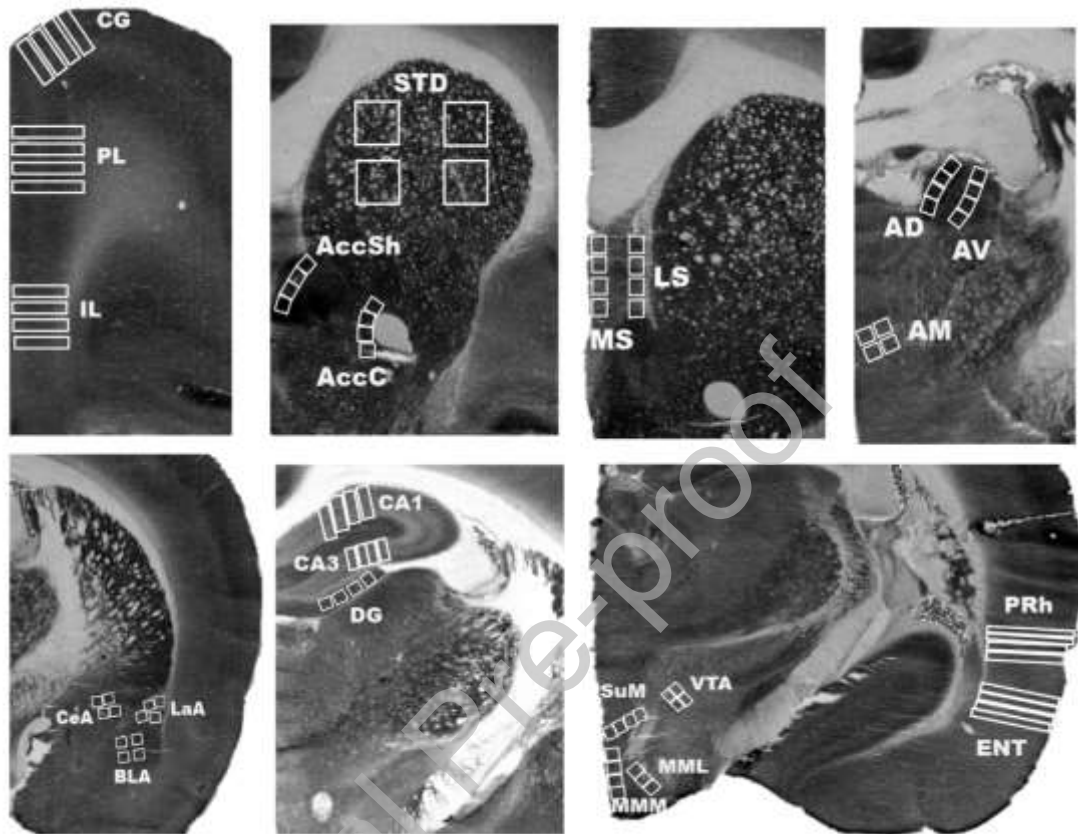


Fig. 1. Regions of interest. Sampling frames of CCO histochemistry in the brain regions of interest. Cingulate cortex= CG, Prelimbic cortex=PL, Infralimbic cortex=IL, Dorsal Striatum=STD, Accumbens Shell=AccSh, Accumbens Core=AccC, Medial Septum=MS, Lateral Septum= LS, Thalamus anterodorsal=AD, Thalamus anteromedial=AM, Thalamus anteroventral=AV, Basolateral Amygdala=BLA, Central Amygdala=CeA, Lateral Amygdala=LaA, field CA1 of hippocampus=CA1, field CA3 of hippocampus=CA3, Dentate Gyrus=DG, Supramammillar=SuM, Medial Medial Mammillary=MMM, Medial Lateral Mammillary=MML, Ventral Tegmental Area=VTA, Perirhinal cortex=PRh, Entorhinal cortex=ENT.

2.6. Statistical analysis

The data obtained was analysed using the software Sigma-Stat 12.5 (Systat Software Inc., Richmond, California). The significance level was defined as $p < 0.05$. Graphic representation of the results was performed with the SigmaPlot 12.5 software (SPSS Inc. and IBM Company, USA). All data was expressed as mean \pm SEM.

Regarding behavioural data, escape latencies were analysed separately for each group and day using a one-way repeated-measures ANOVA. Post hoc comparisons were done when significant differences were found using Tukey test. The time spent in each quadrant (A, B, C, D) was analysed using one t -test per group and day comparing the target quadrant permanence (D in reference memory training and C during reversal memory training) with the other three quadrants. A non-parametric Mann-Whitney U-test was performed when the normality test failed.

Statistical comparisons of CCO activity values in each brain region were analysed using a t -test. Mann-Whitney U test was applied when the normality assumption failed. Group differences CCO activity in each brain region of interest were analysed using one-way ANOVAs, following by post hoc comparisons using the Holm-Sidak method. Kruskal-Wallis One-Way Analysis of Variance of Ranks (H) was performed when equal variance failed, and Dunn's Method was used as a multiple comparison procedure.

3. Results

3.1. Behavioural results of BC and BC+PBM groups

Analysis of the escape latencies during reference memory training did not show a main effect of day in BC group ($F_{3,15}=1.479$, $p=0.260$). Nevertheless, BC+PBM group showed statistically significant differences throughout the days ($F_{3,18}=5.655$, $p=0.007$), but only between the first and fourth training day ($p = 0.004$) (Fig. 2A).

In regards to the time spent in the quadrants, BC group spent more time in the target quadrant (D) during the probe trials of the reference memory training (D1: $t_{(22)} = -4.872$, $p<0.001$; D2: $t_{(22)} = -4.625$, $p<0.001$; D3: $t_{(22)} = -2.111$, $p= 0.046$; D4: $t_{(22)} = -3.394$, $p= 0.003$). The analysis of the probe trial of the reversal memory training data of day 5 showed preserved cognitive flexibility, with preference to the new reinforced quadrant (C) over the others (D5: $t_{(22)} = -2.250$, $p<0.035$) (Fig. 2B). Similarly, BC+PBM group showed a preference for the rewarded quadrant (D) during all days of reference memory training (D1: $U=27.000$, $n_1= 7$, $n_2= 21$, $p= 0.015$; D2:

$t_{(26)} = -3.721, p < 0.001$; D3: $t_{(26)} = -3.989, p < 0.001$; D4: $t_{(26)} = -4.738, p < 0.001$) and also more permanence in the target quadrant (C) during reversal memory training (D5: $t_{(26)} = -2.211, p = 0.036$), exhibiting cognitive flexibility (Fig. 2C).

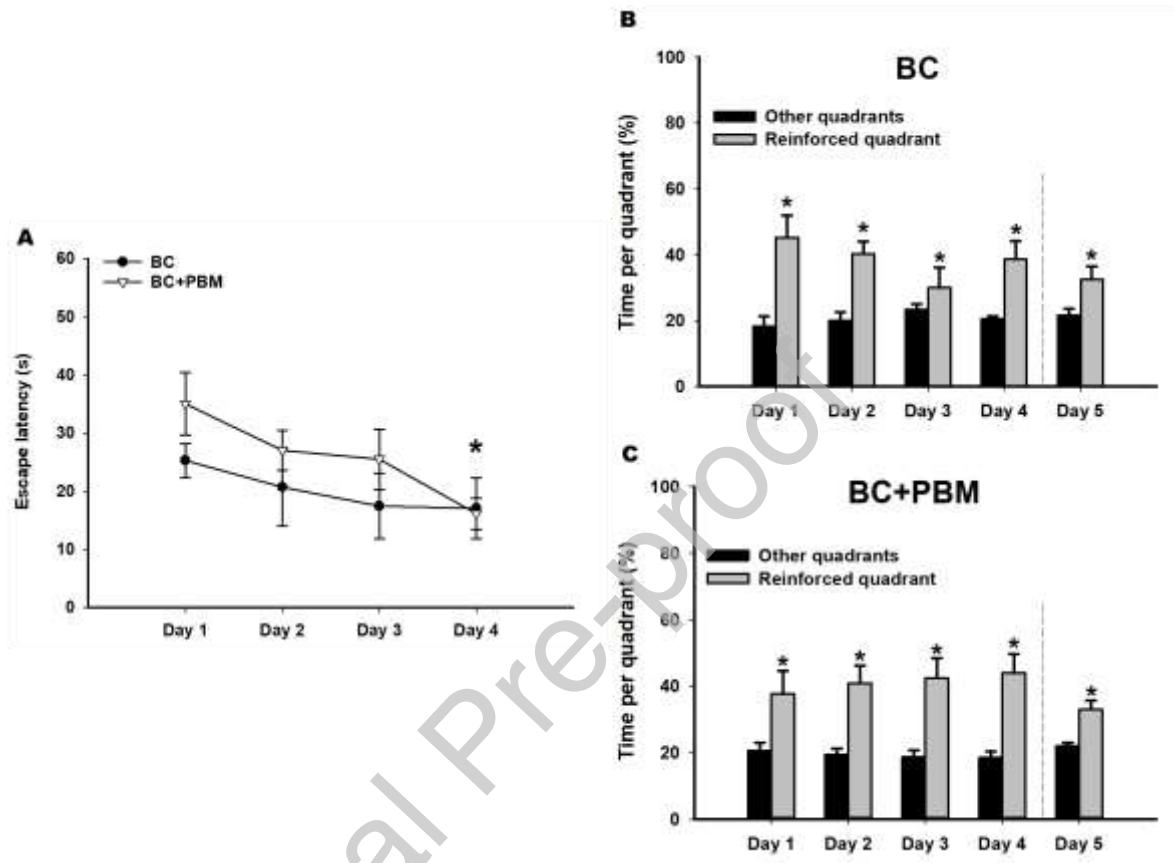


Fig. 2. Morris water maze behavioural results (Mean \pm SEM). **A.** Escape latencies of BC and BC+PBM groups. The x-axis shows the days. Only BC+PBM group showed a decrease in escape latency on the fourth day (* $p < 0.05$). **B.** Permanence of BC group in each quadrant (A, B, C, D) during the probe trials. BC subjects reached the learning criteria on the first day and showed intact cognitive flexibility (* $p < 0.05$). **C.** Permanence of BC+PBM group in each quadrant (A, B, C, D) during the probe trials. This group also reached the learning criteria on the first day and showed intact cognitive flexibility (* $p < 0.05$). The x-axis shows the days. Grey bars show percentage of permanence in reinforced quadrant (D during reference memory training and C, on day 5, during reversal memory training). Black bars represent the average permanence in the rest of the quadrants. Behavioural control group=BC, Behavioural photobiomodulation control group=BC+PBM.

3.2. CCO activity

In experiment 1, analysing the differences on CCO activity between C and C+PBM group, we found that PBM treatment reduced CCO units in dorsal and ventral striatum (STD: $t_{(13)} = 3.684, p = 0.003$; AccC: $t_{(13)} = 2.857, p = 0.013$; AccSh: $U = 9.000, n_1 = 7, n_2 = 8, p = 0.029$), MS ($t_{(13)} = 6.962, p < 0.001$), ENT ($t_{(12)} = 3.513, p = 0.004$), hippocampus (CA1: $t_{(13)} = 3.294, p = 0.006$; CA3: $t_{(13)} = 3.727, p = 0.003$; DG: $t_{(13)} = 3.034, p = 0.010$), amygdala

(CeA: $t_{(12)} = 7.706$, $p < 0.001$; LaA: $U = 4.000$, $n_1 = 7$, $n_2 = 7$, $p = 0.007$; BLA: $U = 1.000$, $n_1 = 7$, $n_2 = 7$, $p = 0.001$), thalamus (AD: $t_{(13)} = 2.346$, $p = 0.035$; AV: $t_{(13)} = 2.969$, $p = 0.011$; AM: $t_{(13)} = 2.686$, $p = 0.019$), mammillary nuclei (MMM: $t_{(10)} = 3.112$, $p = 0.011$; MML: $U = 4.000$, $n_1 = 6$, $n_2 = 6$, $p = 0.026$; SuM: $U = 0.000$, $n_1 = 6$, $n_2 = 6$, $p = 0.002$) and ATV ($t_{(10)} = 3.341$, $p = 0.007$) (Fig. 3A)

Likewise, in experiment 2, BC+PBM group showed fewer CCO units than BC group in MS ($t_{(11)} = 3.262$, $p = 0.008$), ENT ($t_{(11)} = 2.438$, $p = 0.033$), CA1 ($t_{(10)} = 3.569$, $p = 0.005$), CA3 ($t_{(10)} = 3.314$, $p = 0.008$), CeA ($t_{(11)} = 2.256$, $p = 0.045$), and SuM ($t_{(10)} = 2.390$, $p = 0.038$), but not in AccC ($U = 6.000$, $n_1 = 6$, $n_2 = 7$, $p = 0.035$), where BC+PBM group had higher CCO units (Fig. 3B).

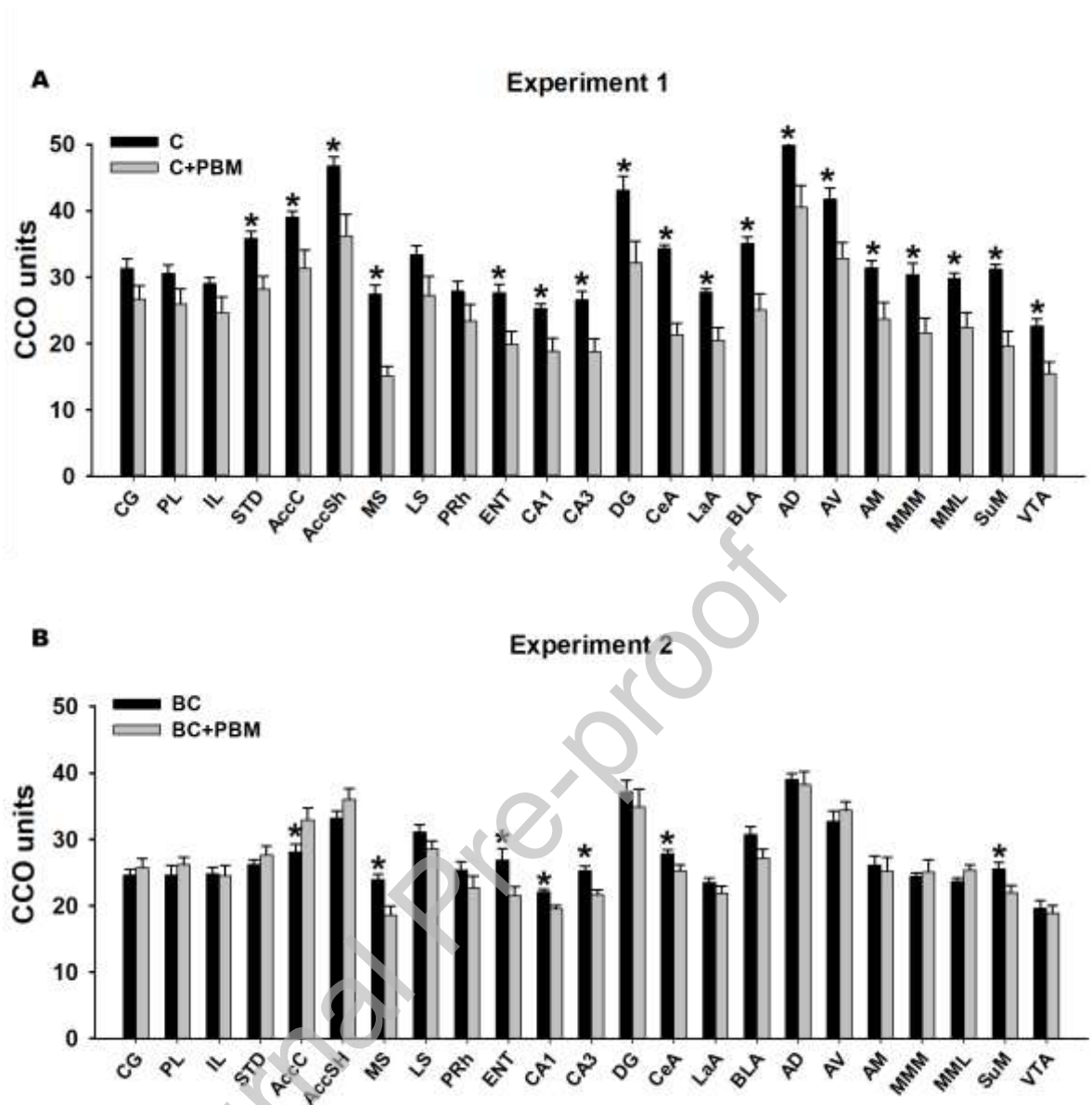


Fig. 3. CCO results (mean \pm SEM). **A.** CCO values in C and C+PBM groups. There were significant differences between the groups in STD, AccC, AccSh, MS, ENT, CA1, CA3, DG, CeA, LaA, BLA, AD, AV, AM, MMM, MML, SuM and VTA ($*p < 0.05$). **B.** CCO values in BC and BC+PBM groups. Significant differences were found in AccC, MS, ENT, CA1, CA3, CeA and SuM ($*p < 0.05$). Groups: control group=C, Control photobiomodulation group = C+PBM, Behavioural control group = BC, Behavioural photobiomodulation control group=BC+PBM. Areas: Cingulate cortex= CG, Prelimbic cortex=PL, Infralimbic cortex=IL, Dorsal Striatum=STD, Accumbens Shell=AccSh, Accumbens Core=AccC, Medial Septum=MS, Lateral Septum= LS, Thalamus anterodorsal=AD, Thalamus anteromedial=AM, Thalamus anteroventral=AV, Basolateral Amygdala=BLA, Central Amygdala=CeA, Lateral Amygdala=LaA, field CA1 of hippocampus=CA1, field CA3 of hippocampus=CA3, Dentate Gyrus=DG, Supramammilar=SuM, Medial Medial Mammillary=MMM, Medial Lateral Mammillary=MML, Ventral Tegmental Area=VTA, Perirhinal cortex=PRh, Entorhinal cortex=ENT.

Finally, CCO units of C, BC and BC+PBM groups were contrasted to analyse more deeply the potential differences in their metabolic activity. Significant group differences in CCO activity were found in the prefrontal cortex (CG: $F_{2,16}=7.768$, $p=0.004$; PL: $F_{2,16}=5.857$, $p=0.012$; IL: $F_{2,16}=4.715$, $p=0.025$), dorsal and ventral striatum (STD: $F_{2,17}=22.243$, $p < 0.001$; AccC: $H_2=12.247$, $p=0.002$; AccSh: $H_2=12.121$, $p=0.002$), septum (MS: $F_{2,17}=14.117$, $p < 0.001$;

LS: $F_{2,17}=3.957$, $p=0.039$), ENT ($F_{2,17}=5.355$, $p=0.016$), hippocampus (CA1: $F_{2,16}=22.485$, $p<0.001$; CA3: $F_{2,16}=6.491$, $p<0.009$; DG: $F_{2,16}=3.860$, $p=0.043$), amygdala (BLA: $F_{2,17}=12.291$, $p<0.001$; CeA: $F_{2,17}=46.678$, $p<0.001$; LaA: $H_2=13.566$, $p=0.001$), thalamus (AD: $F_{2,17}=14.000$, $p<0.001$; AM: $H_2=7.898$, $p=0.019$; AV: $F_{2,17}=9.999$, $p=0.001$) and in mammillary nuclei (SuM: $F_{2,15}=23.280$, $p<0.001$; MMM: $F_{2,15}=4.753$, $p=0.025$; MML: $F_{2,15}=18.808$, $p<0.001$) but not in PRh ($F_{2,17}=2.957$, $p=0.079$) and VTA ($F_{2,15}=2.972$, $p=0.082$). The statistical analysis of pairwise differences between groups using the Holm-Sidak method showed an overall pattern of CCO activity increase in C group as compared to BC group in prefrontal cortex (CG: $t= 3.635$, $p=0.007$, PL: $t= 3.296$, $p=0.014$, IL: $t= 2.533$, $p=0.044$), dorsal and ventral striatum (STD: $t= 6.066$, $p<0.001$, AccC: $Q= 3.494$, $p<0.05$, AccSh: $Q= 3.313$, $p<0.05$), CA1 ($t= 3.732$, $p=0.004$), amygdala (BLA: $t= 2.612$, $p=0.036$; CeA: $t= 6.496$, $p<0.001$; LaA: $Q= 2.633$, $p<0.05$), AD ($t= 4.280$, $p=0.001$), AV ($t= 4.123$, $p=0.002$) and in mammillary nuclei (SuM: $t= 4.161$, $p=0.002$; MMM: $t= 2.822$, $p=0.038$; MML: $t= 5.936$, $p<0.001$).

In addition, C group showed greater CCO activity than BC+PBM group in CG ($t= 3.030$, $p=0.016$), IL ($t= 2.709$, $p=0.046$), STD ($t= 5.346$, $p<0.001$), AccSh ($Q= 2.530$, $p<0.05$), septum (MS: $t= 5.278$, $p<0.001$; LS: $t= 2.812$, $p=0.036$), ENT ($t= 3.018$, $p=0.023$), hippocampus (CA1: $t= 6.665$, $p<0.001$; CA3: $t= 3.521$, $p=0.008$; DG: $t= 2.666$, $p=0.050$), amygdala (BLA: $t= 4.951$, $p<0.001$; CeA: $t= 9.394$, $p<0.001$; LaA: $Q= 3.524$, $p<0.05$), thalamus (AD: $t= 4.785$, $p<0.001$; AM: $Q= 2.711$, $p<0.05$; AV: $t= 3.499$, $p=0.005$) and in mammillary nuclei (SuM: $t= 6.764$, $p<0.001$; MMM: $t= 2.487$, $p=0.050$; MML: $t= 4.304$, $p=0.001$).

Also, BC group showed higher CCO activity than BC+PBM group in MS ($t= 3.075$, $p=0.014$), ENT ($t= 2.560$, $p=0.040$), CA1 ($t= 2.826$, $p=0.012$), CA3 ($t= 2.481$, $p=0.049$), BLA ($t= 2.144$, $p=0.047$), CeA ($t= 2.529$, $p=0.022$), SuM ($t= 2.603$, $p=0.020$) (Table 1).

Table 1. Cytochrome oxidase activity of the selected brain regions in the studied groups (means and S.E.M.)

Regions	C	BC	BC+PBM
Prefrontal cortex			
Cingulate cortex	31,31 ± 1,48	* 24,62 ± 0,87	# 25,73 ± 1,43
Prelimbic cortex	30,57 ± 1,27	* 24,65 ± 1,44	26,21 ± 1,14
Infralimbic cortex	29,01 ± 0,95	* 24,80 ± 1,03	# 24,50 ± 1,57
Dorsal Striatum	35,84 ± 1,06	* 26,20 ± 0,74	# 27,68 ± 1,34
Ventral Striatum			
Accumbens Core	39,02 ± 0,89	* 28,14 ± 1,12	32,93 ± 1,84
Accumbens Shell	46,80 ± 1,31	* 33,19 ± 1,12	# 36,01 ± 1,65
Septum			
Medial septum	27,49 ± 1,31	23,99 ± 0,78	& # 18,58 ± 1,37
Lateral septum	33,39 ± 1,37	31,11 ± 1,07	# 28,61 ± 1,18
Perirhinal	27,87 ± 1,51	25,39 ± 1,23	22,73 ± 1,73
Entorhinal	27,63 ± 1,29	26,92 ± 1,75	& # 21,52 ± 1,40
Hippocampus			
CA1	25,23 ± 0,74	* 22,04 ± 0,48	& # 19,53 ± 0,52
CA3	26,57 ± 1,25	25,24 ± 0,79	& # 21,64 ± 0,75
Dentate gyrus	43,11 ± 2,05	37,17 ± 1,76	# 34,89 ± 2,73
Amygdala complex			
Basolateral n.	35,12 ± 0,94	* 30,76 ± 1,15	& # 27,19 ± 1,34
Central n.	34,32 ± 0,50	* 27,78 ± 0,62	& # 25,24 ± 0,89
Lateral n.	27,75 ± 0,50	* 23,53 ± 0,62	# 21,92 ± 1,02
Thalamus			
Anterodorsal thalamus	49,88 ± 2,00	* 39,05 ± 0,88	# 38,25 ± 1,95
Anteromedial thalamus	31,37 ± 1,11	26,11 ± 1,36	# 25,11 ± 2,13
Anteroventral thalamus	41,72 ± 1,73	* 32,70 ± 1,52	# 34,37 ± 1,27
Mammillary nuclei			
Supramammillary n.	31,20 ± 0,71	* 25,52 ± 1,01	& # 21,96 ± 1,09
Medial medial mamm. n.	30,39 ± 1,68	* 24,42 ± 0,52	# 25,13 ± 1,77
Medial lateral mamm. n.	29,82 ± 0,77	* 23,69 ± 0,50	# 25,37 ± 0,82
Ventral Tegmental area	22,67 ± 1,06	19,57 ± 1,18	18,85 ± 1,19

*: Significant differences between C and BC group ($p < 0.05$). #: Significant differences between C and BC+PBM group ($p < 0.05$). &: Significant differences between BC and BC+PBM group. Mamm=mammillary; n=nucleus; C=control group; BC=behavioural control group; BC+PBM=behavioural photobiomodulation control group.

4. Discussion

The present study aimed to evaluate the effects of PBM in a functionally active neural rat brain network during the execution of a reversal test. We found that after five days of PBM there was a reduction of CCO activity in some limbic regions that are involved in the execution of the reversal task (MS, ENT, CA1, CA3, CeA and SuM), along with higher levels in AccC.

Moreover, we also assessed the effect of this technique in control rats, without learning, and we found a decrease on the oxidative metabolic activity in striatum, medial septum, ENT, hippocampus, amygdala, thalamus nuclei, mammillary nuclei and VTA. Despite applying PBM on the first third of the head, this technique might show a systemic effect causing changes in CCO levels in remote regions through the transmission of its effect in the brain networks.

PBM uses near-infrared light to stimulate, heal and even regenerate damaged tissues and several physiological processes [6,32]. Studies have demonstrated that PBM can reverse apoptotic processes, promote the survival and longevity of the brain cells, leading to brain neuroprotection, and also stimulate angiogenesis [3,10]. It has also displayed photoaging effects and anti-tumor actions through the inhibition of cancer cell proliferation [3]. This breadth of changes is possible due to the absorption of the photons by the CCO which increases ATP levels and leads to numerous biological modifications [33]. However, it should be noted that all these results are dependent on the dose of light fluence applied, being between 600 and 1,200 nm, the higher range of penetration and absorption by the CCO [34].

PBM has been used not only as a treatment of several pathological conditions but also it has been applied to healthy subjects with no clinical symptoms to study its basal effects [35]. Therefore, some studies, such as the research carried out by Wang et al. [36] and Zomorodi et al. [37], have found that after the application of PBM in human population there is a rise of alpha, beta and gamma frequencies and a reduction of delta and theta frequencies of several brain networks, exhibiting a modulator effect of PBM on brain waves. Some studies have shown that theta rhythm is critical for hippocampal functions and the alteration of these oscillations could impair spatial and nonspatial memory and learning [38,39]. Therefore, several research lines have been focused on PBM's consequential effects during the execution of different tasks and they have found cognitive enhancements. Hence, PBM has reported improvements in human executive and mnemonic functions, in learning and attentional capacity [40–42]. Animal research has yielded similar results regarding improving memory and spatial performance and halting cognitive decline [43,44].

In our study, in experiment 1, we examined the effects of five days of 1,064nm PBM on the oxidative metabolic activity of basal control healthy rats. Results showed that, in contrast with the rats that did not receive the PBM treatment, the C+PBM group showed fewer levels of CCO in the striatum, medial septum, ENT, hippocampus, amygdala, thalamus nuclei, mammillary nuclei and VTA. Hence, according to other studies, PBM generated changes in the brain activity of healthy subjects. However, in experiment 2, we assessed the changes in CCO activity after the use of PBM in animals whose known brain networks have been activated by performing a memory task. CCO changes reflect modifications in neural metabolic activity because of learning processes [18]. It has been shown that after this learning there is a reduction in metabolic costs, increasing the efficiency of the areas involved in the task [21]. Furthermore, such pattern of reduction in brain activity has been also related to the difficulty of the task [17]. Similarly, we found that the BC+PBM group displayed lower CCO levels in several limbic areas that were involved in the execution of the memory tasks: MS, ENT, CA1, CA3, CeA, and SuM and higher levels in AccC in comparison with BC group. Therefore, hippocampal regions (CA1, CA3 and ENT) are strongly required for spatial learning [45,46] and they are connected with the SuM, via fornix [47]. The hippocampus also sends and receives afferences from the MS, structure that also send projections to the SuM, generating an active spatial network [46,47]. Conversely, we also found a reduction in the metabolic activity of the amygdala. This region could be linked to the emotional aspects of the task and the lower levels could display fewer levels of stress or anxiety in BC+PBM group [20]. So, the use of PBM could have made easier the execution of the task and could have decreased the metabolic activity of BC+PBM group enhancing the efficiency of this brain active network involved in the spatial memory task. Equivalent results were found by Méndez-López et al. [17]: they showed that there was a CCO activity reduction in several regions involved in a memory task along with, a behavioural improvement when the animals were submitted to only one more trial of this memory task. These results support the idea that an easier execution of the task could be related to the brain changes. Although the animals performed a reversal task that had high difficulty, they were submitted to eight trials after the transfer trial. The large number of trials was enough training to

perform the task correctly and such overtraining could explain why we did not observe behavioural differences between groups that obviously display the effect of PBM in brain active networks. Finally, in BC+PBM group we found a rise of CCO activity in AccC. This area is related to relief learning, the induction of positive emotional states due to the association of a neutral stimulus with the cessation of an aversive event [46,48]. Higher levels of CCO in this area could demonstrate that the BC+PBM group were attributing greater levels of reinforcement to the hidden platform and this could be increasing their seeking behaviours. These brain metabolic changes found by the use of PBM, might explain the marginal difference found in the behavioural tasks because, despite the accurate execution of both groups in the reference memory and reversal task, BC+PBM group displayed a significant latency reduction between day 1 and 4 while BC group remained invariable during all days.

Finally, considering these results, we compared the oxidative metabolic activity of C, BC and BC+PBM groups. Results showed that there was a similar pattern of CCO reduction in BC group compared with C group in several limbic areas: prefrontal regions, striatum, CA1, amygdala, AD, AV and mammillary nuclei. Similarly, BC+PBM group also displayed lower levels of CCO compared with C group but in this case, we found a different pattern of CCO reductions that involve a larger number of limbic regions: prefrontal regions, STD, AccSh, septum, ENT, hippocampus, amygdala, thalamus and mammillary nuclei. As described above, all these regions are distinctly involved in spatial memory, therefore, groups that performed and learned the behavioural tasks showed fewer levels of CCO. Moreover, the BC+PBM group displayed more differences with C group than BC group, showing that PBM prompts changes in many regions involved in the task, making them more efficient and reducing the metabolic cost. Lastly, we found that BC+PBM displayed less CCO levels in MS, ENT, CA1, CA3, BLA and SuM than BC group. This confirms our hypothesis with regards to the effects of PBM on active networks: PBM made the task easier and decreased metabolic activity in the limbic system that was active in the execution of the spatial memory task. In further research, it could be also useful to examine the effects of this technique during the execution of other behavioural tests

that entails other types of learning to elucidate the effects of PBM in diverse active brain networks.

