



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Identificación de marcadores de cicatrización mediante espectroscopía FTIR en heridas tratadas con terapia fotodinámica empleando luz azul y curcumina

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Jaqueline Martínez Luna

Director de Tesis: Dr. Juan Pablo Padilla Martínez

Co- Director de Tesis: Dra. Wendy Argelia García Suastegui

Octubre, 2021



Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor el Dr. Juan Pablo Padilla Martínez perteneciente al Centro de Investigación en Fisicoquímica de Materiales por compartir sus conocimientos, enseñanzas, confianza y paciencia brindadas durante el desarrollo de este proyecto. De igual forma a la Dra. Wendy Argelia García Suastegui del Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción que al igual que el Dr. Pablo compartió sus conocimientos en todo momento.

Asimismo, quiero agradecer al personal del Bioterio Claude Bernard, perteneciente a la Benemérita Universidad de Puebla por facilitarnos y brindarnos el acceso a las instalaciones. Al Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE) por proporcionarnos el dispositivo LED empleado en este proyecto de investigación. Y al Dr. Orlando Zaca Morán del Centro de Investigaciones en Biotecnología Aplicada (CIBA) del IPN campus Tlaxcala, por apoyarnos en la adquisición de los espectros FTIR, lo cual nos permitió alcanzar parte de los objetivos de este proyecto de tesis.

También, quiero agradecer a todos y cada uno de los miembros de mi familia, hermanos, tíos y primos que siempre han estado a mi lado en todo momento. Pero en especial, quiero agradecer a mi madre, por brindarme su amor y confianza a lo largo de mi vida académica y deportiva, ya que sin ella nada de esto hubiera sido posible. Finalmente, y no menos importante, a mis amigos, quienes estuvieron acompañándome a lo largo de estos años en mi trayectoria académica.

Índice

Resumen	I
Planteamiento del problema	II
Hipótesis	III
Objetivos general y particulares	IV
1. Introducción	
1.1 La piel y su estructura.....	1
1.1.1 Epidermis	2
1.1.2 Dermis	4
1.1.3 Hipodermis	5
1.2 Herida cutánea	6
1.2.1 Fases de cicatrización	7
Fase inflamatoria	7
Fase proliferativa	8
Fase de remodelación	9
1.3 Heridas agudas y crónicas: un problema de salud pública	10
1.4 Referencias	13
2. ¿Qué es la Terapia fotodinámica?	
2.1 Antecedentes de la PDT en la curación de heridas	15
2.2 Componentes de la terapia fotodinámica	17
2.2.1 Luz	17

Lámparas de diodos emisores de luz	19
2.2.2 Fotosensibilizador	20
Curcumina	21
2.2.3 Oxígeno	23
2.3 Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica	24
2.4 Referencias	25
3. Espectroscopía FTIR	
3.1 Antecedentes de la FTIR en lesiones de piel	29
3.2 Espectros de la piel	31
3.3 Referencias	35
4. Procedimiento experimental	
4.1 Población de estudio	37
4.2 Procedimiento quirúrgico	37
4.3 Grupos experimentales y tratamiento	38
4.3.1 Grupo Control	38
4.3.2 Grupo PDT Azul	38
4.4 Procedimiento Histológico	40
4.5 Espectros FTIR.....	42
4.6 Referencias	44
5. Resultados	
5.1 Seguimiento del proceso de cicatrización mediante fotografías convencionales.....	45
5.2 Histologías	46

5.3 Espectros 49

6. Discusiones y Conclusiones

6.1 Referencias 63

Resumen

Alrededor de todo el mundo, las heridas han sido consideradas como un grave problema de salud pública, debido a esto, en los últimos 20 años se ha investigado un tratamiento óptico innovador denominado terapia fotodinámica (PDT), cuyo objetivo es generar especies reactivas de oxígeno para la proliferación y diferenciación celular. El objetivo de este proyecto fue identificar mediante espectroscopía FTIR marcadores presentes en la piel de heridas tratadas y no tratadas con terapia fotodinámica, para ello, 6 ratas macho alopecicas de la especie *Rattus norvegicus* fueron utilizadas y divididas en 2 grupos: Control y PDTA. A ambos grupos se les realizaron dos heridas dorsales de 1 cm de diámetro, al grupo control no se le aplicó ningún tratamiento; al grupo PDTA se aplicó el fotosensibilizador curcumina a una concentración de 10 μM durante 5 minutos para posteriormente irradiar durante 3 minutos con un dispositivo LED de luz azul a una longitud de onda de 470 nm con una densidad de energía de 10 J/cm^2 . Se realizaron cortes histológicos a 20 y 50 μm en los días 7, 14 y 21; los primeros cortes se tiñeron con la técnica hematoxilina-eosina y los otros se caracterizaron mediante espectroscopia FTIR a un rango espectral de 380 a 3500 cm^{-1} y 4 cm^{-1} de resolución. Se encontraron picos de colágeno la proteína con mayor abundancia en la piel y de las más importantes, más evidentes en el grupo tratado con la PDTA situados en distintos puntos, 1215, 1284, 1327, 1329, 1365, 1367, 1402, 1631 nm. Otro pico importante y observado únicamente en el grupo PDTA 21 TC fue de 1651 nm, correlacionado a la elastina.

El uso de la terapia fotodinámica con luz azul (PDTA) para la cicatrización de heridas cutáneas tuvo un efecto positivo ya que en el análisis comparativo con el grupo control fue posible observar diferencias morfológicas, histológicas y espectroscópicas, sin embargo, al comparar la eficacia de PDTA con trabajos en donde se utiliza luz roja o verde sus efectos no son tan significativos.

Planteamiento del problema

Las heridas son uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, debido a ello, se han investigado diversas técnicas y tratamientos para mejorar y/o acelerar el proceso de curación de una herida. En los últimos años se ha investigado un tratamiento innovador basado en el uso de colorantes orgánicos no tóxicos activados por luz, denominado terapia fotodinámica. Esta terapia ha sido principalmente utilizada para tratar cierto tipo de cánceres; sin embargo, en los últimos años ha sido investigada para mejorar el proceso de cicatrización de heridas, siendo la luz roja e infrarroja las longitudes de onda más reportadas. Debido a lo anterior, en este proyecto de tesis se propone utilizar la terapia fotodinámica para curar heridas inducidas en el dorso de una rata de laboratorio, empleando el colorante orgánico curcumina activado con luz azul, la cual es una longitud de onda poco estudiada para este propósito.

Por otro lado, las técnicas para evaluar el proceso de cicatrización ha sido mediante técnicas histológicas, las cuales permiten observar, examinar y analizar componentes morfológicos del tejido regenerado. Dentro de estas técnicas histológicas, se encuentra la tinción por hematoxilina-eosina o tinción de Masson, las cuales son los métodos estándares más utilizados y reportados en la literatura. Sin embargo, estas técnicas histoquímicas continúan siendo una herramienta básica y limitada en la investigación, pues difícilmente detecta marcadores moleculares. Durante los últimos años, se ha propuesto el uso de la espectroscopia FTIR como una técnica innovadora para identificar y cuantificar biomoléculas en muestras biológicas. Debido a lo anterior, proponemos utilizar a la espectroscopía FTIR como una técnica óptica atípica para la identificación de marcadores de cicatrización en heridas cutáneas tratadas con terapia fotodinámica empleando luz azul. Hasta el momento son pocos los estudios en donde se utilice la espectroscopía como una herramienta para la identificación de marcadores en piel y no existen reportes de esta técnica sobre cortes histológicos.

Hipótesis

La espectroscopía FTIR ha sido utilizada para identificar marcadores moleculares en distintas muestras biológicas, por lo cual, podría ser una técnica innovadora para identificar marcadores presentes durante el proceso de cicatrización de heridas tratadas y no tratadas con terapia fotodinámica, a través de cortes histológicos obtenidos en días claves del proceso de cicatrización.

Objetivo general

Identificar mediante espectroscopía FTIR marcadores presentes en la piel de heridas tratadas y no tratadas con terapia fotodinámica.

Objetivos particulares

- En un modelo murino se evaluará el efecto de la terapia fotodinámica empleando el fotosensibilizador curcumina a una concentración de 10 μM y una longitud de onda de 470 nm a una densidad de energía de 10 J/ cm^2 .
- Comparar mediante fotografías convencionales el proceso de cicatrización de las heridas.
- Identificar histológicamente las principales estructuras de la piel mediante la técnica de tinción hematoxilina-eosina.
- Identificar los principales marcadores de cicatrización presentes en la piel mediante espectroscopia FTIR.

1. Introducción

1.1 La piel y su estructura

La piel es considerada uno de los órganos más grandes del cuerpo, en un humano promedio llega a pesar aproximadamente 4 Kg y representa del 6 al 12% del peso corporal (Castell *et al.*, 2012). Se puede considerar como una interfase, ya que separa el medio interno del externo (Cordero, 1996), protegiendo a los órganos y tejido interno de agentes físicos, químicos y mecánicos, por ejemplo, los radicales libres inducidos por la radiación ultravioleta son atrapados por la producción de melanina, mitigando el daño celular (ver Figura 1.1). Además, la piel impide la salida de líquido tisular de las células epidérmicas, evitando la deshidratación logrando así un equilibrio hidroelectrolítico (Castell *et al.*, 2012). La termorregulación, es otra de las funciones que se lleva a cabo en la piel, la cual se da a través de la secreción de sudor, la piloerección y por la regulación del paso de sangre por el lecho capilar dérmico. De la misma manera se reconoce un sistema inmunológico que genera tanto respuestas inmunitarias locales, como sistémicas. La función metabólica, es poco reconocida, pero vital para el funcionamiento adecuado de otros órganos del cuerpo (Castell *et al.*, 2012). Las terminaciones nerviosas nociceptivas situadas en la dermis, son vitales e importantes en la función sensorial del organismo (Arenas, 2015).

La piel está constituida por tres capas superpuestas entre sí como se observa en la Figura 1.2, en la parte más superficial se encuentra la epidermis, considerada como el epitelio de cobertura (Fawcett & Jensch, 1999); seguida por la dermis, vascularizada y rica en anexos cutáneos y estructuras nerviosas y, finalmente la hipodermis o tejido adiposo subcutáneo (Cordero, 1996).

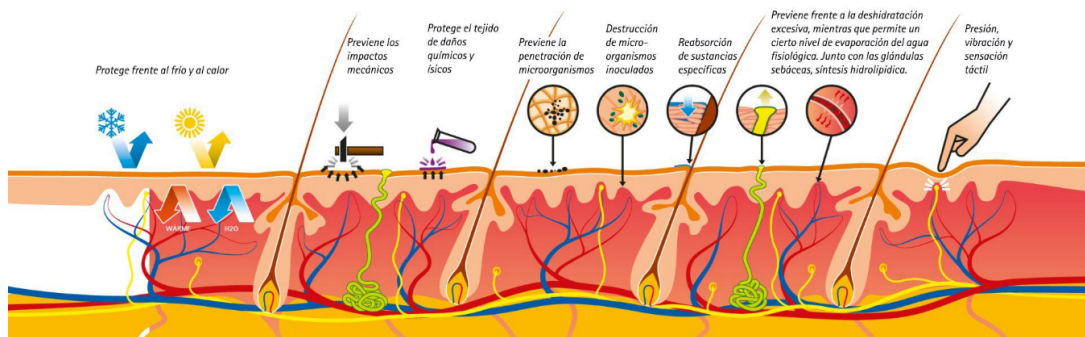


Figura 1.1: Representación de las principales funciones de la piel (Fuente: <https://www.bbraun.es/es/pacientes/cicatrizacion-de-heridas/que-saber-sobre-la-piel.html>).

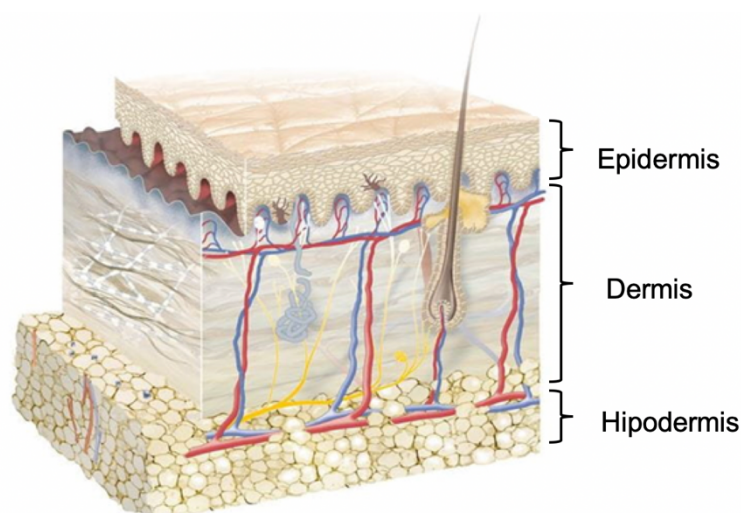


Figura 1.2: Representación esquemática de las capas de la piel. Imagen modificada de <https://www.eucerin.es/acerca-de-la-piel/conocimientos-basicos-sobre-la-piel/estructura-y-funcion-de-la-piel>.

1.1.1 Epidermis

La epidermis es un epitelio plano, estratificado, queratinizado, constituido por varias capas celulares, denominadas estratos (ver Figura 1.3). Apicalmente, se encuentra en contacto directo con el medio externo y está separada de la dermis por una delgada lámina basal, la cual, permite su adhesión sobre la dermis (Castell *et al.*, 2012). Está constituida por cuatro grupos de células: *i*) queratinocitos, *ii*) melanocitos, *iii*) células de Langerhans y *iv*) células de Merkel (Cordero, 1996); en

este trabajo de tesis sólo se describirán a las células de los queratinocitos. Este tipo celular son los que predominan y se diferencian para producir queratina, dando como resultado la formación de capas superficiales que se pierden continuamente y se sustituyen por nuevas células resultado de la mitosis celular de capas basales de la epidermis (Fawcett & Jensch, 1999). Las nuevas células son desplazadas hacia la superficie y durante este trayecto ascendente elaboran queratina que sustituye la mayor parte del citoplasma, haciendo que la célula muera y sea eliminada (Leeson *et al.*, 1987). A su vez, los queratinocitos se organizan en cinco estratos como se observa en la Figura 1.3, los cuales se describen a continuación:

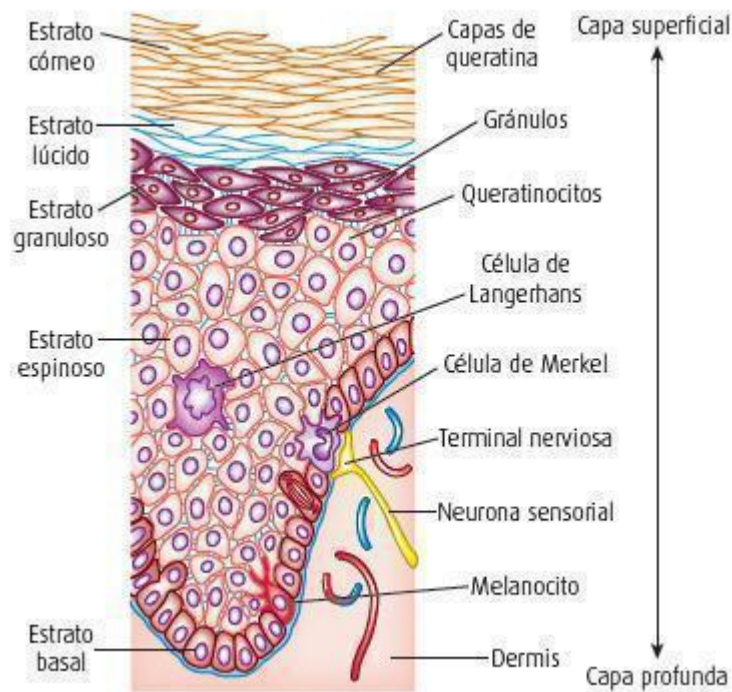


Figura 1.3: Representación esquemática de la distribución de los estratos epidérmicos (Fuente: <https://docplayer.es/72084531-Capitulo-16-sistema-tegumentario-mcgraw-hill-interamericana-editores-todos-los-derechos-reservados.html>).

El estrato basal o germinativo, consta de una capa de células cilíndricas con núcleo grande, nucléolo prominente y citoplasma basófilo (Castell *et al.*, 2012). En este estrato, es donde se inicia la proliferación de los queratinocitos, los cuales, se unen entre sí por desmosomas y por hemidesmosomas a la membrana basal (Arenas, 2015). El estrato espinoso está compuesto por cinco a diez capas de células con

forma poliédrica con núcleo más grande y redondo, y citoplasma eosinófilo (Castell *et al.*, 2012) (Fawcett & Jensch, 1999). Poseen puentes intercelulares para la unión entre sí y a su vez con las células adyacentes (Navarrete, 2003). El estrato granuloso, consta de tres a cinco capas de células aplanadas cuyo citoplasma contiene gránulos de queratohialina (Leeson *et al.*, 1987). La finalidad de este estrato es impedir la desintegración de la membrana plasmática de los queratinocitos cuando han muerto por apoptosis (Castell *et al.*, 2012). El estrato lúcido, presente exclusivamente en donde la piel es gruesa (palmas y plantas) está compuesta por una única línea de células intensamente eosinófilas (Navarrete, 2003), sus células son aplanadas y se pueden agrupar en forma compacta, con núcleos imprecisos o ausentes, mientras que el citoplasma contiene queratohialina producto de los gránulos de capas subyacentes (Leeson *et al.*, 1987).

Por último, tenemos el estrato córneo, el cual está formado por células claras, muertas y semejantes a escamas extremadamente aplanadas que se fusionan progresivamente (Leeson *et al.*, 1987); estas nuevas células ahora son llamadas corneocitos y se caracterizan por la ausencia de núcleo (Cormack, 2003) y su citoplasma es sustituido por queratina. La ausencia de estas estructuras se debe a la activación de enzimas hidrolíticas ligadas a la activación de la vía de las caspasas (Castell *et al.*, 2012).

1.1.2 Dermis

La dermis sostiene y le da forma a la piel (ver Figura 1.4), es la capa adyacente a la epidermis y es al menos diez veces más gruesa que ésta (Castell *et al.*, 2012). De igual manera, ejerce una función inductora de crecimiento y diferenciación sobre la epidermis (Cordero, 1996). Está formada por células de tejido conjuntivo y matriz extracelular (Fawcett & Jensch, 1999). Las células presentes de esta capa son: fibroblastos, considerados como la célula principal y característica de los tejidos conectivos, sintetiza y mantiene la cantidad normal de todos los componentes de la matriz extracelular; miofibroblastos, son los responsables de la contracción-

retracción del tejido de cicatrización; células de Langerhans, fungen como presentadoras de antígenos; mastocitos, liberan mediadores como la histamina, heparina, prostaglandinas, etcétera; macrófagos, secretoras de citocinas; linfocitos, partícipes de la inmunovigilancia (Cordero, 1996). Junto con la hipodermis, la dermis alberga los anexos cutáneos: folículos pilosos, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas, vasos y nervios (Leeson *et al.*, 1987).

