



# **Benemérita Universidad Autónoma De Puebla**

**Facultad de Ciencias Físico Matemáticas**

**Título de la tesis:**

**Análisis Del Efecto De La Terapia De Luz Led De Baja Densidad De Energía En El Proceso De La Cicatrización De Un Modelo Murino Alopecico.**

**27 de mayo de 2021**

**Tesis presentada para obtener el grado de Licenciatura**

**Presenta:**

**Estefany Marisol García García**

**Director De Tesis:**

**Dra. Teresita Spezzia Mazzocco**

**Codirectores de tesis:**

**Dra. Wendy Argelia Garcia Suastegui**

**Dra. Marcela Maribel Méndez Otero**

## Tabla de contenido

<b>Resumen .....</b>	<b>3</b>
<b>Planteamiento del problema .....</b>	<b>4</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>6</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>7</b>
Objetivo general.....	7
Objetivos específicos.....	7
<b>Marco teórico .....</b>	<b>8</b>
Antecedentes .....	8
La luz.....	10
Interacción radiación materia .....	1
Proceso de cicatrización.....	3
Fisiología de la cicatrización.....	5
Terapia de luz led de baja densidad de energía (LED-LLLT) .....	7
Mecanismos en la reparación de tejidos con la LED-LLLT .....	9
<b>Metodología .....</b>	<b>11</b>
<b>Material biológico .....</b>	<b>11</b>
<i>Rattus norvegicus</i> (cepa alopécica) .....	11
<b>Monitoreo de los sujetos de experimentación .....</b>	<b>12</b>
Parámetros ópticos .....	14
<b>Valoración cuantitativa de los sujetos de experimentación .....</b>	<b>15</b>
Análisis de imágenes .....	16
Análisis estadístico .....	17
<b>Valoración cualitativa de los sujetos de experimentación .....</b>	<b>18</b>
<b>Pruebas histológicas.....</b>	<b>19</b>
Cortes histológicos .....	19
Tinción hematoxilina y eosina.....	20
<b>Primera fase experimental: experimento piloto.....</b>	<b>0</b>
<b>Segunda fase del experimento .....</b>	<b>1</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>3</b>
<b>Primera fase experimental.....</b>	<b>3</b>
Resultados de la primera fase experimental del día 3.....	3
Resultados primera fase experimental del día 14.....	5
<b>Segunda fase experimental .....</b>	<b>8</b>
Resultados de la segunda fase experimental del día 3.....	8
Resultados de la segunda fase experimental del día 7.....	10

Resultados de la segunda fase al día 14 .....	12
<b>Resultados histológicos .....</b>	<b>16</b>
Histologías día 3 .....	17
Histologías día 5 .....	18
Histologías día 7 .....	19
Histologías día 14 .....	20
<b>Discusión de resultados .....</b>	<b>21</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>23</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>24</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>25</b>
<b>Reconocimientos y premios.....</b>	<b>28</b>

## Resumen

En 1968, se realizó un estudio donde rasuraron e irradiaron ratones, esto para comprobar si existían efectos negativos de la luz en la piel (1), se observó que el pelaje de los sujetos irradiados creció más rápido que el grupo control. Esto planteó la idea de que la luz puede activar mecanismos biológicos y químicos benéficos en el tejido. Lo que dio paso a una nueva área de estudio, que utiliza a la luz como herramienta en procesos biológicos, conocida como la Biofónica.

El propósito de este estudio es analizar el efecto de la terapia de luz LED de baja densidad de energía (LED-LLLT) en el proceso de cicatrización de heridas cutáneas. Para esto, se realizaron dos fases experimentales, en la primera se probaron dos longitudes de onda a diferentes densidades de energía. Se realizaron dos heridas circulares de 1 cm de diámetro, en el dorso de ratas alopecicas, divididas en 5 grupos: Grupo Control (sin terapia), grupos con terapia de luz LED roja [633 nm], Grupo LR.D1 [2 J/cm<sup>2</sup>] y Grupo LR.D2 [10 J/cm<sup>2</sup>], para los grupos con terapia con luz LED verde [532 nm], Grupo LV.D1 [2 J/cm<sup>2</sup>] y el Grupo LV.D2 [10 J/cm<sup>2</sup>]. Para los grupos tratados con la LED-LLLT, las heridas fueron irradiadas al día 0, 1 y 2, después de provocar las heridas. Posteriormente se midió el área de las heridas con fotografías, adquiridas durante el proceso de cicatrización, estas se analizaron con el software ImageJ. En la segunda fase experimental, se eligió una densidad de energía de cada longitud de onda para un experimento más detallado. Obteniendo 3 grupos, un grupo control, grupo LR (10 J/cm<sup>2</sup>, luz roja) y el grupo LV (8 J/cm<sup>2</sup>, la luz verde). En esta fase se hicieron cortes histológicos, que fueron analizados en microscopio óptico de campo claro y aumento 5X, observándose subestructuras y diferenciación entre las capas de la piel en los grupos LED-LLLT a diferencia del grupo control que muestra solo proliferación. Lo cual parece indicar que la terapia ayuda al tejido a regenerarse, dejando una cicatriz más estética y la piel estructuralmente similar al tejido anterior a la herida.

Palabras Clave: Terapia de luz LED de baja densidad de energía, Cicatrización, Rata alopecica, Herida cutánea.

## Planteamiento del problema

El tratamiento de una herida cutánea es un problema de salud mundial que afecta a una gran parte de la población, ya que a diario estamos expuestos a percances que afectan nuestra piel, el órgano más grande del cuerpo humano y la primera barrera que protege nuestro organismo del exterior. Un manejo inadecuado de la herida podría extender el tiempo de curación aumentando la probabilidad de infección y afectado la salud del paciente.

En los Estados Unidos, las heridas crónicas afectan a 6,5 millones de pacientes. Se estima que se gastan anualmente \$ 25 billones de dólares en el tratamiento de heridas, cifra que está creciendo rápidamente debido al aumento de los costos de atención médica. Se proyecta que el mercado anual de productos para el cuidado de heridas alcance \$ 15.3 billones para el 2010. Un tema central de la curación de heridas es el problema de la cicatrización de la piel, un mercado anual de \$12 billones de dólares. (1) Para el caso de la atención a las heridas en México, a pesar de los enormes esfuerzos que llevan a cabo los profesionales del Sistema Nacional de Salud, no se ha logrado alcanzar la optimización de la calidad de los servicios que se ofrecen para tan emergente problema. (3)

Por otro lado, se han desarrollado técnicas biofotónicas como la terapia con luz LED de baja densidad de energía (LED-LLLT), que consiste en el uso de luz visible LED irradiada directamente sobre la herida durante cierto tiempo, según la dosis óptica, que es obtenida de la potencia del dispositivo y la densidad de energía que se desea emplear. En la literatura se han reportado trabajos que demuestran que esta terapia activa procesos físicos y bioquímicos en el tejido benéficos para proceso de cicatrización (4), sin embargo, existen diferencias entre los resultados reportados, posiblemente debido a la gran diversidad de parámetros empleados como son; fuente de luz, densidad de energía, dosis y las condiciones del experimento, como es el uso de antibióticos o farmacéuticos en el sujeto, ya que no hay una estandarización de los parámetros empleados, por lo cual todavía hay mucho por estudiar.

El impacto económico y social de las heridas en nuestra sociedad exige la asignación de un mayor nivel de atención y recursos para desarrollar terapias que minimicen las complicaciones de una herida cutánea. El propósito de este trabajo es evaluar la aplicación

de la LED-LLLT en el tratamiento de heridas cutáneas sobre ratas de laboratorio, por medio de cortes histológicos. Esta terapia se propone como una alternativa no invasiva, sin contacto para evitar infecciones y acelerar el proceso de cicatrización en una herida cutánea.

## Introducción

Poco se conoce sobre el mecanismo que activa la LED-LLLT en el tejido durante el proceso de cicatrización, todavía existe un gran debate sobre la efectividad de esta terapia. Nuestro estudio propone el uso de ratas alopécicas para esta terapia, ya que estos individuos carecen de pelo, con esto, tenemos ventajas como mayor visibilidad de la evolución de la herida y al tomar las medidas correspondientes mediante fotografías, que se realizaron con el software Image J.

Las longitudes de luz que más se han utilizado son la radiación ultravioleta y la radiación infrarroja, en los estudios hechos dentro del rango visible del espectro electromagnético, se han reportados resultados favorables. Entonces, si esta terapia es empleada correctamente tiene un nivel nulo de riesgos, contraindicaciones y efectos secundarios, a diferencia de fármacos y otros tipos de tratamientos. Se utilizaron dos dispositivos led [532 nm y 633 nm], los dispositivos fueron diseñados y elaborados por el grupo de biofónica del INAOE, cada uno de estos, es económico y fácil de usar al aplicar la terapia, en comparación a otros dispositivos usados en estudios similares hechos con láser. Los parámetros ópticos usados, fueron longitudes de onda y densidades de energía que se han empleado en estudios anteriores, se aplicaron luz verde LED [532 nm] y luz roja LED [633 nm], a densidades bajas de energía. Los métodos de observación elegidos fueron la toma de fotografías para realizar la medición de áreas de las heridas, para observar la cicatrización de la herida y los cortes histológicos de las muestras de la piel de los sujetos de experimentación, para ver los cambios morfológicos del tejido entre grupos.

# Objetivos

## Objetivo general

- Comprobar la eficiencia de la LED-LLLT en la cicatrización de heridas provocadas en modelo murino, utilizando diferentes longitudes de onda y densidades de energía.

## Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la luz verde [532 nm] sobre el proceso de epitelización (tiempo requerido y aspecto de la herida) empleando diferentes densidades de energía de luz.
2. Determinar el efecto de la luz roja [633 nm] sobre el proceso de epitelización empleando diferentes densidades de energía de luz.
3. Realizar la primera fase experimental para seleccionar la densidad de energía óptima en el tratamiento para cada longitud de onda propuesta.
4. Tomar fotografías convencionales de las heridas a diferentes tiempos, para observar el proceso de epitelización y el cierre de la herida.
5. Observar el comportamiento de los animales en experimentación durante el tiempo del tratamiento.
6. Sacrificar los animales en los tiempos establecidos y tomar muestras del tejido en proceso de epitelización para estudios histológicos.
7. Realizar un análisis estadístico para evaluar diferencias entre grupos experimentales con la prueba ANOVA de un factor.



# Marco teórico

## Antecedentes

Las terapias con luz tienen sus inicios en el año 1968 en Budapest, cuando se realizó un estudio en ratones, para determinar si el uso del láser sobre la piel podría causar efectos negativos como cáncer en la piel, se rasuró la parte dorsal de los ratones y se radiaron, usando un láser de una longitud de onda de 694 nm, se observó que el pelo de los ratones irradiados, creció más rápido que el de los no tratados, concluyendo que la luz podría causar una estimulación a nivel celular (3). Gracias a esta observación crece el interés científico en el uso de la luz a bajas densidades de energía para tratamientos y terapias en procesos biológicos, hasta su aplicación en la regeneración de la piel. A la fecha hay diversas hipótesis explicando los procesos que activa la luz en los tejidos para acelerar su proceso de cicatrización, una de las hipótesis explica que la irradiación con luz induce una reacción inflamatoria leve que regula positivamente la angiogénesis alrededor de la herida con un aumento posterior en el flujo sanguíneo, por lo tanto, promueve la cicatrización de la herida. (4) Por otro lado, en Japón, se realizaron experimentos probando con un láser He-Ne para la cicatrización de cortes quirúrgicos de donde se demostró mediante cortes histológicos en microscopía de campo brillante y microscopía de luz polarizada, que se mostró alivio de la inflamación excesiva, mayor formación de fibras de colágeno y recuperación de la continuidad de los tejidos, en el grupo de irradiación con una densidad de energía de 4.21 J/cm<sup>2</sup>, una dosis cada dos días, en cambio, hubo indicios de inflamación, mala formación de fibras de colágeno y discontinuidad de los tejidos en el grupo no radiado (5). Un estudio realizado en el año 2003, motivado por la utilización de los LED como una alternativa en la terapia de laser de baja densidad de energía, se llevó a cabo para evaluar la capacidad de los LED de influenciar los procesos de curación de heridas a nivel celular. Se utilizaron cultivos celulares de fibroblastos los cuales fueron aleatorios de manera controlada y fueron irradiados con láser y LED a diferentes longitudes de onda (Infrarrojo a 950 nm, rojo a 660 nm y verde a 570 nm). Los resultados son sorprendentes, se obtuvo un incremento en la velocidad de crecimiento de todos los cultivos comparados con los controles, sin embargo, el aumento en la tasa de crecimiento de los cultivos fue más marcada en aquellos irradiados

con luz verde, seguidos de los irradiados con luz roja, en tercer lugar, luz infrarroja con LED y por último la luz infrarroja con láser de baja densidad de energía. Los investigadores concluyen, que los resultados obtenidos en su estudio in Vitro sugieren la utilización de dicha terapia en la curación de heridas. La luz aplicada sobre las heridas aumenta de forma sustancial la velocidad y la calidad de la curación y cicatrización (7). Otro estudio realizó heridas circulares usando una cuchilla circular, irradiaron a una intensidad de  $8 \text{ mW/cm}^2$  por una hora por 9 días, basado en la hipótesis que la irradiación con LED induce proliferación beneficiosa de fibroblastos que pueden ser eficaces para promover la cicatrización de la herida. Del análisis del tejido con tinción inmunohistoquímica para la citoqueratina, y la tinción tricrómica de Masson, se demostró que la producción de colágeno se incrementó en el grupo irradiado con un LED verde de longitud de onda de 525 nm (6)

Aunque hay diversidad entre la descripción de los mecanismos que actúan en la terapia LED-LLLT, los ejemplos anteriores y más estudios respaldan la LED-LLLT como una alternativa para el tratamiento de heridas lo cual es de interés por las múltiples aplicaciones a futuro para la regeneración de tejido y aceleración del proceso de cicatrización.

## La luz

Antes de que existiera un estudio formal de la luz, ya utilizaban dispositivos que se relacionaba fenómenos ópticos, a lo largo de la historia han surgido conceptos y teorías que han definido a la óptica, como la rama de la física que estudia el comportamiento y propagación de la luz. Esta disciplina se ha ido desarrollando y asociándose con otras para tener una observación más completa acerca de los fenómenos que nos rodean.

La luz es una onda electromagnética, constituida por un campo magnético y eléctrico perpendiculares a la dirección de propagación, en la Figura 1, podemos observar el campo

eléctrico  $\vec{E}$  y magnético  $\vec{B}$  en un sistema de coordenadas, esto para representar que los campos son perpendiculares a la dirección de propagación y entre sí. También posee una naturaleza dual, es decir, se describe como onda o partícula (fotones) dependiendo del experimento al que la sometan.

Gracias al creciente interés sobre el estudio de la luz, su uso ha ido creciendo conforme avanza la ciencia,

sabemos que la luz no necesita un medio para trasladarse, que la velocidad a la que se propaga es una ley fundamental, que al pasar por ciertos materiales puede cambiar su dirección y que es una forma de energía que es capaz de provocar cambios en la materia.