5. Conclusions

The results of the present study show the effects of PBM on brain networks of healthy control rats and on brain networks that were active during the execution of a reversal memory task. Oxidative metabolic activity was evaluated using CCO histochemistry and showed that control rats that received PBM therapy showed less CCO levels in the striatum, medial septum, ENT, hippocampus, amygdala, thalamus nuclei, mammillary nuclei and VTA. Conversely, the administration of PBM in rats that performed a reversal memory task, resulted in lower levels of CCO in several limbic areas that were involved in the execution of the task (MS, ENT, CA1, CA3, CeA, and SuM) and higher levels in AccC, along with a slight difference in scape latencies. These results could show the differential effect of PBM on active brain networks but further studies are necessary to elucidate its effects in different brain networks that are involved in the execution of other memory tasks.

Acknowledgements

We thank AINDACE Foundation (Ayuda a la Investigación del Daño y Enfermedades Cerebrales).

Financial Support

This work was supported by Projects Grants of the MINECO (Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España) PSI2017-83893-R, PSI2017-90806-REDT, and MCIU-19-PRE2018-086220 to A.G.M.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest to disclose.

References

- [1] F. Salehpour, S. Gholipour-Khalili, F. Farajdokht, F. Kamari, T. Walski, M.R. Hamblin,

- J.O. DiDuro, P. Cassano, Therapeutic potential of intranasal photobiomodulation therapy for neurological and neuropsychiatric disorders: a narrative review, *Rev. Neurosci.* 31 (2019) 269–286. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2019-0063>.
- [2] R. Meynaghizadeh-Zargar, S. Sadigh-Eteghad, G. Mohaddes, F. Salehpour, S.H. Rasta, Effects of transcranial photobiomodulation and methylene blue on biochemical and behavioral profiles in mice stress model, *Lasers Med. Sci.* (2019). <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02851-z>.
- [3] R.A. Musstaf, D.F.L. Jenkins, A.N. Jha, Assessing the impact of low level laser therapy (LLLT) on biological systems: a review, *Int. J. Radiat. Biol.* 95 (2019) 120–143. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1524944>.
- [4] M. De Oliveira, C.P. Soares, Transcranial Photobiomodulation in The Treatment of Major Depression Abstract, *Clin. Psychiatry.* (2019) 1–5. <https://doi.org/10.21767/2471-9854.100057>.
- [5] S.M.V. Prasad, T.R. Prasanna, V. Kumaran, N. Venkatachalam, M. Ramees, E.A. Abraham, Low-level laser therapy: A noninvasive method of relieving postactivation orthodontic pain-a randomized controlled clinical trial, *J. Pharm. Bioallied Sci.* (2019). https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_303_18.
- [6] F. Salehpour, M.R. Hamblin, Photobiomodulation for Parkinson's disease in animal models: A systematic review, *Biomolecules.* 10 (2020) 1–19. <https://doi.org/10.3390/biom10040610>.
- [7] M.R. Hamblin, Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation, *AIMS Biophys.* 4 (2017) 337–361. <https://doi.org/10.3934/biophy.2017.3.337>.
- [8] M. Hamblin, H. Abrahamse, Factors Affecting Photodynamic Therapy and Anti-Tumor Immune Response., *Anticancer. Agents Med. Chem.* 20 (2020).

<https://doi.org/10.2174/1871520620666200318101037>.

- [9] G. Litscher, Brain Photobiomodulation—Preliminary Results from Regional Cerebral Oximetry and Thermal Imaging, *Medicines*. 6 (2019) 11.
<https://doi.org/10.3390/medicines6010011>.
- [10] M.R. Hamblin, Mechanisms of photobiomodulation in the brain, in: *Photobiomodulation in the Brain*, Elsevier, 2019: pp. 97–110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815305-5.00008-7>.
- [11] F. Salehpour, J. Mahmoudi, F. Kamari, S. Sadigh-Eteghad, S.H. Rasta, M.R. Hamblin, Brain Photobiomodulation Therapy: a Narrative Review, *Mol. Neurobiol.* 55 (2018) 6601–6636. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0852-4>.
- [12] L. Lim, M.R. Hamblin, Can the Vielight X-Plus be a Therapeutic Intervention for COVID-19 Infection ?, (2020) 1–13.
- [13] H.H. Buzzá, A.C. Zangirolami, C. Kurachi, S. Vanderlei, Acceleration of Newborn Rats Revelopment with the use of photobiomodulation and the near possibility of application in human premature babies, *J. Biophotonics*. (2019).
<https://doi.org/doi.org/10.1002/jbio.201800461>.
- [14] Y. Yang, Y. Zong, Q. Sun, Y. Jia, R. Zhao, White light emitting diode suppresses proliferation and induces apoptosis in hippocampal neuron cells through mitochondrial cytochrome c oxydase-mediated IGF-1 and TNF- α pathways, *Free Radic. Biol. Med.* 113 (2017) 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.382>.
- [15] W. Xuan, L. Huang, M.R. Hamblin, Repeated transcranial low-level laser therapy for traumatic brain injury in mice: biphasic dose response and long-term treatment outcome, *J. Biophotonics*. 9 (2016) 1263–1272. <https://doi.org/10.1002/jbio.201500336>.
- [16] P. Cassano, M.A. Caldieraro, R. Norton, D. Mischoulon, N.H. Trinh, M. Nyer, C. Dording, M.R. Hamblin, B. Campbell, D. V. Iosifescu, Reported Side Effects, Weight

- and Blood Pressure, after Repeated Sessions of Transcranial Photobiomodulation, Photobiomodulation, Photomedicine, Laser Surg. 37 (2019) 651–656.
<https://doi.org/10.1089/photob.2019.4678>.
- [17] M. Méndez-López, M. Méndez, A. Begega, J.L. Arias, Spatial short-term memory in rats: Effects of learning trials on metabolic activity of limbic structures, *Neurosci. Lett.* 483 (2010) 32–35. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.07.054>.
- [18] J.T. Sakata, D. Crews, F. Gonzalez-Lima, Behavioral correlates of differences in neural metabolic capacity, *Brain Res. Rev.* 48 (2005) 1–15.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.07.017>.
- [19] A. Poremba, D. Jones, F. Gonzalez-Lima, Functional Mapping of Learning-Related Metabolic Activity with Quantitative Cytochrome Oxidase Histochemistry, in: *Cytochrome Oxidase Neuronal Metab. Alzheimer's Dis.*, 1998: pp. 109–144.
https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9936-1_4.
- [20] N.M. Conejo, H. González-Pardo, F. Gonzalez-Lima, J.L. Arias, Spatial learning of the water maze: Progression of brain circuits mapped with cytochrome oxidase histochemistry, *Neurobiol. Learn. Mem.* 93 (2010) 362–371.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.12.002>.
- [21] M. Méndez-López, M. Méndez, L. López, J.L. Arias, Spatial working memory learning in young male and female rats: Involvement of different limbic system regions revealed by cytochrome oxidase activity, *Neurosci. Res.* 65 (2009) 28–34.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.05.001>.
- [22] I.R. Olson, H. Rao, K.S. Moore, J. Wang, J.A. Detre, G.K. Aguirre, Using perfusion fMRI to measure continuous changes in neural activity with learning, *Brain Cogn.* 60 (2006) 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2005.11.010>.
- [23] E.W. Gobel, T.B. Parrish, P.J. Reber, Neural correlates of skill acquisition: Decreased

- cortical activity during a serial interception sequence learning task, *Neuroimage*. 58 (2011) 1150–1157. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.06.090>.
- [24] H. El Khoury, J. Mitrofanis, L.A. Henderson, Exploring the Effects of Near Infrared Light on Resting and Evoked Brain Activity in Humans Using Magnetic Resonance Imaging, *Neuroscience*. 422 (2019) 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.10.037>.
- [25] C. Fidalgo, N.M. Conejo, H. González-Pardo, J.L. Arias, Cortico-limbic-striatal contribution after response and reversal learning: a metabolic mapping study, *Brain Res*. 1368 (2011) 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.10.066>.
- [26] M. Banqueri, C. Zorzo, A. Gutiérrez-Menéndez, S.G., Higarza, J.L., Arias, M. Méndez, c-Fos and its use in memory research: spatial navigation, in: A. Costa, E. Villalba (Eds), *Horizons in Neuroscience Research*, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2020, pp. 1-54.
- [27] V.F. Prado, H. Janickova, M.A. Al-Onaizi, M.A.M. Prado, Cholinergic circuits in cognitive flexibility, *Neuroscience*. 345 (2017) 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.09.013>.
- [28] A. Izquierdo, J.L. Brigman, A.K. Radke, P.H. Rudebeck, A. Holmes, The neural basis of reversal learning: An updated perspective, *Neuroscience*. 345 (2017) 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.021>.
- [29] M. Banqueri, J.A. Martínez, M.J. Prieto, S. Cid-Duarte, M. Méndez, J.L. Arias, Photobiomodulation rescues cognitive flexibility in early stressed subjects, *Brain Res*. (2019) 146300. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146300>.
- [30] F. Gonzalez-Lima, A. Cada, Cytochrome oxidase activity in the auditory system of the mouse: A qualitative and quantitative histochemical study, *Neuroscience*. 63 (1994) 559–578. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90550-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90550-9).

- [31] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition* by, 2007.
- [32] M.R. Hamblin, S.T. Nelson, J.R. Strahan, Photobiomodulation and Cancer: What Is the Truth?, *Photomed. Laser Surg.* 36 (2018) 241–245.
<https://doi.org/10.1089/pho.2017.4401>.
- [33] A.E. Saltmarche, M.A. Naeser, K.F. Ho, M.R. Hamblin, L. Lim, Significant Improvement in Cognition in Mild to Moderately Severe Dementia Cases Treated with Transcranial Plus Intranasal Photobiomodulation: Case Series Report, *Photomed. Laser Surg.* 35 (2017) 432–441. <https://doi.org/10.1089/pho.2016.4227>.
- [34] J.D. Carroll, *Light sources and dosimetry for the brain and whole body*, Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815305-5.00007-5>.
- [35] M.R. Hamblin, Shining light on the head: Photobiomodulation for brain disorders, *BBA Clin.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.09.002>.
- [36] X. Wang, J. Dmochowski, M. Husain, F. Gonzalez-Lima, H. Liu, Proceedings #18. Transcranial Infrared Brain Stimulation Modulates EEG Alpha Power, *Brain Stimul.* 10 (2017) e67–e69. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2017.04.111>.
- [37] R. Zomorodi, G. Loheswaran, A. Pushparaj, L. Lim, Pulsed Near Infrared Transcranial and Intranasal Photobiomodulation Significantly Modulates Neural Oscillations: a pilot exploratory study, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42693-x>.
- [38] T. Shuman, B. Amendolara, P. Golshani, Theta rhythmopathy as a cause of cognitive disability in TLE, *Epilepsy Curr.* 17 (2017) 107–111. <https://doi.org/10.5698/1535-7511.17.2.107>.
- [39] M.E. Hasselmo, C.E. Stern, Theta rhythm and the encoding and retrieval of space and time, *Neuroimage.* 85 (2014) 656–666.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.06.022>.
- [40] N.J. Blanco, W.T. Maddox, F. Gonzalez-Lima, Improving executive function using

- transcranial infrared laser stimulation, *J. Neuropsychol.* 11 (2017) 14–25.
<https://doi.org/10.1111/jnp.12074>.
- [41] F. Gonzalez-Lima, D. Barrett, C. Saucedo, C. Alexander, H. Liu, A. Haley, Transcranial Photobiomodulation in Healthy Subjects: Cognitive Enhancement, *Biol. Psychiatry.* 85 (2019) S80–S81. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.03.208>.
- [42] A. Jahan, M.A. Nazari, J. Mahmoudi, F. Salehpour, M.M. Salimi, Transcranial near-infrared photobiomodulation could modulate brain electrophysiological features and attentional performance in healthy young adults, *Lasers Med. Sci.* 34 (2019) 1193–1200. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-02710-3>.
- [43] S. Michalikova, A. Ennaceur, R. van Rensburg, P.L. Chazot, Emotional responses and memory performance of middle-aged CD1 mice in a 3D maze: Effects of low infrared light, *Neurobiol. Learn. Mem.* 89 (2008) 480–488. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.07.014>.
- [44] F. Salehpour, F. Farajdokht, M. Erfani, S. Sadigh-Eteghad, S.S. Shotorbani, M.R. Hamblin, P. Karimi, S.H. Rasta, J. Mahmoudi, Transcranial near-infrared photobiomodulation attenuates memory impairment and hippocampal oxidative stress in sleep-deprived mice, *Brain Res.* 1682 (2018) 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.12.040>.
- [45] N.M. Conejo, H. González-Pardo, G. Vallejo, J.L. Arias, Changes in brain oxidative metabolism induced by water maze training, *Neuroscience.* 145 (2007) 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.11.057>.
- [46] M. Banqueri, M. Méndez, J.L. Arias, Spatial memory-related brain activity in normally reared and different maternal separation models in rats, *Physiol. Behav.* 181 (2017) 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.09.007>.
- [47] J.P. Aggleton, S.M. O'Mara, S.D. Vann, N.F. Wright, M. Tsanov, J.T. Erichsen,

Hippocampal-anterior thalamic pathways for memory: Uncovering a network of direct and indirect actions, *Eur. J. Neurosci.* 31 (2010) 2292–2307.

<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07251.x>.

- [48] J.R. Bergado Acosta, E. Kahl, G. Kogias, T.C. Uzuneser, M. Fendt, Relief learning requires a coincident activation of dopamine D1 and NMDA receptors within the nucleus accumbens, *Neuropharmacology*. 114 (2017) 58–66.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.11.022>.

Journal Pre-proof

5 Resultados

Adicionalmente a los resultados de las publicaciones presentadas en la presente tesis doctoral correspondientes a los estudios I (Publicación 2) y III (Publicación 4) del bloque I y el estudio I (Publicación 3) del bloque II, a continuación, se presentarán nuevos resultados suplementarios obtenidos en el bloque I realizados con sujetos jóvenes que completarán los objetivos descritos.

5.1 Bloque I: estudio II (Objetivo 3)

El análisis de la densidad de células gliales (astrocitos y microglía) en sujetos machos jóvenes mostró la ausencia de diferencias significativas en la densidad de astrocitos en CG ($F_{2,15}=1,239$, $p=,318$), PL ($H_2=3,263$, $p=,196$) y IL ($F_{2,15}=,710$, $p=,507$) (Figura 18A). Mismos resultados fueron encontrados en el caso de la densidad de la microglía con ausencia de diferencias entre los grupos en las regiones de interés (CG: $F_{2,15}=1,051$, $p=,374$, PL: $F_{2,15}=,461$, $p=,639$ y IL: $F_{2,15}=,412$, $p=,670$) (Figura 18B).

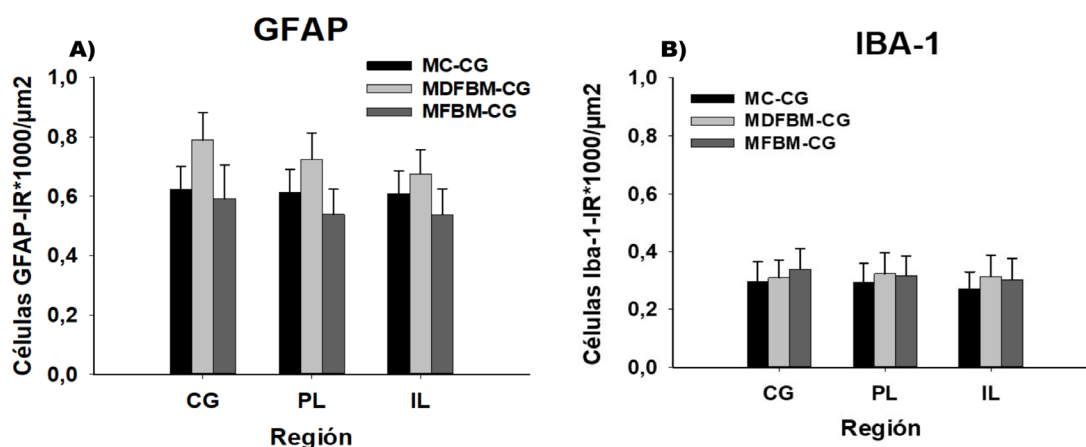


Figura 18. Resultados de la densidad de células gliales en los grupos de machos jóvenes (PND29) en las regiones de interés (Medía ± EEM). A. Número de células GFAP-IR *1000/μm². No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la densidad de astrocitos las regiones de interés ($p>,05$). B. Número de células Iba-1-IR *1000/ μm². No se encontraron diferencias estadísticamente relevantes entre los grupos en la densidad de microglía en las regiones de interés ($p>,05$). CG, corteza cingulada; PL, corteza prelímbica; IL, corteza infralímbica. Grupos: MC-CG, grupo control; MFBM-CG, grupo radiado; MDFBM-CG, grupo sometido a las mismas contingencias experimentales que el grupo radiado, pero, con el dispositivo apagado.

5.2 Bloque I: estudios IV y V (Objetivo 5)

El análisis de los resultados de los estudios IV y V (Objetivo 5), cuenta con la evaluación de la ejecución en el protocolo de memoria de referencia espacial. Las latencias de escape de los grupos de machos MDFBM-MR y MFBM-MR mostraron ausencia de diferencias significativas en la interacción *grupo x día* ($F_{5,114}=,770$, $p=,574$) y en el factor *grupo* ($F_{1,114}=2,414$, $p=,123$). Sin embargo, el factor *día* resultó significativo ($F_{5,114}=12,133$, $p<,001$) encontrándose en las comparaciones *post hoc* diferencias entre el día 1 con el día 3 ($t= 3,021$, $p=,028$) día 4 ($t= 4,350$, $p<,001$), día 5 ($t= 6,321$, $p<,001$) y día 6

($t= 5,898, p<,001$), entre el día 2 con el día 5 ($t= 4,674, p<,001$) y el día 6 ($t= 4,251, p<,001$), y finalmente, entre el día 3 con los días 5 ($t= 3,300, p=,013$) y 6 ($t= 2,877, p=,038$), existiendo una reducción de las latencias con el transcurso de los días (Figura 19).

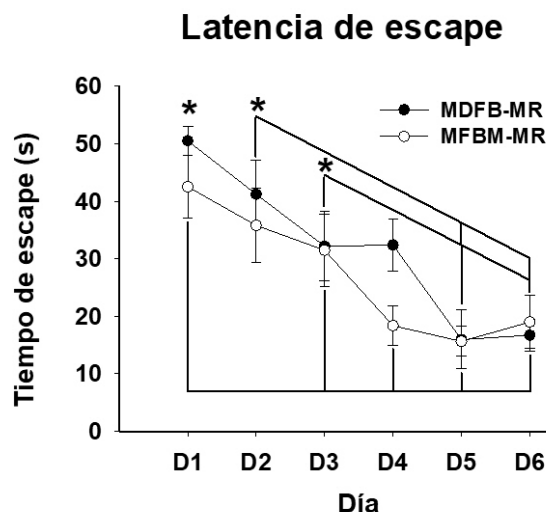


Figura 19. Latencias de escape de los grupos de machos jóvenes (PND24-PND29) durante el protocolo de referencia espacial difícil (dos ensayos/día) (Medía \pm EEM). Existe una reducción en las latencias de escape en ambos grupos a lo largo del transcurso de los días (* $p<,05$). El eje x muestra los días. Grupos: MFBM-MR, grupo radiado con FBM simultáneo a la ejecución del protocolo conductual; MDFB-MR, grupo sometido a las mismas contingencias experimentales que el grupo radiado, pero con el dispositivo apagado.

En cuanto a la permanencia en los cuadrantes, el grupo MDFB-MR presentó diferencias significativas en la interacción *día x cuadrante* ($F_{12,135}=5,089, p<,001$) y en el factor *cuadrante* ($F_{3,135}=17,903, p<,001$) mientras que el factor *día* no fue estadísticamente relevante. Los análisis de comparaciones múltiples mostraron diferencias entre el cuadrante C y el resto de los cuadrantes A ($t= 2,658, p=,035$), B ($t= 4,181, p<,001$) y D ($t= 2,775, p=,031$) en el día 1; entre el cuadrante C y los cuadrantes A ($t= 3,440, p=,004$) y B ($t= 3,587, p=,003$) en el segundo día de la prueba, entre el cuadrante C y el cuadrante B ($t= 2,615, p=,039$) el tercer día junto con la existencia de diferencias entre el cuadrante D y el cuadrante A ($t=3,415, p=,004$) y B ($t= 4,652, p<,001$). Finalmente, en los días restantes de protocolo, día 4, 5 y 6, se encontraron diferencias significativas entre el cuadrante D y el resto de cuadrantes (Día 4: A: $t= 3,886, p<,001$, B: $t= 4,412, p<,001$ y C: $t= 2,532, p=,049$; día 5: A: $t= 4,491, p<,001$, B: $t= 4,040, p<,001$ y C: $t= 3,279, p=,005$ y día 6: A: $t= 7,424, p<,001$, B: $t= 4,746, p<,001$ y C: $t= 5,222, p<,001$), existiendo también, el último día, diferencias entre el cuadrante B y el cuadrante A ($t= 2,677, p=,025$). Los animales del grupo MDFB-MR, por tanto, alcanzan el criterio de aprendizaje en el cuarto día de entrenamiento (Figura 20A). Por otro lado, respecto al grupo MFBM-MR, se encontró que, al igual que en el grupo MDFB-MR, el factor *cuadrante* ($F_{3, 150}=24,882,$

$p < ,001$) y la interacción *día x cuadrante* ($F_{15,150}=8,174, p < ,001$) eran estadísticamente significativos mientras que el factor *día* no lo era ($F_{5,150}=,848, p = ,523$). Los análisis *post hoc* mostraron diferencias significativas entre el cuadrante C y el cuadrante A ($t = 2,642, p = ,036$), B ($t = 4,034, p < ,001$) y D ($t = 4,472, p < ,001$) en el primer día de entrenamiento, entre el cuadrante C y el cuadrante B ($t = 3,021, p = ,017$) en el segundo día y entre el cuadrante D y el cuadrante A ($t = 3,068, p = ,012$) y B ($t = 3,608, p = ,002$) en el tercer día, junto con diferencias entre el cuadrante C y el cuadrante B ($t = 2,732, p = ,028$). Finalmente, los tres días restantes (día 4, 5 y 6) se encontraron diferencias significativas únicamente entre el cuadrante D con el resto de los cuadrantes (Día 4: A: $t = 5,383, p < ,001$, B: $t = 4,737, p < ,001$ y C: $t = 3,681, p = ,001$; día 5: A: $t = 7,131, p < ,001$, B: $t = 6,660, p < ,001$ y C: $t = 6,038, p = ,005$ y día 6: A: $t = 7,675, p < ,001$, B: $t = 5,483, p < ,001$ y C: $t = 5,483, p < ,001$), alcanzando el criterio de aprendizaje, al igual que el grupo MDFBM-MR, el cuarto día de entrenamiento (Figura 20B).

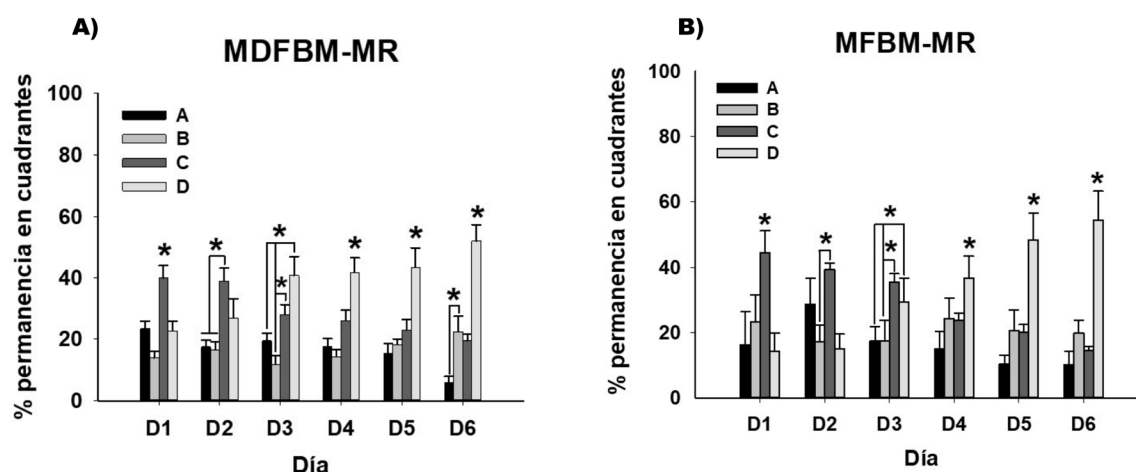


Figura 20. Permanencia de los grupos de machos en cada cuadrante (A, B, C, D) durante el protocolo de referencia espacial difícil (dos ensayos/día) (Media \pm EEM). **A.** Permanencia del grupo sometido a las mismas contingencias experimentales que el grupo radiado, pero con el dispositivo apagado (PND24-PND28). Alcanzan el criterio de aprendizaje en el cuarto día de prueba ($* p < ,05$). **B.** Permanencia del grupo sometido a FBM (PND24-PND28). Al igual que el otro grupo, alcanzan el criterio de aprendizaje en el cuarto día ($* p < ,05$). El eje *x* muestra los días. Cuadrante reforzado: cuadrante D.

Dada la mejora conductual hallada en el grupo de machos jóvenes en el estudio IV con respecto al estudio III presentado en la publicación 4, se decidió examinar en profundidad las diferencias en la permanencia en la zona periférica a lo largo de los días. Así pues, los análisis mostraron diferencias significativas en el factor *grupo* ($F_{1,95}=4,936, p = ,039$) y en el factor *día* ($F_{5,95}=16,522, p < ,001$), mientras que la interacción *grupo x día* ($F_{5,95}=1,822, p = ,112$) no fue estadísticamente relevante. Los análisis de comparaciones múltiples mostraron una mayor permanencia del grupo MDFBM-MR en la zona periférica ($t = 2,222, p = ,039$) y diferencias entre el día 1 con el día 3 ($t = 3,463, p = ,007$), día 4 ($t = 6,138, p < ,001$), día 5 ($t = 7,878, p < ,001$) y día 6 ($t = 6,076, p < ,001$), entre el día 2 con el día 4

Resultados

($t=3,513, p=,007$), día 5 ($t=5,252, p<,001$) y día 6 ($t=3,450, p=,007$) y, finalmente, entre el día 3 con el día 5 ($t=4,415, p<,001$) (Figura 21A). Finalmente, se evaluaron las diferencias en la permanencia en la zona periférica y en la zona central en el último día de prueba (día sexto), entre los diferentes grupos. Los resultados mostraron la ausencia de diferencias significativas en la interacción *zona x grupo* ($F_{1,38}=1,787, p=,189$) y en el factor *grupo* ($F_{1,38}=1,578E^{-030}, p=1,00$) existiendo, sin embargo, diferencias en el factor *zona* ($F_{1,38}=11,337, p=,002$). Las comparaciones a posteriori manifestaron una mayor permanencia en la zona periférica ($t=3,367, p=,002$) en comparación con la zona central (Figura 21B).

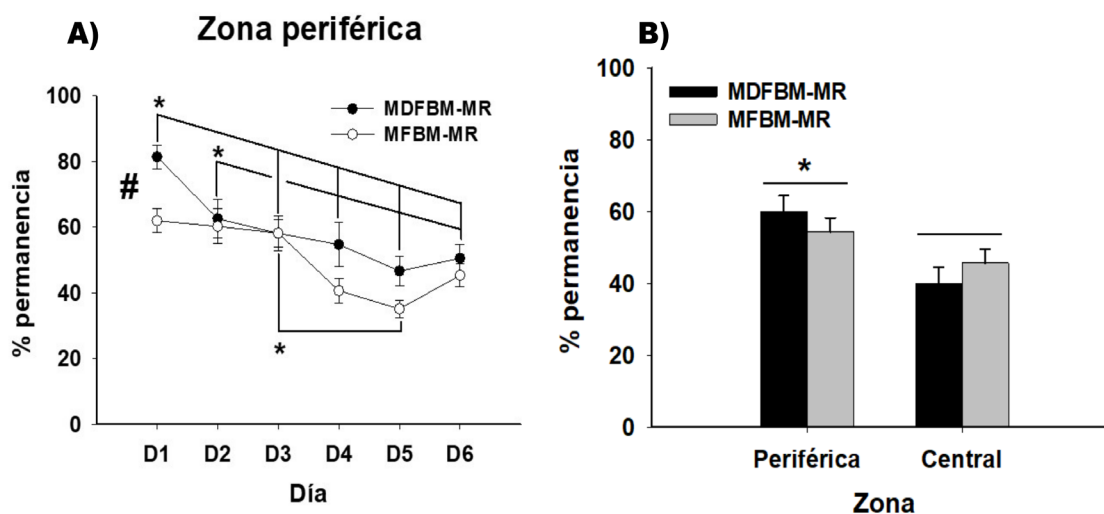


Figura 21. Porcentaje de permanencia de los grupos de machos en la zona periférica y en la zona central durante el protocolo de referencia espacial difícil (dos ensayos/día) (Medía ± EEM). **A.** Porcentaje de permanencia en la zona periférica a lo largo de los días de prueba. Se encontró una mayor permanencia por parte del grupo MDFBM-MR (# $p<,05$), junto con una disminución de permanencia en dicha zona por parte de ambos grupos a medida que avanzaban los días de entrenamiento (* $p<,05$). **B.** Porcentaje de permanencia en la zona periférica y en la zona central en los ensayos del último día de prueba (sexto día). Se encontró una mayor permanencia en la zona periférica por parte de ambos grupos (* $p<,05$). Grupos: MFBM-MR, grupo radiado con FBM simultáneo a la ejecución del protocolo conductual; MDFBM-MR, grupo sometido a las mismas contingencias experimentales que el grupo radiado, pero con el dispositivo apagado.

Por otro lado, los resultados conductuales de las hembras jóvenes en el protocolo de memoria de referencia espacial mostraron, en primer lugar, diferencias significativas en el análisis de las latencias de escape en el factor *día* ($F_{5,110}=11,759, p<,001$) pero no en la interacción *día x grupo* ($F_{5,110}=2,052, p=,077$) ni en el factor *grupo* ($F_{1,110}=0,086, p=,772$). Las comparaciones múltiples realizadas a posteriori mostraron diferencias entre el primer día con el día 5 ($t=4,131, p<,001$) y el día 6 ($t=5,353, p<,001$), entre el día 2 con el día 4 ($t=3,233, p=,016$), día 5 ($t=5,160, p<,001$) y día 6 ($t=6,382, p<,001$), entre el tercer y el sexto día ($t=3,985, p=,001$) y, finalmente, entre el cuarto día y el último

día ($t=3,149, p=,019$), encontrándose una remarcada reducción de la latencia en ambos grupos a medida que avanzaba el protocolo (Figura 22).