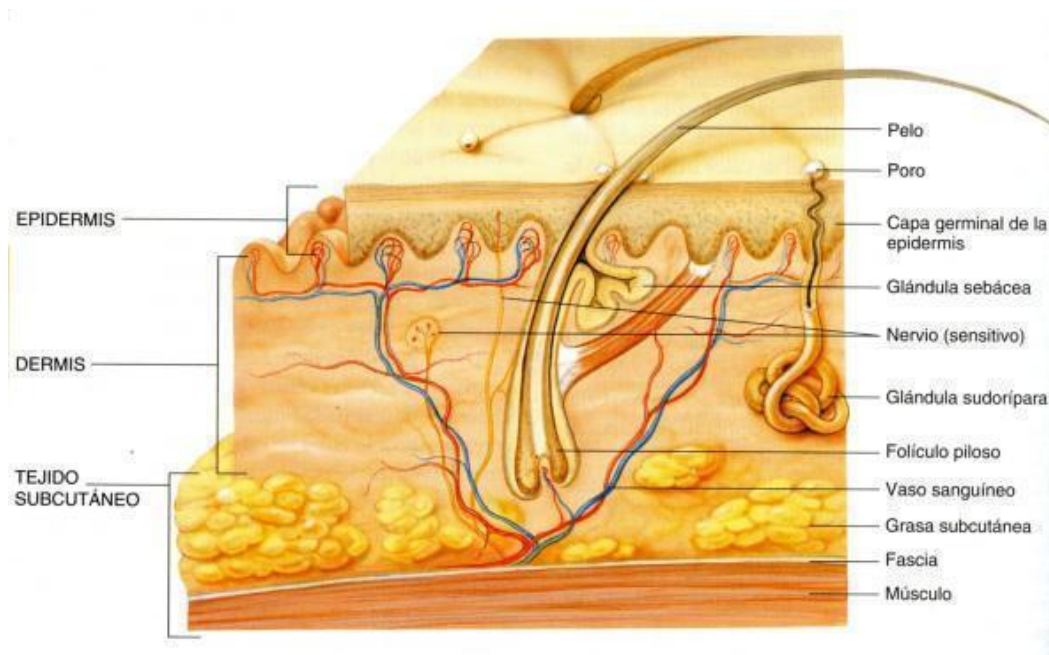


Figura 1.4: Anexos cutáneos presentes en la dermis (Fuente: <https://eifeoidetam.wordpress.com/2015/09/10/%EF%BB%BFanatomia-de-la-piel/>).

1.1.3 Hipodermis

Finalmente, la capa más profunda de la piel es la hipodermis (ver Figura 1.4), también llamada panículo adiposo o tejido subcutáneo. La hipodermis está constituida por células grasas (adipocitos) que se disponen en lóbulos separados por tejido conectivo, llamados septos o tabiques interlobulillares (Navarrete, 2003). Las principales funciones de esta capa son: protección contra traumatismos, pues sirve como una almohadilla absorbente; conservación del calor corporal, ya que

actúa como material aislante del frío y finalmente, como reservorio nutricional y de energía en caso de ayuno (Cordero, 1996).

1.2 Herida cutánea

Son muchos los atributos y funciones que se le dan a la piel, y al ser el órgano del cuerpo más expuesto al medio ambiente, diversos factores etiológicos pueden estar involucrados en la pérdida de su integridad, dando como resultado una lesión o herida (González *et al.*, 2017). Debido a lo anterior, podemos definir a una herida cutánea como la disrupción de estructuras anatómicas y funcionales normales a consecuencia de un trauma, como se muestra en la Figura 1.5. Las heridas pueden alcanzar diferentes profundidades y debido a ello, se pueden clasificar en: 1) heridas superficiales, las cuales solo afectan a la epidermis y no deja una cicatriz, 2) heridas de espesor parcial, las cuales afectan tanto epidermis como a la dermis superficial, respetando los anexos cutáneos y dejando una cicatriz y, 3) heridas de espesor completo, las cuales afectan a las tres capas de la piel y en ocasiones afecta tejidos como músculo, tendón, cápsula articular y hueso y, siempre hay cicatriz (Bermúdez *et al.*, 2008).

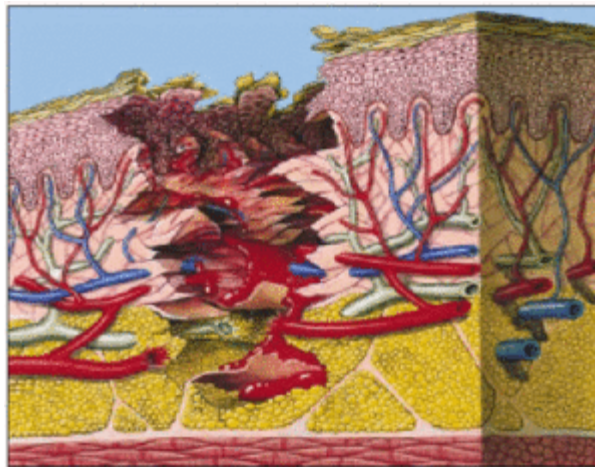


Figura 1.5: Representación esquemática de una herida cutánea (Fuente: Arenas, 2003).

Las heridas también pueden clasificarse respecto al tipo de lesión, por ejemplo, heridas traumáticas, úlceras de pie diabético, lesiones por presión, dehiscencias

quirúrgicas, quemaduras, heridas neoplásicas, úlceras arteriales y lesiones por incontinencia (Vela *et al.*, 2018). Cuando una persona presenta una herida, una serie de fases y eventos bioquímicos complejos son iniciados para regenerar el tejido dañado, entendiéndose por regeneración la sustitución de este tejido por uno morfológicamente y funcionalmente similar al dañado, llamando a este proceso curación de la herida o proceso de cicatrización, el cual se describe a continuación.

1.2.1 Fases de cicatrización

Para que la curación de una herida se dé de manera satisfactoria, es necesario que sucedan una serie de procesos interactivos y dinámicos, los cuales se pueden superponer en el tiempo. Estos procesos se pueden dividir en tres fases: *i)* fase inflamatoria, *ii)* proliferativa y *iii)* fase de remodelación celular (Bermúdez *et. al*, 2008), las cuales se describen brevemente a continuación.

Fase inflamatoria

Inmediatamente después de la lesión, el proceso de cicatrización da inicio con la activación de los elementos que constituyen la sangre, con el objetivo de formar un coágulo o tapón hemostático. Este proceso se da gracias a la cascada de coagulación y la agregación plaquetaria (Ramírez, 2010). El coágulo inicial que se formó propiciará una matriz provisional la cual estará constituida principalmente por fibronectina, trombina y trombospondina, gracias a estos elementos, la migración hacia el lecho de la herida de células inflamatorias y células dérmicas y epidérmicas se da de manera eficiente. De igual forma, es importante señalar que los elementos antes mencionados, también son importantes para la liberación de distintos factores de crecimiento, entre los más importantes, se encuentran: el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDFG), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y el factor de crecimiento transformante α y β (TGF α y β), estos últimos, responsables de la activación de las primeras células en aparecer en el tejido dañado, neutrófilos y macrófagos (Senet, 2008).

Los neutrófilos que arribaron al sitio de la herida permanecerán entre 24 y 48 horas, con el fin de remover detritus celulares, partículas extrañas y bacterias. Estos a su vez serán sustituidos por los monocitos, los cuales, al cabo de entre 48 y 72 horas de estar presentes en los tejidos, se transformarán en macrófagos y permanecerán por días y hasta semanas. La función más importante de estas células, es la regulación de la llegada de más monocitos y fibroblastos, al mismo tiempo que se liberan factores angiogénicos y de crecimiento, importantes al momento de la migración y proliferación celular, así como en la formación de la nueva matriz extracelular (Benavides, 2008).

Fase proliferativa

Esta fase inicia aproximadamente en el día 3, tiene una duración de hasta 15 días, pero autores como Guarín *et al.*, 2013 mencionan que puede extenderse hasta el día 20. Las células protagonistas de esta etapa son los fibroblastos, cuya síntesis se da gracias a factores de crecimiento generados por los macrófagos (Porrás & Mustoe, 1992). Estas células, junto con los miofibroblastos son activadas para migrar al sitio de la herida, proliferando y sintetizando colágeno al igual que otras moléculas presentes en la matriz, este proceso es conocido como fibroplasia, cuyo fin es la generación del tejido de granulación (González *et al.*, 2018).

Casi al mismo tiempo que ocurre la fibroplasia, es necesario que suceda otro proceso denominado angiogénesis, cuyo fin es la formación de nuevos vasos sanguíneos, los cuales garantizarán oxígeno y nutrientes al tejido en crecimiento (González *et al.*, 2018). Para que el proceso de angiogénesis se lleve a cabo, es necesario que las células de los monocitos liberen citoquinas, las cuales a su vez liberarán factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y TGF- β (Benavides, 2008).

Finalmente, y una vez que ocurrieron casi simultáneamente la fibroplasia y la angiogénesis, la matriz extracelular provisional podrá ser sustituida por el tejido de granulación, a este fenómeno se le denomina como reepitelización o epitelización, cuya activación, se ve favorecida por FGF-2, 7 y 10, al igual que TGF- β . Este

proceso se da con la migración, proliferación y diferenciación de células denominadas como queratinocitos (Benavides, 2008). Se sabe que la migración de estas células, se da desde los bordes de la herida hacia el centro, se multiplican y finalmente se diferencian para la formación de la epidermis, y por ende se da el cierre de la herida (Senet, 2008).

Fase de remodelación

Esta última fase da inicio al par de la fase proliferativa, específicamente al momento en que se forma la matriz extracelular permanente y puede extenderse de 1 hasta 2 años (Guarín *et al.*, 2013). Cabe destacar que durante esta fase existirá segregación dada por los fibroblastos de fibronectina y ácido hialurónico, los cuales son útiles para la migración y proliferación celular; estos a su vez serán sustituidos por colágeno, fibras elásticas y glucosaminoglucanos con la finalidad de formar la matriz extracelular permanente con mayor resistencia y fuerza de tracción (Senet, 2008). Las fibras de colágeno que se depositarán para formar la matriz permanente serán inicialmente las de tipo III, las cuales son secretadas entre las 48 y 72 horas y tienen un máximo de duración antes de ser sustituidas por las fibras tipo I de entre 5 y 7 días. (Benavides, 2008).

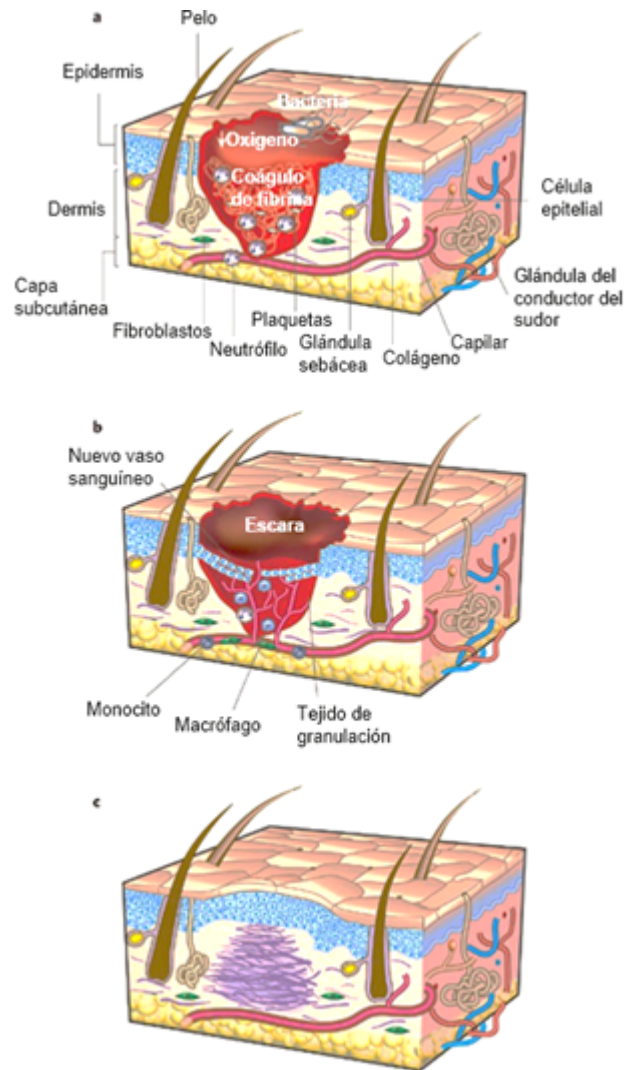


Figura 1.6: Ilustración del proceso de cicatrización de una herida a) fase inflamatoria, b) fase proliferativa y c) fase de remodelación. Imagen modificada de <https://enfermaca.blogspot.com/2015/05/fases-de-cicatrizacion-de-las-heridas.html>

1.3 Heridas agudas y crónicas: un problema de salud pública

Existen dos tipos de heridas, las agudas y las crónicas. Una herida aguda pasará por diferentes etapas en su proceso de cicatrización, con el fin de restaurar la

integridad anatómica y funcional del tejido lesionado, hasta llegar a su cierre y formar una cicatriz (Andrades & Sepúlveda, 2005). Este proceso se lleva a cabo de manera ininterrumpida, secuencial y en un periodo de tiempo predecible, el cual es de aproximadamente 28 días en humanos. Sin embargo, al estancarse en alguna de las etapas de cicatrización (excediendo los 28 días), la herida podrá considerarse como crónica, pues la restauración de su integridad anatómica y funcional del tejido lesionado no se llevó a cabo. El estado nutricional del paciente, el nivel de oxigenación de tejidos, una carga bacteriana elevada, el exceso de humedad local, el estrés físico y emocional y la presencia de patologías concomitantes, son factores involucrados en el estancamiento de la cicatrización (Vela *et al.*, 2018).

La Secretaría de Salud (Secretaría de salud, 2018) señala que, tanto a nivel mundial como nacional, las heridas son un problema de salud pública que afecta directamente la calidad de vida de las personas, conduciéndolas a periodos prolongados de discapacidad, dolor e incomodidad, inclusive los limita a realizar sus actividades básicas. La Secretaría de Salud (Secretaría de salud, 2018) afirma que durante los últimos años las heridas en nuestro país han ido en aumento y, como consecuencia de ello, las estancias en hospitales se prolongan, los recursos médico-quirúrgicos y de enfermería se vuelven costosos y en algunas heridas, poco eficientes.

En un estudio realizado en 2016 (Vela *et al.*, 2018), se mencionan las características, insumos tradicionales y avanzados usados, así como los costos mensuales de la atención brindada a 36 022 pacientes con heridas agudas y crónicas atendidos en 159 unidades médicas de la Secretaría de Salud de 15 entidades federativas. Los resultados reportados por Vela y colaboradores, mencionan que las heridas traumáticas representaron el 27.5% de los casos, con un costo mensual de atención hospitalaria de \$389 975 080.76; seguida por las úlceras de pie diabético con 24.4%, siendo esta la principal lesión para heridas crónicas, alcanzando un costo mensual de atención hospitalaria de aproximadamente \$398 388 469.99 pesos mexicanos.

Para el caso de los insumos tradicionales con mayor frecuencia de uso, destacan las gasas convencionales con 95.3%, tela adhesiva 57.7%, venda elástica (de 10 cm) 47.7%, desinfectante en spray 33.3%; mientras que en los insumos avanzados como el apósito de espuma de poliuretano representó el 13.1%, ungüento de colagenasa un 11%, hidrogel un 9.9% y apósitos de plata nanocristalina un 9.3%. De igual forma, podemos rescatar que, de las 15 entidades federativas presentadas en este estudio, Puebla fue el segundo estado con mayores casos de heridas con un 23.2%, tan solo debajo del estado de Michoacán con el 23.4%.

Hasta hace poco, el cuidado y manejo de heridas en los pacientes era a través de técnicas y procedimientos tradicionales, como el uso de apósitos pasivos de baja absorción (gasas, parches, vendas) y antisépticos tópicos; sin embargo, los apósitos pasivos requieren ser cambiados con frecuencia para evitar que el tejido sano se macere. Recientemente, la curación de heridas se ha llevado a cabo a través del uso de apósitos activos, los cuales generan y mantienen un ambiente húmedo en el lecho de la herida; propiciando un menor número de cambios (Vela *et al.*, 2018). Debido al desarrollo tecnológico, actualmente existen apósitos modernos para la curación de heridas basados en polímeros sintéticos, los cuales pueden clasificarse como pasivos (gasas), interactivos (películas, espumas, hidrogeles e hidrocoloides) y bioactivos (Mir *et al.*, 2018). Este último tipo de apósito se produce a partir de biomateriales que juegan un papel importante en el proceso de cicatrización de heridas, como colágeno, ácido hialurónico, quitosano, alginato y elastina. Sin embargo, todos ellos son métodos de contacto y algunos pueden ser muy caros.

A pesar del gran desarrollo tecnológico que han tenido los apósitos en la curación de heridas, en los últimos 20 años se ha investigado un tratamiento óptico innovador empleando el uso de la luz, denominado *terapia fotodinámica* o *PDT* por sus siglas en inglés (Photodynamic Therapy). Esta terapia requiere de un colorante orgánico no tóxico, el cual es expuesto a la luz a una determinada longitud de onda (color) para producir especies reactivas de oxígeno que pueden inducir señalización celular de apoptosis, por lo cual, la PDT ha sido principalmente utilizada en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer (Agostinis *et al.*, 2011). Sin

embargo, existen algunos estudios *in vitro* e *in vivo* sobre el papel de la PDT en el proceso de cicatrización de heridas (García *et al.*, 2010). El mecanismo de acción de esta terapia, así como algunos antecedentes en la curación de heridas son descritos en la próxima sección.

1.4 Referencias

Agostinis, P. et al., (2011). Photodynamic Therapy of Cancer: An update. *CA Cancer J Clin*, pp. 250-281.

Andrades, P., & Sepúlveda, S. (2005). Cicatrización normal. En *cirugía plástica esencial*. Universidad de Chile, Santiago.

Arenas, J. (2003). Las heridas y su cicatrización. *OFFARM*, 22(5), pp. 126-132.

Arenas, R. (2015). La piel. En *Dermatología atlas diagnóstico y tratamiento*, 6ª e. (pp. 1-21) España: McGraw-Hill Interamericana de España.

Benavides, J. (2008). Reparación de heridas cutáneas. *Rev Asoc Col Dermatol*, 16 (19), pp. 29-35.

Bermúdez, S., Herrera, M., Hochman, A., *et al.* (2008). *Consenso sobre cicatrización de heridas*. Sociedad Argentina de Dermatología.

Castell, A., Herrera, M., & Campos, A. (2012). Piel y anexos. En *Histología y biología celular*, 2ª e. (pp.207-220) (lugar de publicación): McGraw-Hill INTERAMERICANA EDITORES, S.A de C.V.

Cordero, A. A. (1996). *Biología de la piel*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Fawcett, D. W., & Jensch, R. P. (1999). *Compendio de histología*. Madrid, España: McGraw-Hill INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S. A. U.

González, R. V., Hernández, Y. T., & Matiz, G. D. (2017). Estrategias de enfermería para prevenir lesiones de piel en personas con riesgo de padecerlas. *Revista Cubana de Enfermería*, 33 (3).

González *et al.*, (2018). Cicatrización de heridas cutáneas y papel de los miofibroblastos. *Panorama Cuba y Salud*, 13, pp. 505-510.

Guarín, C., Quiroga, P., & Landínez, N. S. (2013). Proceso de cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas. *Rev. Fac. Med*, 61(4), pp. 441-448.

Lesson, C. R., Leeson, T. S., & Paparo A. A. (1987). *Histología*. México, D.F.: Nueva editorial interamericana S.A. de C.V.

Mir, M., Ali, M. N., Barakullah, A. *et al.* (2018). Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. *Progress in Biomaterials* 7, 1-21.

Navarrete, G. (2003). Histología de la piel. *Revista de la Facultad de Medicina*, 46 (4), pp. 130-133.

Porras, B. H., & Mustoe, T. A. (1992). Cicatrización: conceptos actuales. *Acta Medica Colombiana*, 17(1), pp.31-45.

Ramírez, G.A. (2010). Fisiología de la cicatrización cutánea. *Revista facultad de salud*, 2 (2), pp. 69-78.

Secretaría de Salud (2018). *Modelo de atención clínicas de heridas*. México, D.F. http://www.calidad.salud.gob.mx/site/editorial/docs/modelo_atencion_clinicas_heridas.pdf

Senet, P. (2008). Fisiología de la cicatrización cutánea. *EMC-Dermatología*, 42(1), pp. 1-10.

Vela, G., Stegensek, E. M., & Leija, C. (2018) Características epidemiológicas y costos de la atención de las heridas en unidades médicas de la Secretaría de Salud. *Revista de Enfermería del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 26 (2), pp. 105-114.

2. ¿Qué es la terapia fotodinámica?

