

Caracterización Biomolecular Mediante Microespectroscopía FTIR en la Fase de Remodelación de la Cicatrización en un Modelo Murino de Lesión Excisional

Biomolecular Characterization by FTIR Microspectroscopy in the Modeling Phase of Wound Cicatrization in a Murine Model of Excisional Injury

Gustavo Jesús Vázquez-Zapién¹; Mónica Maribel Mata-Miranda¹; Fernando Josué García-Sánchez¹; Sandy Selene Campos-Soto¹; Miguel Sánchez-Brito² & Adriana Martínez-Cuazitl¹

VÁZQUEZ-ZAPIÉN, G. J.; MATA-MIRANDA, M. M.; GARCÍA-SÁNCHEZ, F. J.; CAMPOS-SOTO, S. S.; SÁNCHEZ-BRITO, M. & MARTÍNEZ-CUAZITL, A. Caracterización biomolecular mediante microespectroscopía FTIR en la fase de remodelación de la cicatrización en un modelo murino de lesión excisional. *Int. J. Morphol.*, 37(4):1234-1244, 2019.

RESUMEN: La cicatrización de la piel es un proceso complejo y organizado que involucra tres fases: inflamatoria, proliferativa y de remodelación. Es indispensable el análisis de este proceso biomolecularmente para investigar y proponer nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la cicatrización o promuevan la regeneración. El objetivo de este proyecto fue analizar histológica y biomolecularmente mediante microespectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (MFTIR) y su función de mapeo bioquímico, muestras de lesiones excisionales de piel, comparando los cambios morfológicos y espectroscópicos entre piel sana y piel cicatrizada. Se estandarizó un modelo de lesión excisional de piel en ratones hembra de la cepa NIH de 8 semanas de edad (n=16), provocando una herida excisional de 1 cm². Se analizó piel sana (día 0) y cicatrizada (día 15 post-lesión) morfológica, histológica y biomolecularmente mediante análisis fotográfico, técnica histológica y MFTIR con su función de mapeo. El análisis morfométrico demostró una reducción del área de la herida en un 87,6 % al día 15 post-lesión. Histológicamente, en la piel cicatrizada se evidenció un adelgazamiento de la epidermis y menor celularidad en la dermis, observándose la formación de tejido de granulación y fibras de colágena desorganizadas. Espectroscópicamente, se apreciaron cambios entre los dos grupos de estudio, principalmente en las bandas de lípidos y en la región de proteínas. El cálculo de las áreas bajo la curva y el mapeo bioquímico mostraron menor concentración de queratina y colágena en la piel cicatrizada, así como desorganización de las fibras de colágena. Se demostró la capacidad de la MFTIR para caracterizar de forma precisa los cambios biomoleculares en la cicatrización, entre ellos la cantidad de queratina, colágena, y el depósito y ordenamiento de las fibras de colágena asociadas a su maduración.

PALABRAS CLAVE: Piel; Lesión excisional; Cicatrización; Microespectroscopía FTIR; Mapeo bioquímico.

INTRODUCCIÓN

La piel es un órgano que desempeña diversas funciones vitales en el organismo como protección a agresiones externas, termorregulación, producción de vitamina D, absorción de radiación ultravioleta, detección de estímulos sensoriales, entre otras, y se conforma de tres capas, denominadas de lo superficial a lo profundo epidermis, dermis e hipodermis (Olsztyńska-Janus *et al.*, 2018).

En la piel encontramos diferentes componentes proteicos; en la epidermis, la principal proteína es la queratina producida por los queratinocitos, mientras que en la dermis, la principal proteína es la colágena que constituye alrededor del 80 % del componente proteico producido por los fibroblastos (Pires Rodríguez, 2011).

La piel se encuentra expuesta a múltiples agresiones que la hacen propensa a heridas, las cuales al cicatrizar de una manera inadecuada pueden producir morbilidades, incapacidades motoras o alteraciones estéticas que afectan la vida diaria de las personas que las padecen (Kaplani *et al.*, 2018).