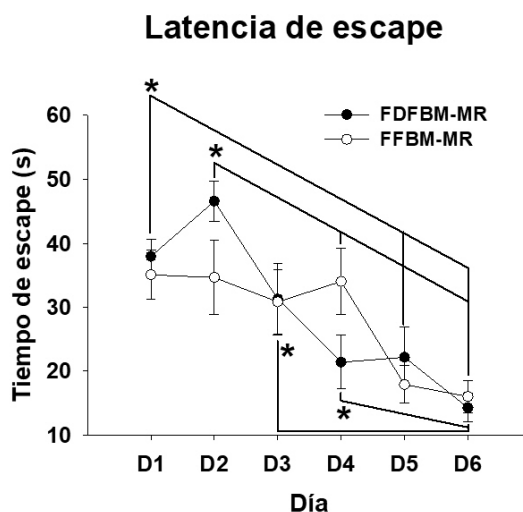


Figura 22. Latencias de escape de los grupos de hembras jóvenes (PND24-PND29) durante el protocolo de referencia espacial difícil (dos ensayos/día) (Medía \pm EEM). Existe una reducción en las latencias de escape en ambos grupos a lo largo del transcurso de los días (* $p<,05$). El eje x muestra los días. Grupos: FFBM-MR, grupo radiado con FBM simultáneo a la ejecución del protocolo conductual; FDFBM-MR, grupo sometido a las mismas contingencias experimentales que el grupo radiado, pero con el dispositivo apagado.

Finalmente, en cuanto a la permanencia en los cuadrantes, el grupo FDFBM-MR mostró diferencias significativas en la interacción *día x cuadrante* ($F_{15,147}=2,176, p=,009$) y en el factor *cuadrante* ($F_{3,147}=28,690, p<,001$) junto con ausencia de diferencias en el factor *día* ($F_{5,147}=0,540, p=,745$). Los análisis de comparaciones múltiples *post hoc* indicaron diferencias entre el cuadrante D y el cuadrante B ($t=2,714, p=,043$) en el primer día, entre el cuadrante B y el resto de los cuadrantes en el segundo día (A: $t=2,527, p=,049$, C: $t=2,843, p=,025$ y D: $t=3,699, p=,002$) y entre el cuadrante D y el cuadrante A en el día 3 ($t=2,821, p=,032$). Finalmente, el resto de los días se encontraron diferencias significativas en la permanencia en el cuadrante D en comparación con el resto de los cuadrantes (Día 4: A: $t=4,216, p<,001$, B: $t=5,471, p<,001$ y C: $t=3,590, p=,002$; día 5: A: $t=3,426, p=,003$, B: $t=6,156, p<,001$ y C: $t=3,986, p<,001$ y día 6: A: $t=5,453, p<,001$, B: $t=5,843, p<,001$ y C: $t=4,298, p<,001$) con la excepción de diferencias adicionales entre el cuadrante A y el cuadrante B en el quinto día ($t=2,730, p=,021$). El grupo FDFBM-MR alcanzó, por tanto, el criterio de aprendizaje en el día 4 de protocolo (Figura 23A). En cuanto al grupo FFBM-MR sometido a radiación, este presentó diferencias significativas en la interacción *día x cuadrante* ($F_{15,164}=6,413, p<,001$) pero también en los factores *cuadrante* ($F_{3,164}=22,396, p<,001$) y *día* ($F_{5,164}=3,892, p=,004$). Las comparaciones múltiples realizadas a posteriori en la interacción revelaron diferencias significativas entre el cuadrante B y el cuadrante A ($t=2,857, p=,024$) y C ($t=3,184, p=,010$) en el primer día, entre el cuadrante B y el

cuadrante C ($t= 3,915, p<,001$) y D ($t= 3,066, p=,013$) en el segundo día y entre el cuadrante C y el cuadrante A ($t= 2,913, p=,016$) y B ($t= 2,780, p=,018$) y el cuadrante D con el cuadrante A ($t= 3,607, p=,002$) y B ($t= 3,478, p=,003$) en el tercer día. En los tres días restantes, se encontraron únicamente diferencias significativas entre el cuadrante D y el resto de los cuadrantes (Día 4: A: $t= 5,957, p<,001$, B: $t= 5,519, p<,001$ y C: $t= 4,333, p<,001$; día 5: A: $t= 5,766, p<,001$, B: $t= 6,826, p<,001$ y C: $t= 5,242, p<,001$ y día 6: A: $t= 6,647, p<,001$, B: $t= 6,587, p<,001$ y C: $t= 5,510, p<,001$), alcanzando el criterio de éxito, al igual que el grupo FDFBM-MR, en el cuarto día de prueba (Figura 23B).

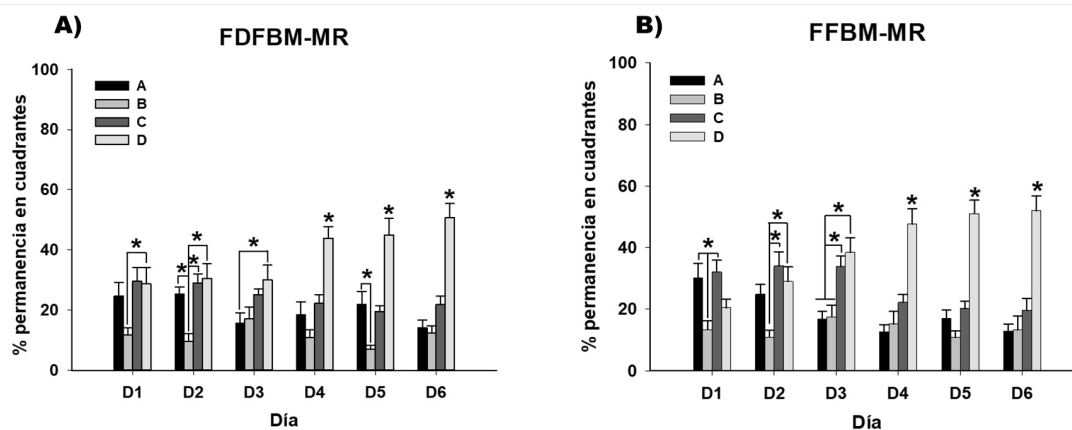


Figura 23. Permanencia de los grupos de hembras en cada cuadrante (A, B, C, D) durante el protocolo de referencia espacial difícil (dos ensayos/día) (Media \pm EEM). A. Permanencia del grupo sometido a las mismas contingencias experimentales que el grupo radiado, pero con el dispositivo apagado (PND24-PND28). Alcanzan el criterio de aprendizaje en el día 4 del protocolo conductual (* $p<,05$). B. Permanencia del grupo sometido a FBM (PND24-PND28). El grupo radiado alcanza también el criterio de aprendizaje en el cuarto día (* $p<,05$). El eje x muestra los días. Cuadrante reforzado: cuadrante D.

Tras la evaluación conductual se realizó el análisis de la actividad metabólica oxidativa cerebral. En este caso, tanto en el grupo de machos como en el de hembras, se incorporó un grupo de cada sexo que actuaba como control negativo de la técnica utilizada. Así pues, en el grupo de machos jóvenes se encontraron diferencias significativas entre los grupos en los núcleos talámicos cuantificados (AD: $F_{2,28}= 4,417, p=,022$; AV: $F_{2,28}= 7,180, p=,003$ y AM: $F_{2,28}= 5,420, p=,010$) donde el grupo MC presentaba una mayor actividad que el resto de los grupos en el núcleo AD (MDFBM-MR: $t= 2,363, p=,050$ y MFBM-MR: $t= 2,758, p=,030$) y una mayor actividad que el grupo radiado en los núcleos AV ($t= 3,786, p=,002$) y AM ($t= 3,290, p=,008$) (Figura 24D). También se encontraron diferencias significativas en las subregiones hipocámpales CA1 ($F_{2,28}= 3,974, p=,030$), CA3 ($F_{2,28}= 5,194, p=,012$) y DG ($F_{2,28}= 3,882, p=,033$) donde el grupo MC presentaba, en todas ellas, una mayor actividad metabólica que el grupo MFBM-MR (CA1: $t= 2,799, p=,027$; CA3: $t= 3,210, p=,010$ y DG: $t= 2,781, p=,028$) (Figura 24F). El resto de las regiones cuantificadas no presentaron diferencias significativas entre los grupos (MO: $H_2=2,403, p=,301$; VO: $F_{2,27}=,297, p=,745$; LO: $F_{2,27}=,738, p=,488$; DLO:

$F_{2,27}=,733, p=,490$; ACG: $F_{2,28}=,430, p=,655$; APL: $F_{2,28}=,671, p=,519$; PCG: $F_{2,28}=,578, p=,568$; PPL: $F_{2,28}=,125, p=,883$; IL: $F_{2,28}=,558, p=,579$; STD: $F_{2,28}=2,157, p=,135$; ACCC: $F_{2,28}=2,043, p=,148$; ACSH: $F_{2,28}=2,494, p=,101$; CeA: $F_{2,24}=1,720, p=,200$; LaA: $F_{2,24}=3,252, p=,056$; BLA: $F_{2,24}=3,379, p=,051$; RSG: $F_{2,28}=2,354, p=,114$ y RSA: $H_2=5,157; p=,076$) (Figura 24).

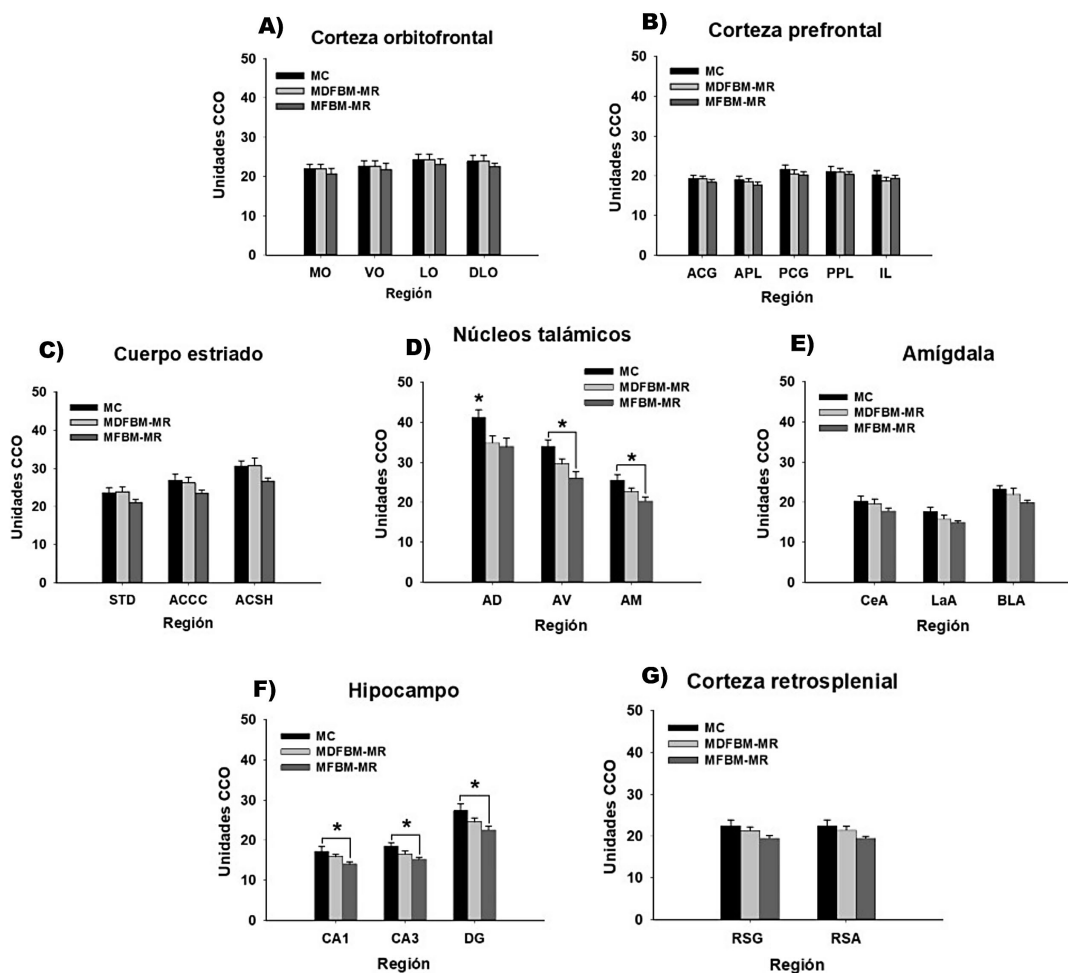


Figura 24. Resultados de la actividad metabólica oxidativa cerebral en los grupos de machos jóvenes (PND29) en las regiones de interés (Media ± EEM). Únicamente se encuentran diferencias significativas en los núcleos talámicos, D), y en las subregiones hipocámpales, F), donde el grupo MC presenta una mayor actividad CCO que el grupo MFBM-MR (* $p < ,05$). Grupos: MC, grupo control; MFBM-MR, grupo radiado con FBM simultáneo a la ejecución del protocolo conductual; MDFBM-MR, grupo sometido a las mismas contingencias experimentales que el grupo radiado, pero, con el dispositivo apagado. Regiones: A) corteza orbital (medial (MO), ventral (VO), lateral (LO) y dorsolateral (DLO)); B) corteza cingulada anterior (ACG); corteza prelímbica anterior (APL); corteza cingulada posterior (PCG); corteza prelímbica posterior (PPL); corteza infralímbica (IL); C) estriado dorsal (STD); subáreas del núcleo accumbens (Accumbens core, ACCC y accumbens shell, ACSH); D) subáreas del tálamo anterior (anterodorsal (AD), anteroventral (AV) y anteromedial (AM)); E) subáreas de la amígdala: central (CeA), lateral (LaA) y basolateral (BLA); F) hipocampo dorsal (asta de Amon 1 (CA1), asta de Amon 3 (CA3) y giro dentado (DG)), G) corteza retrosplenial granular (RSG) y corteza retrosplenial agranular (RSA). CCO: citocromo c oxidasa.

Resultados

Finalmente, el análisis de la actividad CCO en los grupos de hembras jóvenes mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas en MO ($F_{2,32}= 8,662, p<,001$), VO ($F_{2,32}= 15,444, p<,001$), LO ($F_{2,32}= 12,827, p<,001$), DLO ($F_{2,32}= 12,753, p<,001$), APL ($F_{2,32}= 7,652, p=,002$), PCG ($F_{2,32}= 6,214, p=,005$), PPL ($F_{2,32}= 18,123, p<,001$), IL ($F_{2,32}= 16,044, p<,001$), STD ($F_{2,32}= 21,689, p<,001$), ACCC ($F_{2,32}= 11,045, p<,001$), ACSH ($H_2=10,878, p=,004$), AD ($F_{2,32}= 6,871, p=,003$), AV ($F_{2,32}= 12,429, p<,001$), AM ($F_{2,32}= 10,162, p<,001$), CeA ($F_{2,32}= 11,911, p<,001$), LaA ($F_{2,32}= 17,790, p<,001$), BLA ($F_{2,32}= 12,045, p<,001$), CA1 ($F_{2,32}= 8,959, p<,001$), CA3 ($F_{2,32}= 5,655, p=,008$), RSG ($F_{2,32}= 7,182, p=,003$) y RSA ($F_{2,32}= 5,596, p=,008$) y su ausencia en ACG ($F_{2,32}=2,400, p=,107$) y DG ($F_{2,32}=2,114, p=,137$) (Figura 25). El análisis de las comparaciones múltiples manifestó que dichas diferencias se encontraban entre el grupo FDFBM-MR y el grupo FC (MO: $t= 3,665, p=,003$; VO: $t= 5,071, p<,001$; LO: $t= 4,544, p<,001$; DLO: $t= 4,336, p<,001$; APL: $t= 3,411, p=,004$; PCG: $t= 3,255, p=,008$; PPL: $t= 4,772, p<,001$; IL: $t= 4,380, p<,001$; STD: $t= 5,530, p<,001$; ACC: $t= 4,402, p<,001$; AD: $t= 3,656, p=,003$; AV: $t= 3,757, p=,001$; AM: $t= 3,169, p=,007$; CeA: $t= 2,903, p=,013$; LaA: $t= 3,324, p=,004$; BLA: $t= 2,868, p=,014$; CA1: $t= 3,655, p=,002$; CA3: $t= 2,788, p=,018$ y RSG: $t= 3,209, p=,006$) y entre el grupo FFBM-MR y el grupo FC (MO: $t= 3,595, p=,002$; VO: $t= 4,586, p<,001$; LO: $t= 4,280, p<,001$; DLO: $t= 4,471, p<,001$; APL: $t= 3,414, p=,005$; PCG: $t= 2,854, p=,015$; PPL: $t= 5,621, p<,001$; IL: $t= 5,350, p<,001$; STD: $t= 5,937, p<,001$; ACC: $t= 3,702, p=,002$; AD: $t= 2,429, p=,041$; AV: $t= 4,756, p<,001$; AM: $t= 4,389, p<,001$; CeA: $t= 4,862, p<,001$; LaA: $t= 5,960, p<,001$; BLA: $t= 4,894, p<,001$; CA1: $t= 3,729, p=,002$ y CA3: $t=3,059, p=,013$; RSG: $t=3,395, p=,006$ y RSA: $t= 3,320, p=,007$), mostrando ambos grupos experimentales una mayor actividad metabólica en las áreas examinadas. Adicionalmente, el grupo FDFBM-MR mostró una mayor actividad que el grupo FC en ACSH ($Q= 3,219, p<,005$) al igual que el grupo FFBM-MR manifestó una mayor actividad en LaA ($t= 2,695, p=,011$) y BLA ($t= 2,072, p=,046$) que el grupo FDFBM-MR (Figura 25).

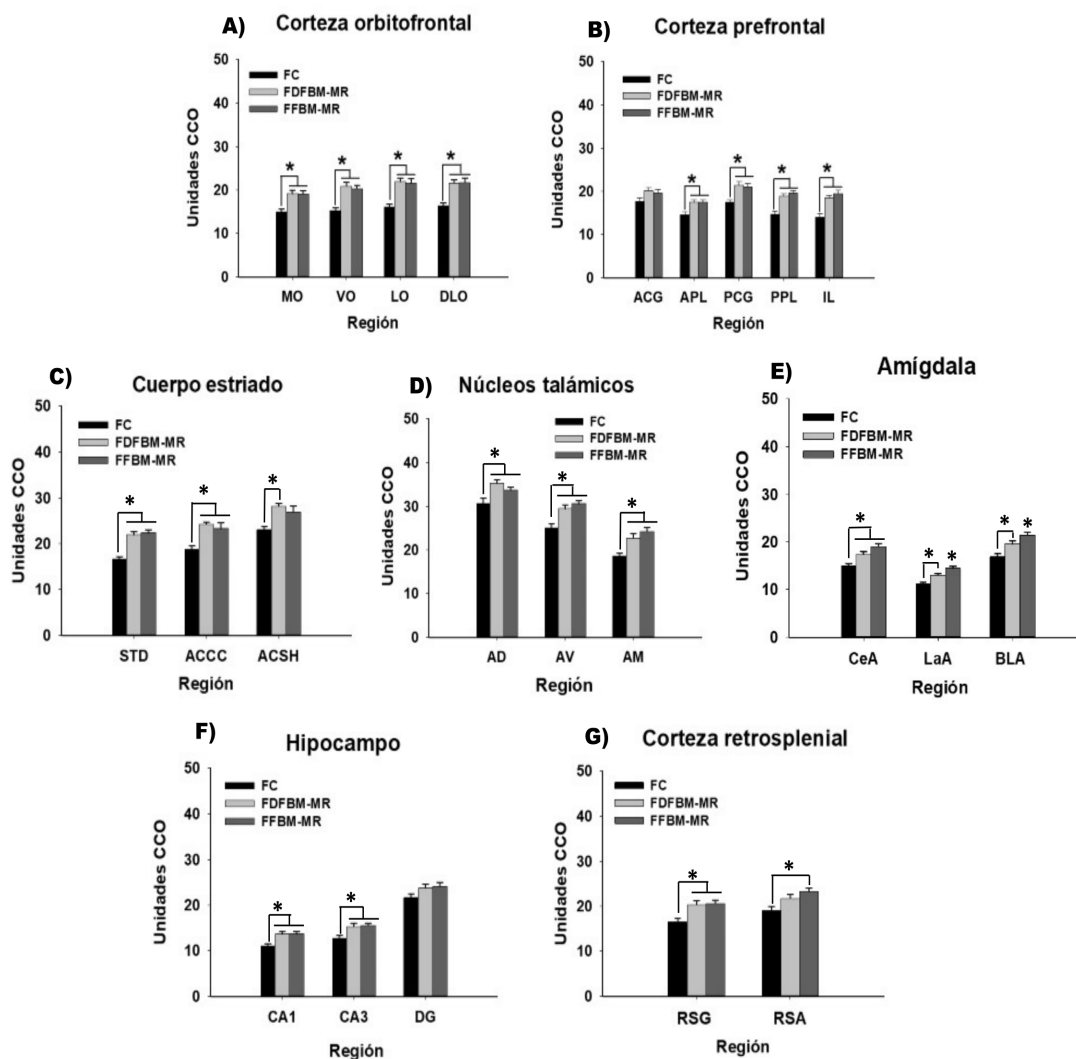


Figura 25. Resultados de la actividad metabólica oxidativa cerebral en los grupos de hembras jóvenes (PND29) en las regiones de interés (Media \pm EEM). Se encuentran diferencias significativas en la mayoría de las regiones cuantificadas mostrándose un patrón generalizado de mayor actividad CCO en los grupos FDFBM-MR y FFBM-MR en comparación con el grupo FC (* $p < 0,05$). Grupos: FC, grupo control; FFBM-MR, grupo radiado con FBM simultáneo a la ejecución del protocolo conductual; FDFBM-MR, grupo sometido a las mismas contingencias experimentales que el grupo radiado, pero con el dispositivo apagado. Regiones: **A)** corteza orbital (medial (MO), ventral (VO), lateral (LO) y dorsolateral (DLO)); **B)** corteza cingulada anterior (ACG); corteza prelímbica anterior (APL); corteza cingulada posterior (PCG); corteza prelímbica posterior (PPL); corteza infralímbica (IL); **C)** estriado dorsal (STD); subáreas del núcleo accumbens (Accumbens core, ACCC y accumbens shell, ACSH); **D)** subáreas del tálamo anterior (anterodorsal (AD), anteroventral (AV) y anteromedial (AM)); **E)** subáreas de la amígdala: central (CeA), lateral (LaA) y basolateral (BLA); **F)** hipocampo dorsal (asta de Amon 1 (CA1), asta de Amon 3 (CA3) y giro dentado (DG), **G)** corteza retrosplenial granular (RSG) y corteza retrosplenial agranular (RSA). CCO: citocromo c oxidasa.

5.3 Bloque I: estudio VI (Objetivo 6)

En el estudio VI se llevó a cabo, en primer lugar, el análisis de las conductas de tipo ansioso de los animales machos jóvenes utilizando el laberinto en cero elevado. Los resultados mostraron que no existían diferencias significativas entre los tres grupos (MCC-AMS, MDFBM-AMS y MFBM-AMS) en ninguna de las variables analizadas: distancia total recorrida en el laberinto ($F_{2,21}=1,163$, $p=,332$), velocidad media ($F_{2,27}=,468$, $p=,632$), promedio de heces excretadas ($H_2=,810$, $p=,667$) y niveles de ansiedad corregidos con el nivel de exploración ($F_{2,21}=,998$, $p=,386$) (Figura 26). Los sujetos sometidos a radiación y al protocolo de aplicación no mostraron, por tanto, una conducta de tipo ansioso en la ejecución de esta prueba.

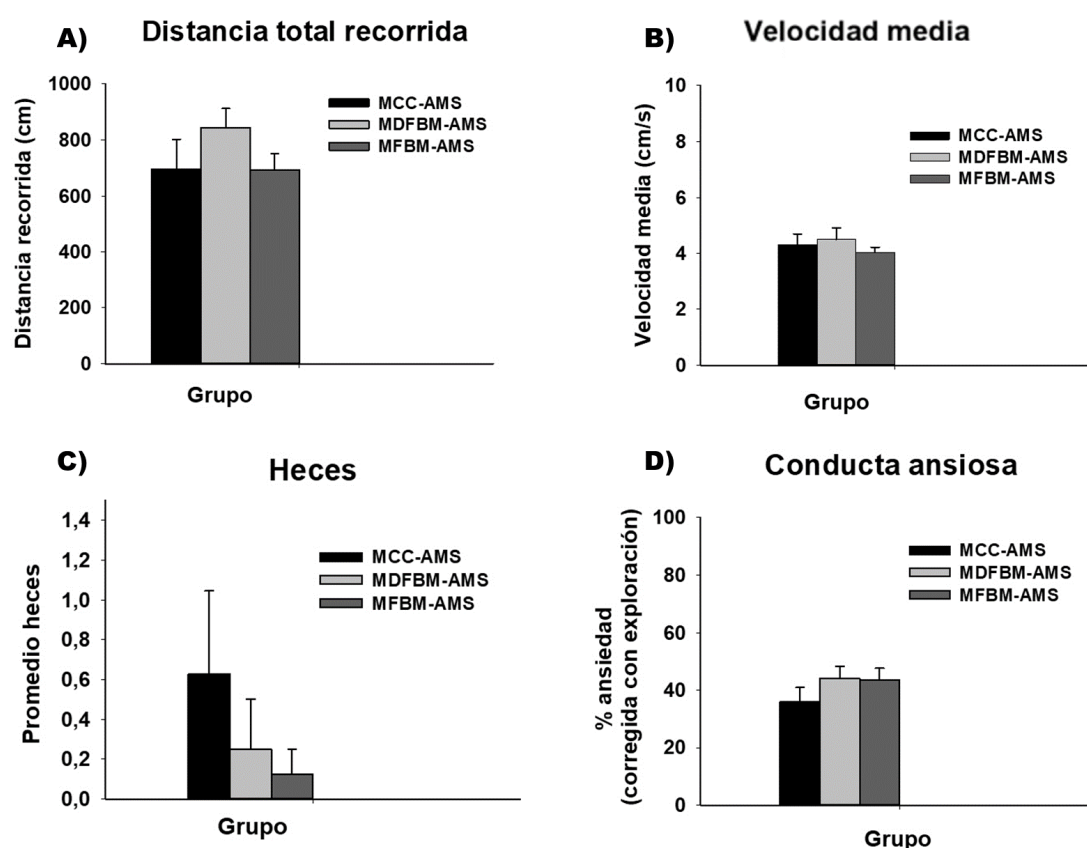


Figura 26. Evaluación de las conductas de tipo ansioso de los grupos de machos jóvenes (PND28) en el laberinto en cero elevado (Media \pm EEM). No se encuentran diferencias significativas entre los grupos en ninguna de las variables registradas (* $p > ,05$). Grupos: MFBM-AMS, administración de la FBM simultáneo a la ejecución de los paradigmas conductuales; MDFBM-AMS, grupo control de la técnica: mismas condiciones que el grupo MFBM, pero con el dispositivo lumínico apagado; MCC-AMS, grupo control aprendizaje sometido a los mismos test conductuales.

A continuación, el estudio de la actividad locomotora en el Rotarod mostró diferencias significativas en la primera fase de la prueba, donde la velocidad se mantenía constante ($F_{2,21}= 4,168$,

$p=,030$), entre el grupo MCC-AMS y el grupo MDFBM-AMS ($t=2,868$, $p=,027$) (Figura 27A). Sin embargo, en la segunda fase del protocolo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la velocidad media máxima alcanzada ($F_{2,21}= 2,179$, $p=,138$) (Figura 27B) ni en el tiempo de permanencia sobre el aparato ($F_{2,21}= 2,211$, $p=,135$) (Figura 27C), lo que muestra que los grupos sometidos a terapia o a sus contingencias, no presentaban una actividad locomotora afectada.

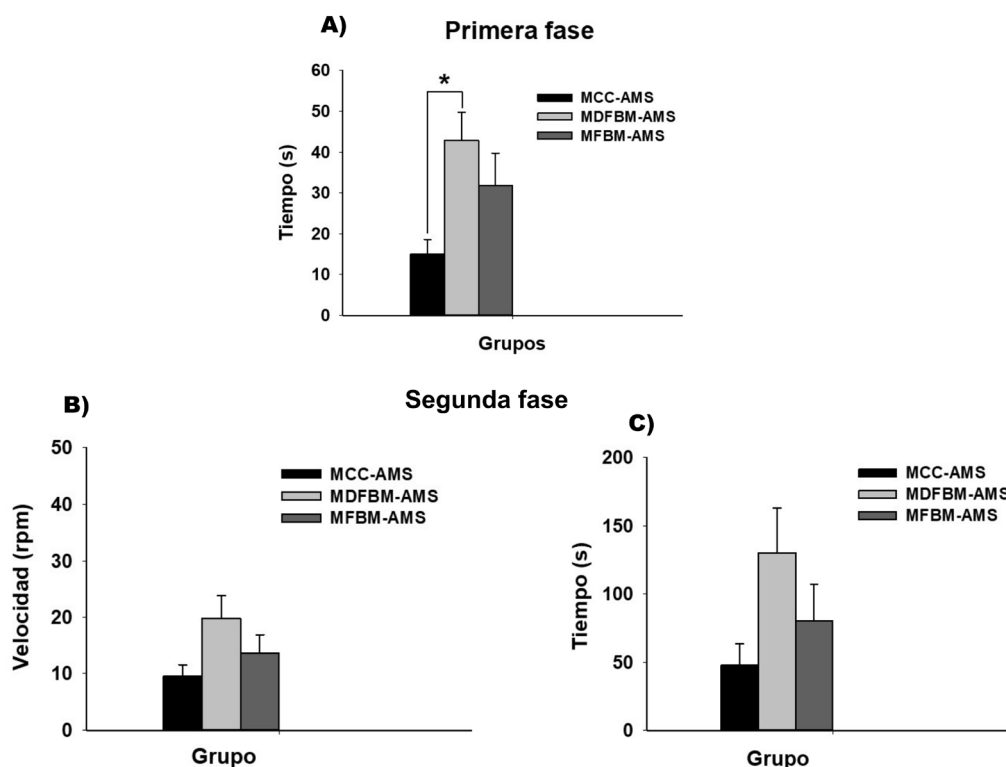


Figura 27. Actividad locomotora de los grupos de machos jóvenes (PND28- PND29) evaluada en el Rotarod (Media \pm EEM). A. Se encuentran diferencias significativas entre el grupo MDFBM-AMS y el grupo MCC-AMS en la permanencia sobre el aparato durante la primera fase de la prueba en la que la aceleración se mantiene constante (* $p<,05$). **B.** No se encuentran diferencias significativas entre los grupos en la velocidad máxima de rotación ni **C.** en el tiempo permanecido en el aparato a medida que se incrementaba la aceleración (* $p>,05$). Grupos: MFBM-AMS, administración de la FBM simultáneo a la ejecución de los paradigmas conductuales; MDFBM-AMS, grupo control de la técnica: mismas condiciones que el grupo MFBM, pero con el dispositivo lumínico apagado; MCC-AMS, grupo control aprendizaje sometido a las mismas pruebas conductuales.