La terapia fotodinámica, es un innovador tratamiento óptico basado en el uso de colorantes orgánicos no tóxicos conocidos como fotosensibilizadores (Parra, 2008), los cuales se administran sobre el tejido afectado (en el caso de heridas cutáneas) y cuya activación depende de la adecuada irradiación lumínica (Ruíz & Rebollo, 2009). Todo este proceso origina un estado excitado, entregando energía a moléculas de oxígeno presentes en su estado base (Moreno *et al.*, 2007) causando fotooxidación y la producción de especies reactivas del oxígeno (Taylor *et al.*, 2011), las cuales en el caso de la regeneración de tejido, estimulan la expresión de genes relacionados con la migración y proliferación celular (Rai, 2017).

En este proyecto de tesis se propone utilizar la terapia fotodinámica para curar heridas inducidas en el dorso de una rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*), empleando el colorante orgánico curcumina activado con luz azul, la cual es una longitud de onda poco estudiada para este propósito. En esta sección, se describirán con más detalle los parámetros principales de la luz y del fotosensibilizador a utilizar, así como el mecanismo de acción de la terapia fotodinámica y algunos antecedentes de la PDT reportados en la curación de heridas.

2.1 Antecedentes de la PDT en la curación de heridas

La terapia fotodinámica inicialmente surgió como un tratamiento alternativo para ciertos tipos de cáncer, sin embargo, en los últimos años se ha investigado su uso como una técnica óptica en la curación de heridas. Existen algunos estudios en los que se hace uso de esta terapia empleando principalmente la luz roja e infrarroja. Entre los trabajos reportados recientemente, destaca el realizado por Dos Santos *et al.* en 2019 en el cual se evalúa la curación de quemaduras de segundo grado en un modelo murino, usando al fotosensibilizador azul de metileno a una concentración de 0.5 µg/mL aplicada tópicamente sobre la herida durante 5 minutos y, posteriormente fue irradiado a dos longitudes de onda 630 nm (luz roja) y 945 nm

(luz infrarroja) durante 1 minuto y 40 segundos, a una potencia de 70 mW y una densidad de energía de 7 J/cm^2 , durante 21 días consecutivos. Los resultados obtenidos mostraron una mayor epitelización, síntesis de colágeno, proliferación de queratinocitos y fibroblastos en el grupo irradiado a 630 nm (Dos Santos *et al.*, 2019).

Aún no existen estudios de curación de heridas usando la terapia fotodinámica con luz azul; sin embargo, se ha evaluado el efecto de la luz azul (por si sola) en un modelo de herida por raspado *in vitro* de fibroblastos humanos, en el cual se determinó el cierre de la herida, la síntesis total de proteína y colágeno, factores de crecimiento y expresión de citocinas (Masson *et al.*, 2016). En este estudio se creó una herida de raspado lineal y se irradió con un dispositivo LED a 470 nm (luz azul) a una potencia de 150 mW y una intensidad de 30 mW/cm^2 . Se usaron cuatro densidades de energía diferentes: 3, 5, 10 y 50 J/cm^2 (en próximas secciones se explicará cómo se calcula la densidad de energía). Los resultados reportados mostraron un cierre en la herida similar en los tres primeros grupos, con una ligera mejoría para la dosis de 5 J/cm^2 ; en cuanto a la concentración de la proteína total, esta se vio aumentada para la irradiación con 3, 5 y 10 J/cm^2 , alcanzando significancia en los 5 J/cm^2 , concluyendo que esta irradiación es la ideal para la síntesis de proteínas .

Por otro lado, fue reportado el uso de la terapia fotodinámica para aplicaciones antimicrobianas (Vieira *et al.*, 2014), empleando una longitud de onda en el azul y curcumina como fotosensibilizador. En un primer estudio (Vieira *et al.*, 2014), se evaluó el efecto de la terapia como enjuague bucal para la desinfección oral en 27 pacientes adultos, divididos en tres grupos: i) PDT, ii) luz azul y iii) fotosensibilizador. La concentración a la que se usó la curcumina fue de 30 mg/L, la cual fue irradiada con un dispositivo LED azul a 455 nm, a una intensidad de 600 mW/cm^2 y densidad de energía de 200 J/cm^2 durante 5 minutos; las muestras fueron recolectadas de los pacientes antes y después del tratamiento. Los resultados mostraron una reducción significativa en las UFC (unidades formadoras de colonias) en el grupo PDT postratamiento, después de 1 y 2 horas en comparación con el pretratamiento;

de igual forma existió una diferencia significativa en el grupo PDT, respecto al grupo luz y fotosensibilizador.

Finalmente, un estudio muy reciente probó la efectividad de la PDT antimicrobiana oral en 30 pacientes portadores y asintomáticos de SIDA (Da Silva *et al.*, 2020), en donde se usó una concentración de 0.75 mg/mL de curcumina, 10 mL de la solución de curcumina se rociaron en el área intraoral por paciente dejándolo por 10 minutos. Para la irradiación, se usó un dispositivo LED azul a una longitud de onda de 450 nm, con una intensidad de 67 mW/cm² y una densidad de energía de 20 J/cm². Se realizaron 2 muestras salivares por paciente, una antes y una después del tratamiento. Los resultados mostraron la efectividad de la terapia al reducir hasta en un 25% de lo normal los niveles de *Streptococcus spp.*, de igual forma se redujo *Staphylococcus spp.*, enterobacterias y el recuento total de microorganismos considerando el número de linfocitos TCD4 y TCD8 .

Como puede observarse, existen pocos estudios de terapia fotodinámica empleando luz azul, siendo aún menos los estudios reportados en la curación de heridas. Debido a lo anterior, en este proyecto de tesis se pretende estudiar a nivel histológico los efectos provocados por la PDT empleando al fotosensibilizador curcumina activado con luz azul en la regeneración de tejido.

2.2 Componentes de la terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica es el resultado de la combinación de tres elementos fundamentales: luz, fotosensibilizador y oxígeno (Taylor *et al.*, 2011). A continuación se describe cada uno de ellos y su papel en la PDT.

2.2.1 Luz

La luz es una onda electromagnética de naturaleza dual, es decir, se comporta como onda o como partícula llamada fotón (Ramos *et al.*, 2016). En el primer caso, se caracteriza por tener dos campos: uno eléctrico y otro magnético, los cuales se generan unos a otros y a su vez se propagan en el vacío u otro medio a una velocidad aproximada de $c=300,000$ km/s (Figura 2.1) (González, 2008). La energía

luminica puede tomar diferentes niveles de acuerdo a la longitud de onda con la que se presente (Parra, 2008). La longitud de onda (descrita por la letra griega λ), es la distancia que hay entre dos picos consecutivos en la onda, ya sean dos picos de mayor amplitud o dos picos de menor amplitud, como se observa en la Figura 2.1. De acuerdo con la ley de Planck ($E=hc/\lambda$, h es la constante de Planck y c la velocidad de la luz en el vacío), los fotones de longitud de onda larga llevan menos energía que los fotones de longitud de onda corta (Fodor *et al.*, 2011). De acuerdo con esta ley, el espectro electromagnético tendría este orden: ondas con frecuencia extremadamente baja, seguidas de ondas de radio, microondas, rayos infrarrojos, espectro visible por el hombre (400 a 700 nm), luz ultravioleta (UV), rayos X, rayos gamma y rayos cósmicos (Parra, 2008), es decir, ondas de menor a mayor energía como se observa en la Figura 2.2. En el caso de la terapia fotodinámica, la longitud de onda con la que se trabaja se sitúa dentro del espectro visible por el hombre (400-760 nm) (Fodor *et al.*, 2011).

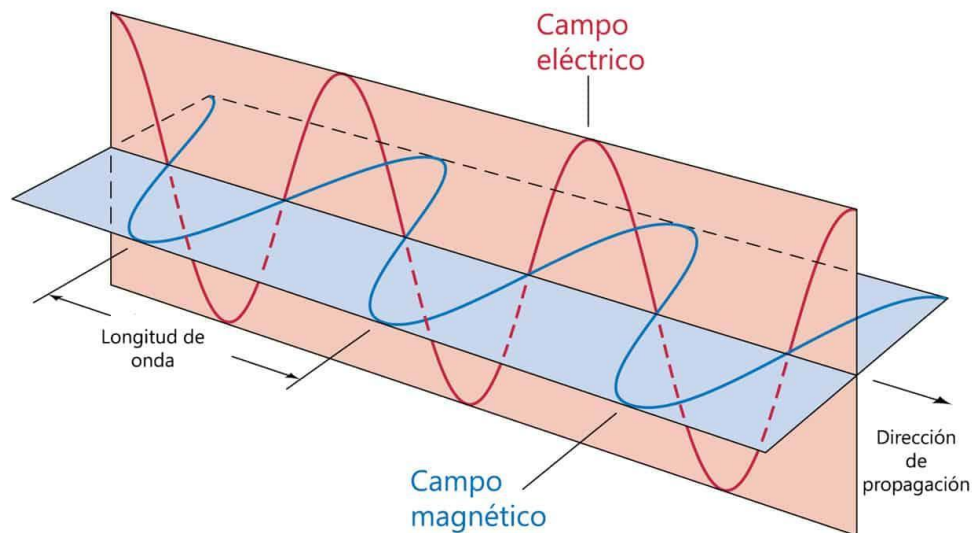


Figura 2.1: Representación de la luz como una onda electromagnética.

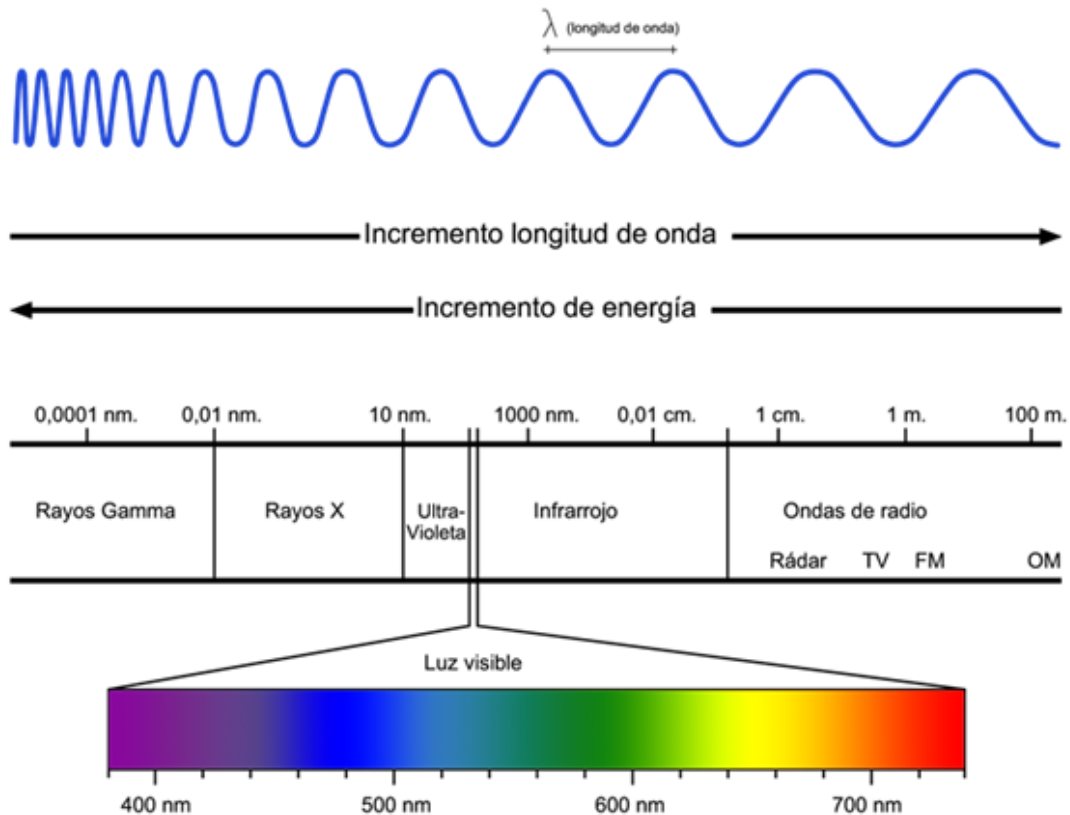


Figura 2.2: Espectro electromagnético.

Lámparas de diodos emisores de luz (LED)

La tecnología LED (Light Emitting Diodes), se basa en diodos semiconductores envueltos en una cápsula traslúcida que, al someterla a corriente eléctrica emite luz (Parra, 2008). Gracias a esta tecnología, fue posible la aparición de la terapia fotodinámica ya que, en comparación con los láseres, proporciona una salida de energía más baja, haciendo que la energía se disperse sobre una mayor superficie y, por tanto, el tratamiento sea más óptimo (Taylor *et al.*, 2011). Otra de las ventajas de los LEDs, es la emisión de longitudes de onda específicas, sin contaminación de otras longitudes, ni de radiaciones infrarroja o UV (Parra, 2008). Parámetros físicos que se deben tomar en cuenta al momento de realizar la terapia fotodinámica, ya que la irradiación ideal optimizará la terapia fotodinámica. Para empezar, debemos tener en cuenta la potencia del dispositivo emisor de luz, que se refiere a la cantidad de energía entregada durante un determinado periodo de tiempo, la cual se mide

en watts y se representa como $W= J/s$ [Joules/segundo] (Fodor *et al.*, 2011). El sistema LED suministra una dosis de energía en el área de piel tratada, esta energía se expresa en watts por centímetro cuadrado (W/cm^2), este parámetro se conoce como irradiancia (Sorbellini *et al.*, 2018). Finalmente, la fluencia o densidad de energía se refiere a la cantidad de energía (J) por unidad de superficie (cm^2), y se representa como $F=J/cm^2$ (Fodor *et al.*, 2011). Esta densidad de energía se puede obtener también al multiplicar la irradiancia (W/cm^2) por el tiempo de irradiación expresado en (s). En nuestro caso, la potencia del dispositivo fue estimada por un medidor de potencia óptica y el tiempo de irradiación fue calculado con la siguiente ecuación, dependiendo de la densidad de energía propuesta. En nuestro caso, el área corresponde al de una herida de un centímetro de diámetro.

$$\text{Densidad de Energía } \left(\frac{J}{cm^2} \right) = \frac{\text{Potencia (W)} \times \text{Tiempo (seg)}}{\text{Área (cm}^2\text{)}}$$

2.2.2 Fotosensibilizador

Los fotosensibilizadores, se caracterizan por la capacidad de absorber la energía de los fotones a una determinada longitud de onda, ya que cada molécula del fotosensibilizador tiene un espectro de absorción específico (Corrales, 1973). De igual forma, las moléculas deben tener una vida media corta y una rápida eliminación en los tejidos sanos (Gilaberte *et al.*, 2006), gracias a esto tienen la capacidad de acumularse en mayor cantidad, concentración y tiempo en células dañadas, y no en las células sanas (Ferriols & Pitarch, 2004). También, se debe tener en cuenta la baja toxicidad y con esto, conocer la estructura del compuesto (Bown, 2013). Gracias a esta capacidad, al ser administradas de manera controlada en organismos vivos, se vuelve una herramienta eficaz en el tratamiento de múltiples patologías (Comini & Núñez, 2016). Existen diversos fotosensibilizadores empleados para este fin, entre ellos, destacan las porfirinas, porfirogenos, clorinas, derivados de clorofila, azul, violeta o verde de metileno y rosa de bengala (Gilabert *et al.*, 2006). En algunos trabajos se han reportado propiedades fotofísicas y

fotoquímicas de la curcumina (Sarkar, 2018), por lo cual, se sugiere a la curcumina como un potencial fotosensibilizador en este proyecto de tesis.

Curcumina

En 1815 se aisló por primera vez la curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$) (ver Figura 2.3), principal polifenol curcuminoide encontrado en la cúrcuma, responsable de las propiedades medicinales y farmacológicas que se le atribuyen (González *et al.*, 2015). En la India, es usada para tratar infecciones, quemaduras, picaduras y enfermedades de la piel (Sarkar, 2018). El mecanismo antioxidante más conocido de la curcumina, es su capacidad para desactivar especies reactivas de oxígeno, principal responsable de la peroxidación de lípidos celulares. A nivel farmacológico, la curcumina es considerado como un compuesto de baja toxicidad (Silva, 2017) y una molécula cromófora que absorbe luz a una longitud de onda determinada (González *et al.*, 2015).

Algunos estudios sugieren que el espectro de absorción de la curcumina en una solución metanólica-acuosa se encuentre desde los 300 nm (UV-A) hasta los 500 nm (espectro visible), teniendo una máxima absorción en los 428 nm (Waranyoupalin *et al.*, 2009) (ver Figura 2.4). Alam *et al.*, 2012 dicen que el máximo de absorción de la curcumina en una solución 50/50 agua y metanol es de 423 nm y que el espectro de emisión va desde los 450 hasta los 700 nm, teniendo un máximo en los 548 nm (ver Figura 2.5). Curcumina en una solución de DMSO (Dimetilsulfóxido) presenta un máximo de absorción de 430 nm y una emisión máxima de 520; mientras que en una solución de cloroformo tiene un máximo de absorción 420 nm y una emisión de radiación a una longitud de onda de 500 nm (Ucisik *et al.*, 2013). Finalmente, el espectro de absorción de la curcumina en una solución metanólica y en una solución de DMSO en el UV-visible se encuentra entre los 300 y 500 nm; el máximo de la solución metanólica se encuentra en los 424 nm, mientras que en la solución DMSO en los 435 nm (Subhan *et al.*, 2014). Con estos estudios, nos podemos dar cuenta que, aunque se ocupen distintas soluciones para la curcumina, el espectro de absorción y de emisión no varía mucho.

Aunque la curcumina pueda absorber parte de la luz UV, esta longitud de onda no es empleada para fines de tratamiento, debido a que este tipo de radiación provoca daño celular. Por otra parte, no existen dispositivos LEDs que puedan emitir a una longitud de onda similar al pico máximo de absorción de la curcumina (~420 nm); sin embargo, la luz azul (470 nm) que emiten algunos dispositivos puede ser aún fuertemente absorbida por la curcumina.

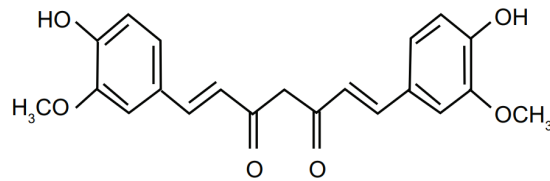


Figura 2.3: Diagrama molecular de la curcumina. (Fuente: Alam *et al.*, 2012).

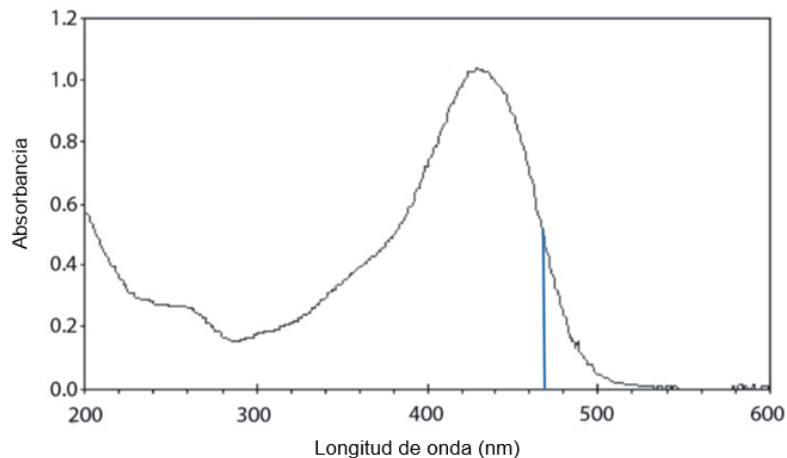


Figura 2.4: Espectro de absorción de la curcumina, en donde la línea azul corresponde a la longitud de operación (470nm) del dispositivo usado en este proyecto. Imagen modificada de Waranyoupalin *et al.*, 2009.