El proceso de cicatrización de heridas consiste en una progresión ordenada de eventos que restablecen la integridad del tejido dañado. Las fases que conforman dicho proceso son: inflamatoria, de proliferación y remodelación. La fase de inflamación comienza inmediatamente después de la lesión, con una vasoconstricción que favorece la homeostasis y libera mediadores de la inflamación. La fase

¹ Escuela Militar de Medicina, Centro Militar de Ciencias de la Salud, Secretaría de la Defensa Nacional, Ciudad de México, 11200, México.

² Doctorado en Ciencias de la Ingeniería, Instituto Tecnológico de Aguascalientes, Aguascalientes, 20256, México.

proliferativa se caracteriza por la proliferación de tejido de granulación formada principalmente por fibroblastos y el proceso de angiogénesis y, finalmente, la fase de remodelación se caracteriza por reformulaciones y mejora en los componentes de la fibra de colágena que aumenta la resistencia a la tracción (Dwivedi *et al.*, 2016).

Estas cicatrices se caracterizan por un incremento en el número de fibroblastos y la cantidad de colágena, así como el reordenamiento de estas fibras, ocasionando dolor y afecciones estéticas principalmente (Enríquez Merino & Caballero Centeno, 2007).

Por lo tanto, es indispensable analizar el proceso de cicatrización en el aspecto biomolecular, empleando métodos precisos, rápidos y menos costosos, para investigar y proponer tratamientos más efectivos que mejoren la cicatrización o aumenten la regeneración de la piel.

En este sentido, la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) puede representar una herramienta útil en el estudio de muestras biológicas, ya proporciona información de la estructura molecular de materiales orgánicos e inorgánicos. En esta técnica, la absorción de la radiación infrarroja (IR) se produce cuando un fotón es transferido a una molécula y la excita a un estado de mayor energía, dando lugar a vibraciones de enlaces moleculares, los cuales se producen a diferentes tamaños de onda o frecuencias en la región IR del espectro de luz. Entre sus ventajas encontramos su versatilidad y su propiedad no destructiva (Chen *et al.*, 2015).

En materiales biológicos, se pueden detectar diferentes biomoléculas tales como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, que tienen estructuras químicas específicas (Vázquez-Zapién *et al.*, 2016). Además, al acoplar la espectroscopía FTIR con la microscopía óptica, ha sido posible el análisis mediante microespectroscopía FTIR (MFTIR), la cual permite la visualización y el mapeo de grupos funcionales y arreglos moleculares. Este método se ha denominado "fotografía química", ya que se puede obtener información semicuantitativa a partir de los espectros IR utilizando softwares estándar de procesamiento de imágenes (Palombo *et al.*, 2009).

La MFTIR es sensible para determinar la distribución y la orientación de diversos componentes, por lo que ha sido utilizada para reconocer diversas patologías; esta técnica permite detectar concentraciones de ciertas moléculas como proteínas utilizando el área bajo la curva de picos específicos del espectro, así como radios entre áreas específicas. Una de las aplicaciones de la espectroscopía

FTIR es en el análisis de la estructura secundaria de las proteínas mediante la segunda derivada o deconvolución; la región de las proteínas amida I (1700-1600) es la región más sensible, ya que representa el 80 % de las vibraciones del enlace C-O; la amida I consiste en el sobre-posicionamiento de diversas bandas que corresponden a la estructura secundaria de las proteínas, como α -helices, hojas β , giros β y estructura desordenada (Balázs *et al.*, 2014). La especificidad y ventajas de usar la segunda derivada, ha permitido determinar el número y la posición de picos de interés en especial en esta región (Paschalis *et al.*, 2015). Ejemplo de ello, es el radio entre el área bajo la curva del pico A1660/1680 el cual está relacionado con la maduración de las fibras de colágena y su ordenamiento (Paschalis *et al.*).

Debido a que la MFTIR es una técnica rápida y versátil y, además proporciona la distribución espacial de biomoléculas, el objetivo central de este proyecto fue analizar histológica y biomolecularmente mediante MFTIR y su función de mapeo IQ, muestras de lesiones excisionales de piel, comparando los cambios morfológicos y espectroscópicos de piel sana y piel cicatrizada.