Clasificándola de longitudes de onda de baja energía como las ondas de radio hasta longitudes de onda de alta energía como rayos gamma, esto conforma lo que se conoce como el espectro electromagnético como se ve en la Figura 2, en esta figura se observa la clasificación por longitud de onda, su clasificación por frecuencias es similar, la frecuencia es inversamente proporcional a la longitud de onda, de este amplio espectro electromagnético solo una fracción es del rango es visible para el ojo humano. Es importante señalar que la

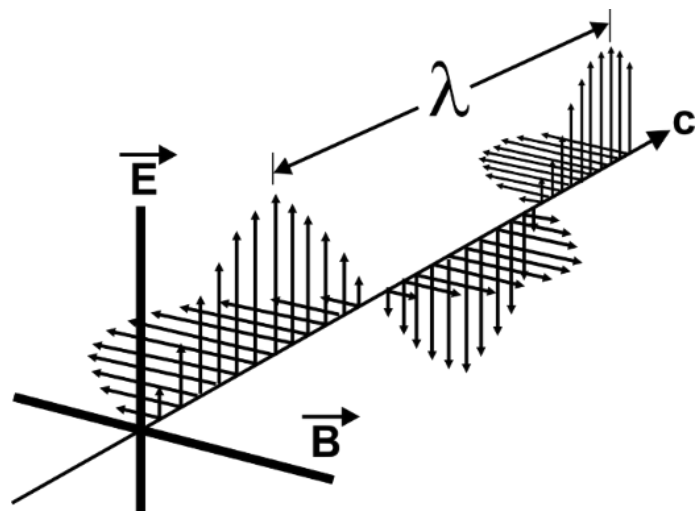


Figura 1. Dualidad onda-partícula, el campo magnético y eléctrico perpendiculares a la dirección de la propagación de la luz. La longitud de onda es la distancia entre dos crestas secuenciales.

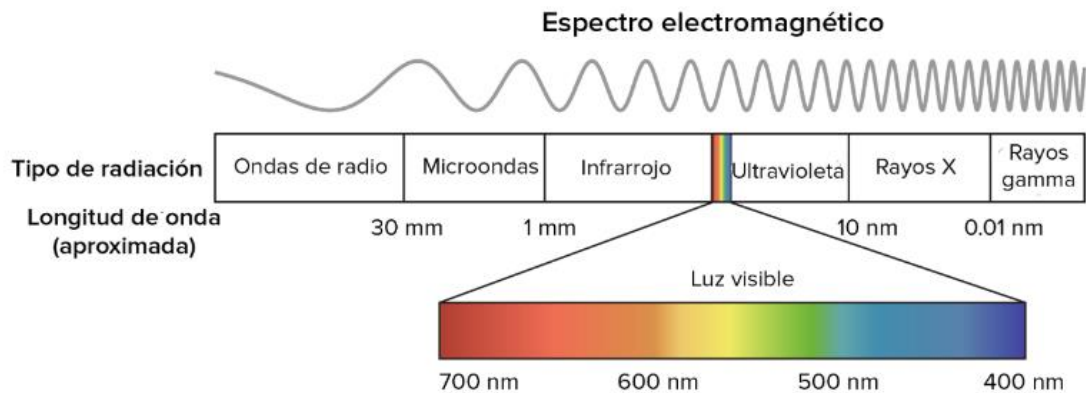


Imagen modificada de "Espectro electromagnético", de Inductiveload (CC BY-SA 3.0) y "Espectro EM", de Philip Ronan (CC BY-SA 3.0). La imagen modificada tiene una licencia de CC BY-SA 3.0

Figura 2. Espectro Electromagnético, el rango de la luz visible es una pequeña porción de este.

exposición del ser humano a ondas electromagnéticas es muy grande, sin embargo, existen longitudes de onda con una alta energía pueden causar daños irreparables en el organismo. Por esto, la exposición debe ser medida cuando tratan de ondas electromagnéticas con gran cantidad de energía, como lo son los rayos x.

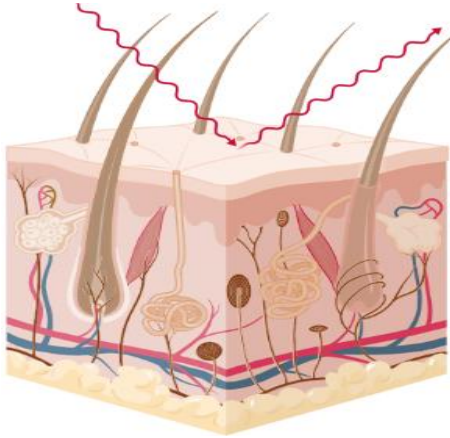
La energía del fotón puede calcularse por medio de la ecuación de Plank:

$$\bullet \quad E = \frac{hc}{\lambda}$$

Donde  $c$  es la velocidad de la luz,  $h$  la constante de Planck y  $\lambda$  la longitud de onda del fotón. En la actualidad es una gran herramienta en la ciencia y tecnología, usualmente, se utilizan longitudes de onda invisibles al ojo humano que están en rango de infrarrojo o ultravioleta. Pero nuevos estudios están apostando por el uso de nuevas tecnologías como es el LED con longitudes de onda en el rango visible ya que en estas condiciones no se esperando obtener efectos secundarios en los tejidos tratados.

## Interacción radiación materia

Los fenómenos ópticos más importantes para nuestro estudio que ocurren cuando la luz interactúa con la piel son:



**Reflexión:** La luz incidente es reflejada por el material a distintos ángulos, como se aprecia en la Figura 3. Este fenómeno se debe a las diferencias en los índices de refracción entre los medios el aire y el extracto corneo que es la parte superficial de la piel, este índice está dado por la relación  $n = \frac{c}{v}$  (donde  $c$  es la velocidad de la luz en el vacío y  $v$  la velocidad en el medio).

Figura 3. Reflexión fenómeno óptico.

**Dispersión o Esparcimiento:** Fenómeno por el cual distintas longitudes de onda se refractan con ángulos distintos al pasar por un medio, es decir, la luz dentro del medio viaja a través de varios caminos con distinto ángulo, como se muestra el cambio de dirección de la luz al pasar por la piel en la Figura 4. Dentro del tejido, la luz puede ser dispersada por fibras de colágeno, vasos sanguíneos, estructuras u otras moléculas de la piel.

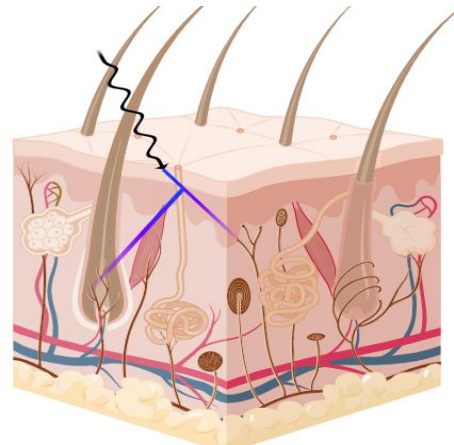
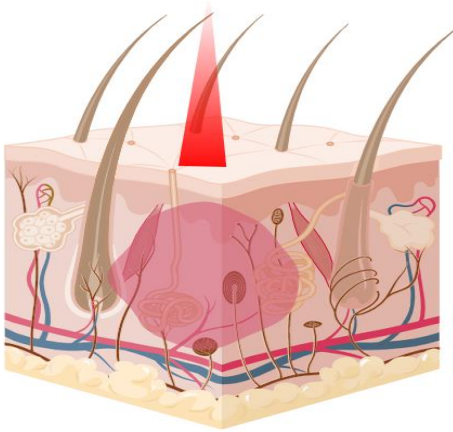


Figura 4. Esparcimiento, la luz cambia de dirección dentro la piel debido a su estructura.

**Absorción:** Cuando la luz es captada por el cuerpo es transformada en otro tipo de energía, o bien puede ser reemitida, como se ejemplifica en la Figura 5. Por lo general todos los materiales absorben en algún rango de longitudes de onda, la absorción de la luz se puede



dar en los cromóforos ya que cada uno de estos tiene un pico de absorción en una longitud de onda específica. Por otro lado, la penetración de la luz depende de la longitud de onda, ya que, en la piel, las longitudes de onda más cortas penetran menor distancia que las longitudes de onda largas, pero hay que tener en cuenta que existe un equilibrio ya que las longitudes de onda muy largas no llegan a interactuar con el tejido.

Figura 5. Absorción, fenómeno óptico importante para las terapias con luz.

La absorción se mide utilizando el coeficiente de absorción ( $\mu_a$ ) con unidades de  $1/m$ . Si la energía que tiene el fotón no es igual a la diferencia de energías entre los niveles de energías entre los niveles de molécula, el fotón puede ser dispersado, la dirección del fotón variará. La dispersión se le cuantifica de forma similar que a la absorción usando el coeficiente de esparcimiento por unidad de longitud. Algunos ejemplos de sustancias que absorben la luz en sistemas biológicos son: Melanina que se encuentra en la epidermis y la Oxihemoglobina, que se encuentra en la sangre.

## Proceso de cicatrización

La piel está conformada principalmente por tres capas, ver Figura 6, la capa exterior epidermis, seguida de la dermis y por último la hipodermis.

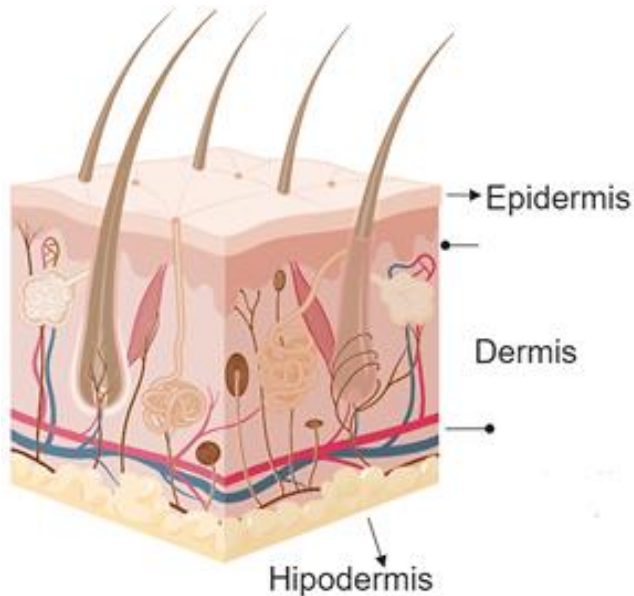


Figura 6. Principales capas de la piel.

La epidermis está constituida por varios grupos de células, uno de ellos son los queratinocitos.

Los queratinocitos se organizan en capas o estratos, que de la más superficial hacia adentro son: Capa córnea, lúcida, granulosa, espinosa y basal. Los queratinocitos cumplen con varias funciones, la más conocida es la de producir queratina, pero además sintetizan otras sustancias químicas. El ciclo de vida de las células de la epidermis es de aproximadamente 28

días y es menor con la exposición al sol.

La Dermis es la capa media de la piel y se divide en dos partes: primero la superficial, la más próxima a la epidermis, separada de esta por la membrana basal, que contiene vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas. Después la dermis profunda con abundancia de redes colágenas y elásticas, en la que están situados los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y las glándulas sudoríparas. Esta capa está constituida por tejido conectivo, las fibras colágenas son las más numerosas en la disposición y el grosor. En la dermis superficial hay fibras delgadas, a diferencia de la dermis media y profunda, donde son más gruesas y se disponen en capas casi paralelos a la superficie de la epidermis.

La hipodermis es la capa más profunda de la dermis y contiene las agrupaciones de glándulas sudoríparas, los vasos sanguíneos de la circulación periférica de la piel y los troncos nerviosos. En ella se asientan las células grasas (adiposas) de la piel, que se conocen con el nombre de adipocitos, células grasas necesarias para una piel sana. (13)

El objetivo principal del estudio de los procesos fisiológicos de la cicatrización es obtener una técnica para favorecer un cierre rápido, obtener una cicatriz funcional y estéticamente

satisfactoria. Los avances recientes en biología celular y molecular han ampliado enormemente la comprensión de los procesos biológicos implicados en la reparación de heridas y la regeneración tisular y han dado lugar a mejoras en el cuidado de heridas.



## Fisiología de la cicatrización

Una herida es la pérdida de la integridad de superficie cutánea y sus estructuras subyacentes donde queda interrumpida la continuidad celular, dicha lesión tisular es común y afecta al organismo en diversas formas, incluyendo pérdida local de fluidos, dolor, inflamación y pérdida de tejido tisular además que deja al organismo expuesto a posibles infecciones (10).

La cicatrización cutánea es un proceso reparativo complejo que conduce a la regeneración del epitelio y el reemplazo de la dermis por un tejido fibroso constituido por colágeno con características diferentes al tejido anterior. Las nuevas fibras son más cortas y desorganizadas, por lo que la cicatriz nunca presenta la misma fuerza tensora la piel ilesa. (11)

La cicatrización el proceso donde participan mediadores solubles extracelulares, células sanguíneas y células de la matriz tisular, para facilitar su estudio de ha dividido en fases. (12) Las cuales ocurren de manera secuencial, pero se superponen en el tiempo como se observan en la Figura 7:

- Hemostasia: Agregación plaquetaria y activación de la cascada de coagulación control de la hemorragia y luego estimula la migración celular.
- Inflamatoria (3 a 6 días): Se eliminan bacterias, la suciedad y se liberan factores que producen la migración y división de las células que toman parte en la siguiente fase.
- Proliferativa o de Granulación (4 a 14 días): Se caracteriza porque hay presencia de angiogénesis, aumento de colágeno la formación del tejido granular.

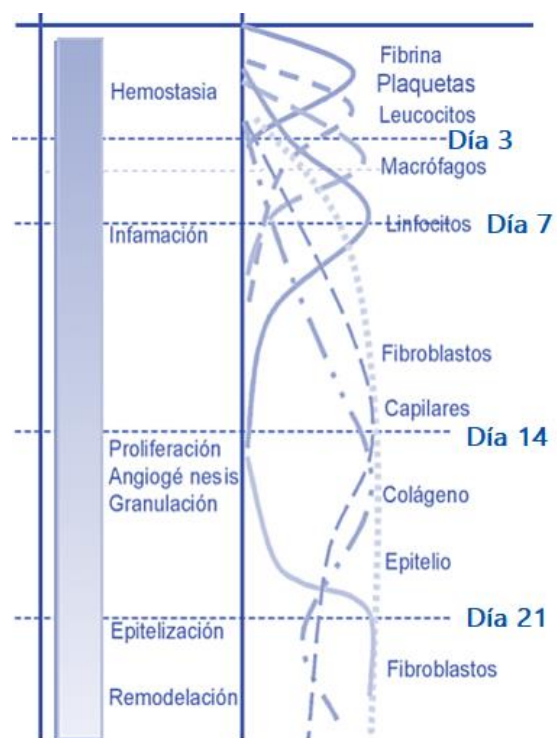


Figura 7. Fases del proceso de cicatrización, señalando los elementos importantes y el tiempo en cada fase.

- Epitelización: Las células epiteliales se desplazan por la herida cubriéndola, por otro lado, los miofibroblastos ayudan a producir fibroblastos y adipocitos que ayudan reducir el tamaño de la herida.
- Remodelación: El colágeno es remodelado y alineado a lo largo de las líneas de tensión y las células no necesarias son eliminadas por apoptosis.