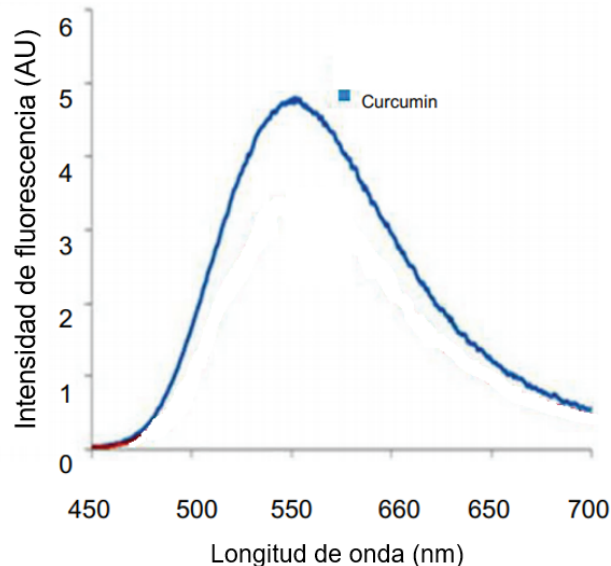


Figura 2.5: Espectro de emisión de la curcumina, cuyo pico máximo se sitúa a los 548 nm, correspondiente al color verde del espectro visible. Modificado de (Fuente: Alam *et al.*, 2012).

2.2.3 Oxígeno

El papel fundamental del oxígeno en la terapia fotodinámica, es la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), moléculas mensajeras (Carvajal, 2019) altamente reactivas y el subproducto natural del metabolismo normal del oxígeno. En condiciones normales, es decir, a bajas concentraciones, la importancia de dichas moléculas radica en regular procesos homeostáticos, señalización celular, (Rai, 2017) proliferación celular, diferenciación celular y apoptosis (Carvajal, 2019). Sin embargo, autores como Lozano & Fernández, 2018 y Prieto, 2019 afirman que a altas concentraciones de ROS, proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos se ven alterados o destruidos. Los agentes reactivos producidos por el oxígeno u otras moléculas que contienen oxígeno son: el estado singlete de oxígeno (1O_2), ion superóxido (O_2^-), hidróxido (OH) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Ramos *et al.*, 2016).

2.3 Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica

Una vez que el fotosensibilizador fue absorbido por el tejido, la zona a tratar es irradiada con una longitud de onda adecuada, los electrones del fotosensibilizador presentes en el estado basal absorberán la energía de los fotones (la luz), provocando que estos se exciten y pasen de un estado basal (de menor energía) a un estado excitado (de mayor energía). Después de esto, pueden ocurrir dos acciones: la primera opción es que los electrones regresen a su estado basal, produciendo fluorescencia, es decir, emitiendo un fotón de menor energía; una segunda opción, es que el electrón sea transferido a un estado triplete. En este estado, los electrones son un poco más estables y pueden permanecer unos cuantos microsegundos.

En el estado triplete, nuevamente pueden ocurrir dos acciones, los electrones pueden regresar al estado base mediante la emisión de un fotón de menor energía, es decir por fosforescencia; o puede interactuar con el oxígeno o moléculas que contienen oxígeno presentes en el medio ambiente. Lo anterior se da a través de 2 vías: la primera, se da por la transferencia de electrones de este estado, para la formación de ROS como superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2); mientras que la tipo 2 producirá oxígeno singlete (1O_2) conocido por ser un agente oxidante (Taylor *et. al.*, 2011) (Gupta *et al.* 2013) (Ramos *et. al.*, 2016) (ver Figura 2.6).

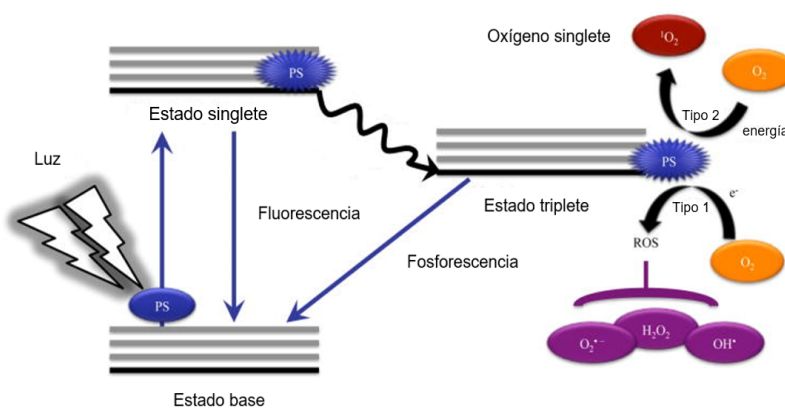


Figura 2.6: Mecanismo de acción para la producción de especies reactivas de oxígeno. Modificado de (Fuente: Gupta *et al.* 2013).

2.4 Referencias

- Alam, S., Panda, J.J., & Chauhan, V.S. (2012). Novel dipeptide nanoparticles for effective curcumin delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 2(7), pp.4207-4222.
- Bown, G. (2013). Photodynamic therapy for photochemists. *Phil. Trans. R. Soc. A*, 371:20120371.
- Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Revista medicina legal de Costa Rica*, 36,1.
- Comini, L. R., & Núñez, S. (2016). Fotosensibilizadores naturales activos en terapia fotodinámica. *Revista electrónica de la Facultad de Ciencias Químicas*, 3 (7).
- Corrales, H. (1973). Fotodermatosis. *Revista Médica Hondureña*, 41.
- Da Silva, F. C, et al., (2020). Total mouth photodynamic therapy mediated by blue led and curcumin in individuals with AIDS, *Expert Review of Anti-infective Therapy*.
- Dos Santos et al., (2019). Comparative study in photodynamic therapy using the same photosensitizer in tissue repair after second-degree burns in an experimental model, *Laser in Dental Science*.
- Ferriols, F., & Pitarch, J. (2004). Principios de la fototerapia y su aplicación en el paciente oncológico. *FARM HOSP (Madrid)*, 28 (3), pp. 205-213.
- Fodor, L., Elmar, M., & Ullmann, Y. (2011). Light Tissue Interactions. En *Aesthetic Applications of Intense Pulsed Light*. Springer London.
- Gilaberte, Y., Serra, C., Heras, M. E., et al. (2006). Terapia fotodinámica en dermatología. *Actas Dermosifiliogr*, 97 (2), pp. 83-102.
- González, A. (2008) ¿Qué es la luz?. *Lat. Am. J. Phys. Educ.*, 2 (1), pp. 51-53.
- González, J., Sanz, D., Claramunt, R. M., et al. (2015). Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological properties. *Real Academia de Farmacia*, 81 (4), pp. 278-310.

Gupta, A. *et al.*, (2013). Shining light on nanotechnology to help repair and regeneration. *Biotechnology advances*, 31(5), pp 607-631.

Lozano, C., & Fernández, F. (2018). Especies reactivas de oxígeno y su implicación en biomedicina. *An. Vet. (Murcia)*, 34.

Masson, D. S., Vakunseh. V., & Enwemeka C. S. (2016). Blue light does not impair wound healing *in vitro*, *Journal of Photochemistry & Photobiology*. 160, pp. 53-60.

Moreno, G. A., Eng, A., Alvarado, A., & Camps, A. (2007). Terapia fotodinámica. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 35 (6), pp. 255-268.

Parra, L. A. (2008). Terapia biofotónica: fundamentos, aplicaciones y protocolos de tratamiento. Centro de Medicina Estética e Investigación.

Prieto, D. (2019). Especies reactivas de oxígeno: papel en la función vascular y en la disfunción endotelial asociada a la enfermedad metabólica. *An Real Acad Farm*, 89,4.

Rai, V. (2017). Role of Reactive Oxygen Species in Low-Level Laser Therapy. En *Handbook of Low-Level Laser Therapy*. (pp. 141-158) Estados Unidos de América: Pan Stanford Publishing.

Ramos, R., Spezzia, T., & Ramírez, J. C. (2016). La biofotónica y tu salud. *Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*, 67 (3), pp.

Ruíz, J., & Rebollo, N. (2009). Terapia fotodinámica en dermatología. *Dermatología Revista Mexicana*, 53 (4), pp. 178-186.

Sarkar, T. (2018). Visible Light-Induced Cytotoxicity of Curcumin and its Iron (III) Complex. En *Top 10 Contributions on Biochemistry*, 2nd edition. Copyright: ©.

Silva, M. F. (2017). Estabilización de la curcumina mediante su encapsulación en nanosistemas O/W: estudio de la fotólisis y oxidación (tesis de pregrado). Universidad de Chile, Santiago de Chile.

Sorbellini, E., Rucco, M., & Rinaldi, F. (2018). Photodynamic and photobiological effects of light-emitting diode (LED) therapy in dermatological disease: an update. *Lasers in Medical Science*, 33, pp. 1431-1439.

Subhan, M.A., Alam, K., Rahaman, M.S., Rahman, M.A., & Awal, M.R. (2014). Synthesis and Characterization of Metal Complexes Containing Curcumin (C₂₁H₂₀O₆) and Study of their Anti-microbial Activities and DNA Binding Properties. *Journal of Scientific Research*, 6(1), pp.97-109.

Taylor, V. M., Cedeño, Cedeño, D. L., & Robledo, S. M. (2011). Fototerapia para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. *Infectio*, 15 (4), pp. 277-288.

Ucisik, M.H., küpcü, S., Schuster, B., & Sleytr, U. B. (2013). Characterization of CurcuEmulsomes: nanoformulation for enhanced solubility and delivery of curcumin. *Journal of Nanobiotechnology*, 11(37).

Vieira, D. P., Paolillo, R. F., Nogueira, T., Fontana, C. R., & Salvador, V. (2014). Effects of Photodynamic Therapy with Blue Light and Curcumin as Mouth Rinse for Oral Disinfection: A Randomized Controlled Trial, *Photomedicine and Laser Surgery*, 32 (11), pp. 627-632.

Waranyoupalin, R. *et al.*, (2009). Studies on complex formation between curcumin and Hg (II) ion by spectrophotometric method: A new approach to overcome peak overlap. *Central European Journal of Chemistry*, 7(3), pp. 388-394.1

3. Espectroscopía FTIR

La espectroscopia, es una técnica óptica con la capacidad de proporcionar información para la caracterización de muestras, ya sean líquidas, soluciones, pastas, polvos, películas, fibras, gases y hasta muestras presentes en superficies de sustrato (Nandiyanto *et al.*, 2019). Una de las técnicas espectroscópicas más utilizadas es la *Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier* (FTIR, por sus siglas en inglés). Como su nombre lo menciona, esta técnica trabaja en el espectro del infrarrojo (IR), por tanto, para poder obtener información las muestras son sometidas a esta radiación (Dole *et al.*, 2011). Una vez que las muestras son sometidas a la radiación IR, los fotones serán absorbidos o transmitidos, dependiendo de la muestra.

En este proyecto de tesis, se abordará únicamente la absorbancia, es decir, parte de la luz irradiada sobre la muestra será absorbida, mientras que la luz sobrante es transmitida a un interferómetro para luego ser recolectada por un detector, dando como resultado un espectro de absorbancia molecular (Crane & Elster, 2012). El principio de dicha técnica es la excitación y vibración de los distintos compuestos químicos presentes en las muestras; debido a que los grupos funcionales absorben o transmiten radiaciones a distintos números de onda (inverso de la longitud de onda, $1/\lambda$) se originan picos espectrales característicos, proporcionando una huella espectral única para cada muestra. Esta huella espectral, facilita la determinación de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos o carbohidratos (Novais *et al.*, 2019).

Otra de las características que se debe tener en cuenta respecto al espectro IR utilizado en la espectroscopia FTIR, es que este espectro se subdivide en 3 regiones respecto al número de onda. Por un lado, está el IR cercano ($<400\text{ cm}^{-1}$), seguido del IR medio ($400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) y finalmente el IR lejano ($4000\text{-}13000\text{ cm}^{-1}$). Es importante mencionar que todas las regiones son igual de válidas a la hora de realizar algún estudio, pero la región de mayor uso para hacer investigaciones y en la cual nos basamos para este proyecto de investigación, es la del IR medio. Dicha zona, a su vez se va a subdividir en 4 regiones bien diferenciadas entre sí: i) la

región de enlace único (2500-4000 cm^{-1}), *ii*) la región de triple enlace (2500-2000 cm^{-1}), *iii*) la región de doble enlace (1500-2000 cm^{-1}) y *iv*) la región de las huellas dactilares (600-1500 cm^{-1}), estas regiones se pueden observar con mayor facilidad en la Figura 3.1 (Nandiyanto *et al.*, 2019).

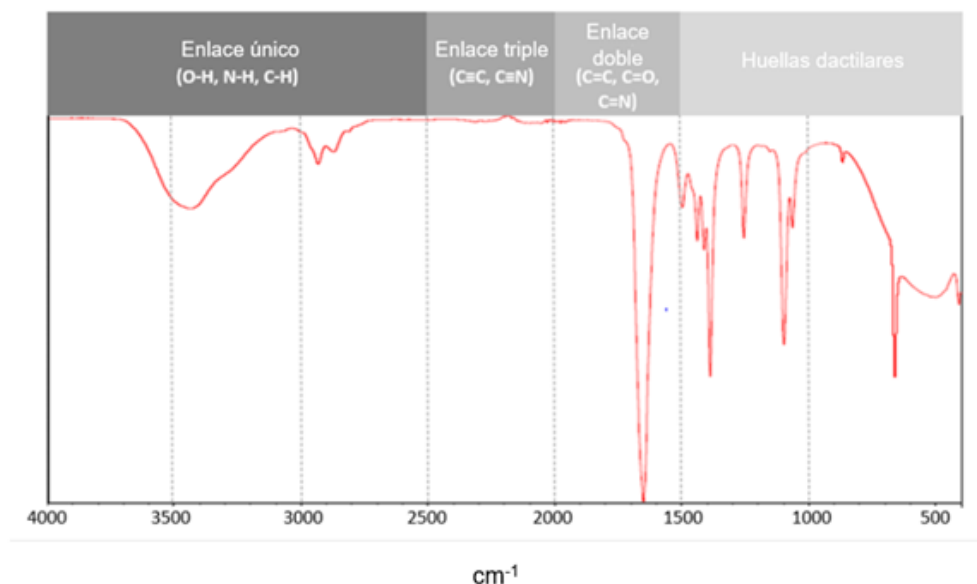


Figura 3.1: Representación de las regiones del IR medio (Fuente: modificada de Nandiyanto *et al.*, 2019).

3.1 Antecedentes de la FTIR en lesiones de piel

La FTIR se ha empleado en distintos ámbitos de la ciencia para la caracterización de muestras inorgánicas principalmente; sin embargo, en esta sección abordaremos estudios en los que se ha empleado específicamente para identificar compuestos presentes en la piel después de alguna lesión. Como se sabe, el cáncer de piel es uno de los cánceres de mayor prevalencia en los humanos y los tratamientos tradicionales para su curación son caros, debido a ello se ha optado por el uso de la PDT, como en la publicación reportada por Lima *et al.*, 2016. En este estudio, se indujeron lesiones neoplásicas en ratones suizos hembra con el fin de obtener carcinomas de células escamosas cutáneas; 50 ratones fueron divididos en tres grupos: G1 (piel sana) este grupo sólo recibió aplicación tópica de acetona, G2

(tejido neoplásico) tanto este grupo como el G3 se sometieron a carcinogénesis química y el grupo G3 (lesiones neoplásicas post PDT) se sometió a una aplicación única de PDT, en la cual se utilizó una crema preparada con el principio activo del ácido 5-aminolevulínico (ALA) e irradiada con un dispositivo LED a una longitud de onda de 630 nm (luz roja) y una densidad de energía de 12 J/cm². Después de 10 días, los animales fueron sacrificados, se obtuvieron biopsias y se procesaron para su caracterización por espectroscopia FTIR en modo reflexión total atenuada. Las mediciones se realizaron en la región del infrarrojo medio (4000-400 cm⁻¹) a una resolución espectral de 4 cm⁻¹ y 100 escaneos por espectro. Los resultados de este trabajo mostraron picos muy similares en los tres grupos, los cuales se situaron en los 1028, 1082, 1151, 1204, 1236, 1338, 1517, 1624 y 1650 cm⁻¹; estos picos se asocian con glicógenos (1028, 1082 y 1151 cm⁻¹), fosfato (1082 y 1236 cm⁻¹), colágeno (1204, 1236, 1282 y 1338 cm⁻¹) y amidas I y II (1517, 1624 y 1650 cm⁻¹).

Otro estudio en el que se utilizó la PDT en conjunto con la espectroscopia FTIR fue a través de una enfermedad parasitaria que afecta directamente la piel, denominada Leishmaniasis cutánea (Fagundes *et al.*, 2018)]. Esta enfermedad es causada por un protozoo del género *Leishmania* y transmitida por la picadura de un mosquito del género *Lutzomyia*. El objetivo de este trabajo, fue investigar el efecto de la PDT sobre *Leishmania major*, en donde fue empleado el fotosensibilizador azul de metileno a una concentración de 500 µg/ml (0.9 mM); para la irradiación, se utilizó un dispositivo LED a una longitud de onda de 660 nm (luz roja), con una potencia de 70 mW y una densidad de energía de 10 J/cm² durante 6 minutos y 40 segundos. Los tratamientos se dividieron en cuatro grupos: *i*) no tratado (CTL), *ii*) irradiado (I), *iii*) azul de metileno (MB) y *iv*) MB+I (PDT). Los cultivos de los tratamientos se mantuvieron incubados durante 18 horas para su posterior análisis por espectroscopía FTIR. Los espectros se obtuvieron en modo transmisión, a una resolución de 4 cm⁻¹ y 64 escaneos por espectro. Los principales picos obtenidos sugieren la presencia de lípidos (2959, 2917, 2848, 1406 y 1457 cm⁻¹), proteínas (1675, 1546 y 1322 cm⁻¹) y ácidos nucleicos (1079 y 1237 cm⁻¹). De igual forma, se obtuvo el área porcentual bajo las curvas obtenidas de los espectros, donde se encontró que la PDT disminuye específicamente el área bajo la curva en los 2966 y

2945 cm^{-1} , correspondiente a los lípidos. En el caso de fosfolípidos/colesterol correspondiente a los 1740 cm^{-1} el área se ve disminuida con MB y PDT; para las proteínas (1580, 1546 y 1322 cm^{-1}) el área bajo la curva se ve aumentada después de aplicar la PDT; para los carbohidratos, como monosacáridos, disacáridos, polisacáridos y glucanos se encontró que la PDT los disminuye. Finalmente se encontró que el aumento del material nuclear es muy poco después de la PDT.

Recientemente, Sakane *et al.*, 2020 investigaron los cambios bioquímicos en *Leishmania braziliensis* tratados con PDT a través de la espectroscopía FTIR. Este estudio fue dividido en cuatro grupos: *i*) control (C), *ii*) fotosensibilizador (PS), *iii*) luz (IR) y *iv*) terapia fotodinámica (PDT); se utilizó como fotosensibilizador al azul de metileno a una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ (0.9 mM), las irradiaciones se llevaron a cabo con un dispositivo LED con una longitud de onda de 660 nm y una densidad de energía de 10 J/cm^2 . Los cultivos se mantuvieron durante 18 horas y se prepararon para el análisis FTIR. Los resultados de este trabajo, mostraron picos en los 1088, 1244, 1393, 1453, 1654, 2853, 2924, 2964 y 3292 cm^{-1} , lo cual indica la presencia de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos. Algo que se observó en este estudio, fue que el fotosensibilizador juega un papel importante ya que aumenta la presencia de lípidos; para el caso de las proteínas se pudo observar que estas aumentan con la PDT; los ácidos nucleicos y los carbohidratos tienden a disminuir posterior al tratamiento con PDT.