MATERIAL Y MÉTODO

Modelo murino de lesión excisional en piel. Se utilizaron ratones hembras de la cepa NIH (n=16), manteniéndose en jaulas metabólicas autoventiladas (EcoFlo Rack; Allentown Inc), en un ambiente de ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, humedad controlada del 50-60 %, temperatura constante de 21 ± 1 °C y, dieta estándar y agua a libre demanda.

Para establecer el modelo de lesión excisional, 24 h antes se realizó tricotomía en la región interescapular y se aplicó crema depiladora para eliminar el pelo residual. Al día siguiente, bajo anestesia con dosis de 10 mg/kg de ketamina y 1 mg/kg de xilacina y, condiciones de asepsia y antisepsia, empleando un bisturí no. 11 se realizó una lesión excisional de 1 cm² hasta la fascia muscular y se colocó el colgajo en bolsas estériles. Al día 15 post-lesión, se repitió el procedimiento para la obtención de la piel cicatrizada y los animales fueron sacrificados.

El Comité Institucional para el cuidado de animales de laboratorio de la Escuela Militar de Medicina aprobó el protocolo. Todos los experimentos fueron examinados y aprobados por el Comité de Ética apropiado y, por lo tanto, se realizaron los estándares éticos establecidos en la Declaración de Helsinki de 1964. Así mismo, se siguieron las directrices de las Normas Oficiales Mexicanas "Guía para el

uso y cuidado de los animales de laboratorio” (NOM-062-ZOO-1999) y “Guía para la eliminación de residuos biológicos” (NOM-087-ECOL-1995).

Análisis morfométrico. Para el análisis morfométrico, se realizó un seguimiento fotográfico empleando una cámara de 12 pixeles colocada sobre un pedestal de 35 cm. Debajo del pedestal, se colocaron los animales bajo anestesia, tomando fotografías después de realizar la lesión excisional a las 24 h y cada tercer día post-lesión hasta el día 15. El análisis morfométrico se realizó con el programa digital Image Pro Plus 9.1 (Media Cybernetics) de 64X bits, utilizando los registros fotográficos de la herida excisional de cada ratón.

Análisis histológico. Inmediatamente posterior a la toma de biopsia de piel sana y piel cicatrizada a los días 0 y 15 post-lesión, los tejidos se colocaron en tissue-tek (4853; Sakura) y se obtuvieron criocortes de 5 μm utilizando un criostato de pie a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ECO-1900; Ecoshel). Enseguida, los criocortes se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 30 min a temperatura ambiente y se enjuagaron con solución buffer fosfato (PBS). Posteriormente, las muestras fueron teñidas con las tinciones hematoxilina-eosina (H&E), Van Gieson y tricrómica de Masson siguiendo los métodos estándar. Finalmente, las muestras histológicas fueron analizadas empleando un microscopio óptico (Ti-U Eclipse, Nikon), analizando el grosor de la epidermis y el índice de celularidad en la dermis empleando el software Image Pro Premier 9.1 (Media Cybernetics).

Microespectroscopía FTIR y tratamiento espectral. El análisis de piel sana y piel cicatrizada mediante MFTIR se realizó en el intervalo espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , utilizando un microscopio FTIR (IRT-5200, Jasco) acoplado a un espectrómetro FTIR (6600, Jasco), en modo de reflectancia, resolución espectral de 4 cm^{-1} y empleando un objetivo cassegrain de 16X.

Posterior a la obtención de las muestras de piel, los criocortes se colocaron sobre un portaobjetos recubierto con una capa de oro de 100 nm (643246-5EA; Aldrich) y se dejaron secar a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 min para eliminar el exceso de agua, midiendo los espectros hasta que las bandas de absorción relacionadas con el agua fueran indetectables. Cada espectro correspondió al promedio de 120 adquisiciones, y cada muestra se analizó por triplicado en las regiones epidérmica y dérmica.

Una vez que se adquirieron todos los espectros FTIR (espectros en crudo), se les aplicó un tratamiento de normalización variable normal estándar (SNV) utilizando el programa Unscrambler X10.3 (Camo Analytics).

