



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

**Facultad de Medicina
Licenciatura en Biomedicina
Eje de Fisiología**

**Centro de Investigación en Físicoquímica de Materiales
Laboratorio de Biofotónica**

**“Tratamiento de heridas con terapia fotodinámica
empleando rosa de bengala”**

Tesis que para obtener el título de:

Licenciado en Biomedicina

Presenta:

Gabriela Juárez Salazar

Director de Tesis:

Dr. Juan Pablo Padilla Martínez

Co-director de Tesis:

Dra. Wendy Argelia García Suastegui

Puebla, Pue. Marzo 2019

Agradecimientos

Al **Dr. Juan Pablo Padilla Martínez** y la **Dra. Wendy Argelia García Suastegui** por dirigir este trabajo de tesis, por sus consejos y confianza.

Al *Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP-SEP)*, con número de convenio 511-6/17-8017 por la beca otorgada para la realización de este trabajo de tesis.

A la *Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP)*, por el apoyo otorgado a través del proyecto con número 100526492-2018.

A la **Red Nacional de Biofotónica** por el apoyo otorgado para la adquisición de materiales necesarios para llevar a cabo este proyecto.

A estudiantes e investigadores de la Coordinación de Óptica del *Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE)*, especialmente a la **Dra. Teresita Spezzia Mazzocco**, el **Dr. Julio César Ramírez San Juan** y el **Dr. Rubén Ramos García** por el diseño y fabricación de los dispositivos emisores de luz empleados en este proyecto y la colaboración hecha, formando un equipo multidisciplinario.

Al **Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción** y al **Centro de Investigación en Físicoquímica de Materiales** del **ICUAP**, así como al **Bioterio Claude Bernard** de la BUAP por brindarme sus instalaciones y material para realizar los experimentos.

Finalmente, a mis compañeros de laboratorio por la ayuda prestada en las diferentes actividades que implicaron este trabajo.

Índice

Resumen	1
Planteamiento del problema	2
Hipótesis	2
Objetivo general y particulares	2

Capítulo 1

Introducción	3
1.1 Importancia del tratamiento de heridas	3
1.2 Fases de cicatrización de una herida	5
1.2.1 Fase de hemostasis e inflamación	5
Quimiotaxis y activación.....	6
1.2.2 Fase proliferativa.....	9
1.2.3 Fase de maduración y remodelado	10
Formación de la matriz en la herida	10
1.3 Métodos convencionales en el tratamiento de heridas	12
1.4 La luz en la salud humana	13
1.5 Uso de luz en el tratamiento de heridas	13
1.6 Referencias	15

Capítulo 2

Fundamentos generales de óptica	18
2.1 Luz y espectro electromagnético	18
2.2 Penetración de la luz en la piel	20
2.3 Interacción luz-piel	22
Reflexión	22
Esparcimiento.....	23
Absorción	24
Trasmisión.....	25
2.4 Fototerapia	26
2.5 Referencias	28

Capítulo 3

Fundamentos de la Terapia Fotodinámica (PDT)	31
---	----

3.1 Fotosensibilizadores	31
3.1.1 Características de un fotosensibilizador	32
3.1.2 <i>Rosa de Bengala</i>	34
3.2 Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica	36
Proceso fotofísico.....	36
Proceso fotoquímico.....	37
3.2.1 Señalización celular por cambios en estado redox	38
Oxidantes y radicales libres derivados del oxígeno	38
Efecto nocivo de las especies reactivas de oxígeno	38
Ventaja y uso del ambiente oxidativo	39
3.3 Terapia fotodinámica aplicada en la curación de heridas	40
3.4 Referencias	41

Capítulo 4

Procedimiento experimental	44
4.1 Manejo y uso de animales	44
4.2 Procedimiento quirúrgico	45
4.3 Grupos Experimentales	46
4.3.1 Grupo Control (GC)	46
4.3.2 Grupo Fotosensibilizador (GF).....	47
4.3.3 Grupo Fototerapia (FT).....	48
4.3.4 Grupo Terapia Fotodinámica (PDT)	50
4.4 Técnicas de Análisis	51
4.4.1 Análisis de fotografías convencionales	51
4.4.2 Preparación de tejido para análisis histológico	53
Cortes histológicos	53
Técnica de Tinción H&E (Hematoxilina y Eosina)	53
4.4.3 Método Estadístico.....	54
4.5 Referencias	54

Capítulo 5

5.1 Resultados experimentales (primera etapa)	55
5.1.1 Interacción Rosa de Bengala-Tejido	55
5.1.2 Interacción Luz-Tejido (fototerapia).....	58

5.1.3 Interacción Rosa de Bengala-luz-tejido (Terapia fotodinámica).....	61
5.2 Resultados experimentales (segunda etapa).....	64
5.2.1 Fototerapia (8 J/cm ²)	64
5.2.2 Terapia fotodinámica (RB 5μM, 8 J/cm ²).....	67
5.2.3 Resultados histológicos.....	70
5.3 Referencias.....	78

Capítulo 6

Discusión y conclusión de resultados.....	80
Referencias.....	81
Participaciones en congresos nacionales	82
Premios obtenidos	82

Resumen

El propósito de este proyecto de tesis fue evaluar la eficacia de la *Fototerapia* y la *Terapia Fotodinámica* en el tratamiento de heridas cutáneas empleando luz verde, así como al fotosensibilizador Rosa de Bengala. La selección de las condiciones óptimas de densidad de energía (cantidad de energía óptica suministrada a la herida, en una cierta área por un determinado tiempo) y de concentración del fotosensibilizador, fueron seleccionados a partir de una prueba piloto en 18 ratas alopecicas, en donde se evaluaron 2 diferentes densidades de luz (2 y 8 J/cm²) y dos concentraciones molares del fotosensibilizador (2 y 5 μM). A partir de los resultados obtenidos en el estudio piloto, se seleccionó solo una de las variantes antes mencionadas para un estudio en 15 organismos. En ambos estudios, dos heridas circulares (1 cm de diámetro) fueron provocadas quirúrgicamente en el dorso de cada rata y divididas aleatoriamente en cuatro grupos experimentales: *i*) Grupo Control, *ii*) Grupo Fotosensibilizador, *iii*) Grupo Fototerapia (FT) y *iv*) Grupo Terapia Fotodinámica (PDT). El primer grupo, representa heridas sin ningún tipo de tratamiento; el segundo grupo, representa heridas solo con la aplicación tópica del fotosensibilizador; el tercer grupo, representa heridas irradiadas con luz verde; y el último grupo, representa heridas con aplicación tópica del colorante y posteriormente irradiadas con luz verde. Para los cuatro grupos experimentales, fotografías convencionales fueron adquiridas durante el proceso de cicatrización y analizadas en el software ImageJ, para cuantificar la contracción de la herida y el proceso de re-pitalización, mediante imágenes en 3D. La región donde la herida fue provocada, fue extraída mediante una biopsia en los días 3, 5, 7, y 14, para realizar cortes histológicos. Los resultados obtenidos muestran una disminución de la herida en los grupos de fototerapia y terapia fotodinámica, en comparación con el control en el día 14 de la cicatrización. A partir de los cortes histológicos, en el día 14 se observó una mayor regeneración del tejido en la herida tratada con PDT, en comparación con el control; el tejido regenerado muestra un mayor engrosamiento de la epidermis, la capa más superficial de la piel que puede ser traspasada por luz verde. Los resultados mostrados en este proyecto de tesis, sugieren que la fototerapia y la terapia fotodinámica son tratamientos ópticos innovadores, no invasivos y de no contacto, los cuales pueden ser un método alternativo en el tratamiento de heridas cutáneas a un menor costo.

Planteamiento del problema

El tratamiento de heridas es un problema de salud mundial que afecta a una amplia población de todas las edades. Un manejo inadecuado de la herida, podría extender el tiempo de curación aumentando el riesgo de infección. Esto sin tomar en cuenta pacientes con enfermedades crónicas, en donde los procesos de cicatrización se encuentran disminuidos y una herida pone en riesgo su integridad. Debido a lo anterior, es de suma importancia mejorar y proponer nuevos tratamientos no invasivos, de no contacto y accesibles para la curación de heridas, en donde la fototerapia y la terapia fotodinámica, son tratamientos ópticos que actualmente están bajo estudio en la estimulación de regeneración de tejido en piel. Son aún muy pocos los estudios publicados con este fin, principalmente empleando terapia fotodinámica y luz verde.

Hipótesis

En fototerapia y terapia fotodinámica el uso de luz verde a bajas densidades de energía, mejorará y acelerará el proceso de cicatrización de heridas cutáneas debido a su interacción con cromóforos celulares y fotosensibilizadores exógenos (Rosa de Bengala).

Objetivo general

Estudiar el efecto de la luz verde en combinación con el fotosensibilizador Rosa de Bengala para optimizar y acelerar el proceso de cicatrización de heridas cutáneas.

Objetivos particulares

En un modelo murino, se evaluarán en el proceso de cicatrización los siguientes parámetros:

- Dos concentraciones del fotosensibilizador Rosa de Bengala (2 y 5 μM).
- Dos densidades de energía (2 y 8 J/cm^2) utilizando una longitud de onda de 532nm (luz verde).
- Monitorear el proceso de cicatrización mediante fotografías convencionales en días claves.
- Monitorear el proceso de reepitelización mediante histogramas 3D.
- Evaluar la formación de estructuras de la piel mediante cortes histológicos.

CAPÍTULO 1

Introducción

1.1 Importancia del tratamiento de heridas

Una **herida** es la pérdida de continuidad de la piel o mucosa, producida por algún agente físico o químico, que cursa una serie de signos y síntomas, tales como la separación de bordes de la piel, dolor, inflamación, hemorragia, etc. (Figura 1.1). Ésta puede variar de un simple corte en el epitelio, rompiendo la piel, o ser profunda extendiéndose a tejido subcutáneo (Velnar, 2009). Como consecuencia del daño, existe riesgo de infección y posibilidad de lesionar a órganos y tejidos adyacentes (Lazarus, 1994). Cuando una persona presenta una herida, una serie de fases y eventos bioquímicos complejos son iniciados para regenerar el tejido dañado, llamando a este proceso curación de la herida (Guo & DiPietro, 2010).

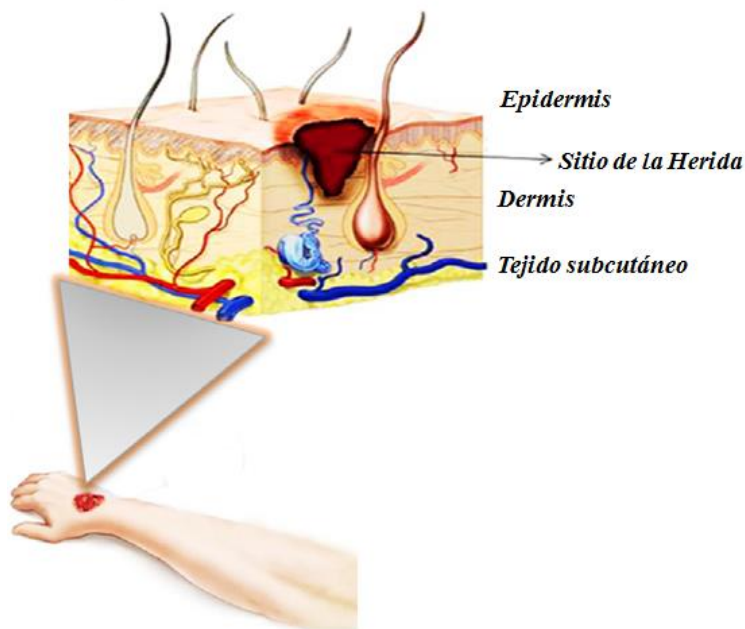


Figura 1.1: Representación esquemática de una herida cutánea. Modificado de (Rui-Hua Dong, 2016)

Las heridas pueden ser de distinto grado dependiendo de su tiempo de curación, por ejemplo, las **heridas agudas** tienen un tiempo de curación que llega a los 30 días. Este tipo de heridas, resultan en una restauración funcional y anatómica siguiendo vías ordenadas y

normalmente se reparan a sí mismas. Las heridas crónicas pueden ser adquiridas por un procedimiento quirúrgico o un accidente traumático (Velnar, 2009). Aquellas heridas que no cursan las etapas normales de curación, y no se reparan de manera ordenada y oportuna son las llamadas *heridas crónicas*. El proceso de curación de este tipo de heridas es incompleto y se ve alterado por varios factores, los cuales prolongan uno o más estados de las fases comprendidas en la cicatrización (las cuales serán descritas en la próxima sección). Estos factores perturbantes incluyen infección, hipoxia, necrosis, exudado y niveles excesivos de citosinas (Lee & James, 1992). Por último, las heridas complicadas son un caso muy especial y son definidas como la combinación de una infección y un defecto en el tejido aunado a enfermedades del paciente que las presenta (Velnar, 2009).

Por otro lado, en México de acuerdo a la secretaria de salud, pacientes con heridas de distinto grado son cada vez más frecuentes en centros de salud, clínicas y hospitales. El tratamiento de heridas en el país tiene un impacto económico estimado en varios billones de pesos de manera directa, esto es sin tomar en cuenta que además estos pacientes sufrirán de diferentes grados de discapacidad mientras las padecen, y que si no son manejadas de forma adecuada las tendrán de manera permanente (Secretaría-de-salud., 2007). Estos hechos ponen en claro la importancia que tiene el tratamiento de las heridas para México: tanta es su importancia clínica y económica que en el año 2004 se reunieron 30 de los más prominentes líderes de opinión en cuidado de heridas del país para evaluar la necesidad de formar una asociación dedicada a la investigación, educación e integración de la cicatrización y cuidado de heridas en el país, culminando con la fundación de la *Asociación Mexicana para el Cuidado Integral y Cicatrización de Heridas A.C.* el 9 de Noviembre de 2006 (Castañeda, 2008).

La necesidad de mejorar y/o proponer nuevos tratamientos en la curación de heridas es un reto a nivel mundial, por ejemplo, en los Estados Unidos de Norte América (USA) las heridas crónicas afectan alrededor de 6.5 millones de pacientes. Se afirma que se gasta más de 25 billones de dólares en el tratamiento de heridas crónicas, y estos costos van creciendo rápidamente debido al aumento de la población de personas de la tercera edad, y al incremento de enfermedades metabólicas y de crónico degenerativas, entre ellas la *diabetes*

(Chandan K. Sen, 2009). Por otro lado, el costo anual de productos para el cuidado y tratamiento de heridas alcanza los 15.3 billones de dólares; de acuerdo a los últimos datos del Centro Nacional de Estadísticas de Salud, 40 millones de procedimientos quirúrgicos para pacientes internados fueron realizados en los Estados Unidos en el año 2000, seguido de cerca por 31.5 millones de cirugías ambulatorias. Cabe señalar que el tratamiento de heridas posquirúrgicas está aumentando rápidamente (Chandan K. Sen, 2009); además, se ha estimado que 120 de cada 100,000 personas son afectadas por heridas crónicas en una edad entre 45 y 65 años e incrementa a 800 por 10,000 en personas mayores de 75 años. (Velnar, 2009).

Es muy probable que la prevalencia y la incidencia de las heridas sigan aumentando. Lo anterior se debe en parte al aumento de la edad media de la población y a los incrementos continuos de la prevalencia de la obesidad, la diabetes y la arteriopatía de las extremidades. Debido a lo anterior, es necesario proponer tratamientos más adecuados para la curación de heridas, que sean económicos y de fácil acceso para la población. Por lo que en la presente tesis se estudia el efecto de la fototerapia y terapia fotodinámica en la cicatrización de heridas en un modelo murino alopecico.

1.2 Fases de cicatrización de una herida

La cicatrización de una herida tradicionalmente ha sido dividida en tres fases distintas: *i*) hemostasis e inflamación, *ii*) proliferación y *iii*) remodelamiento. Normalmente estas fases son fisiológicas y sus extremos pueden ser patológicos (Broughton, Janis, & Attinger, 2006). En cada fase numerosas y orquestadas reacciones e interacciones entre células y mediadores son puestos en acción (Schilling, 1976), las cuales se describen a continuación.

1.2.1 Fase de hemostasis e inflamación

La hemostasis precede a la inflamación, sirve como el paso inicial y establecimiento para el proceso de cicatrización, ya que la primera acción que lleva a cabo el cuerpo inmediatamente después de la herida es controlar el sangrado y sucede justo después de la injuria a través de los días 4 al 6 (Witte & Barbul, 1997). Esto es, la denominada constricción vascular y es dada por la liberación de potentes vasoconstrictores, dispensados por membranas celulares, tales como Tromboxano A-2 y prostaglandina-2. El efecto reflejo

de vasoconstricción temporalmente reduce el sangrado, pero este mecanismo dura solo unos minutos (Campos, Groth, & Branco, 2008). Así los vasos lesionados, el endotelio dañado y las plaquetas aledañas activan la parte intrínseca de la cascada de coagulación, formando así un coágulo (ver Figura 1.2) (Witte & Barbul, 1997). El coágulo y el tejido circundante liberan citosinas proinflamatorias y factores de crecimiento tales como: factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y factor de crecimiento epidermal (EGF), fibronectina y serotonina (DiPietro., 2004).

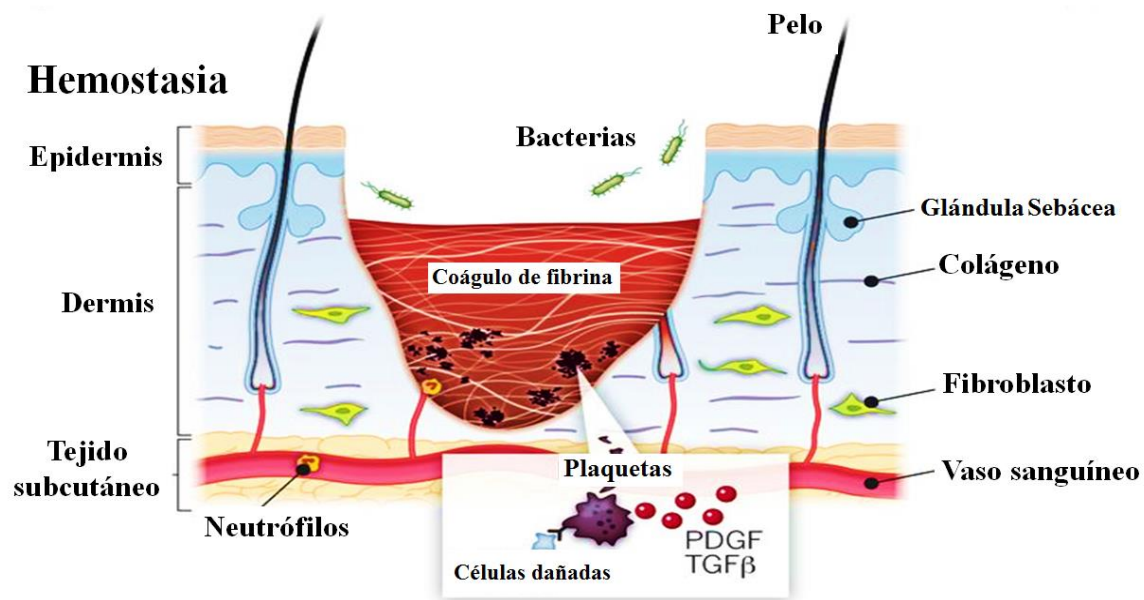


Figura 1.2: Fase de hemostasia. Imagen adquirida de (Sun, Sibrashvili, & Khavari, 2014)

Quimiotaxis y activación

A medida que el coágulo es formado, señales celulares se generan dando como resultado la respuesta de neutrófilos (Pohlman, 1986). Conforme los mediadores inflamatorios se acumulan, las prostaglandinas se elaboran y ocurre vasodilatación de los vasos sanguíneos cercanos, lo cual permite el aumento del tráfico celular a medida que los neutrófilos son atraídos al área lesionada por la interleucina (IL) -1, factor de necrosis tumoral alfa (TNF)- α , factor de crecimiento transformante beta (TGF)- β , factor plaquetario 4 (PF4), y productos bacterianos (Figura 1.3) (Bevilacqua, 1985).

Los monocitos del tejido cercano y la sangre son atraídos al área y son transformados en macrófagos, aproximadamente de 48 a 96 horas después de la lesión. Es de vital importancia la activación de células inflamatorias, especialmente para los macrófagos, de manera que un macrófago activado es importante para la transición a la fase proliferativa, ya que su activación mediará la angiogénesis debido a que sintetiza factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y TNF- α , y también mediará la fibroplasia dado que sintetiza TGF- β , factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), IL-1 y TNF- α , como se muestra en la Figura 1.3. Además se lleva a cabo la activación inducible del óxido nítrico sintasa (por IL-1 y TNF- α) y se sintetiza óxido nítrico (NO) (Barbul, 2002). Los neutrófilos comienzan a ingresar al sitio de la herida y empiezan a despejarla de la invasión de bacterias y desechos celulares; además, los neutrófilos liberan enzimas proteolíticas cáusticas que digieren las bacterias y el tejido no viable. Así mismo los neutrófilos tienen varios tipos de proteasas agrupadas de acuerdo a su diana, proteínas, aminoácidos o el ion metal dentro de la enzima (Hart, 2002). Las serinas proteasas tienen amplia especificidad (por ejemplo, elastasa), mientras que la metaloproteínasa (que contiene un ion de zinc) digiere específicamente el colágeno (Yager & Nwomeh, 1999).

En el sitio de la herida ambos tipos de proteasas destruirán la matriz extracelular preexistente; por fortuna, hay inhibidores de proteasas que crearán una “armadura” que protegerá a la matriz del tejido no dañado, de lo contrario si la respuesta inflamatoria es extremadamente robusta, a partir de una liberación masiva de proteasas, la “armadura antiproteasa” puede ser abrumada y penetrada (Yager & Nwomeh, 1999). Los neutrófilos también pueden generar radicales libres de oxígeno reactivos (a través de la vía mieloperoxidasa) que se combinan con cloro para ayudar a esterilizar la herida de bacterias de modo que los neutrófilos sucumben brevemente a un estímulo para la apoptosis y son reemplazados por macrófagos (que fagocitan a los neutrófilos muertos); los macrófagos no poseen mieloperoxidasa pero por la generación de NO continúan matando patógenos (Broughton, Janis, & Attinger, 2006). La óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) de los macrófagos es estimulada y crea así grandes cantidades de NO. Por otra parte, TNF e IL-1 reaccionan con radicales de oxígeno del ión peróxido para producir peroxinitrito y radicales

hidroxilos aún más tóxicos (Goldman, 2004). En respuesta al TNF- β los macrófagos, fibroblastos, monocitos y queratinocitos, producen metaloproteinasa (MMP) que eliminará la matriz extracelular dañada, ésta MMP limpia los restos inflamatorios y permite la migración de las células individuales de la herida a través de la matriz extracelular (Abraham & et al, 2000).

Hay una serie de reacciones para producir señales de paro, conocidas como “puntos de control de la inflamación” y así termine la fase inflamatoria (Nathan, 2002). La lipoxigenasa además de sintetizar los mediadores inflamatorios eicosanoides prostaglandina, prostaciclina, tromboxano y leucotrienos, también sintetiza lipoxinas (LXA4 y LXB4) (Chiang, 2004). Las plaquetas y los leucocitos a través de una biosíntesis transcelular formarán a las lipoxinas; por otro lado, los neutrófilos solos pueden secretar lipoxinas, en cambio la plaqueta sola no lo puede hacer; pero cuando las plaquetas y los neutrófilos se adhieren entre sí, el leucocito produce leucotrieno A4 (a través de 5-lipoxigenasa), que se transfiere a la plaqueta; la 12-lipoxigenasa de la plaqueta la convierte en lipoxina A4 y B4 (Chiang, 2004).

Inflamación

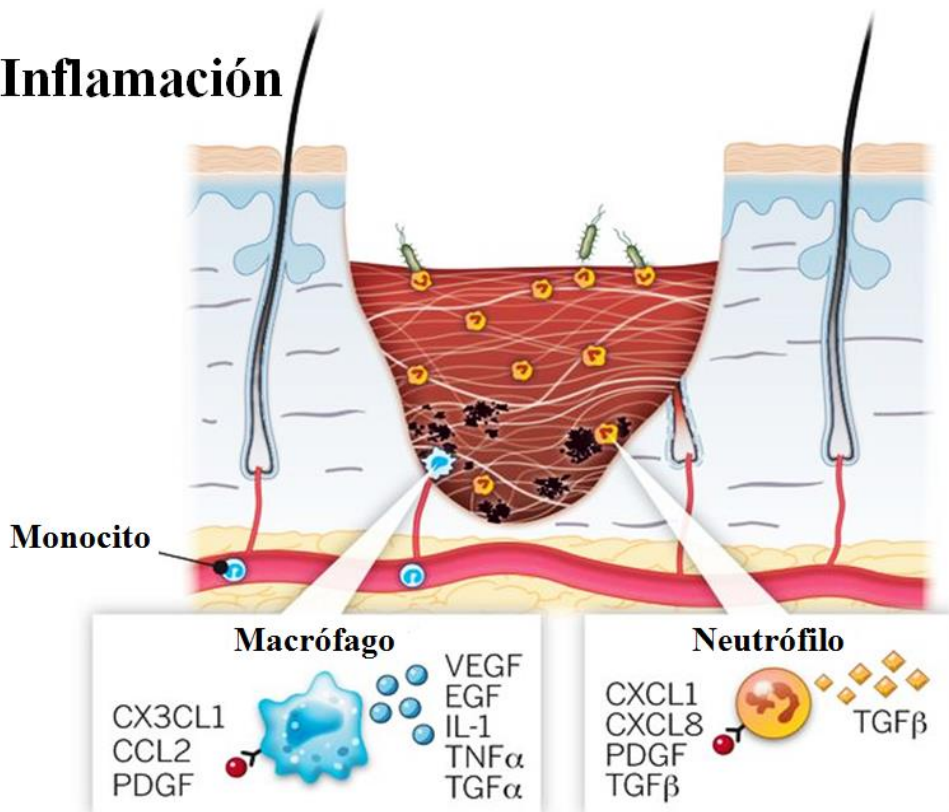


Figura 1.3: Fase inflamatoria. Imagen adquirida de (Sun, Saprashvili, & Khavari, 2014).

Cuando los neutrófilos humanos presentes en la sangre periférica son expuestos a la prostaglandina E2 (PGE2), resultan en un cambio en la biosíntesis de eicosanoides predominantemente LTB4 (una 5-lipoxigenasa- vía iniciada) a LXA4, un producto de 15 lipoxigenasa que "detiene" la infiltración de neutrófilos polimorfonucleares, además la PGE2 inicia la expresión del gen de la 15-lipooxigenasa y el procesamiento del ARN *in vitro* en un marco temporal, que es consistente con el "encendido" de la producción de lipoxina *in vivo* (Chiang, 2004). Exudados de heridas han demostrado que la aparición de leucotrienos y prostaglandinas coincide con la infiltración de neutrófilos en el sitio de inflamación; seguido de biosíntesis de lipoxina, que concurre con la resolución de la inflamación (Yager & Nwomeh, 1999). La inhibición de los productos de prostaglandinas puede alterar la duración de la resolución (Broughton, Janis, & Attinger, 2006).

1.2.2 Fase proliferativa

Las células epiteliales ubicadas en el borde de la piel comienzan a proliferar y enviar proyecciones para restablecer una barrera protectora contra las pérdidas de fluidos y la invasión bacteriana adicional (Menon., 2015). Las plaquetas y los macrófagos activados producen EGF y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), que es el estímulo para la proliferación epitelial y la quimiotaxis (Diegelmann, 1994). La epitelización comienza poco después de hecha la herida y, para que suceda es estimulada por citosinas inflamatorias IL-1 y TNF- α , que regulan positivamente la expresión del gen KGF del fibroblasto, los fibroblastos, a su vez sintetizan y secretan el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF)-1, KGF-2 e IL6, que estimulan a los queratinocitos vecinos para que migren al área de la herida, proliferen y se diferencien en la epidermis (Figura 1.4). al parecer, en humanos KGF-2 es más importante en la dirección de este proceso (Smola, Thiekotter, & Fusenig, 1993) (Yu-Ping Xia, 1999) (Rampy, 1999).

