



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN  
SECCIÓN DE BIOTECNOLOGÍA  
MÉRIDA-ESTADO MÉRIDA



**APLICACIÓN DEL MÉTODO MEJORADO DE PROCESAMIENTO DE  
IMÁGENES DE BIOSPECKLE A ENSAYOS CON *Trypanosoma cruzi* EN  
VIALES DE CULTIVO PROFUNDO.**

bdigital.ula.ve

**AUTORA:** Angela K. Arrieche G.

C.I:17.344.626

**TUTOR:** Prof. Cristina Grassi

**CO-TUTOR:** Prof. Andrades Efrén

**Mérida, Febrero de 2016**



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN  
SECCIÓN DE BIOTECNOLOGÍA  
MÉRIDA-ESTADO MÉRIDA



**APLICACIÓN DEL MÉTODO MEJORADO DE PROCESAMIENTO DE  
IMÁGENES DE BIOSPECKLE A ENSAYOS CON *Trypanosoma cruzi* EN  
VIALES DE CULTIVO PROFUNDO.**

bdigital.ula.ve

**AUTORA:** Angela K. Arrieche G.

C.I:17.344.626

**Correo:**karina\_arriechi@yahoo.es

**TUTOR:** Prof. Cristina Grassi

**CO-TUTOR:** Prof. Andrades Efrén

**Mérida, Febrero de 2016**

## DEDICATORIA

*Esta tesis se la dedico a mi Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. A mi familia quienes por ellos soy lo que soy. Para mis padres por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos. A mis hermanos por estar siempre presentes, acompañándome para poderme realizar. A mi sobrino Matheus quien ha sido y es una mi motivación, inspiración y felicidad.*

*“La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar”.*

bdigital.ula.ve

## AGRADECIMIENTOS

*Mi gratitud, principalmente está dirigida a Dios por haberme dado la existencia y permitido llegar al final de una etapa más en mi vida.*

*A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por ser los forjadores de mi enseñanza.*

*A la Dra. Cumandá Játiva por su asesoramiento en la dirección de la presente tesis por sus conocimientos que han sido el eje fundamental para la culminación de mi trabajo.*

*Al Dr. Jacinto Mera, por la colaboración desinteresada que me ha brindado en el transcurso del trabajo de tesis y por motivarme a la realización de la misma.*

*A los Drs. Miembros del tribunal de Tesis por el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo.*

*A mis padres por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien.*

*A mi amor eterno Huguito por siempre estar a mi lado, brindándome todo su amor, entrega, dedicación y sobre todo tenerme mucha comprensión y paciencia.*

*A todas las personas que colaboraron de una u otra manera para la culminación de este trabajo de investigación.*

## INDICE DE CONTENIDOS

|                                            | <b>PP.</b> |
|--------------------------------------------|------------|
| <b>INDICE GENERAL</b>                      | v          |
| <b>LISTA DE TABLAS</b>                     | vi         |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>                    | vii        |
| <b>LISTA DE GRAFICAS</b>                   | vii        |
| <b>RESUMEN</b>                             | ix         |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>                        | 1          |
| <b>CAPÍTULO I: EL PROBLEMA</b>             |            |
| Planteamiento del problema                 | 2          |
| Justificación de la investigación          | 3          |
| Objetivos de la Investigación              | 3          |
| Objetivos generales                        | 3          |
| Objetivos específicos                      | 3          |
| <b>CAPITULO II: MARCO TEÓRICO</b>          |            |
| Antecedentes de investigaciones            | 4          |
| Antecedentes Históricos                    | 8          |
| Bases teóricas                             | 9          |
| Hipótesis                                  | 17         |
| <b>CAPITULO III: MARCO METODOLÓGICO</b>    |            |
| Tipo y Diseño de investigación             | 18         |
| Materiales y métodos                       |            |
| Método Directo                             | 18         |
| Método Indirecto                           | 19         |
| <b>CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> |            |
| Resultados y Discusión                     | 21         |
| Resultados de Métodos                      | 21         |
| <b>CONCLUSIONES</b>                        | 31         |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>                        | 32         |

## LISTA DE TABLAS

|                                                                     |                  |
|---------------------------------------------------------------------|------------------|
| <b>Tabla 1.</b> Protocolo de trabajo                                | <b>pp.</b><br>20 |
| <b>Tabla 2.</b> Grafica de superficie, un fotograma de cada ensayo. | 27               |
| <b>Tabla 3.</b> Grafica de superficie, un fotograma de cada ensayo. | 28               |

bdigital.ula.ve

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                       | <b>pp.</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <i><b>Figura 1.</b></i> Configuración experimental de Ondas de luz                    | 11         |
| <i><b>Figura 2.</b></i> Configuración experimental de los componentes del BioSpeckle  | 11         |
| <i><b>Figura 3.</b></i> Diagrama de Speckle                                           | 11         |
| <i><b>Figura 4.</b></i> Comparación de dos maneras de trabajar el Biospeckle dinamico | 14         |
| <i><b>Figura 5.</b></i> Reflexión difusa                                              | 16         |
| <i><b>Figura 6.</b></i> Reflejo de Luz de Transmisión                                 | 17         |

bdigital.ula.ve

## LISTA DE GRAFICAS

|                                                                                                 | pp. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>GRÁFICA 1.</b> Efecto del parasito sin presencia de drogas. (90-150 min.)                    | 21  |
| <b>GRÁFICA 2.</b> Efecto del medio sin presencia drogas (90-150 min.)                           | 22  |
| <b>GRÁFICA 3.</b> Efecto del Parasito en presencia de droga “Dipirona 20 $\mu$ L” (90-150 min.) | 22  |
| <b>GRÁFICA 4</b> Efecto del medio sin presencia de drogas. (90-150 min.)                        | 23  |
| <b>GRÁFICA 5</b> Efecto del Parasito en presencia de droga” Azida 20 $\mu$ L” (90-150 min.)     | 23  |
| <b>GRÁFICA 6.</b> Comparación de moteado de cada tubo a un tiempo (90min)                       | 24  |
| <b>GRÁFICA 7.</b> Comparación de moteado de cada tubo a un tiempo de (150 min)                  | 24  |
| <b>GRÁFICA 8.</b> Efecto de la droga (Dipirona) por cambio en el patrón de Speckle.             | 28  |
| <b>GRÁFICA 9.</b> Efecto de la droga (Azida) por cambio en el patrón de Speckle.                | 29  |

bdigital.ula.ve



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN  
SECCIÓN DE BIOTECNOLOGÍA  
MÉRIDA-ESTADO MÉRIDA



## **APLICACIÓN DEL MÉTODO MEJORADO DE PROCESAMIENTO DE IMÁGENES DE BIOSPECKLE A ENSAYOS CON *Trypanosoma cruzi* EN VIALES DE CULTIVO PROFUNDO.**

**Tesista: Arrieché G. Angela K.**

**Tutor: Prof. Cristina Grassi.**

### **Resumen**

Cuando un haz coherente proveniente de un láser ilumina un objeto, éste adquiere una apariencia granular particular. La estructura detallada de la granularidad no tiene una relación directa con las características macroscópicas del objeto, sino que aparece aleatoria y desordenada. Este fenómeno denominado speckle es la manifestación de un proceso óptico de interferencia y se presenta como puntos brillantes y oscuros que cubren la superficie. En este trabajo se propuso aplicar el método denominado IDABV para el procesamiento de imágenes provenientes de videos de Biospeckle de tubos con *Trypanosoma cruzi* en medio de cultivo en presencia y ausencia de drogas que además tenían la complicación de contener varios experimentos en un solo video. Para ello se separaron los videos en fotogramas, se tomaron fotogramas seleccionados que se recortaron para luego establecer la Imagen de Diferencias Acumuladas de Base Variable de la cual se obtuvo la Intensidad Media. También se obtuvo la Intensidad Media por un Método Directo. Luego de la aplicación de esta secuencia de pasos se graficaron los resultados. Se encontró que el método Directo no arroja buenos resultados mientras que el método IDABV permitió diferenciar el medio solo, la presencia de parásitos y el efecto de dos drogas, Dipirona y Azida de Sodio. Además, se logró individualizar para el análisis, las imágenes de tubos incluidos en videos conjuntos. Se concluye que el método de separación de los resultados contenidos en un video fue adecuado y que el procesamiento de imágenes por IDABV arrojó los resultados esperados para la presencia de parásitos y el efecto de las drogas.

**Palabras clave: Biospeckle, *Trypanosoma cruzi*.**

## INTRODUCCION

Cuando un haz de luz coherente se refleja o atraviesa un medio de índice de refracción no uniforme se obtiene una distribución estadística de la irradiación luminosa conocida como patrón de speckle. (Goodman 2007). Estos patrones han sido ampliamente implementados en mediciones de desplazamientos, deformaciones, etc. (Sirohi 1993). Una de las aplicaciones más novedosas de los patrones de speckle está en el estudio de la evolución de los sistemas biológicos, donde la técnica recibe el nombre Biospeckle o speckle dinámico. (Rabal 2008). Algunos ejemplos de aplicaciones del Biospeckle en sistemas biológicos las encontramos en el análisis de especies botánicas, tales como en la evaluación de la motilidad del esperma congelado de bovino (Xu 1995), en el conteo de células en la sangre (Carvalho 2009), (Serra 2002), en el estudio de las células del endotelio en la cornea, (Ayala 2001). También estas técnicas han sido aplicadas para medir la presencia de hongos en especies de frijoles, tal como reportaron (Braga y col. 2007). En estudios patológicos esta técnica ha sido también recurrida, ya que permite estudiar las actividades biológicas en especies de lento crecimiento. Otros estudios muestran una relación entre el cambio del índice de refracción y la concentración bacteriana dado por (Machado y col 2008), quienes lograron medir la constante de tiempo del crecimiento bacteriano.

Existen diferentes métodos para el procesamiento de los patrones de speckle dinámicos. Algunos construyen imágenes auxiliares que representan la historia temporal de los patrones de speckle. (Oulamara, y col. 1989)

La motilidad bacteriana es uno de los temas más relevantes en las áreas de patogénesis y biodegradación. En este trabajo se propone el análisis de la respuesta de motilidad bacteriana usando secuencias de imágenes obtenida con la técnica de láser biospeckle, utilizando el parásito *Trypanosoma cruzi* en viales de cultivo profundo, con la metodología (IDABV) y herramientas accesorias.