Para el diagnóstico en histologías de la cicatrización, conocer el tipo de herida y el estado en que se encuentra la herida, se analizan las células que componen el infiltrado inflamatorio, que son linfocitos, histiocitos, células plasmáticas, mastocitos, neutrófilos, o eosinófilos, pueden estar presentes un único tipo de estas células o por una mezcla de varias de ellas. (14)

Una de las etapas más importantes de la cicatrización es el proceso de angiogénesis que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Este fenómeno está presente en numerosos procesos biológicos, tales como la regeneración de tejidos (piel). Este proceso está regulado tanto por factores biológicos (células) y químicos (oxígeno, factores de crecimiento) como por estímulos mecánicos. (15)

## **Terapia de luz led de baja densidad de energía (LED-LLLT)**

Las terapias con luz consisten en irradiar tejido biológico (15), su estudio se concentra en describir cómo la energía de la luz influye a nivel celular y cuáles son los parámetros de luz óptimos para las diferentes fuentes de luz. (16) Otras definiciones se refieren a la estimulación directa intracelular y molecular, reorganización celular, inhibición y estimulación de ciertas acciones a través de la luz. Es la conversión de la energía lumínica dentro del espectro de la luz visible, en reacciones químicas y físicas que inducen cambios terapéuticos en el paciente. Algunos reportan que esta terapia es un fenómeno fotobiológico (interacción no ionizante). (17)

Esta técnica Biofotónica se reporta con diversos nombres como, por ejemplo, Low level laser therapy orientado al uso del láser, terapia con luz, foto biomodulación, pero el concepto es parecido para los estudios reportados. Los tipos de luz que más se han utilizado son la radiación ultravioleta y la radiación infrarroja, ambos se encuentran en los extremos del espectro del rango de luz visible, poco se ha estudiado sobre el efecto de algunas longitudes de onda dentro del espectro visible de la luz, pero se han encontrado resultados sorprendentes, además tienen un nivel ínfimo de riesgo biológico, contraindicaciones o efectos secundarios. Estudios han reportado que la coherencia no es un parámetro relevante, por ejemplo, Salas Garcia afirma que “Las propiedades de la coherencia no se manifiestan cuando un haz de luz interacciona con un tejido a nivel molecular “ (2), es decir, la eficiencia de la terapia no depende de la coherencia de la luz, ya que pueden obtenerse los resultados similares con luz no coherente (luz LED).

En la actualidad hay una gran variedad de parámetros ópticos, para las terapias con luz, que pueden influir, algunos ejemplos son; la longitud de onda de la luz, fuente de luz, densidad de energía y la dosis (22). Según un estudio hecho en España, donde se realizó un metaanálisis sobre la selección óptima de las fuentes de luz usadas en terapias, se encontró que existía un rango de densidad de energía terapéutico, como se muestra en la Figura 8, esto se hizo comparando diversas fuentes en rangos de rojo-infrarrojo, concluyendo que existían ciertas densidades de energía óptimas para su aplicación terapéutica (18). Esto podría explicar porque en algunos estudios no se han encontrado resultados concluyentes para los experimentos de terapias con luz. Una característica importante de la LED-LLLT es la utilización de la luz del rango visible al ojo humano, usando baja densidad de energía, para obtener un efecto terapéutico en el ser humano a través de la estimulación a nivel molecular y celular.

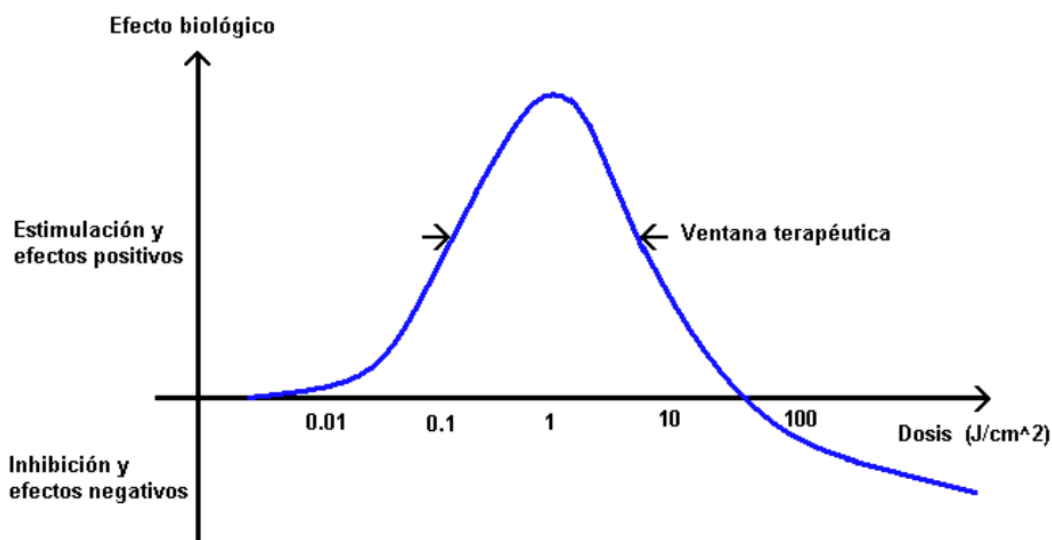


Figura 8. Grafica extraída de un análisis hecho sobre selección de fuentes en terapias con luz. (18)

## Mecanismos en la reparación de tejidos con la LED-LLLT

En la búsqueda de mejorar los tratamientos y técnicas biológicas ha dado a luz nuevas ramas de ciencia como la biofónica, gracias a estas nuevas áreas y al análisis multidisciplinario del problema, podemos comprender mejor los procesos para describir los mecanismos que activa la luz en tejidos biológicos como la piel. (18)

El mecanismo de acción más aceptado de la terapia se encuentra basado en que la energía se entrega a los átomos del objeto foto aceptor. Esta energía puede convertirse en oscilaciones de calor, excitar, ionizar una molécula, o romper enlaces químicos. Produciendo reacciones primarias, explicadas a través de diferentes hipótesis (Hipótesis de los singletes de oxígeno, hipótesis de la alteración de propiedades Redox e hipótesis del óxido nítrico (NO)).

La oxidación biológica, definida como la pérdida o ganancia de electrones da lugar al potencial redox de cada célula, los cambios de energía libre a nivel celular se expresan en términos de Potencial Redox o Potencial de óxido- reducción (19). Existen diferentes sistemas enzimáticos involucrados en este proceso: Las oxidasas, que utilizan al oxígeno como aceptor de hidrógeno, dentro de este complejo, se encuentra el citocromo c oxidasa que es una hemoproteína distribuida ampliamente en muchos tejidos, es el componente terminal de la cadena respiratoria que se encuentra en las mitocondrias (20). Por otro lado, la cadena

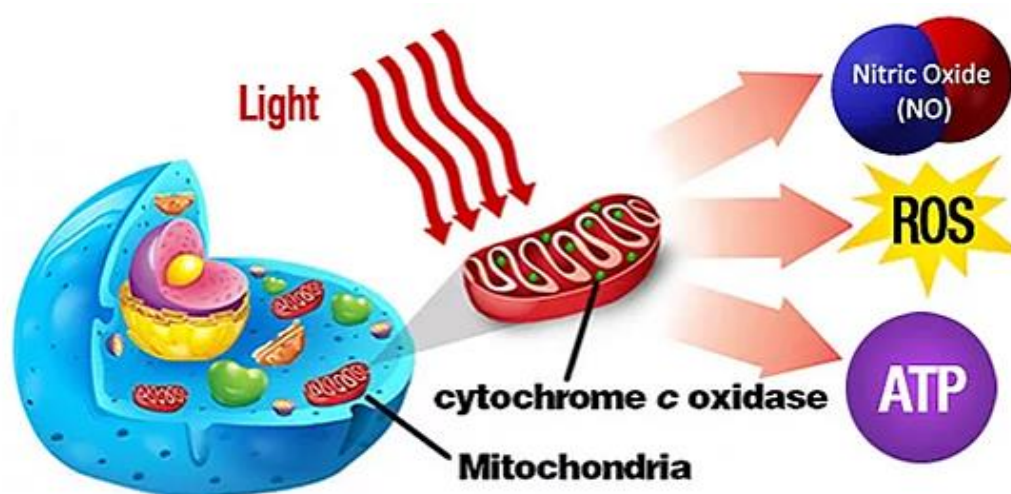


Figura 9. Esquema extraído: "Basic Photomedicine", Ying-Ying Huang, Pawel Mroz, and Michael R. Hamblin, Harvard Medical School

respiratoria se encarga del transporte de electrones y del mantenimiento del potencial redox, la fosforilación oxidativa que es la encargada de la producción de ATP (21), elemento

importante que da energía a la célula. En la figura 9, podemos observar que la radiación emitida sobre la célula actúa sobre las mitocondrias, estimulan la síntesis de ATP, dando mayor energía a la célula. Lo que en el proceso de cicatrización da como resultado el aumento de la proliferación de fibroblastos, fibras de colágeno y procolágeno, y de varias citoquinas responsables en el proceso de curación de heridas, como el factor de crecimiento de queratinocitos, sustancia natural que estimula el crecimiento de células epiteliales en la piel, y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, PDGF (platelet derived growth factor) que es uno de los numerosos factores de crecimiento, o proteínas que regulan el crecimiento celular y la división celular. El PDGF juega un rol significativo, en especial para la angiogénesis, que implica el crecimiento de vasos sanguíneos a partir de tejido vascular existente. (20)

Este mecanismo es congruente en los resultados histológicos reportados, en la mayoría de los estudios, de terapias empleando luz visible para la estimulación celular o procesos biológicos muestran los siguientes efectos:

- Regeneración tisular, incluso en tejidos profundos
- Disminución del proceso inflamatorio ya sea agudo o crónico
- Disminución de los procesos dolorosos
- Disminución y control de los edemas
- Aumento en la proliferación de fibroblastos y fibras de colágeno

Las propiedades ópticas de los tejidos biológicos son importantes para la terapia debido a que estas determinan la manera en que la luz interactúa con la materia. Al incidir luz en la piel se observan cambios a nivel celular, hay muchas teorías acerca de los mecanismos de la LED-LLLT, pero la conclusión es la misma; la luz activa procesos celulares y bioquímicos que pueden ayudar a mejorar el proceso de cicatrización.

# Metodología

## Material biológico

### *Rattus norvegicus* (cepa alopécica)



Figura 10. Rata alopécica en observación, fotografía tomada en el bioterio “Claude Bernard” de la Buap.

La rata desnuda es un mutante genético encontrado en *Rattus norvegicus*, el tamaño y la solidez de la rata desnuda y la ausencia de anomalías endocrinológicas importantes la convierten en un modelo experimental apropiado para una variedad de procedimientos inmunológicos y quirúrgicos. (22)

El modelo de rata sin pelo, como se muestra en la Figura 10, ha demostrado valor en muchas áreas de la investigación biomédica. Esta cepa de rata ha proporcionado un modelo sólido de tamaño adecuado para la experimentación. El Bioterio “Claude Bernard” de la BUAP posee una cepa de rata mutante alopécica, este espécimen se muestra en la figura 10, que sobrevive en condiciones convencionales, su docilidad y fácil manejo le confieren ventajas relativas para el trabajo experimental. (23)

En este trabajo en vital importancia sus características ya que su uso nos brinda una ventaja para medición y observación de las heridas inducidas, mediante el análisis de fotografía, debido a su falta de pelaje. Las características de los sujetos de experimentación usados en este estudio fueron sobre ratas macho (*Rattus Norvegicus*) de la cepa alopécica, con una edad de 3-4 semanas de edad por lo cual, las ubicamos en la edad de la juventud con un peso entre los 100-140 gramos.

## Monitoreo de los sujetos de experimentación

Los sujetos se mantuvieron en las instalaciones del Bioterio “CLAUDE BERNARD” de la BUAP, en un entorno limpio, en cajas con aserrín estéril, agua y comida *add libitum*, como se ilustra en la Figura 11, mantenidos con ciclos de luz-oscuridad 12-12 horas. Respetando los lineamientos de estas instalaciones y después de haber acreditado el curso de “Manejo y vías de administración en rata de laboratorio” requerido para el manejo y vías de administración de ratas



Figura 11. Todas las ratas alopecicas, puestas en las mismas condiciones.

de laboratorio. El manejo de las ratas de laboratorio se realizó en las instalaciones de Bioterio “CLAUDE BERNARD” de la BUAP bajo la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 y la supervisión del Comité Institucional para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio CICUAL BUAP.

Tabla 1

Experimento	Grupos				
Primera fase	CONTROL	LR.D1	LR.D2	LV.D1	LV.D2
	Grupo sin tratamiento	Terapia con luz LED roja, densidad de energía 2 J/cm <sup>2</sup>	Terapia con luz LED roja, densidad de energía 10 J/cm <sup>2</sup>	Terapia con luz LED verde, densidad de energía 2 J/cm <sup>2</sup>	Terapia con luz LED verde, densidad de energía 8 J/cm <sup>2</sup>
Segunda fase	CONTROL	LR		LV	
	Grupo sin tratamiento	Terapia con luz LED roja, densidad de energía 10 J/cm <sup>2</sup>		Terapia con luz LED verde, densidad de energía 8 J/cm <sup>2</sup>	

Todos los sujetos estuvieron aislados las primeras 48 horas, en cajas individual y con las mismas condiciones mencionadas anteriormente, esto para evitar que la cicatrización de herida fuera afectada por el contacto con otra rata en los primeros días, posteriormente se colocaron en pareja para evitar algún signo de depresión por soledad. Se elaboró una bitácora



para la observación cualitativa de los individuos para detectar riesgos de salud, como infecciones o estrés, durante el proceso de cicatrización, ya que no se implementó algún tipo de vendaje, ungüento o antibiótico.

En la segunda fase del experimento; experimento agudo, los sujetos se clasificaron en cinco grupos, ver tabla 1. Esto para encontrar la densidad de energía que muestre mejora en el proceso de cicatrización, y posteriormente aumentar el número de individuos por grupo para un análisis más detallado en el experimento agudo. El tratamiento para los grupos con la LED-LLLT consistió en la irradiación de las heridas inducidas quirúrgicamente, en el dorso de ratas macho alopécicas jóvenes, usando el dispositivo de luz LED, se aplicaron las dosis ópticas al día 0,1 y 2 después de realizar los cortes, en el día 0 la terapia se aplicó antes de que el efecto del sedante pasara, para los otros días, las ratas se sujetaron, durante la terapia, como lo indica el manual del bioterio para no causar algún daño al sujeto. Después se monitoreo su rehabilitación y tomaron las fotografías en los días correspondientes, para posteriormente realizar el análisis cuantitativo mediante la medición del área de las heridas en las fotografías.

Para obtener las muestras de las heridas, los sujetos se sacrificaron, según el día correspondiente, por cámara de  $CO_2$ , para después recortar con bisturí y tijera dejando espacio alrededor de la herida que se tuvo al día 0.



Figura 12. Rata alopécica después del corte quirúrgico.

## Parámetros ópticos



Figura 13. Dispositivos de luz LED, luz verde y luz roja correspondientemente.

Los dispositivos LED usados en las terapias se caracterizaron en el laboratorio de Biofotónica del ICUAP, los dispositivos de luz LED, ver la figura 13, fueron diseñados y elaborados por el departamento de Óptica del instituto de astrofísica, óptica y electrónica de Puebla INAOE.

La Tabla 2 muestra los parámetros físicos ópticos obtenidos en el laboratorio de biofotónica, bajo la dirección del Dr. Juan Pablo Padilla Martínez.

Tabla 2

Terapia	Longitud de onda (nm)	Densidad de Potencia (W/cm <sup>2</sup> )	Área de irradiación (cm <sup>2</sup> )	Tiempo de irradiación (segundos)	Densidad de energía (J/cm <sup>2</sup> )
LV.D1	532nm	0.055	0.78	~37	2 J/cm
LV.D2				~146	8 J/cm
LR.D1	633nm	0.1	0.78	~20	2 J/cm
LR.D2				~100	10 J/cm

En esta tabla también se muestran las densidades de energía que fueron empleadas en los diferentes grupos, donde el tiempo de irradiación del tejido se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad de Energía} = \text{tiempo de exposicion} \left[ \frac{\text{Potencia}}{\text{Area}} \right]$$

Para obtener la dosis óptica, se tomaron los datos de la caracterización y dado que la potencia de los dispositivos es fija, y también el área, solo se puede influir en la densidad de energía a través del tiempo de exposición.

## **Valoración cuantitativa de los sujetos de experimentación**

En la prueba piloto se tomaron fotografías de la cicatriz con una referencia métrica del día 0, 3 y 14, las fotografías se analizaron mediante el software ImageJ, en el cual se midió el área de la cicatriz al día 3 y 14, teniendo como referencia el día 0.