Los fibroblastos y las células endoteliales son las células predominantes que proliferan durante esta fase; las células endoteliales localizadas en vénulas intactas son atraídas por el VEGF, que es mayoritariamente secretado por los queratinocitos en el borde de la herida,

aunque también por macrófagos, fibroblastos y plaquetas; para comenzar a formar más tubos capilares (Broughton, Janis, & Attinger, 2006).

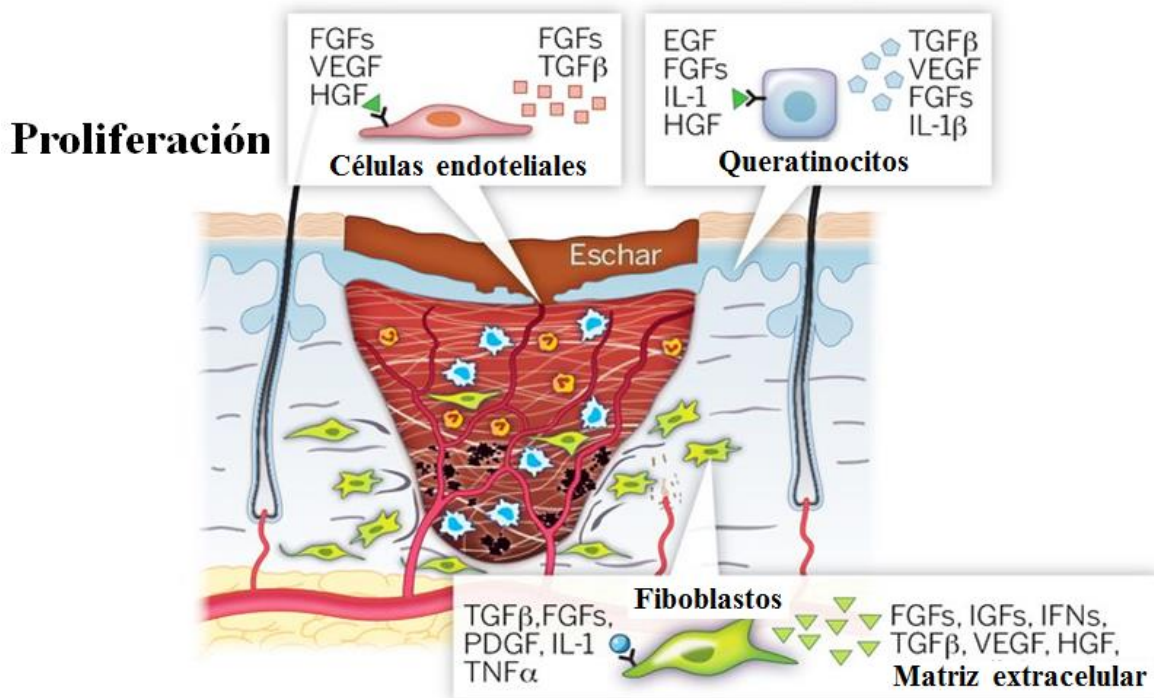


Figura 1.4: Fase Proliferativa. Imagen adquirida de (Sun, Sibrashvili, & Khavari, 2014).

1.2.3 Fase de maduración y remodelado

Clínicamente la fase de maduración y remodelado es la de las más importantes y va del día 8 hasta 1 año. El resultado de esta fase en un individuo sano será la formación rápida de una cicatriz mínimamente visible; sin embargo, ya sea por enfermedad o dieta se puede prolongar esta fase, provocando cicatrices hipertróficas o queloides o hasta heridas crónicas que no cicatrizan (Bridget & Harrison, 2014). La principal característica para la maduración de la herida es la colocación de colágeno en una red muy bien organizada, la cual esta relacionada con las propiedades biomecánicas del nuevo tejido regenerado (Broughton, Janis, & Attinger, 2006).

Formación de la matriz en la herida

La formación de la nueva matriz en la herida se dice que sigue un cierto patrón en el tiempo. Como se mencionó anteriormente, la matriz provisional está compuesta principalmente de fibrina y fibronectina, que se derivaron de la fase de la hemostasia y

proceden de los macrófagos, al unísono los fibroblastos sintetizan proteoglicanos y glicosaminoglicanos que se encuentran de manera desorganizada y junto con otras proteínas como la SPARC (proteína secretada ácida rica en cisteína) y la trombospondina harán posible el reclutamiento celular y serán un marco preliminar para la deposición y remodelación de la matriz futura (Witte & Barbul, 1997). Esta matriz será reemplazada por una organizada y muy fuerte cicatriz hecha principalmente de colágeno (Figura 1.5).

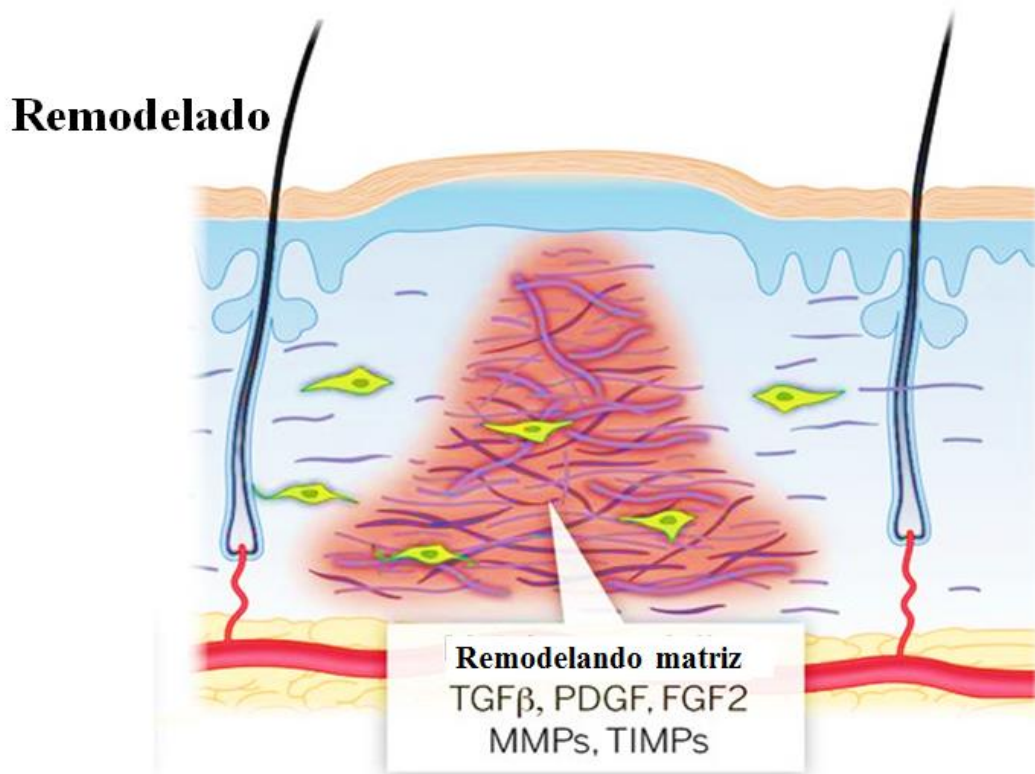


Figura 1.5: Fase de Remodelado. Imagen adquirida de (Sun, Siprashvili, & Khavari, 2014).

El colágeno tipo I, es el componente principal de la dermis sin herida, aproximadamente de un 80% al 90% y de un 10 al 20 por ciento es colágeno tipo III. Por el contrario, en el tejido granular el colágeno tipo III comprende un 30% y a medida que la cicatriz madura de nuevo baja al 10 por ciento y aumenta la concentración de colágeno tipo I y así, va incrementando la resistencia (Krummel, 1996). También se ha demostrado la presencia temporal de colágeno tipo VI y la aparición del colágeno tipo III, el cual coincide con la presencia de fibronectina proponiéndose que el recubrimiento de colágeno desnaturalizado con fibronectina facilita su fagocitosis (Frederick Grinnell, 1980).

1.3 Métodos convencionales en el tratamiento de heridas

El uso de antisépticos es basto ya que fungen como inhibidores de microorganismos, pero se ha reportado que también son reductores en la cicatrización de heridas, por ejemplo, yodopovidona se ha estudiado en animales y demostrado un retraso considerable en la curación de heridas y reducción variable en carga bacteriana. También se ha sugerido que el peróxido de hidrógeno retarda potencialmente la migración y la proliferación de fibroblastos (Kramer, 1999). Otro proceso llevado a cabo de manera sistemática es el tratamiento con antibióticos, sin embargo, se ha demostrado que las bacterias presentan resistencia a antibióticos; además de que deprimen el sistema inmune (Fehervari, 2018).



Figura 1.6: Manejo convencional de una herida.

Hay heridas en las que es necesario el uso de suturas, pero no necesariamente cicatrizan; además de considerar muchos aspectos para el uso adecuado y buen manejo de una sutura (Coldiron, 1989). Si bien existen vehículos de terapéutica dermatológica que incluyen pomadas, pastas, ungüentos y fomentos (Figura 1.6). Por otro lado, están las benditas, gasas y apósitos, de estos últimos no hay evidencia científica suficiente sobre la efectividad en la aceleración del proceso de cicatrización (Bridget & Harrison, 2014). Sin embargo, todos

estos métodos convencionales son de contacto, en algunos casos poco eficientes y propensos a infección; además de generar desechos infecciosos, que requieren de un correcto manejo.

1.4 La luz en la salud humana

En la antigüedad, en Grecia y Roma Apolo fue conocido como el dios del sol y adicionalmente dios de la medicina y curación, quien además de sanar podía provocar también las enfermedades. Actualmente, se ha demostrado que la exposición a la radiación electromagnética (luz) tiene tanto efectos positivos como negativos para la salud humana, dependiendo de la energía de la onda electromagnética, la longitud de onda y el tiempo de exposición.

El beneficio más conocido de la luz solar es su capacidad para aumentar el suministro de vitamina D del cuerpo. La mayoría de los casos de deficiencia de vitamina D (raquitismo, osteomalacia) se deben a la falta de exposición al sol, ya que dicha vitamina se puede sintetizar en la piel por la radiación UVB (Osborne, 2002). A su vez, como criaturas diurnas, el ciclo de luz oscuridad está involucrado en la producción de melatonina que es un elemento clave para muchos de los ritmos circadianos, que también se pueden ver alterados (insomnio, síndrome premenstrual y el trastorno afectivo estacional) (Mead, 2008). Por otro lado, el sistema pigmentario cutáneo es un elemento importante de la piel con respuesta al estrés, debido a que los melanocitos expresan un sistema de receptor de endorfina activado por la luz solar (Kausser, 2003). En cuanto a los efectos perjudiciales, atribuidos en gran parte a la exposición excesiva a los rayos UV, se encuentran las tres principales formas de cáncer de piel (melanoma, carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas). Además del fotoenvejecimiento (Mead, 2008), pero es ocasionado al exponerse a la luz del sol por un tiempo prolongado.

1.5 Uso de luz en el tratamiento de heridas

En 1960 Maiman publicó el primer reporte de la radiación láser (del acrónimo inglés LASER, Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation; amplificación de luz por emisión estimulada de radiación) (Maiman, 1960). Desde entonces, los láseres se han

involucrado en diversos campos de la ciencia y la tecnología; sin mencionar que, en los últimos años, los láseres están revolucionando el campo de la investigación en disciplinas como la biología y la medicina. Durante los sesentas y setentas, los láseres se utilizaban para cortar y destruir tejido, por sus propiedades fototérmicas y ablativas, esto se conoce como cirugía láser (Choy, 1988). Posteriormente, en 1982 Mester y colaboradores dan a conocer la terapia láser, la cual es una técnica óptica que irradia tejido biológico (por ejemplo, heridas) con luz de baja densidad de energía o potencia, conocida como *LLLT* (Low-Level Laser Therapy) o también denominada *fitoterapia* o *fitobiomodulación* (Toth, 1982). Desde entonces, el láser ha incursionado en el tratamiento de heridas cutáneas y actualmente se ha reportado el uso de dispositivos LED (por sus siglas en inglés light-emitting diode, diodo emisor de luz) para el mismo propósito.

La terapia fotodinámica PDT (por sus siglas en inglés, Photodynamic Therapy) es un tratamiento óptico innovador que conduce a la destrucción selectiva de células, a través de procesos biológicos activados por luz (Agostinis & et-al, 2011). La PDT requiere de un fotosensibilizador, que por lo general es un colorante inocuo en ausencia de luz, dicho fotosensibilizador puede ser absorbido por las células; a su vez para la PDT también se requiere de una fuente emisora de luz a una longitud de onda adecuada, para activar al colorante y finalmente, la presencia de oxígeno en la célula (Fila, Kasimova, Arenas, & Nakonieczna, 2016). El colorante absorbe la energía de la luz, de tal manera que los electrones excitados pueden interactuar con el oxígeno presente en la célula y producir especies reactivas de oxígeno, las especies reactivas de oxígeno a bajas concentraciones están implicadas en la señalización celular, sobre todo en procesos claves como la proliferación y la diferenciación (Agostinis & et-al, 2011). Por tanto, utilizando luz a una densidad de energía correcta, podría obtenerse un proceso eficiente de estimulación de regeneración de tejido en piel (Nesi-Reis & et al, 2018). Son aún muy pocos los estudios publicados con este fin (Philip V. Peplow, 2012), pero los resultados son alentadores.

1.6 Referencias

- Abraham, & et al, X. S. (2000). Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *The Journal of Biology Chemistry*, 15220–15225.
- Agostinis, & et-al, B. C.-a. (2011). Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA Cancer J Clin*, 250–281.
- Alan D. Irvine, W. I. (2011). Filaggrin Mutations Associated with Skin and Allergic Diseases. *The New England Journal of Medicine*, 1315-1327.
- Barbul, M. B. (2002). Role of nitric oxide in wound repair. *The American Journal of Surgery*, 406–412.
- Bevilacqua, J. S. (1985). Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *The Journal of Clinical Investiation*, 2003-2011.
- Bridget, & Harrison. (2014). Wound Healing: Part I. Basic Science. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 9-17.
- Broughton, Janis, & Attinger. (2006). The Basic Science of Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 12-34.
- Castañeda, O. C. (2008). "Clínica de Ostomias y Herdas del Hospital Regional General Ignacio Zaragoza. I.S.S.S.T.E. México". *VII Simposio Nacional sobre Ulceras por Presión y Heridas Crónicas* (págs. 15-17). España: GNEAUPP.
- Chandan K. Sen, G. M. (2009). Human Skin Wounds: A Major and Snowballing Threat to Public Health and the Economy. *Wound Repair Regeneration*, 763–771.
- Chiang, C. N. (2004). Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entrée for resoleomics. *Rheumatic Disease Clinics*, 69-95.
- Choy, D. S. (1988). History of Lasers in Medicine. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon* , 114-117.
- Coldiron. (1989). Closure of Wounds Under Tension. *Archives of Dermatology*, 1189-1190.
- Diegelmann, W. T. (1994). Growth factors in wound healing. *Clinics in Dermatology*, 157-169.
- DiPietro., A. G. (2004). Aging and Wound Healing. *World Journal of Surgery*, 321–326.
- Elias, M. G. (2012). The Epidermal Barrier and Strategies for Surmounting It: An Overview. En U. R. Volc-Platzer, *The skin and gene therapy* (págs. 3-26). Berlin: Springer.
- Fehervari. (2018). Antibiotics–immune system interactions. *Nature Immunology*, 99.
- Fila, Kasimova, Arenas, & Nakonieczna, G. B. (2016). Murine Model Imitating Chronic Wound Infections for Evaluation of Antimicrobial Photodynamic Therapy Efficacy. *Frontiers in Microbiology*, 1-11.
- Frederick Grinnell, M. F. (1980). Fibroblast adhesion to fibrinogen and fibrin substrata: Requirement for cold-insoluble globulin (plasma fibronectin). *Cell*, 517-525.
- Freeman, A. B. (2013). Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials*, 817-840.

- G Cotta-Pereira, F. G.-S. (1976). Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 143-148.
- George Broughton, J. E. (2006). The Basic Science of Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 12-34.
- Goldman, R. (2004). Growth Factors and Chronic Wound Healing: Past, Present, and Future. *Advances in Skin & Wound Care*, 24-35.
- Guo, & DiPietro. (2010). Factors affecting wound healing. *J. Dent. Res.*, 219-229.
- Harrison, & Bridget. (2014). Wound Healing: Part II. Clinical Applications. *American Society of Plastic and Reconstructive Surgery*, 383-392.
- Hart. (2002). Inflammation. 1: Its role in the healing of acute wounds. *Journal of Wound Care*, 205-209.
- Investigators, F., & al, e. (2011). Fluid lavage of open wounds (FLOW): a multicenter, blinded, factorial pilot trial comparing alternative irrigating solutions and pressures in patients with open fractures. *The Journal of Trauma*, 596 – 606.
- J.D.Everall, J. T. (1973). The thickness of the epidermis. *British Journal of Dermatology*, 467-476.
- Kadarko, K. K.-M. (2005). alpha-Melanocortin and endothelin-1 activate antiapoptotic pathways and reduce DNA damage in human melanocytes. *Cancer Research*, 4292-4299.
- Kauser, S. A. (2003). Regulation of Human Epidermal Melanocyte Biology By β -Endorphin. *The Society for Investigative Dermatology*, 1073-1080.
- Kivirikko, J. M. (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *TRENDS in Genetics* , 33-43.
- Kramer. (1999). Effect of povidone-iodine on wound healing: A review. *Journal of Vascular Nursing* , 17-23.
- Krummel, H. P. (1996). Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. *Wound Repair and Regeneration*, 203-210.
- Lazarus, C. a. (1994). Definitions and Guidelines for Assessment of Wounds and Evaluation of Healing. *Archives of Dermatology*, 489-493.
- Lee, S., & James. (1992). Modern Wound Dressings: A Systematic Approach to Wound Healing. *Journal of Biomaterials Applications*, 142-213.
- Maiman, T. H. (1960). Stimulated optical radiation in ruby masers. *Nature*, 493–494.
- Man-Cong Zhang, L. H. (1999). Cutis Laxa Arising from Frameshift Mutations in Exon 30 of the Elastin Gene (ELN). *The Journal of Biological Chemistry* , 981-986.
- Mead. (2008). "Benefits of sunlight: a bright spot for human health". *Environmental Health Perspectives*, 161- 167.
- Menon., G. K. (2015). Skin Basics: Structure and Function . *Springer* , 9-18.
- Miranda A. Farage, K. W. (2008). Structural Characteristics of the Aging Skin: A Review. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 343-357.
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 846–852.

- Nesi-Reis, & et al, d. s.-N.-L. (2018). Contribution of Photodynamic Therapy in Wound Healing : A Systematic Review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 294-305.
- Nwomeh, D. R. (1999). The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair Regeneration*, 433-41.
- Osborne, H. (2002). Vitamin D and systemic cancer: is this relevant to malignant melanoma? *British Journal of Dermatology*, 197–213.
- Philip V. Peplow, T.-Y. C. (2012). Photodynamic Modulation of Wound Healing: A Review of Human and Animal Studies. *Photomedicine and Laser Surgery*, 118-148.
- Pohlman, T. A. (1986). *An endothelial cell surface factor(s) induced in vitro by lipopolysaccharide, interleukin 1, and tumor necrosis factor-alpha increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism*. United States of America: The American Association of Immunologists, Inc.
- Rampy, P. A. (1999). Keratinocyte Growth Factor-2 Accelerates Wound Healing in Incisional Wounds. *Journal of Surgical Research*, 238–242.
- Rui-Hua Dong, Y.-X. J.-C.-Z. (2016). In situ deposition of a personalized nanofibrous dressing via a handy electrospinning device for skin wound care. *Nanoscale*, 3482-3488.
- Schilling, J. A. (1976). Wound Healing. *Surgical Clinics of North America*, 859-874.
- Secretaría-de-salud. (2007). *Programa Nacional de Salud 2007-2012*. México: Secretaría de Salud.
- Smola, Thiekotter, & Fusenig. (1993). Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction. *The Journal of Cell Biology*, 417-429.
- Sun, Siprashvili, & Khavari. (2014). Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science*, 941-945.
- Toth, E. M. (1982). The Biostimulating Effect of Laser Beam. *Optoelectronics in Medicine*, 146-152.
- Uitto, J. (2008). The role of Elastin and Collagen in Cutaneous Aging: Intrinsic Aging Versus Photoexposure. *Journal of drugs in dermatology*, 6-12.
- Vanessa Nesi-Reis, D. S.-N.-L. (2017). Contribution of Photodynamic Therapy in Wound Healing : A Systematic Review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 294-305.
- Velnar, T. B. (2009). The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *The Journal of International Medical Research*, 1528-1542.
- Wainwright, M. (2014). In defence of "dye therapy". *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26-29.
- Wertz, P. W. (2000). Lipids and barrier function of the skin. *Acta dermato-venereologica*, 7-11.
- Witte, & Barbul. (1997). General Principles of Wound Healing . *Surgical Clinics of North America* , 509-528.
- Yager, & Nwomeh. (1999). The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 433-441.
- Yu-Ping Xia, Y. Z. (1999). Effects of keratinocyte growth factor-2 (KGF-2) on wound healing in an ischemiaimpaired rabbit ear model and on scar formation. *Journal of Pathology* , 431–438.

CAPÍTULO 2

Fundamentos generales de óptica

2.1 Luz y espectro electromagnético

Una onda electromagnética está constituida por un campo eléctrico y un campo magnético cuyas direcciones son perpendiculares entre sí y, además, perpendiculares a la dirección de propagación de la onda como se muestra en la Figura 2.1. Se ha determinado experimentalmente que la velocidad de propagación de una onda electromagnética en el vacío es $c \sim 3 \times 10^8$. El hecho de que esta velocidad sea prácticamente igual a la velocidad de la luz ha llevado a la hipótesis de que la luz es una onda electromagnética (Alonso, 1999) (Duree, 2011)

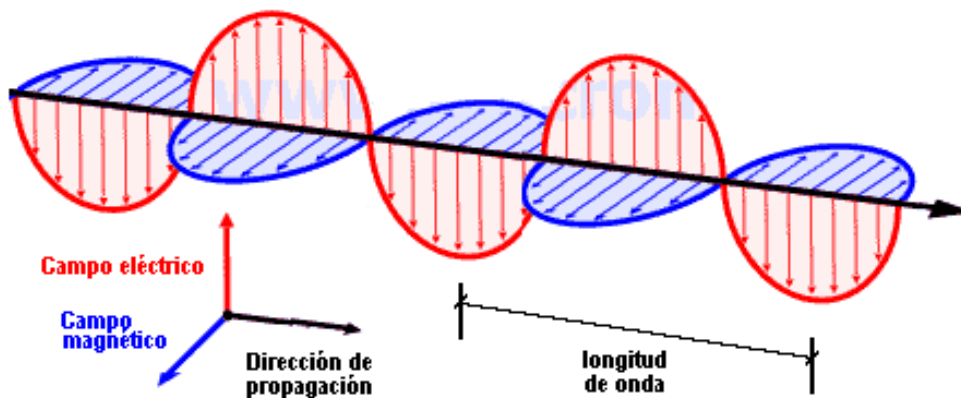


Figura 2.1: Representación esquemática del campo eléctrico y magnético en propagación. (Modificado de unicrom).

Como se puede observar en la Figura 2.1, la distancia existente entre dos crestas o valles consecutivos es lo que llamamos longitud de onda (λ). La frecuencia (ν) es una medida que nos dice con qué regularidad ocurre un evento periódico en función del tiempo, por

ejemplo, un ciclo completo de oscilación de una onda eléctrica o magnética en un segundo se denomina *Hertz* o *hercio*. Por tanto, si λ es la longitud de onda y ν la frecuencia de una onda electromagnética, ambas magnitudes están relacionadas con la velocidad de propagación (c) mediante la siguiente expresión:

$$\lambda \nu = c$$

Ahora bien, los efectos que la radiación ocasiona en las células o tejidos dependen de algunas propiedades de la luz, principalmente su energía. La energía del fotón está dada por la fórmula $E_{\text{fotón}} = h \nu$, la cual esta en términos de su frecuencia o en términos de su longitud de onda como:

$$E_{\text{fotón}} = h \frac{c}{\lambda},$$

donde $h=6.63 \times 10^{-34}$ Joules/seg es la constante de Planck, $c=3 \times 10^8$ m/s es la velocidad de la luz en el vacío y λ es la longitud de onda de la luz medida en nanómetros (1nm= 10^{-9} metros). Por tanto, *la energía del fotón aumenta cuando la longitud de onda disminuye*, es decir, cuanto más corta sea la longitud de onda, mayor será la energía (Hecht, 2000).

Los tipos de radiación electromagnética de acuerdo a su longitud de onda o energía incluyen ondas de radio, microondas, infrarrojo, visible, rayos ultravioleta (UV), rayos X y rayos gamma, denominando a todo este conjunto como *espectro electromagnético* (Figura 2.2). Los rayos gamma, tienen las longitudes de onda mas cortas y las frecuencias mas altas conocidas y, por tanto, son radiaciones de muy alta energía. Los rayos X son empleados en radiografías, debido a que son fotones de alta energía que pueden traspasar el tejido con facilidad, sin embargo, una radiación prolongada puede ser mortal. La radiación ultravioleta de ciertas longitudes de onda daña el ADN. De todo el espectro sólo un 0.013% es observable por el ojo humano (espectro visible), que está entre los 400 y 700 nm, que gracias a nuestro cerebro interpretamos como colores (Hernández, 2008), por ejemplo, la longitud de onda de la luz violeta es de 400 nm, la luz verde es 532 nm, mientras que la de la luz roja es de 633 nm.

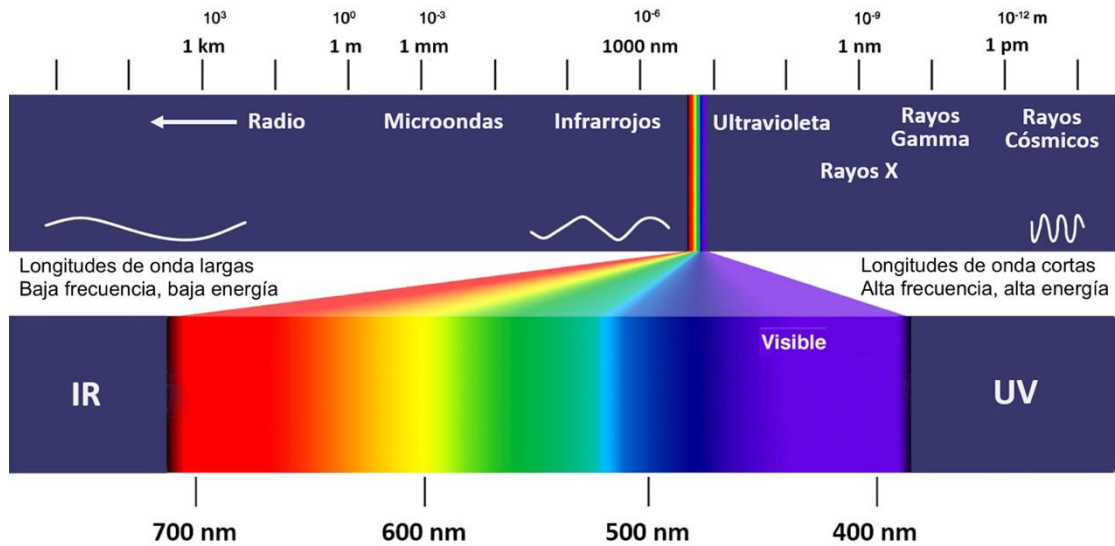


Figura 2.2: Espectro electromagnético.

2.2 Penetración de la luz en la piel

La piel humana es la interfaz entre el hombre y su entorno. Un factor ambiental en el entorno con el que la piel interactúa diariamente es la radiación electromagnética, la cual puede ser absorbida o reflejada por la piel según la longitud de onda del rayo incidente. Cuando los fotones logran penetrar el tejido (aquellos que no fueron reflejados en la capa superficial), interactúan con los electrones en las capas exteriores de las moléculas que conforman a las células, de esta interacción dos resultados pueden tener lugar, el fotón puede ser absorbido o esparcido dentro del tejido. Comenzaremos hablando de la radiación ultravioleta (UV), la cual tiene una profundidad de penetración hasta la epidermis, la capa más superficial de la piel (Figura 2.3). Hay tres tipos principales de rayos UV (Orazio & Jarrett, 2013) .