Análisis de los espectros por MFTIR. A partir de los datos normalizados, se obtuvo la segunda derivada utilizando el programa Unscrambler X10.3. Los espectros normalizados y su segunda derivada fueron promediados y graficados usando el programa Origin 6.1 (OriginLab). Posteriormente, se calculó el área bajo la curva de las regiones relacionadas con lípidos y proteínas amida I y colágena, mientras que, con los espectros en segunda derivada, se analizó la estructura secundaria de las proteínas y se calcularon las áreas bajo la curva de la región relacionada con las α -hélices, hojas β y la estructura desordenada, así como el cálculo de los radios amida I/colágena, α -hélice/estructura desordenada y α -hélice/hojas β .

Función de mapeo IQ. Las imágenes bioquímicas de piel sana y piel cicatrizada, se obtuvieron mediante el mapeo automatizado de múltiples puntos (mapeo IQ) del microscopio FTIR, el cual está equipado con un detector MCT (Mercurio-Cadmio-Telurio) enfriado con nitrógeno líquido, analizando las muestras histológicas con un objetivo cassegrain de 16X. Los espectros de absorbancia se adquirieron en modo de reflectancia a una resolución espectral de 4 cm^{-1} , promediando 64 adquisiciones en cada espectro.

El mapeo bioquímico se realizó en los intervalos espectrales de 1653-1648 cm^{-1} y 1659-1653 cm^{-1} , correspondientes a las α -hélices de la queratina y colágena respectivamente (Andrew Chan *et al.*, 2008), y se representaron imágenes bidimensionales correspondientes a la distribución de cada tipo de biomolécula en la muestra analizada, utilizando el programa Microscope Measurement (Jasco).

Análisis estadístico. Para el análisis morfométrico, histológico y micro FTIR se compararon los resultados con una *t* de student utilizando el software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad), tomándose como estadísticamente significativo una $p < 0.05$.

RESULTADOS

Análisis morfométrico. El análisis macroscópico evidenció el cierre progresivo de las heridas excisionales a partir del día 1 hasta el día 15, en el que aún se observó una costra pequeña; durante el proceso de cicatrización no se evidenciaron complicaciones macroscópicas como infección, fístulas, entre otras (Fig. 1A). Las heridas al día 0 fueron homogéneas y se observó una reducción del 18,67 % del área a las 24 h. A partir de este momento, este porcentaje de reducción del área fue aumentando progresivamente, hasta alcanzar un 87,60 % de reducción del área inicial (Fig. 1B).