## **CAPÍTULO I**

### **El PROBLEMA**

#### **Planteamiento del Problema**

Uno de los problemas del tratamiento de la enfermedad de Chagas es la consideración de nuevas drogas con actividad tripanocida y su efecto en función de la concentración de la droga y del tiempo de respuesta. El Biospeckle es método que se está actualmente evaluando para detectar bacterias, parásitos, células y hasta tejidos. Grassi, H. C.(2016).

La enfermedad de Chagas sigue siendo un problema de salud pública en el país. En años recientes muchas investigaciones han llamado la atención sobre el posible resurgimiento de la enfermedad en distintas zonas del país, en particular en la región de los Llanos y en la región Andina, donde se han encontrado prevalencias serológicas >10% en menores de 10 años, lo cual indica claramente la existencia de transmisión. Esto último aunado al estudio de los vectores, distintas especies de triatomíneos (*R. prolixus*, *T. maculata* y *P.geniculatus*), dan un bosquejo de la posible situación real de la enfermedad en el país. A pesar de esto, nuevos enfoques en la terapéutica abren una posible esperanza al manejo de las formas agudas, inaparentes y crónicas de la patología, a través del conocimiento de vías metabólicas básicas del protozoario, *Trypanosoma cruzi*, así como de su fisiopatología, al demostrar la persistencia tisular del parásito en la fase crónica. (Nubraska et al. 2004)

## **Justificación de la Investigación**

Como se demuestra en la sección “Referencias de Biotecnología”, este proyecto de Biospeckle comenzó en el año 2009. En este proyecto se indica un sistema de procesamiento de imágenes con el cual se estudiaron los videos. Sin embargo, el desarrollo del conocimiento sobre Biospeckle condujo a nuevos métodos de procesamiento de videos por la metodología desarrollada por este grupo de trabajo, denominada IDABV y con la aplicación de otras herramientas accesorias.

## **Objetivos de la investigación**

### ***Objetivo General***

Aplicar el método mejorado de procesamiento de imágenes (IDABV, desarrollado originalmente por Grassi, 2014, en resultados aún no publicados) al análisis de los videos denominados Speckle Diciembre 4, desarrollados por Grassi H.C., Andrades EDL, Lobo ML, Garcia .L. y Cabrera . H. 2009.

### ***Objetivos Específicos***

- Aprender a utilizar la metodología (IDABV) y herramientas accesorias.
- Aplicar el procesamiento directo, tomado de Juan José (tesis en curso)
- Aplicar el procesamiento IDABV.

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Antecedentes de Investigaciones

Alanis, *et al.* (2013) Encontraron un método alternativo a la microscopia tradicional, que permite la detección de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de enfermedad de chaga en sangre. Para ellos se estudiaron propiedades dinámicas de la luz dispersada por muestras de sangre de ratones de laboratorio infectados con el parásito. Se registro la evolución temporal del campo de Speckle correspondiente a muestras de sangre sana e infectada respectivamente.

Zambrano (2013) Logro determinar mediante dos métodos de ensayo de peptidasas, uno en fase líquida y otro en fase gel (zimografía en geles), se detectó una peptidasa, en extractos proteicos crudos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, provenientes de un área rural de Venezuela endémica para el mal de Chagas.

En la Sección Biotecnología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes, se ha empleado la técnica de Biospeckle en diversos trabajos.

García (2011) estandarizó el uso del speckle dinámico para detectar la presencia de parásitos, para ello realizó el ensayo en una placa de V.D.R.L. y efectuó grabaciones de cada pozo realizando videos de 60 s. Esos videos se procesaron con un programa diseñado, elaborado y ejecutado por Andrades (2011), usando el método de las Diferencias Temporales. Los resultados indican que los parásitos en presencia de los diversos fármacos ensayados alcanzan un valor de Media arrojado por el programa de

Andrades (2011), mayor que en ausencia de fármacos, estimulándose el patrón de speckle bajo estas condiciones, asimismo, esta relación es dependiente de la concentración del fármaco. Finalmente, demostró que esta técnica puede sustituir los ensayos *in vitro*, ya que es más rápida y se evita la contaminación del medio.

Simultáneamente en 2011, Lobo corroboró este planteamiento, utilizando el biospeckle para medir la actividad de diversos fármacos sobre *T. cruzi*, de esta manera se puede hacer una predicción rápida del efecto a corto plazo de los fármacos sobre los parásitos, produciéndose un efecto instantáneo cuando se emplea Tofranil y Tryptanol. En este trabajo no solamente se utilizaron nuevas propuestas de fármacos (antidepresivos tricíclicos) como trypanocidas, sino que también se evaluó el valor predictivo del biospeckle al comparar los resultados con experiencias desarrolladas *in vitro* e *in vivo*.

Belandría en (2011), diseñó experiencias de biospeckle tomando en cuenta los resultados de otros investigadores, García (2011) y Lobo (2011), pero aplicadas a *Escherichiacoli*. El diseño consistió en evaluar tanto el efecto de la concentración de antibiótico sobre la bacteria, como el tiempo de acción del mismo, tratando de encontrar tanto la concentración óptima como el tiempo mínimo para la detección por Biospeckle. Para ello desarrolló el Biospeckle con medio de cultivo, medio más bacterias, medio más bacterias más antibiótico y medio más antibiótico, inicialmente se observó que la presencia de bacterias aumenta el patrón de speckle, además se decidió esperar un tiempo prudencial de 15 min, y así evitar los efectos por movimiento, mezcla y difusión. Los resultados demuestran que el biospeckle es más eficiente con respecto a tiempo que técnicas tradicionales como macrodilución y difusión en agar, por tanto representa un método que tiene un valor predictivo para obtener concentración mínima inhibitoria de un antibiótico.

En estos tres trabajos, los videos se procesaron por el Programa de Andrades (2011), el cual fue diseñado por el método de las diferencias temporales tomadas de Pomarico y DiRocco (2004). Este programa hace la resta de las matrices de fotogramas

consecutivos, y luego calcula la media de cada matriz de diferencia y la media de las medias de diferencia, obteniendo un solo valor de Intensidad Media final. Este método tiene la particularidad de “normalizar” y disminuir las diferencias. En los trabajos sucesivos se ha cambiado el análisis hacia un sistema de autocorrelación comparando cada matriz con una matriz constante y tomando el cambio que ocurre en función del tiempo o pendiente, lo que ha mejorado las diferencias entre videos. Este método ha sido denominado por nosotros como comparación de base constante.

En un estudio similar, realizado por (Díaz y Gallego en 2013), se utilizó biospeckle para medir el efecto de ciprofloxacina sobre *Escherichiacoli*, los resultados permiten inferir que se puede distinguir materia viva de materia muerta, además se encontró una posible correlación entre la pendiente de la tendencia lineal, la concentración bacteriana y la concentración del antibiótico, tendiendo a ser mayor la pendiente cuando aumenta la concentración de bacterias, mientras que disminuye cuando aumenta el antibiótico. En este trabajo los videos también se procesaron manualmente por el método de comparación con base constante.

Recientemente se han desarrollado dos trabajos (Méndez 2015, Abche 2015) que han conducido al avance en el procesamiento de imágenes. (Méndez 2015) examinó las ecuaciones y los algoritmos utilizados en el procesamiento y propuso un nuevo método, basado en los conceptos de flujo óptico, que denominamos método óptico IDABV. (Abche 2015) tomó esa propuesta y reprocesó los videos obtenidos por (Belandria 2011) y tomando en consideración el modo de acción de los antibióticos utilizados, contribuyó a constatar que ese nuevo procesamiento es más adecuado.

Todos los trabajos anteriores se llevaron a cabo con un ensamble manual de láser, cámara y porta muestras, que se armaba en un cuarto oscuro. A partir del año 2012 se comenzó a elaborar un prototipo de Biospeckle en el contexto del Proyecto de Innovación del Poder Popular para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, intitulado: “Producto y proceso para medir el efecto de antibióticos sobre

microorganismos en un tiempo corto y utilizando biospeckle” Proyecto No. 2012001862.

Briceño y Ángel (2013), utilizando el Prototipo de Biospeckle en sus primeras etapas de fabricación, también aplicaron biospeckle en el estudio de bacterias, para ello emplearon métodos de atenuación del láser con el objetivo de detectar la presencia de las mismas, usando laser rojo, verde y azul con vidrio o filtros como atenuadores. Los resultados indican que el vidrio es buen atenuador cuando las bacterias están muy diluidas, sin embargo ocurre saturación de la imagen y afecta la cámara, por lo que recomienda usar filtros. Así mismo demostraron que empleando el láser verde se detecta solo efecto antibiótico cuando se usa vidrio como atenuador, mientras que si se usa un filtro se detectan solo las bacterias. En el caso del láser azul se obtienen resultados similares aunque es mucho más versátil para detectar bacterias concentradas y diluidas en presencia y ausencia de antibióticos si se atenúa con filtro. En este trabajo los videos se procesaron manualmente por el método de comparación con base constante.

Moreno (2015) reunió las experiencias anteriores para mejorar los datos de Biospeckle. Para ello se ha evaluado el efecto del antibiótico Ampicilina – Sulbactam sobre *Escherichia coli*, por Biospeckle, usando láser verde en el prototipo construido y se han evaluado variables que inciden sobre este sistema, tales como cámara, resolución, aumento, etapa del crecimiento, presencia de antibiótico, etc. El procesamiento de videos se ha realizado por el método de comparación con base constante y por el método óptico IDABV. En ese contexto se ha logrado poner a punto una metodología de “Antibiograma por Biospeckle” y se ha evaluado la presencia de sistemas particulados para aumentar las diferencias entre muestras vivas y aquellas afectadas por el antibiótico.