3.2 Espectros de la piel

Como se mencionó anteriormente, la espectroscopía FTIR es una técnica óptica muy efectiva y de gran ayuda para la caracterización de compuestos. En los últimos años ha sido utilizada para poder identificar compuestos presentes en la piel de manera no invasiva ni destructiva, gracias a esta capacidad se han podido identificar de forma precisa moléculas presentes en la matriz extracelular (Crane & Elster, 2012). Por tanto, puede considerarse como una herramienta complementaria al análisis histológico, con la gran ventaja de poder usar la misma biopsia para ambas

técnicas analíticas (Lima *et al.*, 2015). Una de las formas en las que se utiliza la espectroscopia FTIR al momento de analizar muestras biológicas, es con el modo Reflexión Total Atenuada (ATR, por sus siglas en inglés) (Castro *et al.*, 2016), en dicha configuración la muestra es puesta en contacto con un cristal, al cual se le denomina cristal ATR, cuya principal característica es su alto índice de refracción debido al material con el cual está hecho, el cual puede ser el seleniuro de zinc (ZnSe) o el bromoyoduro de talio (KRS-5). El funcionamiento de dicha técnica inicia cuando el haz de luz infrarroja es enfocado en el borde biselado del elemento ATR a través de un conjunto de espejos, el cual se va a reflejar a través del cristal para posteriormente dirigirse al detector mediante otro grupo de espejos. El material que está en contacto con la superficie reflectante absorbe de manera selectiva la radiación y esta a su vez pierde energía en la longitud de onda donde el material absorbe, por tanto, la radiación atenuada resultante es medida y trazada mediante el espectrómetro, y esto se hace en función de la longitud de onda. Finalmente, la profundidad de penetración se da mediante la función de la longitud de onda (λ), el índice de refracción del cristal (n_2) y el ángulo de radiación incidente (θ) (Figura 3.2) (Dole *et al.*, 2011). Otra de las ventajas de la espectroscopia ATR-FTIR en comparación con otros métodos de caracterización de compuestos, es que nos proporciona un espectro único de la muestra (Lima *et al.*, 2015).

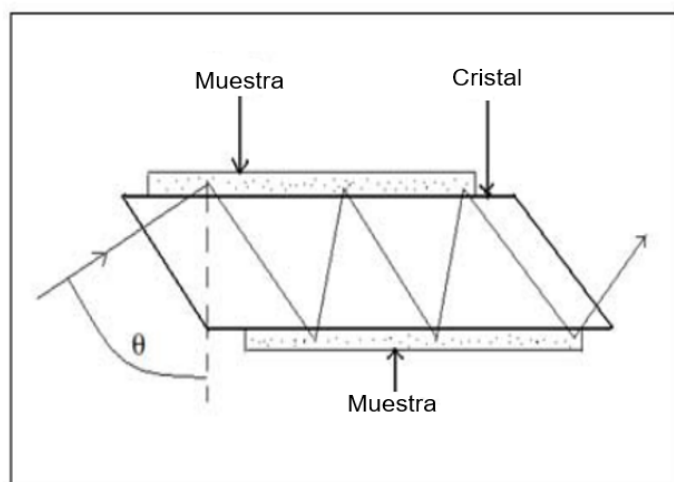


Figura 3.2: Diagrama esquemático del funcionamiento de la ATR (Fuente: modificada de Dole *et al.*, 2011)

La determinación de compuestos presentes en la piel a través de la espectroscopia FTIR, se obtuvieron a través de distintos estudios. En el primero de ellos, se logró identificar las características bioquímicas mediante dos tipos de melanoma; uno murino de la línea celular B16F10 y uno humano de la línea celular C8161. Se utilizó un rango espectral de $4000-900\text{ cm}^{-1}$, una resolución de 2 cm^{-1} y 32 escaneos por espectro. En los resultados obtenidos de este trabajo, se observaron bandas de absorción asociadas a lípidos, las cuales se situaron entre los 3100 y 2800 cm^{-1} , proteínas entre los 1700 y 1400 cm^{-1} y ADN entre los 1300 y 900 cm^{-1} (Figura 3.3). Para tener un estudio más completo, se realizó una tabla en la que se representan los picos relacionados con la piel con su respectiva asignación biológica y química (Figura 3.4) (Mostaço *et al.*, 2009).

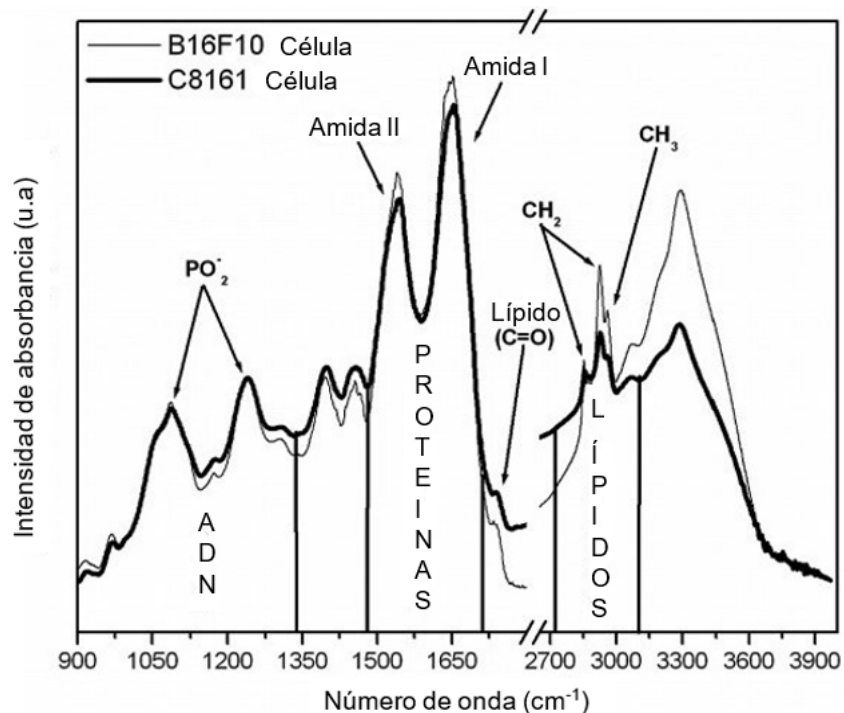


Figura 3.3: Picos espectrales de líneas celulares de melanomas murino y humano en donde se pueden observar algunas de las estructuras que conforman la piel (Fuente: modificada de Mostaço *et al.*, 2009)

Las asignaciones espectrales de C8161, células de melanoma humano; B16F10, células de melanoma

		Posición del pico (cm ⁻¹)										Asignación	
Este artículo		McIntosh et al. (12)				Hammody et al. (25)		Wong et al. (9)	Brancaleon et al. (17)	Barry et al. (21)			
C8161	B16F10	FS	BCC	ET	DT	MT	ET	BCC and NS	HSC	HSC	Química	Biológica	
916.1 ± 0.7	917.0 ± 1.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C—O str.	Ribosa	
968.3 ± 1.3	966.4 ± 0.5	980	980	980	980	970.4 ± 0.4	968.5 ± 1.9	970	—	—	C—C str. and C—O str.	ADN	
—	—	—	—	—	1035 (*)	—	—	1031	—	—	Sym. C—O str. and bend.	(*) Colágeno/carbohidratos	
1050.3 ± 0.6	1049.8 ± 0.7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Sym. C—O str.	Polisacárido	
—	—	—	1055	1055	—	—	—	1055	—	—	Sym. C—O str.	Oligosacáridos	
1085.6 ± 0.6	1087.7 ± 0.6	1080	1082	1082	1080 (*)	1081.2 ± 0.3	1081.8 ± 0.3	1082	—	—	Sym. PO ₂ str.	(*) Colágeno/ADN/ARN	
1122.0 ± 0.6	1120.7 ± 0.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Sym. C—N str. and sym. C—C str.	ARN	
1169.1 ± 0.7	1169.4 ± 0.5	—	1162	1162	—	—	—	1162	—	—	Asym. C—O str.	Serina, treonina y tirosina de proteínas celulares y carbohidratos	
—	—	—	—	—	1204	—	—	—	—	—	C—O—C str.	Colágeno	
1237.3 ± 1.5	1238.1 ± 0.7	1240	1241	1241	1240 (*)	1238.6 ± 0.3	1240.2 ± 0.3	1241	—	1247	Asym. PO ₂ str.	(*) Colágeno/ADN	
—	—	—	—	—	1280 (*)	—	—	—	—	1298	Deformation N—H	(*) Colágeno/citosina	
1308.1 ± 1.5	1308.2 ± 1.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Amida III	
—	—	—	—	—	1330 (*)	—	—	—	—	—	*C—O/CH ₂ wag.	Colágeno	
1396.4 ± 1.2	1393.6 ± 0.5	—	—	—	—	—	—	—	—	1360–1500	Sym. CH ₃ bend. and scis.	Proteínas y lípidos	
1452.8 ± 1.0	1452.6 ± 1.1	—	1456	1456	—	—	—	1456	—	—	Asym. CH ₃ bend., scis.	Proteínas y lípidos	
1543.0 ± 1.1	1543.0 ± 0.5	1500–1600	—	—	1500–1600	1544.7 ± 0.9	1545.4 ± 0.4	—	1500–1700	1550	N—H bend. and sym. C—N str.	Amida II	
—	—	1600–1700	—	—	1634 (*)	—	—	—	—	—	C=C str. and C=O str.	(*) Colágeno/uracilo	
1646.9 ± 1.5	1641.2 ± 2.3	—	—	—	1600–1700	—	—	—	—	—	C=O str.	Estructura lámina β-Amida I	
1652.6 ± 3.3	1653.6 ± 0.8	—	—	—	—	1648.7 ± 0.7	1650.9 ± 0.2	—	—	1650	C=O str.	Estructura hélice α-Amida I	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	1710	—	C=O str.	Lípidos (sebo)	
1739.5 ± 0.7	1740.7 ± 0.2	1740	—	—	1740	—	—	—	1740	1743	C=O str.	Lípidos (sebo)	
2851.9 ± 0.7	2851.3 ± 0.4	2800–3000	2851	2851	2800–3000	—	—	2851	2850	2700–3100	Sym. CH ₂ str.	Lípidos de ácidos grasos	
2922.7 ± 0.7	2922.2 ± 0.6	—	—	—	—	—	—	—	2920	—	Asym. CH ₂ str.	Lípidos de ácidos grasos	
2962.0 ± 0.8	2960.8 ± 0.3	—	2958	2958	—	—	—	2958	—	—	Asym. CH ₃ str.	Cadenas de acilo (lípidos)	
3062.1 ± 1.6	3061.5 ± 0.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Sym. CH ₃ str.	Cadenas de acilo (lípidos)	
3184.2 ± 2.7	3186.5 ± 0.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Sym. N—H str.	Subestructuras ordenadas-cis	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3200	Sym. O—H str.	Agua	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	3300 (*)	3300	Sym. N—H str.	(*) Agua/amida A (proteínas queratinizadas)	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3400	O—H str.	Cabeza polar lipídica	

Figura 3.4: Asignaciones química y biológica de los picos encontrados en las células de melanoma humano y murino (Fuente: modificada de Mostaçõ *et al.*, 2009)

En un estudio más reciente publicado por Castro *et al.*, 2020, la determinación de los componentes de la piel se realizó en heridas causadas por quemaduras, para ello se utilizó como modelo experimental a ratas Wistar. Los datos espectrales se realizaron en los días 3, 7, 14 y 21; las mediciones se obtuvieron en la región media del infrarrojo (4000-400 cm⁻¹), a una resolución espectral de 4 cm⁻¹ y 150 escaneos por espectro, en modo de reflectancia total atenuada. Los principales resultados obtenidos de este trabajo, se muestran en la Figura 3.5.

Asignaciones biológicas para los modos vibracionales observados en la segunda derivada del promedio espectral.

Banda (cm ⁻¹)	Asignación
1029	Carbohidratos
1082	Carbohidratos y ácidos nucleicos
1202	Proteínas
1235	Proteínas y ácidos nucleicos
1280	Proteínas
1340	Proteínas
1626	Proteínas
1653	Proteínas
1745	Lípidos
2852	Lípidos
2924	Lípidos

Figura 3.5: Componentes encontrados en la piel de ratas Wistar expuestas a quemaduras (Fuente: modificada de Mostaço *et al.*, 2009)

Como puede observarse, la espectroscopia es una técnica óptica poco empleada para la identificación de compuestos en la piel, por lo cual, en este proyecto de tesis proponemos el uso de la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), la cual no ha sido utilizada sobre cortes histológicos para la identificación de marcadores de cicatrización de heridas tratadas y no tratadas con terapia fotodinámica empleando curcumina y luz azul.

3.3 Referencias

Castro, P. A. A., Lima, C. A., Santos, M. O., & Zezell, D.M. (2016). ATR-FTIR spectroscopy and multivariate analysis for thermal burned skin classification. Latin America Optics and Photonics Conference,

Castro, P. A. A., Lima, C. A., Morais, M. R. P. T., Zorn, T. M. T., & Zezell, D. M. (2020). Monitoring the progress and healing status of burn wounds using infrared spectroscopy. *Applied spectroscopy*, 74(7), pp. 758-766.

Crane, N. J., & Elster, E. A. (2012). Vibrational spectroscopy: a tool being developed for the noninvasive monitoring of wound healing. *J. Biomedical Opt.*, 17(1).

Dole, M. N., Patel, P. A., Sawant, S. D., & Shedpure, P. S. (2011). Advance applications of Fourier transform infrared spectroscopy, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 7, pp. 159-166.

Fagundes *et al.*, (2018). Evaluation of photodynamic therapy with methylene blue, by the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) in *Leishmania major-in vitro*.

Lima, C. A., Goulart, V. P., Correa, L., & Zezell, D. M. (2015). ATR-FTIR Spectroscopy for the Assessment of Biochemical Changes in Skin Due to Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, pp. 6621-6630.

Lima, C. A., Goulart, V. P., Correa, L., & Zezell, D. M. (2016). Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy to evaluate biological effects induced by photodynamic therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*, 48, pp. 538-545.

Mostaço, L. B., Murakami, L. S., Nomizo, A., & Bachmann, L. (2009). Fourier Transform Infrared Spectroscopy of skin cancer cells and tissues. *Applied spectroscopy reviews*, 44 (5), pp. 438-455.

Nandiyanto, A. B., Oktiani, R., & Rafadhita, R. (2019). How to read and interpret FTIR spectroscope of organic material. *Indonesian Journal of Science & Technology*, 4 (1), pp. 97-118.

Novais, A., Freitas, A. R., Rodrigues, C., & Peixe, L. (2019). Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 38, pp. 427-448.

Sakane, K. K. *et al.*, (2020). Biochemical changes in *Leishmania braziliensis* after photodynamic therapy with methylene blue assessed by the Fourier transform infrared spectroscopy. *Lasers Med Sci*.

4. Procedimiento experimental

4.1. Población de estudio

Este proyecto de investigación fue aprobado y avalado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad (CICUAL-BUAP), con clave de proyecto: GASW-UAL-17. Se utilizaron un total de 6 ratas macho de la especie *Rattus norvegicus* (alopécicas) (Figura 4.1) de 4 semanas de edad con un peso aproximado de entre 100 y 120 g, las cuales fueron criadas en el Bioterio Claude Bernard, perteneciente a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Cabe destacar que todos los protocolos que se realizaron se basaron en la NOM-062-ZOO-1999. Durante todo el proceso del estudio, las ratas se mantuvieron en cajas plásticas y bajo condiciones ambientales óptimas (periodos de luz/oscuridad de 12/12 y temperatura de 21°C), de igual forma se les proporcionó comida de laboratorio estándar y agua *Ad libitum*.



Figura 4.1: Rata alopécica de la especie *Rattus norvegicus*.

4.2 Procedimiento quirúrgico

Antes de iniciar con la cirugía, las ratas fueron marcadas con un plumón en la parte inicial de la cola, esto con el fin de facilitar su identificación; de igual modo se separaron aleatoriamente en dos grupos: Grupo Control y Grupo PDT Azul. Una vez identificadas las ratas, se anestesiaron vía intraperitoneal con Xilacina-Ketamina en

una dosis de 0.20 mL/100 g. de peso. Con ayuda de unas tijeras curvas de punta roma y pinzas dentadas previamente esterilizadas se realizaron dos heridas de 1 cm de diámetro en la parte dorsal, justo a la altura de la última costilla (Figura 4.2). Mientras se realizaba este procedimiento se pusieron gotas oftalmológicas para evitar desecación ocular y la irritación. Cuando los individuos se despertaron de la anestesia fueron puestos en cajas distintas, a fin de evitar el contacto entre ellos; fue en el día 2 en el que se colocaron tres ratas por caja.

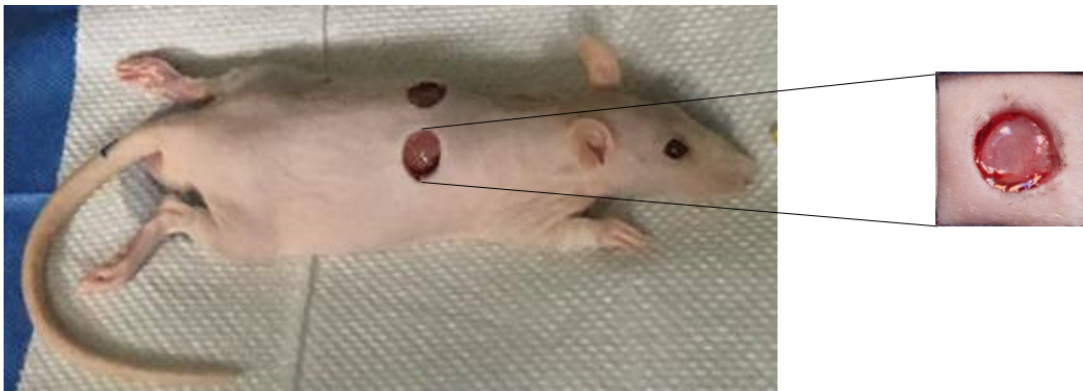


Figura 4.2: Localización anatómica y representación de las heridas quirúrgicas de 1 cm de diámetro.

4.3 Grupos experimentales y tratamiento

4.3.1 Grupo Control

Tres de las seis ratas fueron incluidas en este grupo, al cual no se le realizó ningún tipo de tratamiento óptico, solamente se sometieron a heridas quirúrgicas. A una rata se le dio un seguimiento durante 21 días (del proceso de cicatrización) a través de fotografías convencionales con una cámara semiautomática. Un individuo se sacrificó en cámara de CO₂ el día 7, otro al día 14 y finalmente el último al día 21 posterior al sacrificio se tomaron biopsias del tejido cicatricial para su análisis.

4.3.2 Grupo PDT Azul

Las tres ratas restantes se incluyeron en este grupo, en donde una vez realizadas las heridas quirúrgicas, se aplicó a cada herida el fotosensibilizador curcumina a

una concentración de $10 \mu\text{M}$ y se dejó actuar sobre la herida durante 5 minutos, durante este tiempo las heridas se cubrieron para evitar que tuviera contacto con la luz ambiental y el fotosensibilizador fuera activado. Inmediatamente pasados los 5 minutos y para activar al fotosensibilizador, la herida se irradió durante 3 minutos con un dispositivo LED de luz azul a una longitud de onda de 470 nm (Figura 4.3), a una densidad de energía de 10 J/cm^2 . Este dispositivo se fabricó por investigadores y estudiantes de posgrado del Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE). El tratamiento se aplicó durante tres días seguidos a partir de la cirugía, es decir, el primer día de tratamiento fue el día en que se hicieron las heridas considerado como día cero; el día posterior a la cirugía como el día uno y así sucesivamente. Al igual que el grupo control, a una rata se le dio un seguimiento durante 21 días durante el proceso de cicatrización, esto a través de fotografías convencionales (Figura 4.4) con una cámara semiautomática. Un individuo se sacrificó en cámaras de CO_2 al día 7, otro al día 14 y finalmente el último al día 21.



Figura 4.3: Aplicación del fotosensibilizador curcumina sobre la herida, a una concentración de $10 \mu\text{M}$ (izquierda). Irradiación con luz azul (470 nm) a una densidad de energía de 10 J/cm^2 sobre las heridas.