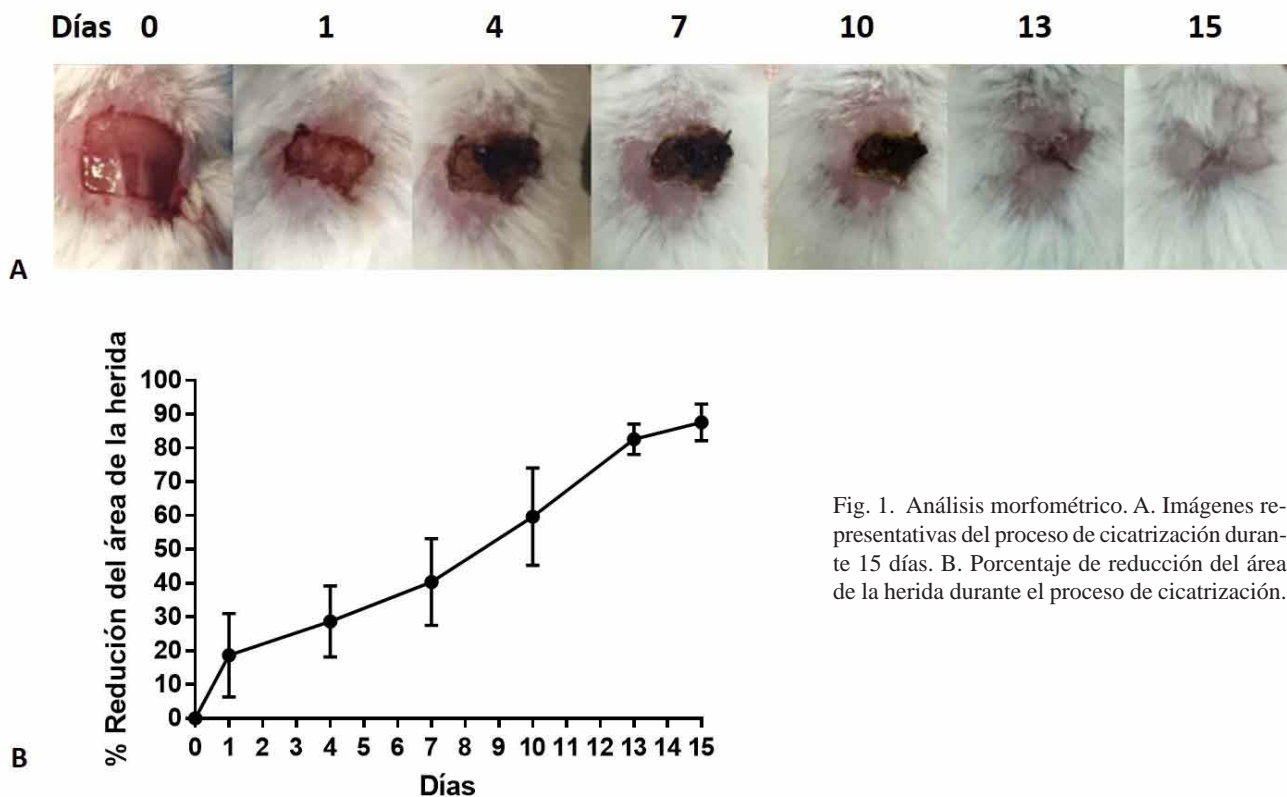


Fig. 1. Análisis morfométrico. A. Imágenes representativas del proceso de cicatrización durante 15 días. B. Porcentaje de reducción del área de la herida durante el proceso de cicatrización.

Análisis histológico. Respecto al análisis histológico (Fig. 2), en los cortes teñidos con H&E se observa el epitelio plano estratificado queratinizado en la epidermis sana, cuya capa basal presenta núcleos prominentes; en la unión dermo-epidérmica se observan papilas dérmicas, mientras que en la dermis se aprecian anexos cutáneos como glándulas sebáceas y folículos pilosos (Fig. 2A). Por otro lado, en la piel cicatrizada se observa el epitelio plano estratificado queratinizado adelgazado, sin la presencia de papilas dérmicas ni anexos cutáneos en la dermis (Fig. 2B).

Así mismo, la celularidad de la dermis en la piel sana se evidenció mediante la presencia de una mayor concentración de núcleos celulares en comparación con la piel cicatrizada; el índice de celularidad en la dermis de la piel cicatrizada al día 15 post-lesión fue de 88,72 % respecto a la piel sana, pero sin encontrar diferencia estadísticamente significativa (Fig. 2C).

De la misma forma, con la tinción de Van Gienson se evidenciaron los cambios en la epidermis, observando mayor presencia de queratina y los estratos espinoso y granuloso evidentes en la piel sana (Fig. 2D), mientras que en la piel cicatrizada, los estratos espinoso y córneo se encontraron adelgazados significativamente, con una disminución

de $411,30 \pm 5,67$ mm a $364,40 \pm 9,09$ mm, representando el 88,60 % de grosor de la epidermis respecto a la piel sana (Figs. 2E y 2F).

Finalmente, con la tinción tricrómica de Masson se observó en la piel cicatrizada la formación de tejido de granulación y mayor presencia de fibras de colágena, las cuales se observaron desorganizadas en comparación con la piel sana (Figs. 2G y 2H).

Microespectroscopía FTIR. Respecto a los resultados espectroscópicos mediante MFTIR, la Figura 3A muestra los espectros FTIR normalizados y promediados de piel sana y piel cicatrizada tomados en las regiones de epidermis y dermis, donde se observan bandas de absorción asociadas con diferentes tipos de biomoléculas.