Para finalizar con dicho estudio, se examinó la capacidad de reconocimiento social de los animales mediante la evaluación de su preferencia por la novedad social en el test de las tres cámaras. Los resultados mostraron ausencia de diferencias significativas entre los grupos en la distancia media total recorrida en el paradigma conductual ($F_{2,21}= ,121$, $p=,886$) (Figura 28A) y en la velocidad media de ejecución ($F_{2,21}= ,121$, $p=,887$) (Figura 28B). Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje del valor de preferencia por la novedad social obtenido

mediante la ratio de tiempo dedicado a explorar el sujeto extraño (s) entre el tiempo dedicado a explorar el sujeto extraño más el tiempo dedicado a explorar el sujeto familiar (s) ($F_{2,21}= 4,058, p=,032$), donde el grupo MFBM-AMS mostraba un menor porcentaje de preferencia por la novedad social que el grupo MCC-AMS ($t=2,832, p=,030$) (Figura 28C). A pesar de dichas diferencias, el criterio de preferencia por la novedad social fue considerado cuando el porcentaje era mayor que el valor del 50% (C. J. W. Smith et al., 2015). Así pues, tanto el grupo MCC-AMS como el grupo MDFBM-AMS mostraron una adecuada preferencia por la novedad social siendo su porcentaje de preferencia del 68% (EEM: 5,052) y del 53% (EMM: 5,260), respectivamente, mientras que, por el contrario, el grupo sometido a radiación presentaba una leve alteración en la capacidad de reconocimiento social no alcanzando el porcentaje de éxito estipulado (42%, EMM: 8,467).

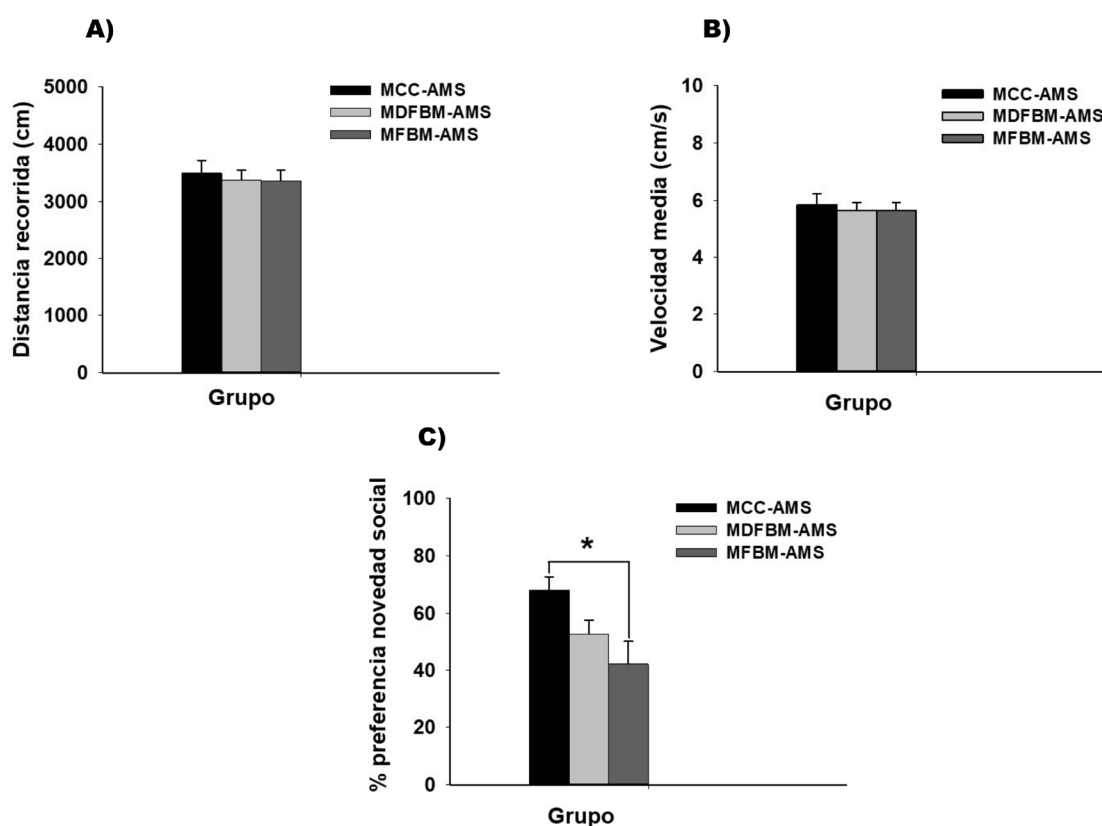


Figura 28. Evaluación de la capacidad de reconocimiento social de los grupos de machos jóvenes (PND29) mediante la evaluación de su preferencia por la novedad social en el test de las tres cámaras (Media \pm EEM). El grupo MCC-AMS presenta un porcentaje de preferencia por la novedad social superior que el grupo MFBM-AMS C. (* $p<,05$). Grupos: MFBM-AMS, administración de la FBM simultáneo a la ejecución de los paradigmas conductuales; MDFBM-AMS, grupo control de la técnica: mismas condiciones que el grupo MFBM, pero con el dispositivo lumínico apagado; MCC-AMS, grupo control aprendizaje sometido a los mismos test conductuales.

6 Discusión

En la presente tesis doctoral se planteó el estudio de los efectos de la técnica de FBM a dos niveles, primeramente, en sujetos jóvenes en periodo de desarrollo, cuyos estudios conforman el cuerpo central de este trabajo (bloque I), y adicionalmente, en el estudio de las consecuencias de su aplicación en sujetos adultos (bloque II). El objetivo principal propuesto fue intentar contribuir mediante la aportación de nuevas pruebas empíricas, a la identificación y determinación de los posibles efectos beneficiosos, y no perjudiciales, de la TFBM en la actividad cerebral y en los procesos cognitivos, a través de la evaluación de múltiples aspectos a nivel conductual, en dos etapas vitales específicas: en el periodo juvenil y en la adultez. Con este fin, analizamos su efecto a nivel de metabolismo energético cerebral en ambos grupos de edades (Publicación 2 y 3, *objetivos 2 y 7*), y la activación de genes tempranos y la densidad de células gliales específicamente en los sujetos jóvenes (Publicación 2, *objetivos 2 y 3*) así como también su impacto en el aprendizaje espacial (Publicación 3, *objetivos 5 y 7*) y en las conductas de tipo ansioso, en la locomoción y en el reconocimiento social (*Objetivo 6*).

La FBM es una técnica de modulación cerebral la cual implica la exposición del tejido a radiaciones lumínicas rojas o NIR dentro del espectro electromagnético permitiendo así la modulación de múltiples funciones celulares tales como el incremento de la función mitocondrial o la mejora de la síntesis de ATP (Khoury et al., 2021; Salehpour y Rasta, 2017). A pesar de que la TFBM cuenta con una extensa muestra de ensayos preclínicos y clínicos y de la parcial aceptación por parte del campo científico, aún sigue existiendo un modesto escepticismo e incredulidad entre los biomédicos y la población general respecto a su uso. Las razones que aluden a esta falta de plena aprobación recaen en la carencia de un íntegro conocimiento acerca de sus mecanismos de acción y en la ausencia de consenso sobre la dosimetría y los parámetros a utilizar, acompañado, además, de la escasez de revisiones sistemáticas que aúnen los resultados obtenidos en los estudios realizados (Hamblin, 2016a). Por todo ello, el primer objetivo planteado en la presente tesis doctoral y presentado en la Publicación 1, fue la realización de una revisión sistemática con el fin de comparar los parámetros utilizados en la TFBM y de analizar los efectos beneficiosos de esta técnica como posible terapia en el campo de los trastornos psicológicos y en la modulación de la función cerebral.

6.1 Controversia inicial: mecanismo de acción

Una de las controversias iniciales respecto al uso de la TFBM fue la ausencia de conocimiento acerca del mecanismo que subyace a su acción en el sistema nervioso. Así pues, este mecanismo fisiológico exacto continúa siendo desconocido, sin embargo, la base teórica actual se centra en los cambios en la función mitocondrial. En este sentido, los resultados obtenidos tienden a confirmar que la TFBM interactúa principalmente con las mitocondrias, siendo la CCO, complejo enzimático IV de la cadena respiratoria mitocondrial partícipe en el metabolismo celular al catalizar la reducción de O_2 a H_2O , la diana principal al constatar su capacidad de absorción de la luz roja y NIR, afectando a su estructura y/o función (Pruitt et al., 2022; Tripodi et al., 2020). Para la identificación de esta enzima como elemento principal, fue empleada la espectroscopia de absorción y de acción de células vivas, así

como múltiples enfoques experimentales, tales como la radiación dicromática de las células y la alteración de su metabolismo a través diversos productos químicos (Karu, 2014). De esta forma, fue propuesta la posible correspondencia entre el espectro de absorción de la CCO y el espectro de acción de la FBM *in vitro*, planteándose así un posible aumento en la actividad de la CCO en respuesta a la radiación que justificaría los incrementos observados en el ATP, en el consumo de oxígeno y en el potencial de membrana (Hamblin y Liebert, 2022). Estas suposiciones fueron también apoyadas por el hecho de que, en condiciones naturales, el complejo IV es el mayor consumidor de oxígeno en la célula lo cual explicaría el aumento en el consumo de dicha molécula durante la TFBM (de Freitas y Hamblin, 2016). Además, se ha demostrado que, tras el suministro de sustancias inhibitoras de la CCO, se bloquea el efecto beneficioso de la FBM (de Freitas y Hamblin, 2016). Sin embargo, a pesar de que la literatura recogida hasta la actualidad parece confirmar que la luz roja o NIR interactúa con el fotoceptor molecular CCO, los mecanismos celulares y moleculares que subyacen dicha relación aún están por determinar (Serrage et al., 2019).

Una de las teorías predominantes mantiene que la propia absorción de fotones por parte de la CCO promovería cambios en el potencial de la membrana mitocondrial interna y en el estado de reducción-oxidación (redox) de sus enzimas, conduciendo a una aceleración en la tasa de transferencia de electrones lo que potenciaría la capacidad de las mitocondrias de catalizar la reducción del oxígeno a agua, produciendo así una generación de ATP más eficiente (dos Santos Cardoso et al., 2022; Pruitt et al., 2022; Vladimirov et al., 2004). De este modo, a medida que aumentaría la actividad de la reacción redox de la CCO, se elevaría a su vez, el consumo de oxígeno conduciendo a un aumento en la tasa de obtención de ATP y en el metabolismo de este (Pruitt et al., 2022). Otra de las hipótesis plausible contempla que dichos efectos mencionados podrían ser resultado de un incremento en la disponibilidad de electrones, tras el uso de la FBM, cuando estos no estarían disponibles para la reducción del oxígeno (Karu, 2014). En ambas teorías, la producción de ATP desencadenada permitiría, a su vez, la activación de quinasas que inducirían la liberación de calcio (dos Santos Cardoso et al., 2022). Aunque no existen pruebas sólidas en la actualidad, algunos estudios sugieren que este ATP conduciría también a la formación del nucleótido adenosín monofosfato cíclico (*cAMP*, por sus siglas en inglés correspondientes a *Cyclic Adenosine Monophosphate*), mensajero secundario, cuyo incremento se ha demostrado tras el uso de la FBM (de Freitas y Hamblin, 2016; dos Santos Cardoso et al., 2022). Adicionalmente, el uso de la luz provocaría una mayor liberación de ROS y de NO, el cual produciría un efecto vasodilatador (Ramezani et al., 2022), por parte de las mitocondrias (dos Santos Cardoso et al., 2022). Esta teoría fue confirmada de manera objetiva por Pruitt et al. en 2016 al informar por primera vez de mejoras en la actividad redox de la CCO y en la hemodinámica vascular tisular (concentraciones de hemoglobina oxigenada y desoxigenada) durante y tras la aplicación de la TFBM en el antebrazo humano (Pruitt et al., 2022). En un estudio posterior realizado por dichos autores, la aplicación del mismo láser en la corteza prefrontal humana dio lugar a resultados análogos a los

obtenidos anteriormente, un aumento de la hemoglobina oxigenada y una mejora en el metabolismo cerebral tras el empleo de la TFBM (Pruitt et al., 2020).

La FBM no solamente parece afectar a nivel de funcionamiento mitocondrial, sino que también se ha establecido y demostrado, tal y como se describió previamente, su efecto sobre las ROS celulares. Las ROS son moléculas producidas a bajos niveles principalmente en las mitocondrias de los mamíferos mediante la conversión del oxígeno metabolizado en múltiples procesos celulares, y son esenciales en la señalización redox y celular, en la activación de enzimas, en la regulación de los ciclos celulares, en la síntesis de proteínas y en el estrés oxidativo (Hamblin, 2018a; Tripodi et al., 2020). Como se indicó en el párrafo anterior, los cambios en el potencial redox de las células conducirían a una mayor oxidación y, por tanto, a una mayor generación de ROS (Ramezani et al., 2022; Tripodi et al., 2020). Este aumento en las ROS se ha mostrado también presente en las mitocondrias disfuncionales y en el estrés oxidativo, el cual contribuye en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas (Hamblin, 2018a; Tripodi et al., 2020). Esta contradicción mencionada, puede explicarse si se tiene en cuenta que el aumento de las ROS provocado por la FBM, es moderado y breve por lo que puede servir para iniciar el sistema de defensa antioxidante, además, las ROS son mediadoras beneficiosas en el organismo cuando se encuentran en concentraciones y exposiciones bajas mientras que resultan perjudiciales en niveles altos o exposiciones crónicas (de Freitas y Hamblin, 2016; Ramezani et al., 2022). Así pues, se ha mostrado que el empleo de la FBM puede aumentar la cantidad de moléculas antioxidantes tales como el glutatión, el superóxido dismutasa y la catalasa, las cuales cooperan para la eliminación del H_2O_2 , miembro de la familia de las ROS, al ser convertido en agua. La activación, por tanto, de este sistema antioxidante, mejoraría la recuperación de las neuronas restaurando la actividad mitocondrial y normalizando la producción de energía (Ramezani et al., 2022).

No obstante, tal y como se describió previamente en la sección de introducción, una de las hipótesis más populares hasta la actualidad está basada en la interacción entre el NO, el oxígeno y la CCO y fue propuesta definitivamente en 2006 por el bioquímico Nick Lane, encontrándose dicha propuesta en estudios previos sobre los efectos de la radiación láser (Hamblin y Liebert, 2022; Karu, 2014; Vladimirov et al., 2004). Dicho autor propuso que el NO compite con el oxígeno en su interacción con la CCO y que la unión del NO con dicha enzima induciría su inhibición en células en estado de hipoxia o de estrés celular, resultando en una menor tasa de respiración celular y en una reducción en la producción de ATP (Hamblin y Liebert, 2022; Tripodi et al., 2020). Todo parece indicar que el uso de la luz roja o NIR invertiría de forma aguda esta inhibición de la CCO por parte del NO a través de la disociación del NO de dicha enzima a nivel mitocondrial, aumentando así la tasa de respiración celular y la cantidad de ATP (Tripodi et al., 2020). Así pues, estudios *in vitro* han mostrado como la adición de NO a células cultivadas en suspensión, previo a la radiación mediante FBM, eliminaba los efectos positivos reportados de la FBM en los cultivos celulares donde se encontraba un aumento de células adheridas a la matriz de vidrio. Los mismos resultados negativos fueron reportados por los

investigadores cuando la adición del NO se producía tras la FBM, hipotetizando, por tanto, que el NO es capaz de controlar las reacciones activadas por la radiación de FBM a través de su unión a la CCO (Karu et al., 2005). Sin embargo, estas pruebas no son plenamente consistentes. Una prueba de ello es el estudio realizado por Buravlev et al. en 2015 los cuales comprobaron que la presencia de NO producía la reducción de la actividad de los complejos mitocondriales II-III y IV, actividad que no pudo ser restaurada mediante el uso de radiación roja la cual mostró efectos insignificantes.

Cabe añadir, además, que el efecto de la FBM no se ha observado únicamente en las mitocondrias, donde se encuentra la CCO, su principal aceptor, sino que su efecto alcanza incluso el núcleo de las células. Así pues, se ha visto que la radiación de fibroblastos humanos con luz roja provocaba un aumento en la tasa de síntesis de ADN y ARN acompañado, además, de una regulación al alza de 111 genes pertenecientes a 10 categorías funcionales diferentes (Karu, 2014). Estos cambios son explicados mediante la acción de los mediadores secundarios mencionados anteriormente tales como la cAMP, el NO y las ROS, entre otros, los cuales son capaces de activar factores de transcripción y vías de señalización que explicarían el efecto a nivel nuclear y los resultados duraderos de la TFBM tras una breve exposición a esta (Hamblin, 2018a). Así pues, las cAMP activarían vías metabólicas a nivel nuclear y reducirían los procesos inflamatorios (de Freitas y Hamblin, 2016; dos Santos Cardoso et al., 2022). Por otro lado, el NO podría activar diferentes vías de señalización las cuales conducirían a la modulación y estimulación de múltiples proteínas (de Freitas y Hamblin, 2016). Finalmente, los últimos mensajeros secundarios a destacar serían las ROS las cuales desencadenarían algunas vías de señalización mitocondrial que desencadenarían efectos citoprotectores, antioxidantes y antiapoptóticos en las células (Hamblin, 2016b). Dichas moléculas serían capaces de activar el factor nuclear NF- κ B, factor de transcripción involucrado en la activación de genes que codifican la liberación de citoquinas y quimioquinas, la adhesión celular, los receptores de la superficie celular, la antiapoptosis, la proliferación y migración celular, etc., regulando, por tanto, genes relacionados con múltiples funciones celulares tales como las respuestas de estrés, supervivencia e inflamatorias (de Freitas y Hamblin, 2016; Tripodi et al., 2020). La FBM incrementaría la activación del factor NF- κ B posiblemente a través de la generación de las ROS (Tripodi et al., 2020). Dicha relación ha sido probada al observar la inhibición del NF- κ B durante la radiación con FBM tras la adición de moléculas antioxidantes (de Freitas y Hamblin, 2016). La producción de ROS y por tanto, la activación a su vez del NF- κ B, desencadenarían la replicación del ADN mitocondrial y de genes nucleares de activación temprana (Henderson y Morries, 2017). El NF- κ B, junto con el factor de transcripción de la proteína activadora-1 (AP-1), presentarían, además, su actividad alterada debido a los cambios en la permeabilidad y en el flujo de iones en la membrana celular tras la aplicación de FBM (de Freitas y Hamblin, 2016). Finalmente, existen otras hipótesis que presentan, por el momento, escasa evidencia. Una de ellas sería la acción de los receptores de potencial transitorio (TRP, por sus siglas en inglés correspondientes a *Transient Receptor Potential*). Los TRP son canales de calcio sensibles a la luz cuya activación podría ser

responsable de algunos de los mecanismos de acción presentes en la TFBM (de Freitas y Hamblin, 2016).

Teniendo en cuenta las hipótesis recogidas en la presente tesis doctoral, las cuales constituyen la diana de interés actual y, a pesar de que el mecanismo exacto de la FBM se desconoce, el hecho demostrado del aumento de la actividad de la CCO ante la TFBM, se ha comprobado beneficioso para las mitocondrias (Ramezani et al., 2022). Además, el empleo de la TFBM desencadena múltiples consecuencias beneficiosas en el sistema nervioso tales como el aumento en el flujo sanguíneo cerebral, la mejora del metabolismo celular, la inhibición de la apoptosis y de la inflamación, la estimulación de la angiogénesis y el incremento de la neurogénesis y de la sinaptogénesis, entre otros (Ramezani et al., 2022; M. Yang et al., 2021). Sin embargo, siguen siendo necesarias más investigaciones para analizar con precisión los efectos biológicos tras su uso y para tratar de desarrollar un conjunto aceptado y estandarizado de directrices de aplicación basadas en la evidencia (Tripodi et al., 2020). La estandarización de la aplicación de la FBM es un factor de suma importancia al ser extensamente conocido que las consecuencias de esta técnica son estrictamente dependientes de los parámetros y características de la radiación empleada.

6.2 Controversia actual: falta estandarización de los parámetros

La revisión sistemática (Publicación 1) llevada a cabo puso de manifiesto y confirmó la falta de consenso actual sobre los parámetros de estimulación idóneos para cada contexto en particular. Así pues, se ha mostrado como los parámetros de radiación y la dosis aplicada son elementos fundamentales en la FBM y su empleo requiere un delicado equilibrio. Este equilibrio es necesario debido a la existencia de una respuesta bifásica a la dosis: escasas cantidades de energía no producirían efecto detectable en el organismo mientras que su exceso podría conducir a la aparición de efectos negativos (de Freitas y Hamblin, 2016). Dicho fenómeno sigue la *Ley de Arndt-Schul*, la cual establece que estímulos débiles aceleran ligeramente la actividad vital, estímulos más fuertes la elevan hasta que alcanzan un pico de actividad y estímulos aún más fuertes suprimen la actividad hasta alcanzar una respuesta negativa (de Freitas y Hamblin, 2016).

En este sentido, son numerosas las variables (referentes a la radiación, a la dosis o al modo de aplicación) que pueden ser manipuladas en la consecución del correcto equilibrio, algunas de las cuales se han recogido en la tabla 3, siendo la longitud de onda uno de los parámetros más relevantes (Buravlev et al., 2015). En nuestro análisis de la literatura, fue notable la alta variabilidad en la elección de los parámetros por parte de los investigadores en el estudio de la modulación de las funciones cognitivas y el tratamiento de los trastornos psicológicos.

Tabla 3. Variables referentes a la radiación, a la dosis o al modo de aplicación típicamente manipuladas en los estudios de FBM.

<i>Variables</i>	<i>Unidad de medida/ de uso</i>
Longitud de onda	Nm
Dispositivo	Láser LED
Onda	Continua/Pulsátil
Irradiancia, densidad de potencia o intensidad	W/cm ²
Fluencia o densidad de energía	J/cm ²
Modo de aplicación	Intranasal Transcraneal
Área de aplicación	Región cerebral seleccionada
Distancia de radiación	cm
Tiempo de radiación	Segundos/minutos/horas
Intervalo entre radiaciones	Horas/días/semanas

Por lo general, durante un proceso de radiación del tejido biológico mediante luz, solo una pequeña cantidad de esta es reflejada mientras que la mayor parte es absorbida (Tripodi et al., 2020). El efecto de la luz sobre las células depende en gran medida de esta absorción la cual está a su vez condicionada por la dispersión producida en la interacción luz-tejido y ambas variables determinan la atenuación total de la luz, es decir, la reducción de su intensidad al incidir con el tejido (Jiang et al., 2022; Tripodi et al., 2020). Teniendo en cuenta dichos componentes, se ha desarrollado un modelo conocido como “ventana óptica” para explicar los niveles relativamente altos de penetración de la luz roja y la NIR. Así pues, se plantea que a medida que las longitudes de onda se acercan al extremo del azul (500 nm aproximadamente), la luz se absorbe y se dispersa más fácilmente en los tejidos biológicos. Por otro lado, a partir de longitudes de onda superiores a 1.150 nm, el agua de los tejidos comienza a absorber una cantidad significativa de energía luminosa (Tripodi et al., 2020). La TFBM ha demostrado una ventana óptica óptima para las longitudes de onda comprendidas entre los 600- 1.100

nm lo cual explota este rango óptico previamente descrito generando, una máxima penetración de la luz junto con una mínima atenuación de la misma (Tripodi et al., 2020). Además, se ha verificado que este rango de valores produce una mayor absorción por parte de la CCO (Carroll, 2019). Cabe señalar que según indican Tripodi et al. (2020) dicha ventana óptica se corresponde con la aplicación de la luz en tejidos *in vivo*, lo cual explicaría por qué otras longitudes de onda mostrarían efectos positivos *in vitro* pero no podrían ser trasladables a modelos animales o humanos. Por ende, en el inicio del uso de la FBM, su aplicación se limitaba a la utilización de longitudes de onda correspondientes a la radiación roja. Sin embargo, este rango se fue ampliando hasta incluir longitudes NIR, convirtiéndose dichas radiaciones en la gama de longitudes más populares debido a sus propiedades de penetración y a los resultados beneficiosos reportados (Hamblin, 2018b). Tras la realización de nuestra revisión de la literatura hasta el año 2020, se observó que la mayoría de los estudios coincidían en que las longitudes de 810 y 1.064 nm podrían ser versátiles y adecuadas para generar efectos beneficiosos, incluso algunos optaban por la combinación de diferentes longitudes (Caldieraro et al., 2018; Chan et al., 2019; Henderson y Morries, 2017). Conclusiones similares fueron planteadas recientemente por Puitt et al. (2022) los cuales observaron, además, un mayor efecto fisiológico y un prolongado mantenimiento de la respuesta tras el uso de la longitud de 1.064 nm frente a 800 y 850 nm. Cabe destacar que en la actualidad, se está incrementando el uso de longitudes de onda fuera del espectro rojo-NIR al resultar beneficiosas en determinados contextos (Serrage et al., 2019). Este sería el caso, por ejemplo, del estudio previamente mencionado de Buravlev et al. (2015), los cuales estudiaban el efecto del NO en los complejos mitocondriales. Dichos autores detectaron que, tras el empleo de radiaciones con longitudes comprendidas en el rango rojo y verde, los cambios eran insignificantes mientras que cuando se empleaba la luz azul se encontraba una restauración parcial de la actividad de la CCO (complejo IV). Se debe reseñar, sin embargo, que dichos resultados podrían no ser debidos únicamente a la longitud de onda, sino también al dispositivo utilizado, ya que en el caso de las radiaciones azules y verdes se utilizó un láser, mientras que la luz roja fue administrada mediante el uso de LED (Buravlev et al., 2015).

El tipo de dispositivo, por ende, parece constituir otra variable en la aplicación de la TFBM. En la publicación 1, fue puesto de manifiesto la prevalencia del uso del láser frente al LED, y es que la aplicación de la FBM se ha realizado típicamente mediante una fuente de luz laser. Sin embargo, según afirman numerosos autores, los dispositivos LEDs son cada vez más utilizados y surgen como una opción más segura y barata, sustituyendo a los láseres en múltiples indicaciones (Berman et al., 2017; Hamblin, 2018b). A día de hoy, parece que se han incrementado el número de investigaciones que optan por el uso de dispositivos LEDs (Chao et al., 2020; Martin et al., 2021), no obstante, todo parece señalar que el empleo de láseres, tal y como se vio en la revisión, continua siendo la forma más prevalente (dos Santos Cardoso et al., 2022; Y. Li et al., 2021; Zhao et al., 2022). Parece ser que la importancia en la elección del tipo de fuente recae en los efectos biológicos ya que se han observado efectos dispares en el organismo en función de la fuente de suministro elegida. Así, algunos estudios indican que los láseres

son más eficaces y alcanzan efectos terapéuticos más profundos (Musstaf et al., 2019). Una muestra de dicha premisa sería el estudio de Tatmatsu-Rocha et al. (2018) los cuales mostraron efectos beneficiosos en la producción de colágeno en animales diabéticos tras el uso del láser, pero no tras el uso del LED. Cabe destacar, sin embargo, que dichos autores asociaron las diferencias encontradas con el tipo de onda utilizado: en el caso del láser fue empleada una onda de tipo pulsátil mientras que en el caso del LED fue de tipo continuo. No obstante, un estudio reciente de Pruitt et al. (2022) mostraron efectos similares tras el uso de LED y de láser en el metabolismo de la CCO y en la oxigenación vascular. A pesar de ser un parámetro a tener en cuenta, la mayoría de los investigadores mantienen que otros parámetros tales como la longitud de onda, la irradiancia y la fluencia son más relevantes en la determinación de la eficacia de la FBM (X. Li et al., 2020).

La irradiancia, también conocida como densidad de potencia, es un parámetro cuya determinación depende de los vatios de emisión y del tamaño de la zona de tratamiento. Los estudios analizados mostraron una elevada heterogeneidad en la elección de dicha variable lo que dificulta alcanzar un consenso sobre el valor ideal de administración. A pesar de ello, en el ámbito médico, el valor que se suele emplear por sesión para garantizar la seguridad del paciente se sitúa en torno a los 10-70 mW/cm². Por otro lado, en cuanto a la fluencia o densidad de energía, algunos autores sitúan su rango de uso en torno a 10-30 J/cm² en el tratamiento de los problemas neurológicos, entre 12 y 84 J/cm² en la aplicación en trastornos psicológicos y entre 15 y 60 J/cm² en su empleo en sujetos sanos (Gavish y Houreld, 2018; Salehpour y Rasta, 2017). En la revisión realizada, el valor escogido por la mayoría de los estudios fue de 60 J/cm². Dicho valor sería adecuado al plantearse que el suministro de fluencias en torno a 1 y 3 J/cm² parecen suficientes y convenientes para desencadenar la producción de ATP (Hamblin, 2018a). Un estudio que ejemplifica dicho argumento sería el realizado por Eshaghi et al. (2019) los cuales mostraron una atenuación de los síntomas depresivos tras emplear una fluencia de 1,8 J/cm².

La elección de los parámetros es esencial para proporcionar una emisión suficiente que permita alcanzar la zona objetivo pero dicho alcance es dependiente, a su vez, del modo de aplicación de la radiación. Así pues, algunos autores mantienen que una correcta elección en la aplicación transcraneal lograría atravesar capas externas presentando penetraciones de 20 y 30 mm llegando incluso a 50 mm y 2 cm (Hamblin, 2018b; Salehpour y Rasta, 2017; Santos et al., 2019). Otros autores, sin embargo, mantienen que las emisiones transcraneales no superarían los 10 mm por lo que optan por una emisión combinada (Henderson y Morries, 2017). En este sentido, Mitrofanis y Jeffery (2018) sostienen que, a pesar de no superar dicha profundidad, la FBM llegaría a estructuras más profundas a través de vías indirectas como podría ser la circulación. La zona de tratamiento escogida por la mayoría de los estudios fue la frente, siendo la zona frontal la más repetida y optando, en gran medida, por la aplicación en varios puntos distales o bilaterales potenciando así el efecto de la radiación. Dado que la penetración de la radiación varía en función de la región en la que se aplique, la elección de puntos distales es

justificada a través del fenómeno conocido como FBM sistémica: la aplicación de la FBM en una zona concreta del cuerpo puede tener implicaciones en otras zonas alternativas debido a la transmisión del efecto biológico (Caldieraro y Cassano, 2019). En esta misma línea, algunas investigaciones han reportado reducciones en los síntomas depresivos en pacientes sometidos a FBM para el tratamiento del dolor de espalda (Caldieraro y Cassano, 2019; Salehpour y Rasta, 2017). Al mismo tiempo, un factor adicional y menos predecible que habría que tener en cuenta en las aplicaciones transcraneales, sería las características interindividuales de los tejidos y su morfología. La literatura sugiere que un mayor grosor de los tejidos intermedios entre la superficie de piel y el cerebro y la deshidratación de los tejidos, factores asociados con el envejecimiento, estarían inversamente correlacionados con la penetración de la FBM (Salehpour, Cassano, et al., 2019). Alternativamente al modo de aplicación transcraneal, Berman et al. (2017) optan por la aplicación a través de las fosas nasales (aplicación intranasal) dada la abundancia capilar que presenta, lo cual podría facilitar la estimulación, y Salehpour et al. (2018b) describe también la exposición a través de la cavidad oral o los oídos. Por otro lado, los autores Moro et al. (2017) han mostrado una posible alternativa en el empleo de la FBM al implantar fibras LED en macacos sin consecución de daños. Finalmente, la efectividad de la FBM aplicada directamente sobre la piel, podría variar en función de la pigmentación de esta ya que la absorción de energía diferiría de unas pigmentaciones a otras. De esta manera, algunos autores tales como Conde Quintero et al. (2011) mantienen que los parámetros han de modificarse en función de si la FBM se aplica en pieles claras u oscuras mientras que para otros autores como Barrett y Gonzalez-Lima (2013) dicho ajuste de emisión en función de la pigmentación no sería relevante.