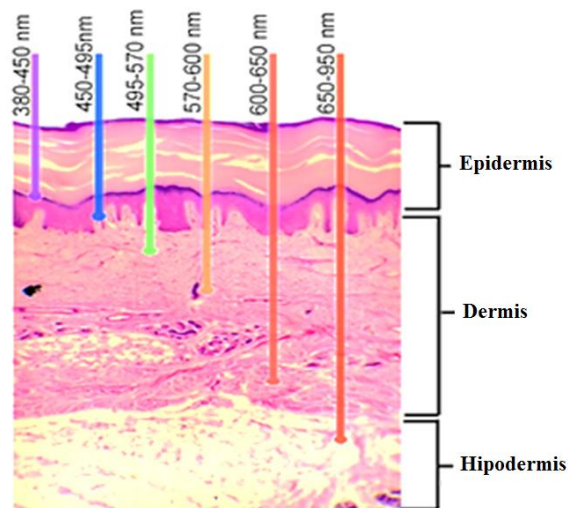
- Los **rayos UVA** envejecen a las células de la piel y pueden dañar el ADN de estas células. Estos rayos están asociados al daño de la piel a largo plazo tal como las arrugas, pero también se considera que desempeñan un papel en algunos tipos de cáncer.
- Los **rayos UVB** tienen un poco más de energía que los rayos UVA. Estos rayos pueden dañar directamente al ADN de las células de la piel, y son los rayos

principales que causan quemaduras de sol. Asimismo, se cree que causan la mayoría de los cánceres de piel.

- Los **rayos UVC** tienen más energía que otros tipos de rayos UV, pero no penetran nuestra atmósfera y no están en la luz solar. No son normalmente una causa de cáncer de piel.

La epidermis juega un papel importante, ya que actúa como un filtro y se adapta a la exposición excesiva de la UV teniendo mayor grosor o mayor pigmentación e induce la producción de previtamina D3. (Caerwyn Ash, 2017).

Pasando en la región visible del espectro electromagnético (Figura 2.2), la luz roja (600-650 nm) penetra más profundamente que la luz azul (450-495nm) y la luz verde (495-570 nm), debido a que en la piel existen cromóforos que tienen diferentes coeficientes de dispersión y absorción que son dependientes de la longitud de onda (véase figura 2.3). De las propiedades intrínsecas del cromóforo dependerá la dispersión de luz en un tejido y la eventual reducción de densidad de energía conforme aumente la profundidad de penetración (Young, 1997). Como se observa en la figura 2.3, la luz infrarroja (650-950 nm) tiene mayor profundidad de penetración en el tejido que longitudes de onda más cortas (Zhao, 1998), por lo cual, son las longitudes de onda más empleadas en terapia



fotodinámica para activar a fotosensibilizadores con coeficientes de absorción dentro de este espectro (Nani Leite, 2014).

Figura 2.3: Corte histológico de la piel, teñido con H&E donde se muestra la profundidad de penetración del espectro visible e infrarrojo cercano. Modificado de Healthy Line Mats. La selección de la longitud de onda en un dispositivo emisor de luz es de suma importancia, ya que se debe asegurar la absorción de los fotones incidentes por los cromóforos diana y considerar a que profundidad dichos cromóforos se encuentran en el interior del tejido. Por tanto, la longitud de onda es probablemente la consideración más importante que hay que tomar en cuenta en la fototerapia, ya que la absorción de la energía de los fotones por los posibles cromóforos presentes en el tejido, producirán los efectos biológicos deseados o no deseados (Caerwyn Ash, 2017).

2.3 Interacción luz-piel

Cuando la luz incide sobre la piel, pueden ocurrir las siguientes interacciones luz-tejido: *i*) reflexión, *ii*) esparcimiento, y *iii*) absorción de radiación y *iv*) transmisión. A continuación, se describe cada una de estas interacciones.

Reflexión

Cuando la luz incide sobre la superficie de un tejido (en este caso piel) y es reflejado a distintos ángulos. Esta *reflexión* es debido a las diferencias en los índices de refracción entre el aire ($n_{\text{aire}}=1$) y el estrato córneo (la parte más superficial de la epidermis); el cual puede variar dependiendo de la longitud de onda. El índice de refracción ($n=c/v$), es una característica óptica de los materiales, el cual se define como la razón de la velocidad de la luz en el vacío (c) y la velocidad de luz en el medio (v).

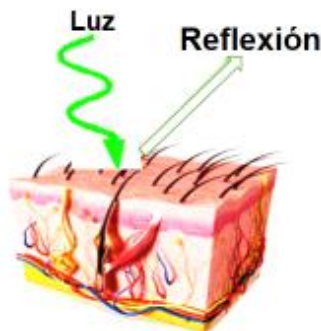


Figura 2.4: Representación esquemática de la incidencia y reflexión de un haz de luz verde sobre la superficie de la piel.

Cuando la luz incide casi perpendicularmente sobre la piel (ángulos menores a 40°), aproximadamente el 5% de la luz se refleja y el 95% restante entra en la epidermis (Ver figura 2.4). Cuando el ángulo de incidencia aumenta, la cantidad de luz reflejada aumenta también. La luz reflejada no interactúa con el interior de la piel y, por tanto, no es modificada por los cromóforos presentes en el tejido. La presencia de sebo en la piel suaviza la rugosidad de la superficie y, debido al hecho de que posee un índice de refracción mayor ($n_{\text{sebo}}=1.5$) aumenta la cantidad de luz reflejada en la interfaz aire-sebo, dando la apariencia de una piel brillante (es lo que vemos cuando nos colocamos crema) (Gajinov & Matic, 2010).

Esparcimiento

Regularmente del 4 al 7% de la luz es reflejada por la piel, el 93-96% restante de la radiación puede ser *esparcido*, *absorbido* o *transmitido* en el tejido. El esparcimiento se puede definir como la desviación del haz de luz de una trayectoria recta, es decir, la luz viaja a través del tejido en múltiples caminos con ángulos distintos, ver figura 2.5. El esparcimiento puede ser causado por uniformidades microscópicas en el tejido y a la diferencia del índice de refracción de los orgánulos subcelulares y el citoplasma que los envuelve (Cheong & Welch, 1990).

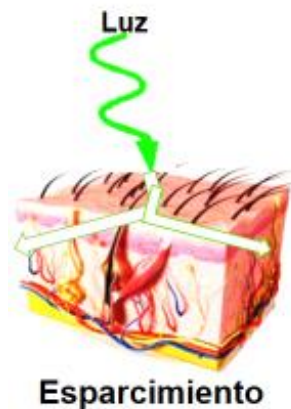


Figura 2.5: Esquema del esparcimiento de la luz a través de la piel.

Absorción

De la luz esparcida los fotones que se propagan aleatoriamente dentro del tejido tenderán a ser absorbidos selectivamente por las estructuras pigmentadas *cromóforos o fluoróforos* (ver figura 2.6). La absorción por las estructuras pigmentadas o el tejido circundante se caracteriza por sus respectivos coeficientes de absorción ($\alpha[\text{cm}^{-1}]$), los cuales dependen fuertemente de la longitud de onda (λ) (Young, 1997). Para longitudes de onda que varían de 300 a 1200 nm, la melanina es el absorbente dominante, sin embargo, también la hemoglobina, oxihemoglobina, desoxihemoglobina, colágeno, agua absorben gran cantidad



de luz (Figura 2.7). En esta figura, se puede observar una ventana óptica en la que se sitúan los coeficientes de absorción de los diferentes componentes biológicos de la piel.

Figura 2.6: Esquema que representa la absorción de la luz en la piel.

Tras la absorción de la luz, se pueden llevar a cabo dos procesos: *i*) los cromóforos después de su excitación pueden volver a su estado inicial emitiendo luz, fenómeno conocido como *fluorescencia intrínseca o endógena del tejido* (Padilla-Martinez, William Lewis, & Franco, 2018) (Lewis, Padilla-Martinez, Ortega-Martinez, & Franco, 2016) (Padilla-Martinez, Wang, & Franco, 2016) (Padilla-Martinez, Ortega-Martinez, & Franco, 2016) (Wang, Ortega-Martinez, & Padilla-Martinez, 2017) y *ii*) la energía de los fotones absorbidos puede convertirse en otro tipo de energía, dando lugar a fenómenos fotoquímicos o fototérmicos (Avci, Gupta, & Sadasivam, 2013). En los fotoquímicos, se desencadenan diversas reacciones químicas entre las que podemos citar la fotoadición, fotofragmentación, fotooxidación, etc. En el caso de efectos fototérmicos, se produce un calentamiento en la zona irradiada y sus alrededores y puede dar lugar a una hipertermia,

desnaturalización de proteínas, fotocoagulación, vaporización o carbonización. Las aplicaciones terapéuticas que utilizan luz y en donde el aumento local de temperatura es despreciable se engloban dentro de lo que se conoce como terapia laser de baja potencia (LLLT) o de bajo nivel o fototerapia (Chung, Dai, & Sharma, 2012), la cual será descrita en la próxima sección.

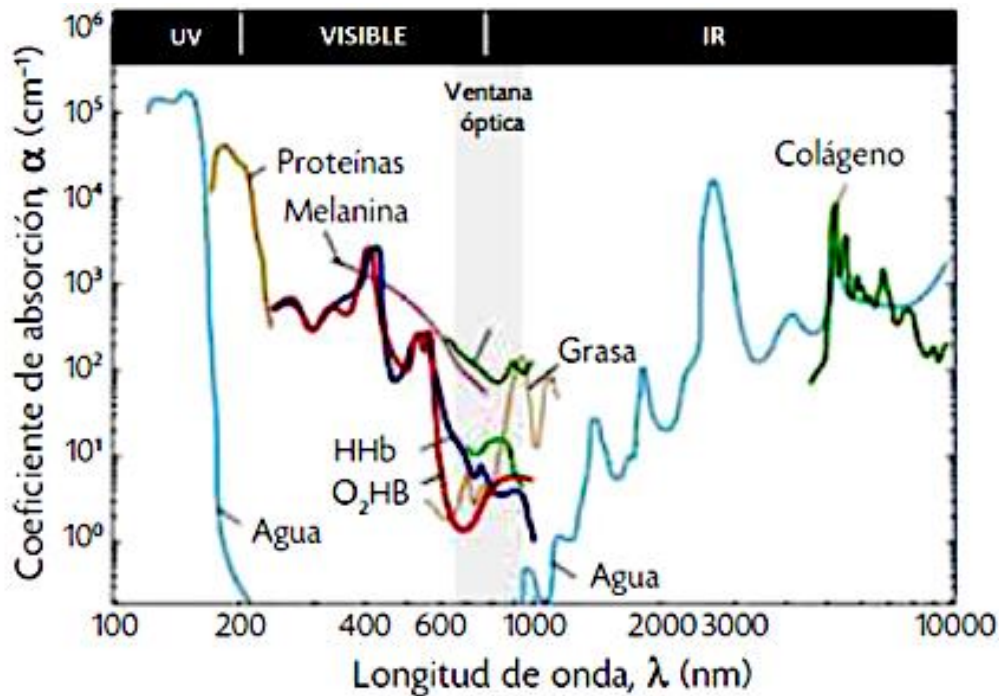


Figura 2.7: Coeficiente de absorción de melanina, oxihemoglobina y agua a diferentes longitudes de onda y la ventana óptica. Tomado de (Ramos & Juan, 2016).

Trasmisión

La luz que no es absorbida (por alguna estructura pigmentada), se transmite a través de la piel (véase figura 2.8). Se ha demostrado que la transmisión varía según el tipo de piel; además, como se mencionó en la figura 2.4, generalmente hay un aumento gradual de la penetración de la luz en la piel a longitudes de onda más largas, por ejemplo, se ha observado que en la dermis blanca se transmite casi el 50% de la luz a una longitud de onda de 400 nm y, hasta el 90% a una longitud de onda de 1, 200 nm; mientras que la epidermis negra transmite menos del 40% a 400 nm, aproximadamente (Everett, 1966).



Figura 2.8: Transmisión de la luz a través de la piel.

2.4 Fototerapia

La fototerapia involucra la exposición de tejidos o células a bajas densidades de potencia de luz, en comparación con densidades utilizadas para producir ablación o corte de tejido (Fodor, 2011). Recientemente, se ha encontrado que el tratamiento médico con la fototerapia a diferentes densidades de potencia estimula o inhibe una variedad de procesos celulares (Barolet, 2008) y es que, la luz en dosis bajas tiene efectos benéficos importantes, ya que puede inducir reacciones fisiológicas favorables al interactuar con moléculas y estructuras subcelulares.

En 1971, Endre Mester demostró que el láser de HeNe ($\lambda=633$ nm) puede estimular la cicatrización de heridas en ratones (Tota, 1971) posteriormente, aplicó sus hallazgos a pacientes humanos, utilizando luz láser para tratar úlceras cutáneas no cicatrizantes (Mester, Szende, & Spiry, 1972) (Mester, NagyLucskay, 1976). Muchos de los estudios reportados muestran falta de estandarización en los parámetros ópticos, por ejemplo, la potencia del láser, la densidad de energía, el tiempo de irradiación de la herida, número de repeticiones y la longitud de onda. La fototerapia utiliza fuentes de luz coherentes (misma longitud de onda y la misma orientación) que son los láseres o fuentes de luz no coherentes consistentes en lámparas con filtros o *diodos emisores de luz* (LED). Sin embargo, ya se ha

demostrado en cicatrización que la fototerapia tiene el mismo efecto ya sea empleando dispositivos emisores de luz láser o LED (Abreu Chaves, 2014).

El mecanismo de la fototerapia celular aún no se conoce por completo. A partir de experimentos publicados, al parecer tiene muchos efectos a nivel molecular, celular y tisular (Figura 2.9). Se cree que el mecanismo biológico se debe a la absorción de luz por cromóforos mitocondriales, en particular el citocromo c oxidasa (CCO) que está en la cadena respiratoria ubicada dentro de las mitocondrias; también se especula que los fotoceptores en la membrana plasmática de las células absorben la luz. (Karu P. L., 2004). Debido a la energía absorbida de los fotones, se hipotetiza que podría causar fotodisociación del óxido nítrico, inhibidor de CCO, lo que lleva a una mejora de la actividad enzimática, transporte de electrones, respiración mitocondrial y producción de trifosfato de adenosina (ATP). También se supone altera el estado redox celular que induce la activación de numerosas vías de señalización intracelular, y altera la afinidad de los factores de transcripción relacionados con la proliferación celular, la supervivencia, la reparación de tejidos y la regeneración. (Karu & Kolyakov, 2005) (Avci G. A., 2013).

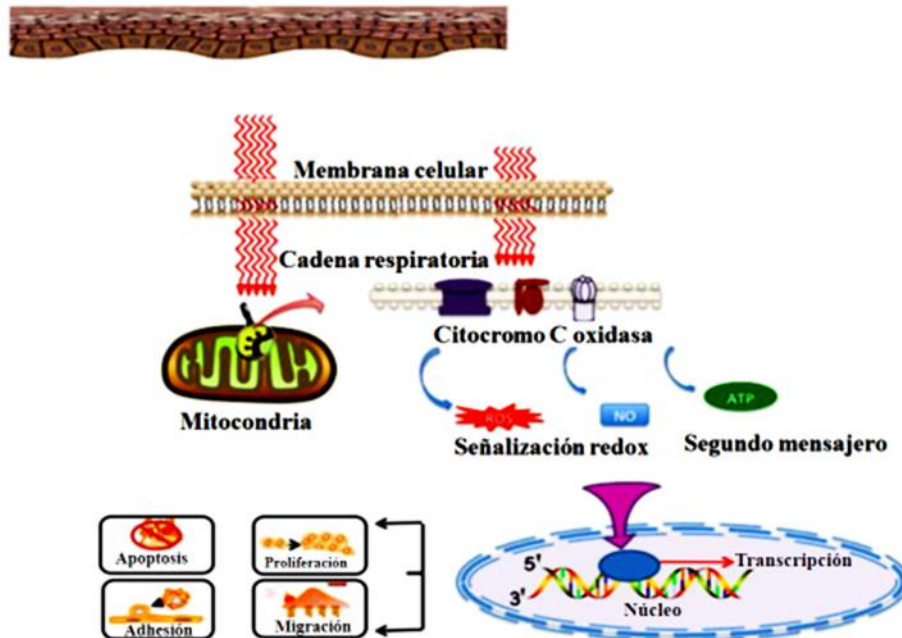


Figura 2.9: Mecanismo de acción de la fototerapia.

Hasta ahora, la mayoría de los estudios se realizan con luz roja o infrarroja y existen diversos estudios en modelos de ratas que confirman su eficiencia (Suzuki & Takakuda, 2016) (Diwan & Abid, 2016). Por otro lado, existen algunos reportes en donde se estudia el efecto de regeneración de tejido utilizando luz verde o azul y al parecer, el tratamiento con luz verde tiene efectos benéficos muy importantes, por lo que pudiera llegar a constituir una alternativa tan eficiente como la luz roja o infrarroja, desafortunadamente hay muy pocos estudios al respecto (Fushimi & Inui, 2012) (Adamskaya & et-al, 2011). Es por esto que en este proyecto de tesis proponemos estudiar el efecto de la regeneración de tejido a través de la fototerapia utilizando **luz verde**, así como con tratamientos de terapia fotodinámica combinada con luz verde para activar al fotosensibilizador Rosa de Bengala en dosis bajas de energía.

2.5 Referencias

- Abreu Chaves, A. R. (2014). Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 616-623.
- Adamskaya, & et-al. (2011). Light therapy by blue LED improves wound healing in an excision model in rats. *Injury*, 917-921.
- Alonso, M. (1999). *Física*. España: Addison-Wesley.
- Avci, Gupta, & Sadasivam, V. D. (2013). Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg*, 41-52.
- Barolet, D. (2008). Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 227-238.
- Caerwyn Ash, M. D. (2017). Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods. *Lasers in Medical Science*, 1909–1918.
- Cheong, & Welch, P. a. (1990). A Review of the Optical Properties of Biological tissues. *Iee Journal of Quantum Electronics* , 2166-2185.
- Chung, Dai, & Sharma, H. Y. (2012). The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Annals of Biomedical Engineering*, 516–533.
- Diwan, M. F., & Abid, T. A. (2016). The effect of different doses of 660 nm laser therapy on open skin wound healing in Wistar rats. *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences* , 130-137.
- Duree, G. C. (2011). *Optics For Dummies*. Washington D. C.: Wiley.
- Everett, Y. S. (1966). Penetration of Epidermis by Ultraviolet Rays. *Photochemistry and Phofobiology*, 533-542.

- Fodor, L. (2011). Light Tissue Interactions. En Fodor, & E. Ullmann, *Aesthetic Applications of Intense Pulsed Light* (págs. 11-20). Rumanía: Springer.
- Fushimi, & Inui, N. T. (2012). Green Light emitting diodes accelerate wound healing: characterization of the effect and its molecular basis in vitro and in vivo. *Wound Repair Regen*, 226-235.
- Gajinov, & Matic, P. Đ. (2010). Optical properties of the human skin. *Serbian Journal of Dermatology and Venereology*, 131-136.
- Hecht. (2000). *Óptica*. Madrid: Addison Wesley.
- Hernández, L. A. (2008). Terapia Biofotónica: Fundamentos, Aplicaciones y Protocolos de Tratamiento. *Centro de Medicina Estética e Investigación*, 1-22.
- Karu, & Kolyakov. (2005). Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, 355–361.
- Karu, P. L. (2004). Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *The Royal Society of Chemistry and Owner Societies*, 211-216.
- Lewis, W., Padilla-Martinez, J. P., Ortega-Martinez, A., & Franco, W. (2016). “Changes in endogenous UV fluorescence and biomechanical stiffness of bovine articular cartilage after collagenase digestion are strongly correlated” . *Journal of Biophotonics*, 1-8.
- Mester, Szende, & Spiry, S. A. (1972). Stimulation of wound healing by laser rays. *Acta Chir Acad Sci Hung*, 315-324.
- Mester. Nagylucskay, D. T. (1976). Laser stimulation of wound healing. *Acta Chir. Acad. Sci. Hung.*, 49–55.
- Nani Leite, M.-M. E. (2014). Phototherapy promotes healing of cutaneous wounds in undernourished rats. *An Bras Dermatology*, 899-904.
- Orazio, & Jarrett, A.-O. S. (2013). UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences*, 12222–12248.
- Padilla-Martinez, J. P., William Lewis, A. O.-M., & Franco, W. (2018). Intrinsic fluorescence and mechanical testing of articular cartilage in human patients with osteoarthritis. *Journal of Biophotonics* , 1-10.
- Padilla-Martinez, J., Ortega-Martinez, A., & Franco, W. (2016). , "The endogenous fluorescence of fibroblast in collagen gels as indicator of stiffness of the extracellular matrix ". *Proc. SPIE* , 971005.
- Padilla-Martinez, Wang, & Franco. (2016). Evaluation of cell and matrix mechanics using fluorescence excitation spectroscopy: Feasibility study in collagen gels containing fibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine*, 377–384.
- Ramos, R. G., & Juan, T. S. (2016). La biofónica y tu salud. *Ciencia*, 46-53.
- Suzuki, & Takakuda. (2016). Wound healing efficacy of a 660-nm diode laser in a rat incisional wound model. *Lasers in Medical Science*, 1683–1689.

- Tota, M. (1971). Effect of Laser Rays on Wound Healing. *Am. J. Surg*, 532-535.
- Wang, Y., Ortega-Martinez, A., & Padilla-Martinez. (2017). "In vivo assessment of wound re-epithelialization by UV fluorescence excitation imaging ". *Proc. SPIE*, 10037.
- Young, A. R. (1997). Chromophores in human skin. *Physics in Medicine and Biology*, 788 - 802.
- Zhao, F. (1998). Dependence of light transmission through human skin on incident beam diameter at different wavelengths. *SPIE Proceedings of Laser-Tissue Interaction IX*, 354–360.

CAPÍTULO 3

Fundamentos de la Terapia Fotodinámica (PDT)

3.1 Fotosensibilizadores

Un fotosensibilizador (PS) es un colorante no tóxico en ausencia de luz, el cual puede ser administrado vía local, tópica o sistémica a un sujeto. Comúnmente el PS es inyectado en el torrente sanguíneo para ser absorbido por células de todo el cuerpo; posteriormente, es expuesto a la luz a una determinada longitud de onda para producir especies reactivas de oxígeno que pueden inducir señalización celular de apoptosis, por lo cual, los PS's son empleados principalmente en el tratamiento de ciertos tipos de cánceres, debido a que el PS permanece por más tiempo en las células cancerosas que en las células normales. Al proceso que involucra un PS, luz y oxígeno se le conoce como Terapia Fotodinámica (PDT) (Castano, Demidova, & Hamblin, 2004), la cual será descrita más adelante.

La primera generación de PS incluye el Photofrim (conocido por su nombre comercial) y derivados de hematoporfirina (HpD), debido a que existen en mezclas complejas de estructuras monoméricas, diméricas y oligoméricas. Ésta primera generación de PS presentaba una larga fotosensibilidad, por lo que los pacientes tenían que evitar la luz solar por hasta 8 semanas. Debido a lo anterior, se desarrollaron nuevos PS, por lo que actualmente hay una gran variedad de compuestos. Entre los cuales se encuentran los siguientes:

Fotosensibilizadores derivados de la porfirina: Las clorinas, que comparadas con las porfirinas se diferencian en la estructura ya que la estructura de las clorinas tiene dos hidrógenos adicionales en un anillo de pirrol. Este cambio estructural conduce a un cambio en la banda de absorción, siendo de 640 a 700 nm (Lui, 2004). En este sentido los feofórbidos también tienen dos hidrógenos adicionales en una unidad de pirrol y pueden derivarse de la clorofila, que absorbe en 665 nm y ha sido usado para tratamiento contra el cáncer (Lobel, 2001). Los bacteriofeofórbidos por otra parte, tienen en su estructura con

cuatro hidrógenos más que las porfirinas y en general, la λ max de estos sensibilizadores se desplaza al rojo a 740–800 nm (Brun, 2004). De manera parecida las texafirinas también absorben a 732 nm y son solubles en agua, finalmente en este grupo de derivados de porfirinas encontramos a las ftalocianinas que se ha incursionado su uso en PDT pero requieren la formación de complejos metálicos porque los metales de transición permiten que ocurra el cruce entre sistemas. Su λ max se puede encontrar a 670–700 nm (Lier, 1999).

En cuanto a fotosensibilizadores no porfirínicos se encuentran los siguientes: Antraquinonas, siendo la hipericina un representante que absorbe a 590 nm., conocida por generar EROS que atacan a las células cancerosas siendo un derivado de antraquinona natural que se extrae de la hierba de San Juan (Sanovic & Verwanger, 2009), Pasando a otro grupo, el azul de metileno pertenece a la familia del fenotiazinio y absorbe a 666 nm (Chen, 2008). Por otro lado en el grupo de los curcuminoides está la curcumina, siendo un colorante natural aislado de los rizomas de *Curcuma longa* L y es un componente de la cúrcuma, una especia de cocina. La curcumina absorbe a 420 nm y se ha utilizado en un estudio piloto como desinfectante en cirugía oral por acción de terapia fotodinámica (Waranyoupalin & Wongnawa, 2009). Finalmente el fotosensibilizador Rosa de Bengala utilizado en esta investigación, perteneciente a la familia de Xantenos se mencionará en las secciones siguientes.

Por lo tanto, la selección del PS en la PDT depende mucho de la longitud de onda de la luz y de las distintas áreas del cuerpo a tratar, ya que la profundidad de penetración de la luz en el interior del tejido depende de su longitud de onda, como se explicó en el capítulo 2 (Freeman, 2013). A continuación, se menciona algunas de las características que un fotosensibilizador debe cumplir para ser utilizado en la Terapia Fotodinámica.

3.1.1 Características de un fotosensibilizador

Las características que un fotosensibilizador debe poseer para ser seleccionado en la PDT es tener bajos niveles de toxicidad en ausencia de luz. Se requiere que sean solubles en agua o en una mezcla de solvente acuosa inofensiva y no inducir alergias en el sujeto, independientemente de la vía de administración. El PS debe absorber luz a una determinada

longitud de onda, especialmente en el espectro visible (400 a 700 nm) debido a que es luz de baja energía en comparación con longitudes de onda cortas (rayos UV). Cuando el PS absorbe la energía de los fotones, se le denomina *activación*. La mayoría de los fotosensibilizadores son activados con luz roja e infrarroja, debido a que este tipo de luz puede activar el PS a una mayor profundidad dentro del tejido; sin embargo, existen fotosensibilizadores que pueden ser activados con luz verde (Peplow T.-Y. C., 2012). Es deseable que el tiempo entre la aplicación del PS en el sujeto y su posterior irradiación sea lo más corta posible, con el propósito de facilitar un tratamiento ambulatorio rápido y rentable; aunque se han reportado distintos tiempos de espera, desde minutos a horas. (Nesi-Reis D. S.-N.-L., 2017)

Las características estructurales importantes del PS son: *i*) la carga iónica neta, la cual puede variar de -4 (aniónica) a +4 catiónica, *ii*) el grado de hidrofobicidad, expresado como el logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua y *iii*) el grado de la asimetría presente en la molécula. Los PS's que son hidrofóbicos y tienen dos o menos cargas negativas, pueden difundirse a través de la membrana plasmática y luego reubicarse en otras membranas intracelulares. Aquellos PS's que son menos hidrofóbicos y tienen más de dos cargas negativas, tienden a ser demasiado polares para difundirse a través de la membrana plasmática y, por tanto, son absorbidos por endocitosis. (Castano, Demidova, & Hamblin, 2004). Es muy deseable que el fotosensibilizador tenga la capacidad de acumularse selectivamente en tejidos, los principales objetivos son las membranas, las mitocondrias, el aparato de Golgi, para poder así iniciar apoptosis o necrosis, dependiendo de lo que se busque. (Niamien Konan, 2002). Por último y no menos importante, para que un PS pueda ser utilizado en aplicaciones médicas debe ser aprobado por la FDA (Food and Drug Association). (Wainwright, 2014).