A 1747 cm^{-1} se aprecian bandas de absorción relacionadas con las vibraciones de extensión del grupo éster $\text{C}=\text{O}$ de lípidos, siendo más intensas en la epidermis y dermis de piel sana con respecto a la cicatrizada. Enseguida, se observan bandas a 1660 cm^{-1} y 1550 cm^{-1} , las cuales están relacionadas con los grupos funcionales de proteínas amida I (extensión $\text{C}=\text{O}$) y amida II (extensión $\text{C}-\text{N}$ + flexión $\text{N}-\text{H}$) respectivamente, presentando mayor intensidad en la der-

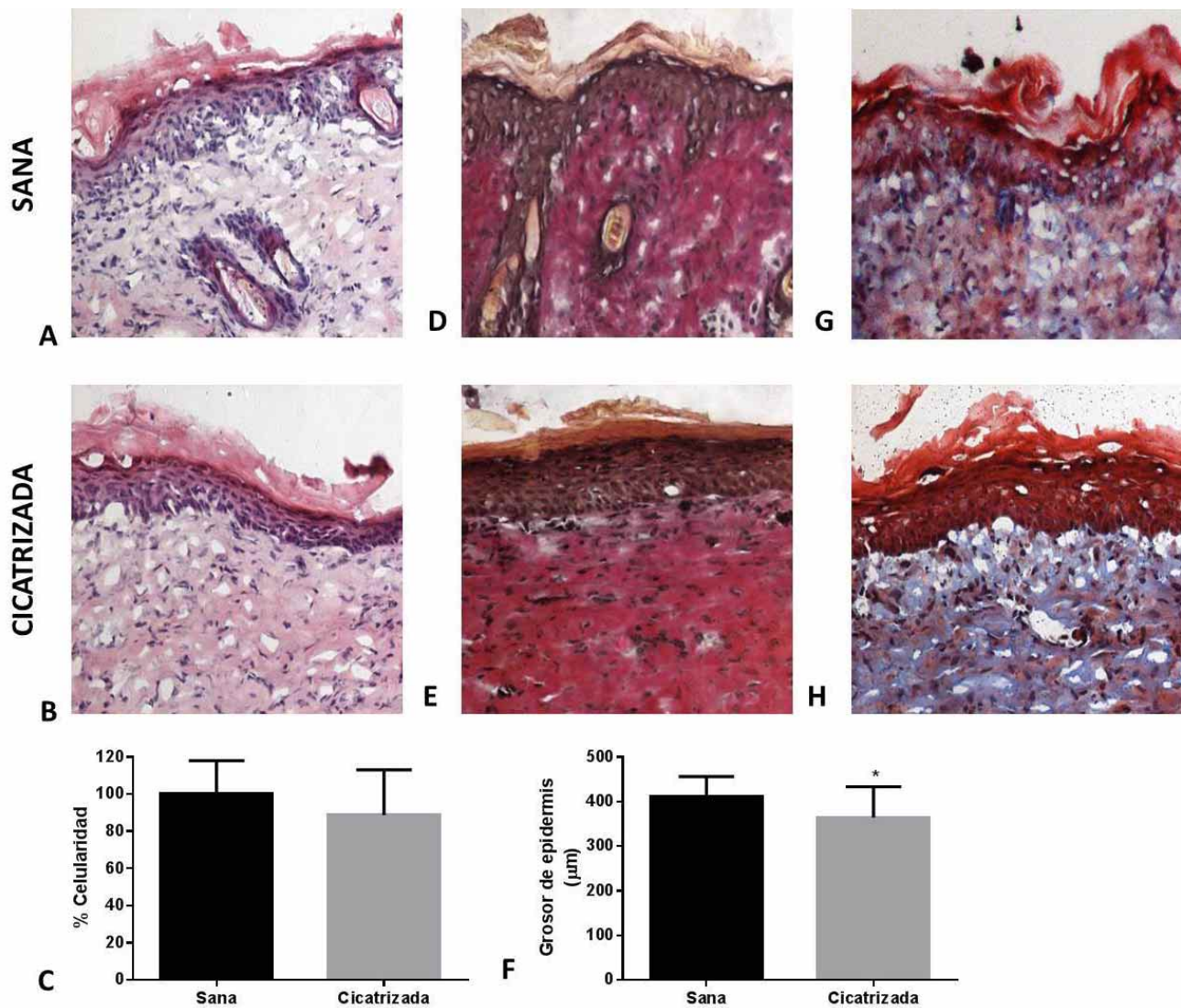


Fig. 2. Análisis histológico de piel sana y piel cicatrizada 15 días post-lesión, 100X. A y B. Microfotografías representativas teñidas con H&E. C. Porcentaje de celularidad entre piel sana y piel cicatrizada. D y E. Microfotografías representativas empleando la tinción de Van Gieson. F. Grosor de la epidermis de piel sana y piel cicatrizada. G y H. Microfotografías representativas teñidas con la técnica tricrómica de Masson. n=16, los valores representan la media ± SD. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. *p< 0,05 versus piel sana realizando una t de student pareada.

mis cicatrizada. Posteriormente, las bandas a 1457 cm^{-1} corresponden a los grupos metilo y metileno de lípidos y proteínas, mientras que las bandas a 1340 cm^{-1} se deben a las vibraciones de la colágena. Las siguientes bandas a 1238 cm^{-1} y 1080 cm^{-1} están relacionadas con las vibraciones de extensión asimétricas y simétricas P=O de los grupos fosfodiéster PO_2 de moléculas fosforiladas respectivamente. Finalmente, las bandas en el intervalo $992\text{-}986\text{ cm}^{-1}$ están asociadas con la cadena principal de fosfato ribosa, mientras que las bandas a 966 cm^{-1} provienen de las vibraciones de extensión del esqueleto de DNA.