En el experimento agudo se tomaron fotografías de la cicatriz, diariamente durante 21 días, con referencia métrica y delimitando el área a fotografiar con una platilla cuadrada. Estas fotografías se analizaron mediante el software ImageJ, en el cual se midió el área de la cicatriz, teniendo como referencia el día 0. Se tomo este día como el 100% de la herida, se normalizaron los siguientes días al día 0 para crear una gráfica con los porcentajes de área de la herida. Estos datos fueron analizados usando el software Minitab para obtener gráficas, utilizando el método ANOVA de un factor, esto para comprobar diferencias significativas entre tratamientos de los grupos a comparar.

## Análisis de imágenes

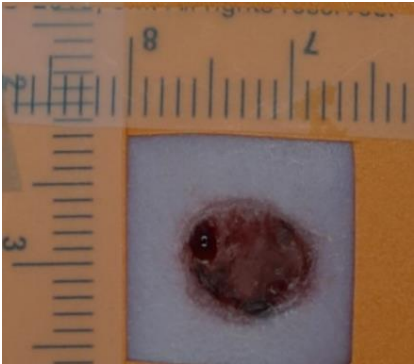


Figura 14. Fotografía con referencia para su posterior medida.

En la segunda fase del experimento se obtuvieron las fotografías correspondientes de cada día durante 21 días, para realizar las mediciones y observar la evolución de la cicatrización.

Las fotografías de las heridas en cada grupo fueron tomadas con una escala, como se observa en la figura 14, para la medición del área mediante las herramientas del software Image J, que se muestran en la figura 15, obteniendo las mediciones como se ejemplifica en la figura 16. Se tomaron las fotografías de los días claves del proceso de cicatrización. Estas medidas fueron sometidas a un análisis estadístico para encontrar alguna tendencia en la reducción del área de la herida en los grupos con terapia en comparación con el grupo control.

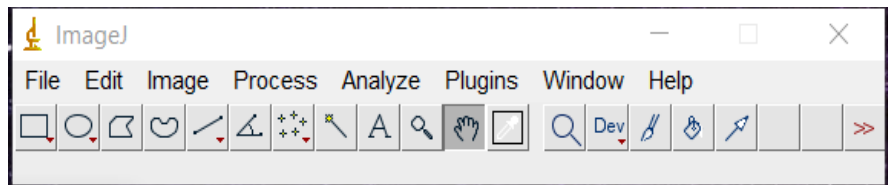
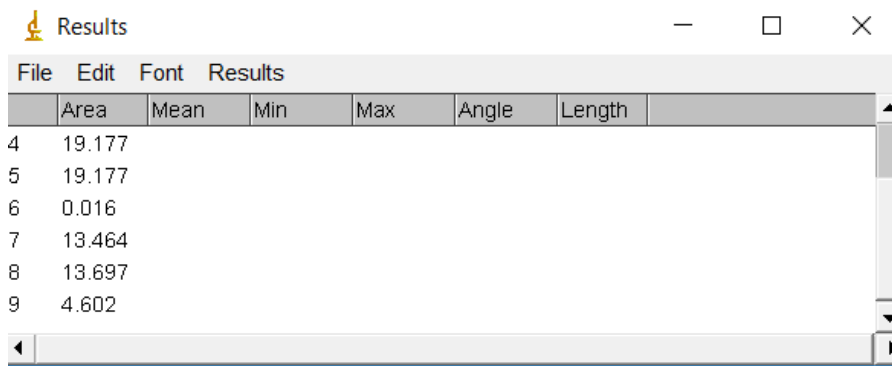


Figura 15. Ventana de herramientas, ImageJ J.



File	Edit	Font	Results		
Area	Mean	Min	Max	Angle	Length
4	19.177				
5	19.177				
6	0.016				
7	13.464				
8	13.697				
9	4.602				

Figura 16. Ventana de medidas hechas en ImageJ.

## Análisis estadístico

El objetivo principal de muchos experimentos consiste en determinar el efecto que sobre alguna variable dependiente Y tienen distintos niveles de algún factor X. El diseño para el análisis simple de la varianza consistirá en obtener muestras aleatorias e independientes del valor de Y asociado un factor X1. (25) En otras palabras, el análisis de ANOVA de un solo factor evalúa la importancia de un factor al comparar las medias de la variable de respuesta. La prueba ANOVA requiere datos que sigan una distribución aproximadamente normal con varianzas iguales entre los niveles de factores, sin embargo, funciona bastante bien incluso cuando se viola el supuesto de normalidad, a menos que una o más de las distribuciones sean muy asimétricas o si las varianzas son bastante diferentes.

La hipótesis nula establece que todas las medias de cada tratamiento son iguales mientras que la hipótesis alternativa establece que al menos una es diferente. Si el valor p es menor al error aceptado se rechaza la hipótesis nula, lo que supone que el factor o tratamiento sí influye en la respuesta de la variable dependiente, en caso contrario la hipótesis nula se acepta y se dice que no hay significancia entre las condiciones evaluadas. El objetivo del ANOVA es comparar los diversos valores medios para determinar si alguno de ellos difiere significativamente del resto (24).

De las áreas obtenidas de las mediciones, se tuvo como referencia el día 0 como el 100 por ciento de la herida y se normalizaron los otros días de cada herida, esto para tener los porcentajes de área de las heridas, estos datos fueron procesados para el análisis estadístico utilizando el método de ANOVA de un factor para demostrar la diferencia entre los tratamiento y el grupo control, usando nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$  con una hipótesis nula de medias iguales e hipótesis alternativa con al menos una media diferente.

**Tabla 3. Método ANOVA, nivel de significancia para los resultados del experimento.**

<b>Hipótesis nula</b>	<b>Todas las medias son iguales</b>
<b>Hipótesis alterna</b>	No todas las medias son iguales
<b>Nivel de significancia</b>	$\alpha = 0.05$

## **Valoración cualitativa de los sujetos de experimentación**

Para este rubro se llevó a cabo una bitácora, en la cual se concentró la valoración diaria de los pesos, estado de salud y comportamiento de los sujetos de experimentación, esto para asegurar que los sujetos se encontraron en buena salud, antes, durante y después de la cirugía y terapias. El experimento piloto y la bitácora nos sirvieron para elegir los mejores parámetros ópticos y fisiológicos para emplear en la segunda fase del experimento

En la prueba piloto, los pesos de los sujetos fueron de 95 a 130 g, de esta prueba se observó que la edad de nuestras ratas no podría ser la misma, para la segunda fase se tomó el rango de pesos entre 120-140 g. Los registros nos indican que el peso de los sujetos no mostro bajas significativas ni presentaron deficiencias en su alimentación, tampoco hubo signo alguno de depresión o dolor crónico, esto nos indica que nuestros individuos fueron tratados de forma responsable y nuestros sujetos se encontraron con buena salud a lo largo de su observación.

# Pruebas histológicas

## Cortes histológicos

El día de sacrificio de los organismos se tomaron biopsias de las heridas, que se colocaron en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 4 semanas aproximadamente, después de este tiempo se siguió el siguiente procedimiento para preparar el tejido para su estudio mediante cortes histológicos:

- Deshidratar el tejido: Se colocó en alcohol a diferentes concentraciones, dejándolos 24 horas por cada cambio, los primeros dos cambios al 70% y el último al 100%.
- Desalcoholizar: Se cambió el tejido a cloroformo durante 24 horas, después se hizo un último cambio de una hora y media.

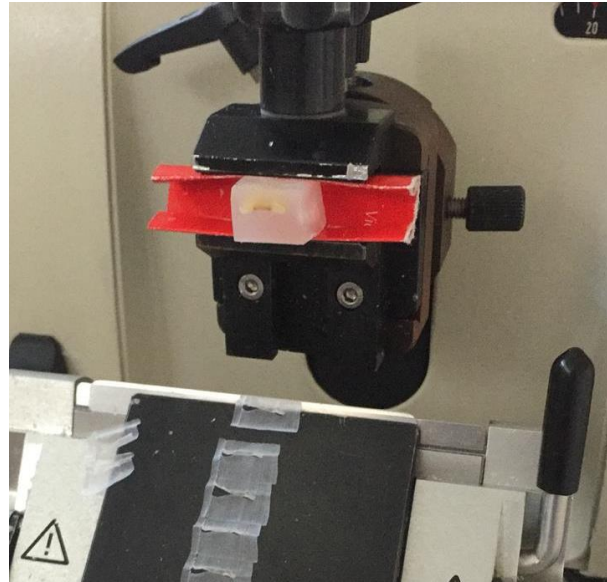


Figura 17. Micrótopo con bloque de parafina donde se incluyó la muestra del tejido.

Posteriormente se incluyeron los tejidos en parafina dejando la muestra en parafina líquida durante 24 horas y después la muestra se pasó a parafina filtrada en moldes para formar un bloque, estos se dejaron enfriar durante mínimo 24 horas. Estos se cortaron en micrótopo,



Figura 18. Cortes histológicos montados en portaobjetos.

como se observa en la figura 17, con un grosor de 20  $\mu\text{m}$ , estos cortes, con ayuda de gelatina para montaje, se fijaron en los portaobjetos, como los ejemplos en la figura 18. Los análisis histológicos se realizaron en el departamento de Biología y Toxicología del ICUAP. Bajo la dirección de la Dra. Wendy Argelia Garcia Suastegui.



## Tinción hematoxilina y eosina

La técnica de tinción con hematoxilina H&E, este se usa como colorante nuclear, tiñendo los núcleos de color azul/negro y aportando un buen detalle de estos. Por este motivo, se suele usar junto con un colorante citoplasmático, generalmente la eosina, que aporta una gradación entre el rosa, y el rojo a las estructuras y matrices celulares de carácter catiónico, a las que la hematoxilina no tiñe o lo hace muy débilmente. Las características de los compuestos que la componen hacen posible observar al microscopio óptico las células individualizadas y sus núcleos, que se tiñen de forma diferenciada. Las fibras de colágeno no son difíciles de reconocer en los cortes histológicos. Con la hematoxilina y eosina toman un color rosado, bajo esta tinción, es posible identificar la gran mayoría de tejidos musculares y glandulares del cuerpo. Aportando con ella la morfología de las células que forman el tejido y la posición relativa y la forma del núcleo dentro de ellas. (24)

Los cortes fueron montados, teñidos y sellados para formar laminillas que serán observadas en un microscopio óptico de campo claro con un objetivo de 5X. Según el protocolo del laboratorio de toxicología del ICUAP, el procedimiento es el siguiente, además que se bosqueja el proceso, el carril de tinción, en la figura 19:

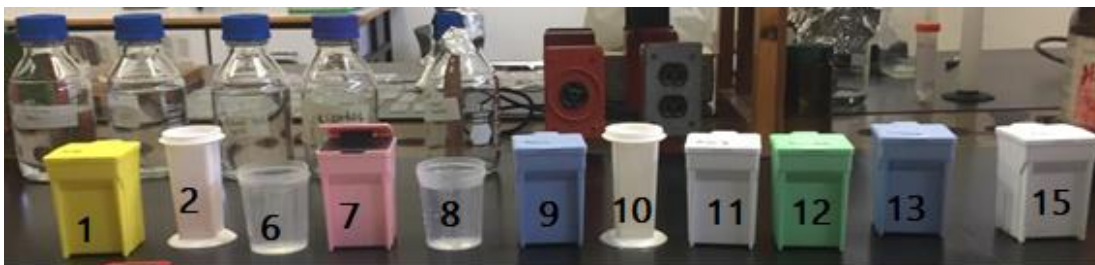


Figura 19. Carril de tinción.

- 1.- 2 cambios de 10 min en xileno para desparafinar.
- 2.- 2 cambios de 10 min en etanol 100°
- 3.- 10 min en etanol 96°
- 4.- 10 min en etanol 80°
- 5.- 10 min en etanol 50°
- 6.- 5 min en H<sub>2</sub>O destilada.
- 7.- 5-10 min en Hematoxilina.
- 8.- 15 min en agua corriente.

### **Diferenciación.**

- 9.- 2 cambios de 1 min en H<sub>2</sub>O destilada.
- 10.- 1.5 min en Eosina al 0.2 % en H<sub>2</sub>O.
- 11.- unos segundos en 70° para diferenciación.
- 12.- 20 s en etanol 96°
- 13.- 2 cambios de 3 min en etanol 100°
- 14 y 15.- 2 cambios de 10 min en xileno.
- 16.- Montar en un portaobjetos.



## Primera fase experimental: experimento piloto

En la prueba piloto se comprobaron dos densidades de energía para cada longitud de onda usando un dispositivo de diodo LED. Los sujetos se valoraron y pesaron para verificar que estuvieran en buenas condiciones para la cirugía. Se trabajaron con 10 ratas jóvenes, se distribuyeron según la Tabla 4, después los sujetos se sedaron con Xilacina- Ketamina a una dosis de 0.20 ml por 100 g. Los cortes fueron hechos con tijera, dos cortes circulares de 1 cm de diámetro en la parte dorsal de la rata.

**Tabla 4**

<b>Grupo</b>	<b>Numero de ratas</b>
<b>Control</b>	<b>2</b>
<b>LR.D1 (Luz Roja) 2 J/cm<sup>2</sup></b>	<b>2</b>
<b>LR.D2 (Luz Roja) 10 J/cm<sup>2</sup></b>	<b>2</b>
<b>LV.D1 (Luz Verde) 2 J/cm<sup>2</sup></b>	<b>2</b>
<b>LV.D2 (Luz Verde) 8 J/cm<sup>2</sup></b>	<b>2</b>

- El grupo control, camada de ratas con herida, pero sin tratamiento, n=4.
- Grupo de LED-LLLT con el dispositivo de luz roja (633nm) con una densidad de energía de 5 (LR.D1) y 10 (LR.D2) J/cm<sup>2</sup>, n=4.
- Grupo de LED-LLLT con el dispositivo de luz verde (532nm) con una densidad de energía de 2 (LV.D1) y 8 (LV.D2) J/cm<sup>2</sup>, n=4.

La terapia se aplicó al día 0, 1 y 2, según los tiempos establecidos para cada grupo. Después se tomaron fotografías de las heridas al día 0, 3 y 14, para obtener las medidas del área de la herida para cada rata.

## Segunda fase del experimento

En la prueba piloto se comprobaron dos densidades de energía para cada longitud de onda usando un dispositivo de diodo LED, en esta etapa se utilizaron las densidades de energía seleccionadas de la prueba piloto. En esta fase se trabajó con 17 ratas jóvenes divididas en 3 grupos, como se describe en la tabla 5:

**Tabla 5**

<b>Grupo</b>	<b>Numero de ratas</b>
<b>Control</b>	<b>6</b>
<b>LR (Luz Roja) 10 J/cm<sup>2</sup></b>	<b>6</b>
<b>LV (Luz Verde) 8 J/cm<sup>2</sup></b>	<b>5</b>

- El grupo control, camada de ratas con herida, pero sin tratamiento, n=12.
- Grupo de LLLT con el dispositivo de luz roja (633nm) a la densidad de energía seleccionada, n=12.
- Grupo de LLLT con el dispositivo de luz verde (532nm) a la densidad de energía seleccionada n=10.

Los sujetos se encontraban en peso de entre 120 a 140 gramos, los sujetos se sedaron con Xilazaina- Ketamina. Se hicieron dos cortes circulares de 1 cm de diámetro con tijera. La terapia se aplicó al día 0, 1 y 2 después de provocar las heridas en los sujetos. A diferencia del experimento piloto, en esta fase se decidió tomar fotografías de las heridas con escala diariamente, durante 21 días, se normalizaron las heridas para obtener el porcentaje de herida al día correspondiente.

Finalmente se sacrificaron los sujetos por cámara de CO<sub>2</sub> y se tomaron las muestras de las heridas que se incluyeron en paraformaldehído al 4% para posteriormente realizar los análisis

histológicos. A forma resumen, se puede observar en la Figura 20 para observar el proceso de este experimento antes de la realización de los cortes histológicos.