Finalmente, todo este sistema de detección de microorganismos por Biospeckle se aplicó a muestras de orina de pacientes que clínicamente tenían infección urinaria y sus muestras se analizaron por VITEK y por Biospeckle, en el Bioespequelómetro

(Muñoz 2015). Los resultados obtenidos en la comparación de coincidencia paciente por paciente, Vitek-Biospeckle, es de 75%, concluyendo que el biospeckle es capaz de detectar actividad biológica en muestras de orina y que pudiera llegar a ser una prueba complementaria al análisis microbiológico tradicional, tal como cultivo, antibiograma y VITEK, ya que en un tiempo muy corto, podría dar una indicación al médico para iniciar el tratamiento, que luego se confirmaría por los métodos tradicionales.

Aunque otros autores tales como Ramírez-Miquet, (Martí y Contreras 2011) también desarrollaron Biospeckle sobre bacterias, nuestro trabajo ha resultado ser novedoso y original por usar bacterias en medios líquidos y evaluar el efecto de antibióticos y lograr detectar pequeños cambios en la actividad bacteriana en tiempos cortos.

El trabajo que se propone ejecutar utilizaría el prototipo construido y las condiciones puestas a punto en los trabajos anteriores y en el Proyecto de Innovación aquí citado.

### **Antecedentes Históricos**

Segura *et al.* (1999) lograron controlar la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en Argentina estableciendo programa de la eliminación de las poblaciones domésticas y peridomésticas de *T. infestans* a través del rociado con insecticidas, y el control serológico de los donantes de sangre para prevenir infecciones relacionadas con las transfusiones.

(Suárez 2004) En Venezuela la presencia de *T. cruzi* en *Rhodnius prolixus* fue señalada por primera vez en 1919 por Enrique Tejera; en 1934 José Francisco Torrealba alerta acerca de la importancia del problema y Félix Pífano crea las bases para los estudios epidemiológicos y clínicos de la enfermedad de Chagas en el País a través de sus trabajos publicados desde el año 1940 (Pifano, 1969). Después de

ensayos iniciales de control con DDT y HCH, en 1952 el Ministerio de Sanidad y Asistencia Social emprendió una campaña piloto contra los triatominos utilizando Dieldrin, en el caserío La Hoyada del municipio Carvajal del estado Trujillo y posteriormente en San Juan de los Morros en Mayo de 1953, pero es a partir del 26 de febrero de 1966, cuando incluye una partida en el Presupuesto Nacional para acometer una Campaña Nacional Contra la Enfermedad de Chagas (Berti, 1997), quedando establecido el Programa de Control de la Enfermedad de Chagas (PCECh).

(Bonfante *et, al.*2011) Determinaron factores de riesgo asociados a la seropositividad para anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi en 26 poblaciones rurales. En Venezuela, en los últimos cuarenta años se ha observado un descenso progresivo de los índices de la prevalencia de la infección en humanos, desde un 44,5% en la década de los años 50 a 60, hasta un 8,3% en el año 2000. Estos resultados han sido producto de la puesta en práctica de acciones que incluyen: sustitución de viviendas, control de vectores, cribado de sangre y programas de prevención en áreas vulnerables.

## **Bases Teóricas**

### ***El Speckle***

Cuando un haz coherente proveniente de un láser ilumina un objeto, éste adquiere una apariencia granular particular. La estructura detallada de la granularidad no tiene una relación directa con las características macroscópicas del objeto, sino que aparece aleatoria y desordenada. Este fenómeno denominado speckle es la manifestación de un proceso óptico de interferencia y se presenta como puntos brillantes y oscuros que cubren la superficie (Passoniet, *al.*2005). Si la superficie presenta algún tipo de movimiento local, el speckle observado evolucionará en el tiempo (Bragaet, *al.*2009); (Passoniet,*al.*2005). Esto es característico de muestras biológicas iluminadas por láser y de procesos industriales, como por ejemplo secado de polímeros, corrosión, eflorescencia, intercambio de calor, etc. (Zakharov *et,al* 2009). El estudio de la evolución temporal de los diagramas de speckle provee una

interesante herramienta no destructiva ni invasiva para caracterizar los parámetros involucrados en procesos dinámicos.

Los patrones de actividad biospeckle se pueden utilizar para extraer información sobre los cambios en la heterogeneidad de factores en materiales biológicos. Esta técnica se ha aplicado a varios fenómenos biológicos. Se ha utilizado para cuantificar el movimiento de los fluidos o células, por ejemplo al describir el flujo de sangre en un tejido (Briers, 1975), el crecimiento de bacterias y la motilidad del semen (Carvalho et al, 2009;.. (Murialdo et al, 2012) o la tasa de raíz deformación (Rathnayake et al., 2008), para evaluar las diferencias entre individuos o tratamientos, por ejemplo cuando se analizan la madurez de los tejidos (Rabelo et al., 2005), la determinación de la eficacia de los medicamentos en los parásitos (nematodos) (Pomarico et al, 2004);.. (Amaral y otros, 2013), o la detección de hongos en las semillas de frijol (Braga et al., 2005) o el diagnóstico del cáncer (Ul'yanov et al., 2012) y para cuantificar cambios espaciales o temporales en tejidos específicos, por ejemplo a partir de los patrones de actividad biospeckle de cultivo de tejido de raíces (Braga et al., 2009).

Los orígenes de los patrones de actividad biospeckle son a menudo desconocidos. Sin embargo, ha sido especulado que pueden surgir de los procesos biológicos, incluyendo la maduración del tejido, la división celular, el movimiento de los orgánulos, corriente citoplasmática y reacciones bioquímicas (Rabelo et al., 2005).

El moteado o biospeckle dinámico constituye una herramienta prometedora para el estudio de los procesos microscópicos en medios biológicos, moteado (término de origen Inglés) es un patrón de interferencia aleatoria creado por la interferencia mutua de múltiples ondas coherentes con desplazamientos de fase al azar. Cuando los objetos están vivos y son iluminados por láser, el patrón de moteado cambia debido a los cambios temporales de las fases de ondas dispersas y amplitudes. Por eso el láser biospeckle (BSL) se ha convertido a lo largo de los años en una aplicación cada vez más eficiente para la supervisión de la actividad en muestras biológicas como lo son (Parásitos, Bacterias, Hongos entre otros).

Los sistemas diseñados cuentan con varios componentes, entre ellos tenemos:

- **Envase:** Que pueden variar su tipo, placas de petri, placa de V.D.R.L viales, cubetas o solo se usa la muestra como: frutos, semillas, objetos.
- **Láser para la iluminación:** Se utilizan láseres de diferentes características. Dependiendo del tipo de muestra, se utiliza láser gaseoso He-Ne de luz roja (de alrededor de 630nm) o láser de luz verde (de alrededor de 560nm), de potencias variable que pueden oscilar desde 1 á 50mW.

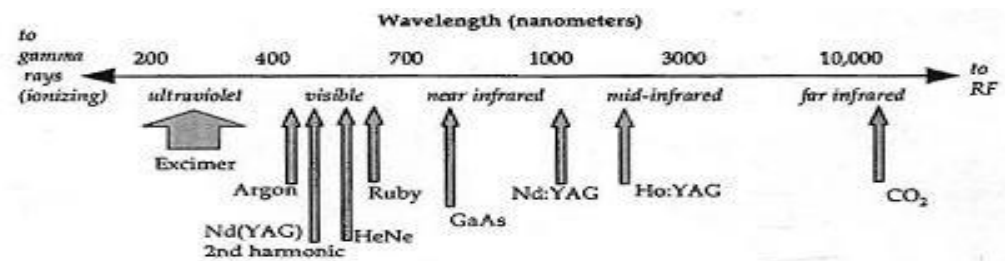


Figura 1.- Configuración experimental.

- **Cámara:** CCD, que toma o capta la imagen que es proyectada por el laser a la muestra. Ésta debe ser capaz de tomar videos con alta velocidad.
- **Computador:** Que procesa el patrón de imagen de moteado (Speckle) utilizando diferentes métodos.

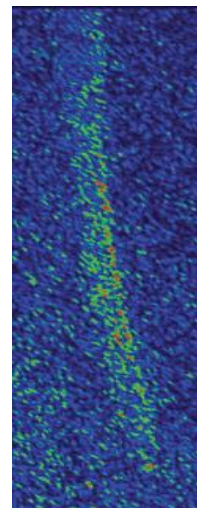
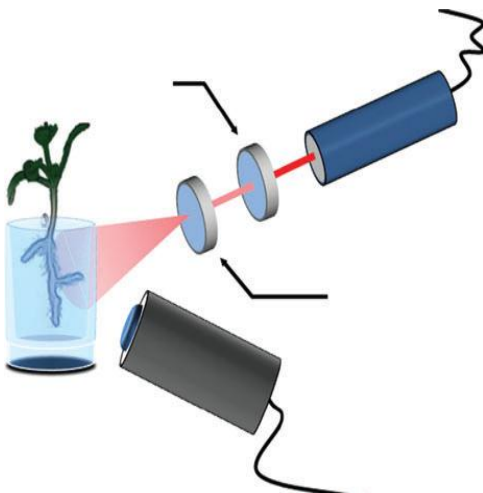


Figura 2.- Configuración experimental. Figura 3.- Diagrama de speckle.