Para comparar los cambios significativos entre la epidermis y dermis de piel sana y piel cicatrizada, se calcularon áreas bajo la curva de estos espectros FTIR. El área en la región $1773\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a lípidos de las epidermis, fue mayor significativamente en la epidermis sana con respecto a la epidermis cicatrizada (Fig. 3B).

El área bajo la curva de la amida I en el rango de $1717\text{-}1595\text{ cm}^{-1}$ no presentó diferencias significativas entre la dermis sana y la cicatrizada (Fig. 3C), mientras que el área correspondiente a la colágena en el rango de $1358\text{-}1325$

cm^{-1} fue significativamente menor en la dermis cicatrizada comparada con la dermis sana (Fig. 3D); así mismo, el radio de las áreas amida I/colágena fue mayor en la dermis cicatrizada (Fig. 3E).

Por otro lado, para analizar específicamente la estructura secundaria de las proteínas, se obtuvo la segunda derivada de los espectros FTIR normalizados de piel sana y cicatrizada en la región de amida I de proteínas (1700-1600

cm^{-1}), observando α -hélices a 1651 cm^{-1} en epidermis y a 1656 cm^{-1} en dermis, correspondiendo a queratina y colágena en epidermis y dermis respectivamente (Fig. 4A). Así mismo, se compararon las dermis sana y cicatrizada, observando bandas a 1681 cm^{-1} y a 1638 cm^{-1} correspondientes a las hojas β y a la estructura desordenada de las proteínas respectivamente (Fig. 4B). Además, empleando estos espectros en segunda derivada, se calcularon los radios entre el área de las α -hélices y las hojas β (A1656/1681) (Fig. 4C) y