El fotosensibilizador elegido en este trabajo de tesis es el rosa de Bengala, por lo que el siguiente apartado está dedicado a éste, y de este modo, se entenderá la dependencia del uso de luz verde en la terapia fotodinámica.

3.1.2 Rosa de Bengala

El fotosensibilizador Rosa de Bengala (figura 3.1) pertenece a la familia de colorantes xanteno, el cual es soluble en agua a un pH de 7.0 (Alarcon, Poblete, Roh, Couture, & Jeffrey Comer, 2017). Este fotosensibilizador presenta un pico máximo de absorción de luz alrededor de los 550 nm (como se muestra en la figura 3.2), con una meseta a 525 nm, por lo cual, puede absorber fuertemente la luz verde ($\lambda=532$ nm). Cuando el Rosa de Bengala es excitado a esta longitud de onda ($\lambda=532$ nm), emite fluorescencia a una longitud de onda cercano al color rojo, con un pico máximo de emisión alrededor de los 575 nm, como se observa en la figura 3.3. Los espectros de absorción y emisión mostrados en la figura 3.2 y 3.3, fueron obtenidos a una concentración de Rosa de Bengala de 2 y 5 μ M, las cuales fueron utilizadas en este proyecto de tesis para la PDT. Dichos espectros fueron obtenidos por el grupo de trabajo del Laboratorio de Luminiscencia y Raman del Centro de Investigación en Físicoquímica de Materiales del ICUAP. Cabe mencionar, que el Rosa de Bengala tiene una larga historia como colorante fotoactivo y ha sido utilizado en aplicaciones antimicrobianas (Costa, Rasteiro, Pereira, Rossoni, & Jorge, 2011), de unión de tejidos (Xu & Farinelli, 2015) y contra el cáncer (Panzarini, Inguscio, & Dini, 2014).

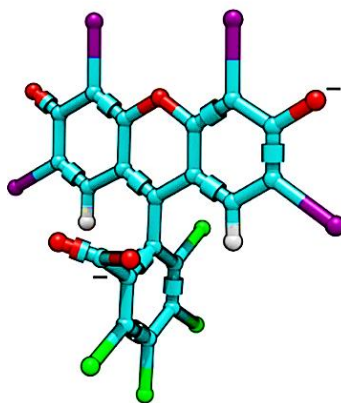


Figura 3.1: Modelo molecular del Rosa de Bengala. Tomado de (Alarcon, Poblete, Roh, Couture, & Jeffrey Comer, 2017).

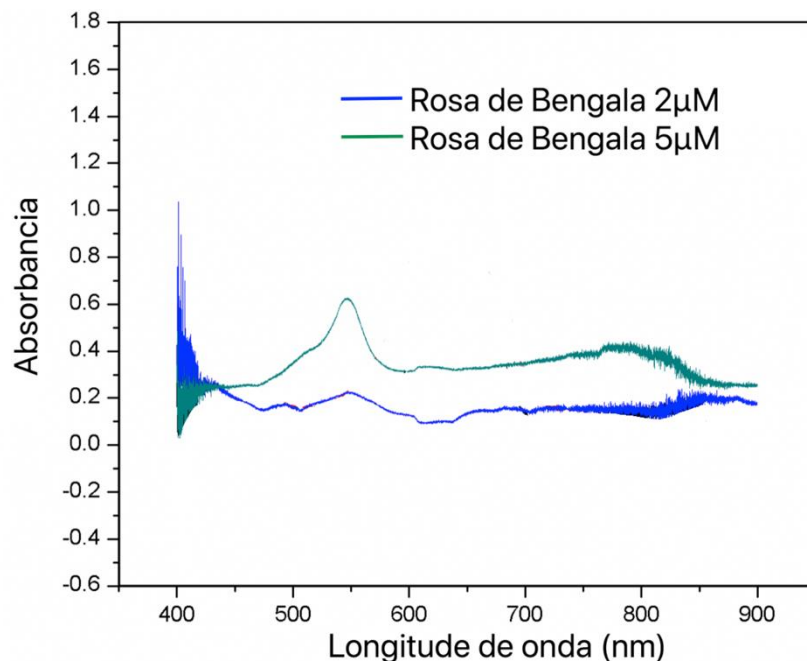


Figura 3.2: Gráfica absorbanza como función de la longitud de onda, donde se muestra el pico máximo de absorbanza (~550nm) del Rosa de Bengala a concentraciones de 2 y 5 μM.

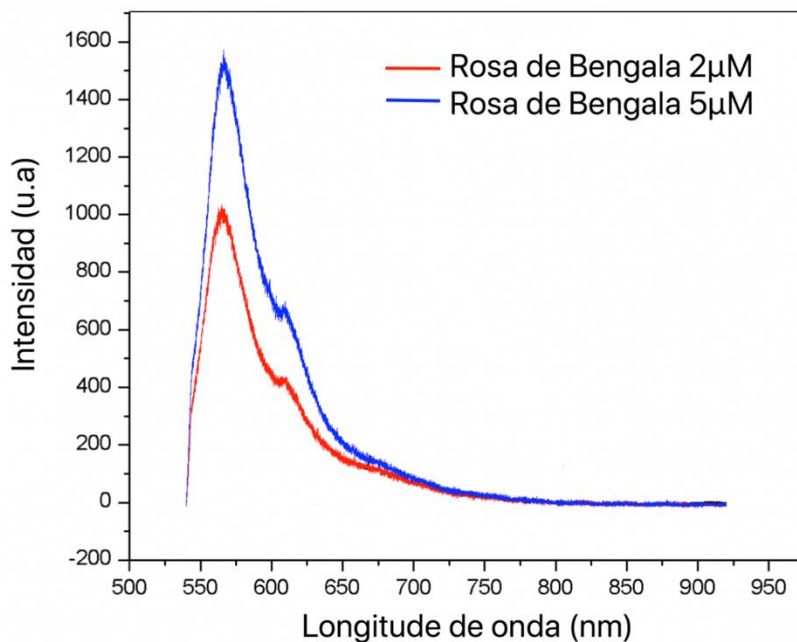


Figura 3.2: Espectro de fluorescencia del Rosa de Bengala, donde se muestra el pico máximo de emisión (~575 nm) para ambas concentraciones molares (2 y 5 μM).

3.2 Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica

Como se mencionó en el capítulo 1, la terapia fotodinámica (PDT) es un tratamiento óptico que conduce a la destrucción selectiva de células, a través de procesos biológicos activados por luz. A continuación, se describen los procesos fotofísicos y fotoquímicos que ocurren en la PDT.

Proceso Fotofísico

En la terapia fotodinámica el PS en estado fundamental tiene dos electrones con espines opuestos, ubicados en el orbital molecular de baja energía comúnmente llamado estado singulete (S_0), como se observa en la Figura 3.4. Después de absorber la energía de los fotones ($E=h\nu_{abs}$), los electrones son excitados y pueden pasar hacia otros orbitales de mayor energía llamados estados singuletes excitados (S_1 y S_2), pero mantiene su giro. Los electrones que se encuentran en estos niveles de energía tienen un tiempo de vida corto (nanosegundos), es decir, son inestables y nuevamente regresan a su orbital molecular de baja energía; sin embargo, la energía que habían absorbido puede ser perdida en parte por conversión interna en forma de calor (cuando pasan del nivel S_2 al S_1) o emitiendo luz (cuando pasan del nivel S_1 al S_0), fenómeno conocido como **fluorescencia**. El hecho de que la mayoría de PS sea fluorescente ha conducido al desarrollo de ensayos sensibles para cuantificar la cantidad de PS en células o tejidos, permitiendo obtener imágenes de fluorescencia *in vivo* en animales o pacientes. Los electrones del PS que se encuentran en el estado de singulete excitado también puede experimentar el proceso conocido como *cruce entre sistemas*, donde el giro del electrón excitado se invierte para formar el estado triplete excitado. En este estado, los electrones tienen un tiempo de vida relativamente larga (microsegundos). Cuando los electrones pasan del estado triplete excitado al nivel S_0 , pierden su exceso de energía nuevamente emitiendo luz, sin embargo, este proceso es conocido como **fosforescencia**. El tiempo de vida largo de los electrones en el estado triplete, se podría explicar debido al hecho de que la pérdida de energía por emisión de luz (fosforescencia) es un proceso "spin-prohibido," es decir, los electrones del PS se moverían directamente de un estado triplete a un estado singulete (Castano, Demidova, & Hamblin, 2004). Todo el proceso fotofísico descrito anteriormente es representado mediante un esquema en la figura 3.4.

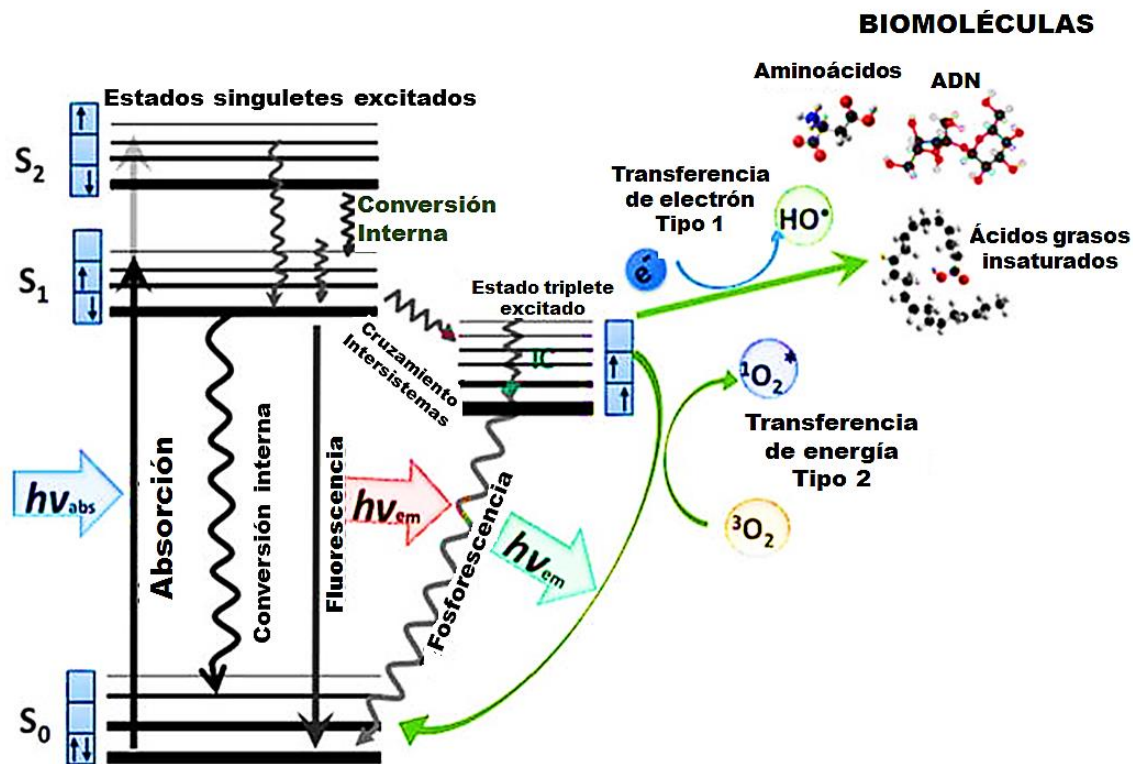


Figura 3.4: Representación esquemática del mecanismo fotoquímico y fotoquímico que se llevan a cabo en la PDT. Tomado de (Abrahamse & Hamblin, 2016).

Proceso fotoquímico

El estado triplete excitado del PS puede sufrir dos tipos de reacciones. La reacción de Tipo 1, puede reaccionar directamente con un sustrato, como la membrana celular o una molécula, y transferir un protón o un electrón para formar un anión radical o catión radical, respectivamente (Figura 3.4). Estos radicales pueden reaccionar aún más con oxígeno para producir EROS, tales como el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\bullet) (Niamien Konan, 2002). El segundo proceso es una reacción de tipo 2, el PS triplete puede transferir su energía directamente al oxígeno molecular (3O_2) (en sí mismo un triplete en el estado fundamental), para formar oxígeno singlete en estado excitado (1O_2), la transferencia de energía al oxígeno molecular puede ocurrir sólo si el PS

está en el mismo estado triplete (Figura 3.4). Ambas reacciones tipo 1 y tipo 2 pueden ocurrir simultáneamente, y la relación entre estos procesos depende del tipo de PS utilizado, las concentraciones de sustrato y la cantidad de oxígeno presente (Freeman, 2013).

3.2.1 Señalización celular por cambios en estado redox

Dentro de la célula se producen EROS que a bajas concentraciones activan la transducción de señales, que van desde la inflamación, apoptosis y/o necrosis, sin embargo, tratan de mantener la homeostasis, como a continuación se describe.

Oxidantes y radicales libres derivados del oxígeno

Como es bien sabido, en la célula el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O_2), con los electrones que forman el enlace (σ), antienlazante con el mismo espín, es decir, en estado triplete. De este modo el oxígeno es poco reactivo con una baja velocidad de reacción, a temperatura fisiológica; sin embargo, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) que pueden empezar múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo. (Gutiérrez, 2002). Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicales, pero que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes prooxidantes y son las especies reactivas del oxígeno, entre las que se encuentran (Naqui, Chance, & Cadenas, 1986):

- Radical hidroxilo ($HO\cdot$)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Anión superóxido (O_2^-)
- Oxígeno singulete (1O_2)
- Oxígeno nítrico (NO)
- Peróxido (ROO)
- Semiquinona (Q)
- Ozono

Efecto nocivo de las especies reactivas de oxígeno

El daño celular producido por las especies reactivas del oxígeno ocurre sobre diferentes macromoléculas. En el proceso de peroxidación lipídica afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, de este modo se altera la permeabilidad de la membrana celular dando como resultado edema y muerte celular. La peroxidación lipídica representa una forma de daño tisular que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singulete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. A su vez, con las proteínas puede suceder oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina, asimismo puede haber entrecruzamientos de cadenas peptídicas, y por último formación de grupos carbonilos. En el ácido desoxirribonucleico (ADN) hay lugar a mutaciones y carcinogénesis, pérdida de expresión por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes. (Reilly & Bulkley, 1990).

Ventaja y uso del ambiente oxidativo

Los EROS a bajas concentraciones tienen una función fisiológica en el organismo como la de participar en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno y de prostaglandinas, activar enzimas de la membrana celular, disminuir la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modificar la membrana celular y favorecen la quimiotaxis, ver figura 3.5. (Hernández-Saavedra & McCord, 2007)

De manera fisiológica los leucocitos polimorfonucleares activados producen el radical superóxido, que se utiliza como arma antibacteriana. Participando, así como un antibiótico de amplio espectro. En el proceso, los neutrófilos también se destruyen, es decir, el superóxido es un mediador de inflamación y las superperóxido dismutasas despliegan una actividad antiinflamatoria. Desde otro punto de vista el superóxido sirve para estimular a los fibroblastos para que entren en un modo de proliferación celular, extendiendo fibras de colágeno y formando el tejido de la cicatriz para cerrar y sellar la herida. (Halliwell, 2000) (Hernández-Saavedra & McCord, 2007)

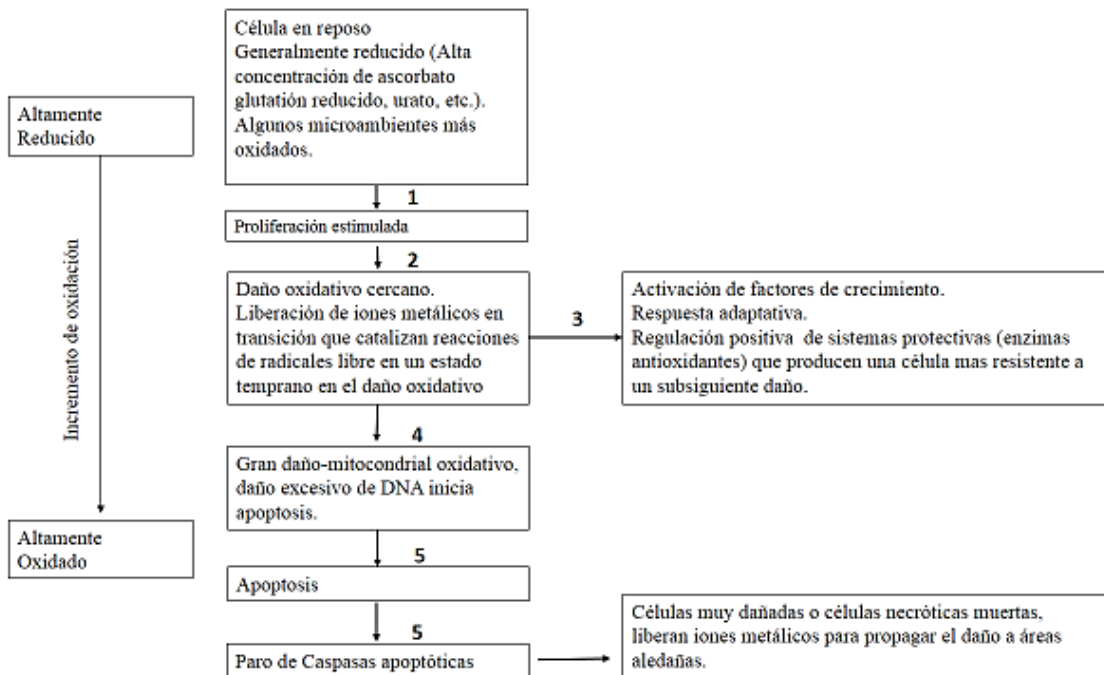


Figura 3.5: Posibles vías debidas a las especies reactivas de oxígeno. Tomado de: (Halliwell, 2000)

3.3 Terapia fotodinámica aplicada en la curación de heridas

Los fotosensibilizadores se han utilizado en medicina desde hace varios años, sin embargo, los fundamentos científicos para su uso eran inexistentes o poco claros, antes de 1900 (Daniell & Hill, 1991). Ya a principios del siglo XX, Oskar Raab observó por accidente que las células protozoarias teñidas con tintes fluorescentes murieron al ser iluminadas (Rajesh, 2011). Más tarde, Prime y colaboradores notaron en humanos que, tras ingerir colorantes fluorescentes para un tratamiento experimental de enfermedades neurológicas desarrollaron eritema severo después de una corta exposición a luz de sol (Abrahamse & Hamblin, 2016). Por un tiempo, la PDT no tuvo demasiada atención hasta la década de los 70s, cuando investigadores estadounidenses que con derivados de hematoporfirina y luz roja dieron tratamiento a cáncer de vejiga en animales y humanos. Desde entonces, la PDT es considerada como una terapia para matar células malignas, sin los efectos secundarios de la quimioterapia (Garcia, Mazzocco, & Juan, 2016).

En el área de curación de heridas con PDT, un número limitado de estudios *in vitro*, en modelos animales y casos clínicos han mostrado evidencia de mejoría (Peplow T.-Y. C., 2012). Por ejemplo, Staius en el año 1997 demostró que la matriz extracelular depositada en placas de cultivo por células endoteliales al ser tratadas con PDT provocó una inactivación de TGFβ, como resultado se observó un aumento de la proliferación de las células endoteliales (LaMuraglia, 1997). Ya para el 2014, Mills mostró que MALA-PDT con 3 horas de incubación e iluminación con luz roja (34 J/cm²) aumentó TGF-β3, MMP1 y MMP9 lo que condujo a una mejora de la matriz extracelular en la curación de heridas humanas *in vivo* (Mills, y otros, 2014). Sin embargo, los resultados obtenidos por la PDT están fuertemente relacionados a la fuente de luz y dosis, características del fotosensibilizador, concentraciones y, al modelo de experimentación (Peplow T.-Y. C., 2012).

Siguiendo este contexto, el fotosensibilizador Rosa de Bengala (RB) activado con luz verde, ha sido utilizado experimentalmente en el tratamiento de carcinoma de mama y melanoma metastásico (Mousavi, Tavakkol-Afshari, Brook, & Jafari-Anarkooli, 2009). Por otro lado, Yao y colaboradores en el 2015 y 2011 reportaron el sellado de heridas (incisiones quirúrgicas) utilizando RB activado con luz verde en humano y cerdo (Xu & Farinelli, 2015) (Tsao, Yao, & Tsao H, 2011); sin embargo, han sido pocos los reportes del uso de RB en la curación de heridas cutáneas.

3.4 Referencias

- Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *The Biochemical Journal*, 347–364.
- Alarcon, E. I., Poblete, H., Roh, H., Couture, J.-F., & Jeffrey Comer, a. I. (2017). Rose Bengal Binding to Collagen and Tissue Photobonding. *American Chemical Society*, 6646-6657.
- Brun, D. D. (2004). Determination of the *in vivo* pharmacokinetics of palladium-bacteriopheophorbide (WST09) in EMT6 tumour-bearing Balb/c mice using graphite furnace atomic absorption spectroscopy. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1006–1010.
- Castano, Demidova, & Hamblin. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 279—293.

- Chen, Z. L. (2008). Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. *Cancer Sci.*, 2019–2027.
- Costa, A. C., Rasteiro, V. M., Pereira, C. A., Rossoni, R. D., & Jorge, J. C. (2011). The effects of rose bengal- and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*. *Mycoses*, 56–63.
- Daniell, & Hill. (1991). A History of Photodynamic Therapy. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*, 340-348.
- Fila, Kasimova, Arenas, & Nakonieczna, G. B. (2016). Murine Model Imitating Chronic Wound Infections for Evaluation of Antimicrobial Photodynamic Therapy Efficacy. *Frontiers in Microbiology*, 1-11.
- Freeman, A. B. (2013). Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials*, 817-840.
- Garcia, R. R., Mazzocco, T. S., & Juan, J. C. (2016). La biofónica y tu salud. *Ciencia*, 46-53.
- Gutiérrez, V. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit*, 126-133.
- Halliwell, B. (2000). The antioxidant paradox. *The Lancet*, 1179-1180.
- Hernández-Saavedra, & McCord. (2007). Evolución y radicales libres. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 477- 484.
- Joon Seok Lee, B. I. (2015). Photo-induced inhibition of Alzheimer's β -amyloid aggregation in vitro by rose bengal. *Biomaterials*, 43-49.
- LaMuraglia, R. G. (1997). Photodynamic therapy inhibits transforming growth factor β activity associated with vascular smooth muscle cell injury. *Journal of vascular surgery*, 1044–1053.
- Lier, A. a. (1999). Metal complex as photo- and radiosensitizers. *Chem. Rev.*, 2379–2450.
- Lobel, J. e. (2001). “2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a (HPPH) in a nude rat glioma model: implications for photodynamic therapy.”. *Lasers in surgery and medicine*, 397-405.
- Lui, H. L. (2004). Photodynamic Therapy of Multiple Nonmelanoma Skin Cancers With Verteporfin and Red Light–Emitting Diodes Two-Year Results Evaluating Tumor Response and Cosmetic Outcomes. *Arch Dermatol*, 26–32.
- Mills, S., Farrar, M., Ashcroft, G., Griffiths, C., Hardman, M., & Rhodes, L. (2014). Topical photodynamic therapy following excisional wounding of human skin increases production of transforming growth factor- β 3 and matrix metalloproteinases 1 and 9, with associated improvement in dermal matrix organization. *British Journal of Dermatology*, 55-62.
- Mousavi, S., Tavakkol-Afshari, J., Brook, A., & Jafari-Anarkooli, I. (2009). Direct toxicity of Rose Bengal in MCF-7 cell line: Role of apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, 855–859.
- Naqui, Chance, & Cadenas. (1986). Reactive Oxygen Intermediates in Biochemistry. *Annual Review of Biochemistry*, 137-166.

- Nesi-Reis, D. S.-N.-L. (2017). Contribution of Photodynamic Therapy in Wound Healing : A Systematic Review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 294-305.
- Niamien Konan, R. G. (2002). State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 89-106.
- Panzarini, E., Inguscio, V., & Dini, G. M. (2014). Rose Bengal Acetate PhotoDynamic Therapy (RBAC-PDT) Induces Exposure and Release of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human HeLa Cells. *PLOS ONE*, 1-12.
- Peplow, T.-Y. C. (2012). Photodynamic Modulation of Wound Healing: A Review of Human and Animal Studies. *Photomedicine and Laser Surgery*, 118-148.
- Rajesh, K. P. (2011). Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. *J Indian Soc Periodontol*, 323-327.
- Reilly, & Bulkley. (1990). Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. *British Journal of Surgery*, 1323-1324.
- Sanovic, K. G., & Verwanger, T. (2009). Time-resolved gene expression profiling of human squamous cell carcinoma cells during the apoptosis process induced by photodynamic treatment with hypericin. *Int. J. Oncol*, 921-939.
- Sellera, Sabino, & Hamblin. (2016). History of PDT. En F. P. Ribeiro, *Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice* (págs. 1-10). Springer Cham.
- Tsao, Yao, & Tsao H, H. F. (2011). Light-activated tissue bonding for excisional wound closure: a split-lesion clinical trial. *British Journal of Dermatology*, 555-563.
- Wainwright, M. (2014). In defence of "dye therapy". *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26-29.
- Waranyoupalin, R., & Wongnawa, W. P. (2009). Studies on complex formation between curcumin and Hg(II) ion by spectrophotometric method: A new approach to overcome peak overlap. *Cent. Eur. J. Chem.*, 388-394.
- Xu, & Farinelli, H. Z. (2015). Light-Activated Sealing of Skin Wounds. *Lasers in Surgery and Medicine*, 17-29.

CAPÍTULO 4

Procedimiento experimental

4.1 Manejo y uso de animales

En este proyecto de tesis, 33 ratas (*Rattus norvegicus*) macho alopecías con un peso corporal de entre 100 a 150 gramos fueron utilizados. Los animales fueron criados y mantenidos en las instalaciones del Bioterio "Claude Bernard," de acuerdo a los lineamientos establecidos en la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" y las especificaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, y la Legislación Mexicana relativa vigente. Este proyecto de investigación fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la BUAP, con el protocolo de investigación con clave: GASW-UALVIEP-17.

Los organismos fueron mantenidos en cajas de propileno, con un ciclo de luz-oscuridad 12-12, agua y comida *Ad libitum* y divididos aleatoriamente en 4 grupos: G1 (Control), G2 (Fotosensibilizador), G3 (FT) y G4 (PDT). EL grupo G1 (Control), representa heridas sin ningún tipo de tratamiento; el grupo G2, representa heridas con aplicación tópica del colorante rosa de bengala; el grupo G3, son heridas irradiadas con luz a una longitud de onda de $\lambda=532$ nm (verde), sin la aplicación tópica de colorante (Fototerapia); por ultimo, el grupo G4 son heridas con aplicación tópica del colorante rosa de bengala y posteriormente irradiadas con luz verde (Terapia Fotodinámica).

Para estudiar los efectos que se llevan a cabo en la curación de la herida cuando es tratada con las técnicas FT y PDT, los experimentos de la primera etapa fueron realizados en 18 ratas para evaluar los siguientes parámetros: *ii*) densidad de energía, *iii*) tiempo de irradiación, *iv* y *v*) concentración del colorante. Basados en los resultados obtenidos de la primera etapa, se realizaron experimentos en 10 organismos (5 ratas para la fototerapia y 5 ratas para la terapia fotodinámica) seleccionado la densidad de energía y concentración molar del fotosensibilizador que mejores resultados presentaron en la primera etapa. Las ratas utilizadas en este proyecto fueron divididas como se especifica en la Tabla 1 y 2.

GRUPO (Primera etapa)	NÚMERO DE RATAS
G1: Control	2
G2:Fotosensibilizador	4
G3: FT	4
G4: PDT	8

Tabla 1: Grupos experimentales y número de organismos (Primera etapa).

GRUPO (Segunda Etapa)	NÚMERO DE RATAS
G1: Control	5
G2: FT	5
G3: PDT	5

Tabla 2: Grupos experimentales y número de organismos (Segunda etapa).