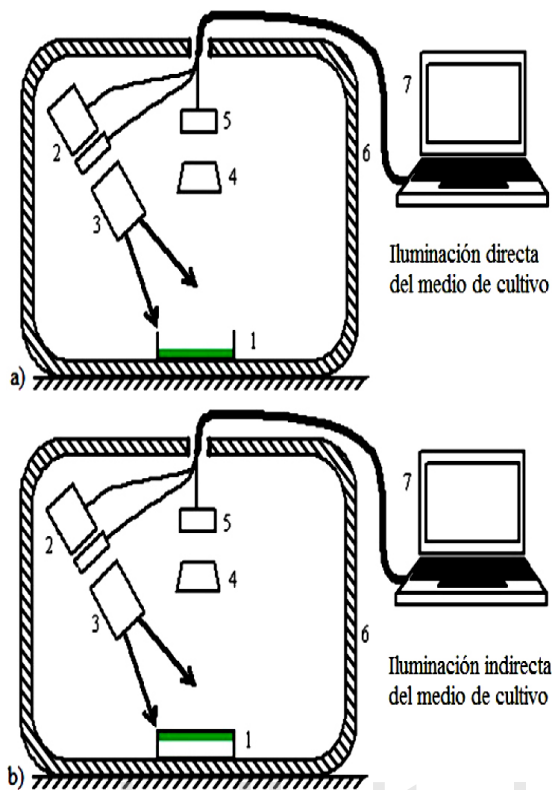
Algunos ejemplos de la reciente aplicación de esta herramienta son las obras de:

- Zakharov, A.C. (2009) Determino el flujo de sangre en la imagen cerebro de roedores.
- Mavilio (2010) Realizo el estudio del proceso de pintura secado.
- Ansari y Nirala (2013) Determinaron el control de la maduración de Frutas indias usando los métodos de correlación cruzada y momentos.
- Carvalho et al, (2009) Logró determinar el crecimiento de bacterias y la motilidad del semen.
- Rabelo et al., (2005), la determinación de la eficacia de los medicamentos en los parásitos nemátodos.
- Pomarico et al, (2004), interferometría de moteado aplicado a los estudios farmacodinámicos : evaluación de la motilidad parásito.
- Amaral y otros, (2013), Aplicación de la técnica láser biospeckle para determinar los fenómenos biológicos relacionados con el envejecimiento de carne
- Braga et al., (2005) Realizo un estudio utilizando Biospeckle para el diagnóstico del cáncer.

Cada método tiene características distintas y propiedades. Además, el elevado número de aplicaciones de biospeckle trae consigo mismo la necesidad de técnicas de

imagen y procesamiento de señales que pueden ayudar en la interpretación, y ofrecer información adicional derivada de estos patrones de interferencia ópticos.

Con el transcurrir del tiempo se han desarrollado diferentes procesos, métodos y tipos de diseño. Un ejemplo se presenta en la investigación de R. Arizaga, M. Trivi y H. Rabal, *Optics & Laser Technologies* **31** (1999) 163-169, donde se hace comparación de dos maneras de trabajar el Biospeckle dinámico, se determina sus posibilidades para describir la actividad de células de la especie *E. coli*, utilizando dos configuraciones diferentes en la forma de iluminar la muestra. En los experimentos se utilizaron placas de Petri de dos compartimientos. Ambos compartimientos contienen medio de cultivo sólido (Agar Mueller Hinton (*MHA*), Oxoid) pero solo uno de ellos fue inoculado con células bacterianas utilizando el método de hisopo calibrado. De acuerdo con los autores, con este método se logra una distribución homogénea de las bacterias en el medio de cultivo. De esta forma, se logra un registro de la actividad de fondo inherente al medio de cultivo. Estos autores encuentran resultados similares con ambas configuraciones de iluminación.



**La Fig. 1** Muestra un esquema simplificado.

En el esquema representado **a)** La placa de petri está colocada de manera que el haz incide directamente sobre el medio de cultivo.

En el esquema representado **b)** Se muestra otra forma de iluminar la placa; en este caso el haz incide por la parte inferior, de manera que accede indirectamente al medio de cultivo después de atravesar un volumen del material de la placa.

Extraído

**R. Arizaga, M. Trivi y H. Rabal,**  
*Optics & Laser Technologies*  
**31 (1999) 163-169.**

**Figura 4.** Comparación de dos maneras de trabajar el Biospeckle dinámico.

Según R. Arizaga, M. Trivi y H. Rabal, *Optics & Laser Technologies* **31** (1999), Demuestran cualitativamente como cuantitativamente que la actividad diferenciada detectada se encuentra relacionada con eventos que ocurren en el medio de cultivo, específicamente en el compartimento inoculado y que el tiempo en que se detecta esta actividad es independiente de la configuración de incidencia directa o indirecta del haz.

También se han realizado otros estudios de casos demostrativos aplicando el Speckle que puede ser efectivamente usado para analizar muestras que presenten actividad interna más quieto con frutos, frutos secos y semillas. A continuación se citan algunos trabajos desarrollados con este tipo de diseño.

A. Oulamara (1989) En este trabajo se estudia la evolución temporal del patrón de speckle de cada semilla (semillas de lupino) a temperatura ambiente y a diferentes

temperaturas en el rango comprendido entre 5 y 25 °C, considerando. Oulamara; propuso el uso de una cámara CCD para registrar y almacenar una columna individual de la imagen en pasos consecutivos de tiempo con un display y construir la historia temporal de un patrón de speckle (THSP, Time History of Speckle Pattern). Así la información espacial y temporal se almacena simultáneamente. A partir de los resultados obtenidos con todas las semillas de lupino estudiadas, se efectuó una correlación entre los valores calculados del momento de inercia de la matriz de concurrencia de cada semilla con la clasificación efectuada de cada una por el test del Tetrazolium, lo que permitió validar la técnica del biospeckle como método alternativo y no destructivo para el estudio de la viabilidad de estas semillas.

Por otro lado, (Arizaga *et al.* 2002) trabajó con semillas de uchuva (*P. peruviana*) que son 50 veces más pequeñas, El *speckle* dinámico registrado en las semillas estudiadas depende en gran medida de la evaporación del agua que contienen. Tanto con el método de las diferencias generalizadas modificado (DGM) como con el método de la diferencia temporal (DT) se detectó mayor actividad en los patrones de *speckle* dinámico en las semillas de uchuva vivas hidratadas que en las semillas vivas secas y la semilla no viable seca (control). La técnica no permitió diferenciar estos dos últimos tipos de semillas, probablemente por su bajo nivel de hidratación.

Como se ha explicado anteriormente es necesario la reflexión de la luz, donde interviene mucho la naturaleza de la superficie reflectante. Según sea esta superficie se pueden distinguir las siguientes clases de reflexión entre ellos tenemos:

### ***La reflexión de la luz sobre la muestra***

La Reflexión Difusa se produce cuando la luz incide sobre una superficie rugosa ocasionando que la luz se refleje en diversas direcciones. Ésta se denomina también Lambertiana y se describe en términos del coseno del ángulo entre la luz incidente y un vector perpendicular a la superficie.

La reflexión especular se produce cuando la luz refleja en una superficie lisa o pulida como, por ejemplo, un espejo. Si la superficie es totalmente lisa la luz va a reflejar en el mismo ángulo en el cual incide o llega a esa superficie. Superficies metálicas y líquidos presentan Reflexión Especular. (Silva, P. C. 1993).



Figura 5. **Reflexión Difusa.**

Otras superficies suelen presentar combinaciones de Reflexión Difusa y Especular. Por ejemplo, en el caso del vidrio, aunque éste transmite la mayor parte de la luz, sus dos superficies pueden ejercer reflexión. También las superficies curvas, afectan el tipo de reflexión que se encuentra.

En los ensayos de Biospeckle, dependiendo del sistema que se utilice, la reflexión puede estar afectada por el tipo de muestra y de sistema que se utilice para obtener el resultado.

### **Transmisión**

La transmisión se puede considerar una doble refracción. Si pensamos en un cristal; la luz sufre una primera refracción al pasar del aire al vidrio, sigue su camino y vuelve a refractarse al pasar de nuevo al aire. Si después de este proceso el rayo de luz no es desviado de su trayectoria se dice que la transmisión es regular como pasa en los vidrios transparentes. Si se difunde en todas direcciones tenemos la transmisión difusa que es lo que pasa en los vidrios translúcidos. Y si predomina una dirección sobre las demás tenemos la mixta como ocurre en los vidrios orgánicos o en los cristales de superficie labrada. Cuando la luz blanca choca con un objeto una parte de los colores que la componen son absorbidos por la superficie y el resto son

reflejados. Los componentes reflejados son las que determinan el color que percibimos. (Silva, P. C. 1993).

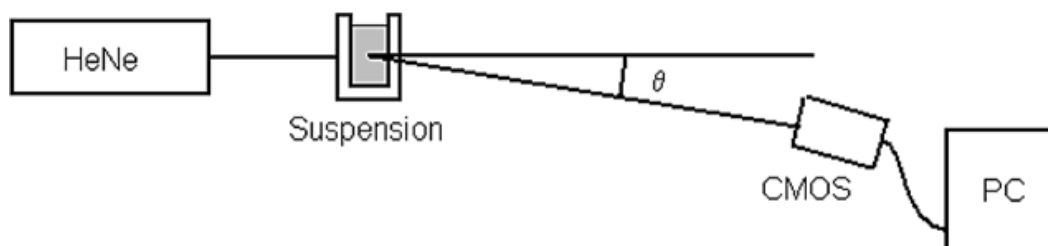


Figura 6. **Reflejo de Luz de Transmisión.**

Algunas investigaciones serán citadas a continuación

- Parales R and Haddock J (2004), Utilizan la técnica para la detección de la respuesta de los móviles en muestras de cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* usando láser speckle dinámico o biospeckle como un método alternativo.
- J. W. GoodmanJ. D. Briers (2001) En su estudio de la concentración de partículas en el agua natural por moteado de tamaño y medición, revelan que el speckle junto con el tamaño medio de moteado del campo lejano puede ser utilizado como un procedimiento rápido en la evaluación de la concentración de centros de dispersión en una fluido biológico, en el intervalo de concentración de pequeñas y medianas partículas de agua.

### Hipótesis

El método mejorado de procesamiento de imágenes conjuntamente con otras herramientas puede ser aplicada para el análisis de experiencias de Biospeckle de parásitos que por haber sido desarrollado en viales y haberse tomado las muestras de manera simultánea no habían sido analizados.

## CAPITULO III

### Marco Metodológico

#### Tipo y diseño de la Investigación

Dicha investigación posee un enfoque tipo mixto ya que comprende enfoque Cualitativo y cuantitativo.

#### Materiales y Métodos

En el siguiente trabajo se contó con el análisis de (5) videos denominados Speckle **Diciembre 4**, desarrollados por Grassi H.C., Andrades EDL, Lobo ML, Garcia .L. y Cabrera. H. 2009.

Se utilizó los siguientes materiales descriptos a continuación

- Viales 3 ml con tapa.
- Parasito *Trypanosoma cruzi*
- Dipirona – ampolla. Inyectable 2 mg/ml
- Azida de Na. 1ml/M (0,0065 g/ml)
- Cámara CCD, Laser 35mW y un ordenador para procesar los videos captados por la cámara.
- Cada de los (5) videos corresponden a un tiempo (1.5, 2.5, 3.5, 4.5) horas.
- Se hicieron tomas de tubos individuales y en conjunto, correspondiente al siguiente orden (105, 205, 305,405) donde se describen en el siguiente cuadro.