La distancia de emisión parece ser, asimismo, una variable a considerar. Hamblin et al. (2015) muestran como la luz aplicada directamente en contacto con la piel sería la opción más eficaz ya que presiona los tejidos modificando el flujo sanguíneo y logrando una mejor penetración. En cuanto al tiempo de radiación y el intervalo de tratamiento, se ha encontrado una alta variabilidad entre los estudios, acompañado de una falta de especificidad de estos parámetros, lo que dificulta la estandarización de la técnica. Sin embargo, autores como Lapchak (2012) recomienda la repetición de la TFBM para mantener sus beneficios.

Finalmente, cabe señalar que tal y como se ha descrito en este apartado, las investigaciones realizadas en el campo de la FBM describen una amplia gama de metodologías poco específicas e incluso, en algunos de los casos, carecen de la descripción de los parámetros seleccionados. Esta carencia se debe, en muchos de los casos, a la desinformación por parte de algunas empresas que fabrican los dispositivos (Hamblin, 2016a), acompañado a su vez de la falta de dispositivos láseres y LEDs disponibles en el mercado (Pruitt et al., 2022). Todos estos inconvenientes, entre otros, dificultan la replicabilidad de los estudios y, por tanto, impiden el desarrollo de protocolos estandarizados centrados en las características patológicas de cada paciente, que permitan el uso correcto, beneficioso y homogéneo de la FBM.

6.3 Eficacia de la técnica en la modulación cognitiva y los trastornos psicológicos

La TFBM, al igual que otras técnicas transcraneales, ha sido cuestionada dada la ausencia de conocimiento acerca de su efectividad y reproducibilidad (Rojas y Gonzalez-Lima, 2013). Sin embargo, la consecución de resultados positivos, junto con la mínima presencia de efectos secundarios, han llevado al aumento de estudios experimentales cuyo fin es lograr la calidad y el rigor metodológico que permitan otorgar a la FBM una función como herramienta terapéutica. Así pues, ha emergido un creciente interés por el uso de esta terapia en la disciplina psicopatológica como posible estrategia para tratar múltiples trastornos. La disparidad de estudios realizados sugería el empleo de la FBM como una herramienta terapéutica alternativa para mejorar la función cerebral dada la ausencia prácticamente total de efectos secundarios adversos, junto con el creciente desencanto en el uso de fármacos (Hamblin, 2018b). Por ello, la revisión sistemática presentada en la publicación 1, aunó la literatura publicada hasta el año 2019 con el fin de confirmar la funcionalidad de la TFBM en el ámbito psicológico. Así pues, los resultados mostraron que dicha técnica lograba una estimulación suficiente para generar efectos beneficiosos en sujetos sanos y en sujetos con múltiples patologías psicológicas. Cabe destacar que, tal y como se ha planteado previamente, todos los efectos reportados dependían, en su totalidad de los parámetros de radiación seleccionados. Dicha revisión sirvió, además, como base para el planteamiento de las investigaciones llevadas a cabo en la presente tesis doctoral.

El trastorno clínico elegido por la mayor parte de los diferentes autores para el estudio de la TFBM fue la depresión. Dicha elección se fundamenta en la alta prevalencia de dicha patología, siendo la principal causa de discapacidad en el mundo y afectando a más de 300 millones de personas (World Health Organization (WHO), 2017). Asimismo, el uso de la TFBM como posible herramienta terapéutica resultaría razonable dada la presencia de múltiples cambios cerebrales tales como atrofia del hipocampo, apoptosis del giro dentado, cambios en la oxigenación y disfunción mitocondrial, debilitamiento de las redes neuronales y déficit en el flujo cerebral prefrontal, alteración también común en otros trastornos mentales (Salehpour y Rasta, 2017; Schiffer et al., 2009). Igualmente, se ha reportado un aumento del estrés oxidativo y de la neuroinflamación, hipometabolismo y una reducción en los niveles de BDNF (Caldieraro y Cassano, 2019; Caruncho Michinel y Rivera Baltanás, 2010). Atendiendo a dichas premisas, los resultados de la revisión mostraron la existencia de efectos positivos en el tratamiento de la depresión tras el uso de la TFBM. Tanto es así que autores como Mathewson (2015) concluyen que los resultados reportados tras el uso de esta técnica son mayores que los obtenidos tras el empleo de otras terapias tales como terapias electroconvulsivas o la estimulación magnética. En esta misma línea, la comparación entre los fármacos habituales utilizados en la depresión y el uso de la FBM mostró efectos similares en ambos tratamientos destacando, sin embargo, un aumento de peso y una mayor reducción de cortisol bajo el tratamiento de radiación (Salehpour et al., 2016; Wu et al., 2012). Cabe añadir, además, que autores como Disner et al. (2016) establecen la beneficiosa posibilidad de combinar la TFBM con otros tratamientos farmacológicos, físicos o psicoterapéuticos, dado su papel

en la optimización de estados que potencian la acción de otros tratamientos. En este sentido, el uso combinado de la radiación y fármacos antidepresivos parece acelerar la eficacia y la velocidad de los efectos farmacológicos acompañado, adicionalmente, de una mejora de la función mitocondrial y una mayor protección neuronal al combinar la TFBM con productos metabólicos (Dong et al., 2015; Huang et al., 2009). La revisión reciente de Bertani et al. (2021) añade, además, que la TFBM podría iniciar una mejoría del estado de ánimo antes que los fármacos antidepresivos. Los efectos positivos reportados en las investigaciones recogidas en la revisión sistemática fueron alcanzados, en su mayoría, mediante el empleo de radiaciones con longitudes de onda de 810 nm, irradiancia de 362-250 mW/cm² y con una fluencia alrededor de 60 J/cm². La relevancia en la elección de los parámetros queda de nuevo reflejada en el estudio actual realizado por Iosifescu et al. (2022). Dichos autores confirmaron que el uso de la TFBM transcraneal con baja irradiancia, baja energía por sesión y bajo número de sesiones podría no ser considerada una estrategia depresiva eficaz y enfatizan la necesidad de una mayor caracterización de dicha terapia en el tratamiento de la depresión (Iosifescu et al., 2022).

La existencia de evidencias acerca de la posible disfunción mitocondrial en otros múltiples trastornos psicológicos y la importancia de la oxigenación para el correcto funcionamiento del organismo, convierten a la TPBM en una atractiva alternativa. Así pues, la TFBM no solo ha mostrado efectos beneficiosos en los trastornos depresivos sino también se considera útil para el tratamiento de trastornos con posible disfunción del lóbulo prefrontal tales como el autismo, el trastorno obsesivo-compulsivo, la esquizofrenia o el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (Hamblin, 2016b). Adicionalmente, otras patologías tales como el trastorno bipolar, el trastorno afectivo estacional o las alteraciones del sueño, asociadas con desregulaciones del ritmo circadiano, podrían restaurarse mediante el uso de TPBM mostrando su evidente funcionalidad neurobiológica (Ashkenazy et al., 2009; Bertani et al., 2021; Santana-Blank y Rodríguez-Santana, 2018). En el caso del trastorno bipolar, Duong et al. (2018) sugieren la existencia de alteraciones en los genes relacionados con la generación y la biodisponibilidad de ATP junto con un deterioro en el funcionamiento mitocondrial. Estas alteraciones hacen de este trastorno un objetivo ideal para la aplicación de la TFBM.

Los estudios diseñados para dilucidar las consecuencias de la FBM no solo se han realizado con muestras de sujetos diagnosticados con trastornos psicológicos, sino que también se han probado en sujetos sanos sin síntomas clínicos aparentes. Siguiendo esta línea experimental, los estudios recopilados han mostrado resultados positivos en la mejora de múltiples funciones cognitivas tales como el aprendizaje, la memoria, la atención y las funciones ejecutivas. Dichas mejorías no fueron solo observadas en el rendimiento cognitivo, sino que también se encontraron cambios en la actividad cerebral con un aumento en las concentraciones de CCO, en la hemoglobina oxigenada y cambios en la frecuencia de las ondas cerebrales (Gonzalez-Lima, 2017; X. Wang, Dmochowski, et al., 2017; Zomorodi et al., 2019). Estudios actuales, no incluidos en nuestra revisión, reafirman dichos efectos

positivos encontrados en sujetos sanos, lo que podría de manifiesto el posible uso de la TFBM como una herramienta en la modulación y mejoría de las funciones cognitivas.

Un aspecto de suma importancia que debe ser tenido en cuenta es la existencia de efectos deletéreos. Así pues, algunas investigaciones han descrito efectos secundarios transitorios en humanos, tales como la presencia de cefalea. Síntomas similares fueron detallados por Bertani et al. (2021), los cuales mantienen que los síntomas de la FBM serían leves y reversibles y se presentarían en forma de dolor de cabeza, fatiga visual, visión borrosa, fotofobia, irritabilidad, diarrea y/o náuseas. Sin embargo, otros autores identificaron la presencia de efectos apoptóticos en cultivo de células hipocampales, un retraso de efectos positivos tras la aplicación de FBM en ratones con lesiones traumáticas y un aumento de peso e incremento de la presión diastólica en sujetos con depresión (Cassano et al., 2019; Xuan et al., 2016; Yang et al., 2017).

Finalmente, cabe reseñar que los estudios recopilados descritos anteriormente eligieron principalmente muestras humanas en contraposición al uso de modelos animales. Sin embargo, la muestra reclutada en estos estudios estaba formada por un número muy reducido de participantes y, únicamente, cuatro estudios emplearon muestras superiores a 100 personas. Además, la población seleccionada era elegida de forma no aleatoria y generalmente, existía una ausencia de grupo control de comparación. Dichas limitaciones, junto con la falta de seguimiento de los participantes para evaluar los resultados a largo plazo, hacen necesario el desarrollo de nuevas líneas de investigación que permitan evaluar los posibles riesgos y beneficios tras el uso de la FBM en cada contexto en particular.

6.4 Modulación cerebral mediante fotobiomodulación

Los resultados prometedores reportados mediante el uso de la TFBM, especialmente en sujetos sanos, así como la escasez de estudios centrados en los posibles efectos moduladores de la TFBM en el desarrollo, impulsaron la puesta en marcha de las investigaciones recopiladas en la presente tesis doctoral. Por ello, primeramente, se decidió iniciar los estudios mediante la evaluación del efecto de la FBM en el cerebro focalizando la investigación en sujetos jóvenes, objeto central de esta tesis. Dada la importancia de la elección de los parámetros, cabe reseñar de antemano que la longitud de onda escogida en el caso de los estudios con sujetos jóvenes (bloque I, *objetivos 2, 3, 5, y 6*), fue de 810 nm debido al elevado número de investigaciones que reportan efectos positivos tras su uso, además de la realización previa de estudios piloto de nuestro grupo de investigación. En cuando a la duración y modo de suministro, se optó por la radiación manual durante 30 minutos (tres ciclos de 10 minutos cada uno) con el objetivo de reducir al máximo posible el estrés durante la aplicación. Por otro lado, en el caso de los sujetos adultos (bloque II, *objetivo 7*), se utilizó una longitud de onda de 1.064 nm dado su extenso uso en las investigaciones con adultos humanos y se recurrió a la colocación de una pieza de velcro con conexión directa con el láser para facilitar así la radiación de los animales adultos dado su tamaño y para reducir la situación estresante al permitirles la total libertad durante el suministro.

En el estudio I del bloque I (Publicación 2), el análisis de la actividad cerebral fue llevado a cabo en sujetos jóvenes (29 DPN) de ambos sexos, los cuales habían sido radiados con FBM (810 nm) en la superficie de su cabeza, intentando alcanzar áreas prefrontales, durante cinco días. Dicha actividad fue evaluada mediante el estudio de su metabolismo oxidativo cerebral y de la expresión de genes de activación temprana en la PFC y en el hipocampo. Respecto al estudio de la actividad metabólica, los resultados mostraron la ausencia de diferencias entre los grupos experimentales en cada uno de los sexos en las regiones estudiadas. En la etapa de desarrollo postnatal, se ha demostrado que se produce un incremento de citocromos y de la actividad CCO (Kalous et al., 2001). Tal y como se mencionó previamente, aunque los mecanismos precisos de la FBM no están del todo claros, la vía de acción principal propuesta es la absorción de la luz por parte de la CCO por lo que en nuestra investigación se hipotetizaba la probable modulación de la función de dicha enzima reportando cambios en la actividad metabólica de los sujetos jóvenes. Así pues, en el estudio de Pruitt et al. (2020) encontraron un aumento en la concentración de hemoglobina oxigenada y de CCO oxidada en sujetos jóvenes y adultos humanos. Son escasas las investigaciones cuyo objetivo principal haya sido específicamente el análisis de la actividad metabólica cerebral tras la aplicación de la TFBM y los encontrados focalizan sus estudios en muestras adultas, apoyándose en la idea de que la absorción de fotones por parte de la CCO aumentaría la actividad enzimática, el consumo de oxígeno y la producción de ATP debido a la fotodisociación del óxido nítrico (Gonzalez-Lima, 2017; Hamblin, 2019a; X. Wang, Tian, et al., 2017). Hay que tener en cuenta que los resultados reportados dependen directamente de los parámetros elegidos, pero, a pesar de ello, hay que destacar que la administración de FBM alcanza la consecución de modificaciones de la CCO en sujetos adultos controles. Estos cambios en la enzima CCO no se han identificado únicamente en sujetos adultos sanos, sino también en varios modelos de enfermedad y en tareas cognitivas (N. Arias et al., 2016; Banqueri et al., 2019; Méndez et al., 2021). Sin embargo, en nuestro estudio, tras la aplicación de FBM en sujetos sanos jóvenes no se encontraron alteraciones en la actividad metabólica. En esta misma línea, el estudio de la expresión del protooncogén c-fos ha recibido aún menos atención que la CCO tras la aplicación de la FBM. Dicho gen temprano es uno de los primeros grupos de genes que se expresan en minutos tras la activación sináptica y neuronal durante la estimulación extracelular y está involucrado en la proliferación y diferenciación celular (Y. Li et al., 2021; Velazquez et al., 2015). En nuestro estudio, al igual que en el caso de la cuantificación de la enzima CCO, no encontramos cambios en la expresión de c-fos entre los grupos experimentales en el caso de los machos ni tampoco en el de las hembras. Los estudios previos han reportado resultados controvertidos mostrando aumento en la producción de la proteína c-Fos, pero también disminución en su generación en varias áreas cerebrales de modelos sanos y de enfermedad (J. L. Arias et al., 2020; De Taboada y Hamblin, 2019; Y. Li et al., 2021; Nadur-Andrade et al., 2016).

El periodo postnatal es una etapa crítica del desarrollo en la cual el cerebro es muy plástico y especialmente vulnerable. En nuestro estudio, la aplicación de la TFBM en sujetos con 29 DPN durante

cinco días no produjo variaciones en la actividad metabólica ni en la expresión de c-fos y esta ausencia de diferencias se mantuvo en los grupos de ambos sexos. Dichos resultados concuerdan con estudios previos (dos Santos Cardoso, de Souza Oliveira Tavares, et al., 2021; Saucedo et al., 2021; Shinhmar et al., 2020). Estos autores compararon los efectos de la radiación de FBM entre sujetos jóvenes y de edad avanzada sobre la función retiniana, la actividad y la hemodinámica de la CCO y la respuesta neuroinflamatoria. Sus resultados mostraron unos mayores efectos de la FBM en sujetos de edad más avanzada tras la aplicación de la técnica. Durante el envejecimiento cerebral, múltiples procesos de degeneración neuronal, tales como la inflamación local y la reducción del metabolismo energético, inician su puesta en marcha (dos Santos Cardoso, dos Santos, et al., 2021; dos Santos Cardoso, Mansur, et al., 2021). Es por ello que estos investigadores hipotetizaron que el declive mitocondrial ligado a la edad y no presente en las muestras de jóvenes desempeñaría un papel esencial en los resultados de la TFBM (dos Santos Cardoso, de Souza Oliveira Tavares, et al., 2021; Saucedo et al., 2021; Shinhmar et al., 2020). Dicha hipótesis ha sido confirmada recientemente en el estudio realizado por Cardoso et al. (2022). Estos investigadores mostraron la existencia de una disminución en la actividad regional de la CCO y en la conectividad funcional en el cerebro de sujetos envejecidos. Tras el empleo de la FBM de manera crónica, se producía la reversión de dichas disfunciones fortaleciendo la conectividad funcional. Este efecto era encontrado en el grupo de sujetos de avanzada edad, pero también en el grupo de jóvenes, siendo más significativo en el grupo de mayor edad (dos Santos Cardoso et al., 2022). Siguiendo esta premisa, el mismo motivo puede explicar nuestros hallazgos tras la aplicación de TFBM en sujetos jóvenes cuyo cerebro continúa en desarrollo y sin problemas de salud aparentes. En esta etapa postnatal, la función cerebral y, específicamente, la función mitocondrial del cerebro no está perturbada, por lo que la acción de la FBM en las mitocondrias podría no ser detectable mediante el análisis de la actividad de la CCO y la síntesis de la proteína c-Fos. Se podría entonces sugerir, en base a las evidencias aportadas en la literatura actual, que la TFBM sería más eficaz en individuos con posible disfunción mitocondrial, tales como serían modelos de sujetos adultos/ancianos e incluso, con presencia de disfunciones, antes que en sujetos jóvenes y sanos (Saucedo et al., 2021; Scaglia, 2010). Por otro lado, las células hipóxicas o disfuncionales son más propensas a presentar altas concentraciones inhibitorias de NO (Hamblin, 2018a). La teoría de la acción de la FBM a través de la fotodisociación del NO explicaría entonces por qué se encontraría un mayor efecto de dicha técnica en tejidos enfermos o dañados y no sería tan apreciable en células sanas (Hamblin, 2018a). Sin embargo, tal y como se planteó en la introducción de esta tesis doctoral, en el estudio de Buzzá et al. (2019) se observó como la aplicación de la TFBM en la etapa de desarrollo postnatal conducía a efectos beneficiosos. A pesar de que los sujetos elegidos por parte de estos autores eran ratas sanas y recién nacidas, los resultados mostraron una madurez más temprana y sin daños en el grupo radiado. En contraste con nuestro estudio, Buzzá et al. (2019) iniciaron la radiación con FBM en una etapa más temprana del desarrollo y no fue examinado ningún parámetro de actividad neural.

Finalmente se analizaron las diferencias entre los grupos de machos y hembras en la actividad metabólica cerebral y en la producción de proteína c-Fos. Así pues, se comprobó que, en el caso de la actividad de la CCO, los tres grupos femeninos mostraban una mayor actividad que los grupos masculinos en la PFC y en el hipocampo. Dichos resultados concuerdan con los reportados previamente por Spivey et al. (2008) los cuales encontraron una menor actividad metabólica regional en la PFC y en la corteza parietal de machos jóvenes sanos en comparación con el grupo de hembras sanas jóvenes. Resultados similares en una muestra de sujetos adultos fueron reportados por González-Pardo et al. (2020). Dimorfismo sexual se encontró también en el caso del estudio de las diferencias en expresión del gen c-fos. En este caso, los tres grupos masculinos mostraron un mayor número de células positivas de c-Fos que las mujeres en las tres áreas estudiadas de la PFC mientras que, por el contrario, los grupos femeninos presentaron una mayor producción de proteína c-Fos en la subregión CA3 del hipocampo.

Tras verificar la ausencia de alteraciones en la actividad metabólica y en la expresión de genes tempranos en el PFC y en el hipocampo de machos y hembras jóvenes tras la radiación con FBM, nos planteamos el estudio de la seguridad de la aplicación de la técnica a través del análisis de células gliales en muestra de machos jóvenes (Estudio II, *objetivo 3*). La gliosis es el término utilizado para describir la proliferación de células gliales en respuesta al daño neuronal y tiende a ser asociada con efectos tóxicos y perjudiciales para las neuronas (El Massri, Moro, et al., 2016). El efecto sobre las células gliales de la TFBM ha sido escasamente explorado y las investigaciones actuales focalizan su interés en muestras de sujetos adultos sin encontrar en la literatura ningún dato acerca de la alteración de estas células en el desarrollo postnatal. Los resultados obtenidos en estos estudios muestran una atenuación de la inflamación cerebral general tras el uso de la FBM, al encontrarse un descenso en el número de células gliales (El Massri et al., 2018; El Massri, Johnstone, et al., 2016). Sin embargo, existen controversias entre las investigaciones acerca de qué células se ven afectadas tras su uso. Así pues, algunas investigaciones encuentran una reducción general de astrocitos y microglía (El Massri et al., 2018; Lee et al., 2016; Tsai et al., 2022), mientras que otros únicamente encuentran un efecto significativo en los astrocitos siendo muy limitado en el caso de la microglía (El Massri, Johnstone, et al., 2016; El Massri, Moro, et al., 2016). Cabe destacar que dicha disminución, encontrada únicamente en los astrocitos, parece estar presente en las investigaciones llevadas a cabo en modelos de Parkinson por lo que podría ser un proceso de gliosis específico en este trastorno el que produjera dicho efecto particular. Un estudio reciente llevado a cabo por Vogel et al. (2021) en un modelo de infarto cerebral detectaron una reducción en Iba-1, marcador de microglía, junto con un incremento astrogliol. Los mismos resultados fueron confirmados por Yoon et al. (2021), los cuales detectaron un aumento en la proliferación de astrocitos en las células cultivadas radiadas con FBM. Por otro lado, se vuelve a poner de manifiesto la importancia de los parámetros de radiación en el estudio de El Massri, Johnstone, et al. (2016) al constatar como el tratamiento con FBM podría actuar como factor protector ante la degeneración progresiva durante el envejecimiento siempre que se aplique en intervalos regulares. La

misma importancia se otorga a los parámetros de radiación en el estudio de Xuan et al. (2016) los cuales identifican una inhibición temporal del proceso de reparación al observarse un aumento en el número de astrocitos tras un excesivo número de sesiones de FBM. En contraste con los efectos descritos reportados por otros autores, en nuestra investigación no fueron hallados cambios en la proporción de astrocitos y microglía en el PFC de los grupos jóvenes sanos radiados (Figura 18). Cabe señalar que los estudios previamente citados emplearon muestras de sujetos en edades avanzadas o con presencia de lesiones o trastornos neurodegenerativos mientras que en nuestro caso la muestra estaba formada por sujetos sanos jóvenes. Los astrocitos y la microglía son células que contribuyen a un funcionamiento óptimo de las neuronas en el cerebro sano y la alteración en cualquiera de estas células repercute en la función neuronal y, en consecuencia, en la función cognitiva (Lynch et al., 2010). Así pues, estas células son activadas ante presencia de daño o infección y en múltiples enfermedades neurodegenerativas (Allen y Barres, 2009). Las investigaciones, además, han verificado como con la edad se produce un cambio en el fenotipo de los astrocitos y de la microglía asociado con el deterioro de la función sináptica (Lynch et al., 2010).

Para finalizar este apartado focalizado en la modulación de la función cerebral mediante el uso de la TFBM, se incluyen los resultados derivados del estudio I, bloque II (Publicación 3) realizado, en este caso, en muestras de sujetos adultos. En este estudio se analizó la actividad metabólica en sujetos controles basales sanos y en sujetos sometidos a una prueba de aprendizaje reverso. En este apartado, únicamente se incluirá el primer grupo de sujetos basales. Así pues, tras la aplicación de la TFBM durante cinco días se encontró una disminución en la actividad metabólica en el estriado dorsal y ventral, MS, ENT, hipocampo, amígdala, tálamo anterior, cuerpos mamilares y VTA. El suministro de la radiación generó cambios en la actividad cerebral de los sujetos sanos y, a pesar de haber sido aplicada en el primer tercio de la cabeza, los cambios en los niveles de CCO se detectaron también en regiones distales poniendo de manifiesto el efecto sistémico de la técnica. Investigaciones anteriores han encontrado resultados similares examinando los efectos de la FBM en la modulación de la función cerebral de sujetos sanos con ausencia de síntomas clínicos. En esta línea, en el estudio de Cardoso et al. (2022) se reportó una disminución de la actividad metabólica cerebral en sujetos jóvenes y de avanzada edad sanos tras la aplicación de la FBM. Por otro lado, Wang, et al. (2017) y Zomorrodí et al. (2019) reportaron un aumento de las frecuencias alfa, beta y gamma junto con una reducción de las frecuencias delta y theta en múltiples regiones en una muestra de sujetos humanos. En un estudio reciente de Oh et al. (2022) encontraron, también, una reducción en las concentraciones de la CCO oxidada en un modelo de roedor sin patología. Cabe destacar que la detección de la hemodinámica y el metabolismo cerebral se realizó empleando la espectroscopia de infrarrojo cercano, la cual requiere de uso de anestesia. Es por ello por lo que justifican los resultados obtenidos no solamente debido a la acción de la FBM en la mitocondria, sino también debido a la inhibición del complejo I mitocondrial debido al uso de isoflurano (Oh et al., 2022).

6.5 *Modulación conductual mediante fotobiomodulación y actividad cerebral subyacente*

Finalizado el estudio de las consecuencias de la FBM en la función cerebral de sujetos jóvenes y tras reportar una ausencia de cambios en la actividad metabólica cerebral y en la expresión de genes tempranos, junto con la ausencia en la proliferación de células gliales, se planteó el estudio de su efecto en determinados parámetros conductuales. Del mismo modo, el estudio de los efectos de la FBM en sujetos adultos se continuó con el análisis de sus consecuencias en una tarea de aprendizaje reverso.

Previo al inicio de las investigaciones con sujetos jóvenes y con el objetivo inicial de estudiar el efecto de la FBM en la memoria espacial en ambos sexos, se llevó a cabo un estudio experimental básico para analizar la ejecución de los animales jóvenes en una tarea de memoria de referencia espacial con dos grados diferentes de dificultad (Estudio 3, *objetivo 4*, publicación 4). La memoria espacial es una función cognitiva vital que permite aprender y explorar el contexto que nos rodea. Dicha función depende principalmente del hipocampo el cual interactúa con otras estructuras tales como la PFC para llevar a cabo una navegación espacial exitosa y por tanto una correcta ejecución conductual (Glöckner et al., 2021; Tan et al., 2017). Existe cierto consenso sobre la emergencia de dicha función en roedores en la tercera semana postnatal, alrededor del día 20 o 21 (Akers y Hamilton, 2007; Scott et al., 2011; Wills et al., 2014), sin embargo, el estudio de Tan et al. (2017) mostró la competencia de memoria espacial ya en el DPN 19, al mantener la temperatura del cuerpo de los animales estable y al utilizar un MWM proporcional en medidas al tamaño del animal. A pesar de dichos resultados, la investigación actual no ha encontrado evidencias de la emergencia del aprendizaje espacial antes del DPN 19 (Wills y Cacucci, 2014). En nuestro estudio, tras iniciar el entramiento en el protocolo estándar/fácil de memoria de referencia espacial en el DPN 23, encontramos una disminución de la latencia de escape a lo largo de los días en ambos grupos (machos/hembras) junto con un aprendizaje de la tarea en el cuarto día de protocolo (DPN 27). Adicionalmente, no se encontraron diferencias entre los grupos de ambos sexos en la permanencia en la zona focal, en la zona periférica, en el cuadrante objetivo ni en la distancia recorrida, pero sí se vieron reflejadas en la velocidad, siendo el grupo femenino, F-MRF, más rápido que el masculino, M-MRF.

Por otro lado, el estudio general de la memoria espacial ha mostrado la existencia de dimorfismo sexual en las habilidades espaciales, apoyando una mejor ejecución por parte de los machos en diferentes tipos de memoria tales como la memoria de referencia o la memoria de trabajo (Yagi et al., 2017). Sin embargo, dicha teoría no tiene el apoyo en los resultados de otras investigaciones. Estas posibles desigualdades en la ejecución entre los sexos son asociadas, por algunos autores, al uso de distintos tipos de estrategias para navegar en el espacio, mientras que otros proponen que se deben a la dificultad de la tarea (W. Chen et al., 2020). Así pues, investigaciones previas han mostrado como los machos son mejores en el uso de estrategias aloécnicas (formación de un mapa cognitivo a partir de las relaciones existentes entre los objetos del medio) mientras que las hembras emplearían más estrategias egocéntricas, guiadas por la orientación del cuerpo (a pesar de que no muestran mejores

resultados empleando el componente egocéntrico) (Méndez-López et al., 2009a; C. Wang et al., 2020). En nuestro estudio se utilizaron señales distales situadas alrededor de la piscina, para tratar de evocar el uso de estrategias allocéntricas en la orientación de los animales. La memoria espacial, en concreto, la memoria allocéntrica depende de la corteza entorrinal, del hipocampo y de otras estructuras circundantes mientras que, por el contrario, las representaciones egocéntricas implican el estriado dorsal y varias estructuras interconectadas. El desarrollo de la memoria allocéntrica de las ratas coincide con la maduración funcional de las células de lugar (*place cells*) del hipocampo (Baram et al., 2019). Estas células se disparan en una posición única en el contexto circundante y codifican la ubicación actual del sujeto (Wills et al., 2014). A pesar de que el hipocampo es la estructura fundamental en la memoria allocéntrica, las interacciones entre el hipocampo y la PFC también parecen ser relevantes para codificar los objetivos prospectivos y para lograr la ubicación por parte de las células de lugar durante la navegación (Glöckner et al., 2021). Estas células muestran una sintonía espacial y un disparo estable alrededor del DPN 16 (Baram et al., 2019; Tan et al., 2017), pero la madurez de la red de células de lugar no se alcanza hasta alrededor del DPN 45 (Wills et al., 2014). Las células de lugar también disminuyen su capacidad de disparo a medida que se avanza en la edad, mostrando pérdida de sinapsis funcionales y alteraciones en la regulación del calcio en varias regiones del hipocampo (Glöckner et al., 2021). Varios estudios apoyan que el alcance de la precisión en el disparo por parte de las células de lugar, coincide con el desarrollo de la red de las células de red o de rejilla (*grid cells*) en la corteza entorrinal. Las células de rejilla, organizadas en módulos, se disparan en un patrón hexagonal de localizaciones y su desarrollo contribuye a estabilizar las células de lugar (Baram et al., 2019; Gardner et al., 2022). Por lo tanto, la acción combinada de las células de lugar y de las células de rejilla podría determinar la percepción y el recuerdo de la posición de un sujeto en el contexto circundante (Moser et al., 2008).

Pocos son los estudios que se dirigen al análisis de las diferencias sexuales de la memoria espacial durante el desarrollo postnatal y los encontrados, apoyan una mejor ejecución por parte de los machos jóvenes que las hembras (Chow et al., 2013; Cimadevilla et al., 1999; Conejo et al., 2004). En contraposición a esta teoría, en nuestro estudio no se encontraron diferencias entre los dos sexos en la correcta ejecución de la prueba de memoria de referencia espacial estándar. Ambos grupos alcanzaron el criterio de aprendizaje en el cuarto día (DPN 27) y no mostraron diferencias en las latencias de escape, en la permanencia en la zona focal, en la zona periférica, en el cuadrante objetivo ni en la distancia recorrida. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Akers y Hamilton (2007) los cuales encontraron una ejecución similar entre ambos sexos en una tarea de pistas distales. Cabe destacar que en nuestro estudio las hembras exhibieron una tendencia a permanecer en el cuadrante objetivo desde el día dos (PND25) y también mostraron una mayor velocidad de ejecución. La inconsistencia respecto a las diferencias sexuales no ha sido encontrada únicamente en estudios de memoria de referencia espacial, sino que también se observa en otros tipos de memoria tales como en la evaluación de la memoria de trabajo. En este caso, algunos autores no encuentran diferencias entre machos y hembras

jóvenes mientras que otros apoyan un retraso en la adquisición de la tarea por parte de las hembras, diferencias las cuales desaparecen en la etapa adulta (Conejo et al., 2004; Méndez-López et al., 2009a).