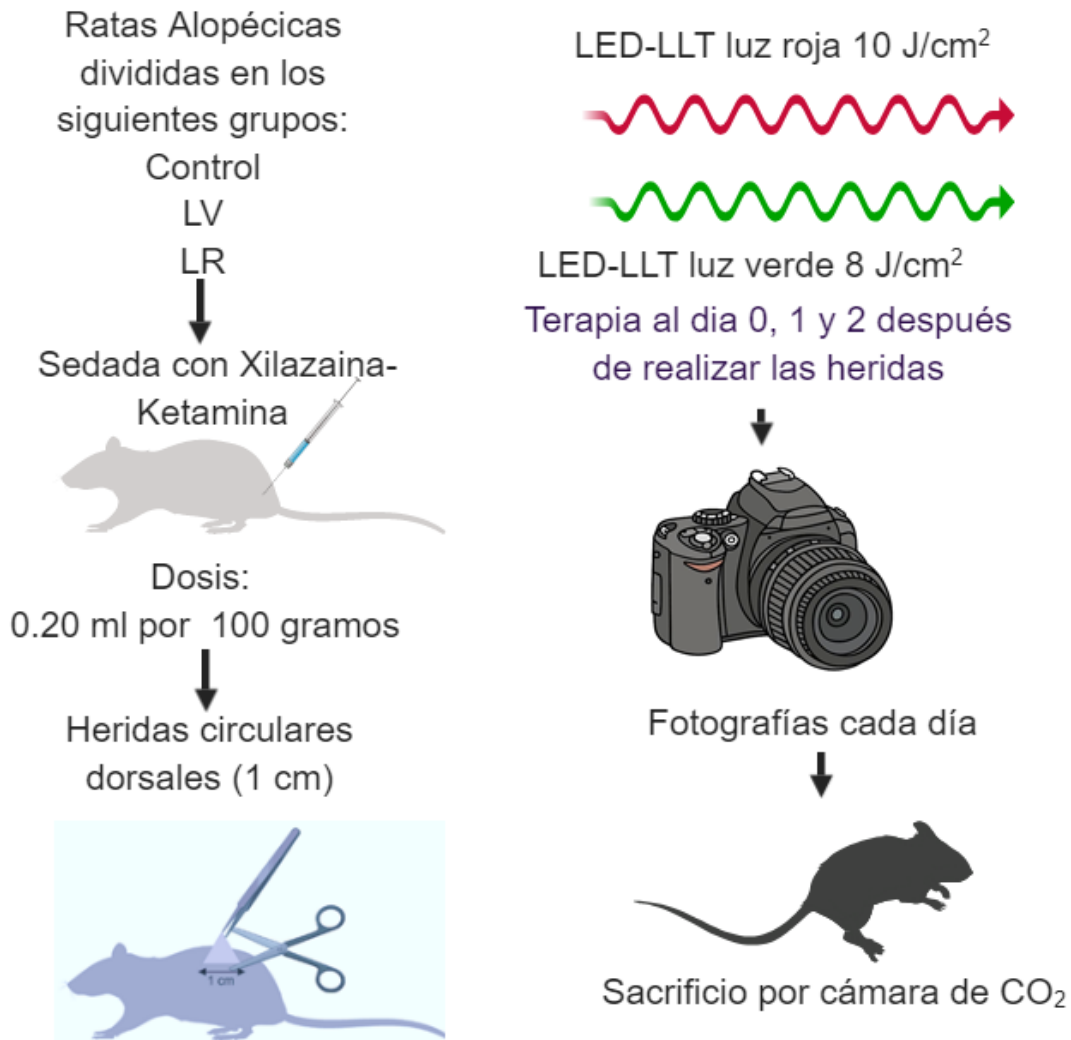


Figura 20. Experimento.

# Resultados

## Primera fase experimental

En la primera fase experimental se obtuvieron las fotografías del día 3 y 14, las áreas de la herida fueron obtenidas mediante la medición de las fotografías usando el software image J y procesadas en el ANOVA de un factor en Minitab, también se obtuvo una gráfica para la interpretación de los resultados.

### Resultados de la primera fase experimental del día 3

Los datos se normalizaron respecto a la medida del día 0, para obtener los porcentajes del área la herida al día 3, obteniendo las medias y datos que se muestran en la tabla 7, donde N es nuestro número de área (herida medida).

**Tabla 6. Medias**

Día 3. Grupo	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Control	4	81.32	18.01	(63.35, 99.29)
LR.D1	2	76.3	17.1	(50.9, 101.7)
LR.D2	2	60.27	11.63	(34.86, 85.69)
LV.D1	2	62.25	13.27	(36.83, 87.67)
LV.D2	2	60.48	6.48	(35.06, 85.89)

De esta tabla 6 podemos deducir que hay una gran diferencia entre la desviación estándar para el grupo control, lo que es de esperar ya que los organismos no cicatrizan igual debido a factores biológicos propios, en cambio el grupo LV.D2 disminuye esta diferencia, esto podría deberse a la terapia que hace que cicatricen de manera similar.

En la figura 21, podemos observar que una clara diferencia al día 3, teniendo los mejores resultados para los grupos LV.D2 y LR.D1, los grupos menos eficientes son el grupo control y el grupo LR.D1, que fue el de menor densidad de energía para la luz roja

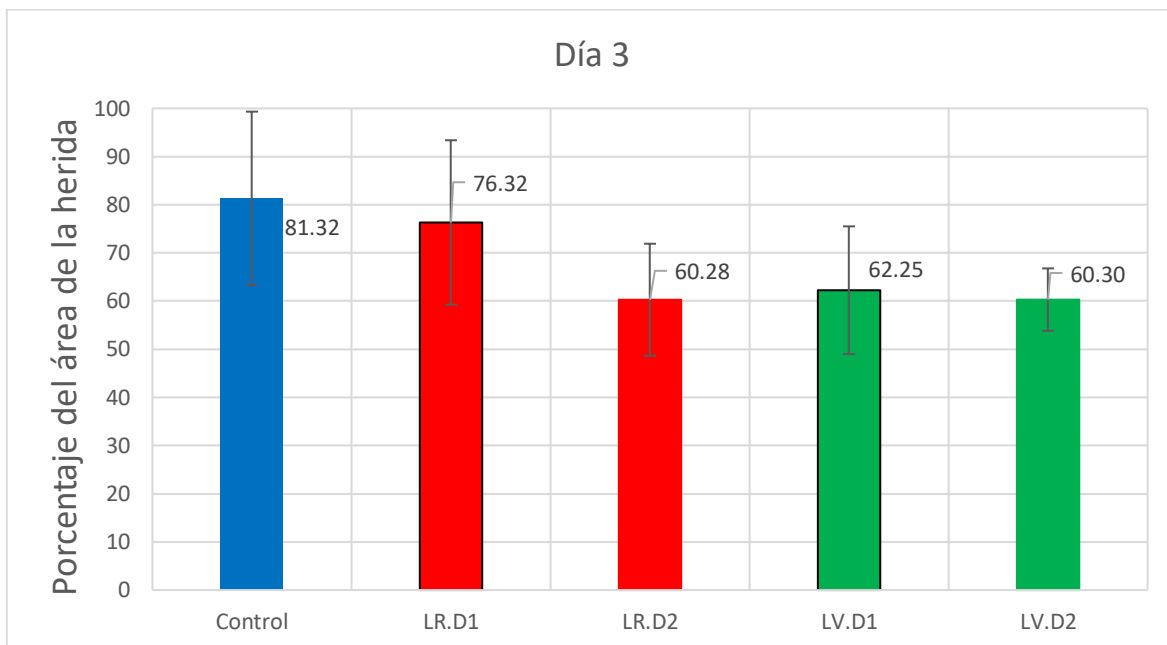


Figura 21. Grafica de los porcentajes de área obtenidas al día 3.

Para verificar esta diferencia, fue necesario realizar el análisis ANOVA de un solo factor, entre todos los grupos.

**Tabla 7. Análisis de varianza**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Día	4	1082	270.5	1.17	0.400
Error	7	1618	231.1		
Total	11	2700			

Como se explicó en capítulos anteriores la prueba estadística se hizo, estableciendo un nivel de significancia menor a 0.05, por lo cual en este caso la se acepta hipótesis nula, lo cual nos dice que las medias son iguales, nuestro tratamiento parece no diferir a la cicatrización sin terapia, este resultado podría no estar del todo correcto dado que estamos haciendo esta prueba con todos los grupos y que nuestro número de datos es muy bajo, pero se toma como referencia para la siguiente fase experimental.

## Resultados primera fase experimental del día 14

El análisis de los datos es muy similar al día 3 ya que de igual forma el grupo control tiene la mayor desviación estándar y el grupo LV.D2 la menor, estos resultados se pueden revisar en la tabla 8.

**Tabla 8. Medias**

Día 14. Grupo	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Control	2	17.11	2.60	(14.01, 20.20)
LR.D1	2	15.19	1.64	(12.09, 18.29)
LR.D2	2	13.935	1.308	(10.836, 17.034)
LV.D1	2	15.14	1.61	(12.04, 18.23)
LV.D2	2	10.510	0.905	(7.411, 13.609)

Desv.Est. agrupada = 1.70485

En la gráfica de la figura 22, podemos observar los porcentajes del área de las heridas entre los tratamientos al día 14, teniendo otra vez, como mejor resultado para el grupo LV.D2 y LR.D1, los grupos con la terapia de mayor densidad de energía.

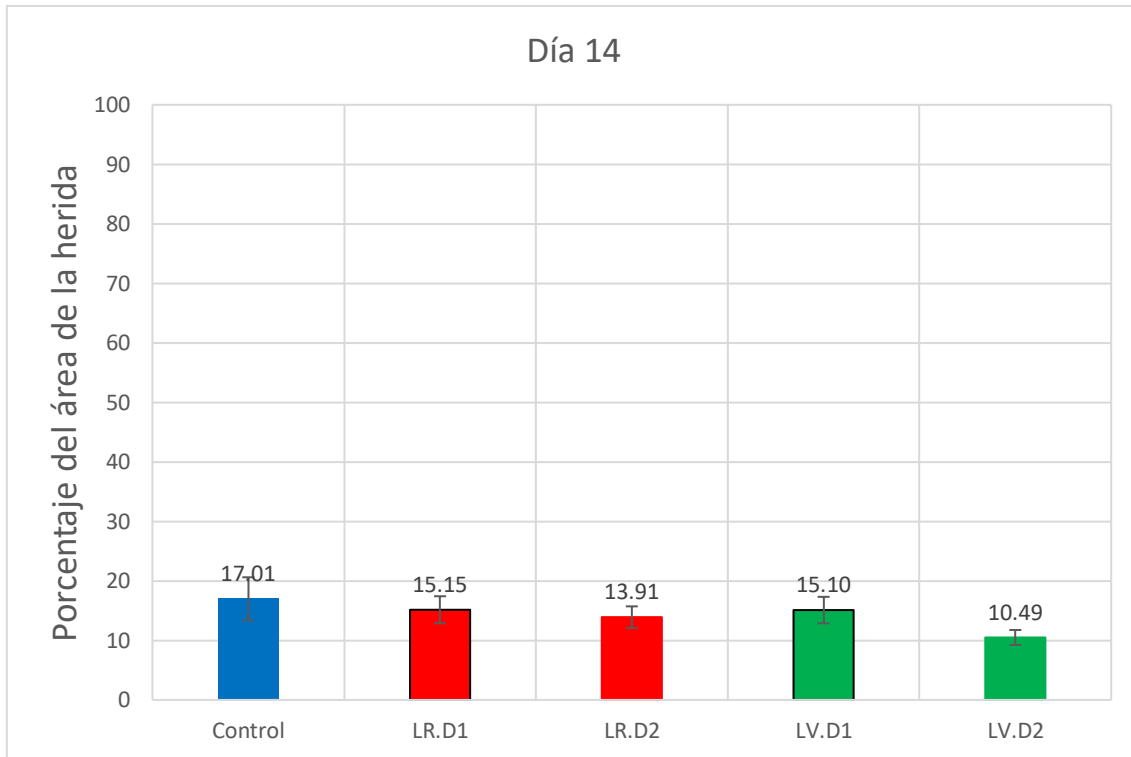


Figura 22. Grafica del porcentaje de área al día 14. Experimento piloto.

Sin embargo, al realizar el análisis ANOVA de un solo factor, entre todos los grupos, se encuentra un valor p, ligeramente mayor a 0.05, ver tabla 8, por lo cual nuestra hipótesis nula, que dice que todas las medias son iguales se acepta, por lo cual no existe significancia entre nuestros resultados para el día 14 del experimento piloto.

**Tabla 9. Análisis de Varianza**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Día 14	4	47.65	11.913	4.10	0.077
Error	5	14.53	2.907		
Total	9	62.19			

Debido al que no se encontró un resultado significativo del análisis al día 3 y 14, pero se observó que la desviación estándar de los grupos LR.D2 y LV.D2 es menor que en otros, esto nos puede indicar que los datos de este último grupo tienen menor dispersión que en los datos de otros grupos. Esto plantea la hipótesis que los tratamientos con densidad de energía de 8 y 10 J/cm<sup>2</sup> son parámetros que podrían ayudar en el proceso de cicatrización de heridas

cutáneas, tomando esta hipótesis y la retroalimentación de experimento piloto se plantea la segunda fase experimental. Por lo cual podemos concluir de esta fase experimental que, aunque no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos al día 3 y 14, los individuos de grupos con mayor densidad de energía podrían estar cicatrizando de forma similar debido a la terapia, por lo cual la terapia estaría influyendo en el proceso de cicatrización. Estos grupos fueron elegidos para realizar un experimento agudo, donde se usó mayor número de individuos, de la misma edad, camada y con pesos similares, para evitar diferencias metabólicas o biológicas importantes entre los individuos.



## Segunda fase experimental

Para segunda fase experimental se obtuvieron las fotografías del día 3, 5, 7 y 14, las áreas de la herida fueron obtenidas mediante la medición de las fotografías usando el software image J y procesadas en el ANOVA de un factor en Minitab, también se obtuvo una gráfica para la interpretación de los resultados.

### Resultados de la segunda fase experimental del día 3

En la figura 23, podemos ver la gráfica es similar a la gráfica obtenida de la primera fase, ya que las medias obtenidas son similares. Como se observa en la gráfica el grupo LV tiene una mayor reducción en el porcentaje para el día 3, en comparación con los otros dos grupos.