**Tabla 2**  
**Protocolo de Trabajo**

| <b>ORDEN</b>                                      | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b>      | <b>4</b> | <b>5</b>       |
|---------------------------------------------------|----------|----------|---------------|----------|----------------|
| <b>Parasito</b><br><b>1x10<sup>7</sup> par/ul</b> | 0,5      | ---      | 0,5           | ---      | 0,5            |
| <b>Medio lit</b>                                  | 2,5      | 3        | 2,5           | 3        | 2,5            |
| <b>Droga</b>                                      | ----     | ---      | Dipirona 20ul | ----     | Azida<br>20ul. |

A lo consiguiente, se emplearon diferentes programas y métodos donde se describe a continuación.

### ***Método Directo***

Como primer método se procedió a tomar los videos del experimento Biospeckle DICIEMBRE 4. Se fragmentaron, empleando un programa de separación de videos en fotogramas, “Free video”, se seleccionaron 10 fotogramas a partir del 100, luego se empleo “Microsoft Office Picture Manager” utilizando coordenadas (Izq: 130pix, Dere: 700pix, Sup: 100pix y Inf: 550pix) y así obtener 10 recortes de los fotogramas que corresponden a 10 matrices

Estas matrices obtenidas anteriormente, son llevadas al programa “Image J”. Primero se aplica la herramienta image>color>split channels produciendo tres matrices, una correspondiente a la banda roja, otra a la banda verde y otra a la banda azul. A la matriz de la banda roja se le aplica la herramienta analyze>histogram, obteniendo el histograma para así obtener la media de la intensidad y otros parámetros tales como desviación estándar y moda. Esos valores se llevan a Excel para realizar graficas en barras y así observar el efecto del parasito en presencia de la droga, bien sea (Dipirona ó Azida)

### ***Método Indirecto***

Como un segundo método se aplicó (IDABV) Imagen de diferencias acumuladas de base variable, de acuerdo con la metodología puesta a punto por Méndez (2015). Este método se realizó de la siguiente manera: se tomaron 6 matrices (100 a 106) que provenían de fotogramas recortados, como se describió en el método directo. Usando la herramienta process>image calculator se realiza la diferencia secuencial de las matrices y luego, con la misma herramienta se realizó la suma de las cinco diferencias que representa la idabv.

Cada histograma es llevado a Excel para realizar su estadística y obtener graficas de la media como variable dependiente y el tiempo como variable independiente, y así indicarnos el efecto de las drogas por cambio en el patrón de speckle, cuál de ellas produjo disminución de movilidad del parásito *Trypanosoma cruzi* y así llegar a una conclusión coherente.

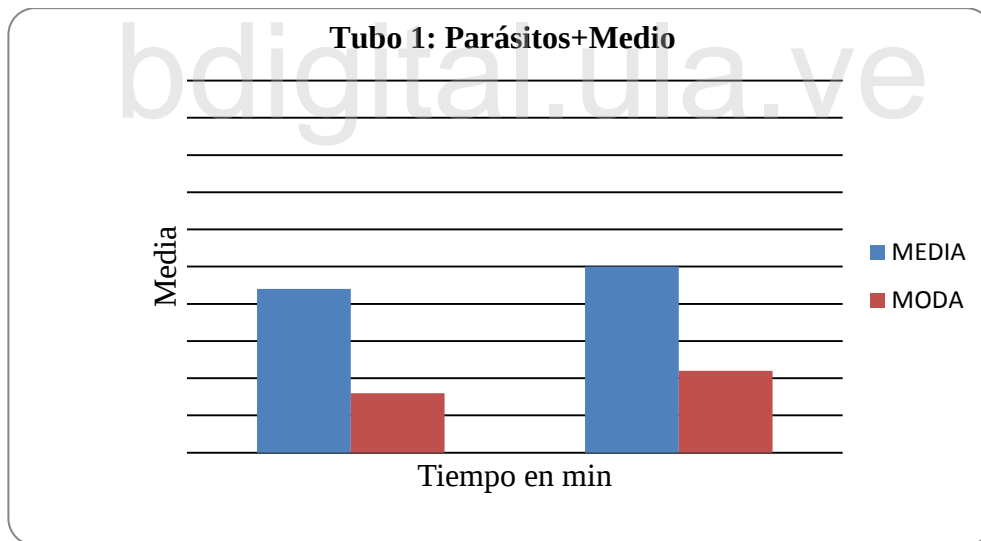
bdigital.ula.ve

## CAPITULO IV

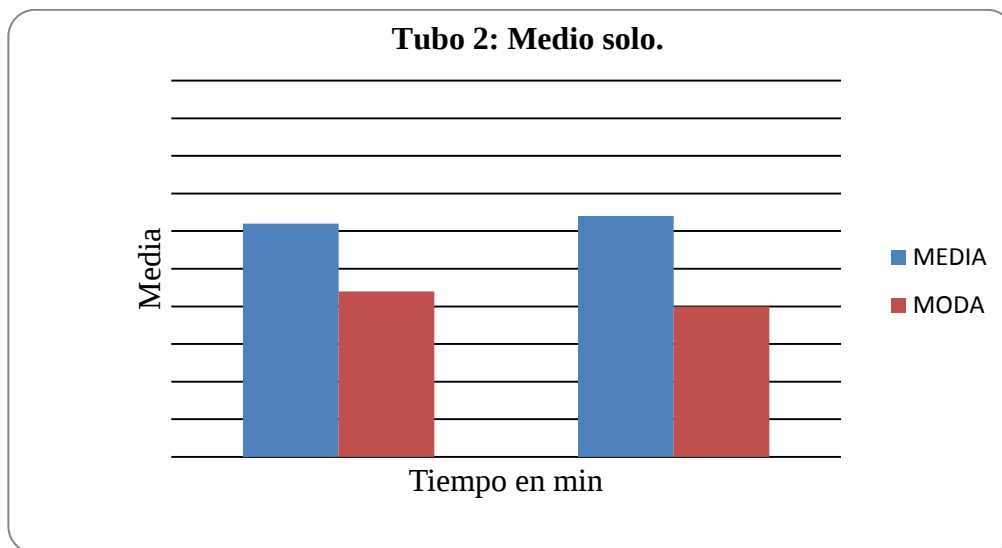
### Resultados y Discusión

#### *Método directo*

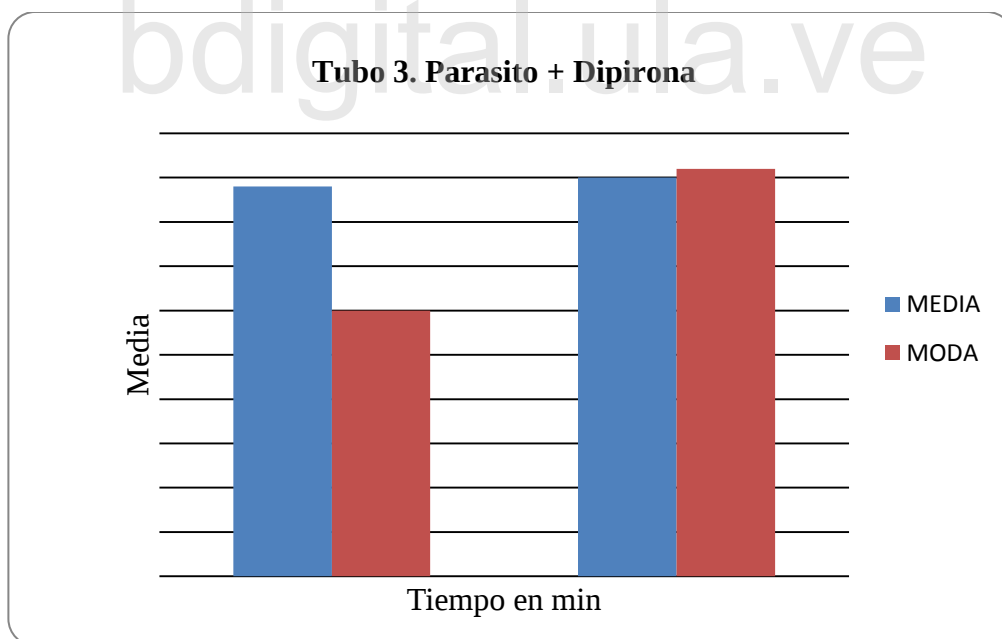
Histogramas, obtenidos de los videos Diciembre 4



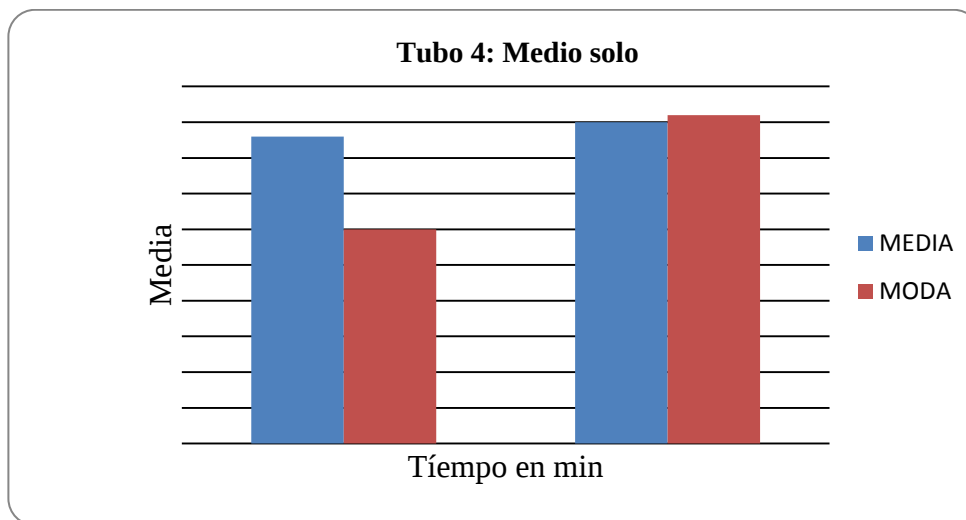
**GRÁFICA 1.** Efecto del parasito sin presencia de drogas.  
(90-150 min.)