Por otro lado, tal y como se mencionó previamente algunos autores asocian las diferencias sexuales a la dificultad de la tarea. Es por ello que, en nuestra segunda investigación presentada en el estudio III, se estudió la ejecución de machos y hembras en la misma tarea de memoria espacial, pero esta vez, añadiendo el factor de dificultad al disminuir el número de ensayos en la fase de adquisición (dos ensayos). Nuestros resultados pusieron de nuevo de manifiesto la ausencia de diferencias entre machos y hembras en la latencia de escape, en el tiempo de permanencia en la zona focal y periférica, en la velocidad y en la distancia recorrida. Sin embargo, existió una clara ventaja en el caso de las hembras en la adquisición del criterio de aprendizaje. El grupo de hembras, F-MRD, alcanzó el criterio de aprendizaje en el día cuatro (DPN 27), dos días antes que el grupo de machos, M-MRD, (día seis, DPN29). También mostraron una elevada permanencia en el cuadrante objetivo (D) a lo largo de los días. A pesar de la mayor dificultad de la tarea, el grupo F-MRD mantuvo el mismo rendimiento encontrado anteriormente en el protocolo de memoria de referencia fácil. A nuestro parecer, esta podría ser la primera investigación que analiza la ejecución de ratas macho y hembras en edades tempranas en un protocolo de memoria de referencia con mayor grado de dificultad. Nuestros resultados podrían mostrarse en consonancia con varios estudios humanos los cuales hipotetizaron que las diferencias de sexo en tareas de memoria espacial dependen de la dificultad de la tarea, emergiendo dichas controversias cuando aumentan las exigencias de la misma (W. Chen et al., 2020). En nuestro estudio, se encontraron resultados contrarios: la mayor dificultad en la tarea condujo a una peor ejecución de los machos, pero a un mantenimiento de la conducta de las hembras, exhibiendo mismos niveles de éxito que en el protocolo de memoria de referencia espacial fácil analizado previamente. En esta etapa del desarrollo, los protocolos difíciles podrían detectar un desarrollo temprano de las habilidades espaciales de las hembras en comparación con las de los machos.

Algunas de las diferencias sexuales en el rendimiento espacial han sido atribuidas a los efectos de las hormonas gonadales tanto en la edad adulta como en el desarrollo temprano (Méndez-López et al., 2009a). Las hormonas sexuales, especialmente los estrógenos, desempeñan un papel de suma importancia en la memoria espacial de ambos sexos (Taxier et al., 2020). De hecho, la pérdida de memoria espacial vinculada a la edad que se inicia con anterioridad en las hembras de ratón, puede estar relacionada con el cese del ciclo estral (Vorhees y Williams, 2014). Es ampliamente conocido que los estrógenos afectan a la neuroplasticidad de varias regiones del cerebro y concretamente, modulan la formación de espinas dendríticas y sinapsis y también la neurogénesis en la formación del hipocampo (Sheppard et al., 2019). Sin embargo, sus efectos sobre la plasticidad del hipocampo dependen de diversos factores tales como el sexo, la edad, el historial reproductivo, el estado hormonal, etc. (Sheppard et al., 2019). El mejor rendimiento cognitivo encontrado en nuestra investigación podría no estar relacionado con los estrógenos circulantes, ya que las concentraciones son mínimas y se mantienen

equivalentes en ambos sexos hasta la pubertad (DPN 30-DPN 42 en las hembras y DPN 42- DPN 55 en los machos). Adicionalmente, la regulación del ciclo estral y la maduración del esperma ocurren más tardíamente, también en esa etapa de pubertad (Bell, 2018). Otra posible explicación de la disparidad de los resultados en la memoria espacial podría estar relacionada con el uso de protocolos de preentrenamiento que permitirían a los animales familiarizarse con la tarea y reducir el estrés de la natación (Simpson y Kelly, 2012). El uso de estos procedimientos de habituación tiende a reducir las diferencias sexuales y se manifiesta en una menor respuesta de tigmotaxis, conducta típica de estrés en roedores manifestada por una mayor permanencia de los animales próximos a las paredes del aparato, en la zona periférica (Méndez-López et al., 2009a; Simpson y Kelly, 2012). A pesar de la tendencia de una mayor presencia de comportamiento de tigmotaxis en las ratas hembras descrita en la literatura (Simpson y Kelly, 2012), en nuestro estudio, tras analizar en ambos protocolos de diferente dificultad la permanencia en la zona periférica, zona cercana a las paredes, no encontramos diferencias en este parámetro entre ambos sexos. En ambos grupos, se realizó una jornada de habituación previa por lo que esos ensayos de preentrenamiento podrían ser suficientes para reducir el estrés de los animales y conseguir una correcta realización de la tarea, como se ha encontrado en estudios anteriores (Méndez-López et al., 2009a).

Una vez realizado el estudio de la ejecución en el protocolo de memoria de referencia espacial en las muestras de roedores jóvenes, se planteó el estudio del efecto de la FBM en dicha conducta y en la actividad metabólica cerebral subyacente escogiendo como protocolo a estudiar el de mayor dificultad (2 ensayos/6 días). Para ello, se contó con tres grupos diferentes de ambos sexos, el grupo radiado, el grupo dispositivo que servía como control de la técnica, ambos sometidos al protocolo conductual y, por último, un grupo control basal, el cual fue añadido en el estudio de la actividad metabólica con el fin de controlar los niveles basales de los sujetos jóvenes en las unidades de CCO.

En el caso de las muestras de machos jóvenes (Estudio IV), se observó que no existían diferencias significativas entre el grupo MDFB-MR y el grupo MFBM-MR en las latencias de escape, ambos grupos mostraban una reducción a lo largo de los días (Figura 19). Respecto al aprendizaje de la tarea, ambos grupos lograban adquirir el criterio de aprendizaje en el cuarto día de protocolo (DPN 27) (Figura 20). A pesar de no existir diferencias entre el grupo radiado y el grupo control dispositivo, cabe destacar que ambos grupos de machos jóvenes alcanzaron el criterio de aprendizaje dos días antes que el grupo de machos jóvenes controles sometidos al protocolo de memoria de referencia espacial difícil presentados en el estudio III de la presente tesis doctoral. Una de las hipótesis que podría dar cuenta de nuestros resultados sería el posible efecto del estrés producido por el protocolo de inmovilización. El análisis de la permanencia de ambos grupos en la zona periférica y en la zona central del MWM el último día de protocolo (sexto día), manifestó la ausencia de diferencias entre ambos grupos presentando, sin embargo, una mayor permanencia en la zona periférica en comparación con la zona central (Figura 21). Tal y como se expuso previamente, dicho resultado podría ser indicativo de la

presencia de tigmotaxis, medida no invasiva de los niveles de estrés en los protocolos del MWM (Harris et al., 2008). Así pues, el estrés es un potente modulador de la función cognitiva en general, y particularmente, de los procesos de aprendizaje y memoria, presentando un efecto altamente complejo (Loganathan y Rathinasamy, 2015). Algunos estudios muestran como la exposición repetida de los roedores a situaciones de estrés produce déficits en tareas de memoria y aprendizaje. Por otra parte otros estudios han mostrado como la exposición crónica al estrés mejora los componentes de adquisición o rendimiento en tareas de memoria (Gouirand y Matuszewich, 2005). Un estudio de Luine et al. (1996) mostraron como tras 13 días de estrés mediante un método de inmovilización daba lugar a mejoras en la ejecución en el laberinto radial de ocho brazos mientras que dicha inmovilización durante siete días no mostraba afectaciones de la memoria espacial. En nuestro estudio la exposición de sujetos jóvenes al protocolo de inmovilización podría dar lugar a efectos de estrés más destacables a nivel conductual.

Una de las principales consecuencias de la exposición al estrés es la activación del eje hipotalámico-hipofisiario adrenal y la liberación de la hormona glucocorticoide (cortisol en humanos y corticosterona en la mayoría de los roedores) por parte de las glándulas suprarrenales, así como también la liberación de otros mediadores como las catecolaminas y las citoquinas (Czakoﬀ et al., 2010). Dichas moléculas activarían sus respectivos receptores en el cerebro dando lugar a una serie de cambios funcionales como son la alteración de la actividad sináptica, la organización dendrítica y la neurogénesis (Czakoﬀ et al., 2010). Así pues, Chaby et al. (2015) mantienen que los sujetos jóvenes podrían ser más sensibles al estrés por varias razones: en primer lugar, los adolescentes presentarían una mayor producción de glucocorticoides ante estímulos físicos y psicológicos aversivos en comparación con los adultos, en segundo lugar los adolescentes podrían ser más sensibles al efecto de los glucocorticoides en la regulación de los genes y, por último, las áreas cerebrales de los sujetos jóvenes implicadas en la regulación del estrés, el aprendizaje y la memoria tales como el PFC, el hipocampo y la amígdala, se encontrarían aún en un período de desarrollo y maduración por lo que podrían verse más afectadas por la producción de glucocorticoides. De esta manera, aunque algunos tipos de exposiciones a situaciones de estrés crónico disminuyen el rendimiento en tareas de memoria, otras exposiciones facilitan la adquisición o el rendimiento en tareas de memoria siguiendo una curva en forma de U invertida: condiciones de estrés leve o transitorio mejorarían el aprendizaje mientras que el estrés crónico más severo lo perturbaría (Gouirand y Matuszewich, 2005). Por tanto, la exposición a estrés elevado o a una situación que conduce a una alta producción de glucocorticoides afectaría al aprendizaje y a la memoria pero sin embargo, dicho efecto dependería entonces del tipo, duración e intensidad del estrés (Loganathan y Rathinasamy, 2015). La exposición a la situación de inmovilización en nuestro estudio podría suponer una situación estresante, reflejada en los niveles de tigmotaxis, la cual mejoraría la ejecución de los machos jóvenes dando lugar a un aprendizaje precoz. Sin embargo, el análisis individual del porcentaje de permanencia en la zona periférica mostró que el último día del protocolo, el porcentaje del grupo MDFBM-MR era del 50,58% y el del grupo radiado fue del 45,39%. Al

comparar dichos porcentajes con los resultados obtenidos en el estudio III, los machos controles pertenecientes a dicha investigación previa, mostraron un porcentaje de permanencia en la zona periférica el día sexto del 58,17% exhibiendo entonces, unos mayores niveles de tigmotaxis que dichos grupos sometidos al protocolo de FBM. Por tanto, parecería suponer que el nivel de estrés no sería el causante de la mejora reportada en el aprendizaje. Adicionalmente, algunos autores mantienen que los niveles de tigmotaxis correlacionan positivamente con los niveles de corticosterona durante la ejecución de las pruebas en el MWM y adicionalmente, con los niveles de ansiedad (Harris et al., 2008). No obstante, reafirmando dicha falta de relación entre el estrés y el mejor rendimiento reportado en el MWM, el estudio VI mostró la ausencia de diferencias entre los grupos sometidos al protocolo de FBM y el grupo control aprendizaje en las variables que evaluaban conductas de tipo ansioso.

Dado que el estrés del protocolo no parece ser el factor explicativo de los resultados obtenidos otra hipótesis que podría dar cuenta de las mejorías obtenidas sería el efecto de la habituación o familiaridad al experimentador. Así pues, los animales sometidos al protocolo de FBM, a diferencia de los sujetos en el estudio III, permanecieron un mayor periodo de tiempo en contacto con el experimentador. La literatura previa establece que uno de los factores más importantes en la variación de los resultados conductuales es el investigador, dadas las diferencias que se establecen en el manejo de los animales (Fridgeirsdottir et al., 2014). El manejo postnatal ha mostrado mejorías en la ejecución de los roedores en diferentes protocolos y pruebas conductuales tales como el MWM (Plescia et al., 2014; Thompson y Lippman, 1975). Así pues, estudios previos como el estudio de Fridgeirsdottir et al. (2014) mostraron como la manipulación de los ratones produjo un aprendizaje precoz en comparación con el grupo de ratones no manipulados los primeros días de ejecución en el MWM. Estudios con sujetos jóvenes manipulados tras el destete han mostrado un incremento en las conductas exploratorias (Thompson y Lippman, 1975). Dichos autores mantienen que la habituación a la manipulación tanto después del destete como en la edad adulta disminuiría la emocionalidad y aumentaría el comportamiento exploratorio (Thompson y Lippman, 1975). En nuestro estudio, los sujetos que fueron sometidos al protocolo de FBM se mantuvieron inmovilizados por parte del investigador durante 30 minutos al día por un período de siete días (un día de habituación + seis de FBM o dispositivo). Dicha inmovilización era realizada de manera manual por parte del investigador por lo que los animales permanecían durante todo el tiempo en contacto directo con el investigador. Al igual que en los estudios previos, dicha familiarización podría haber conducido a una mejor ejecución en el MWM y, por tanto, a una mejora en el aprendizaje del protocolo de memoria de referencia espacial.

Respecto a la actividad metabólica subyacente, se encontró una disminución de la actividad metabólica cerebral en el grupo MFBM-MR con respecto al grupo control en todas las subáreas del hipocampo y en los núcleos talámicos, junto con una reducción significativa de actividad en AD en el grupo MDFBM-MR en comparación con MC (Figura 24). Cabe destacar que, a pesar de no existir diferencias significativas entre los grupos en el resto de las áreas, se observó una tendencia a manifestar

menores unidades de CCO en los grupos MDFBM-MR y MFBM-MR sometidos al protocolo conductual de memoria de referencia, siendo el grupo MFBM-MR el que mostraba un mayor descenso. Así pues, los cambios en la CCO reflejan las modificaciones de la actividad metabólica neuronal debido a los procesos de aprendizaje (Sakata et al., 2005). La evaluación de los niveles de CCO por parte de numerosos estudios ha demostrado que la demanda de energía cerebral implicada en la actividad neuronal durante una tarea conductual específica se incrementa en las áreas cerebrales que participan en la ejecución de la tarea y, además, dicha actividad está relacionada con la dificultad de la misma (Conejo et al., 2010; Méndez-López et al., 2010; Poremba et al., 1998; Sakata et al., 2005), mientras que por el contrario tras la consecución del aprendizaje, se produce una reducción de los costes metabólicos, aumentando la eficiencia de las áreas implicadas en la tarea (Méndez-López et al., 2009b). Así pues, en el estudio de Olson et al. (2006) mostraron la existencia de una correlación entre la disminución del flujo sanguíneo y la mejoría en una tarea de tiempo de reacción y Gobel et al. (2011) hallaron un patrón de desactivación de varias regiones cerebrales, en la mejor de la eficiencia del procesamiento visomotor en una tarea de aprendizaje.

En nuestro estudio, se observó un claro patrón de reducción de la CCO en los grupos que habían realizado el protocolo de aprendizaje. El criterio de aprendizaje fue alcanzado en el día cuarto de la tarea y el análisis de la actividad metabólica se realizó dos días después, en el sexto día. Tras la ejecución correcta de la prueba, la tarea sería percibida por los sujetos como un elemento de fácil superación, por lo que requeriría un menor esfuerzo reflejado en la actividad metabólica subyacente mediante una reducción en los costes metabólicos incrementando así la eficiencia de las regiones implicadas en la tarea de memoria. Cabe destacar que el grupo MFBM-MR mostró una reducción significativa de la actividad en las regiones hipocampales CA1, CA3 y DG y en el tálamo anterior en comparación con el grupo control (Figura 24). El hipocampo, junto con otras regiones cerebrales, es reconocido como una estructura límbica cerebral que sustenta múltiples formas de memoria y, específicamente, se ha visto que es especialmente relevante en la memoria espacial (Tan et al., 2017). El tálamo anterior, el cual también forma parte del sistema límbico, también está relacionado con la memoria espacial, al contribuir a dicha función mediante su conexión recíproca con las células hipocampales, siendo considerado como la “extensión del sistema hipocampal” debido a su papel esencial en la ejecución de una gran variedad de tareas de memoria espacial (Jankowski et al., 2013; Méndez-López et al., 2009b). Así pues, en nuestra investigación todo parece indicar que, a pesar de existir un patrón de disminución de unidades CCO tras la realización de la tarea, la FBM podría haber tenido un mayor efecto en aquellas regiones cuyo papel fue fundamental en la tarea de memoria de referencia espacial.

Continuando con el estudio del efecto de la FBM en la conducta de sujetos jóvenes, la misma investigación previa fue llevada a cabo, esta vez, utilizando muestras de roedores jóvenes hembras (Estudio V) con el objetivo de evaluar la posible afectación diferencial en cada uno de los sexos. Los resultados mostraron ausencia de diferencias entre los grupos FDFBM-MR y FFBM-MR en las

latencias de escape existiendo en ambos casos una disminución de estas a medida que los ensayos avanzaban en el protocolo conductual (Figura 22). Por otra parte, ambos grupos alcanzaron el criterio de aprendizaje el cuarto día de la prueba, mismo día que las hembras controles pertenecientes al estudio III (Figura 23). Al contrario que en el caso de los machos jóvenes, las hembras no mostraron ninguna mejoría en la ejecución en el protocolo de memoria de referencia. Esto muestra que el efecto de la FBM, tanto de la propia radiación como del protocolo de aplicación de la técnica, no produjo efectos aparentes detectados con nuestra evaluación conductual.

Dada la posibilidad de que el desarrollo de las habilidades espaciales tenga lugar antes en hembras que en machos, sería necesario el análisis más detallado de la conducta de dicha muestra o la evaluación de otras funciones de mayor exigencia cognitiva para detectar las posibles consecuencias de la FBM. No obstante, a pesar de no encontrar diferencias a nivel conductual entre los grupos, el análisis de la actividad metabólica muestra diferencias significativas entre los grupos. Así pues, los grupos FDFBM-MR y FFBM-MR mostraron elevados niveles de unidades CCO que el grupo FC en la corteza orbitofrontal, en regiones prefrontales, en el cuerpo estriado, núcleos talámicos, amígdala, subdivisiones hipocampales CA1 y CA3 y en la RSG (Figura 25). Dichas diferencias reportadas podrían ser explicadas debido al procedimiento de aplicación de la TFBM, el cual conllevaría una situación de estrés que conduciría a unos mayores niveles de actividad en el caso de las hembras. Así pues, estudios previos sugieren la existencia de variaciones en los mecanismos responsivos ante situaciones de estrés entre machos y hembras (Zavala et al., 2011).

De forma acorde con nuestros resultados, el estudio de Mällo et al. (2009) mostró un patrón de actividad neuronal regional diferente entre machos y hembras ante una situación de estrés. Dichos autores pusieron de manifiesto la presencia de mayores niveles de metabolismo oxidativo en hembras en comparación con los machos en la amígdala y en las regiones límbicas, junto con una disminución de la actividad metabólica en varias regiones corticales y en el tronco cerebral (Mällo et al., 2009). Por tanto, al igual que en dicha investigación, las hembras de nuestro estudio sometidas a inmovilización debido al protocolo de aplicación de la FBM, tanto el grupo FFBM-MR que recibió la radiación, como el grupo MDFBM-MR que fue expuesto a las mismas condiciones, pero con el aparato apagado y sin emisión, exhibieron mayores niveles de actividad metabólica en las áreas límbicas examinadas que el grupo FC que no fue sometido a la situación de estrés. Este efecto diferencial del estrés ha sido también reportado por otras investigaciones las cuales han mostrado una mayor activación de neuronas que expresan glucocorticoides, junto con mayores niveles de corticosterona en situaciones basales y en situaciones de estrés en ratas hembras en comparación con machos (Galea et al., 1997; Zavala et al., 2011). Es por ello que nuestros resultados podrían ser explicados debido a una mayor activación general por parte de las hembras sometidas a la situación estresante, la cual se ve reflejada en unos mayores niveles de actividad metabólica. Dicho efecto del evento estresante, sin embargo, no se vio reflejado en la ejecución de la tarea de memoria de referencia espacial de dichas hembras. Las hembras jóvenes del

estudio V sometidas al protocolo de TFBM, alcanzaron el criterio de aprendizaje el día cuarto de entrenamiento, al igual que las hembras controles del estudio III. Dicha correcta ejecución podría ser indicativa de la ausencia de dificultad para superar la tarea en esta muestra de sujetos, por lo que el efecto del estrés podría no ser un factor decisivo en la ejecución de la tarea de memoria de referencia espacial utilizada y pruebas más sensibles o con mayor exigencia cognitiva podrían llegar a dar cuenta del efecto de la inmovilización realizada. Adicionalmente, cabe destacar que en nuestro estudio encontramos mayores niveles de unidades de CCO en los núcleos amigdalinos LaA y BLA del grupo radiado en comparación con el grupo FDFBM-MR y el grupo FC. La amígdala es una estructura cerebral la cual es activada ante estímulos estresantes y conduce a una serie de reacciones de afrontamiento de la situación las cuales incluyen respuestas emocionales, autonómicas y neuroendocrinas (Mitsushima et al., 2006). No es de extrañar, entonces, la presencia de alta actividad amigdalina en nuestros animales dada la situación de inmovilización a la que fueron sometidos.

El estudio I del bloque II el cual será discutido más adelante, puso de manifiesto el efecto diferencial de la FBM en redes cerebrales activas, observando un mayor efecto de la TFBM en aquellas regiones las cuales se encontraban activadas en la realización de una tarea espacial. Este efecto potenciador de la FBM en las regiones activas justificaría la mayor actividad de los núcleos amigdalinos encontrada en el grupo FFBM-MR: la amígdala estaría notablemente más activada ante la situación de inmovilización y la aplicación de la FBM produciría un efecto significativamente mayor en dicha estructura conduciendo así, a un aumento de su actividad metabólica. El mismo patrón de mayor actividad en el grupo FFBM-MR en comparación con los otros dos grupos, lo encontramos en la corteza RSA. Estudios previos han mostrado la relevancia de la RSA en la memoria espacial, concretamente, en la navegación guiada por elementos visuales del contexto (Pothuizen et al., 2008; Vann et al., 2009). La relevancia de dicha estructura en la orientación espacial aloécéntrica, estrategia potenciada en nuestro estudio al usar pistas distales para guiar los movimientos de los sujetos, junto con su posición dorsal y cercana a la corteza prefrontal, lugar de aplicación de la FBM, explicarían la mayor actividad encontrada en los grupos radiados. Así pues, dicha estructura mostraría un alto grado de activación al ejecutar la tarea de memoria de referencia espacial, actividad que se vería potenciada debido a la cercanía de la aplicación de la FBM y dadas las evidencias previas del efecto diferencial de la FBM en aquellas áreas activadas durante la tarea.

El estudio del efecto de la FBM en sujetos jóvenes se continuó con la evaluación de las conductas de tipo ansioso, la actividad locomotora y del reconocimiento social en una muestra de sujetos machos. Así pues, en primer lugar, la evaluación de las conductas ansiosas en el laberinto en cero elevado no mostró diferencias entre los tres grupos (MCC-AMS, MDFBM-AMS y MFBM-AMS) en ninguna de las variables estudiadas: distancia total recorrida, velocidad media, número de heces y porcentaje de ansiedad (Figura 26). El laberinto en cero elevado es un paradigma conductual que permite evaluar la ansiedad en roedores y se basa en la mayor tendencia a permanecer en los lugares cerrados y oscuros

(brazos cerrados) en comparación con las áreas abiertas (brazo abiertos) (Dawson y Tricklebank, 1995). La ausencia de diferencias entre grupos en nuestra investigación pone en evidencia la no manifestación de ansiedad tras el protocolo de aplicación de la FBM. Así pues, a pesar de inmovilizar a los animales diariamente, los grupos MDFBM-AMS y MFBM-AMS no mostraron mayores niveles de ansiedad que el grupo MCC-AMS. Del mismo modo, tampoco se vio reflejado el efecto de la radiación en dichas conductas de tipo ansioso.

Por otro lado, el estudio de la actividad y la coordinación motora en el rotarod no mostró diferencias significativas entre los grupos en la segunda fase del protocolo, al añadir la variable aceleración, pero si se encontraron diferencias en la primera fase donde la velocidad se mantuvo constante (Figura 27). En dicha primera fase, el grupo MDFBM-AMS mostró una mayor permanencia en el aparato que el grupo control. Cabe destacar, además, que, en todas las variables estudiadas, los grupos MDFBM-AMS y MFBM-AMS mostraron una mayor tendencia a permanecer más tiempo en el aparato exhibiendo una posible leve mejoría con respecto a el grupo MCC-AMS en la coordinación y la actividad locomotora. Tal y como se expuso previamente, estos resultados pueden derivar de la habituación de los animales al experimentador y a situaciones de mayor actividad. Los animales sometidos al protocolo de la FBM permanecieron un mayor tiempo fuera de la jaula y contaron con más oportunidades para entrenar su capacidad locomotora lo que puede verse reflejado en el rotarod. Se puede afirmar entonces, que la FBM no mostró efectos en la coordinación ni en la actividad locomotora de los machos jóvenes evaluado en el rotarod.

Finalmente, se estudió el efecto de la técnica en el reconocimiento social mediante el uso del test de las tres cámaras, paradigma conductual utilizado para evaluar la preferencia de los roedores por la novedad social. Está basado en el Test de Interacción Social de Crawley, pero con una importante modificación del estímulo social familiar, siendo en este caso, un congénere de la misma jaula que el animal que se está evaluando (C. J. W. Smith et al., 2015). Los resultados mostraron ausencia de diferencias entre los grupos en la distancia recorrida y en la velocidad media, pero, sin embargo, el grupo MFBM-AMS mostró un porcentaje de preferencia por la novedad social significativamente menor que el grupo MCC-AMS (Figura 28). En la actualidad, no se encuentra literatura que analice los efectos de la FBM en los aspectos sociales y únicamente fue encontrado el artículo de Hosseini et al. (2022) los cuales, al igual que en nuestro estudio, evaluaron los efectos de la FBM a nivel social en un modelo de roedor envejecido utilizando para ello, el test de tres las cámaras. Estos autores describieron una mejoría en el índice de sociabilidad de los sujetos envejecidos tras la TFBM. En nuestro caso, al contrario que las consecuencias reportadas por Hosseini et al. (2022), no se encontró mejoría en los aspectos sociales tras la aplicación de la FBM sino que los sujetos radiados parecían presentar un menor interés por el congénere nuevo. De nuevo, se puede observar que en ambos grupos sometidos a la técnica de FBM, MDFBM-AMS y MFBM-AM, existía una tendencia menor que en el grupo MCC-AMS a interactuar con el congénere desconocido. Al igual que lo expuesto anteriormente, el protocolo de

aplicación, así como la mayor manipulación e interacción con el investigador y las variables del medio, podrían influir en dicha reducción. Así pues, los sujetos eran expuestos a un contexto nuevo durante la técnica lo cual incluía nueva ubicación, sonidos, olores, elevada manipulación por parte de los investigadores, etc. Todos estos factores podrían haber sido de interés al inicio del protocolo pero, tras los primeros días, los animales se habrían habituado a esta continua estimulación, condicionando así sus comportamientos de exploración y búsqueda en contextos y ante factores novedosos. Por tanto, la habituación a los contextos y eventos novedosos podría ser la causa de la reducción por la novedad social encontrada en los dos grupos sometidos a la técnica. Sin embargo, sería necesario evaluar en profundidad mediante el uso de otros protocolos de evaluación de los aspectos sociales, el efecto de la técnica y de su protocolo de administración.

Finalmente, en el estudio I (Publicación 3) del bloque II, posterior al análisis del efecto de la FBM en sujetos controles adultos, se evaluaron los cambios en la actividad de la CCO durante el uso de la FBM en animales cuyas redes cerebrales habían sido activadas al ser sometidos a una tarea de aprendizaje reverso. Tal y como se describió anteriormente, la CCO refleja modificaciones de la actividad metabólica neuronal debido a los procesos de aprendizaje (Sakata et al., 2005). Así pues, la demanda de energía cerebral implicada en una tarea conductual específica se incrementa en las áreas cerebrales que participan en la ejecución de la tarea (Conejo et al., 2010; Méndez-López et al., 2010; Poremba et al., 1998; Sakata et al., 2005). Por el contrario, se ha comprobado que tras la consecución del aprendizaje se produce una reducción de los costes metabólicos, aumentando la eficiencia de las áreas implicadas en la tarea (Méndez-López et al., 2009b). Siguiendo dichas premisas, en nuestro estudio encontramos que, a pesar de no existir diferencias en la ejecución de la prueba de aprendizaje reverso, el grupo BC+PBM exhibió menores niveles de CCO en varias áreas límbicas implicadas en la ejecución de la tarea de memoria tales como MS, ENT, CA1, CA3, CeA y SuM, junto con niveles de actividad más elevados en AccC en comparación con el grupo BC. Las regiones hipocámpales (CA1, CA3 y ENT) son necesarias para el aprendizaje espacial (Banqueri et al., 2017; Conejo et al., 2007) y presentan conexiones con el SuM a través del fórnix (Bergado Acosta et al., 2017). El hipocampo, además, envía y recibe aferencias del MS, estructura que también envía proyecciones al SuM, generando, entonces, una red espacial activa (Aggleton et al., 2010; Banqueri et al., 2017). En nuestro estudio, encontramos también una reducción de la actividad metabólica en la amígdala. Dicha región podría estar relacionada con los aspectos emocionales de la tarea y los niveles más bajos podrían indicar menor grado de estrés o de ansiedad en el grupo BC+PBM (Conejo et al., 2010).

Por lo tanto, el uso de la FBM podría haber facilitado la ejecución de la tarea al provocar una disminución de la actividad metabólica en el grupo BC+PBM mejorando la eficiencia de esta red activa del cerebro implicada en la tarea de memoria espacial. Resultados similares fueron encontrados por Méndez-López et al. (2010) los cuales hallaron reducción de la actividad CCO en varias regiones implicadas en una tarea de memoria, junto con una mejoría conductual, al someter a los animales a un

ensayo adicional en la tarea de memoria a realizar. Estos resultados sustentan la hipótesis de que la ejecución más fácil de una tarea podría estar también relacionada con cambios cerebrales. Así pues, en nuestro estudio, a pesar de que los animales fueron sometidos a una tarea de aprendizaje reverso de alta dificultad, realizaron ocho ensayos antes del ensayo de transferencia. El gran número de ensayos fue suficiente entrenamiento para desempeñar la tarea correctamente y dicho sobreentrenamiento podría explicar por qué no observamos diferencias conductuales entre los grupos BC y BC+PBM que muestren de forma evidente el efecto de la FBM en las redes activas del cerebro. Por último, en el grupo BC+PBM se encontró un aumento de la actividad CCO en el AccC. Esta área está relacionada con el *relief learning*, inducción de estados emocionales positivos debido a la asociación de un estímulo neutro con el cese de un evento aversivo (Banqueri et al., 2017; Bergado Acosta et al., 2017). Los niveles más elevados de CCO en este área podrían indicar una mayor atribución de refuerzo a la plataforma oculta por parte del grupo BC+PBM lo que conduciría el aumento sus conductas de búsqueda. Estos cambios metabólicos encontrados por el uso de la técnica podrían explicar la diferencia marginal encontrada en las tareas conductuales ya que, a pesar de la correcta ejecución por parte de ambos grupos en la tarea de aprendizaje espacial reverso, el grupo BC+PBM mostró una reducción significativa de las latencias entre el día 1 y el día 4 mientras que en el grupo BC se mantuvo invariable durante todos los días.