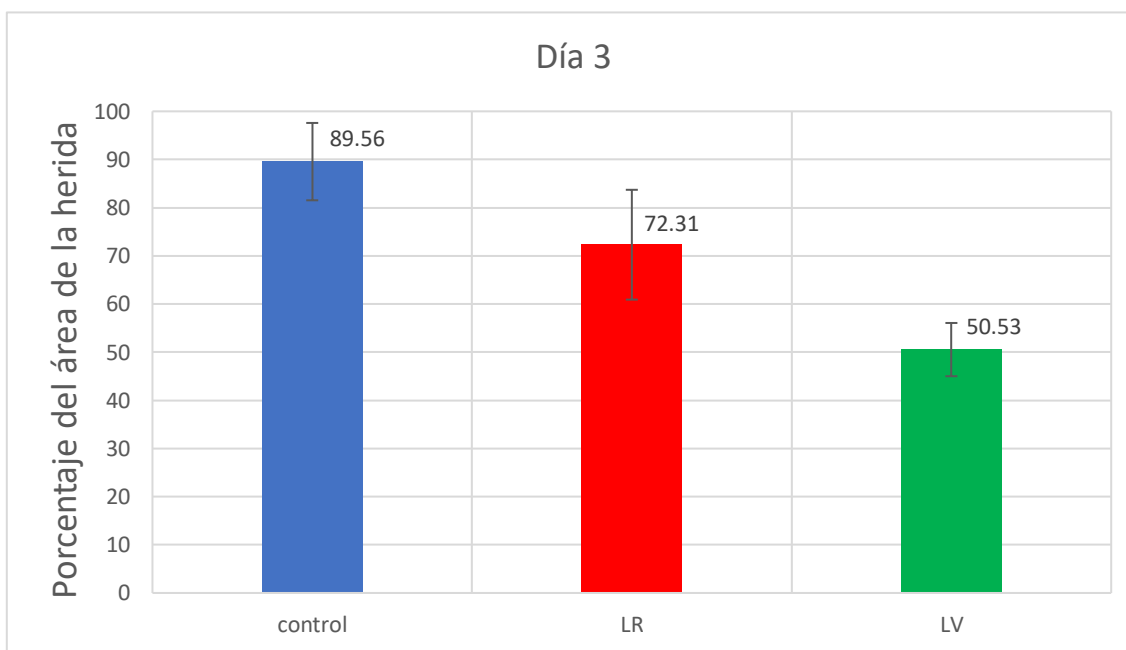


Figura 23. Gráfica de los porcentajes de área al día 3 del experimento piloto. LV (Luz verde, 8 J/cm<sup>2</sup>), LR (Luz roja, 10 J/cm<sup>2</sup>), observando que el grupo LV es el que presenta menor área, por lo cual suponemos que la contracción de la herida es más rápida que en los otros grupos.

En esta fase tenemos un numero de muestras mayor a la fase anterior, en la tabla 10, podemos observar que el grupo LV tiene una menor desviación estándar, resultado similar al análisis de la primera fase, pero para esta fase el valor del grupo LR es mayor al grupo control.

**Tabla 10. Medias**

Grupo. Día 3	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
CONTROL	12	89.57	14.20	(80.47, 98.66)
LR	12	72.32	20.15	(63.22, 81.41)
LV	10	50.54	8.92	(40.57, 60.50)

Desv.Est. agrupada = 15.4497.

De los datos planteados anteriormente para el día 3 de la segunda fase experimental, el grupo LV ha tenido mayor éxito al reducir el área de la herida, pero es necesario verificarlo mediante la prueba ANOVA.

**Tabla 11. Análisis de Varianza**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Día 3	2	8312	4156.0	17.41	0.002
Error	31	7399	238.7		
Total	33	15712			

De la tabla 11, podemos ver que el valor p es menor a 0.05, lo cual nos dice que nuestros resultados son significativos, y del cual la hipótesis nula se rechaza, las medias no son igual por lo cual existe una diferencia entre la cicatrización sin terapia y el uso de la terapia, es decir la terapia influye en la cicatrización del tejido al día 3.

## Resultados de la segunda fase experimental del día 7

Los porcentajes del área de las heridas al día 7 del experimento agudo se pueden observar en la gráfica de la figura 24, en la cual no se observa una gran diferencia entre grupos, comparada con la gráfica anterior, el grupo LV que tuvo tratamiento con la densidad de energía de  $8 \text{ J/cm}^2$ , tiene la menor área.

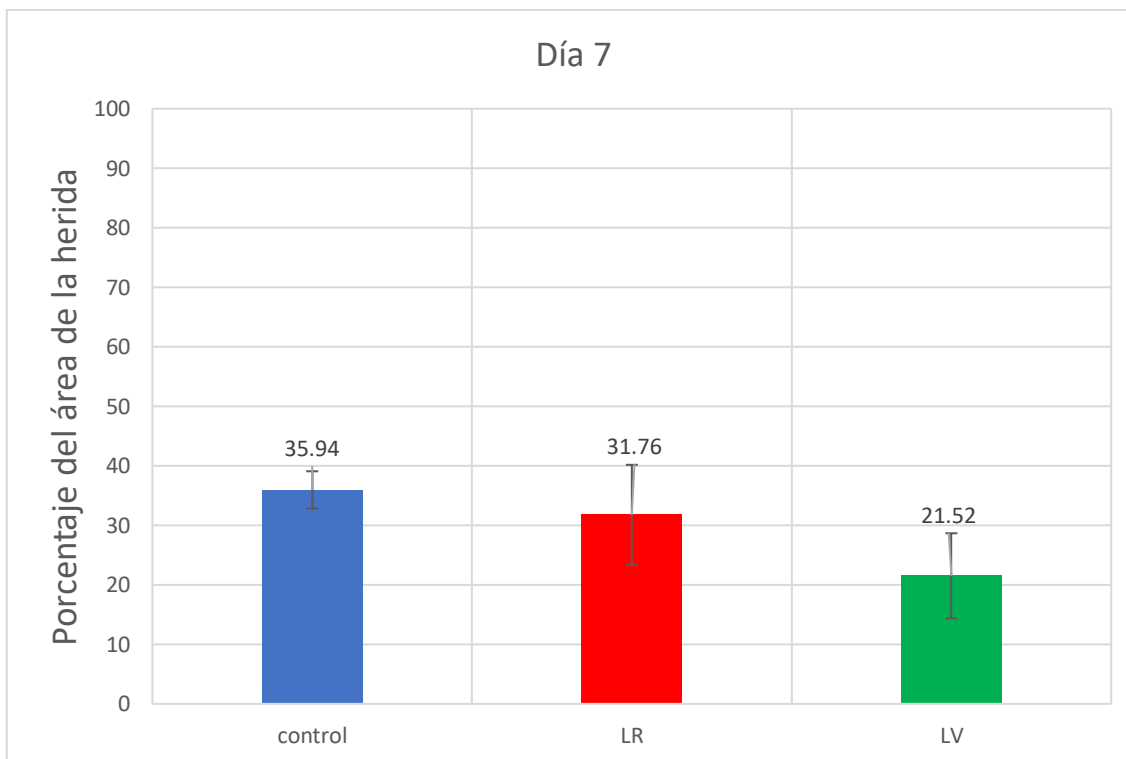


Figura 24. Grafica del porcentaje del área de la herida al día 7, en el experimento agudo, a simple vista no se observa gran diferencia entre los resultados, pero el análisis estadístico confirma que existe significancia entre los datos.

En este día, como se ve en la tabla 12, las desviaciones estándares sugieren que ahora el grupo control al día 7, tiene una cicatrización semejante, pero como se ha visto anteriormente el grupo LV siguen teniendo los mejores resultados, al tener la mayor disminución del porcentaje de la herida al día 7.

**Tabla 12. Medias**

Día 7	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
CONTROL	8	35.94	4.53	(29.21, 42.67)
LR	8	31.77	12.13	(25.04, 38.50)
LV	6	21.53	8.92	(13.75, 29.30)

Desv.Est. agrupada = 9.09585

El valor p obtenido para el día 7 es menor a 0.05, ver tabla 13 obtenida de la prueba ANOVA, lo cual rechaza la hipótesis nula, por lo cual las medias entre los tratamientos son diferentes, esto indica que hay un efecto de la terapia en la disminución del área de la herida.

**Tabla 13. Análisis de Varianza**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Día 7	2	732.9	366.46	4.43	0.026
Error	19	1572.0	82.73		
Total	21	2304.9			

## Resultados de la segunda fase al día 14

Al día 14 del experimento agudo, podemos observar en la figura 27 que no es notable la diferencia entre grupos, podría deberse a que la herida ya no tiene cicatriz ni es muy notoria, además que ya son subjetivas al observador.

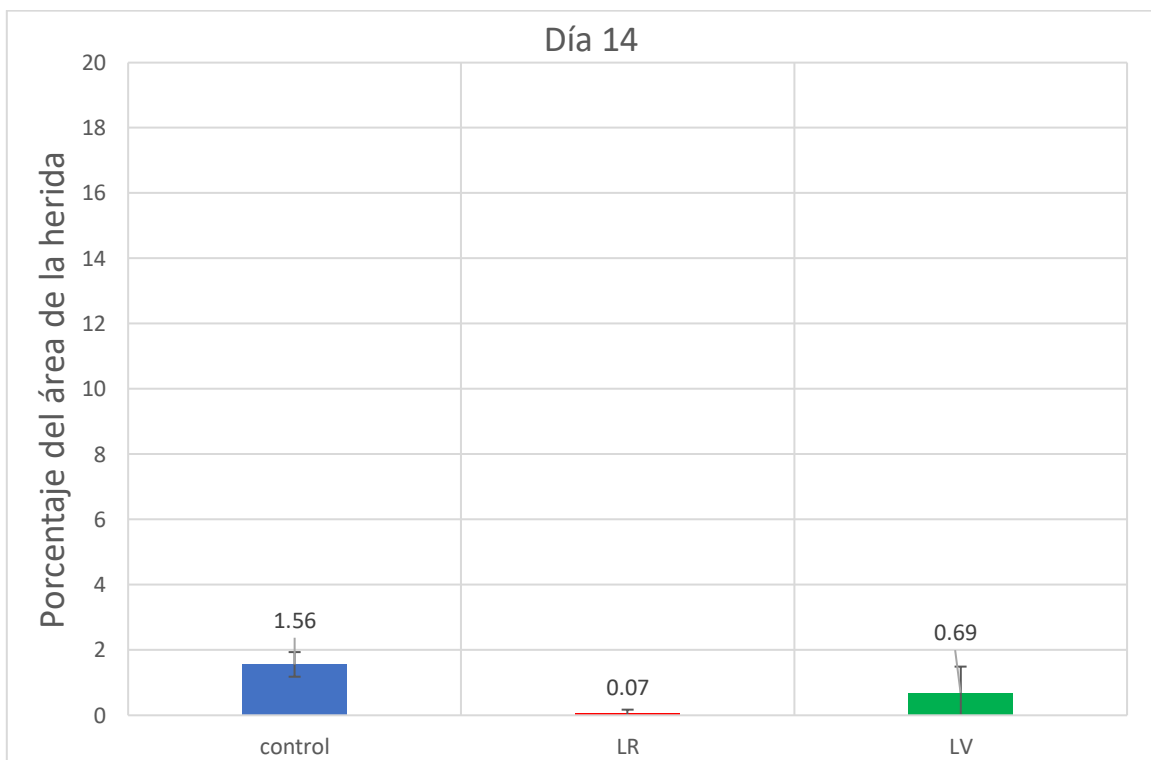


Figura 25. Grafica de los porcentajes de área de las heridas, al día 14 del experimento agudo, no se observan claramente la diferencia entre grupos, dado que, a este día, las heridas ya no tan visibles y su medición es subjetiva. El análisis estadístico nos dice que si existe significancia entre los resultados.

Tabla 14. Medias

Día 14	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
CONTROL	6	1.563	0.471	(1.126, 2.001)
LR	6	0.0767	0.1291	(-0.3612, 0.5145)
LV	4	0.688	0.819	(0.151, 1.224)

Desv.Est. agrupada = 0.496413.

**Tabla 15. Análisis de Varianza**

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
<b>Día 14</b>	2	6.683	3.3416	13.56	0.001
<b>Error</b>	13	3.204	0.2464		
<b>Total</b>	15	9.887			

Los datos en el experimento agudo parecen más favorables que el experimento piloto, esto podría deberse, a la falta de experiencia en el manejo de ratas o la diferencia entre camadas o al número de sujeto, ya que, por el método de ANOVA de un solo factor, se encontró diferencia significativa entre los tratamientos al día 3, 7 y 14.

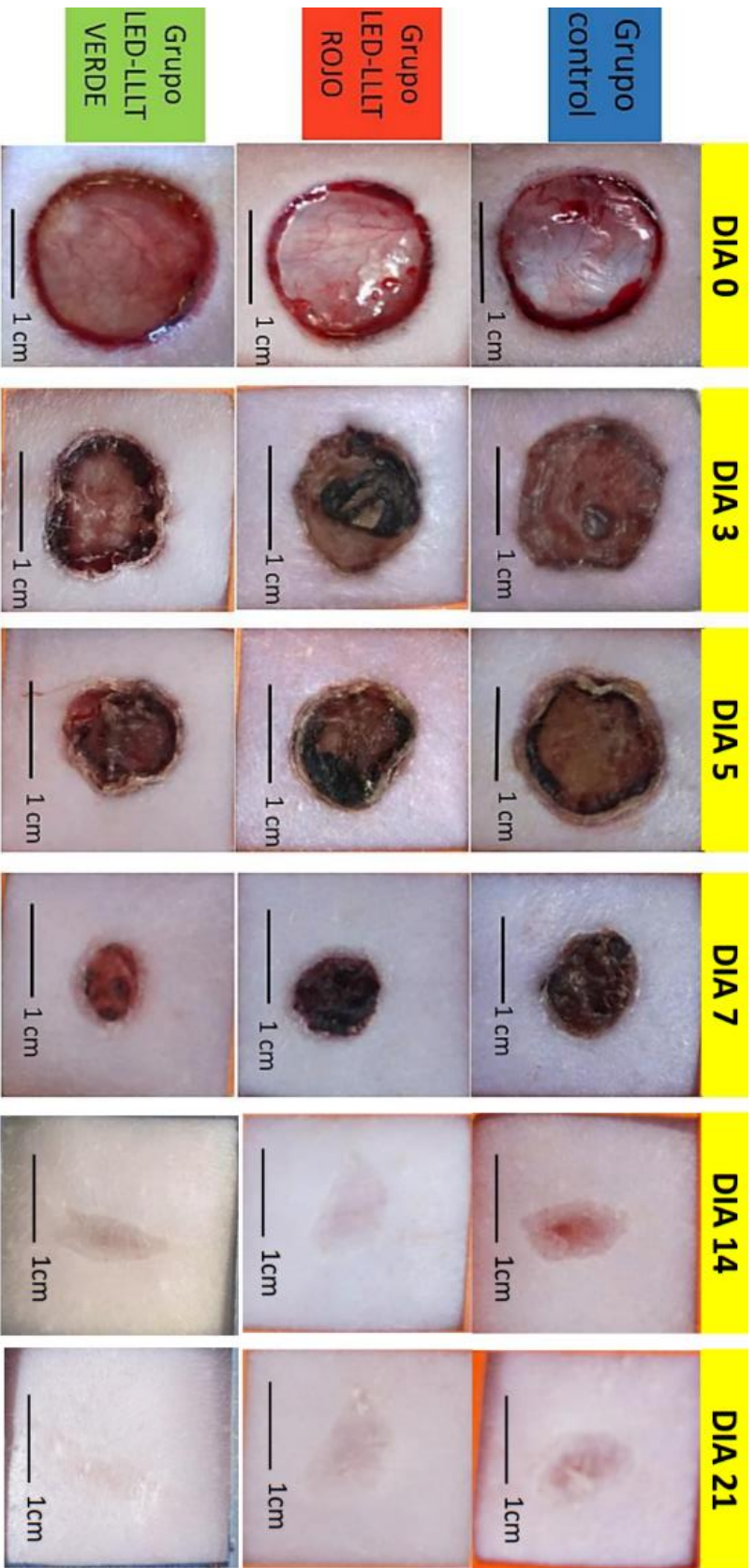


Figura 26. Se muestra la siguiente matriz de los días claves de experimento agudo para observar la evolución de la cicatrización a lo largo de los días. Fotografías obtenidas en la segunda fase del experimento

Para observar una evolución de la cicatrización se graficaron los porcentajes del área de la herida, teniendo el 100% al día 0, observando cómo se contrae la herida a lo largo de 21 días, pero después de los primeros 14 días las cicatrices, las mediciones no se pudieron lograr porque en algunos grupos las heridas ya no se distinguían.