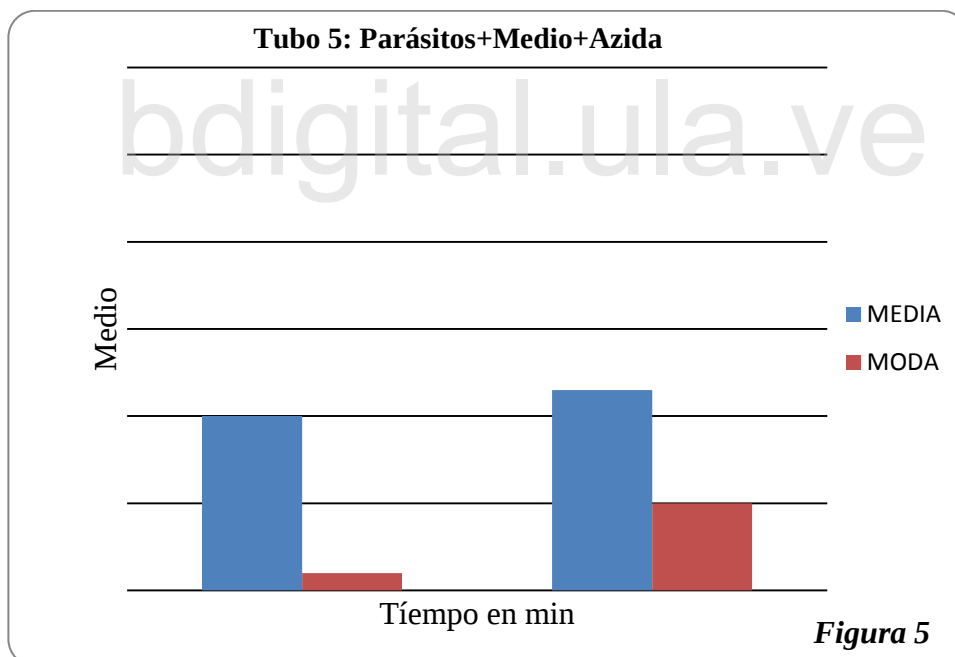
**GRÁFICA 2.** Efecto del medio sin presencia drogas.  
(90-150 min.)



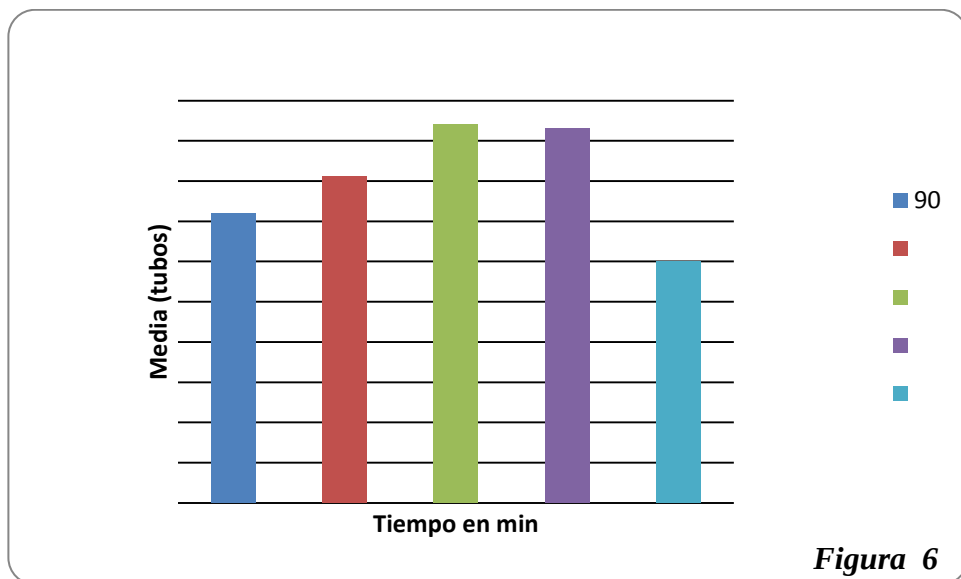
**GRÁFICA 3.** Efecto del Parasito en presencia de droga “Dipirona 20 $\mu$ L”  
(90-150 min.)



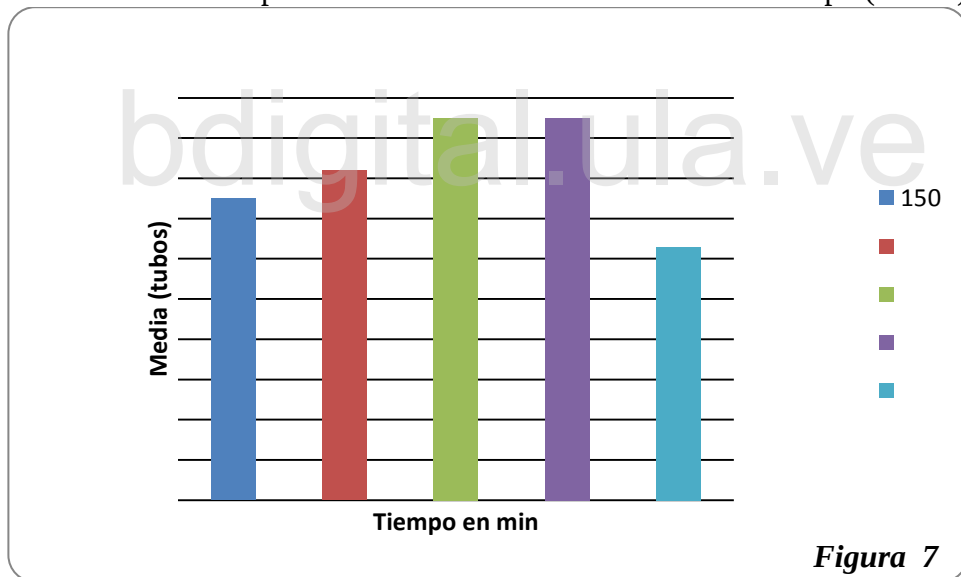
**GRÁFICA 4.** Efecto del medio sin presencia de drogas.  
(90-150 min.)



**GRÁFICA 5.** Efecto del Parasito en presencia de droga” Azida 20 $\mu$ L”  
(90-150 min.)



**GRÁFICA 6.** Comparación de moteado de cada tubo a un tiempo (90min)



**GRÁFICA 7.** Comparación de moteado de cada tubo a un tiempo de (150 min)

Hay muchos efectos de brillo que interfieren en la comparación del moteado, es por ello que para este Método Directo, no tomamos en cuenta los videos de tiempo(305 y 405min) ya que éstos presentan saturación de luz yestán mucho mas brillantes que los de tiempo(105 y 205min).

Los tubos 2 y 4 presentan moteado diferente a pesar de que ambos tienen solo medio de cultivo, probablemente éste es un efecto de factores externos tales como brillo, posición, etc. También se observa que el moteado del medio solo es mayor que el moteado del medio con parásitos. Sin embargo, si se compara parásitos solos con parásitos con Azida, se ve un efecto de disminución del moteado en presencia de la droga.

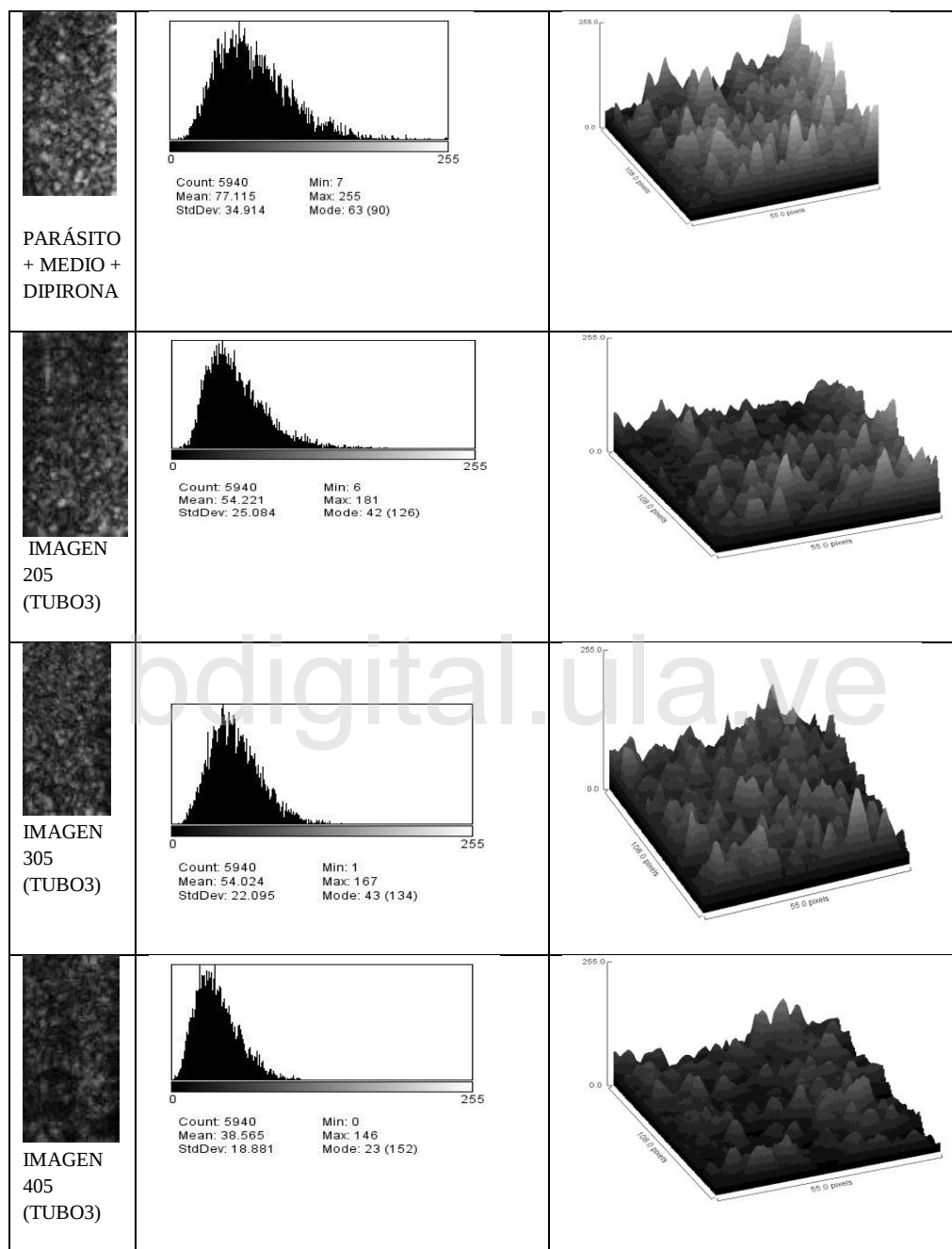
Si se compara parásitos solos con parásitos con Dipirone, se ve un aumento del moteado en presencia de la droga, efecto que ya ha sido reportado anteriormente (Lobo, 2011).