En último lugar, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, comparamos la actividad metabólica oxidativa de los grupos C, BC y BC+PBM. Los resultados mostraron un patrón similar de reducción de la CCO en el grupo BC en comparación con el grupo C en varias áreas límbicas: regiones frontales, estriado, CA1, amígdala, AD, AV y cuerpos mamilares. Del mismo modo, el grupo BC+PBM también mostró niveles más bajos de CCO en comparación con el grupo C, pero, en este caso, en un mayor número de regiones límbicas: regiones prefrontales, STD, AccSh, septum, ENT, hipocampo, amígdala, tálamo y cuerpos mamilares. Tal y como se describió anteriormente, todas estas regiones están implicadas en tareas de memoria espacial por lo que los grupos que ejecutaron y alcanzaron el aprendizaje de la tarea, mostraron menores niveles de CCO. Adicionalmente, el grupo BC+PBM mostró más diferencias con el grupo C que con el grupo BC lo que indicaría que la FBM provoca cambios en muchas regiones implicadas en la tarea, haciéndolas más eficientes y reduciendo el coste metabólico. Por último, encontramos una reducción de los niveles de CCO en el grupo BC+PBM en MS, ENT, CA1, CA3, BLA y SuM en comparación con el grupo BC. En concordancia con los resultados descritos en nuestra investigación, en el estudio de Khoury et al. (2021) hallaron una reducción de la actividad cerebral en varias regiones cerebrales implicadas en una de las tareas realizadas por los sujetos. En consecuencia, dichos autores sugirieron que la luz NIR mostraría efectos significativos en la actividad cerebral pero sólo cuando la región esta funcionalmente activa ejecutando una tarea específica y que esta reducción podría reflejar un efecto protector de la FBM (Khoury et al., 2021). Acorde con dicha hipótesis y teniendo en cuenta el conjunto de nuestros resultados, la FBM facilitó la ejecución de la tarea de memoria espacial y disminuyó la actividad metabólica en el sistema límbico que estaba activo

en la ejecución de la tarea espacial dejando ver el efecto diferencial de la FBM en redes cerebrales activas.

6.6 Limitaciones del trabajo y perspectiva futura

Tras la discusión de los estudios realizados en esta tesis doctoral, cabe destacar las limitaciones presentadas en nuestras investigaciones, así como también las posibles líneas de investigación futuras que explorarían en mayor profundidad los posibles efectos de la FBM en sujetos en la etapa postnatal.

Una de las limitaciones presentes en el estudio I del bloque I sería la utilización de escasos métodos para detectar los cambios en la actividad cerebral. El análisis de las variaciones de CCO y de c-Fos podría no ser suficiente para detectar cambios en los cerebros jóvenes y sanos y, por tanto, la adición de otros métodos funcionales o conductuales podría ayudar en la comprobación de los posibles efectos. Por otro lado, a pesar de incluir un grupo de dispositivo sometido a las mismas condiciones que el grupo de FBM, pero sin radiación, en un intento por controlar cualquier influencia estresante, la inclusión de un grupo de control positivo podría ser necesario para ratificar que los métodos histológicos utilizados son sensibles a cambios.

El estudio de la seguridad de la técnica presente en el estudio II, requeriría de la evaluación más exhaustiva de otros factores implicados en la respuesta ante daño. Así pues, podría ser interesante el análisis de los niveles de citocinas (proinflamatorias) tales como la interleucina-6, el factor de necrosis tumoral o la interleucina-1 beta. Además, podría plantearse el estudio de la determinación taxonómica del microbiota intestinal con el fin de evaluar si el efecto de la FBM a nivel cerebral conllevaría consecuencias periféricas en el sistema nervioso. Dichos planteamientos deberían llevarse a cabo no solamente en muestras de machos, sino también en hembras dado el efecto diferencial de la FBM presentado en esta tesis doctoral.

En los estudios IV y V se estudió el efecto de la FBM en un protocolo de memoria de referencia espacial ejecutado por machos y hembra jóvenes durante el mismo período de aplicación de la técnica. La limitación presente en estos estudios sería la falta de un grupo control aprendizaje en cada uno de los sexos el cual sería sometido a las mismas pruebas conductuales con el objetivo de obtener una medida basal de ejecución de los sujetos en las mismas condiciones. Adicionalmente, dados los resultados obtenidos, destacablemente en el caso de los machos, las futuras investigaciones podrían dirigirse al estudio del efecto de la FBM en las funciones cognitivas en la edad adulta tras su aplicación en el período juvenil. En el caso de las hembras, tras reportar las posibles consecuencias de la situación de inmovilización en la actividad cerebral, resultaría necesario la evaluación de otras funciones cognitivas mediante el uso de tareas más sensibles a los efectos del estrés, con el fin de detectar la posible existencia de efectos positivos/deletéreos tras la aplicación de la FBM. Además, resultaría de sumo interés la evaluación de las conductas de tipo ansioso o de estrés para confirmar las consecuencias de la aplicación de la FBM en dichos aspectos. Dado el comportamiento y el efecto neural diferencial

Discusión

manifestado en ambos sexos, nuestros estudios reafirman entonces, la necesidad de inclusión de muestras de hembras en los estudios sobre la eficacia de la FBM, como es prescriptivo en la actualidad para la mayoría de los estudios desarrollados en las Neurociencias.

Finalmente, a pesar de los resultados positivos obtenidos, se plantea la posibilidad de utilizar en futuros estudios un método adicional de aplicación de la técnica que evite la inmovilización de los sujetos para su aplicación y permita su total movilidad.

7 Conclusiones

1. El análisis de la literatura científica indica que la fotobiomodulación produce efectos positivos en la modulación de las funciones cognitivas en sujetos sanos y logra beneficios evidentes en sujetos que padecen trastornos psicológicos, siendo de suma importancia la elección de los parámetros de estimulación.
2. La aplicación de la técnica de fotobiomodulación con una longitud de onda de 810 nanómetros durante cinco días en el área frontal de ratas jóvenes sanas macho y hembra no muestra cambios en la actividad metabólica oxidativa ni en la producción de proteína c-Fos en la corteza prefrontal ni en el hipocampo.
3. No se encuentran cambios en la proporción de astrocitos y microglía en el córtex prefrontal de ratas jóvenes sanas macho tras la aplicación de la técnica de fotobiomodulación de 810 nanómetros en el área frontal durante cinco días.
4. Ratas jóvenes sanas de ambos sexos adquieren el criterio de aprendizaje en una tarea estándar de memoria espacial de referencia en el día postnatal 27 con ausencia de dimorfismo sexual en este parámetro.
5. En una tarea de memoria de referencia espacial difícil, las ratas hembra sanas jóvenes muestran un mejor rendimiento que los machos.
6. La fotobiomodulación de 810 nanómetros mediante inmovilización, simultánea a la realización de una tarea de memoria de referencia espacial difícil en machos jóvenes sanos, produce una reducción de la actividad metabólica oxidativa cerebral en el grupo radiado con respecto al grupo control en el hipocampo y núcleos talámicos, sin diferenciarse del control de aplicación, con el que no presenta diferencias conductuales. La fotobiomodulación y la inmovilización mejoran la adquisición de la memoria de referencia espacial.
7. La fotobiomodulación de 810 nanómetros mediante inmovilización, simultánea a la realización de una tarea de memoria de referencia espacial difícil en hembras jóvenes sanas, no mejora la adquisición del aprendizaje y manifiesta, junto con el control de dispositivo, un aumento de la actividad metabólica oxidativa cerebral en diversas regiones del sistema límbico, sin diferenciarse conductualmente de este. El efecto de la fotobiomodulación sobre el metabolismo oxidativo cerebral actúa exclusivamente sobre la amígdala y la corteza retrosplenial agranular durante la tarea de memoria de referencia.
8. La radiación fotobiomoduladora con 810 nanómetros mediante inmovilización de sujetos machos sanos jóvenes da lugar a la ausencia de conductas de tipo ansioso, sin afectar a la locomoción, y a una disminución en la preferencia por la novedad social, sin diferenciarse del grupo de aplicación.
9. El uso de la fotobiomodulación con 1.064 nanómetros en sujetos adultos sanos produce una disminución de la actividad metabólica oxidativa en diversas regiones del sistema límbico tales como el estriado, septum medial, hipocampo, amígdala, tálamo, cuerpos mamilares y corteza entorrinal.

Conclusiones

10. La fotobiomodulación con 1.064 nanómetros en sujetos adultos sanos sometidos a una tarea de aprendizaje reverso reduce las latencias de aprendizaje y la actividad metabólica oxidativa cerebral en diversas regiones del sistema límbico tales como el septum medial, corteza entorrinal, CA1 y CA3, la amígdala y los cuerpos mamilares.

8 Conclusions

1. The analysis of the literature shows that photobiomodulation produces positive effects on several cognitive functions of healthy subjects and achieves evident benefits in subjects with psychological disorders, taking always into account the importance of the stimulation parameters.
2. The application of 810-nanometres photobiomodulation technique for five days in the frontal area of healthy male and female young rats shows no changes in the metabolic activity nor c-Fos protein production in the prefrontal cortex and the hippocampus.
3. No changes in the density of astrocytes and microglia in the prefrontal cortex of young healthy male rats are found after the application of 810-nanometre photobiomodulation technique for five days in the frontal region.
4. Healthy young rats of both sexes acquire the learning criterion in a standard reference spatial memory task on postnatal day 27 with a lack of sexual dimorphism.
5. In a difficult spatial reference memory task, young healthy female rats show better performance than males.
6. The 810-nanometre restraining photobiomodulation protocol, simultaneous to the execution of a difficult spatial reference memory task in healthy young males, produces a reduction of brain oxidative metabolic activity in the irradiated group when compared to the control group in the hippocampus and thalamic nuclei, with no differences comparing to the application control group, with respect to whom it does not show behavioural differences. Both photobiomodulation and restrain groups improve the acquisition of spatial reference memory.
7. The application of the 810-nanometre restraining photobiomodulation protocol, simultaneous to the execution of a difficult spatial reference memory task in healthy young females, does not improve the acquisition of learning criterium and shows, together with the device control group, an increase in brain oxidative metabolic activity in some regions of the limbic system, without behavioural differences. The effect of photobiomodulation on brain oxidative metabolism takes action exclusively on the amygdala and agranular retrosplenial cortex during the spatial reference memory task.
8. The 810-nanometre restraining photobiomodulation protocol application in young healthy male subjects results in a lack of anxiety-like behaviours, no locomotion affectation and a decrease in the social novelty preference in the irradiated group relative to the control group.
9. The use of 1,064-nanometre photobiomodulation in healthy adult subjects causes a decrease in the oxidative metabolic activity of several regions of the limbic system (striatum, medial septum, hippocampus, amygdala, thalamus, mammillary bodies and entorhinal cortex).
10. The 1,064-nanometre photobiomodulation in healthy adult subjects subjected to a reversal-learning task reduces learning latencies and brain oxidative metabolic activity in some regions of the limbic system (medial septum, entorhinal cortex, CA1 and CA3, amygdala and mammillary bodies).

9 Referencias

- Aggleton, J. P., O'Mara, S. M., Vann, S. D., Wright, N. F., Tsanov, M., & Erichsen, J. T. (2010). Hippocampal-anterior thalamic pathways for memory: Uncovering a network of direct and indirect actions. *European Journal of Neuroscience*, *31*(12), 2292–2307. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07251.x>
- Akers, K. G., & Hamilton, D. A. (2007). Comparison of developmental trajectories for place and cued navigation in the Morris water task. *Developmental Psychobiology*, *49*(6), 553–564. <https://doi.org/10.1002/dev.20227>
- Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Glia-more than just brain glue. *Nature*, *457*(February), 675–677. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/457675a>
- Arias, J. L., Méndez, M., Martínez, J. Á., & Arias, N. (2020). Differential effects of photobiomodulation interval schedules on brain cytochrome c-oxidase and proto-oncogene expression. *Neurophotonics*, *7*(04), 1–11. <https://doi.org/10.1117/1.nph.7.4.045011>
- Arias, N., Méndez, M., & Arias, J. L. (2016). Low-light-level therapy as a treatment for minimal hepatic encephalopathy: behavioural and brain assessment. *Lasers in Medical Science*. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-2042-4>
- Arle, J. E., & Shils, J. L. (2011). *Essential Neuromodulation* (J. Arle & J. Shils (eds.)). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-381409-8.00022-x>
- Ashkenazy, T., Einat, H., & Kronfeld-Schor, N. (2009). Effects of bright light treatment on depression- and anxiety-like behaviors of diurnal rodents maintained on a short daylight schedule. *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.03.005>
- Banqueri, M., Martínez, J. A., Prieto, M. J., Cid-Duarte, S., Méndez, M., & Arias, J. L. (2019). Photobiomodulation rescues cognitive flexibility in early stressed subjects. *Brain Research*, 146300. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146300>
- Banqueri, M., Méndez, M., & Arias, J. L. (2017). Spatial memory-related brain activity in normally reared and different maternal separation models in rats. *Physiology & Behavior*, *181*(September), 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.09.007>
- Banqueri, M., Méndez, M., & Arias, J. L. (2018). Why are maternally separated females inflexible? Brain activity pattern of COx and c-Fos. *Neurobiology of Learning and Memory*, *155*(June), 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.06.007>
- Baram, T. Z., Donato, F., & Holmes, G. L. (2019). Construction and disruption of spatial memory

- networks during development. *Learning and Memory*, 26(7), 206–218. <https://doi.org/10.1101/lm.049239.118>
- Barrett, D. W., & Gonzalez-Lima, F. (2013). Transcranial infrared laser stimulation produces beneficial cognitive and emotional effects in humans. *Neuroscience*, 230, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.11.016>
- Bathini, M., Raghushaker, C. R., & Mahato, K. K. (2020). The Molecular Mechanisms of Action of Photobiomodulation Against Neurodegenerative Diseases: A Systematic Review. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-01016-9>
- Bell, M. R. (2018). Comparing postnatal development of gonadal hormones and associated social behaviors in rats, mice, and humans. *Endocrinology*, 159(7), 2596–2613. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00220>
- Bergado Acosta, J. R., Kahl, E., Kogias, G., Uzuneser, T. C., & Fendt, M. (2017). Relief learning requires a coincident activation of dopamine D1 and NMDA receptors within the nucleus accumbens. *Neuropharmacology*, 114, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.11.022>
- Berman, M. H., Hamblin, M. R., & Chazot, P. (2017). Photobiomodulation and Other Light Stimulation Procedures. In *Rhythmic Stimulation Procedures in Neuromodulation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803726-3.00004-3>
- Bertani, D. E., De Novellis, A. M. P., Farina, R., Latella, E., Meloni, M., Scala, C., Valeo, L., Galeazzi, G. M., & Ferrari, S. (2021). “Shedding Light on Light”: A Review on the Effects on Mental Health of Exposure to Optical Radiation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijerph18041670>
- Björn, O. L. (2015). *Photobiology. The Science of Light and Life* (L. Olof Björn (ed.); Third Edit). Springer. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1468-5>
- Buravlev, E. A., Zhidkova, T. V., Osipov, A. N., & Vladimirov, Y. A. (2015). Are the mitochondrial respiratory complexes blocked by NO the targets for the laser and LED therapy? *Lasers in Medical Science*, 30(1), 173–180. <https://doi.org/10.1007/s10103-014-1639-8>
- Buzzá, H. H., Zangirolami, A. C., Kurachi, C., & Salvador, V. (2018). Photostimulation Effects on Chicken Eggs Development: Perspectives to Human Newborns Treatment. *Journal of Biophotonics*, 11 (2). <https://doi.org/10.1002/jbio.201700046>
- Buzzá, H. H., Zangirolami, A. C., Kurachi, C., & Vanderlei, S. (2019). Acceleration of Newborn Rats

- Revelopment with the use of photobiomodulation and the near possibility of application in human premature babies. *Journal of Biophotonics*. <https://doi.org/doi.org/10.1002/jbio.201800461>
- Calabrese, E., Badea, A., Watson, C., & Johnson, G. A. (2013). A quantitative magnetic resonance histology atlas of postnatal rat brain development with regional estimates of growth and variability. *NeuroImage*, *71*(1), 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.01.017>.
- Caldieraro, M. A., & Cassano, P. (2019). Transcranial photobiomodulation for major depressive and anxiety disorders and for posttraumatic stress disorder. In *Photobiomodulation in the Brain* (pp. 479–487). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815305-5.00035-x>
- Caldieraro, M. A., Sani, G., Bui, E., & Cassano, P. (2018). Long-Term Near-Infrared Photobiomodulation for Anxious Depression Complicated by Takotsubo Cardiomyopathy. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, *38*(3), 268–270. <https://doi.org/10.1097/JCP.0000000000000883>
- Carroll, J. D. (2019). Light sources and dosimetry for the brain and whole body. In *Photobiomodulation in the Brain*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815305-5.00007-5>
- Caruncho Michinel, H. J., & Rivera Baltanás, T. (2010). Biomarcadores de la depresión. *Revista de Neurología*, *50*(08), 470. <https://doi.org/10.33588/rn.5008.2010177>
- Cassano, P., Caldieraro, M. A., Norton, R., Mischoulon, D., Trinh, N. H., Nyer, M., Dording, C., Hamblin, M. R., Campbell, B., & Iosifescu, D. V. (2019). Reported Side Effects, Weight and Blood Pressure, after Repeated Sessions of Transcranial Photobiomodulation. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, *37*(10), 651–656. <https://doi.org/10.1089/photob.2019.4678>
- Czakoff, B. N., Johnson, K. J., & Howland, J. G. (2010). Converging effects of acute stress on spatial and recognition memory in rodents: A review of recent behavioural and pharmacological findings. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *34*(5), 733–741. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.04.002>
- Chan, A. S., Lee, T. L., Yeung, M. K., & Hamblin, M. R. (2019). Photobiomodulation improves the frontal cognitive function of older adults. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, *34*(2), 369–377. <https://doi.org/10.1002/gps.5039>
- Chao, L. L., Barlow, C., Karimpoor, M., & Lim, L. (2020). Changes in Brain Function and Structure After Self-Administered Home Photobiomodulation Treatment in a Concussion Case. *Frontiers in Neurology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00952>

Referencias

- Chen, V. S., Morrison, J. P., Southwell, M. F., Foley, J. F., Bolon, B., & Elmore, S. A. (2017). Histology Atlas of the Developing Prenatal and Postnatal Mouse Central Nervous System, with Emphasis on Prenatal Days E7.5 to E18.5. *Toxicologic Pathology*, 45(6), 705–744. <https://doi.org/10.1177/0192623317728134>
- Chen, W., Liu, B., Li, X., Wang, P., & Wang, B. (2020). Sex Differences in Spatial Memory. *Neuroscience*, 443, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.06.016>
- Chow, C., Epp, J. R., Lieblich, S. E., Barha, C. K., & Galea, L. A. M. (2013). Sex differences in neurogenesis and activation of new neurons in response to spatial learning and memory. *Psychoneuroendocrinology*, 38(8), 1236–1250. <https://doi.org/10.1016/j.psychneuen.2012.11.007>
- Cimadevilla, J. M., González-Pardo, H., López, L., Díaz, F., Cueto, E. G., García-Moreno, L. M., & Arias, J. L. (1999). Sex-related differences in spatial learning during the early postnatal development of the rat. *Behavioural Processes*, 46(2), 159–171. [https://doi.org/10.1016/S0376-6357\(99\)00034-0](https://doi.org/10.1016/S0376-6357(99)00034-0)
- Conde Quintero, M., de Sande, J. C. G., & Toscano Arroyo, M. J. (2011). Terapia por láser de baja potencia: Consideraciones óptico-físicas y biológicas determinantes en su aplicación clínica. *Fisioterapia*, 33(1), 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.ft.2010.11.002>
- Conejo, N. M., González-Pardo, H., Gonzalez-Lima, F., & Arias, J. L. (2010). Spatial learning of the water maze: Progression of brain circuits mapped with cytochrome oxidase histochemistry. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93(3), 362–371. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.12.002>
- Conejo, N. M., González-Pardo, H., Vallejo, G., & Arias, J. L. (2004). Involvement of the mammillary bodies in spatial working memory revealed by cytochrome oxidase activity. *Brain Research*, 1011(1), 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.03.025>
- Conejo, N. M., González-Pardo, H., Vallejo, G., & Arias, J. L. (2007). Changes in brain oxidative metabolism induced by water maze training. *Neuroscience*, 145(2), 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.11.057>
- Dawson, G. R., & Tricklebank, M. D. (1995). Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends in Pharmacological Sciences*, 16(2), 33–36. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)88973-7](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)88973-7)
- de Freitas, L. F., & Hamblin, M. R. (2016). Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 22(3), 348–364.

<https://doi.org/10.1109/JSTQE.2016.2561201>

- De Taboada, L., & Hamblin, M. R. (2019). Transcranial photobiomodulation treats Alzheimer's disease in amyloid- β protein precursor transgenic mice. In *Photobiomodulation in the Brain: Low-Level Laser (Light) Therapy in Neurology and Neuroscience* (Vol. 3). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815305-5.00015-4>
- Disner, S. G., Beevers, C. G., & Gonzalez-Lima, F. (2016). Transcranial Laser Stimulation as Neuroenhancement for Attention Bias Modification in Adults with Elevated Depression Symptoms. *Brain Stimulation*, 9(5), 780–787. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2016.05.009>
- Dompe, C., Moncrieff, L., Matys, J., Grzech-Leśniak, K., Kocherova, I., Bryja, A., Bruska, M., Dominiak, M., Mozdziak, P., Skiba, T. H. I., Shibli, J. A., Angelova Volponi, A., Kempisty, B., & Dyszkiewicz-Konwińska, M. (2020). Photobiomodulation—Underlying Mechanism and Clinical Applications. *Journal of Clinical Medicine*, 9(6), 1724. <https://doi.org/10.3390/jcm9061724>
- Dong, T., Zhang, Q., Hamblin, M. R., & Wu, M. X. (2015). Low-level light in combination with metabolic modulators for effective therapy of injured brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(9), 1435–1444. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.87>
- Doronina-Amitonova, L. V, Fedotov, I. V, Fedotov, A. B., Anokhin, K. V, & Zheltikov, A. M. (2015). Neurophotonic: optical methods to study and control the brain. *Physics-Uspekhi*, 58(4), 345–364. <https://doi.org/10.3367/ufne.0185.201504c.0371>
- dos Santos Cardoso, F., Barrett, D. W., Wade, Z., Gomes da Silva, S., & Gonzalez-Lima, F. (2022). Photobiomodulation of Cytochrome c Oxidase by Chronic Transcranial Laser in Young and Aged Brains '. *Frontiers in Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.818005>
- dos Santos Cardoso, F., de Souza Oliveira Tavares, C., Araujo, B. H. S., Mansur, F., Lopes-Martins, R. Á. B., & Gomes da Silva, S. (2021). Improved Spatial Memory And Neuroinflammatory Profile Changes in Aged Rats Submitted to Photobiomodulation Therapy. *Cellular and Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01069-4>
- dos Santos Cardoso, F., dos Santos, J. C. C., Gonzalez-Lima, F., Araújo, B. H. S., Lopes-Martins, R. Á. B., & Gomes da Silva, S. (2021). Effects of Chronic Photobiomodulation with Transcranial Near-Infrared Laser on Brain Metabolomics of Young and Aged Rats. *Molecular Neurobiology*, 58(5), 2256–2268. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02247-z>
- dos Santos Cardoso, F., Mansur, F., Araújo, B., Gonzalez-Lima, F., & Gomes da Silva, S. (2021).

Referencias

- Photobiomodulation Improves the Inflammatory Response and Intracellular Signaling Proteins Linked to Vascular Function and Cell Survival in the Brain of Aged Rats. *Molecular Neurobiology*, 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12035-021-02606-4>
- Duong, A., Beaulieu, M., & Andreazza, A. (2018). Targeting Mitochondria in Bipolar Disorder: Brain Bioenergetics and Photobiomodulation. *Bipolar Disorders*, 20, 45–46. https://doi.org/10.1111/bdi.32_12616
- Eayrs, J. T., & Goodhead, B. (1959). Postnatal development of the cerebral cortex in the rat. *Journal of Anatomy*, 93, 385–402. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13819134%0A>
- El-Hussein, A., Kasem, M. A., Elfaham, M. M., Saad, A., & Hamblin, M. R. (2019). Effect of He-Ne laser irradiation on embryonic development in chicken eggs. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2019.05.002>
- El Massri, N., Johnstone, D. M., Peoples, C. L., Moro, C., Reinhart, F., Torres, N., Stone, J., Benabid, A. L., & Mitrofanis, J. (2016). The effect of different doses of near infrared light on dopaminergic cell survival and gliosis in MPTP-treated mice. *International Journal of Neuroscience*, 126(1), 76–87. <https://doi.org/10.3109/00207454.2014.994063>
- El Massri, N., Moro, C., Torres, N., Darlot, F., Agay, D., Chabrol, C., Johnstone, D. M., Stone, J., Benabid, A. L., & Mitrofanis, J. (2016). Near-infrared light treatment reduces astrogliosis in MPTP-treated monkeys. *Experimental Brain Research*, 234(11), 3225–3232. <https://doi.org/10.1007/s00221-016-4720-7>
- El Massri, N., Weinrich, T. W., Kam, J. H., Jeffery, G., & Mitrofanis, J. (2018). Photobiomodulation reduces gliosis in the basal ganglia of aged mice. *Neurobiology of Aging*, 66, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.02.019>
- Eshaghi, E., Sadigh-Eteghad, S., Mohaddes, G., & Rasta, S. H. (2019). Transcranial photobiomodulation prevents anxiety and depression via changing serotonin and nitric oxide levels in brain of depression model mice: A study of three different doses of 810 nm laser. *Lasers in Surgery and Medicine*, 51(7), 634–642. <https://doi.org/10.1002/lsm.23082>
- Fridgeirsdottir, G. A., Hillered, L., & Clausen, F. (2014). Escalated handling of young C57BL/6 mice results in altered Morris water maze performance. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 119(1), 1–9. <https://doi.org/10.3109/03009734.2013.847511>
- Galea, L. A. M., McEwen, B. S., Tanapat, P., Deak, T., Spencer, R. L., & Dhabhar, F. S. (1997). Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress.

- Neuroscience*, 81(3), 689–697. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00233-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00233-9)
- Gardner, R. J., Hermansen, E., Pachitariu, M., Burak, Y., Baas, N. A., Dunn, B. A., Moser, M.-B., & Moser, E. I. (2022). Toroidal topology of population activity in grid cells. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04268-7>
- Gavish, L., & Houeild, N. N. (2018). Therapeutic Efficacy of Home-Use Photobiomodulation Devices: A Systematic Literature Review. *Photomedicine and Laser Surgery*, 37(1), 1–13. <https://doi.org/10.1089/pho.2018.4512>
- Glöckner, F., Schuck, N. W., & Li, S. C. (2021). Differential prioritization of intramaze cue and boundary information during spatial navigation across the human lifespan. *Scientific Reports*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94530-9>
- Gobel, E. W., Parrish, T. B., & Reber, P. J. (2011). Neural correlates of skill acquisition: Decreased cortical activity during a serial interception sequence learning task. *NeuroImage*, 58(4), 1150–1157. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.06.090>
- Golovynskyi, S., Golovynska, I., Stepanova, L. I., Datsenko, O. I., Liu, L., Qu, J., & Ohulchanskyi, T. Y. (2018). Optical windows for head tissues in near-infrared and short-wave infrared regions: Approaching transcranial light applications. *Journal of Biophotonics*, 11(12), 1–12. <https://doi.org/10.1002/jbio.201800141>
- Gonzalez-Lima, F. (2017). Transcranial Photobiomodulation: Controlled Evidence for Cerebrovascular and Cognitive Enhancement. *Biological Psychiatry*, 81(10), S156. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.02.398>
- Gonzalez-Lima, F., & Cada, A. (1994). Cytochrome oxidase activity in the auditory system of the mouse: A qualitative and quantitative histochemical study. *Neuroscience*, 63(2), 559–578. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90550-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90550-9)
- González-Pardo, H., Arias, J. L., Gómez-Lázaro, E., Taboada, I. L., & Conejo, N. M. (2020). Sex-specific effects of early life stress on brain mitochondrial function, monoamine levels and neuroinflammation. *Brain Sciences*, 10(7), 1–17. <https://doi.org/10.3390/brainsci10070447>
- González-Pardo, H., Novelli, A., Menéndez-Patterson, A., & Arias, J. L. (1996). The development of oxidative metabolism in diencephalic structures of the rat: A quantitative study. *Brain Research Bulletin*, 41(1), 31–38. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(96\)00007-X](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(96)00007-X)
- Gouirand, A. M., & Matuszewich, L. (2005). The effects of chronic unpredictable stress on male rats

- in the water maze. *Physiology and Behavior*, 86(1–2), 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.06.027>
- Hamblin, M. R. (2016a). Photobiomodulation or low-level laser therapy. *Journal of Biophotonics*, 9(11–12), 1122–1124. <https://doi.org/10.1002/jbio.201670113>
- Hamblin, M. R. (2016b). Shining light on the head: Photobiomodulation for brain disorders. *BBA Clinical*. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.09.002>
- Hamblin, M. R. (2018a). Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochemistry and Photobiology*, 94(2), 199–212. <https://doi.org/10.1111/php.12864>
- Hamblin, M. R. (2018b). Photobiomodulation for traumatic brain injury and stroke. *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.24190>
- Hamblin, M. R. (2019a). How to Write a Good Photobiomodulation Article. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, 1–2. <https://doi.org/10.1089/photob.2019.4648>
- Hamblin, M. R. (2019b). Mechanisms of photobiomodulation in the brain. In *Photobiomodulation in the Brain* (pp. 97–110). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815305-5.00008-7>
- Hamblin, M. R., & Liebert, A. (2022). Photobiomodulation Therapy Mechanisms Beyond Cytochrome c Oxidase. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, 40(2).
- Hamblin, M. R., Pires de Sousa, M. V., Arany, P. R., Carroll, J. D., & Patthoff, D. (2015). Low level laser (light) therapy and photobiomodulation: the path forward. *Mechanisms for Low-Light Therapy X*. <https://doi.org/10.1117/12.2084049>
- Harris, A. P., D’earth, R. B., & Healy, S. D. (2008). Sex differences, or not, in spatial cognition in albino rats: acute stress is the key. *Animal Behaviour*, 76(5), 1579–1589. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.07.016>
- Hart, W. L., Kameneva, T., Wise, A. K., & Stoddart, P. R. (2019). Biological Considerations of Optical Interfaces for Neuromodulation. *Advanced Optical Materials*, 7(19). <https://doi.org/10.1002/adom.201900385>
- Hassanzahraee, M., Zoghi, M., & Jaberzadeh, S. (2018). How different priming stimulations affect the corticospinal excitability induced by noninvasive brain stimulation techniques: A systematic review and meta-analysis. *Reviews in the Neurosciences*, 29(8), 883–899. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0111>