4.2 Procedimiento quirúrgico

Los organismos fueron anestesiados con Xilaxina-Ketamina a una dosis de 0.20 mL/100g peso vivo por vía intraperitoneal. Posterior a la anestesia, dos heridas circulares de 1 cm de diámetro fueron realizadas quirúrgicamente en el dorso de la rata (a nivel de la última costilla flotante), como se observa en la Figura 4.1. Las heridas fueron hipodérmicas justo hasta llegar a la fascia. El día en que las heridas fueron realizadas fue considerado como “Día 0” y el día siguiente a la cirugía como “Día 1” y así consecutivamente. Cabe mencionar que en el Día 0 y 1, los organismos fueron colocados en cajas individuales, con la finalidad de evitar algún contacto de la herida con otras ratas. En el Día 2, los organismos fueron colocados en parejas en cada caja.

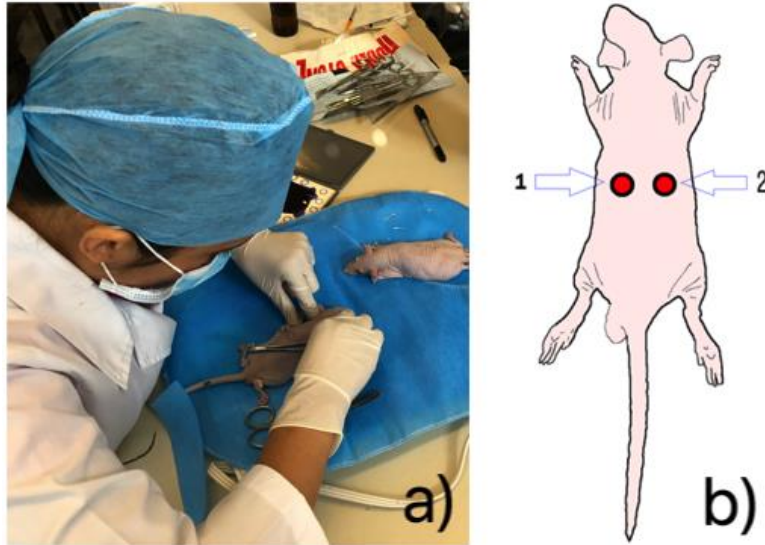


Figura 4.1: a) Cirugía, realización de heridas quirúrgicas y b) localización anatómica de las heridas.

4.3 Grupos Experimentales

Posterior a la cirugía, se ejecutaron los siguientes procedimientos para cada grupo experimental.

4.3.1 Grupo Control (G1)

En este grupo sólo se realizaron las heridas, sin llevar a cabo ningún tratamiento óptico ni aplicación tópica del colorante, y el proceso de cicatrización se llevó a cabo sin la aplicación de ningún fármaco (analgésico, antibiótico). Cabe mencionar que a ningún grupo se le aplicó analgésico o antibiótico, para evitar falsos positivos durante el proceso de cicatrización. Fotos convencionales de cada herida fueron adquiridas durante el proceso de cicatrización ver figura 4.2 y un organismo fue sacrificado utilizando cámara de CO₂ al día 3, 5, 7, 14 y 21 posterior a la realización de la herida quirúrgica.

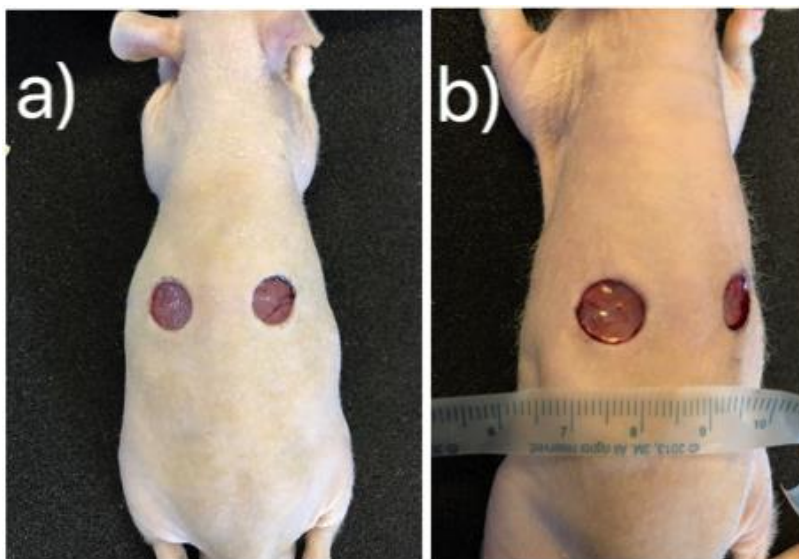


Figura 4.2: Heridas circulares de 1 cm de diámetro, realizadas quirúrgicamente en ratas alopécicas.

4.3.2 Grupo Fotosensibilizador (G2)

A las heridas de este grupo se les aplicó tópicamente el fotosensibilizador Rosa de Bengala (Sigma Aldrich Co.) en los primeros tres días, es decir, los días 0, 1 y 2. El colorante fue preparado en una solución de amortiguador de fosfatos salina (PBS, Phosphate Buffered Saline) a dos concentraciones molares (2 y 5 μM); a esta solución se le conoce comúnmente como fotosensibilizador. Para el estudio piloto, a las heridas provocadas en 2 ratas se le aplicó el fotosensibilizador a una concentración de 2 μM y a las 2 ratas restantes una concentración de 5 μM (Figura 4.3). Para asegurar que el fotosensibilizador penetrara en el tejido, se dejó en contacto con la herida por 10 minutos (rata inmovilizada). Para cada concentración, un organismo fue sacrificado al día 3 y 14. El Día 3 de sacrificio fue seleccionado para observar el efecto del fotosensibilizador posterior a la última aplicación tópica (Día 2) en ausencia de luz verde. El Día 14 de sacrificio para este grupo, fue seleccionado para observar el estado de cicatrización de la herida. Todo el proceso descrito previamente es ilustrado en la Figura 4.3.

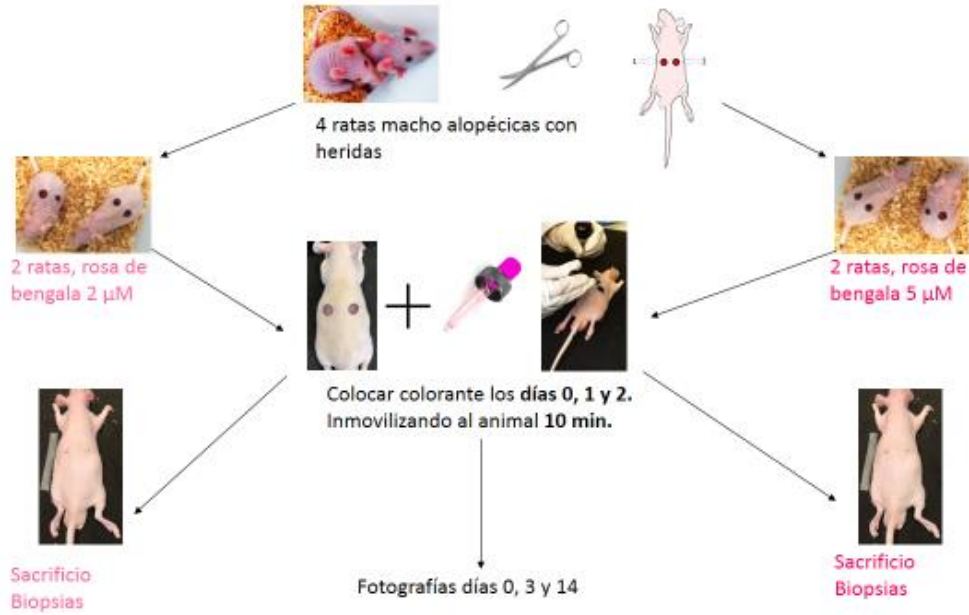


Figura 4.3: Procedimiento experimental para el Grupo Colorante (G2).

4.3.3 Grupo Fototerapia (FT)

Para este grupo, 2 ratas fueron utilizadas para el estudio piloto y 5 ratas para la primer etapa. Las heridas fueron irradiadas con luz verde utilizando un dispositivo emisor de luz, el cual fue diseñado y construido por nuestro grupo de trabajo perteneciente al Departamento de Óptica del Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE), del estado de Puebla (ver Figura 4.4).

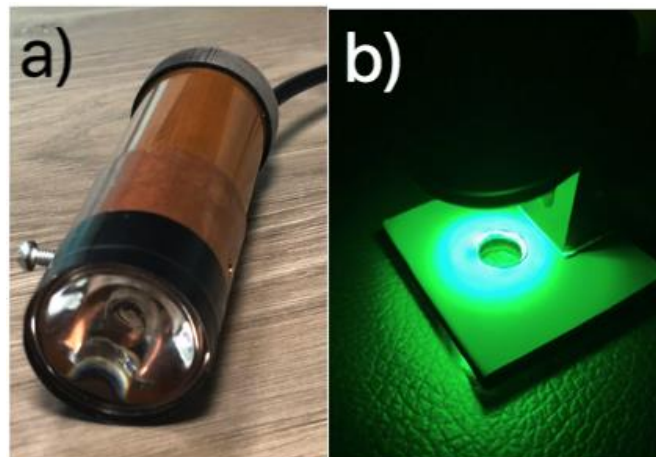


Figura 4.4: a) Dispositivo LED (Diodo Emisor de Luz) apagado y b) Dispositivo encendido y con la implementación de una plataforma.

El dispositivo fue caracterizado para obtener la potencia (W) de salida, para determinar la densidad de potencia (W/cm^2) y ajustar el tiempo (s) de irradiación, obteniendo con ello la densidad de energía (J/cm^2) suministrada a la herida. Los parámetros ópticos empleados en la fototerapia se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Parámetros ópticos calculados para la fototerapia.

Longitud de onda (nm)	Potencia (W)	Área de irradiación (cm^2)	Densidad de Potencia (W/cm^2)	Tiempo de irradiación (sec)	Densidad de energía (J/cm^2)	Día de tratamiento
532	0.043	~0.78	0.055	~37	2 J/cm^2	0, 1 y 2
532	0.043	~0.78	0.055	~146	8 J/cm^2	0, 1 y 2



Figura 4.5: Aplicación de la Fototerapia empleando luz verde ($\lambda=532\text{nm}$).

Para la primera etapa del estudio, las heridas provocadas en 2 ratas fueron irradiadas a una densidad de energía de 2 J/cm^2 y a las 2 ratas restantes a una densidad de 8 J/cm^2 (Figura 4.5). Para cada densidad de energía, un organismo fue sacrificado al día 3 y 14. Nuevamente, el Día 3 de sacrificio fue seleccionado para observar el efecto de la luz

posterior al último día de realizar la fototerapia (Día 2) y, el Día 14 para observar el estado de cicatrización de la herida y ser comparada con los otros grupos. Todo el proceso descrito previamente es ilustrado en la Figura 4.6. Con base a los resultados obtenidos de este primer estudio, se seleccionó una densidad de energía ($8\text{J}/\text{cm}^2$) y se repitió el experimento en un grupo de 5 ratas, a las cuales se les aplicó el mismo procedimiento, con la diferencia de que fueron sacrificadas a los días 3, 5, 7, 14 y 21. Fotografías de las heridas fueron adquiridas con una cámara digital Sony α 6000 y analizadas en el Software ImageJ.

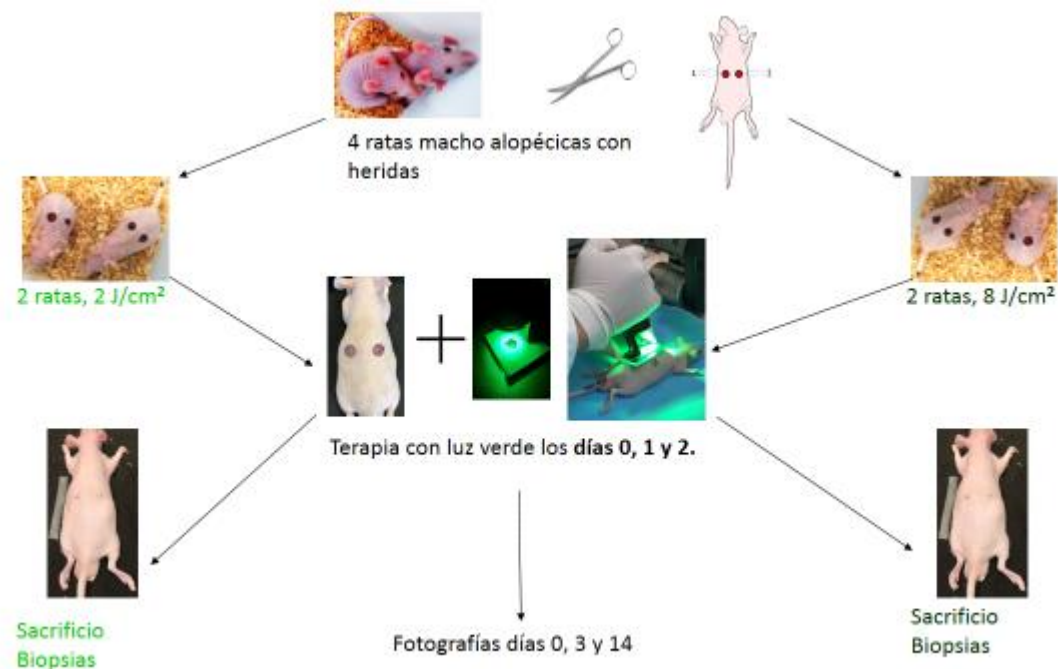


Figura 4.6: Procedimiento experimental para el Grupo Fototerapia.

4.3.4 Grupo Terapia Fotodinámica (PDT)

Este grupo experimental, es una combinación de los dos grupos anteriores, es decir, del Grupo Colorante y del Grupo Fototerapia. Una vez realizado el procedimiento quirúrgico, se aplicó el fotosensibilizador Rosa de Bengala a una concentración de 2 y $5\ \mu\text{M}$, dejando el fotosensibilizador en contacto con la herida durante 10 minutos. Posteriormente se realizó la fototerapia con luz verde, a dos densidades de energía de 5 y $8\text{ J}/\text{cm}^2$, para activar

al fotosensibilizador. Todo el proceso y el número de organismos utilizados en el primer estudio, así como la concentración molar del colorante y densidad de energía, son mostrados en la Figura 4.7. Basados en los resultados obtenidos de la primera etapa, se realizaron experimentos en 5 ratas seleccionando una sola densidad de energía y una sola concentración molar del colorante. Los organismos fueron sacrificados los días 3, 5, 7, 14 y 21, para la adquisición de biopsias.

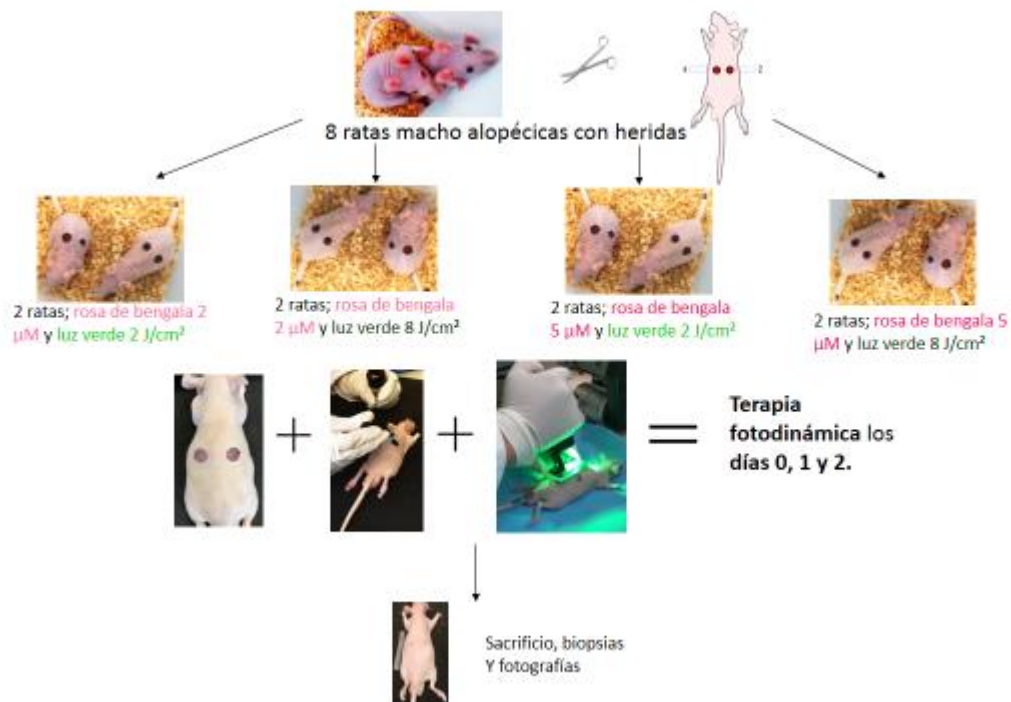


Figura 4.7: Procedimiento experimental para el Grupo Terapia Fotodinámica (primera parte del estudio).

4.4 Técnicas de Análisis

4.4.1 Análisis de fotografías convencionales

A partir de las heridas convencionales se cuantifico el área de las heridas, haciendo uso del programa ImageJ, el cual es un Software de uso libre (ver Figura 4.8). Para ello, el borde de la herida fue delimitado haciendo uso de las herramientas del Software (como se observa en la Figura 4.8) y posteriormente se obtuvo el área de la herida en cm^2 . Esto fue realizado para todas las fotos adquiridas en la primer y segunda parte de este estudio.

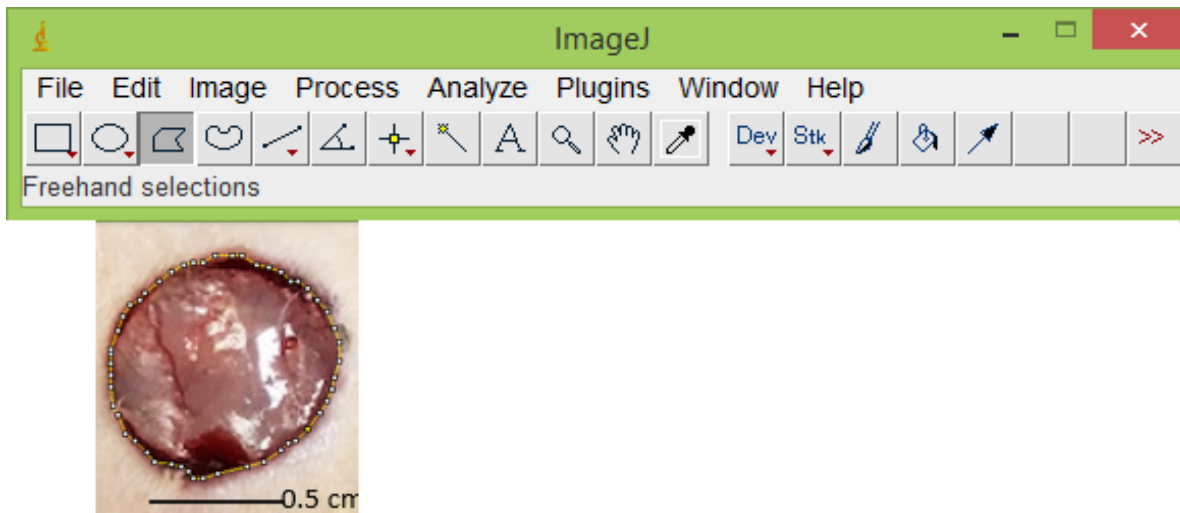


Figura 4.8: Software Image J y ejemplo de la cuantificación del área de la herida.

Nuevamente, haciendo uso del programa Image J, se obtuvieron histogramas en 3D en escala de grises de cada herida, como se observa en la figura 4.9. Para obtener la imagen en 3D, primero se establece la escala de la imagen en centímetros (cm), con el propósito de saber el diámetro de la herida. Posteriormente, la fotografía convencional es descompuesta en sus tres colores primarios (rojo, verde y azul), obteniendo así tres imágenes. La imagen en rojo, fue posteriormente seleccionada y convertida a escala de grises y finalmente, se selecciona la región donde fue realizada la herida y se grafica la intensidad de cada pixel para obtener la imagen en 3D. Dichas imágenes, representan la intensidad de cada pixel en la fotografía. Cuando una herida es realizada, la intensidad de los pixeles en la imagen es más baja en la región de la lesión, y conforme la herida va sanando, la intensidad de los pixeles comienza a igualarse con la de la piel no dañada. Lo anterior, nos da una idea del proceso de re-epitalización.

Finalmente, se calcularon los promedios y desviación estándar del área de las heridas para cada grupo y día, mediante el programa Origin 9.1 y se obtuvieron las gráficas del porcentaje de contracción de las heridas con su respectivo error estándar.

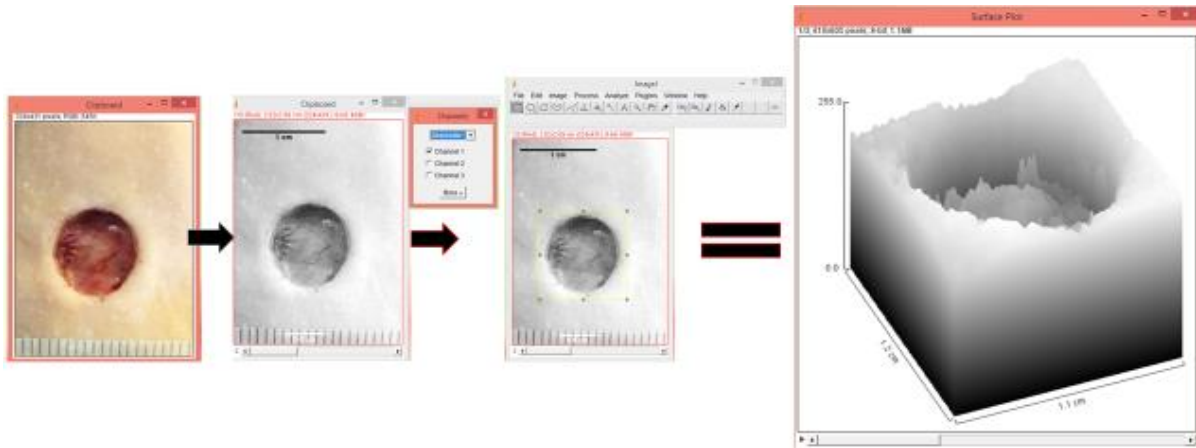


Figura4.9: Procesamiento de las fotografías convencionales.

4.4.2 Preparación de tejido para análisis histológico

Cortes histológicos

El día de sacrificio de los organismos se tomaron biopsias de las heridas y se fijó el tejido en paraformaldehído al 4% durante 4 semanas, para la próxima deshidratación del tejido sustituyendo el paraformaldehído por alcohol a diferentes concentraciones (del 70 al 100%). Una vez deshidratadas las muestras se procede a desalcoholizar con cloroformo; entonces se incluyeron los tejidos en parafina y se hicieron cortes de 20 μm de grosor mediante un micrótopo, montando los cortes en portaobjetos.

Técnica de Tinción H&E (Hematoxilina y Eosina)

Los cortes histológicos se tiñen con la intención de elucidar los límites del tejido, identificar y estudiar los componentes del mismo. Se emplean sobre los cortes realizados dos colorantes, en primer instancia los cortes se exponen a la hematoxilina, un colorante básico que se une a cualquier sustancia que tenga grupos ácidos, tal es el ADN que presenta grupos fosfatos y a proteínas nucleares con carga negativa. Posteriormente se someten a la eosina, que es un colorante ácido débil, por lo que colorea estructuras básicas. El resultado de ambos colorantes en el corte histológico es distinguir perfectamente a los núcleos

celulares teñidos de azul o morado y proteínas con diferentes tonos de rosa dependiendo de su acidofilia (Bueno García, 2007).

4.4.3 Método Estadístico

Para estimar los efectos de los distintos tratamientos se realizó un análisis de varianza ANOVA de un factor que compara las medias de distintos grupos. Parte de suponer que tenemos muestras aleatorias simples independientes que tienen una distribución normal. Este análisis de la varianza permite determinar si diferentes tratamientos muestran diferencias significativas o por el contrario puede suponerse que sus medias no difieren. (Moore, 2005)

4.5 Referencias

Bueno García, J. D. (2007). *Gestión, procesado y análisis de imágenes biomédicas*. Cuenca: Ediciones de la Universidad de Castilla- La Mancha.

Moore, D. S. (2005). *Estadística aplicada básica*. Washington: Antoni Bosch.

Capítulo 5

5.1 Resultados experimentales (primera etapa)

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos del estudio piloto donde se evaluó al fotosensibilizador Rosa de Bengala a dos diferentes concentraciones molares. Dicho fotosensibilizador fue activado empleando una longitud de onda de 532 nm (luz verde) a dos diferentes densidades de energía (8 y 2 J/cm²). En este estudio, se pretende observar mediante fotografías convencionales la contracción de una herida debido al efecto de tres interacciones distintas con el tejido: *i*) efecto del fotosensibilizador, *ii*) efecto de la luz en el tejido y *iii*) efecto del fotosensibilizador activado con luz. A partir de los resultados obtenidos en este estudio piloto, se seleccionó la densidad de energía y la concentración molar del fotosensibilizador óptimos, para llevar a cabo la fototerapia y terapia fotodinámica en un estudio con un mayor número de individuos, así como un análisis histológico del progreso de la cicatrización de las heridas con y sin tratamiento.

5.1.1 Interacción Rosa de Bengala-Tejido

La apariencia de las heridas es un importante aspecto clínico, donde se desea siempre una rápida cicatrización, con el propósito de evitar una infección. La forma más común de evaluar el proceso de cicatrización de una herida o el cierre de la misma, es mediante imágenes convencionales o haciendo una evaluación visual en tiempo real de la herida por un clínico o profesional de la salud. En la figura 5.1, se muestran fotografías convencionales de heridas pertenecientes a los grupos Control y Colorante fotosensibilizador (2 y 5 µM), las cuales fueron adquiridas a los días 0, 3 y 14. En esta figura se puede observar que al día 0, las heridas tienen la misma forma y aproximadamente el mismo tamaño (1 cm de diámetro), en el día 3 parecen tener la misma velocidad de cicatrización. En el día 14, la herida del grupo control presenta una coloración ligeramente más rojiza en comparación con las heridas del grupo colorante; sin embargo, para ambos grupos la herida en el día 14 aún no ha cerrado por completo.

Cabe mencionar que las heridas en el dorso de la rata cierran por contracción en los primeros días, por lo cual es fácil medir su contorno y cuantificar su contracción; sin embargo, debido al proceso de re-epitalización es complicado cuantificar su progreso mediante fotografías convencionales. Por esta razón, se realizaron histogramas o imágenes 3D (ver figura 5.2), a partir de las fotografías de la figura 5.1. Los histogramas fueron obtenidos, descomponiendo la fotografía convencional en sus tres colores primarios (rojo, verde y azul), obteniendo así tres imágenes. La imagen en rojo, fue posteriormente seleccionada y convertida a escala de grises y posteriormente, se graficó la intensidad de cada pixel para obtener la imagen en 3D que nos ayuda a cuantificar la profundidad y tamaño de la herida.

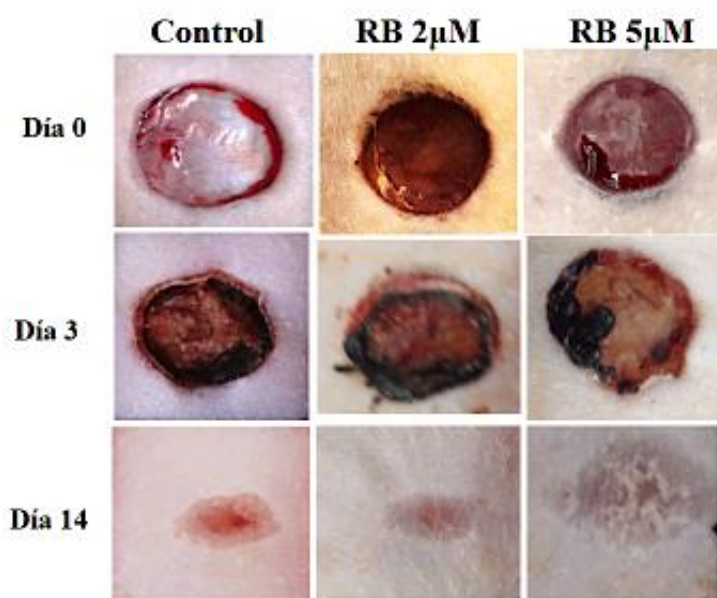


Figura 5.1: Fotografías convencionales representativas de los días 0, 3 y 14, mostrando las heridas y su evolución.