El método directo no parece ser buen reflejo de la velocidad de moteado, contrariamente a lo encontrado por Juan José Rojas (tesis en curso), esto posiblemente se deba a la distorsión óptica que produce la curvatura del vial y el reflejo del laser y brillo sobre el tubo.

Sin embargo podemos hacer una comparación utilizando las herramientas “Surface Plot” e “Histograma” que nos sugieren una manera de ver el efecto del tratamiento de los parásitos, como se muestra a continuación en las Tablas 2 y 3.

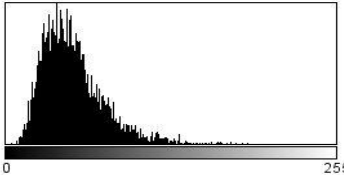
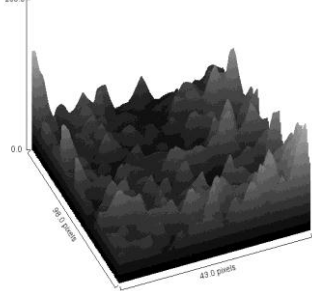
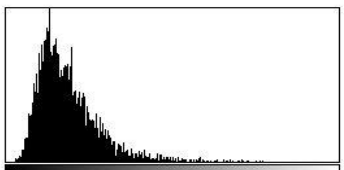
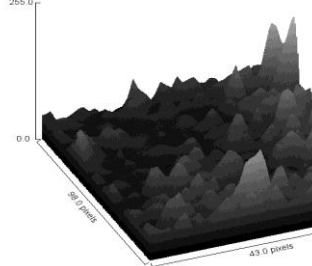
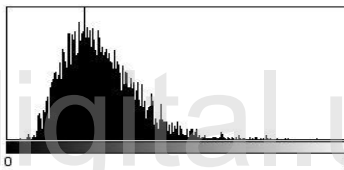
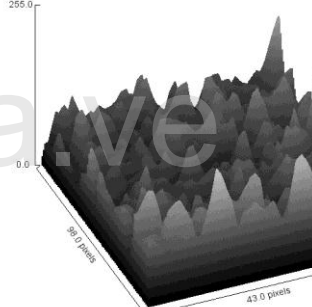
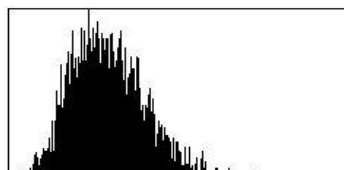
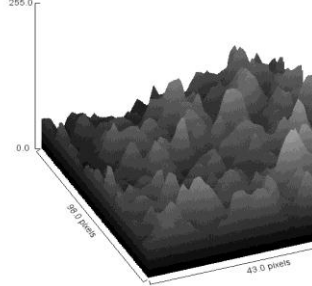
**Tabla 2**

*Grafica de superficie, un fotograma de cada ensayo*



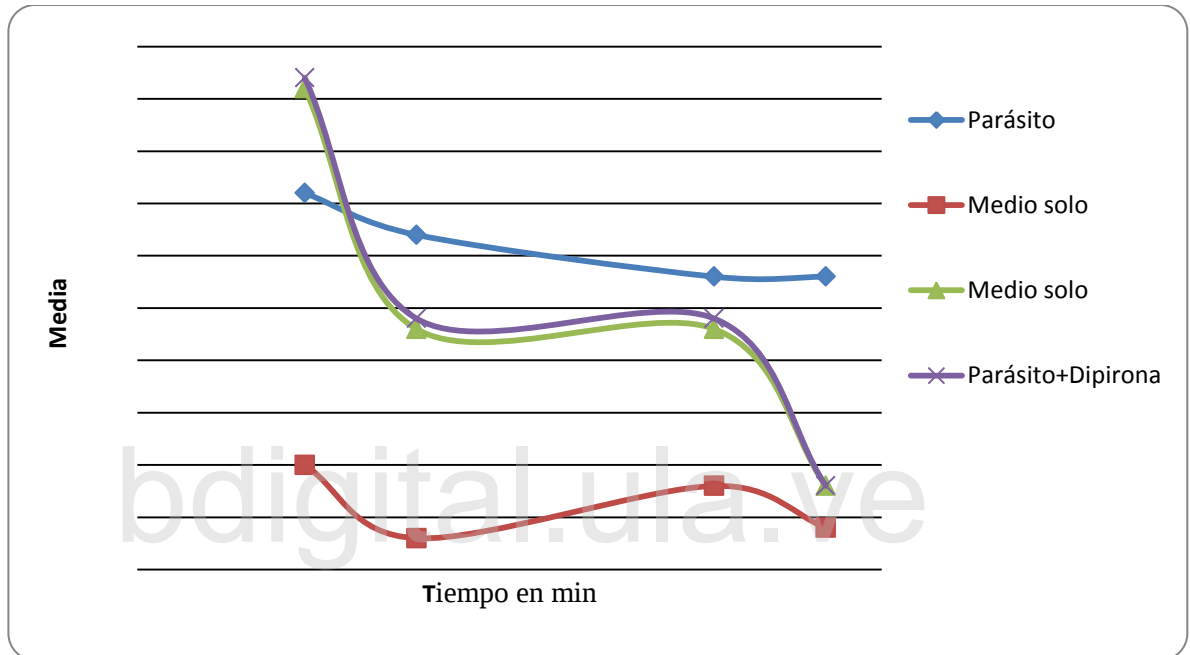
**Tabla 3**

*Grafica de superficie, un histograma de cada ensayo.*

|                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                         |                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p><b>IMAGEN 105</b><br/>(TUBO 5)<br/>PARÁSITO +<br/>MEDIO + AZIDA</p> |  <p>Count: 4214      Min: 4<br/>Mean: 51.990      Max: 187<br/>StdDev: 24.836      Mode: 39 (97)</p>   |    |
|  <p><b>IMAGEN 205</b><br/>(TUBO 5)</p>                                  |  <p>Count: 4214      Min: 7<br/>Mean: 47.998      Max: 197<br/>StdDev: 25.217      Mode: 33 (122)</p>  |    |
|  <p><b>IMAGEN 305</b><br/>(TUBO 5)</p>                                 |  <p>Count: 4214      Min: 9<br/>Mean: 67.742      Max: 226<br/>StdDev: 27.295      Mode: 56 (86)</p>  |   |
|  <p><b>IMAGEN 405</b><br/>(TUBO 5)</p>                                |  <p>Count: 4214      Min: 0<br/>Mean: 67.801      Max: 185<br/>StdDev: 25.834      Mode: 54 (78)</p> |  |

### Método Indirecto

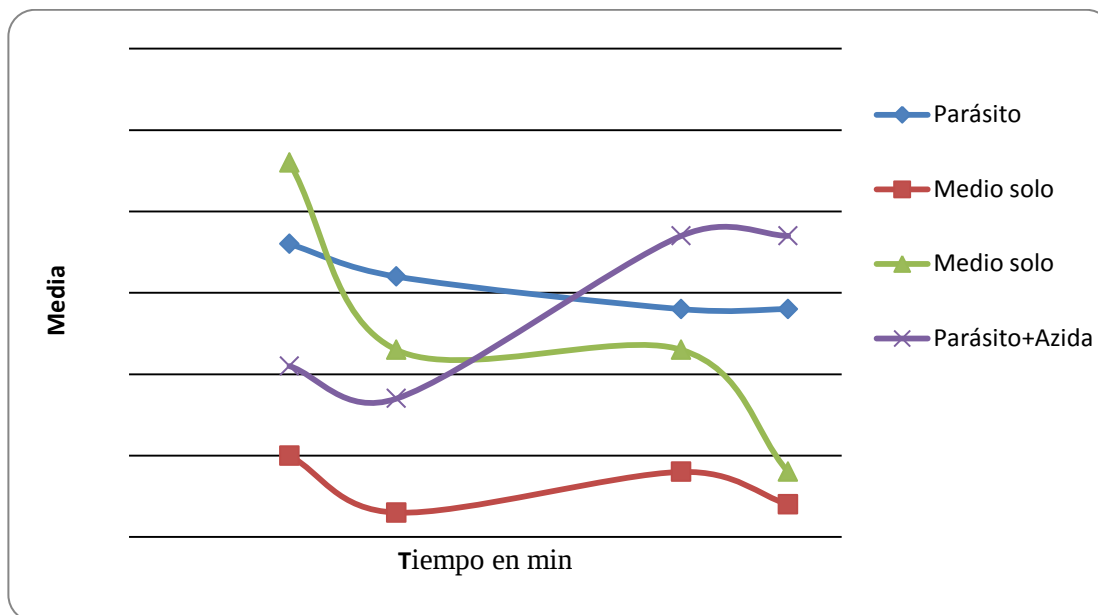
Método indirecto (IDABV). Imagen de Diferencias Acumuladas de Base  
Variable:



**GRÁFICA 8.** Efecto de la droga (Dipirona) por cambio en el patrón de Speckle.

**Tiempo** ( 90, 150, 310, 370 min)

Se observa que la presencia de parásitos aumenta y cambia el perfil que se observa con el medio solo. Esto indica que por este método se puede detectar la presencia de parásitos. Al encontrarse el parásito en presencia de dipirona se observa que el perfil de la gráfica es idéntico al perfil del medio solo, lo que indica que se está detectando por Biospeckle el efecto de la dipirona sobre este microorganismo.