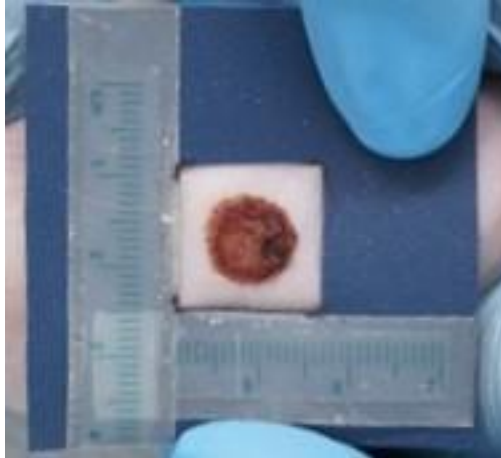


Figura 4.4: Ilustración del seguimiento del proceso de cicatrización a través de fotografías convencionales

4.4 Procedimiento histológico

Las biopsias del tejido cicatricial obtenidas de las ratas sacrificadas (días 7, 14 y 21), fueron fijadas durante una semana en paraformaldehído al 4%. Posterior a la fijación, se deshidrataron en alcoholes de diferentes concentraciones (70, 96 y 100%). Los cambios se hicieron cada 24 horas; para la concentración de 96 y 100% se realizaron 2 cambios. Para el aclaramiento, la muestra permaneció 24 horas en cloroformo y se realizó un segundo cambio de 1.30 horas. Para hacer los cortes histológicos, las muestras se incluyeron en bloques de parafina. Una vez solidificado, la muestra se llevó a un microtomo de rotación y se hicieron cortes de 20 y 50 μm , los cuales fueron montados en portaobjetos (Figura 4.5).

Los cortes de 20 μm fueron teñidos con la técnica hematoxilina-eosina, cuyos colorantes se unen de manera específica a determinadas estructuras del tejido; la hemateína, es el producto oxidado de la hematoxilina, el cual teñirá sustancias como la cromatina del núcleo y las agregaciones ribosomales del citoplasma. En el caso de la eosina, cuyo colorante es ácido, se une a elementos del citoplasma y de la matriz extracelular. Colágenos, músculos, queratina y citoplasmas se tiñen desde un rosa pálido hasta un rojo intenso; mientras que los núcleos se tiñen de azul

oscuro o púrpura (Megías *et al.*, 2018). Finalmente se observaron en un microscopio y se fotografiaron (Figura 4.6). Las muestras de 50 μm de grosor fueron llevadas al CIBA (Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada) del IPN campus Tlaxcala, para su posterior análisis por espectroscopía FTIR.



Figura 4.5: Representación ilustrada de la preparación de las biopsias para su posterior análisis.



Figura 4.6: Imagen superior representan las laminillas con los cortes histologicos; Imagen intermedia representa el tren de tinción usando la técnica Hematoxilina-Eosina para obtener las histologías de los días 7, 14 y 21; Imagen inferior representa una histologia observada en el microscopio óptico.

4.5 Espectros FTIR

Para obtener los espectros FTIR de los cortes histológicos de 50 μm , las muestras tenían que estar desparafinadas, sin teñir y sin cubreobjeto, esto con el fin de evitar que la radiación IR se reflejara en el vidrio del cubreobjeto y evitar espectros de absorción de la parafina y los colorantes, con el propósito de evitar resultados alterados (Figura 4.7). Los espectros de los cortes se obtuvieron con un espectrómetro acoplado a un microscopio marca Bruker® Vertex 70, modelo

Hyperion 2000, en modo reflexión total atenuada (ATR). Cabe resaltar que el espectrofotómetro al estar acoplado a un microscopio, permitió visualizar con exactitud la región de la muestra en donde se obtiene el espectro (Figura 4.9). Los espectros fueron adquiridos en un rango de 380 a 3500 cm^{-1} con 4 cm^{-1} de resolución. Las mediciones se hicieron escogiendo 2 puntos específicos sobre la herida; 1 en la periferia y 1 en el centro, a cada punto seleccionado se le realizó una matriz de 4x4 y a cada punto de esta matriz se le realizaron 120 mediciones. Finalmente, los datos se procesaron en el software Origin 8.5 (Figura 4.8).



Figura 4.7: Cortes histológicos para la obtención de los espectros en los días 7,14 y 21.

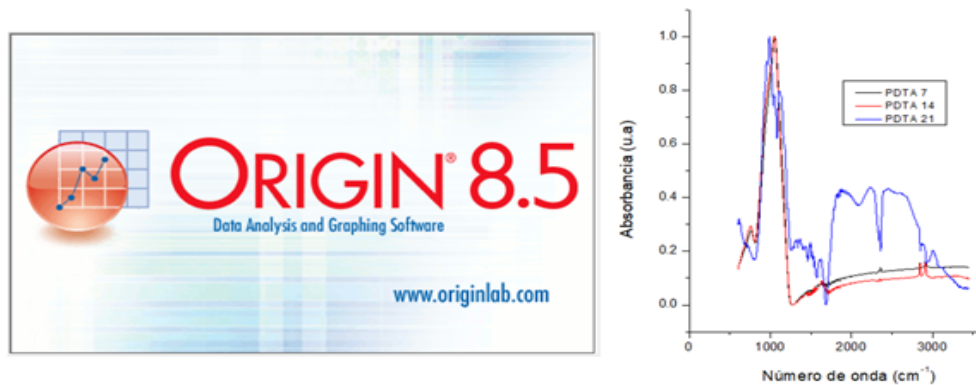


Figura 4.8: Procesamiento de los datos usando el programa Origin 8.5.



Figura 4.7: Espectrómetro acoplado a un microscopio

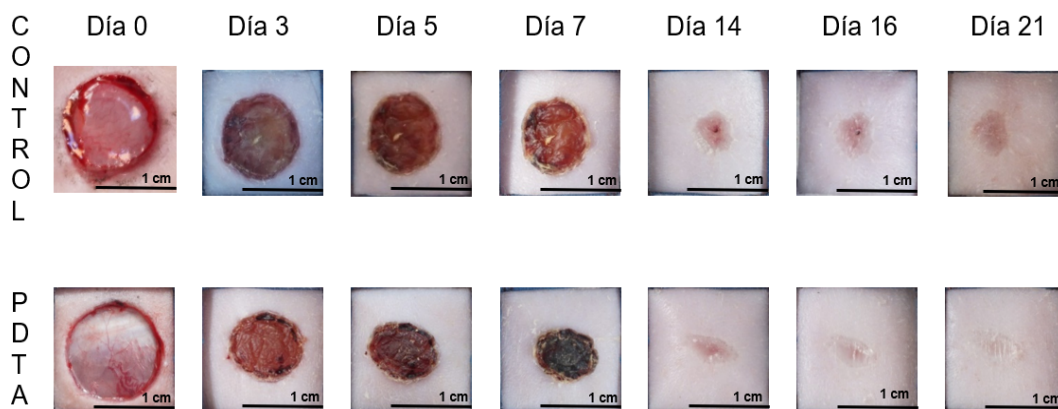
4.6 Referencias

Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. A. (2018). Técnicas histológicas protocolos. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo.

5. Resultados

5.1 Seguimiento del proceso de cicatrización mediante fotografías convencionales

El proceso de cicatrización de las heridas, fue observado mediante la adquisición de fotografías convencionales, como se muestra en la Figura 5.1. En esta figura, se pueden observar las diferencias morfológicas durante el proceso de cicatrización de una herida correspondiente al grupo control (sin tratamiento), con el proceso de cicatrización de una herida tratada con terapia fotodinámica con luz azul (PDTA). En esta figura, es posible observar que a partir del día 5, la herida del grupo PDTA tiene una menor área en comparación con la herida del grupo control. Conforme avanzaron los días, esta tendencia fue visualmente notoria durante los próximos días que duró el monitoreo de las heridas. En el día 7, la diferencia de área entre los grupos se aprecia con mayor facilidad y en el día 14, la herida del grupo PDTA tiene una tonalidad menos rojiza que la herida del grupo control, es decir, visualmente presenta un mejor cierre de la herida, especialmente en los días 16 y 21. Estéticamente la herida del grupo PDTA al día 21 es mejor que la del grupo control, esta afirmación es debida al color rojizo que presenta la herida del día 14 al 21, la cual va disminuyendo con el tiempo, para finalmente llegar al día 21 a un tono similar al de la piel no dañada.



Cuadro 5.1: Fotografías convencionales del proceso de cicatrización de una herida del grupo control y una herida con tratamiento.

5.2 Histologías

Cortes histológicos fueron realizados con el objetivo de identificar las principales estructuras morfológicas en la herida en días claves del proceso de cicatrización, tanto para el grupo control como las heridas con tratamiento. Los cortes histológicos fueron teñidos con la técnica de Hematoxilina-Eosina, la cual es la técnica estándar para este tipo de propósitos. Todos los cortes teñidos fueron observados mediante un microscopio óptico con un aumento de 4x y posteriormente, fueron agrupados en una sola imagen para obtener un campo de visión del corte histológico completo. A continuación, se presentan las imágenes obtenidas de cortes histológicos correspondientes a los días 7, 14 y 21, del proceso de cicatrización.

En las figuras 5.2 y 5.3, es posible observar las imágenes panorámicas del corte histológico para el día 7 de los grupos control y PDTA, respectivamente. En ambas figuras, se observan las 3 capas de la piel (epidermis, dermis e hipodermis), con una escasa pero notoria diferenciación entre ellas. La capa más superficial (epidermis) se aprecia con capas muy delgadas, casi imperceptibles. La diferenciación fue más notoria en la capa dérmica, debido a que esta capa se visualizó con mayor grosor en el grupo control respecto al grupo PDTA. Sin embargo, la capa hipodérmica presentó mayor grosor en el grupo PDTA, respecto al grupo control, en ambos cortes histológicos se observa migración de adipocitos en la dermis, en el grupo control se observan vasos sanguíneos asociados con la inflamación.

Las imágenes panorámicas de los grupos control y PDTA en el día 14, se muestran en las figuras 5.4 y 5.5, respectivamente. En estas figuras, podemos observar nuevamente las 3 capas de la piel, pero ahora más diferenciadas entre sí. En este día, la epidermis sigue estando de tamaño muy reducido. Podemos notar cómo en ambas histologías el grosor de la capa dérmica es de un tamaño similar, de igual forma se aprecia el aumento de la misma, respecto al día 7, en el control se observa bien diferenciado el estrato córneo superior de la epidermis. En el caso de la capa hipodérmica, en ambos grupos, el grosor de la misma se vio disminuida con respecto al día 7.

Finalmente, las imágenes panorámicas de los cortes histológicos del día 21 son mostrados en las Figuras 5.6 y 5.7 para los grupos control y PDTA, respectivamente. En estas figuras, las 3 capas de la piel se observan bien diferenciadas entre sí; además, la primera capa ha aumentado visualmente su grosor con respecto a los días 7 y 14. La capa dérmica disminuyó visualmente su grosor con respecto al día 14 en ambas heridas; al mismo tiempo, esta capa se visualizó con mayor grosor en el grupo PDTA con respecto al grupo control. Con respecto a la capa hipodérmica, nuevamente volvió a engrosarse con respecto al día 14, de igual manera, podemos observar que para el caso de la PDTA aún se visualizan algunas estructuras vasculares.

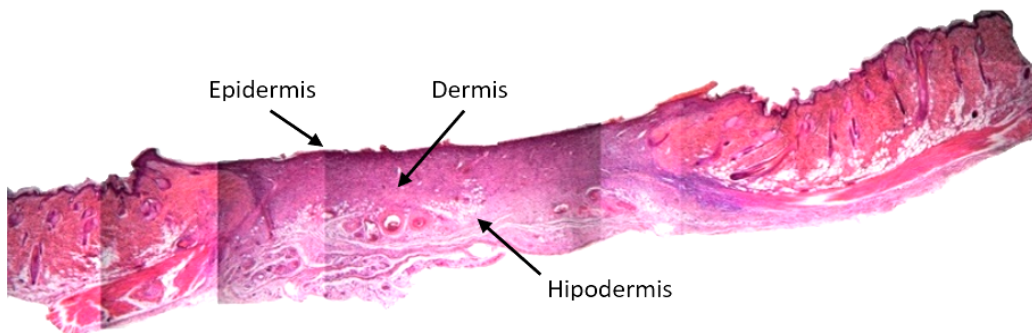


Figura 5.2: Corte histológico a 20 μm de grosor del grupo control en el día 7, vista en un aumento 4x.

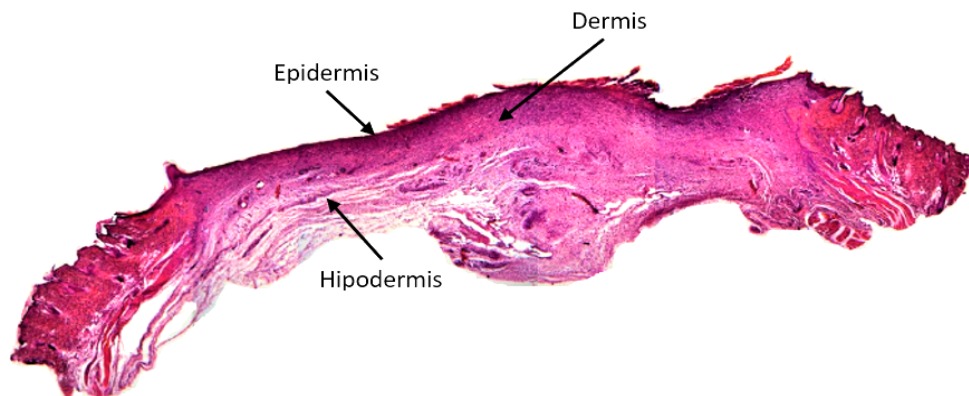


Figura 5.3: Corte histológico a 20 μm de grosor del grupo PDTA en el día 7, vista en un aumento 4x.

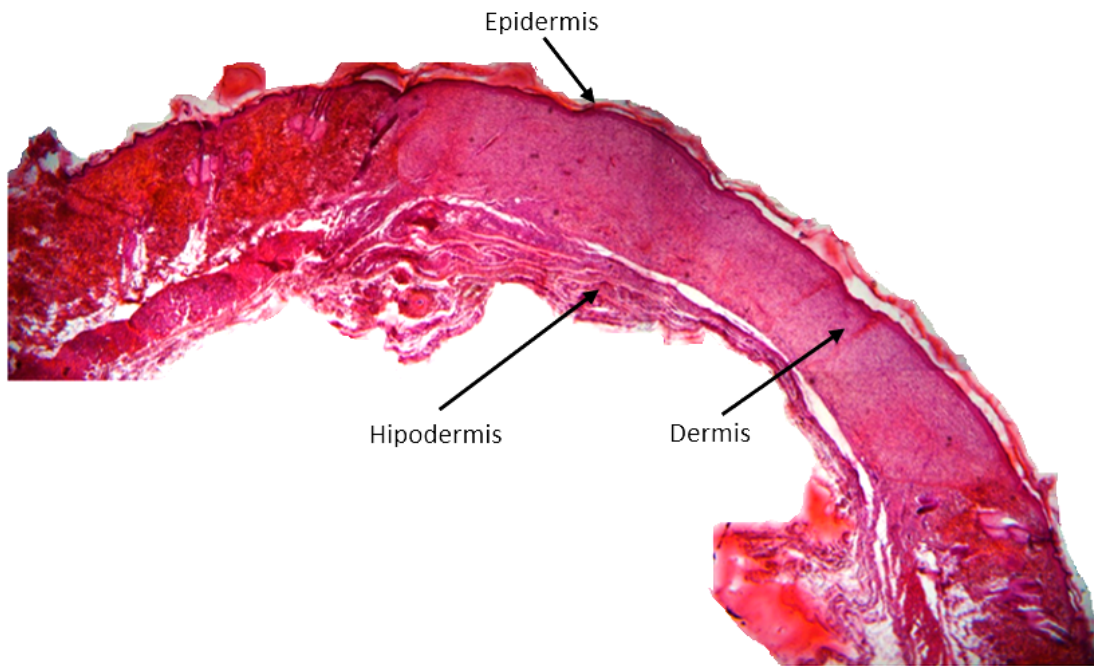


Figura 5.4: Corte histológico a 20 μm de grosor del grupo control en el día 14, vista en un aumento 4x.

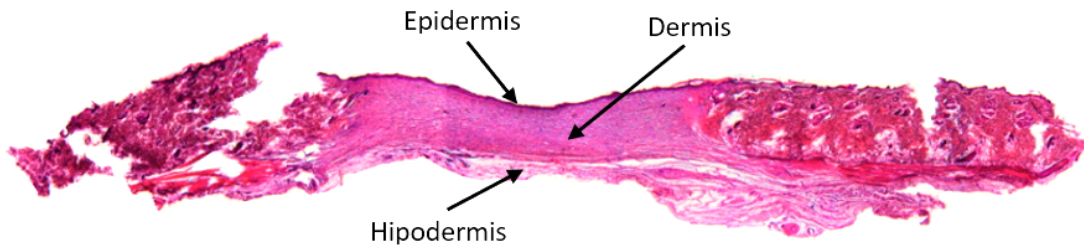


Figura 5.5: Corte histológico a 20 μm de grosor del grupo PDTA en el día 14, vista en un aumento 4x.

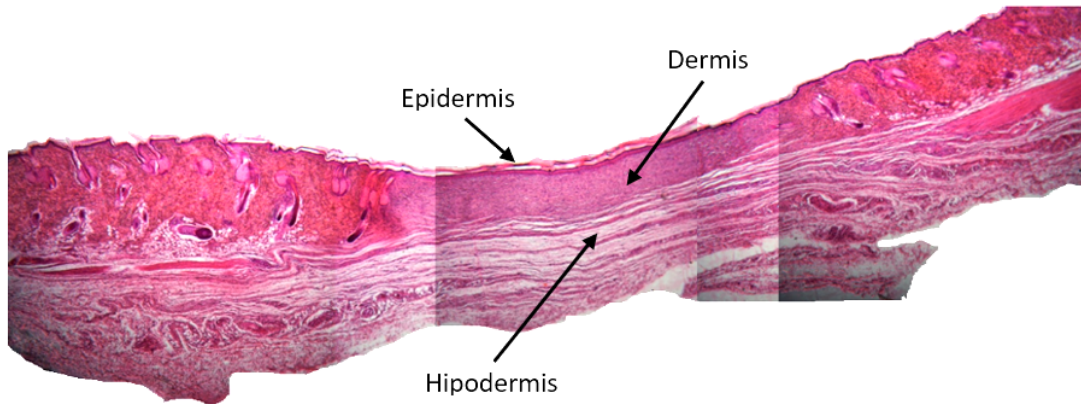


Figura 5.6: Corte histológico a 20 μm de grosor del grupo control en el día 21, vista en un aumento 4x.

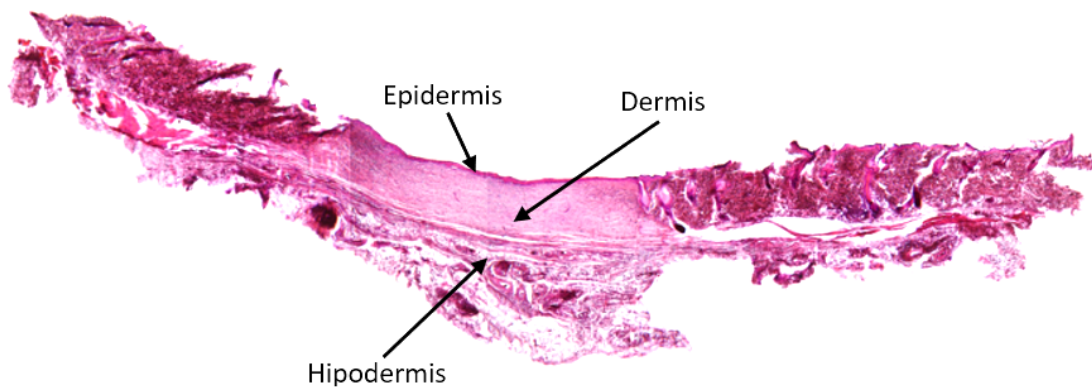


Figura 5.7: Corte histológico a 20 μm de grosor del grupo PDTA en el día 21, vista en un aumento 4x.

5.3 Espectros FTIR obtenidos de los cortes histológicos

La identificación de los picos de absorción fue llevada a cabo mediante la técnica de espectroscopía FTIR, empleando cortes histológicos sin teñir y de 50 μm de grosor. Los espectros fueron obtenidos en días claves del proceso de cicatrización (7, 14 y 21), los cuales se muestran a continuación.