Cuando la herida está abierta o presenta una coloración rojiza (presencia de sangre o costra), la intensidad de los pixeles es menor en comparación con la intensidad de los pixeles a su alrededor (piel no dañada), observando así un pozo en la imagen 3D (observar herida RB 2 μ M en el día 0), conforme la herida se va reepitalizando, la intensidad de los pixeles dentro de la herida se van igualando con los del tejido circundante, ofreciendo información sobre el cierre de la herida. La figura 5.3, muestra una gráfica del porcentaje del área de la herida durante el proceso de cicatrización, adquirida a partir de las fotografías

convencionales. En el día 3, el porcentaje del área de la herida fue 74.83% (control), 98.55% (RB 2 μ M) y 66.21% (RB 5 μ M); en el día 14 el porcentaje del área de la herida fue de 4.42% (control), 2.89% (RB 2 μ M) y 2.56% (RB 5 μ M). Aunque la concentración molar de 5 μ M presenta ligeramente una mayor contracción, los porcentajes son muy parecidos en los tres grupos y no hay diferencias estadísticamente significativas, por lo que podría deducirse que el colorante por si solo no tiene un efecto considerable en la regeneración del tejido.

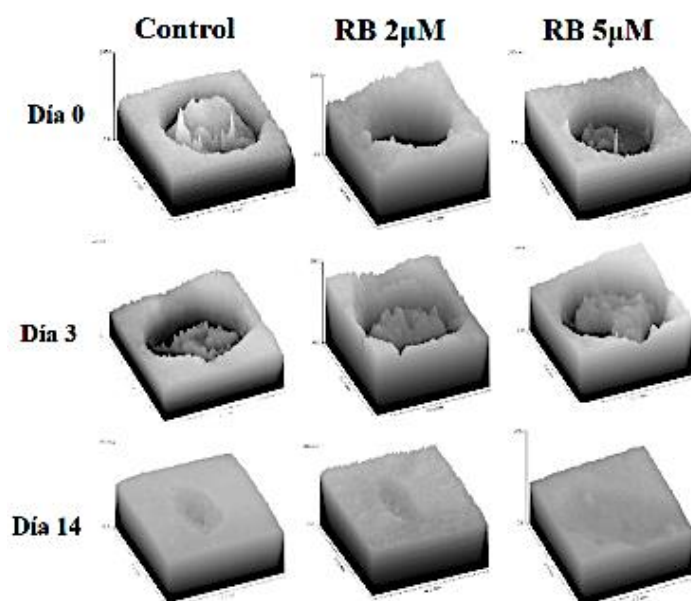


Figura 5.2: Imágenes 3D obtenidas a partir de las fotografías convencionales al día 0, 3 y 14, ofreciendo información sobre el cierre de la herida.

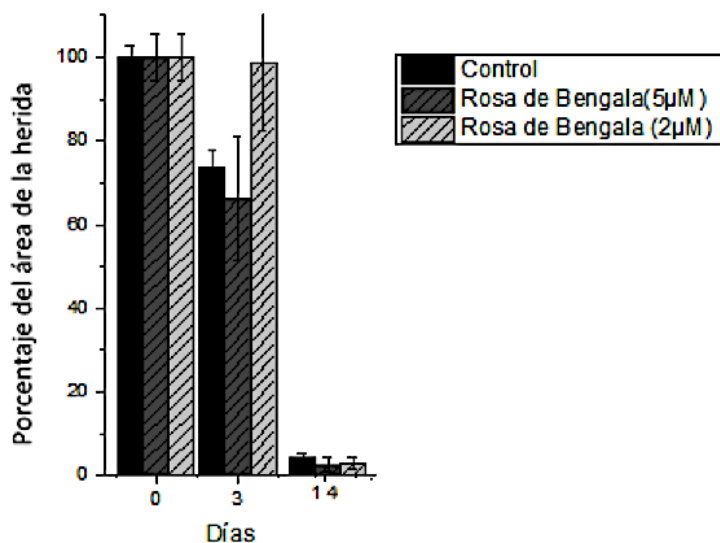


Figura 5.3: Gráfica de área de las heridas obtenida de las fotografías convencionales.

Todas las heridas fueron normalizadas al 100% en el día 0.

5.1.2 Interacción Luz-Tejido (fototerapia)

Para que la luz produzca algún efecto sobre el tejido, es necesario que ocurra la absorción de radiación y son las moléculas fotorreceptoras las que desencadenan todo un conjunto de respuestas celulares implicadas en estos fenómenos tisulares. Aunque algunos de los efectos terapéuticos de la luz están reportados (Karu, 2004), aún no están claros los mecanismos a nivel celular y molecular, mediante el cual se produce la acción terapéutica y cuáles son los parámetros óptimos de la luz que se deben de emplear para cada aplicación clínica. Debido a lo anterior, en este proyecto de tesis se pretende evaluar el efecto de la luz verde ($\lambda=532$ nm) en la regeneración de tejido empleando dos densidades de energía diferentes [energía total por unidad de área que absorbe la superficie de la piel (J/cm^2)]. Para este estudio piloto, se eligieron densidades de energía bajas ($2 \text{ J}/\text{cm}^2$) y ($8 \text{ J}/\text{cm}^2$), las cuales se obtienen a partir de la potencia del dispositivo LED utilizado (43mW) y del tiempo de irradiación de la herida. Cabe mencionar, que la cantidad de luz absorbida puede variar, debido a el tipo de piel y la zona tratada.

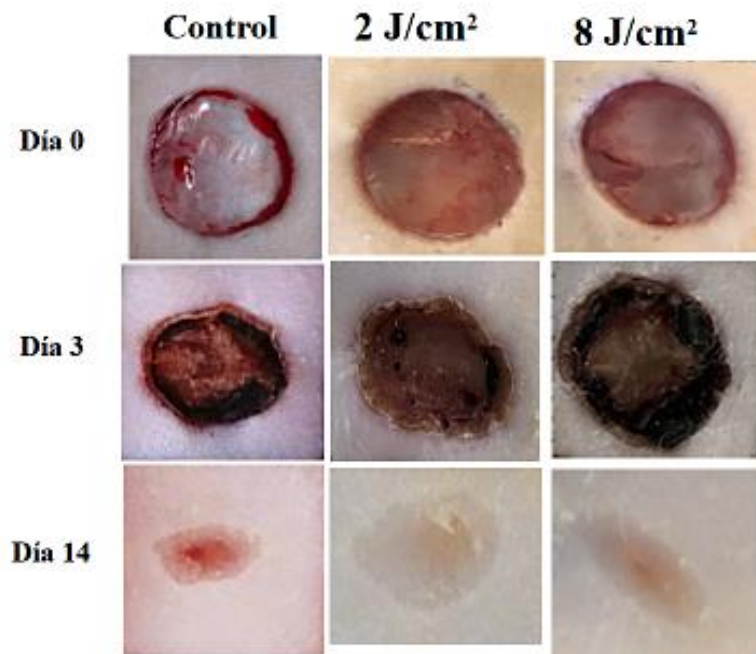


Figura 5.4: Fotografías convencionales representativas de los días 0, 3 y 14, mostrando las heridas y su evolución.

La figura 5.4, muestra la matriz de fotografías convencionales de ambos grupos (Control y fototerapia). En esta figura se puede observar que en el día 14, las heridas tratadas con fototerapia muestran una mejor cicatrización que la herida del grupo control. Debido a que cuando la luz incide sobre la herida, una parte de la luz se refleja y otra se refracta y penetra el tejido. Dentro del tejido, ciertos cromóforos absorben parte de la luz a la longitud de onda de operación y la energía de los fotones absorbidos es convertida en energía química (conservación de la energía), lo anterior, modifica al cromóforo de forma transitoria o permanente y este hecho activa todos los procesos fotobiológicos inherentes a la fototerapia.

En la literatura, es posible encontrar algunos cromóforos que absorben fuertemente la luz a una longitud de onda de alrededor de $\lambda=550\text{nm}$ (color verde) (Jiménez & Merchant., 2003), por ejemplo, podemos mencionar al citocromo b y c. Dichos cromóforos, pueden absorber energía a esta longitud de onda, por lo cual, se podría deducir que juegan un gran papel en el proceso de cicatrización en nuestros experimentos, debido a que los cromóforos están involucrados en la transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial (NC-IUB, 1992). Nuevamente, a partir de la figura 5.4 se obtuvieron las imágenes 3D o histogramas.

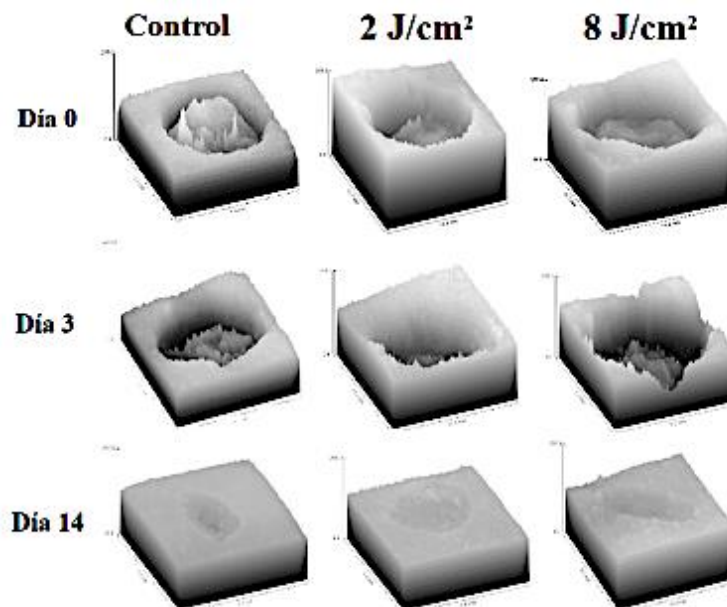


Figura 5.5: Imágenes 3D obtenidas a partir de las fotografías convencionales los días 0, 3 y 14, ofreciendo información sobre el cierre de las heridas.

En la figura 5.5, se puede observar que en el día 14, las heridas tratadas con luz verde muestran una superficie más uniforme que la herida del grupo control. Aunque la superficie de la herida es similar en los histogramas para ambas densidades de energía, el área de la herida es ligeramente menor para una densidad de energía de 8 J/cm^2 , lo cual se muestra en la gráfica de la figura 5.6. Esta gráfica, muestra el porcentaje del área de la herida durante el proceso de cicatrización para el grupo control y fototerapia, adquirida a partir de las fotografías convencionales. En el día 0, las heridas fueron nuevamente normalizadas al 100% (herida completamente abierta), en el día 3 la herida se redujo a un 74.83% para el grupo control, 67.39% empleando la fototerapia a 2 J/cm^2 y 74.41% para 8 J/cm^2 . En el día 14, las heridas tratadas con luz se redujeron 2.85% y 2.07% para 2 y 8 J/cm^2 , respectivamente, ligeramente menor que la herida del grupo control (4.42%), sugiriendo que la luz verde tiene un efecto en el positivo en el proceso de cicatrización.

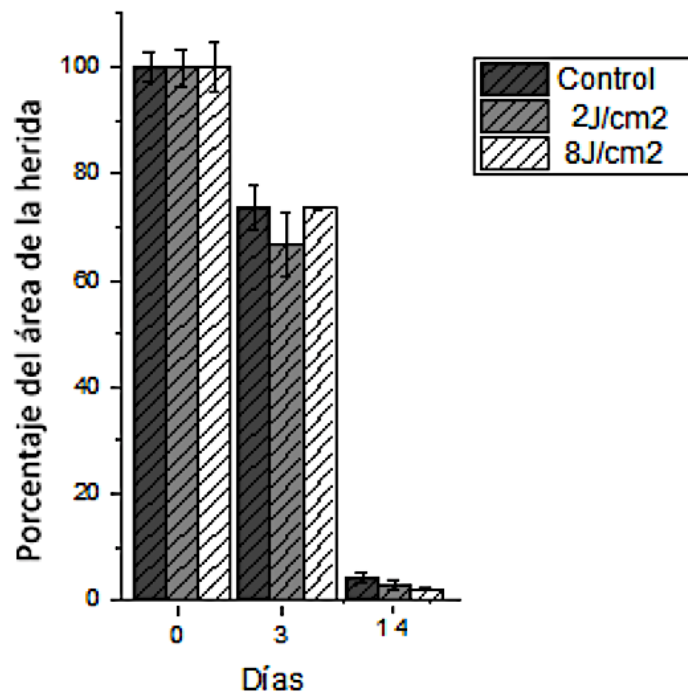


Figura 5.6: Gráfica del área de las heridas medida en las fotografías convencionales. Mostrando los promedios de los grupos de fototerapia comparados con el control y su desviación estándar.

5.1.3 Interacción Rosa de Bengala-luz-tejido (Terapia fotodinámica)

En esta sección se muestran las heridas tratadas con el fotosensibilizador Rosa de Bengala a las dos concentraciones molares utilizadas en la sección 5.1 (2 y 5 μM), el cual fue activado mediante la irradiación con luz verde a las dos densidades de energía empleadas en la sección 5.2. Las combinaciones entre las concentraciones del fotosensibilizador y las densidades de energía de la luz, fueron las siguientes: *i*) RB (2 μM)/2 J/cm^2 , *ii*) RB (2 μM)/8 J/cm^2 , *iii*) RB (5 μM)/2 J/cm^2 y *iv*) RB (5 μM)/8 J/cm^2 . En la figura 5.7, se muestran la evolución de la herida en los días 0, 3 y 14 para el grupo control y los cuatro grupos mencionados anteriormente.

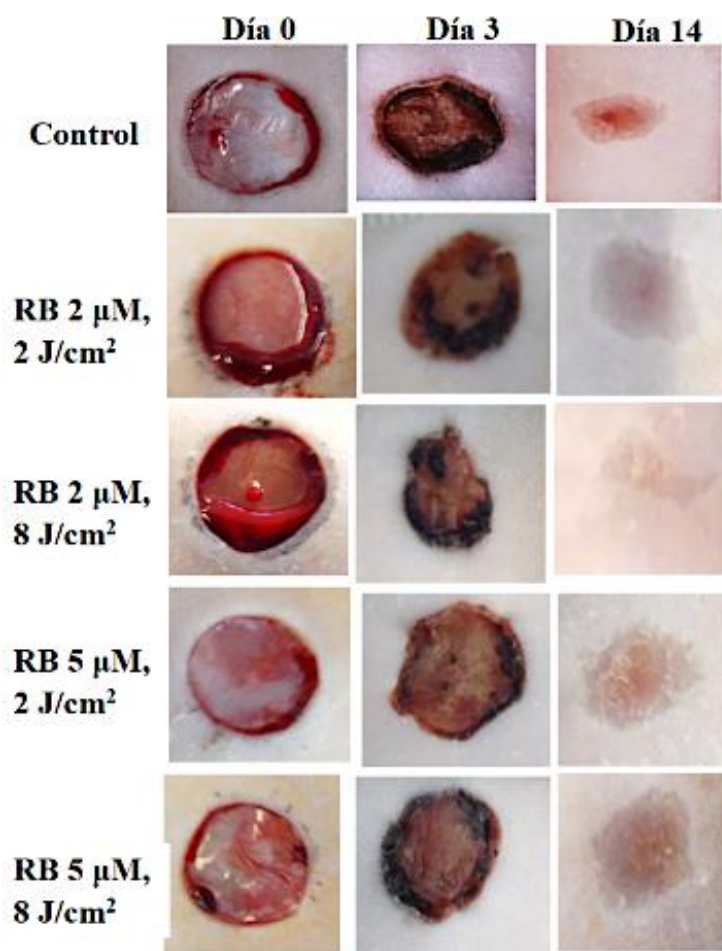


Figura 5.7: Fotografías convencionales representativas de los días 0, 3 y 14, mostrando las heridas y su evolución.

La figura 5.7, muestra la matriz de fotografías convencionales para los grupos mencionados anteriormente. En esta figura se puede observar nuevamente que al día 0, las heridas tienen la misma forma y aproximadamente el mismo tamaño (1 cm de diámetro); en el día 3, nuevamente parecen tener la misma velocidad de cicatrización a excepción del grupo RB (2 μ M)/8 J/cm². En el día 14, la herida del grupo control presenta una coloración ligeramente más rojiza en comparación con las heridas de los grupos RB (2 μ M)/2 J/cm² y RB (2 μ M)/8 J/cm². Aunque las heridas de los grupos RB (5 μ M)/2 J/cm² y RB (5 μ M)/8 J/cm² muestran una coloración aun rojiza, ésta es ligeramente menor que la coloración de la herida del grupo control.

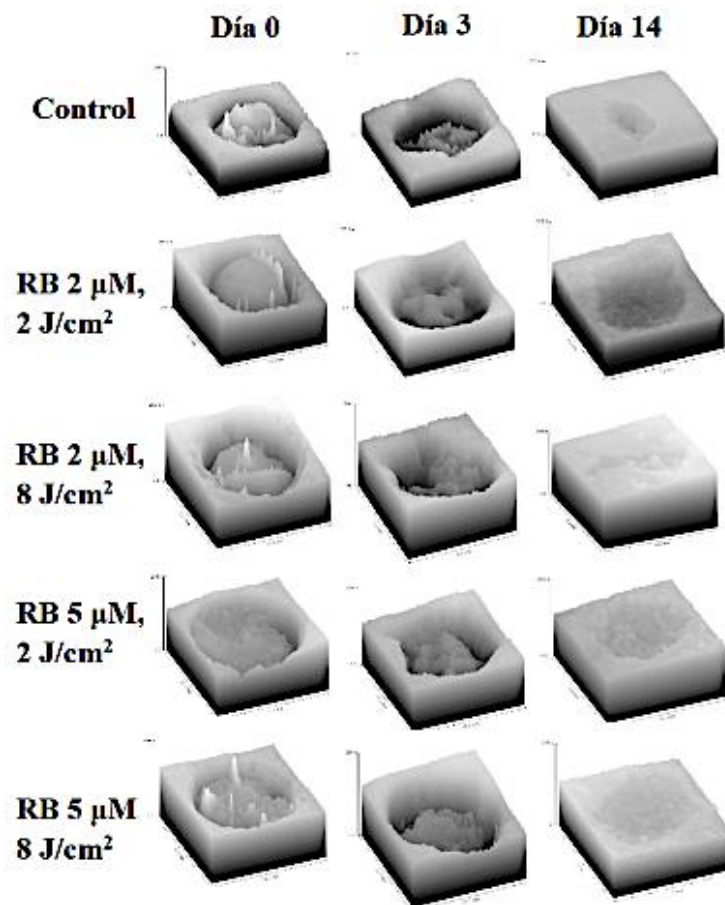


Figura 5.8: Histogramas de las fotografías convencionales al día 0, 3 y 14, que representan la epitelización.

La figura 5.8, muestra las imágenes en 3D de las heridas de los diferentes grupos en diferentes días (0, 3 y 14). Note que en el día 14, las heridas del grupo (2 μ M)/8 J/cm² y

(5 μ M)/8 J/cm² muestran una superficie ligeramente más homogénea con su entorno, en comparación con la superficie de las heridas de los otros grupos, sugiriendo que una dosis de energía de 8J/cm² tiene un mayor efecto en la regeneración del tejido, en comparación con dosis de 2J/cm². Posiblemente, las imágenes en 3D de las heridas no sean la mejor forma de evaluar el cierre de las mismas, esta técnica solo fue utilizada para obtener información sobre el proceso de reepitalización, que nos pudiera ayudar a seleccionar los parámetros óptimos para la fototerapia y PDT y, posteriormente analizar cambios estructurales en ambos grupos mediante análisis histológicos.

Por último, la figura 5.9 muestra el porcentaje del área de la herida durante el proceso de cicatrización para todos los grupos mencionados en esta sección grupo control y fototerapia, adquirida a partir de las fotografías convencionales. En el día 14, las heridas se redujeron a un 4.42% para el grupo control, 3.41% Rosa de Bengala (2 μ M)/2 J/cm², 0.33% Rosa de Bengala (2 μ M)/8 J/cm², 4.36% Rosa de Bengala (5 μ M)/2 J/cm², finalmente 5.14% Rosa de Bengala (5 μ M)/8 J/cm². Cabe mencionar, que tomando en cuenta la baja absorbancia del fotosensibilizador Rosa de Bengala a concentraciones molares bajas (ver figura 3.2, capítulo 3), se escogió la concentración de 5 μ M para los futuros experimentos, activadas con luz verde a una dosis óptica de 8 J/cm².

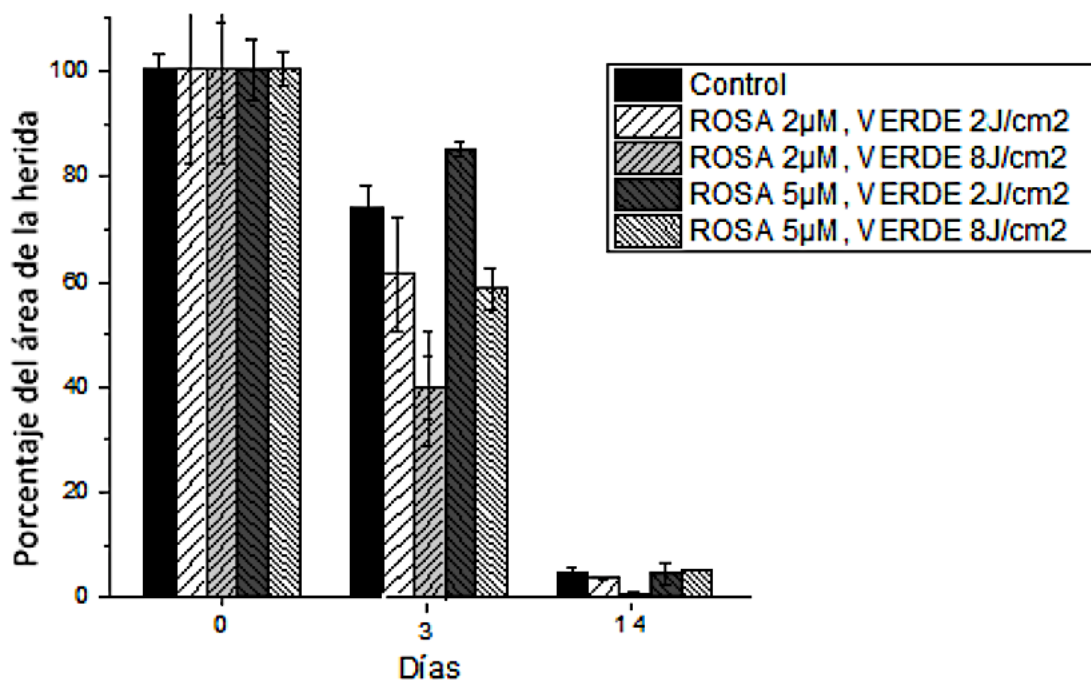


Figura 5.9: Gráfica del área de las heridas medida en las fotografías convencionales. Mostrando promedios de los grupos de terapia fotodinámica comparados con el control y su desviación estándar.

5.2 Resultados experimentales (segunda etapa)

En esta segunda etapa del proyecto, se presentan los resultados obtenidos en un estudio con un mayor número de organismos empleados en la fototerapia y terapia fotodinámica. La selección de los parámetros ópticos como la densidad de energía (8 J/cm^2), así como la concentración molar del fotosensibilizador Rosa de Bengala ($5\mu\text{M}$), fueron seleccionados a partir del estudio piloto. Cabe mencionar, que en este estudio los organismos de cada grupo fueron sacrificados a los días 3, 5, 7, 14 y 21, adquiriendo nuevamente imágenes convencionales en estos días para ampliar la ventana y tener así más argumentos sobre la efectividad y mecanismos de la fototerapia y terapia fotodinámica.

5.2.1 Fototerapia (8 J/cm^2)

En este proyecto de tesis un objetivo propuesto fue estudiar el efecto de la regeneración de tejido a través de la fototerapia utilizando luz verde (532nm), debido a que la mayoría de los estudios reportados emplean luz roja o infrarroja (Suzuki & Takakuda, 2016) (Diwan & Abid, 2016). Se ha reportado que la fototerapia a diferentes densidades de potencia estimula o inhibe una variedad de procesos celulares (Barolet, 2008), algunos de los cuales fueron mencionados en capítulos anteriores.

La figura 5.10, muestra la secuencia de fotografías convencionales adquiridas en los días claves antes mencionados, tanto para el grupo control como el grupo fototerapia. Para ambos grupos, en el día 0 se puede observar una herida cutánea aproximadamente de 1 cm de diámetro. En el día 3, se puede observar una herida con mejor coloración en el grupo de fototerapia en comparación con el grupo control. Para los días 5, 7, 14, la herida para el grupo fototerapia es ligeramente menor en área que el grupo control, lo anterior puede ser observado en la gráfica de la figura 5.11. En el día 21, se observa que la herida inducida en el grupo fototerapia casi no se nota (flecha negra en la fotografía convencional), es decir, la región de la herida es más parecida a la piel no dañada. La observación anterior puede ser comprobada haciendo uso nuevamente de las imágenes 3D mostradas en la parte derecha de la figura 5.10. Con base a la secuencia de fotos convencionales e imágenes 3D

adquiridas para ambos grupos, se podría decir que el uso de luz verde si tiene un efecto positivo en el proceso de cicatrización de las heridas en comparación con heridas no irradiadas (control).

En la figura 5.11, se muestra una gráfica de porcentaje de áreas de las heridas de cada grupo. Nuevamente, al día 0 se normalizan las heridas. Este estudio fue realizado con una n=10 heridas (2 por individuo) para el grupo control y para el grupo de fototerapia (5 animales por grupo). En el día 3 el área de la herida en el grupo control fue de 74.83%, mientras el grupo fototerapia fue de 58.76%; en el quinto día el área obtenida fue de 63.57% (control) y 46.38% (fototerapia); en el día 7, se obtuvo un área de 31.78% (control) y 26.06% (FT), para el día 14, 4.42% (control) y 3.58%(FT); finalmente en el día 21 el grupo control es de 2.90% y 0.73% (FT).