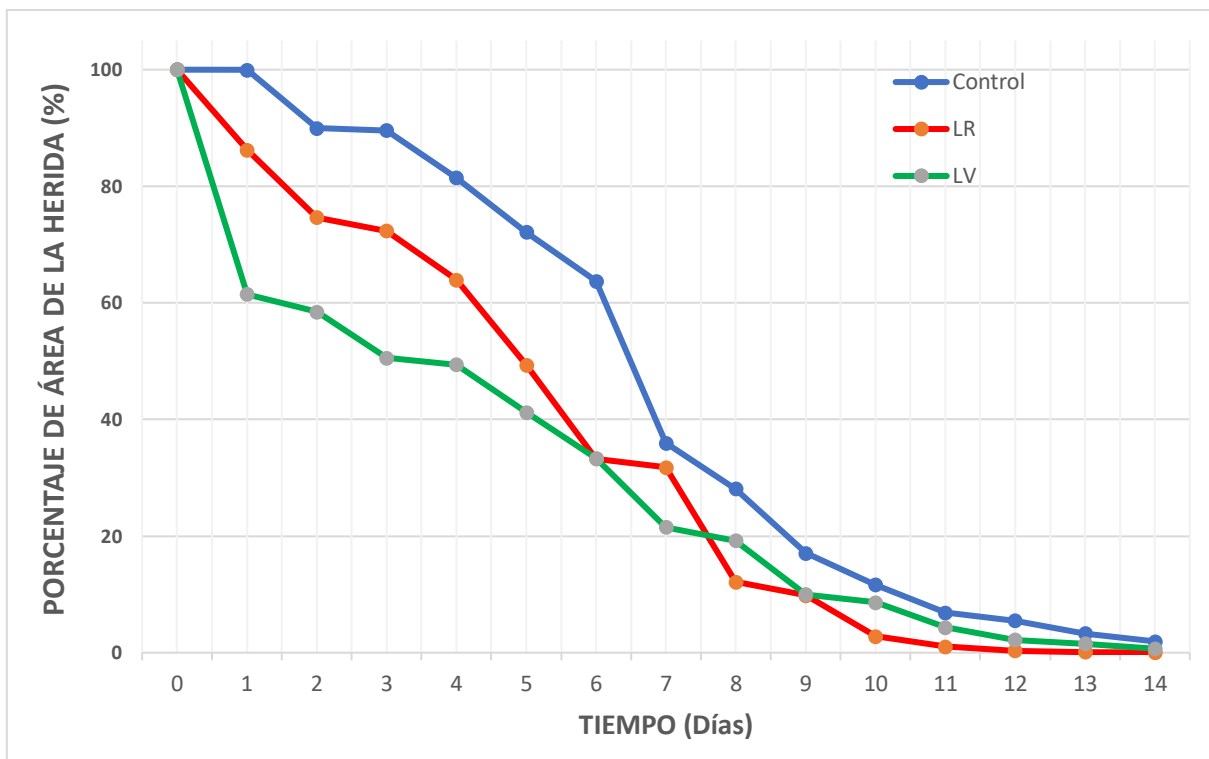


Figura 27. Grafica del porcentaje del área de la herida, se observa cómo cambia el porcentaje del área a lo largo de 14 días.

Como podemos observar en la figura 27, al día 3 hay indicios de que la luz verde acelera la contracción de la herida a comparación de los otros tratamientos. Para el día 14 la respuesta aparente es similar entre los grupos, esto se confirma con el análisis estadístico pues hay diferencia significativa entre los resultados según el análisis hecho por el método de ANOVA.



## Resultados histológicos

Las heridas se valoran, en su mayoría, por métodos visuales que pueden ser diagnósticos subjetivos, para tener información acerca de las terapias, se hicieron pruebas histológicas de cortes teñidos con hematoxilina y eosina (H&E), de 20  $\mu\text{m}$  de espesor, hechas en micrótomo que se observaron en microscopio óptico, tomando fotografías con un objetivo 5X. La capa córnea está formada por células que no tienen núcleo, por lo que con los colorantes de rutina (hematoxilina y eosina) se tiñe únicamente por la eosina, como se muestra en la Figura 15, casi morado.

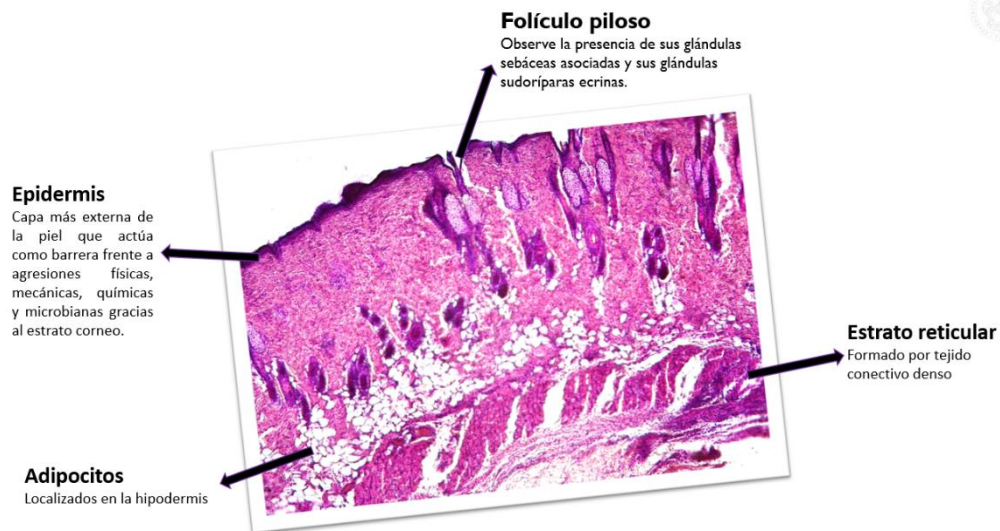


Figura 28. Corte histológico, de 10  $\mu\text{m}$  de espesor de piel teñida con hematoxilina eosina, de una muestra de piel sin herida.

### Histologías día 3

En la figura 29, se muestra la histología de la herida del día 3 del grupo control, corte histológico teñido con H&E, donde podemos observar costra y sangre en la epidermis y dermis, podemos observar indicios de inflamación, lo cual indica a este tejido dentro de la fase de hemostasia y al inicio de la fase de inflamación del proceso de cicatrización, a comparación de que las histologías de la figura 29 y 30 que muestran presencia de adipocitos en la dermis, además que se observa la formación de la epidermis.

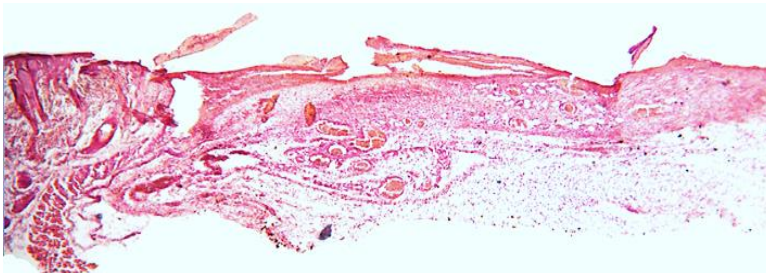


Figura 29. Grupo control, día 3, se observa la costra en color naranja-rosa y podemos ver sangre coagulada a la mitad y en la capa inferior del tejido, la epidermis todavía no se ha definido.

Figura 30. Grupo LR, día 3: En la parte superficial podemos observar la formación de la epidermis que podemos ver en tono rosado, diferente al de hipodermis, podemos ver que la dermis ya se puede diferenciar de la capa hipodermis donde podemos ver adipocitos migrando a la dermis.

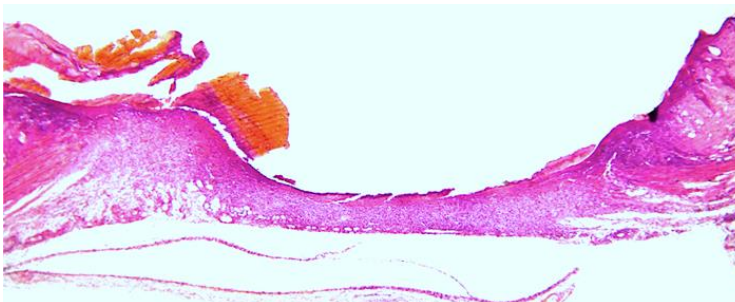
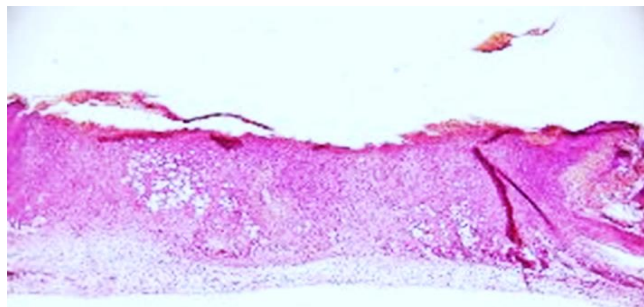


Figura 31. Grupo LV, Día 3: En esta histología, tenemos una visión amplia del tejido alrededor de la herida, podemos ver costra, pero la epidermis se observa mejor, la línea de color casi morado, y hay concentración de adipocitos en la dermis.

## Histologías día 5

En la figura 32 podemos observar el corte histológico de una muestra del grupo control, el cual muestra indicios de proliferación ya que se observan muchos núcleos, que se muestran como puntos de color rosa, pero sin indicaciones de nuevos tipos de células, a diferencia del caso de la figura 33 y 34, que son muestras de los grupos tratados con LED-LLLT, al día 5 muestran adipocitos en la dermis, para el caso del grupo LR, y en la hipodermis, estas células grasas son de vital importancia ya que son la reserva energética y conforman la hipodermis. En la figura 33, muestra del grupo LR, se observa mayor presencia de adipocitos, la epidermis está más definida, la línea rosada más superficial, además que ya se pueden diferenciar las capas de la piel.

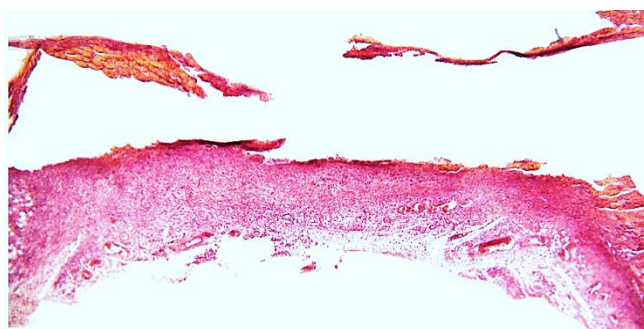


Figura 32. Histología de un corte de una muestra del grupo control al día 5, no se logra observar la epidermis, la dermis se encuentra delgada y hay migración de neutrófilos, se llaman neutrófilos porque no se tiñen con colorantes ácidos ni básicos, por lo que su citoplasma al microscopio óptico aparece de color rosa suave, estos elementos indican que sigue habiendo infiltrado inflamatorio.

Figura 33. LR Dia 5: En contraste con la histología del grupo control, podemos observar presencia de angiogénesis, la epidermis o el estrato corneo no se observan formados aún, se observan mayor presencia de adipocitos las cuales se pueden transformar en fibroblastos.

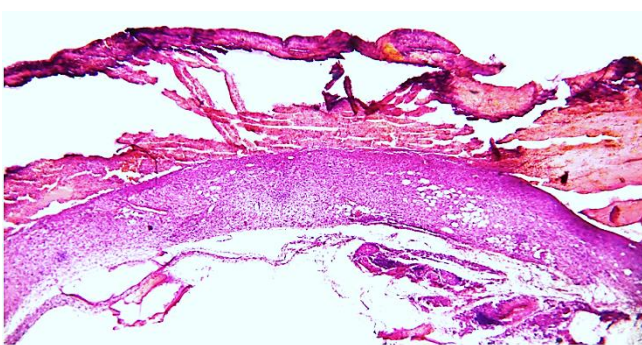
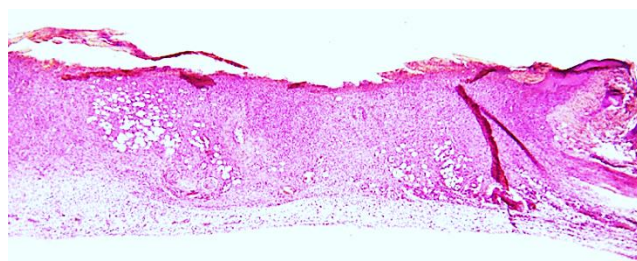


Figura 34. LV Dia 5: Para el grupo tratado con LED-LLLT se observa queratinocitos y se observa mejor la epidermis, no hay mucha diferencia entre la dermis que se observó con el control, pero se encuentra mayor presencia de angiogénesis.



## Histologías día 7

En la figura 35, corte histológico de una muestra del grupo control, el cual muestra indicios de proliferación ya que se observan muchos núcleos, contrario a las muestras de las figuras 36 y 37, que son muestras de los grupos tratados con LED-LLLT, al día 7 muestran adipocitos en la dermis. La muestra del grupo LR, tienen el mejor resultado ya que, en la figura 36, podemos observar mayor presencia de adipocitos, no hay restos de costra y la epidermis está bien definida, además que es el tejido que más se asemeja al tejido sin herida.

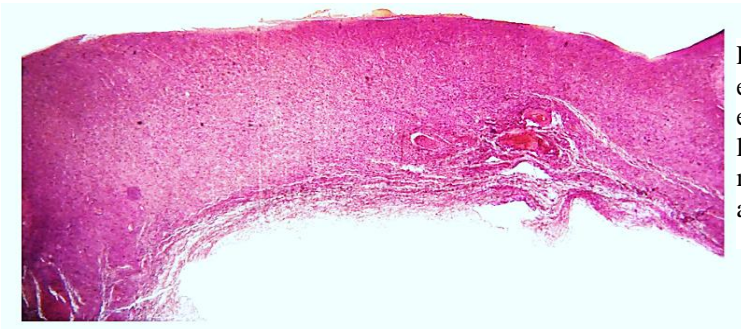


Figura 35. Día 7 del grupo control, la epidermis no está definida aún, la dermis esta gruesa, pero no se logra diferenciar las capas de la piel, lo cual indica que la morfología no se asemeja al tejido anterior.

Figura 36. Al día 7 en el grupo LR, se mostró una mejoría de la herida en comparación con los otros grupos, ya que se ve definida la epidermis con el estrato corneo, que se ve en un color roja-morado en la parte alta, la estructura del tejido se parece más a la parte sana, que está a los extremos de la imagen.

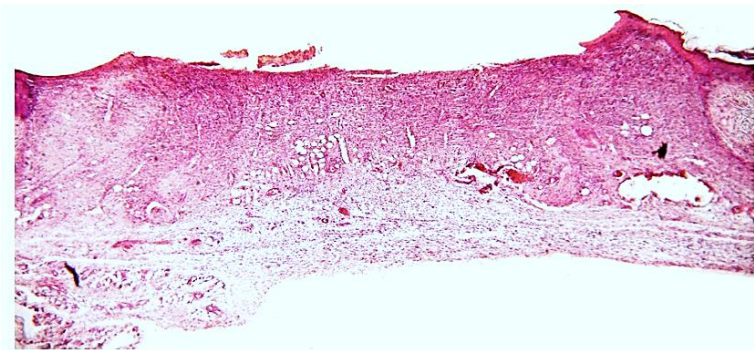
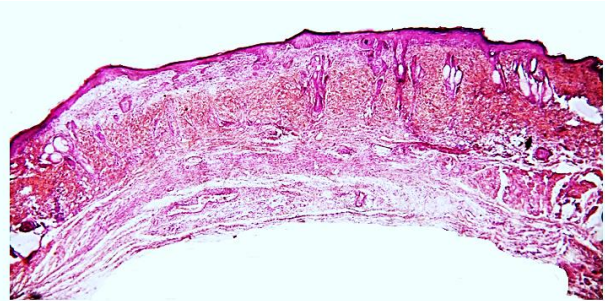


Figura 37. Para la muestra del grupo LV al día 7, se observa que comienza la formación de la epidermis, la dermis está más gruesa que al día 5, encontramos adipocitos en la hipodermis.