Como se mencionó en la sección 4.5, los espectros FTIR fueron adquiridos en 2 puntos distintos del corte histológico, el centro y la periferia de la herida,

denominados por ejemplo, PDTA 7 y PDTA 7 TC, donde PDTA hace referencia a una herida con tratamiento, el número 7 al día del proceso de cicatrización y la abreviación TC, hace referencia al tejido circundante a la región de la herida. Para el grupo (CONTROL 7), los picos encontrados en la región de la herida en el día 7 fueron los siguientes: 1022, 1041, 1610, 1755, 2335, 2351, 2866, 2883, 2949, 3008 cm^{-1} . Los picos de absorbancia encontrados en el centro de la herida en el día 7 (PDTA 7) son los siguientes: 762, 1055, 2335, 2360, 2848 y 2919 cm^{-1} . En cuanto al tejido circundante (PDTA 7 TC), fueron los siguientes: 762, 1053, 2341, 2362, 2848, 2916 cm^{-1} (ver figura 5.8). Para los tres casos (Control 7, PDTA 7 y PDTA 7 TC), el pico de mayor absorbancia se sitúa alrededor de los 1055 cm^{-1} . La Figura 5.9, muestra una vista más amplia del espectro en la región de los 2300 a los 3000 cm^{-1} en el día 7 del proceso de cicatrización.

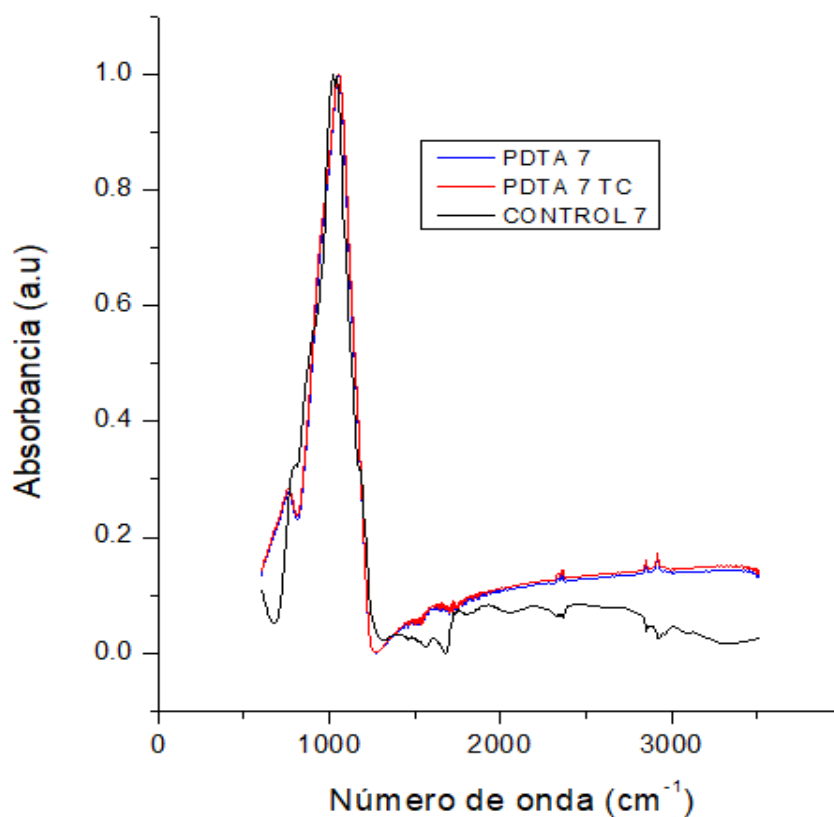


Figura 5.8: Espectros de absorción FTIR obtenidos en el día 7, para una herida control y una herida con tratamiento.

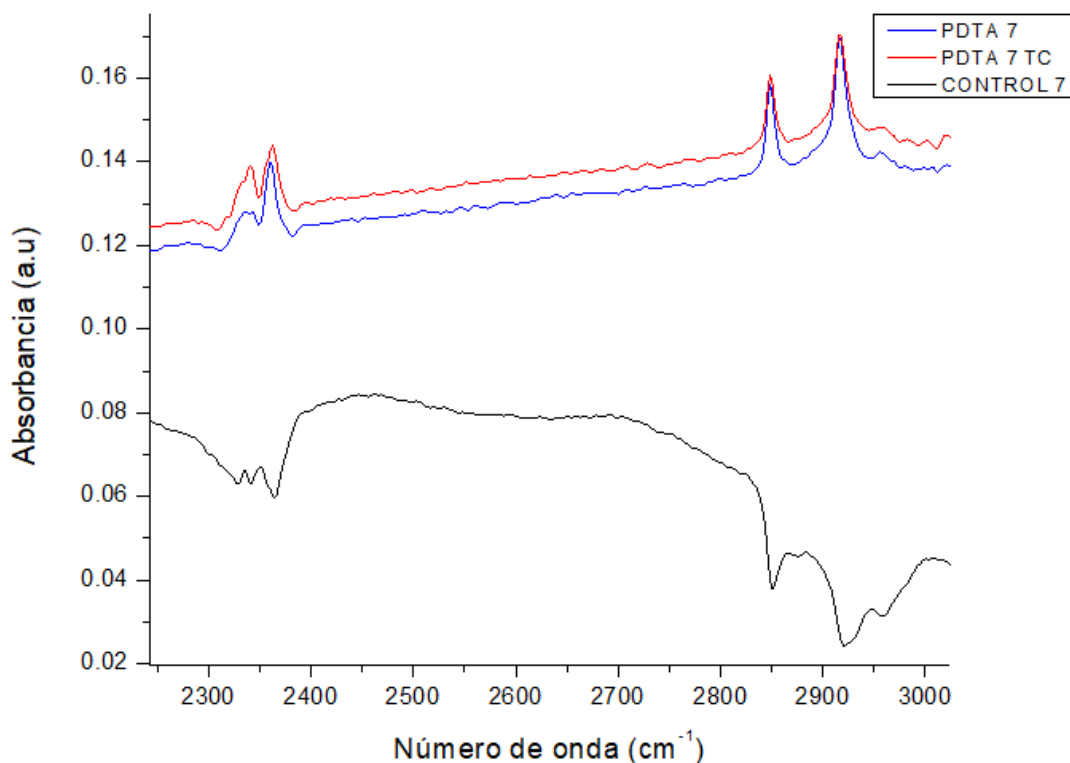


Figura 5.9: Espectro ampliado entre los 2300 y 3000 cm^{-1} en el día 7, para una herida control y una herida con tratamiento.

Los picos espectrales encontrados en el día 14, se muestran a continuación. En la herida del grupo CONTROL 14 se identificaron los siguientes grupos : 1018, 1041, 1371, 1606, 1710, 1903, 2166, 2409, 3001, 3007 cm^{-1} . Para la región de la herida en el grupo PDTA 14, fueron los siguientes: 758, 1047, 1442, 1462, 1483, 1495, 1502, 1514, 1531, 1537, 1548, 1564, 1585, 1612, 1631, 1658, 1691, 1710, 1726, 1739, 1755, 1765, 1788, 2339, 2358, 2848, 2916 cm^{-1} . En cuanto al tejido circundante a la herida (PDTA 14 TC), los picos identificados fueron: 733, 1053, 1091, 1182, 1215, 1327, 1367, 1383, 1390, 1402, 1427, 1442, 1462, 1483, 1495, 1502, 1514, 1529, 1549, 1562, 1631, 1641, 1658, 2339, 2357, 2364, 2848, 2916, 3025, 3043, 3053, 3070, 3087, 3192, 3205, 3224, 3238, 3251 cm^{-1} (ver Figura 5.10). La figura 5.11, representa una vista más amplia de los picos encontrados en la región de los 1300 a los 3000 cm^{-1} en el día 14.

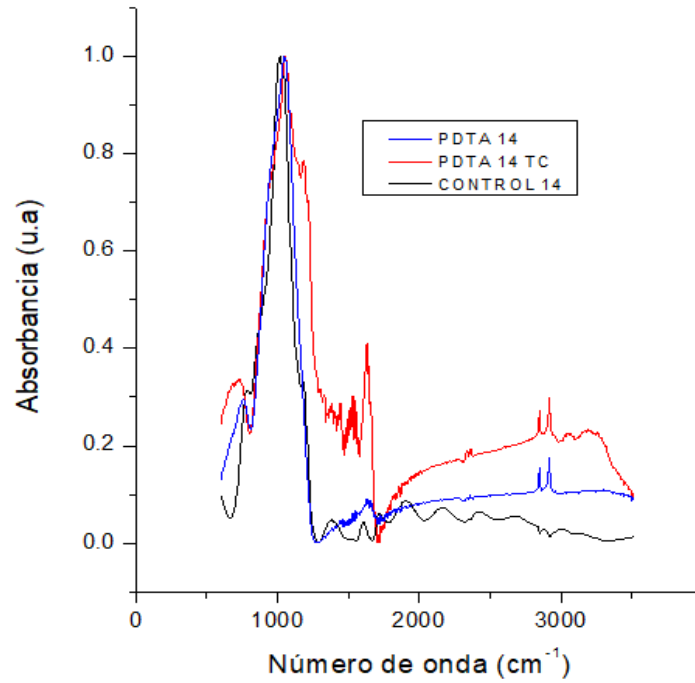


Figura 5.10: Espectros de absorción FTIR obtenidos en el día 14, para una herida control y una herida con tratamiento.

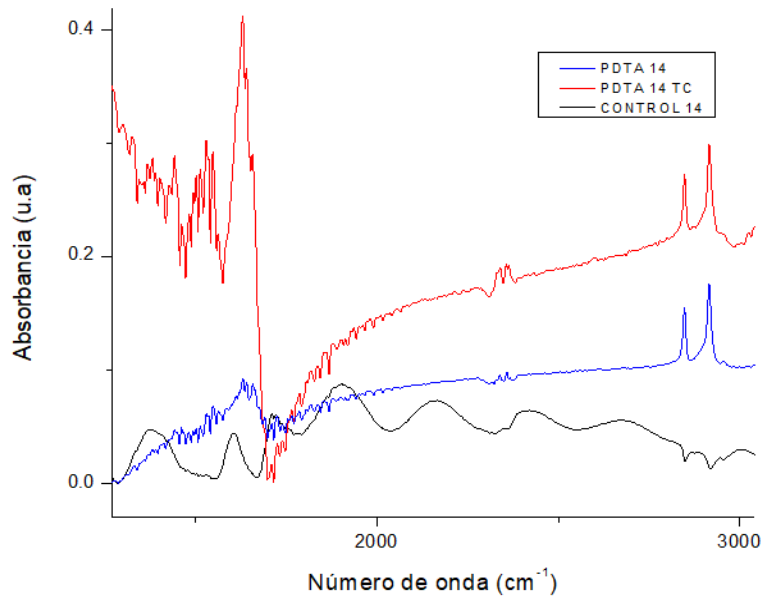


Figura 5.11: Espectro ampliado entre los 1300 y 3000 cm⁻¹ en el día 14, para una herida control y una herida con tratamiento.

Finalmente, los picos FTIR identificados en la región de la herida en el día 21 para el grupo CONTROL 21, los picos identificados en la región de la herida fueron: 766, 990, 1043, 1144, 1176, 1358, 1427, 1495, 1611, 2281, 2339, 2347, 2866, 2947, 3012 cm^{-1} . Para el grupo PDTA 21, fueron los siguientes: 613, 955, 1043, 1107, 1277, 1309, 1327, 1358, 1367, 1379, 1402, 1414, 1427, 1441, 1462, 1468, 1485, 1493, 1502, 1512, 1529, 1547, 1612, 1628, 1788, 1820, 1838, 1854, 1874, 1900, 1913, 1928, 1950, 1975, 1996, 2230, 2349, 2445, 3006 cm^{-1} . En el caso del tejido circundante para la misma muestra y grupo (PDTA 21 TC) fueron los siguientes: 661, 752, 1047, 1284, 1307, 1329, 1358, 1365, 1383, 1392, 1414, 1427, 1442, 1462, 1469, 1483, 1495, 1502, 1512, 1529, 1549, 1572, 1599, 1604, 1612, 1631, 1651, 1658, 1678, 1691, 1711, 1726, 1743, 1755, 1766, 1786, 2351, 2846, 2916 cm^{-1} (ver Figura 5.12). La Figura 5.13, representa una vista más amplia de los picos encontrados en la región de los 600 a los 1500 cm^{-1} en el día 21. De igual forma, la Figura 5.14 representa una vista más amplia de los picos encontrados en la región de los 1200 a los 3015 cm^{-1} en el día 21.

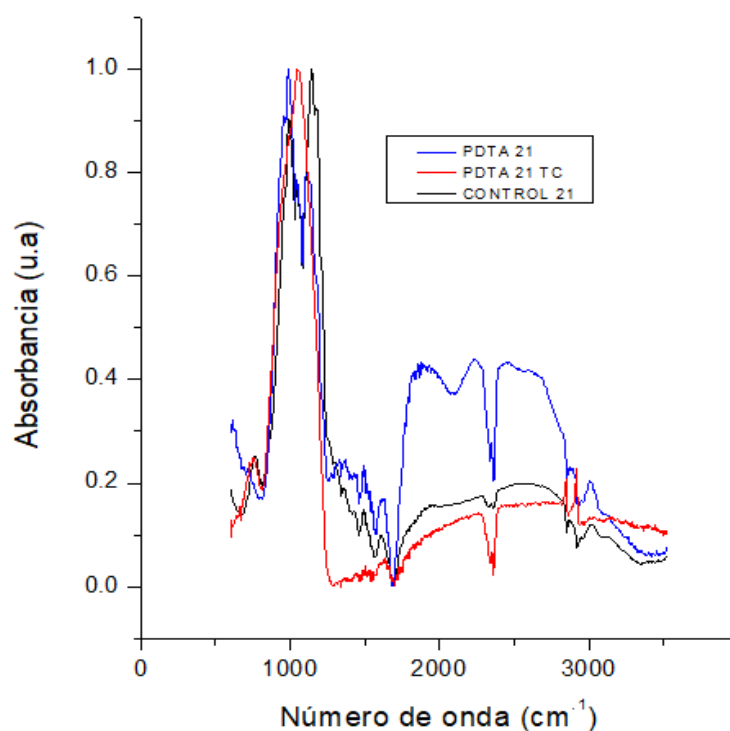


Figura 5.12: Espectros de absorción FTIR obtenidos en el día 21, para una herida control y una herida con tratamiento.

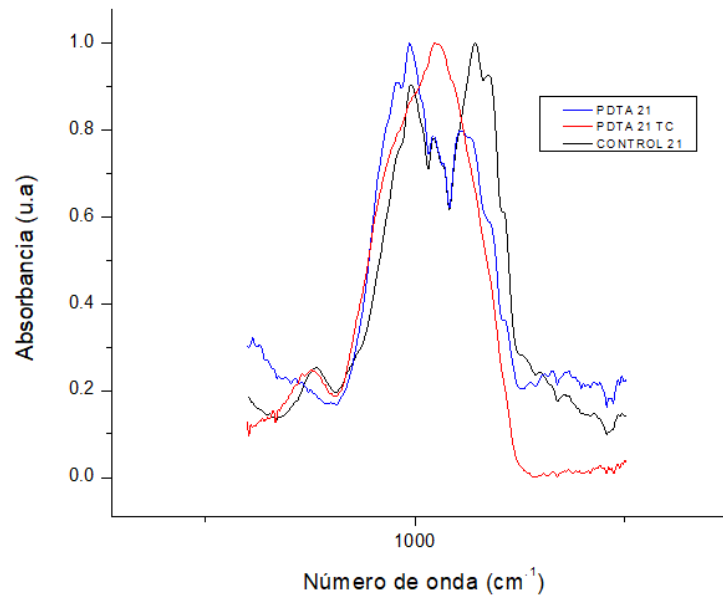


Figura 5.13: Espectro ampliado entre los 600 y 1500 cm^{-1} en el día 21, para una herida control y una herida con tratamiento.

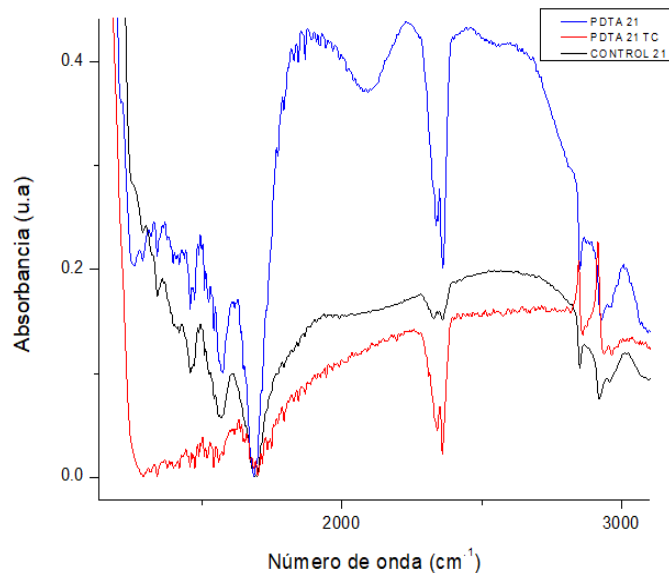


Figura 5.14: Espectro ampliado entre los 1200 y 3015 cm^{-1} en el día 21, para una herida control y una herida con tratamiento.

En la siguiente sección, se hará un análisis y discusión de los resultados reportados en esta sección, así como la correlación de los picos identificados en nuestro proyecto de tesis con picos de absorción FTIR reportados en la literatura.

6. Discusión y conclusiones

El proceso de cicatrización de las heridas evaluado mediante fotografías convencionales, indica una notable reducción del área de la herida en el grupo PDTA en comparación con el grupo control, esto fue notorio a partir del día 7, dicho hallazgo coincide con lo planteado por Adamskaya *et al.*, 2011. En cuanto al aspecto estético se encontraron resultados satisfactorios en el grupo PDTA a partir del día 16, cosa que no ocurrió en el grupo control; indicando que el uso de la terapia fotodinámica con luz azul podría favorecer el aspecto estético de las heridas. Sin embargo, un estudio más robusto es necesario para fortalecer esta observación.

En cuanto a los análisis histológicos autores como Dos Santos *et al.*, 2019 evaluaron el efecto de la PDT a longitudes de onda de 630 y 945 nm en la curación de quemaduras. Los autores, reportan que para el día 7 del proceso de cicatrización de una herida control, los queratinocitos estaban ausentes y con una ligera presencia de células adiposas; caso contrario ocurrió con el tratamiento de PDT a 945 nm, pues ahí la presencia de queratinocitos fue moderada al igual que las células adiposas. En el caso del trabajo realizado por Castro *et al.*, 2020 en donde también se evaluó el proceso de cicatrización después de una quemadura, reportan que al día 7 se observaron áreas con reepitelización y una disminución del tejido de granulación. Ambos resultados coinciden con los encontrados en este proyecto de tesis.

Las histologías evaluadas y reportadas en el día 14 por Castro *et al.*, 2020, muestran una reepitelización avanzada cubriendo la superficie quemada, dicha afirmación también coincidió con lo encontrado en este proyecto de investigación. Finalmente, las histologías evaluadas por Dos Santos *et al.*, 2019 para el día 21 del control, proponen una neovascularización y presencia de ligera grasa tisular; mientras que en los tratamientos de PDT a 630 y 945 nm mostraron una mejoría en cuanto a la neovascularización y la presencia de células adiposas y queratinocitos. Dichas afirmaciones, coinciden con los resultados encontrados en este proyecto de

investigación, lo que nos sugiere que el proceso de cicatrización sigue activo y generando nuevas estructuras para la regeneración de la piel.

Respecto al estudio realizado por Castro *et al.*, 2020, ellos notaron que la epidermis y la dermis estaban completamente restablecidas, casi como la piel sana, si bien en este proyecto de investigación podemos notar que al día 21 las 3 capas de la piel están bien diferenciadas entre sí, la dermis tiene un menor grosor, posiblemente esto se deba a la relación que existe entre la longitud de onda empleada (470 nm) y su poca profundidad de penetración en la piel, ya que en el caso de las longitudes a 945 nm la profundidad de penetración es hasta la capa hipodérmica; mientras que a los 630 nm la penetración llega a la capa dérmica; caso contrario ocurre para la longitud de onda ocupada en este proyecto (470 nm), situada entre las capas epidérmica y dérmica (Serrano *et al.*, 2009).