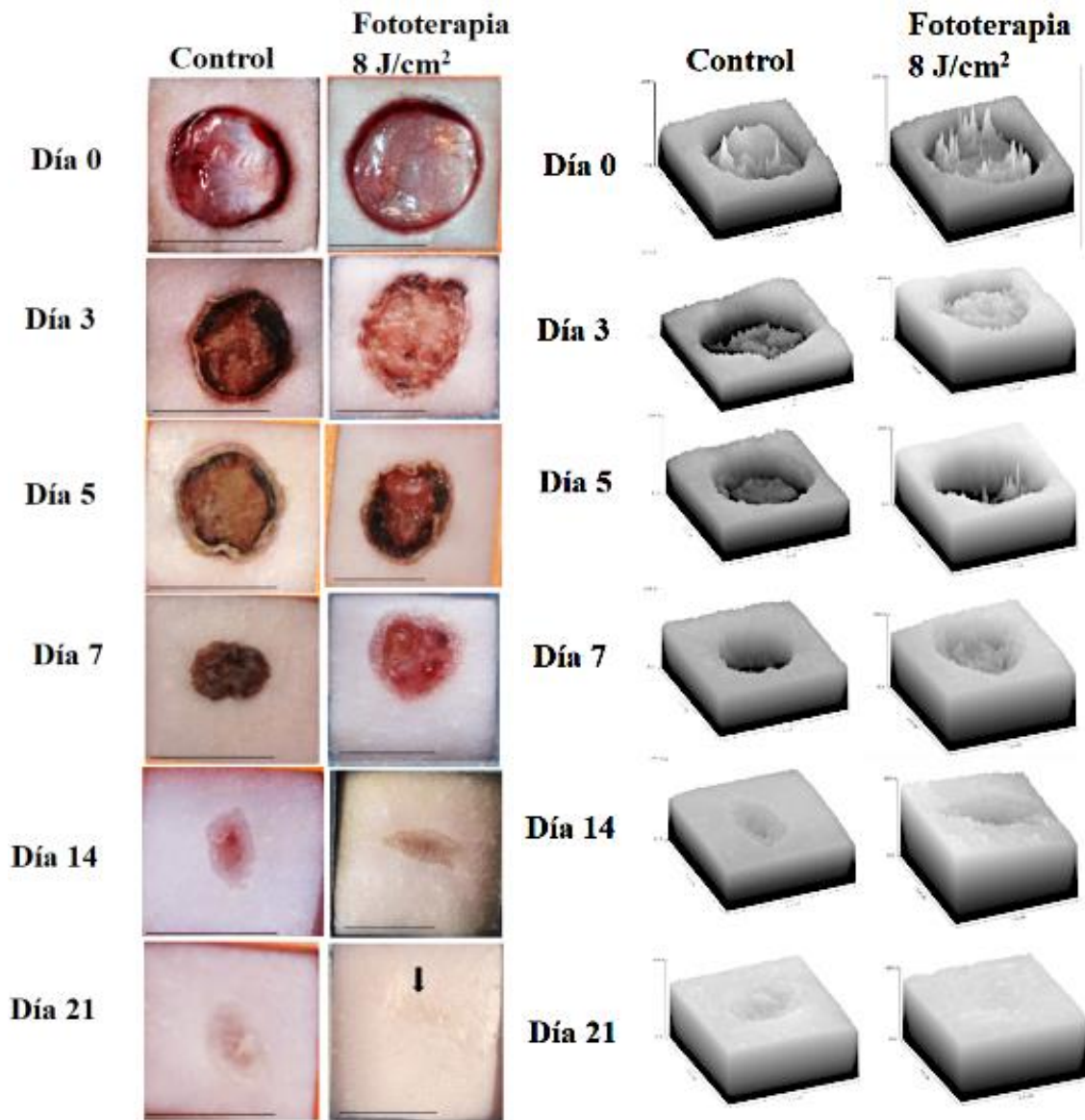


Figura 5.10: Imágenes a diferentes días del proceso de cicatrización para heridas irradiadas con luz verde (fototerapia) y heridas no irradiadas (grupo control). Imagen de la izquierda muestra fotografías convencionales representativas de los días 0, 3, 5, 7, 14 y 21 (la flecha indica el sitio de la herida y la línea es la escala de 1 cm). La imagen de la derecha, muestra los histogramas de las fotografías convencionales a los mismos días (imágenes en 3D de la herida).

Los resultados obtenidos se sometieron a la prueba estadística Anova de una vía con una $p \leq 0.05$, dicho análisis de la varianza permite determinar si diferentes tratamientos muestran

diferencias significativas, obteniendo así, que el día 7 presenta la mayor diferencia estadística significativa para el grupo fototerapia, respecto al grupo control.

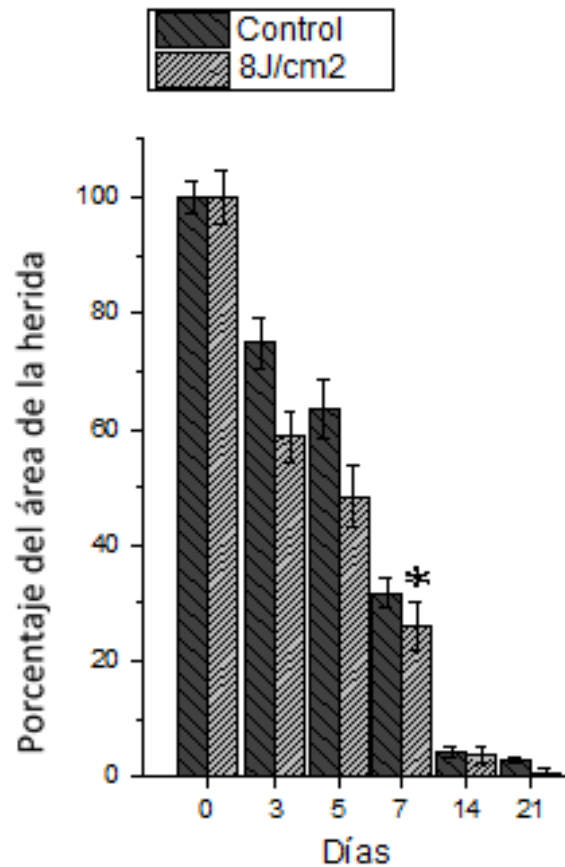


Figura 5.11: Gráfica del área de las heridas obtenida de las fotografías convencionales. El 100% representa una herida abierta al día 0 y cómo va disminuyendo el área para los días 3, 5, 7, 14 y 21. El asterisco se refiere a una $p \leq 0.05$ en Anova y las barras de error representan la desviación estándar.

5.2.2 Terapia fotodinámica (RB $5\mu\text{M}$, 8 J/cm^2)

En esta sección, se muestran los resultados obtenidos de la terapia fotodinámica (PDT), la cual fue empleada para tratar de acelerar el proceso de cicatrización de heridas cutáneas. En la figura 5.12, se muestran fotografías convencionales adquiridas tanto del grupo control como de terapia fotodinámica (RB $5\mu\text{M}/8\text{ J/cm}^2$), en las cuales es posible observar que la herida del grupo de PDT tiene un cierre más rápido que la herida del grupo control. En el día 7 del proceso de cicatrización, se empieza a observar una evidente reducción de la

herida tratada con PDT, respecto al control. En el día 14, la herida del grupo control aún está abierta, mientras que la herida tratada con PDT muestra mayor contracción. Finalmente, en el día 21, la herida tratada presenta una coloración parecida a la piel sin herida. La figura 5.12 muestra las imágenes en 3D, en donde es posible observar que efectivamente en el día 7, la herida tratada tiene una mayor reducción de área y menor profundidad. Los resultados obtenidos en esta sección, sugieren que posiblemente la combinación del fotosensibilizador Rosa de Bengala, activado con luz verde tiene un mayor efecto en la regeneración de tejido, que si se utiliza la luz verde o el fotosensibilizador de manera independiente. Los resultados anteriormente mostrados posiblemente se deben a que en la PDT, la luz verde activa tanto a fotosensibilizadores endógenos (cromóforos) como exógenos (Rosa de Bengala).

La figura 5.13 muestra la gráfica del área de las heridas (en porcentaje) para el grupo control y el grupo de terapia fotodinámica (RB (5 μ M)/8 J/cm²). Nuevamente, en el día cero todas las heridas fueron normalizadas al 100%; en el día 3, se obtuvo un porcentaje de 75% (control) y 74% (PDT) siendo casi el mismo valor, lo cual sucede también para el día 5 donde se observa un área de la herida de 64% (control) y 61%(PDT). Sin embargo, en el día 7 la herida tratada tiene un porcentaje de 20% en comparación con el 32% en el control. Para el día 14, las heridas alcanzaron un 5% control y ~1% PDT, aquí es importante resaltar que aunque la diferencia entre porcentajes es del 4%, la herida tratada presenta signos de una mejor reepitalización. Finalmente, en el día 21 el grupo control fue de 3% y el de terapia fotodinámica de 0% (en este caso fue difícil medir el porcentaje del área de la herida debido a la coloración de la misma). Los resultados anteriores se sometieron a la prueba Anova de un factor con una $p \leq 0.05$, comparando el grupo de terapia fotodinámica con el grupo control y diferencia significativa en el día 7.

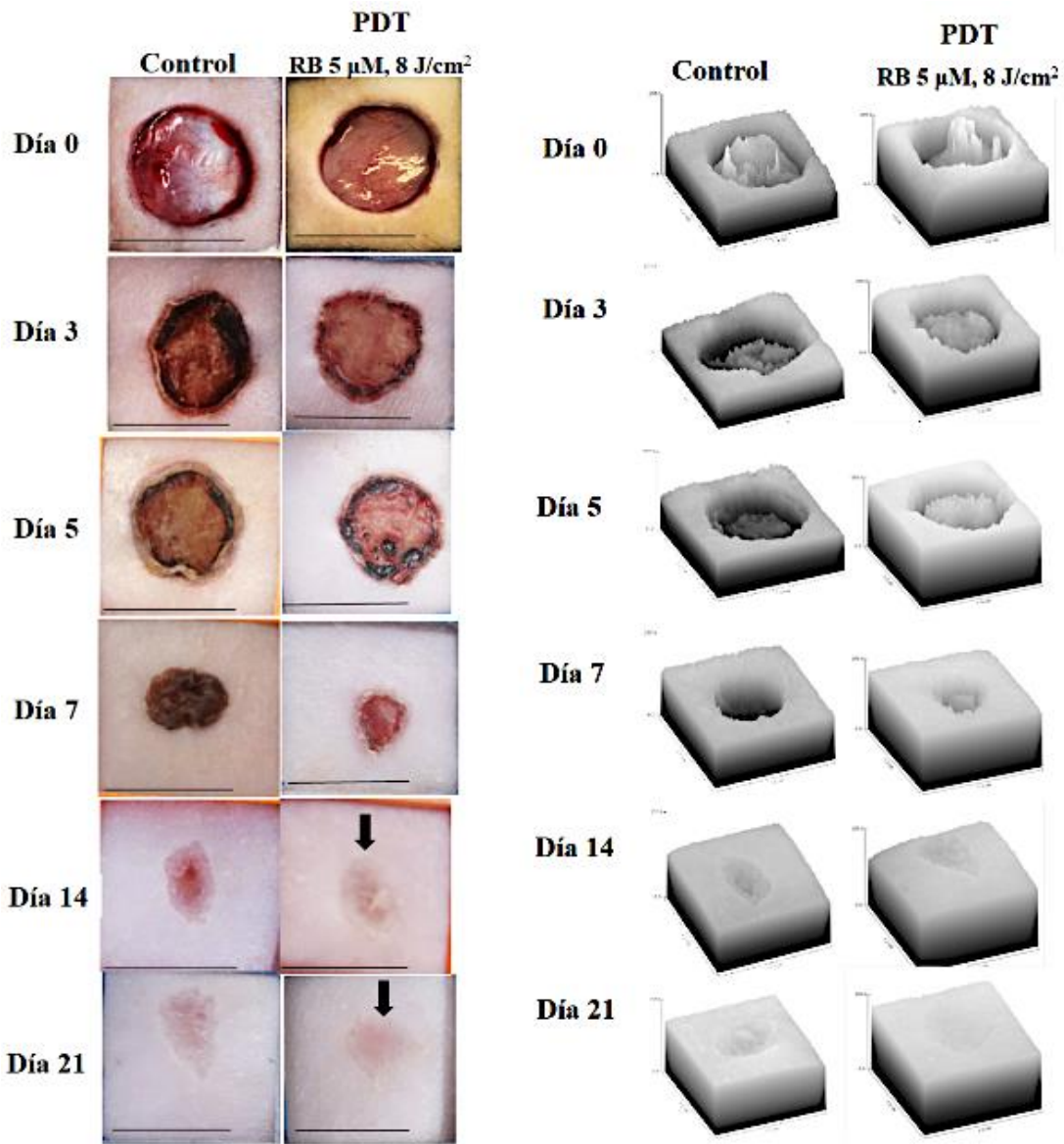


Figura 5.12: Imagen izquierda muestra las fotografías convencionales representativas de los días 0, 3, 5, 7, 14 y 21, mostrando la herida realizada y su evolución (la flecha indica el sitio de la herida y la línea es la escala de 1 cm). La imagen de la derecha muestra los histogramas en 3D de cada respectiva herida.

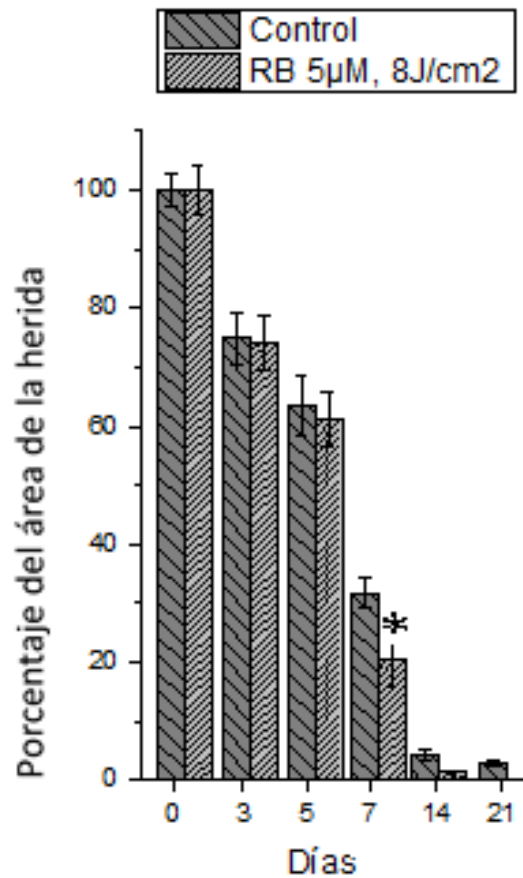


Figura 5.13: Gráfica del área de las heridas obtenida a partir de las fotografías convencionales de la figura 5.12. El asterisco representa una $p \leq 0.05$ en Anova.

5.2.3 Resultados histológicos

Determinar la velocidad de cicatrización es un aspecto importante en el cuidado clínico de las heridas, no obstante, sigue siendo la estimación visual la manera más común de evaluar la cicatrización (Wang, Ortega-Martinez, & Padilla-Martinez, 2017). Por ejemplo, en el 2018 Nesi Reis y colaboradores reportan que la mayoría de estudios de Terapia Fotodinámica miden sus resultados por medio de examen clínico y fotografías digitales (Nesi-Reis & et-al, 2018) y, con base a esos resultados proponen hipótesis de mecanismos (que dependen de las variables ópticas, del colorante y el modelo utilizado). Sin embargo, también hay estudios donde emplean técnicas histológicas para estudiar los mecanismos de acción (Peplow, Chung, & Baxter, 2012).

En este trabajo de tesis, además de obtener fotografías convencionales del proceso de cicatrización, también se realizaron cortes histológicos de la región donde se indujo la herida, la cual fue procesada hasta teñirla con la técnica H&E (Hematoxilina y Eosina), con el objetivo de analizarlas mediante el uso de un microscopio óptico. A continuación, se presentan las imágenes histológicas.

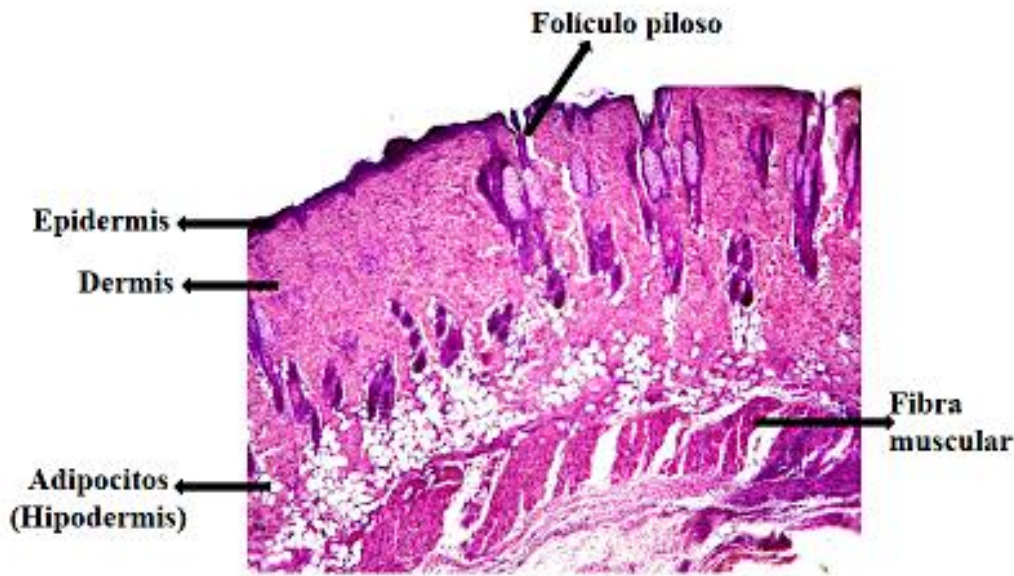


Figura 5.14: Corte histológico (20 μm de grosor) de piel de rata alopécica sin herida, teñida con H&E.

En la figura 5.14, se muestra una imagen de un corte histológico teñido con H&E de la piel de rata alopécica sin herida, resaltando que esta biopsia de piel fue adquirida en el dorso de la rata, es decir, en la misma región donde las heridas cutáneas fueron realizadas en los otros grupos experimentales. Lo anterior es importante debido a que el grosor de la piel depende de las variables de un individuo a otro, del sitio corporal, la edad y el género (Everall, 1973).

La epidermis es la capa más externa de la piel, funciona como barrera y principalmente está constituida de queratinocitos, también alberga melanocitos y células dendríticas, las capas de esta son estrato corneo, granuloso, espinoso y basal (Menon, 2015), en la fotografía 5.14 se aprecia como un borde morado, la cual delimita a la piel del espacio en blanco.

Inmediatamente debajo de la epidermis se encuentra la dermis, que funciona como protección contra traumatismos y nutre a la epidermis. El contenido celular de la dermis consiste en mastocitos, fibroblastos y macrófagos y la principal proteína contenida es el colágeno (Ankush Gosain, 2004). Además, contiene folículos pilosos con sus músculos erectores y glándulas sebáceas. Cabe mencionar, que se observan muy pocos folículos pilosos, debido a las características del organismo, es decir, la rata alopecica utilizada en esta tesis tenía algunos pelitos pero eran escasos, poseía poca densidad de pelo.

Debajo de la dermis está la hipodermis, una capa de tejido conectivo laxo que une la piel a los órganos internos. Esta capa contiene grasa subcutánea y tejido, proporcionando amortiguación, termorregulación y estabilidad de la piel mediante la conexión dermis a los órganos internos. (Miranda A. Farage, 2008). En la fotografía 5.14, se señalan a los adipocitos que se encuentran en la hipodermis. El músculo se encuentra rodeado por la fascia, la cual se encuentra por debajo de la dermis, siendo justo aquí hasta donde se realizó la herida quirúrgica cutánea en la piel de la rata. En la figura 5.14, se observa además de las capas de la piel una porción muscular.

Los siguientes cortes histológicos, fueron teñidos con H&E (hematoxilina-eosina) y se tomaron fotografías con el objetivo 5X.

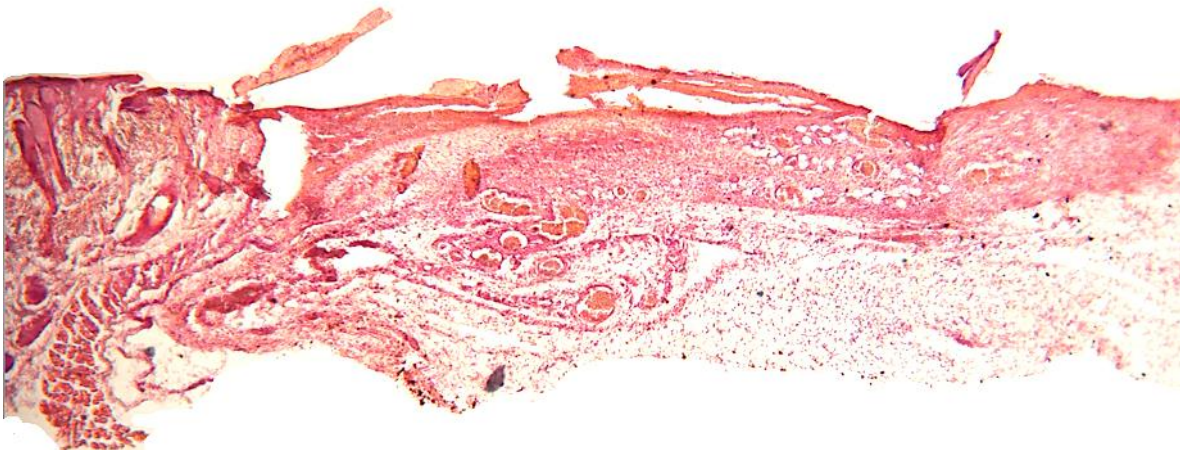
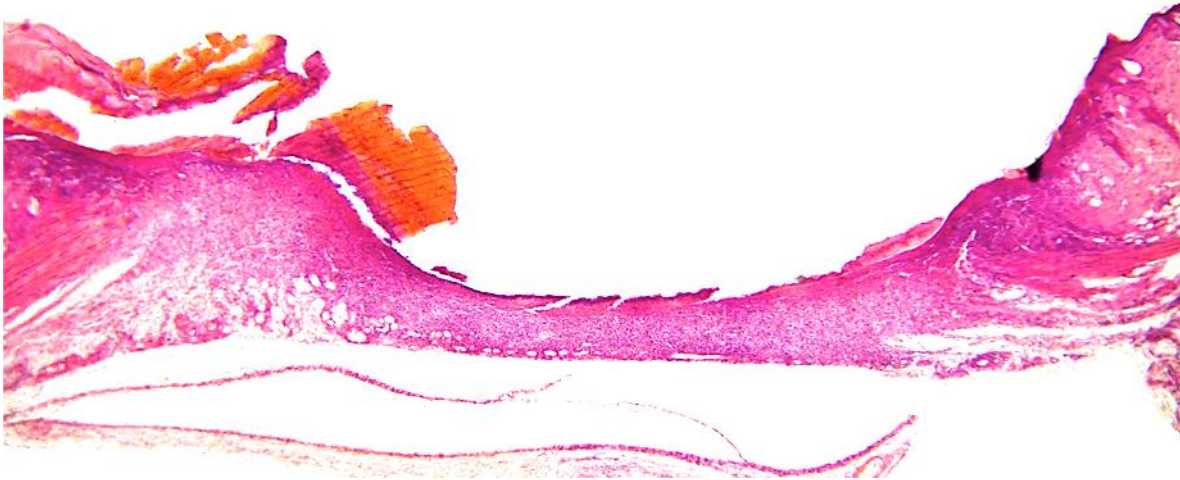


Figura 5.15: Grupo Control (Día 3).



5.16: Grupo Fototerapia (Día 3)



Figura 5.17: Grupo Terapia Fotodinámica (Día 3).

En la figura 5.15 que corresponde al grupo control, se observa la presencia de la costra, ya hay aparición de tejido conectivo laxo, la dermis se observa pequeña aunque ya logra distinguirse, se observa también infiltrado celular inflamatorio. Mientras que en la figura 5.16 que se refiere a fototerapia la dermis se muestra delgada comparada con el control, respecto a la epidermis en la parte superior izquierda se observa una porción gruesa de ella, es decir un agregado de queratinocitos. En este sentido, la figura 5.17 que pertenece al grupo de terapia fotodinámica se muestra una epidermis sumamente robusta, comparada con el control y la fototerapia, así mismo en esta figura se identifican ya las capas

epidermis, dermis, e hipodermis, recalcando un mayor grosor de la dermis y más vasos sanguíneos formados respecto a las figuras 5.16 y 5.15.

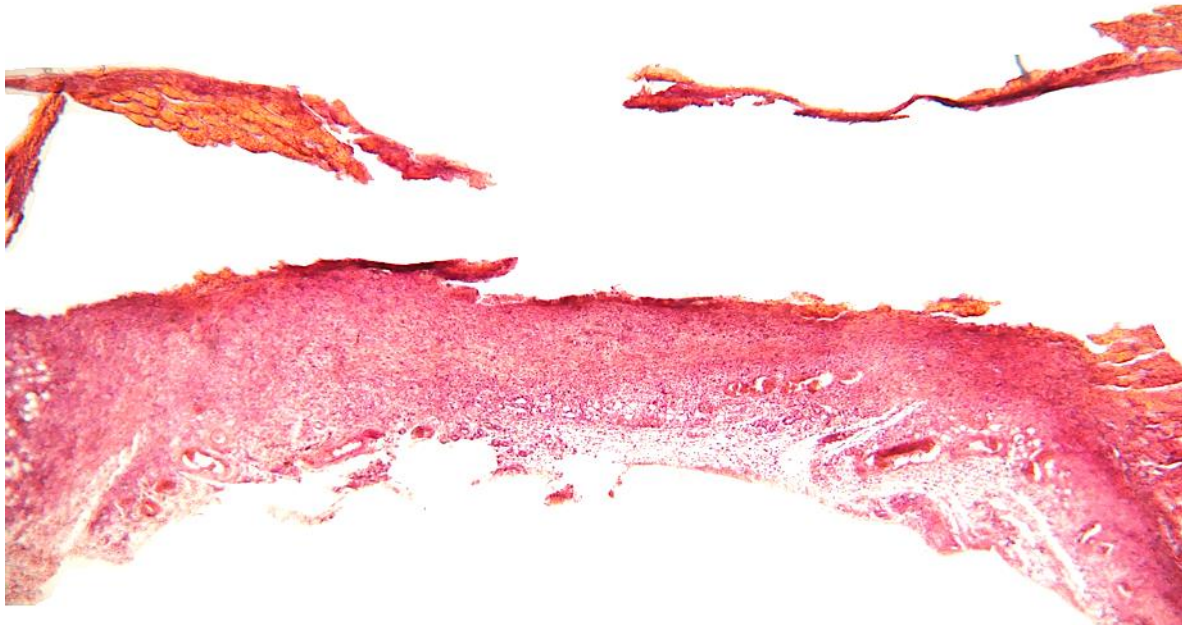


Figura 5.18: Grupo Control (Día 5).