## Histologías día 14

En la figura 38, muestra del grupo control, podemos observar al día 14, una epidermis definida, las capas de la piel aún no están definidas, pero ya podemos diferenciarlas, en la figura 39, muestra del grupo LR, podemos ver presencia de costra, pero la epidermis ya se puede diferenciar y hay presencia de proliferación. En la figura 40 se observa que el grupo LV parece estar todavía en la fase de proliferación lo cual indica que esta en una fase anterior de la cicatrización en comparación con el grupo LR.

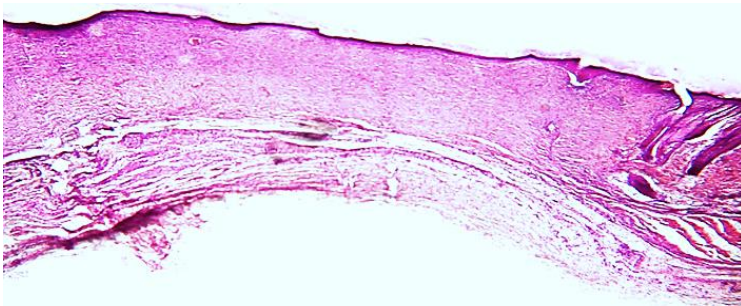


Figura 38. Grupo control. Día 14 grupo control: La epidermis definida, la dermis esta diferenciada, no se observa presencia de adipocitos.

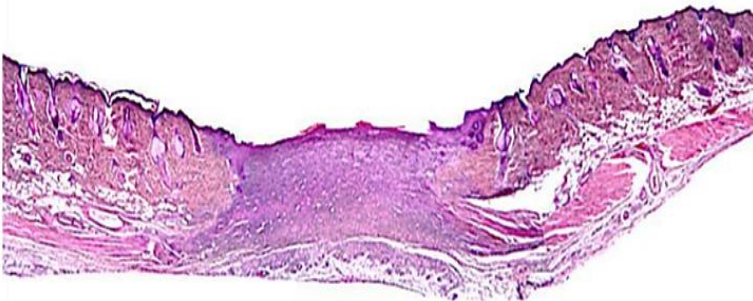


Figura 39. Grupo LR, día 14: En esta figura podemos observar que existe una pequeña similitud a la del día 7, para esta muestra la diferenciación entre las capas de la piel no es muy notoria.

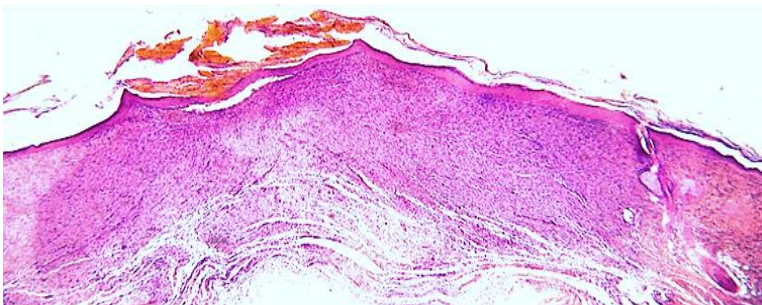


Figura 40. Grupo LV, día 14: Esta muestra presencia de proliferación, podemos ver costra, pero la epidermis ya se puede distinguir.

## Discusión de resultados

De la tabla 21, podemos observar que los parámetros y materiales son similares, por lo cual es conveniente comparar los resultados obtenidos en cada reporte, aunque las histologías son de carácter cualitativo, por lo cual está sujeto a la lectura del observador, los resultados descritos parecen llegar a conclusiones similares.

**Tabla 16**

<b>Estudio</b>	<b>Yasukawa (6)</b>	<b>Cheon (8)</b>	<b>En este trabajo</b>
<b>Sujeto de experimentación</b>	Rata (Sprague Dawley) Corte quirúrgico	Rata (Sprague Dawley) Heridas circulares 1 cm de diámetro	Rata alopecica Heridas circulares 1 cm de diámetro
<b>Parámetros ópticos</b>	Laser He-Ne Dosis cada dos días 4.21 J/cm <sup>2</sup>	LED [525 nm] 8 mW/cm <sup>2</sup> Dosis por una hora por 9 días	Dosis al día 0, 1, 3 LED verde [532 nm] 2 y 8 J/cm <sup>2</sup> LED rojo [633 nm] 2 y 10 J/cm <sup>2</sup>
<b>Resultados</b>	Histología: Alivio de la inflamación, mayor formación de fibras de colágeno y recuperación en tejido irradiados.	Tinción de Masson: La producción de colágeno se incrementa en el grupo irradiado.	En las histologías se vio la diferenciación de las capas de la piel y la producción de adipocitos que no se observó en el grupo control.

Nuestros resultados histológicos muestran claramente la diferencia entre las capas y las fotografías ayudan a observar la evolución de la cicatriz a través del tiempo, punto que no es observable en estudios hechos con ratas con pelaje, ya que estas al ser rasuradas, el pelaje

crece y no permite ver la cicatriz a los pocos días del tratamiento. En el primer trabajo, hecho con láser, la aplicación del tratamiento es complicado ya que tuvieron que montar un arreglo con lentes que pudiera expandir y dirigir el haz a lo largo de la cicatriz, lo cual no es práctico y el precio del equipo en la terapia es más costoso.

En el caso de los cultivos celulares, su material biológico es *in vitro* lo que supone condiciones óptimas en un laboratorio, aunque muestra que existe una estimulación celular, las condiciones convencionales *in vivo*, no serán evaluadas en este diseño, pero gracias a las histologías hechas podemos observar en las muestras con tratamiento que el tejido sufre cambios morfológicos e indicadores que muestran la existencia de una estimulación celular. Para el estudio de Cheon (8) que usa diversas fuentes de luz, obtuvieron mejores resultados de LED verde en el estudio con la tinción Masson. Aunque el grupo LV (terapia con luz verde) tuvo el mejor resultado en el análisis estadístico, en el análisis histológico fue el grupo LR (terapia con luz roja) el que obtuvo el mejor resultado.

## Conclusiones

En la segunda fase del experimento, se encontraron diferencias significativa entre los tratamientos al día 3, 7 y 14. Además, se realizó una gráfica de los primeros 14 días para mostrar la disminución del porcentaje de herida a lo largo de ese tiempo, encontrando, en los primeros días, resultados favorables para el grupo LV, lo cual puede indicar un cierre de la herida más rápida que los otros grupos, lo que confirma lo observado en las fotografías, ya que estas mostraron una cicatriz más estética en el día 14 que los otros dos grupos, de hecho al día 21 ya no se distingue donde estuvo la cicatriz.

En las histologías con tinción H&E se observó que la terapia LED-LLLT, la aceleración de la diferenciación entre las capas de la piel lo cual puede indicar la regeneración de las estructuras y subestructuras en el tejido, observación que no se muestra en el grupo control, ya que solo se observó proliferación, pero sin ningún tipo de estructura en el tejido. Los resultados histológicos sugieren que el tratamiento con luz roja favorece una mayor regeneración a diferencia de los otros grupos. Este grupo podría alcanzar que el nuevo tejido sea tan funcional como el anterior. Para el caso del tratamiento de luz verde, los resultados sugieren que el tratamiento con luz verde favorece una cicatrización más estética en menor tiempo, sin embargo, en las histologías, la mejoría observada está detrás del grupo LR.

Nuestro estudio muestra puntos importantes en el uso de la LED-LLLT que pudieran ayudar en estudios posteriores, debido que existen pocos reportes y detalles en estudios anteriores. Además de contribuir con el uso de un nuevo sujeto, la falta de uso de antibióticos y el uso de dispositivos LED en luz verde. La aplicación de la LED-LLLT en una herida cutánea podría llegar a constituir una alternativa innovadora, no invasiva, sin contacto, que ayudaría para evitar infecciones, y acelerar el proceso de cicatrización.



## Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos a las personas que hicieron posible el presente trabajo a la Dra. Teresita Spezzia Mazzoco, la directora de esta tesis y a los codirectores la Dra. Wendy Argelia García Suastegui, Juan Pablo Padilla Martínez por su apoyo y mentoría a lo largo de este trabajo.

A los investigadores Dr. Rubén Ramos García, Julio Cesar Ramírez San Juan y los alumnos del Departamento de Óptica, en el Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE) por la fabricación de los dispositivos de luz LED, utilizados en este trabajo y por sus aportes a esta tesis.

Al Bioterio “CLAUDE BERNARD” de la BUAP, que brindo sus instalaciones, conocimiento y apoyo para el monitoreo de los animales experimentales.

A mis compañeros Gabriela Juárez Salazar, Facultad de Medicina, Luis A. De La O Aguilar, C. Rosas García, Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, gracias por su compañía y ayuda brindada.

## Bibliografía

1. *Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy.* **Sen, Chandan K and Gordillo, Gayle M and Roy, Sashwati and Kirsner, Robert and Lambert, Lynn and Hunt, Thomas K and Gottrup, Finn and Gurtner, Geoffrey C and Longaker, Michael T.** 6, s.l. : Wiley Online Librar, 2009, Vol. 17.
2. *Selección de la fuente de luz óptima en terapia láser de baja intensidad.* **Salas García, Irene y Laso García, Ana y Ortega Quijano, Noé y Fanjul Vélez, Félix y Arce Diego, José Luis & others.** Santander, Cantabria, España : Grupo de Técnicas Ópticas Aplicadas, Departamento de Tecnología Electrónica e Ingeniería de Sistemas y Automática, Universidad de Cantabria.
3. *The effect of laser beams on the growth of hair in mice.* **Mester, E and Szende, B and Gärtner, P.** 1968, Radiobiologia, radiotherapia, pp. 621--626.
4. *Improvement of flap survival by application of hypobaric oxygen training.* **Kami, Toshiaki.** 1990, The Keio journal of medicine, pp. 6--13.
5. *The effect of low reactive-level laser therapy (LLLT) with helium-neon laser on operative wound healing in a rat model.* **Yasukawa, Akio and HRUI, Haruki and Koyama, Yoshihisa and Nagai, Masahiro and Takakuda, Kazuo.** 2007, Journal of Veterinary Medical Science, pp. 799--806.
6. *Wound healing effect of 525 nm Green LED irradiation on skin wounds of male sprague dawley rats.* **Cheon, Min-Woo and Park, Yong-Pil.** 5, 2010, Transactions on Electrical and Electronic Materials, Vol. 11, pp. 226-229.
7. *Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation.* **Vinck, Elke M and Cagnie, Barbara J and Cornelissen, Maria J and Declercq, Heidi A and Cambier, Dirk C.** 2, s.l. : Springer, 2003, Vol. 18. 95-99.
8. **Gajinov, Matic, PrCiC, Duran.** Optical properties of the human skin. *Serbian Journal of demartology an venereology.* 2010, 131-136.
9. *Recuperación del coeficiente de absorción de la epidermis en la piel humana.* **Narea, Freddy J.** 2015.
10. *Emergency management of chronic wounds.* **Hartoch, Richard S and McManus, John G and Knapp, Sheri and Buettner, Mark F.** 1, s.l. : Elsevier, 2007, Vol. 25. 203-221.

11. *Fisiología de la cicatrización cutánea*. **Hernandez, German Alfredo Ramirez**. 2, s.l. : RFS, 2015, Vol. 2. 69-78.
12. *The molecular and cellular biology of wound repair*. **Clark, Richard AF**. s.l. : Springer Science & Business Media, 2013.
13. *Histología de la piel*. **Medicina, Revista de la Facultad de**. 4, s.l. : Revista de la Facultad de Medicina, 2003, Vol. 46.
14. *Patrones histopatológicos de las enfermedades inflamatorias de la piel*. **Requena, Luis**. s.l. : Servicio de Dermatología, Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma, Madrid.
15. *Modelado del proceso de angiogénesis en cicatrización de heridas por el método de elementos finitos*. **C. Valero, E. Javierre, J.M. García-Aznar, M.J. Gómez-Benito**.
16. *Low-level laser therapy (LLLT) versus light-emitting diode therapy (LEDT): What is the difference?* **Hode, Lars and Tuner, Jan**. s.l. : International Society for Optics and Photonics, 2000, Laser Florence'99: A Window on the Laser Medicine World, pp. 90--98.
17. *Photobiology of low-power laser therapy*. **Karu, Tiina I**. 691-704, s.l. : Taylor & Francis, 1989, Vol. 8.
18. *Biphasic dose response in low level light therapy*. **Ying-Ying Huang, Aaron C.-H. Chen, James D. Carroll, Michael R. Hamblin**. *International DOCE-RESPONSE Society*.
19. *Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy*. **Eells, Janis T and Wong-Riley, Margaret TT and VerHoeve, James and Henry, Michele and Buchman, Ellen V and Kane, Mary P and Gould, Lisa J and Das, Rina and Jett, Marti and Hodgson, Brian D and others**. 5, s.l. : Elsevier, 2004, Vol. 4. 559-567.
20. *Oxidación Biológica en Medicina*. **Murray, R and Mayes, A and Peter, A**. 99-104, Mexico DF : Harper, Bioquímica Ilustrada. Manual moderno, 2004, Vol. 16.
21. *Terapia biofotónica: fundamentos, aplicaciones y protocolo de tratamiento*. **Hernandez, Luis ALberto Parra**. Barranquilla, Colombia : s.n., 2008.
22. *The Laboratory Rat (Second Edition)*. *American College of laboratory Animal Medicine*. **Hanes, Martha A**. Second Edition, 2006, 733-759.
23. *Parámetros reproductivos básicos en ratas hembras adultas (Rattus norvegicus) de una cepa mutante alopecica hipotímica mantenida en condiciones convencionales de biot.*

**Suastegui, Wendy & Ochoa Ramos, Adrián & Silva, Anabella & Moran Perales, Jose.**  
2017.

24. *Estudio de los tejidos. Características generales de los tejidos básicos o primarios.*

**Pérez, Belén Z. Iglesias Ramírez Dra. CM Irene Rodríguez.** s.l. : Dpto. de Histología  
ICBP Victoria de Girón.

25. *Intra-arterial infusion of PGE1 in peripheral arterial diseases.* **Nagashima, T.** 1982,  
Gendai Iryou, pp. 1000--1013.

# Reconocimientos y premios

Edificio de Física, Facultad de Ciencias, Piso 2 UNAM, C.U. C.P. 04510 Delegación Coyoacán, Ciudad de México, CDMX

Ciudad de México, 29 de agosto de 2018

Apreciable Estefany Marisol Garcia Garcia  
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

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

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

de los autores:

**Estefany Marisol Garcia Garcia**

**Gabriela Juarez Salazar**

**Angela Cindy Rosas Garcia**

**Luis Adrian De la O Aguilar**

**Teresita Spezzia Mazzoco**

**Wendy Angelica Garcia Suategui**

**Ruben Ramos Garcia**

**Anabela Handal Silva**

**Placido Zaca Moran**

**Juan Pablo Padilla Martinez**

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

ATENTAMENTE

**Mesa Directiva**  
Sociedad Mexicana de Física



Sociedad Mexicana de Física



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

otorgan el presente

## RECONOCIMIENTO

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

Presentado por:

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

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

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

Dr. Eduardo Tepichín Rodríguez  
 Presidente del Comité Organizador,  
 INAOE



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

## FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Otorga la presente:

CONSTANCIA



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

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

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

**En el Marco del Día del Biotecnólogo**

**”Pensar bien para vivir mejor”**

H. Puebla de Zaragoza a 18 de junio de 2018

**Dr. Salvador Galicia Isasmendi**  
DIRECTOR

**Dra. Hortensia Carrillo Ruiz**  
SECRETARÍA ACADÉMICA