**GRÁFICA. 9** Efecto de la droga (Azida) por cambio en el patrón de Speckle.

Como se puede ver en la grafica 9, la presencia de Azida de Sodio no produjo una disminución en la señal de Biospeckle. Este compuesto se utilizó con el objeto de promover una inhibición de la respiración del parásito, ya que actúa inhibiendo la enzima citocromo oxidasa de la cadena respiratoria. Si hubiese habido una inhibición sobre la respiración se esperaba una disminución en la motilidad y por lo tanto una disminución del Biospeckle. Los inhibidores metabólicos fueron muy usados para la clasificación de hemoflagelados ya que a través de su efecto se podía describir su fisiología. En ese sentido, Zeledon (1960) estudió el efecto de algunos inhibidores, encontrando que la azida de sodio tiene poco efecto sobre la respiración y la motilidad de *Trypanosomacruzi*. A una concentración de azida de  $10^{-5}M$  no hay efecto sobre la respiración y motilidad, mientras que a una concentración de  $10^{-4}M$ , el efecto es leve. Como en el presente trabajo la concentración de azida utilizada es de  $6,6 \times 10^{-5}M$  que se encuentra de manera intermedia entre las dos utilizadas previamente, es de esperar que su efecto sobre el parásito sea de poco a nulo. Adicionalmente, Ryley (1956) reportó que *T. cruzi* puede utilizar la oxidación de

aminoácidos como vía alterna de respiración endógena, lo que podría explicar el aumento en la actividad en función del tiempo.

Finalmente, tal como se planteó en el objetivo general de este trabajo, se logró aplicar el método IDABV al análisis de los videos seleccionados, usando herramientas que permitieron separar el video en fotogramas, recortar los fotogramas, obtener las diferencias entre fotogramas y sumar las diferencias. El análisis de imágenes por el Método Directo no produjo buenos resultados, posiblemente debido a que, tal como se discute en las Bases Teóricas de este trabajo, el vidrio y más aún, las superficies curvas, pueden presentar una mezcla de Reflexión Difusa y Especular. En nuestro caso, posiblemente el diseño del experimento con viales de paredes curvas, aunque se puede hacer el análisis por IDABV, el Método Directo no resulta adecuado.

bdigital.ula.ve

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIÓN**

Se concluye que la aplicación del método directo de análisis de resultados no arrojó un resultado coherente de Biospeckle.

La aplicación del método IDABV con las herramientas adicionales de análisis de Biospeckle permitió

- Poner a punto un método para el procesamiento de imágenes de Biospeckle en condiciones de viales de cultivo y tomando videos de los cinco viales simultáneamente, lo que asegura que las condiciones del video son iguales para todos los tubos.
- Poner a punto un método para el procesamiento de imágenes de superficies curvas, en ese sentido se descarta el Método Directo para superficies curvas y se acepta el Método de IDABV.
- Calcular la actividad de Biospeckle en viales de cultivo, sin embargo se debe cuidar el efecto de brillo excesivo producido por la curvatura de los tubos.
- Poner en evidencia la presencia de parásitos ya que se genera una señal de Biospeckle que es superior al medio de cultivo solo.
- Poner en evidencia el efecto de Dipirona sobre el cultivo de parásitos ya que este fármaco ocasiona un perfil de Biospeckle que es similar al medio de cultivo, luego de permitir el efecto del fármaco.

Poner en evidencia el comportamiento de los parásitos en presencia de azida de sodio que tal como se esperaba, produce una ligera inhibición con recuperación de la señal de Biospeckle.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arizaga, R. A., Luci, N., Trivi, M., Romero, G., & Alani, E. (1996). ***Transient phenomena analysis using dynamic speckle patterns***. *Optical engineering*, 35(1), 57-62.
- Ayala, G., Díaz, M. E., & Martínez-Costa, L. (2001). ***Granulometric moments and corneal endothelium status***. *Pattern Recognition*, 34(6), 1219-1227
- Andrades, Francisco. (2011). ***Diseño, Elaboración y Ejecución para el procesamiento de Imágenes de Biospeckle por el Método Matemático de las Diferencias Temporales***. Resultados no publicados.
- Alanis, E., Basombrio, M., Bojarski, R., Cap, N., Matthews, C., Montem, M.,...& Romem, G. (2013, September). ***Detección De Trypanosoma Cruzi En Sangre Mediante Speckle Láser Dinámico***. In *Anales Afa* (Vol. 3, No. 1).
- Abche, S. (2015). ***El antibiograma realizado por la técnica de Biospeckle***. *Tesis de Maestría para obtener el título de Magister Scientae en Química de Medicamentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela*. Tutor Prof. Cristina Grassi, tesis en curso.
- Ansari, M. Z., Grassi, H. C., Cabrera, H., & Andrades, E. D. J. (2016). ***Real time monitoring of drug action on T. cruzi parasites using a biospeckle laser method***. *Laser Physics*, 26(6), 065603.
- Beckmann, P., & Spizzichino, A. (1987). ***The scattering of electromagnetic waves from rough surfaces***. Norwood, MA, Artech House, Inc., 1987, 511 p.
- Braga, R. A., Dupuy, L., Pasqual, M., & Cardoso, R. R. (2009). ***Live biospeckle laser imaging of root tissues***. *European biophysics journal*, 38(5), 679-686.

- Braga Jr, R. A., Rabelo, G. F., Granato, L. R., Santos, E. F., Machado, J. C., Arizaga, R., ... & Trivi, M. (2005). ***Detection of fungi in beans by the laser biospeckle technique. Biosystems engineering***, 91(4), 465-469.
- Belandria, O. (2011). ***Evaluación comparativa del de la quimiotaxis y el antioibiograma con el método “biospeckle” sobre bacterias***. Tesis de Maestría para obtener el título de MagisterScientae en Química de Medicamentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Bonfante-Cabarcas, R., Rodríguez-Bonfante, C., Vielma, B. O., García, D., Saldivia, A. M., Aldana, E., & Curvelo, J. L. C. (2011). ***Seroprevalencia de la infección por Trypanosoma cruzi y factores asociados en un área endémica de Venezuela Seroprevalence for Trypanosoma cruzi infection and associated factors in an endemic area of Venezuela. Cad Saúde Pública***, 27(10), 1917-29.
- Briceño, M. y Ángel, A. (2013). ***Detección de la presencia de bacterias por Biospeckle: Métodos de atenuación del láser***. Tesis de Pregrado para obtener el título de Licenciado en Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Carvalho, P. H., Barreto, J. B., Braga, R. A., & Rabelo, G. F. (2009). ***Motility parameters assessment of bovine frozen semen by biospeckle laser (BSL) system. Biosystems Engineering***, 102(1), 31-35.
- Goodman, J. W. (2007). ***Speckle phenomena in optics: theory and applications. Roberts and Company Publishers***.

Longarzo, A., Grumel, E. E., Cap, N. L., Rabal, H., & Trivi, M. R. (2013). ***La curva de dimensión fractal en función del nivel de intensidad como descriptor de imágenes: aplicaciones en patrones de speckle laser***. In *II Jornadas de Investigación y Transferencia de la Facultad de Ingeniería*.

Martínez-Celorio, R. A., González-Peña, R. J., Cibrián, R. M., Salvador, R., Gil-Benso, R., San Miguel, T., & Sánchez-Muñoz, O. L. (2012). ***Estudio de la Actividad Biológica de Células de Melanoma en un Medio de Cultivo Mediante Técnicas de Biospeckle***.

Nubraska, R., Silva, L., Demetrius, K., & Rodríguez, A. (2004). ***Enfermedad de Chagas en Venezuela: Un bosquejo de su impacto sobre la salud pública***. *A. Cientif. Estud*, 2(4), 148-156.

Oulamara, A., Tribillon, G., & Duvernoy, J. (1989). ***Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle***. *Journal of Modern Optics*, 36(2), 165-179.

Passoni, I., Dai Pra, A., Rabal, H., Trivi, M., & Arizaga, R. (2005). ***Dynamic speckle processing using wavelets based entropy***. *Optics communications*, 246(1), 219-228.

Rabal, J., y Braga, R., (2008). ***Dynamic laser speckle and applications***. New York (USA). 304.

Segura, E. L., Sosa-Estani, S., Esquivel, M. L., Gómez, A., Salomón, O. D., de Desarrollo, G., & Operativa, A. (1999). ***Control de la transmisión de Trypanosoma cruzi en la Argentina 1999.***

Silva, P. C. (1993). *Fundamentos de Fotografías*. Editorial Universitaria.

Sirohi, R. S. (1993). Speckle methods in experimental mechanics. ***OPTICAL ENGINEERING-NEW YORK-MARCEL DEKKER INCORPORATED-***, 38, 99-99.

Suárez, B., Hernández, M., Duque, N., Martinez, C., & Feliciangeli<sup>1</sup>, M. D. (2004). ***Conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en los estados Barinas y Portuguesa, Venezuela.***

Xu, Z., Joenathan, C., & Khorana, B. M. (1995). ***Temporal and spatial properties of the time-varying speckles of botanical specimens.*** *Optical engineering*, 34(5), 1487-1502.

Zeledón, R. (1960). ***Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture.*** IV. Effect of metabolic inhibitors on the respiration. *Rev. Biol. Trop*, 8, 181-195.

Zakharov, P., Völker, A. C., Wyss, M. T., Haiss, F., Calcinaghi, N., Zunzunegui, C. & Weber, B. (2009). ***Dynamic laser speckle imaging of cerebral blood flow.*** *Optics express*, 17(16), 13904-13917.

Zambrano, E. A., de la Cruz, H. S., & Coita, B. E. (2013). ***Una peptidasa ácida, insensible a inhibidores clásicos, en extractos proteicos de Trypanosoma***

*cruzi, proveniente de una zona rural de Venezuela, endémica para la enfermedad de Chagas. Investigación Clínica, 54(3).*

bdigital.ula.ve