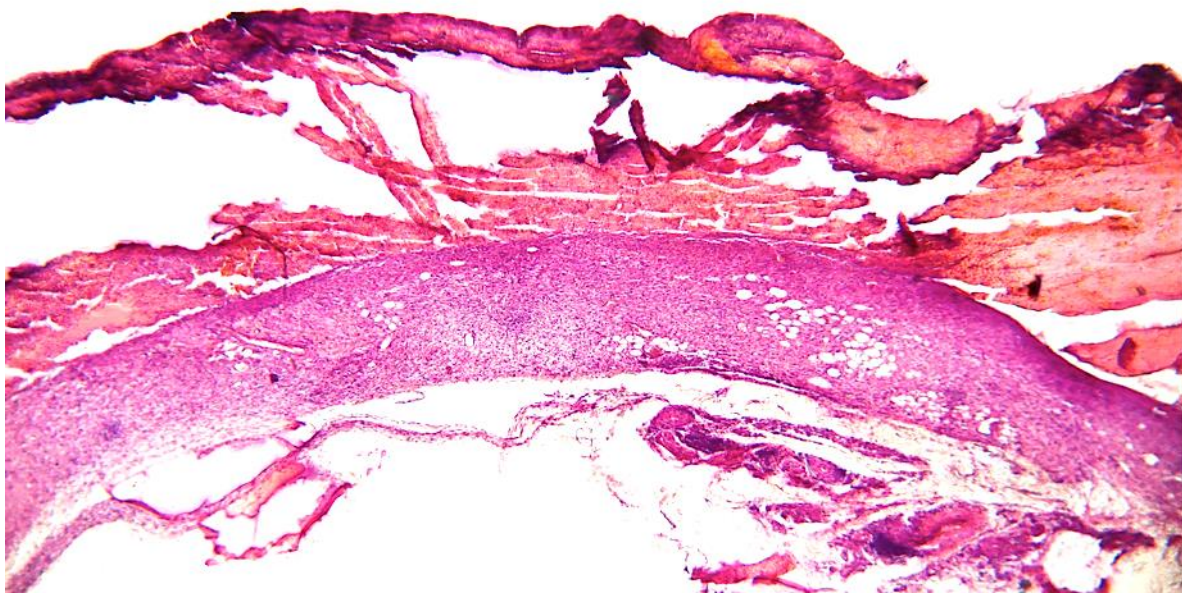


Figura 5.19: Grupo Fototerapia (Día 5)

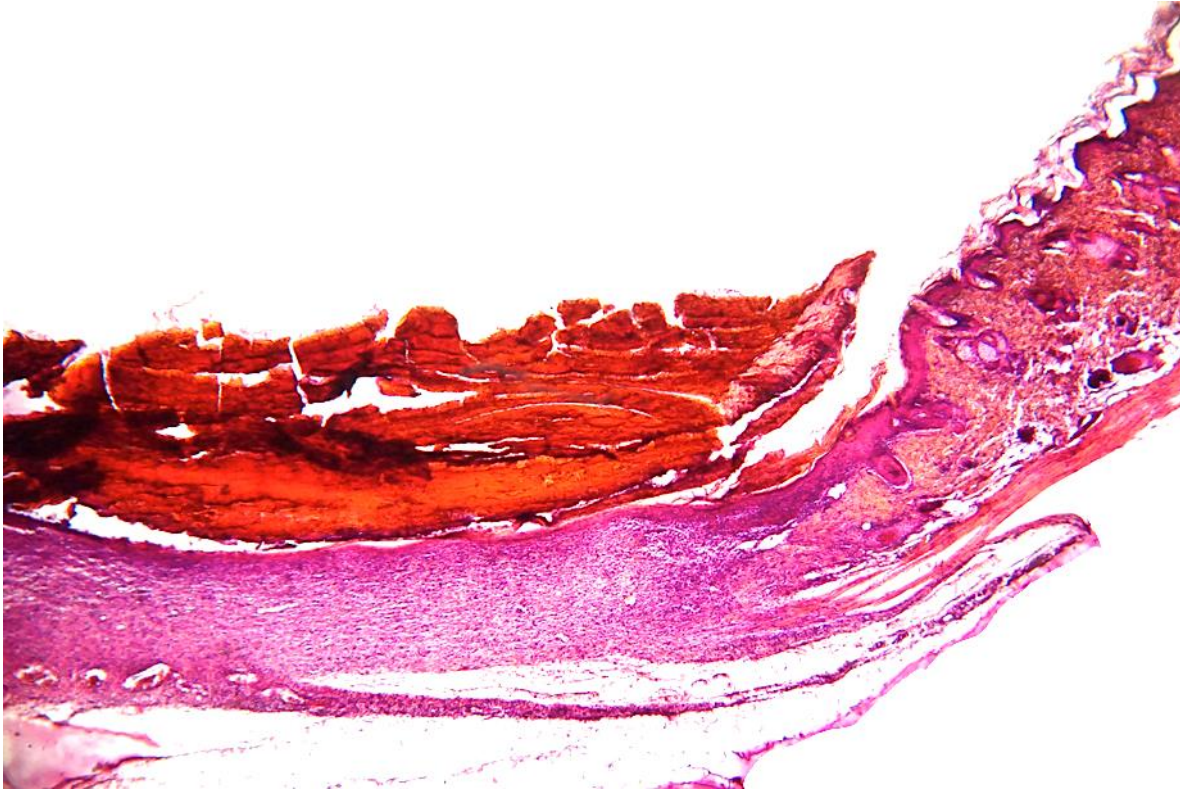


Figura 5.20: Grupo Terapia Fotodinámica (Día 5).

En la figura 5.18 no se logra observar la epidermis, la dermis se muestra delgada y sigue habiendo migración de neutrófilos, que nos indica que sigue habiendo infiltrado inflamatorio, en cambio en la figura 5.19 que es de fototerapia hay un agregado de queratinocitos y se define mejor la epidermis, la dermis se ve un poco más delgada en comparación que la figura 5.18 y se va realizando angiogénesis. Por otra parte, la figura 5.20 que corresponde a terapia fotodinámica ya está muy bien formada la epidermis, y se observa además una gran capa de queratinocitos, hay neovascularización, además de una dermis bien lograda, comparada con las figuras 5.18 y 5.19.

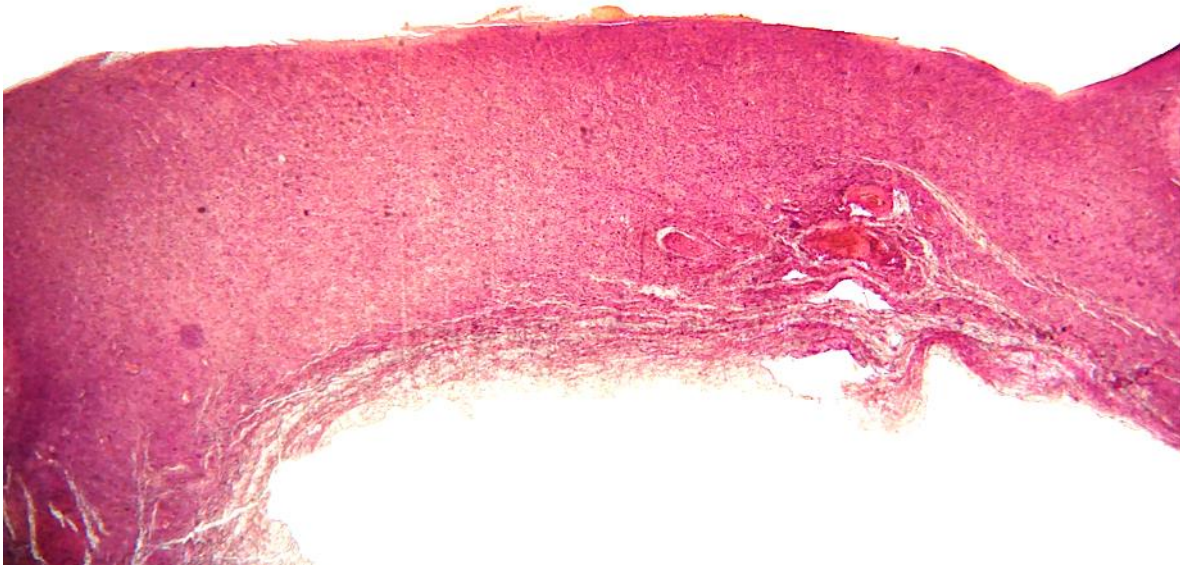


Figura 5.21: Grupo Control (Día 7).

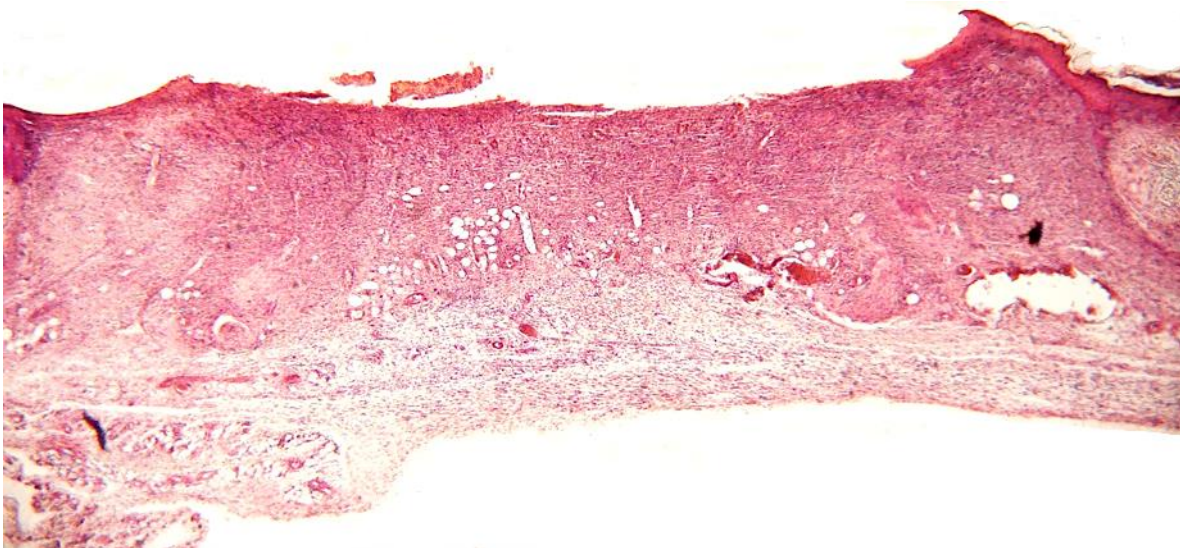


Figura 5.22: Grupo Fototerapia (Día 7).

En las figuras 5.21 y 5.22 no se aprecia la epidermis, sin embargo, la herida tratada con fototerapia, muestra la aparición de adipocitos y en la histología del control eso no se observa.

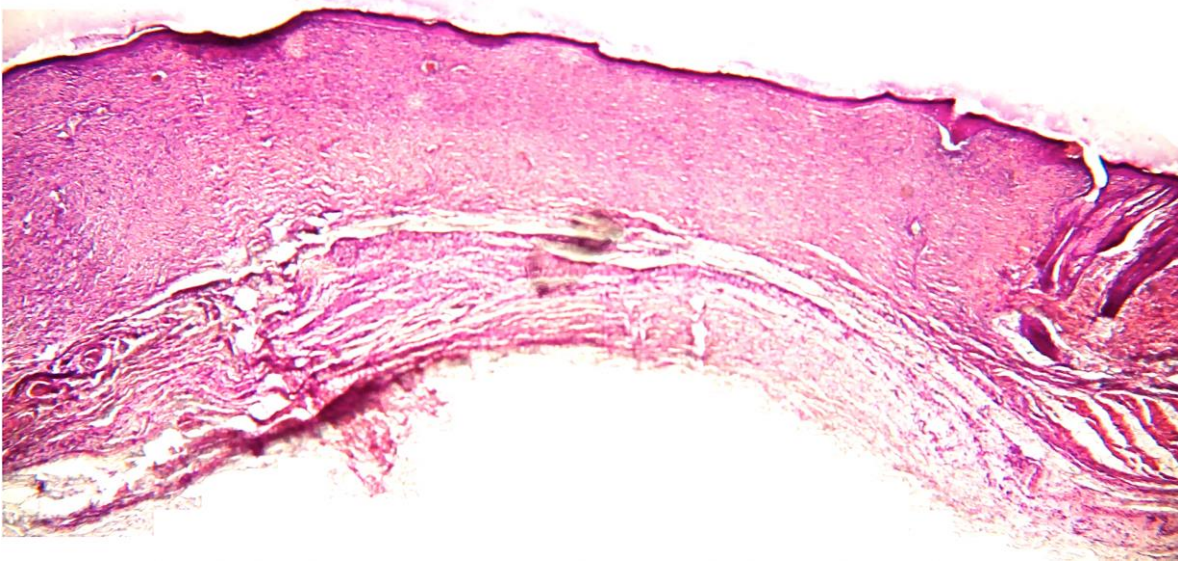


Figura 5.23: Grupo Control (Día 14).

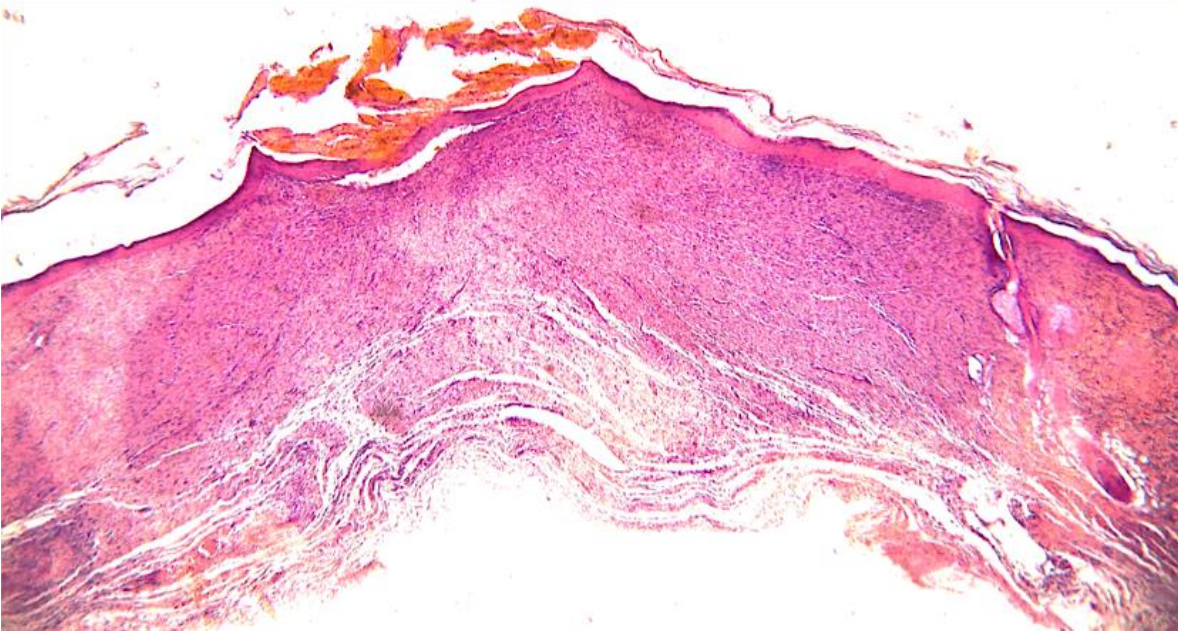


Figura 5.24: Grupo Fototerapia (Día 14).

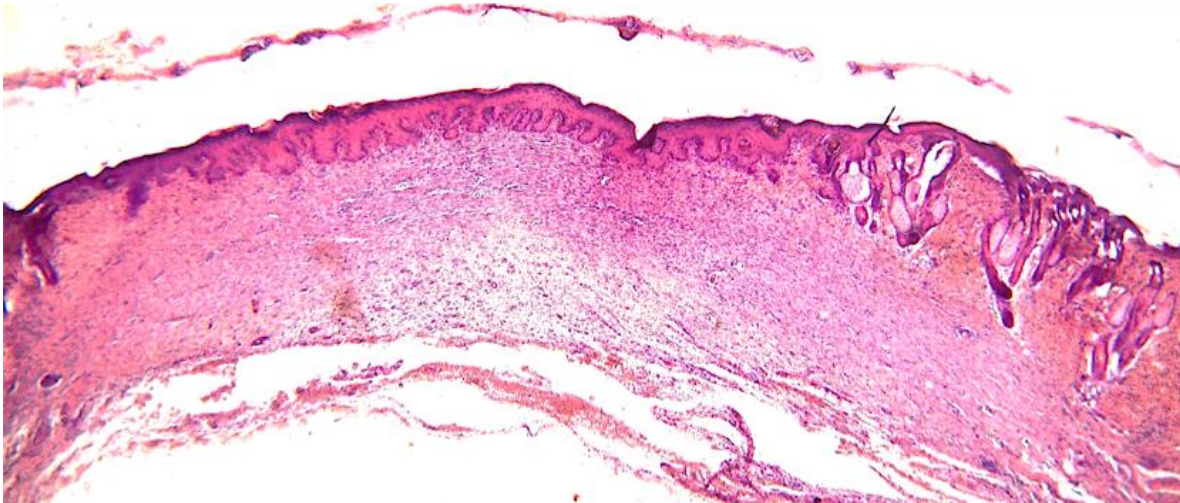


Figura 5.25: Grupo Terapia Fotodinámica (Día 14).

En la figura 5.23 la epidermis está sumamente delgada, y aunque ya está formada la dermis e hipodermis falta madurar esas capas, pues aún se ve migración celular y el folículo piloso no está terminado, por su parte la figura 5.24 está más desarrollada que la figura 5.23 considerando su epidermis más gruesa con una gran capa de queratinocitos, presencia de adipocitos y una dermis gruesa respecto a la figura 5.23. Por último, en la figura 5.25 la epidermis está muy bien definida, las dermis más gruesa que las figuras anteriores, hay varios folículos pilosos asociados a sus glándulas y vasos de novo y también se observa la hipodermis.

5.3 Referencias

- Ankush Gosain, L. A. (2004). Aging and Wound Healing. *world journal of surgery*, 321-326.
- Babilas, Landthaler, & Szeimies. (2006). Photodynamic therapy in dermatology. *Eur J Dermatol*, 340-348.
- Barolet, D. (2008). Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 227-238.
- Chung, Dai, & Sharma, H. Y. (2012). The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Annals of Biomedical Engineering*, 516–533.
- Diwan, M. F., & Abid, T. A. (2016). The effect of different doses of 660 nm laser therapy on open skin wound healing in Wistar rats. *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences* , 130-137.

- Everall, J. W. (1973). The thickness of the epidermis. *British Journal of Dermatology*, 467-476.
- Fornias Sperandio, A. S. (2010). Photodynamic Therapy Mediated by Methylene Blue Dye in Wound Healing. *Photomedicine and Laser Surgery*, 581-587.
- Jiménez, G., & Merchant., L. (2003). *Biología celular y molecular*. México: Pearson Educación.
- Karu, P. L. (2004). Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *The Royal Society of Chemistry and Owner Societies*, 211-216.
- Menon, G. K. (2015). Skin Basics; Structure and Function . *Springer*, 9-18.
- Miranda A. Farage, K. W. (2008). Structural Characteristics of the Aging Skin: A Review. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 343-357.
- NC-IUB, N. C.-I. (1992). Nomenclature of electron-transfer protein. *Journal of Biological Chemistry*, 665-677.
- Nesi-Reis, V., & et-al. (2018). Contribution of Photodynamic Therapy in Wound Healing : A Systematic Review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 294-305.
- Peplow, P., Chung, T.-Y., & Baxter, D. (2012). Photodynamic Modulation of Wound Healing: A Review of Human and Animal Studies. *Photomedicine and Laser Surgery*, 118-148.
- Suzuki, & Takakuda. (2016). Wound healing efficacy of a 660-nm diode laser in a rat incisional wound model. *Lasers in Medical Science*, 1683-1689.
- Thierry Patrice, J. M. (2003). An outline of the hundred-year history of PDT. En H. a. Kostron, *Photodynamic Therapy* (págs. 1 - 18). "The Royal Society of Chemistry.
- Wang, Y., Ortega-Martinez, A., & Padilla-Martinez. (2017). "In vivo assessment of wound re-epithelialization by UV fluorescence excitation imaging ". *Proc. SPIE*, 10037.

Capítulo 6

Discusión y conclusión de resultados

En los resultados de los experimentos realizados utilizando el fotosensibilizador Rosa de Bengala a 2 y 5 μM no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la reducción del tamaño de las heridas, lo cual sugiere que el fotosensibilizador por sí solo no estimula la proliferación y diferenciación celular. Con base en el análisis de reducción de área empleando imágenes convencionales y 3D se encontró que las heridas que recibieron fototerapia y terapia fotodinámica mostraron una significativa reducción en el área de la herida a partir del día 7 en comparación con el grupo control ($P \leq 0.05$).

En las heridas irradiadas con una dosis de energía de $8\text{J}/\text{cm}^2$ se observó una cicatrización más evidente que en las heridas irradiadas a la dosis de energía de $2\text{J}/\text{cm}^2$. Cabe señalar que las dosis empleadas en este proyecto de tesis son de muy baja densidad de energía en comparación con las dosis encontradas en la literatura (Nesi-Reis, 2018). Es importante destacar que el uso de luz verde (532nm), ha sido poco estudiado en tratamientos para la regeneración de tejidos, siendo la luz roja e infrarroja las más reportadas para este propósito.

El hecho de observar engrosamiento y mejor diferenciación de la epidermis en las heridas tratadas con terapia fotodinámica se debe probablemente a la profundidad de penetración que tiene la luz verde en el tejido, esta luz tiene menor longitud de onda (mayor energía del fotón) que la luz roja por lo que su interacción con el tejido es más superficial (hasta la epidermis), y su efecto no impacta las capas más profundas de la piel, ya que el nivel de diferenciación de la dermis y la hipodermis fue similar en todos los grupos. La terapia fotodinámica potencializa la señalización celular mediante la formación de Especies Reactivas de Oxígeno capaces de inducir la expresión de factores de transcripción que activan la expresión de genes involucrados en la proliferación y diferenciación celular. En los cortes histológicos, se observó que las heridas tratadas con Rosa de Bengala y luz verde

(PDT) presentan mayor agregado de queratinocitos en la epidermis en comparación con las heridas de los otros grupos.

Los resultados mostrados en este proyecto de tesis sugieren que la fototerapia y la terapia fotodinámica son tratamientos ópticos innovadores, no invasivos y de no contacto, que pueden ser un método alternativo en el tratamiento de heridas cutáneas a un menor costo. La implementación de este tipo de tratamientos basados en el uso de luz, tiene el potencial de mejorar los procesos de cicatrización en heridas crónicas como es el caso de úlceras diabéticas o úlceras intestinales, reduciendo el tiempo de cicatrización de las mismas, y mejorando el aspecto y función del tejido regenerado.

6.1 Referencias

Nesi-Reis, L.-N. O.-L. (2018). Contribution of photodynamic therapy in wound healing: A systematic review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 294-305.

Participaciones en congresos nacionales

1. Participación en el **IX Congreso Nacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud 2018**, con la presentación del cartel titulado: “EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA TERAPIA LÁSER DE BAJO NIVEL EMPLEANDO DOS LONGITUDES DE ONDA (633 Y 532NM) EN LA ACELERACIÓN DEL PROCESO DE CURACIÓN DE HERIDAS CUTÁNEAS”
2. Participación en el **IX Congreso Nacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud 2018**, con la presentación del cartel titulado: “ESTUDIO PRELIMINAR DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA APLICADA EN LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS”
3. Presentación en la sesión de la División óptica del **LXI CONGRESO NACIONAL DE FÍSICA**, con el trabajo titulado: “ESTUDIO DE LA TERAPIA LÁSER DE BAJA DENSIDAD DE ENERGÍA PARA ACELERAR LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS CUTÁNEAS”

Premios obtenidos

1. **Obtención del segundo lugar** en la categoría de cartel a nivel licenciatura en el **IX Congreso Nacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud 2018**, celebrado los días 14, 15 y 16 de junio del 2018, Puebla Puebla, con la presentación del cartel titulado: “EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA TERAPIA LÁSER DE BAJO NIVEL EMPLEANDO DOS LONGITUDES DE ONDA (633 Y 532NM) EN LA ACELERACIÓN DEL PROCESO DE CURACIÓN DE HERIDAS CUTÁNEAS”
2. **Premiación entre los mejores 3 carteles** en el marco del **día del biotecnólogo** celebrado el 18 de Junio del 2018 en la facultad de Ciencias Biológicas de la BUAP, Puebla, Puebla. con el cartel titulado “EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA TERAPIA LÁSER DE BAJO NIVEL EMPLEANDO DOS LONGITUDES DE ONDA (633 Y 532NM) EN LA ACELERACIÓN DEL PROCESO DE CURACIÓN DE HERIDAS CUTÁNEAS”



El Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica,
 La Universidad Nacional Autónoma de México, a través del CCADET,
 El Centro de Investigaciones en Óptica, A.C.,
 La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a través de la VIEP y
 La Universidad Autónoma de Nuevo León, a través de la Facultad de Medicina

otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Gabriela Juárez Salazar, Estefany Marisol García García, Luis Adrián De La O Aguilar, Ángela Cindy Rosas García,
 Wendy Argelia García Suastegui, Teressita Spezzia Mazzoco, Rubén Ramos García, Julio Cesar Ramírez San Juan, Placido Zaca Morán,
 Carolina Morán Raya, Francisco Ramos Collazo, Juan Pablo Padilla Martínez

por su valiosa participación en el IX Congreso Nacional de Tecnología
 Aplicada a Ciencias de la Salud, con la presentación del cartel intitulado

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA TERAPIA LÁSER DE BAJO NIVEL EMPLEANDO DOS LONGITUDES
 DE ONDA (683 Y 532 NM) EN LA ACELERACIÓN DEL PROCESO DE CURACIÓN DE HERIDAS CUTÁNEAS
 Puebla, Pue, 14, 15 y 16 de junio de 2018

Dr. José Eduardo Espinosa Rosales
 Director de Divulgación Científica,
 VIEP-BUAP

Dr. Eduardo Zepichín Rodríguez
 Por el Comité Organizador,
 INAOE

Dr. Leopoldo Altamirano Robles
 Director General,
 INAOE



El Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica,
 La Universidad Nacional Autónoma de México, a través del CCADET,
 El Centro de Investigaciones en Óptica, A.C.,
 La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a través de la VIEP y
 La Universidad Autónoma de Nuevo León, a través de la Facultad de Medicina

otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

al Cartel:
EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA TERAPIA LÁSER DE BAJO NIVEL EMPLEANDO DOS LONGITUDES DE ONDA (633 Y 532 NM) EN LA ACELERACIÓN DEL PROCESO DE CURACIÓN DE HERIDAS CUTÁNEAS

Presentado por:

Gabriela Juárez Salazar, Estefany Marisol García García, Luis Adrián De La O Aguilar,
 Ángela Cindy Rosas García, Wendy Argelia García Suastegui, Teressita Spezzia Mazzoco,
 Rubén Ramos García, Julio Cesar Ramirez San Juan, Placido Zaca Morán, Carolina Morán Raya,
 Francisco Ramos Collazo, Juan Pablo Padilla Martínez

por haber obtenido el **SEGUNDO LUGAR** en la categoría de Cartel a nivel Licenciatura
 en el IX Congreso Nacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud,
 Puebla, Pue, 14, 15 y 16 de junio de 2018

Dr. José Eduardo Espinosa Rosales
 Director de Divulgación Científica,
 VIEP-BUAP

Dr. Eduardo Tepichín Rodríguez
 Presidente del Comité Organizador,
 INAOE



El Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica,
 La Universidad Nacional Autónoma de México, a través del CCADET,
 El Centro de Investigaciones en Óptica, A.C.,
 La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a través de la VIEP y
 La Universidad Autónoma de Nuevo León, a través de la Facultad de Medicina

otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Luis Adrian De La O Aguilar, Angela Cindy Rosas García, Marisela Coyotl Huexotl, Gabriela Juárez Salazar, Juan Pablo Padilla
 Martínez, Estefany Marisol García García, Francisco Ramos Collazo, Teressita Spezzia Mazoco, Anabella Handal Silva, José Luis

Morán Perales, Octavio Sanchez García, Wendy Argelia García Suastegui

por su valiosa participación en el IX Congreso Nacional de Tecnología
 Aplicada a Ciencias de la Salud, con la presentación del cartel intitulado

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA APLICADA EN LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS..

Puebla, Pue, 14, 15 y 16 de junio de 2018

Dr. Jose Eduardo Espinosa Rosales
 Director de Divulgación Científica,
 VIEP-BUAP

Dr. Leopoldo Altamirano Robles
 Director General,
 INAOE

Dr. Eduardo Tepichín Rodríguez
 Por el Comité Organizador,
 INAOE

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Otorga la presente:

CONSTANCIA



A: **G. Juárez-Salazar, E. García García, L. A. De la O Aguilar, A. C. Rosas García, W. A. García Suategui, T. Spezia Mazzoco, R. Ramos García, J. C. Ramírez San Juan, P. Zaca Moran, C. Moran Raya, F. Ramos Collazo, J. P. Padilla Martínez**

Por su participación en la exposición de carteles con el tema:

"Evaluación de la eficacia de la Terapia Láser de Bajo Nivel empleando dos longitudes de onda (633 y 532 nm) en la aceleración del proceso de curación de heridas cutáneas"

En el Marco del Día del Biotecnólogo

"Pensar bien para vivir mejor"

H. Puebla de Zaragoza a 18 de junio de 2018

Dr. Salvador Galicia Isasmendi
DIRECTOR

Dra. Hortensia Carrillo Ruiz
SECRETARIA ACADÉMICA

578

Ciudad de México, 29 de agosto de 2018

Apreciable Estefany Marisol García García
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Me es grato comunicarle que el trabajo con ID: SMF-1284 y cuyo título es:

**Estudio de la Terapia Láser de Baja Densidad de Energía
para acelerar la cicatrización de heridas cutáneas.**

de los autores:

Estefany Marisol García García

Gabriela Juárez Salazar

Angela Cindy Rosas García

Luis Adrián De la O Aguilar

Teresita Spezzia Mazzoco

Wendy Argelia García Suastegui

Rubén Ramos García

Anabela Handal Silva

Placido Zaca Moran

Juan Pablo Padilla Martínez

ha sido aceptado para su presentación mural en la sesión de la División Óptica del LXI CONGRESO NACIONAL DE FÍSICA, que se celebrará en Puebla, Puebla, del 7 al 12 de octubre de 2018. A partir del 3 de agosto usted podrá consultar en la página del congreso la fecha y hora de su sesión.

ATENTAMENTE

Mesa Directiva
Sociedad Mexicana de Física