Sabemos que la síntesis del ATP es posible gracias a un sistema denominado como cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones, cuyo fin es transportar electrones a través de sus complejos; dichos complejos poseen componentes enzimáticos específicos, los cuales tienen la capacidad de absorber luz a determinada longitud de onda, entre ellos se encuentran los citocromos 1 al 5. El 1 y 4 corresponden al citocromo b; el 3 al citocromo c y finalmente el 2 y 5 al citocromo oxidasa, cuya absorción de este último citocromo corresponde a luz azul y roja respectivamente (ver figura 6.1) (De Gómez & Gómez, 2003). Dado que la longitud de onda empleada en este proyecto de investigación fue de 470 nm (correspondiente a la luz azul) podemos decir que la actividad del citocromo oxidasa se vio mayormente influenciada en comparación con los otros citocromos. Por otro lado, sabemos que la función del citocromo oxidasa es la de transportar electrones entre los complejos III y IV en la cadena respiratoria mitocondrial con el fin de generar ATP (Colman *et al.*, 2015). Sin embargo Lunova *et al.*, 2019 afirman que la actividad del citocromo oxidasa en la cadena transportadora de electrones es inhibida al irradiarse con luz láser en azul, y muy excesiva al hacerlo con luz láser en rojo, pero a pesar de ello ambas longitudes de onda, cumplen con el objetivo de provocar muerte apoptótica que, aunque no lo hacen en la misma proporción, si de

manera muy similar. Por ende, podríamos decir que a pesar de esto, se cumple con el objetivo que es general ATP ya que pudimos observar proliferación y diferenciación celular.

Por otra parte, los picos de absorbancia encontrados mediante la espectroscopia FTIR, sugieren la presencia de lípidos, proteínas, carbohidratos y material nuclear. En la Tabla 6.1, se muestran varios picos reportados en la literatura, los cuales nos dan una idea de los posibles marcadores de cicatrización presentes en las heridas control y con tratamiento mostradas en este trabajo. Cabe mencionar que durante el proceso de cicatrización, se va formando la matriz extracelular, dicha matriz está constituida por cuatro tipos de macromoléculas: colágenos, elastinas, proteoglicanos y glicoproteínas (Silvera & Barrios, 2002).

Analizando los picos de este proyecto, notamos la presencia de proteoglicanos en dos regiones; autores como Hanifi *et al.*, 2013 afirman que estas macromoléculas están situadas entre los 985 y 1140 cm^{-1} , en el caso de este proyecto de investigación, los picos que se encontraron estaban situados en los 1091 y 1107 cm^{-1} los cuales estuvieron presentes únicamente en el grupo tratado con PDT, y estos fueron PDTA 14 TC y PDTA 21 respectivamente; De Campos & Mello, 2011 reportaron esta macromolécula en el pico situado a 1640 cm^{-1} , la cual coincide con el pico reportado en este proyecto de tesis situado en los 1641 cm^{-1} , el cual sólo estuvo presente en el grupo tratado con PDTA, en el día 14 TC.

Otra de las proteínas de gran importancia y que podría considerarse como el principal marcador de cicatrización, es el colágeno, debido a que es considerado como un elemento importante de soporte para la matriz extracelular (Saavedra *et al.*, 2018). Esta proteína está reportada en distintos puntos y por diversos autores, para empezar Riaz *et al.*, 2018 proponen un pico relacionado con dicha proteína a los 1214 cm^{-1} ; mientras que el reportado por nosotros se sitúa en los 1215 cm^{-1} correspondiente al grupo PDTA 14 TC. Otro pico reportado por este autor sitúa a la proteína en los 1360 cm^{-1} ; reportando en este trabajo de tesis dos picos cercanos situados a los 1367 cm^{-1} para el grupo PDTA 14 TC y PDTA 21 y 1365 cm^{-1} para la PDTA 21 TC.

Belbachir *et al.*, 2009, Lima *et al.*, 2016 y Tang *et al.*, 2017 reportan un pico en los 1282 cm^{-1} ; mientras que el reportado el identificado en este trabajo de tesis se localiza a 1284 cm^{-1} y pertenece al grupo PDTA 21 TC. Según lo planteado por Mostaço *et al.*, 2009, el pico relacionado para el colágeno podría situarse en los 1330 cm^{-1} , en este proyecto de tesis se identificaron dos picos cercanos al reportado por dicho autor, estos fueron los situados a 1327 cm^{-1} para el grupo PDTA 14 TC y PDTA 21 y 1329 cm^{-1} para el grupo PDTA 21 TC. Otro de los picos asignados por Mostaço *et al.*, 2009 es el situado a 1634 cm^{-1} ; mientras que el identificado en nuestro proyecto fue a 1631 cm^{-1} para los grupos PDTA 14, PDTA 14 TC y PDTA 21 TC. Finalmente, Nandiyanto *et al.*, 2019 reportan el pico para el colágeno a los 1401 cm^{-1} ; mientras que el identificado en nuestros cortes histológicos fue a 1402 cm^{-1} para los grupos PDTA 14 TC y PDTA 21.

Otra de las proteínas que participa activamente en la cicatrización después de una herida es la Elastina, De Campos & Mello, 2011 reportan a esta proteína en el pico situado a los 1655 cm^{-1} ; el encontrado por nosotros se observó únicamente en el grupo PDTA 21 TC a los 1651 cm^{-1} . La identificación de estos picos de absorbancia en los cortes histológicos de las heridas en los días 7, 14 y 21 del proceso de cicatrización y su correlación con este tipo de macromoléculas, podría sugerir que la terapia fotodinámica tiene un efecto positivo en la cicatrización de heridas, induciendo la activación de genes que codifican para estos marcadores. Diversos estudios en donde se trabaja la espectroscopia FTIR para identificar compuestos en la piel reportan la presencia de amidas I, II, III, A y B: La tabla 6.1 nos muestra con más detalle los sitios específicos en los que podemos localizar estos compuestos.

Tabla 6.1 Asignación de los picos espectrales por espectroscopia FTIR en heridas tratadas y no tratadas con PDTA

Posición del pico (cm^{-1})									ASIGNACIÓN	REFERENCIAS
PDTA	PDTA	CONT	PDTA	PDTA	CONT	PDTA	PDTA	CONT		
7	7 TC	7	14	14 TC	14	21	21 TC	21	Huella digital: espectros específicos	Novais <i>et al.</i> , 2019
			758	733		613	661	766		
						955	752			

								990	β -glucano	Fagundes <i>et al.</i> , 2018
					1018				$\nu(\text{CO}) + \nu(\text{CC}) + \delta(\text{OCH})$ polisacáridos	Fagundes <i>et al.</i> , 2018
		1022							β -glucano	Fagundes <i>et al.</i> , 2018
1055	1053	1041	1047	1053	1041	1043	1047	1043	$\nu \text{C-O} / \nu \text{C-N-C}$ de Amida III	Ju <i>et al.</i> , 2020
				1091					Proteoglicanos	Hanifi <i>et al.</i> , 2013
								1144	Carbohidratos, fructosa; glucosa	Fagundes <i>et al.</i> , 2018
								1176	$\nu \text{C-O}$	Lima <i>et al.</i> , 2016
				1182					Grupo carbonilo y $\nu(\text{C-O-C})$	Riaz <i>et al.</i> , 2018
				1215					Amida III del colágeno	Riaz <i>et al.</i> , 2018
								1277	Sin asignar	
								1284	$\delta(\text{CH}_3)$ específico del colágeno	Belbachir <i>et al.</i> , 2009 Lima <i>et al.</i> , 2016 Tang <i>et al.</i> , 2017
						1309	1307		Amida III	Mostaço <i>et al.</i> , 2009
				1327		1327	1329		Colágeno	Mostaço <i>et al.</i> , 2009
						1358	1358	1358	Amina terciaria aromática, δCN	Nandiyanto <i>et al.</i> , 2019
				1367		1367	1365		Cadenas laterales de prolina en el colágeno I	Riaz <i>et al.</i> , 2018
						1371	1379		Modos de respiración en anillo de las bases de ADN/ARN	Fagundes <i>et al.</i> , 2018
				1383				1383	Grupo metil C-H/C-C-H & C-C-H, O-C-H & C-O-H de CHO's	Longas <i>et al.</i> , 2011
				1390				1392	$\nu_s(\text{COO}^-)$ aminoácidos libres; ácido graso	Tang <i>et al.</i> , 2017
				1402		1402			Proteína y colágeno	Nandiyanto <i>et al.</i> , 2019
						1414	1414		Amida II	Ju <i>et al.</i> , 2020
				1427		1427	1427	1427	Desoxirribosa	Fagundes <i>et al.</i> , 2018
		1442	1442			1441	1442		$\delta_{\text{as}}(\text{CH})(\text{CH}_2)$	Sakane <i>et al.</i> , 2020

1462	1462	1462	1462		$\delta_{as} (CH)(CH_3)$ y $\delta_{as} (CH)(CH_2)$	Sakane <i>et al.</i> , 2020)
		1468	1469			
1483	1483	1485	1483			Kittiphattanabawon <i>et al.</i> , 2015
1495	1495	1493	1495	1495	Amida II	Ju <i>et al.</i> , 2020
1502	1502	1502	1502		Cadenas laterales (tirosina, fenilalanina)	Tang <i>et al.</i> , 2017
1514	1514	1512	1512			
	1529	1529	1529			Xio <i>et al.</i> , 2007 Belbachir <i>et al.</i> , 2009 Lan <i>et al.</i> , 2015 Kittiphattanabawon <i>et al.</i> , 2015 Tang <i>et al.</i> , 2017 Castro <i>et al.</i> , 2018
1531						
1537						
1548	1549	1547	1549		Amida II	Fagundes <i>et al.</i> , 2018 Riaz <i>et al.</i> , 2018 Anastassopoulou <i>et al.</i> , 2019
1564	1562		1572			Castro & Zzell, 2019 Ju <i>et al.</i> , 2020 Sakane <i>et al.</i> , 2020)
1585					$\delta(NH_2)$ o $\nu(C=N)$	Fagundes <i>et al.</i> , 2018
			1599		Amida I	Hanifi <i>et al.</i> , 2013
		1606	1604		δNH_2 o $\nu(C=N)$	Sakane <i>et al.</i> , 2020)
1610	1612	1612	1612	1611	Amida I	Belbachir <i>et al.</i> , 2009
		1628			Amida I	Riaz <i>et al.</i> , 2018 Castro <i>et al.</i> , 2018
1631	1631		1631		Colágeno/uracilo	Mostaço <i>et al.</i> , 2009
1641	1641		1641		Proteoglicano	De campos & Mello, 2011
			1651		Amida I del Colágeno / Elastina	De Campos & Mello, 2011
1658	1658		1658		Amida I	Belbachir <i>et al.</i> , 2009 Lima <i>et al.</i> , 2015 Riaz <i>et al.</i> , 2018
			1678		Amida I	Hanifi <i>et al.</i> , 2013 Kittiphattanabawon <i>et al.</i> , 2015
1691			1691			

			1710	1710		1711	Amida I	Hanifi <i>et al.</i> , 2013
						1726	Enlace vibracional de éster (Éster)	Riaz <i>et al.</i> , 2018
						1739	estiramiento del carbonilo C=O en los fosfolípidos, colesterol y triglicéridos	Fagundes <i>et al.</i> , 2018 Sakane <i>et al.</i> , 2020)
	1755		1755			1755	Lípidos	Castro <i>et al.</i> , 2018
						1765		Sin asignar
						1788		
						1788		
						1786		
							Aryl carbonate	Nandiyanto <i>et al.</i> , 2019
						1820		
						1838		
						1854		
						1874		
						1903		
						1900		
						1913	Carbonilos de metales de transición	Nandiyanto <i>et al.</i> , 2019
						1928		
						1950		
						1975		
						1996		
						2166	Tiocianato (-SCN)	Nandiyanto <i>et al.</i> , 2019
						2230	Cianuro aromático/nitrilo	Nandiyanto <i>et al.</i> , 2019
						2281		Sin asignar
	2335		2335	2339	2339	2339	Componente relacionado con las aminas	Nandiyanto <i>et al.</i> , 2019
		2341		2358	2357	2349		
						2351		
						2347		
	2360		2362					
								Sin asignar
						2409		

2848	2848	2848	2848		2846	v_s C-H de lípido	Lan <i>et al.</i> , 2015
		2866			2866	Lípidos de ácidos grasos	Mostaço <i>et al.</i> , 2009
		2883				v_s y v_{as} de CH ₂ de Amida B	Ju <i>et al.</i> , 2020
2919	2919	2916	2916		2916	v_{as} C-H de lípido	Lan <i>et al.</i> , 2015
		2949			2947	v_{as} (CH)(CH ₃)	Fagundes <i>et al.</i> , 2018
		3008	3025	3001	3006	3012	
			3043	3007			
			3053			Amida B	Riaz <i>et al.</i> , 2018
			3070				
			3087				
			3192			Grupo amida primario	Riaz <i>et al.</i> , 2018
			3205				
			3224				
			3238			Amida A	Riaz <i>et al.</i> , 2018
			3251				

Notas: v, estiramiento; δ , flexión; as, asimétrico; s, simétrico

Conclusiones

El uso de la terapia fotodinámica con luz azul (PDTA) para la cicatrización de heridas cutáneas mostró resultados positivos ya que en el análisis comparativo con el grupo control fue posible observar diferencias morfológicas, histológicas y espectroscópicas, sin embargo, al comparar la eficacia de PDTA con trabajos en donde se utiliza luz roja o verde sus efectos no son tan significativos. El uso de la espectroscopia FTIR como una herramienta complementaria al análisis histológico fue útil para la identificación de marcadores de cicatrización como colágeno,

elastina, proteoglicanos y glicoproteínas abundantes en la matriz extracelular de las heridas tratadas con PDTA y menos abundantes en el grupo control, podemos concluir que la PDTA tuvo un efecto positivo en la cicatrización de las heridas y la espectroscopia FTIR resultó ser una herramienta óptica de diagnóstico que facilitó la identificación y caracterización de los componentes del tejido cicatricial.

6.1 Referencias

Adamskaya, N. *et al.*, (2011). Light therapy by blue LED improves wound healing in an excision model in rats. *Injury, Int. J. Care Injured*, 42, pp. 917-921.

Anastassopoulou, J., Kyriakidou, M., Mamareli, V., Tanis, O., & Rallis, M. (2019). The influence of UV Irradiation on Diabetic Mice Skin; A Vibrational FT-IR and Raman Spectroscopic Study. *Chromatogr Spectros Tech*, 2(1), pp. 21-27.

Belbachir, K., Noreen, R., & Gouspillou, G. (2009). Collagen types análisis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*, 395, pp. 829-837.

Castro, P., Lima, C., Zorn, T. M. T., & Zezell, D. M. (2018). FTIR spectroscopy: an optical method to study wound healing process. *Latin America Optics and Photonics Conference*.

Castro, P., Zorn, T., & Zezell, D. (2018). Biochemical characterization of skin burn wound healing using ATR-FTIR.

Castro, P. A. A & Zezell, D. M. (2019). Infrared spectroscopy evaluation of burn wound healing: semi-quantitative study. *Proc. of SPIE*, 11073.

Castro, P. A. A., Lima, C. A., Morais, M. R. P. T., Zorn, T. M. T., & Zezell, D. M. (2020). Monitoring the progress and healing status of burn wounds using infrared spectroscopy. *Applied spectroscopy*.

Colman, V., Costa, E., Chaves, R., & Tórtora, V. (2015). Roles biológicos del citocromo c: transporte electrónico mitocondrial, muerte celular programada y ganancia de actividad peroxidática. *Anales de la Facultad de Medicina*, 2, pp. 59-70.

De Campos, B., & Mello, M. L. S. (2011). Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron*, 42, pp. 283-289.

De Gómez, M.T., & Gómez, A. (2003). Las mitocondrias. En *Biología Celular y Molecular*. 1ra e. (pp. 295-313). Pearson educación.

Dos Santos et al., (2019). Comparative study in photodynamic therapy using the same photosensitizer in tissue repair after second-degree burns in an experimental model, *Laser in Dental Science*.

Fagundes *et al.*, (2018). Evaluation of photodynamic therapy with methylene blue, by the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) in *Leishmania major-in vitro*

Fekrazad, R., Nikkerdar, A., Joharchi, K., Kalhori, K., & Abbas, F. M. (2014). Effect of Laser Photostimulation on the Healing of Third-Degree Burn wounds in Rats. *Journal of Archives in Military Medicine*, 2(3), pp. 1-6.

Hanifi, A., McCarthy, H., Roberts, S., & Pleshko, N. (2013). Fourier Transform Infrared Imaging and Infrared Fiber Optic Probe Spectroscopy Identify Collagen Type in Connective Tissues. *Plos one*, 8.

Ju, H., Liu, X., Zhang, G., Liu, D., & Yand Y. (2020). Comparison of the Structural Characteristics of Native Collagen Fibrils Derived from Bovine Tendons using Two Different Methods: Modified Acid-Solubilized and Pepsin-Aided Extraction. *Materials*, 13(2).

Kittiphattanabawon, P., Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. (2015). Characteristics of Pepsin-Solubilised Collagen from the Skin of Splendid Squid (*Loligo formosana*). *Hindawi Journal of Chemistry*, 2015, pp. 1-8.

Lan *et al.*, (2015). Effect of menthone and related compounds on skin permeation of drugs with different lipophilicity and molecular organization of stratum corneum lipids. *Pharm Dev Technol*, Early Online.

Lima, C. A., Goulart, V. P., Correa, L., & Zezell, D. M. (2015). ATR-FTIR Spectroscopy for the Assessment of Biochemical Changes in Skin Due to Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, pp. 6621-6630.

Lima, C. A., Goulart, V. P., Correa, L., & Zezell, D. M. (2016). Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy to Evaluate Biological Effects Induced by Photodynamic Therapy. *Laser in Surgery and Medicine*, 48, pp. 538-545.

Longas, M. O., Cheairs, K., Puchalski, M. M., & Park, J. I. (2011). Reliability of fourier transform infrared spectroscopy in the characterization of human skin. *Scientific research*, 1, pp. 24-28.

Lunova *et al.*, (2019). Light-induced modulation of the mitochondrial respiratory chain activity: possibilities and limitations. *Cellular and Molecular Life Sciences*,

Mostaço, L. B., Murakami, L. S., Nomizo, A., & Bachmann, L. (2009). Fourier Transform Infrared Spectroscopy of skin cancer cells and tissues. *Applied spectroscopy reviews*, 44 (5), pp. 438-455.

Nandiyanto, A. B., Oktiani, R., & Rafadhita, R. (2019). How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material. *Indonesian Journal of Science & Technology*, 4 (1), pp. 97-118.

Novais, A., Freitas, A. R., Rodrigues, C., & Peixe, L. (2019). Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 38, pp. 427-448.

Riaz *et al.*, (2018). FTIR analysis of natural and synthetic collagen. *Applied Spectroscopy reviews*, 53(9), pp.703-746.

Sakane, K. K. *et al.*, (2020). Biochemical changes in *Leishmania braziliensis* after photodynamic therapy with methylene blue assessed by the Fourier transform infrared spectroscopy. *Lasers Med Sci*.

Saavedra *et al.*, (2018). Microfotografía: generalidades en la matriz extracelular, colágeno y piel. *Morfología*, 10(3).

Serrano, P., Voegeli, A., & Romero D. (2009). Fotodepilación. *Actas Dermosifiliogr*, 100, pp. 351-361.

Silvera, L. A., & Barrios, C. (2002). La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Salud Uninorte*, 16.

Tang *et al.*, (2017). Thermal and vibrational characterization of human skin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 127(2), pp. 1143-1154.

Xio, H., Cai, G., & Liu, M. (2007). Hydroxyl radical induced structural changes of collagen. *Spectroscopy*, 21, pp. 91-103.