- Henderson, T. A., & Morries, L. D. (2017). Multi-Watt Near-Infrared Phototherapy for the Treatment of Comorbid Depression: An Open-Label Single-Arm Study. *Frontiers in Psychiatry*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2017.00187>
- Hosseini, L., Farazi, N., Erfani, M., Mahmoudi, J., Akbari, M., & Hojjat, S. (2022). Effect of transcranial near - infrared photobiomodulation on cognitive outcomes in D - galactose / AlCl₃ induced brain aging in BALB / c mice. *Lasers in Medical Science*, 1787–1798. <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03433-8>
- Huang, Y., Mroz, P., & Hamblin, M. R. (2009). *Basic photobiomedicine*. <http://photobiology.info/Photomed.html>
- Ibarra Villalón, H. E., Pottiez, O., & Gómez Vieyra, A. (2018). El camino hacia la luz láser. *Revista Mexicana de Física E*, 64(2), 100–107. <https://doi.org/10.31349/revmexfise.64.100>
- Iosifescu, D., Norton, R., Tural, U., Mischoulon, D., Collins, K., Rette, D., De Taboada, L., Foster, S., Cusin, C., Yeung, A., Clain, A., Schoenfeld, D., Hamblin, M. R., & Cassano, P. (2022). Very Low-Level Transcranial Photobiomodulation for Major Depressive Disorder: The ELATED-3 Multicenter, Randomized, Sham-Controlled Trial. *The Journal of Clinical Psychiatry*. <https://doi.org/10.1089/pho.2018.4490>
- Jankowski, M. M., Ronnqvist, K. C., Tsanov, M., Vann, S. D., Wright, N. F., Erichsen, J. T., Aggleton, J. P., & O'Mara, S. M. (2013). The anterior thalamus provides a subcortical circuit supporting memory and spatial navigation. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 7, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00045>
- Jiang, S., Wu, X., Rommelfanger, N. J., Ou, Z., & Hong, G. (2022). Shedding light on neurons: optical approaches for neuromodulation. *National Science Review*. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwac007/6510840>
- Kalous, M., Rauchová, H., & Drahota, Z. (2001). Postnatal development of energy metabolism in the rat brain. *Physiological Research*, 50(3), 315–319.
- Karege, F., Schwald, M., & Cisse, M. (2002). Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neuroscience Letters*, 328(3), 261–264. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00529-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00529-3)
- Karu, T. I. (1987). Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 23(10), 1703–1717. <https://doi.org/10.1109/JQE.1987.1073236>

Referencias

- Karu, T. I. (2014). Cellular and molecular mechanisms of photobiomodulation (low-power laser therapy). *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics*, 20(2), 143–148. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2013.2273411>
- Karu, T. I., Pyatibrat, L. V., & Afanasyeva, N. I. (2005). Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers in Surgery and Medicine*, 36(4), 307–314. <https://doi.org/10.1002/lsm.20148>
- Khoury, H. El, Mitrofanis, J., & Henderson, L. A. (2021). Does photobiomodulation influence the resting-state brain networks in young human subjects? *Experimental Brain Research*, 239(2), 435–449. <https://doi.org/10.1007/s00221-020-05981-x>
- Kim, H. P. (2014). Lightening up light therapy: Activation of retrograde signaling pathway by photobiomodulation. *Biomolecules and Therapeutics*, 22(6), 491–496. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.083>
- Kolk, S. M., & Rakic, P. (2022). Development of prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 47(1), 41–57. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01137-9>
- Lapchak, P. A. (2012). Transcranial near-infrared laser therapy applied to promote clinical recovery in acute and chronic neurodegenerative diseases. *Expert Review of Medical Devices*, 9(1), 71–83. <https://doi.org/10.1586/erd.11.64>
- Lee, H. I., Park, J. H., Park, M. Y., Kim, N. G., Park, K. J., Choi, B. T., Shin, Y. I., & Shin, H. K. (2016). Pre-conditioning with transcranial low-level light therapy reduces neuroinflammation and protects blood-brain barrier after focal cerebral ischemia in mice. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 34(2), 201–214. <https://doi.org/10.3233/RNN-150559>
- Lewis, P. M., Thomson, R. H., Rosenfeld, J. V., & Fitzgerald, P. B. (2016). Brain Neuromodulation Techniques: A Review. *Neuroscientist*, 22(4), 406–421. <https://doi.org/10.1177/1073858416646707>
- Li, X., Liu, C., & Wang, R. (2020). Light modulation of brain and development of relevant equipment. *Journal of Alzheimer's Disease*, 74(1), 29–41. <https://doi.org/10.3233/JAD-191240>
- Li, Y., Dong, Y., Yang, L., Tucker, L., Yang, B., Zong, X., Hamblin, M. R., & Zhang, Q. (2021). Transcranial photobiomodulation prevents PTSD-like comorbidities in rats experiencing underwater trauma. *Translational Psychiatry*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01389-5>
- Liebert, A., Bicknell, B., Johnstone, D. M., Gordon, L. C., Kiat, H., & Hamblin, M. R. (2019).

- “photobiomics”: Can Light, Including Photobiomodulation, Alter the Microbiome? *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, 37(11), 681–693. <https://doi.org/10.1089/photob.2019.4628>
- Loganathan, S., & Rathinasamy, S. (2015). Impairment of Memory and Novelty of Wistar Albino Rats Exposed to Acute Noise Stress. *International Journal of Health Sciences and Research*, 5, 159–168.
- Lopatina, O. L., Panina, Y. A., Malinovskaya, N. A., & Salmina, A. B. (2021). Early life stress and brain plasticity: From molecular alterations to aberrant memory and behavior. *Reviews in the Neurosciences*, 32(2), 131–142. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2020-0077>
- Luine, V., Martinez, C., Villegas, M., Magariños, A. M., & McEwen, B. S. (1996). Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance. *Physiology and Behavior*, 59(1), 27–32. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(95\)02016-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(95)02016-0)
- Lynch, A. M., Murphy, K. J., Deighan, B. F., O’Reilly, J. A., Gun’ko, Y. K., Cowley, T. R., Gonzalez-Reyes, R. E., & Lynch, M. A. (2010). The impact of glial activation in the aging brain. *Aging and Disease*, 1(3), 262–278.
- Mällo, T., Matrov, D., Kõiv, K., & Harro, J. (2009). Effect of chronic stress on behavior and cerebral oxidative metabolism in rats with high or low positive affect. *Neuroscience*, 164(3), 963–974. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.041>
- Mansdorf, S. Z. (2019). Handbook of occupational safety and health. In D. Koradecka (Ed.), *Handbook of Occupational Safety and Health*. Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1002/9781119581482>
- Martin, P. I., Chao, L., Kregel, M. H., Ho, M. D., Yee, M., Lew, R., Knight, J., Hamblin, M. R., & Naeser, M. A. (2021). Transcranial Photobiomodulation to Improve Cognition in Gulf War Illness. *Frontiers in Neurology*, 11, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.574386>
- Mathewson, I. (2015). Did human hairlessness allow natural photobiomodulation 2 million years ago and enable photobiomodulation therapy today? This can explain the rapid expansion of our genus’s brain. *Medical Hypotheses*. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2015.01.032>
- Méndez-Couz, M., Conejo, N. M., Vallejo, G., & Arias, J. L. (2014). Spatial memory extinction: a c-Fos protein mapping study. *Behavioural Brain Research*, 260, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.11.032>

Referencias

- Méndez-López, M., Méndez, M., Begega, A., & Arias, J. L. (2010). Spatial short-term memory in rats: Effects of learning trials on metabolic activity of limbic structures. *Neuroscience Letters*, *483*(1), 32–35. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.07.054>
- Méndez-López, M., Méndez, M., López, L., & Arias, J. L. (2009a). Sexually dimorphic c-Fos expression following spatial working memory in young and adult rats. *Physiology and Behavior*, *98*(3), 307–317. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.06.006>
- Méndez-López, M., Méndez, M., López, L., & Arias, J. L. (2009b). Spatial working memory learning in young male and female rats: Involvement of different limbic system regions revealed by cytochrome oxidase activity. *Neuroscience Research*, *65*(1), 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.05.001>
- Mendez, M., Arias, N., Uceda, S., & Arias, J. L. (2015). C-Fos expression correlates with performance on novel object and novel place recognition tests. *Brain Research Bulletin*, *117*, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.07.004>
- Méndez, M., Fidalgo, C., Arias, J. L., & Arias, N. (2021). Methylene blue and photobiomodulation recover cognitive impairment in hepatic encephalopathy through different effects on cytochrome c-oxidase. *Behavioural Brain Research*, *403*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113164>
- Méndez, M., Méndez-López, M., López, L., Aller, M. A., Arias, J., & Arias, J. L. (2008). Mammillary body alterations and spatial memory impairment in Wistar rats with thioacetamide-induced cirrhosis. *Brain Research*, *1233*, 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.07.040>
- Méndez, M., Méndez-López, M., López, L., Aller, M. Á., Arias, J., Cimadevilla, J. M., & Arias, J. L. (2008). Spatial memory alterations in three models of hepatic encephalopathy. *Behavioural Brain Research*, *188*(1), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.10.019>
- Mengler, L., Khmelinskii, A., Diedenhofen, M., Po, C., Staring, M., Lelieveldt, B. P. F., & Hoehn, M. (2014). Brain maturation of the adolescent rat cortex and striatum: Changes in volume and myelination. *NeuroImage*, *84*, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.034>
- Miki, T., Yokoyama, T., Kusaka, T., Suzuki, S., Ohta, K., Warita, K., Wang, Z.-Y., Ueki, M., Sumitani, K., Bellinger, F. P., Tamai, M., Liu, J.-Q., Yakura, T., & Takeuchi, Y. (2014). Early postnatal repeated maternal deprivation causes a transient increase in OMpg and BDNF in rat cerebellum suggesting precocious myelination. *Journal of the Neurological Sciences*, *336*(1–2), 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.10.007>
- Mitrofanis, J., & Jeffery, G. (2018). Does photobiomodulation influence ageing? *Aging*.

<https://doi.org/10.18632/aging.101556>

- Mitsushima, D., Yamada, K., Takase, K., Funabashi, T., & Kimura, F. (2006). Sex differences in the basolateral amygdala: The extracellular levels of serotonin and dopamine, and their responses to restraint stress in rats. *European Journal of Neuroscience*, *24*(11), 3245–3254. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05214.x>
- Moro, C., Torres, N., Arvanitakis, K., Cullen, K., Chabrol, C., Agay, D., Darlot, F., Benabid, A. L., & Mitrofanis, J. (2017). No evidence for toxicity after long-term photobiomodulation in normal non-human primates. *Experimental Brain Research*, *235*(10), 3081–3092. <https://doi.org/10.1007/s00221-017-5048-7>
- Morries, L. D., Cassano, P., & Henderson, T. A. (2015). Treatments for traumatic brain injury with emphasis on transcranial near-infrared laser phototherapy. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *11*, 2159–2175. <https://doi.org/10.2147/NDT.S65809>
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Me*, *11*, 47–60.
- Moser, E. I., Kropff, E., & Moser, M. B. (2008). Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annual Review of Neuroscience*, *31*, 69–89. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.061307.090723>
- Musstaf, R. A., Jenkins, D. F. L., & Jha, A. N. (2019). Assessing the impact of low level laser therapy (LLLT) on biological systems: a review. *International Journal of Radiation Biology*, *95*(2), 120–143. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1524944>
- Nadur-Andrade, N., Dale, C. S., Oliveira, V. R. da S., Toniolo, E. F., Feliciano, R. dos S., da Silva, J. A., & Zamuner, S. R. (2016). Analgesic Effect of Photobiomodulation on Bothrops Moojeni Venom-Induced Hyperalgesia: A Mechanism Dependent on Neuronal Inhibition, Cytokines and Kinin Receptors Modulation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(10), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004998>
- Nizamutdinov, D., Qi, X., Berman, M. H., Dougal, G., & Huang, J. H. (2020). Therapeutic Effects of Near Infrared Light Stimulation on Cognitive and Behaviour Symptoms of Dementia. *The FASEB Journal*, *34*(S1), 1–1. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.09950>
- Oh, Y., Nguyen, N., Jin Jung, H., Choe, Y., & Gwan Kim, J. (2022). Changes in Cytochrome C Oxidase Redox State and Hemoglobin Concentration in Rat Brain During 810 nm Irradiation Measured by Broadband Near-Infrared Spectroscopy. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser*

Surgery., 40(5).

- Olson, I. R., Rao, H., Moore, K. S., Wang, J., Detre, J. A., & Aguirre, G. K. (2006). Using perfusion fMRI to measure continuous changes in neural activity with learning. *Brain and Cognition*, 60(3), 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2005.11.010>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (Sixth Edit). Elsevier.
- Plescia, F., Marino, R. A. M., Navarra, M., Gambino, G., Brancato, A., Sardo, P., & Cannizzaro, C. (2014). Early handling effect on female rat spatial and non-spatial learning and memory. *Behavioural Processes*, 103, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2013.10.011>
- Poremba, A., Jones, D., & Gonzalez-Lima, F. (1998). Functional Mapping of Learning-Related Metabolic Activity with Quantitative Cytochrome Oxidase Histochemistry. In *Cytochrome Oxidase in Neuronal Metabolism and Alzheimer's Disease* (pp. 109–144). https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9936-1_4
- Pothuizen, H. H. J., Aggleton, J. P., & Vann, S. D. (2008). Do rats with retrosplenial cortex lesions lack direction? *European Journal of Neuroscience*, 28(12), 2486–2498. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06550.x>
- Pritchett, K., & Mulder, G. B. (2003). The Rotarod. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 42(6), 49.
- Pruitt, T., Carter, C., Wang, X., Wu, A., & Liu, H. (2022). Photobiomodulation at Different Wavelengths Boosts Mitochondrial Redox Metabolism and Hemoglobin Oxygenation: Lasers vs. Light-Emitting Diodes In Vivo. *Metabolites*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/metabo12020103>
- Pruitt, T., Wang, X., Wu, A., Kallioniemi, E., Husain, M. M., & Liu, H. (2020). Transcranial Photobiomodulation (tPBM) With 1,064-nm Laser to Improve Cerebral Metabolism of the Human Brain In Vivo. *Lasers in Surgery and Medicine*, 52(9), 807–813. <https://doi.org/10.1002/lsm.23232>
- Ramezani, F., Neshasteh-Riz, A., Ghadaksaz, A., Fazeli, S. M., Janzadeh, A., & Hamblin, M. R. (2022). Mechanistic aspects of photobiomodulation therapy in the nervous system. *Lasers in Medical Science*, 37(1), 11–18. <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03277-2>
- Razza, L. B., Dos Santos, L. A., Borrione, L., Bellini, H., Branco, L. C., Cretaz, E., Duarte, D., Ferrão, Y., Galhardoni, R., Quevedo, J., Simis, M., Fregni, F., Correll, C. U., Padberg, F., Trevizol, A., Daskalakis, Z. J., Carvalho, A. F., Solmi, M., & Brunoni, A. R. (2021). Appraising the

- effectiveness of electrical and magnetic brain stimulation techniques in acute major depressive episodes: an umbrella review of meta-analyses of randomized controlled trials. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 43(5), 514–524. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2020-1169>
- Rojas, J. C., & Gonzalez-Lima, F. (2013). Neurological and psychological applications of transcranial lasers and LEDs. *Biochemical Pharmacology*, 86(4), 447–457. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.06.012>
- Ross, G., & Ross, A. (2009). The issue features Photobiomodulation (PBM). *Journal of Laser Dentistry*, 17(3). www.laserdentistry.org
- Sagar, S., Sharp, F., & Curran, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*, 240(4857), 1328–1331. <https://doi.org/10.1126/science.3131879>
- Sakata, J. T., Crews, D., & Gonzalez-Lima, F. (2005). Behavioral correlates of differences in neural metabolic capacity. *Brain Research Reviews*, 48(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.07.017>
- Salehpour, F., Berman, M. H., & Sadigh-Eteghad, S. (2021). Photobiomodulation as a brain-boosting strategy in aging. In *Assessments, Treatments and Modeling in Aging and Neurological Disease* (pp. 389–402). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818000-6.00035-4>
- Salehpour, F., Cassano, P., Rouhi, N., Hamblin, M. R., De Taboada, L., Farajdokht, F., & Mahmoudi, J. (2019). Penetration Profiles of Visible and Near-Infrared Lasers and Light-Emitting Diode Light through the Head Tissues in Animal and Human Species: A Review of Literature. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, 37(10), 581–595. <https://doi.org/10.1089/photob.2019.4676>
- Salehpour, F., Khademi, M., & Hamblin, M. R. (2021). Photobiomodulation Therapy for Dementia: A Systematic Review of Pre-Clinical and Clinical Studies. *Journal of Alzheimer's Disease*, 83(4), 1431–1452. <https://doi.org/10.3233/JAD-210029>
- Salehpour, F., Mahmoudi, J., Kamari, F., Sadigh-Eteghad, S., Rasta, S. H., & Hamblin, M. R. (2018a). Brain Photobiomodulation Therapy: a Narrative Review. *Molecular Neurobiology*, 55(8), 6601–6636. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0852-4>
- Salehpour, F., Mahmoudi, J., Kamari, F., Sadigh-Eteghad, S., Rasta, S. H., & Hamblin, M. R. (2018b). Brain Photobiomodulation Therapy: a Narrative Review. *Molecular Neurobiology*, 55(8), 6601–6636. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0852-4>

Referencias

- Salehpour, F., Mahmoudi, J., Sadigh-Eteghad, S., & Cassano, P. (2019). Photobiomodulation for depression in animal models. In *Photobiomodulation in the Brain: Low-Level Laser (Light) Therapy in Neurology and Neuroscience* (pp. 189–205). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815305-5.00014-2>
- Salehpour, F., & Rasta, S. H. (2017). The potential of transcranial photobiomodulation therapy for treatment of major depressive disorder. *Reviews in the Neurosciences*, 28(4), 441–453. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2016-0087>
- Salehpour, F., Rasta, S. H., Mohaddes, G., Sadigh-Eteghad, S., & Salarirad, S. (2016). Therapeutic effects of 10-Hz Pulsed wave lasers in rat depression model: A comparison between near-infrared and red wavelengths. *Lasers in Surgery and Medicine*, 48(7), 695–705. <https://doi.org/10.1002/lsm.22542>
- Sampedro-Piquero, P., Zancada-Menendez, C., Begega, A., Rubio, S., & Arias, J. L. (2013). Effects of environmental enrichment on anxiety responses, spatial memory and cytochrome c oxidase activity in adult rats. *Brain Research Bulletin*, 98, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2013.06.006>
- Santana-Blank, L., & Rodríguez-Santana, E. (2018). Photobiomodulation in Light of Our Biological Clock's Inner Workings. *Photomedicine and Laser Surgery*. <https://doi.org/10.1089/pho.2018.4445>
- Santos, L., Olmo-Aguado, S. del, Valenzuela, P. L., Winge, K., Iglesias-Soler, E., Argüelles-Luis, J., Álvarez-Valle, S., Parcero-Iglesias, G. J., Fernández-Martínez, A., & Lucia, A. (2019). Photobiomodulation in Parkinson's disease: A randomized controlled trial. In *Brain Stimulation* (Vol. 12, Issue 3, pp. 810–812). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2019.02.009>
- Saucedo, C. L., Courtois, E. C., Wade, Z. S., Kelley, M. N., Kheradbin, N., Barrett, D. W., & Gonzalez-Lima, F. (2021). Transcranial laser stimulation: Mitochondrial and cerebrovascular effects in younger and older healthy adults. *Brain Stimulation*, 14(2), 440–449. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2021.02.011>
- Scaglia, F. (2010). The role of mitochondrial dysfunction in psychiatric disease. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 16(2), 136–143. <https://doi.org/10.1002/ddrr.115>
- Schiffer, F., Johnston, A. L., Ravichandran, C., Polcari, A., Teicher, M. H., Webb, R. H., & Hamblin, M. R. (2009). Psychological benefits 2 and 4 weeks after a single treatment with near infrared light to the forehead: a pilot study of 10 patients with major depression and anxiety. *Behavioral and Brain Functions*, 5(1), 46. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-5-46>

- Scott, R. C., Richard, G. R., Holmes, G. L., & Lenck-Santini, P. P. (2011). Maturation dynamics of hippocampal place cells in immature rats. *Hippocampus*, 21(4), 347–353. <https://doi.org/10.1002/hipo.20789>
- Serrage, H., Heiskanen, V., Palin, W. M., Cooper, P. R., Milward, M. R., Hadis, M., & Hamblin, M. R. (2019). Under the spotlight: mechanisms of photobiomodulation concentrating on blue and green light. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 18(8), 1877–1909. <https://doi.org/10.1039/C9PP00089E>
- Sheppard, P. A. S., Choleris, E., & Galea, L. A. M. (2019). Structural plasticity of the hippocampus in response to estrogens in female rodents. *Molecular Brain*, 12(1), 28–30. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0442-7>
- Shinmar, H., Grewal, M., Sivaprasad, S., Hogg, C., Chong, V., Neveu, M., Jeffery, G., & Le Couteur, D. (2020). Optically Improved Mitochondrial Function Redeems Aged Human Visual Decline. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 75(9), e49–e52. <https://doi.org/10.1093/gerona/glaa155>
- Simmons, R. K., Stringfellow, S. A., Glover, M. E., Wagle, A. A., & Clinton, S. M. (2013). DNA methylation markers in the postnatal developing rat brain. *Brain Research*, 1533, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.08.005>
- Simpson, J., & Kelly, J. P. (2012). An investigation of whether there are sex differences in certain behavioural and neurochemical parameters in the rat. *Behavioural Brain Research*, 229(1), 289–300. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.12.036>
- Sliney, D. H. (2016). What is light? the visible spectrum and beyond. *Eye (Basingstoke)*, 30(2), 222–229. <https://doi.org/10.1038/eye.2015.252>
- Smith, C. J. W., Wilkins, K. B., Mogavero, J. N., & Veenema, A. H. (2015). Social Novelty Investigation in the Juvenile Rat: Modulation by the μ -Opioid System. *Journal of Neuroendocrinology*, 27(10), 752–764. <https://doi.org/10.1111/jne.12301>
- Smith, H. S., & Pilitsis, J. G. (2014). Neuromodulation and Palliative Medicine. *American Journal of Hospice and Palliative Medicine*, 31(2), 211–219. <https://doi.org/10.1177/1049909113482745>
- Sowa, P., Rutkowska-Talipska, J., Rutkowski, K., Kosztyła-Hojna, B., & Rutkowski, R. (2013). Optical radiation in modern medicine. In *Postepy Dermatologii i Alergologii* (Vol. 30, Issue 4, pp. 246–251). <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.37035>

Referencias

- Spivey, J. M., Colorado, R. A., Conejo-Jimenez, N., Gonzalez-Pardo, H., & Gonzalez-Lima, F. (2008). Juvenile male rats display lower cortical metabolic capacity than females. *Neuroscience Letters*, *440*(3), 255–259. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.05.104>
- Sviridova-Chailakhyan, T. A., Fakhranurova, L. I., Simonova, N. B., Khramov, R. N., Manokhin, A. A., Paskevich, S. I., & Chailakhyan, L. M. (2008). Photobiomodulation of early mouse embryo development. *Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care*, *6991*, 69912B. <https://doi.org/10.1117/12.781380>
- Tan, H. M., Wills, T. J., & Cacucci, F. (2017). The development of spatial and memory circuits in the rat. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, *8*(3). <https://doi.org/10.1002/wcs.1424>
- Tatmatsu-Rocha, J. C., Roberta Tim, C., Avo, L., Bernardes-filho, R., Brassolatti, P., Wilian, H., Hamblin, M. R., & Antonio, N. (2018). Mitochondrial dynamics (fission and fusion) and collagen production in a rat model of diabetic wound healing treated by photobiomodulation: comparison of 904 nm laser and 850 nm light-emitting diode (LED). *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, *187*, 41–47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.07.032>
- Taxier, L. R., Gross, K. S., & Frick, K. M. (2020). Oestradiol as a neuromodulator of learning and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, *21*(10), 535–550. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0362-7>
- Thompson, R. W., & Lippman, L. G. (1975). The effect of age and postweaning and adult handling habituation on activity and exploration in the rat. *Bulletin of the Psychonomic Society*, *5*(4), 285–288. <https://doi.org/10.3758/BF03333246>
- To, W. T., De Ridder, D., Hart, J., & Vanneste, S. (2018). Changing brain networks through non-invasive neuromodulation. *Frontiers in Human Neuroscience*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2018.00128>
- Tripodi, N., Feehan, J., Husaric, M., Kiatos, D., Sidiroglou, F., Fraser, S., & Apostolopoulos, V. (2020). Good, better, best? The effects of polarization on photobiomodulation therapy. *Journal of Biophotonics*, *13*(5). <https://doi.org/10.1002/jbio.201960230>
- Tsai, C.-M., Chang, S.-F., Li, C.-C., & Chang, H. (2022). Transcranial photobiomodulation (808 nm) attenuates pentylenetetrazole-induced seizures by suppressing hippocampal neuroinflammation, astrogliosis, and microgliosis in peripubertal rats. *Neurophotonics*, *9*(01). <https://doi.org/10.1117/1.nph.9.1.015006>

- Tsujimoto, S. (2008). Review: The prefrontal cortex: Functional neural development during early childhood. *Neuroscientist*, *14*(4), 345–358. <https://doi.org/10.1177/1073858408316002>
- Vann, S. D., Aggleton, J. P., & Maguire, E. A. (2009). What does the retrosplenial cortex do? *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(11), 792–802. <https://doi.org/10.1038/nrn2733>
- Velazquez, F. N., Caputto, B. L., & Boussin, F. D. (2015). c-Fos importance for brain development. *Ageing*, *7*(12). <https://doi.org/10.18632/aging.100862>
- Vladimirov, Y. A., Osipov, A. N., & Klebanov, G. I. (2004). Photobiological Principles of Therapeutic Applications. *Biochemistry*, *69*, 81–90. <https://doi.org/10.1023/b:biry.0000016356.93968.7e>
- Vogel, D. D. S., Ortiz-Villatoro, N. N., Araújo, N. S., Marques, M. J. G., Aimbire, F., Scorza, F. A., Scorza, C. A., & Albertini, R. (2021). Transcranial low-level laser therapy in an in vivo model of stroke: Relevance to the brain infarct, microglia activation and neuroinflammation. *Journal of Biophotonics*, *14*(6), 1–8. <https://doi.org/10.1002/jbio.202000500>
- Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2006). Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*, *1*(2), 848–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>
- Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2014). Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR Journal*, *55*(2), 310–332. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilu013>
- Wang, C., Chen, X., & Knierim, J. J. (2020). Egocentric and allocentric representations of space in the rodent brain. *Current Opinion in Neurobiology*, *60*, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.11.005>
- Wang, Q., Timberlake, M. A., Prall, K., & Dwivedi, Y. (2017). The recent progress in animal models of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *77*, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.04.008>
- Wang, X., Dmochowski, J., Husain, M., Gonzalez-Lima, F., & Liu, H. (2017). Proceedings #18. Transcranial Infrared Brain Stimulation Modulates EEG Alpha Power. *Brain Stimulation*, *10*(4), e67–e69. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2017.04.111>
- Wang, X., Tian, F., Reddy, D. D., Nalawade, S. S., Barrett, D. W., Gonzalez-Lima, F., & Liu, H. (2017). Up-regulation of cerebral cytochrome-c-oxidase and hemodynamics by transcranial infrared laser stimulation: A broadband near-infrared spectroscopy study. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *37*(12), 3789–3802. <https://doi.org/10.1177/0271678X17691783>

Referencias

- Whelan, H. T. (2000). The NASA light-emitting diode medical program—progress in space flight and terrestrial applications. *AIP Conference Proceedings*, 504, 37–43. <https://doi.org/10.1063/1.1302454>
- Wills, T. J., & Cacucci, F. (2014). The development of the hippocampal neural representation of space. *Current Opinion in Neurobiology*, 24(1), 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.09.006>
- Wills, T. J., Muessig, L., & Cacucci, F. (2014). The development of spatial behaviour and the hippocampal neural representation of space. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1635). <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0409>
- Wong-Riley, M. T. T. (1989). Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends in Neurosciences*, 12(3), 94–101. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90165-3](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90165-3)
- World Health Organization (WHO). (2017). Depression and Other Common Mental Disorders- Global Health Estimates. *Obstetrics and Gynecology*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/934574>
- Wu, X., Alberico, S. L., Moges, H., De Taboada, L., Tedford, C. E., & Anders, J. J. (2012). Pulsed light irradiation improves behavioral outcome in a rat model of chronic mild stress. *Lasers in Surgery and Medicine*, 44(3), 227–232. <https://doi.org/10.1002/lsm.22004>
- Xuan, W., Huang, L., & Hamblin, M. R. (2016). Repeated transcranial low-level laser therapy for traumatic brain injury in mice: biphasic dose response and long-term treatment outcome. *Journal of Biophotonics*, 9(11–12), 1263–1272. <https://doi.org/10.1002/jbio.201500336>
- Yagi, S., Drewczynski, D., Wainwright, S. R., Barha, C. K., Hershorn, O., & Galea, L. A. M. (2017). Sex and estrous cycle differences in immediate early gene activation in the hippocampus and the dorsal striatum after the cue competition task. *Hormones and Behavior*, 87, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.10.019>
- Yang, M., Yang, Z., Wang, P., & Sun, Z. (2021). Current application and future directions of photobiomodulation in central nervous diseases. *Neural Regeneration Research*, 16(6), 1177–1185. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.300486>
- Yang, Y., Zong, Y., Sun, Q., Jia, Y., & Zhao, R. (2017). White light emitting diode suppresses proliferation and induces apoptosis in hippocampal neuron cells through mitochondrial cytochrome c oxidase-mediated IGF-1 and TNF- α pathways. *Free Radical Biology and Medicine*, 113(October), 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.382>
- Yoon, S. R., Hong, N., Lee, M. Y., & Ahn, J. C. (2021). Photobiomodulation with a 660-nanometer

- light-emitting diode promotes cell proliferation in astrocyte culture. *Cells*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/cells10071664>
- Zavala, J. K., Fernandez, A. A., & Gosselink, K. L. (2011). Female responses to acute and repeated restraint stress differ from those in males. *Physiology and Behavior*, 104(2), 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.03.022>
- Zhao, C., Li, D., Kong, Y., & Liu, H. (2022). Transcranial photobiomodulation enhances visual working memory capacity in humans. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.02.24.481703>
- Zomorrodi, R., Loheswaran, G., Pushparaj, A., & Lim, L. (2019). Pulsed Near Infrared Transcranial and Intranasal Photobiomodulation Significantly Modulates Neural Oscillations: a pilot exploratory study. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42693-x>
- Zorzo, C., Higarza, S. G., Méndez, M., Martínez, J. A., Pernía, A. M., & Arias, J. L. (2019). High frequency repetitive transcranial magnetic stimulation improves neuronal activity without affecting astrocytes and microglia density. *Brain Research Bulletin*, 150, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.05.004>
- Zorzo, C., Méndez-López, M., Méndez, M., & Arias, J. L. (2019). Adult social isolation leads to anxiety and spatial memory impairment: Brain activity pattern of COx and c-Fos. *Behavioural Brain Research*, 365, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.03.011>