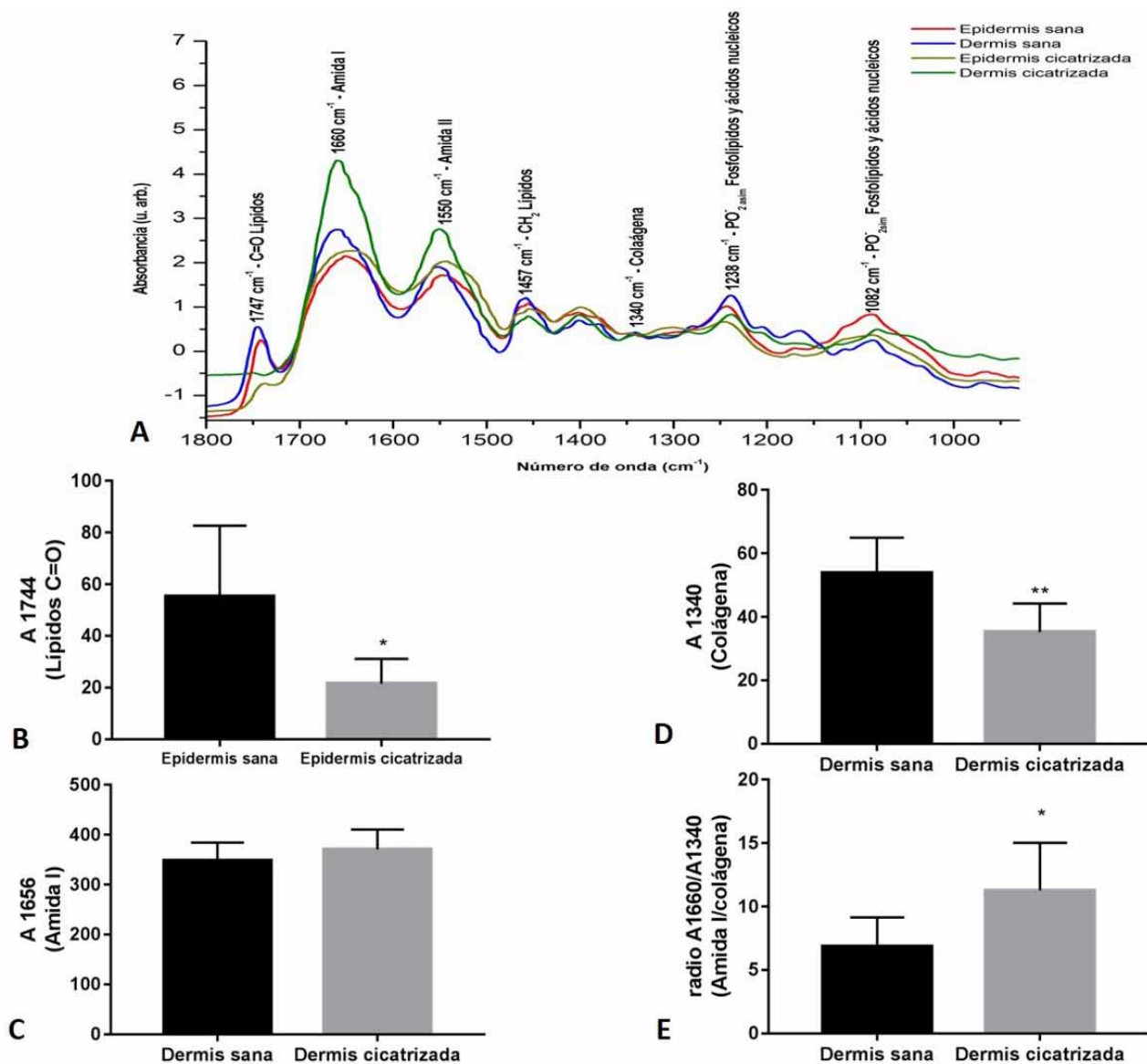


Fig. 3. Microespectroscopía FTIR (MFTIR). A. Espectros promediados obtenidos por MFTIR de epidermis y dermis de piel sana y piel cicatrizada en la huella biológica dactilar ($1800\text{-}800 \text{ cm}^{-1}$), se observan las principales bandas asociadas a biomoléculas como lípidos, proteínas, carbohidratos, colágena y ácidos nucleicos B. Área bajo la curva de la región de lípidos en epidermis de piel sana y cicatrizada. C y D. Áreas bajo la curva de las regiones relacionadas con proteínas (amida I) y colágena respectivamente en dermis de piel sana y cicatrizada. E. Radio proteínas (Amida I)/colágena en dermis de piel sana y cicatrizada. $n=16$, los valores representan la media \pm SD. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus piel sana realizando una t de student pareada.

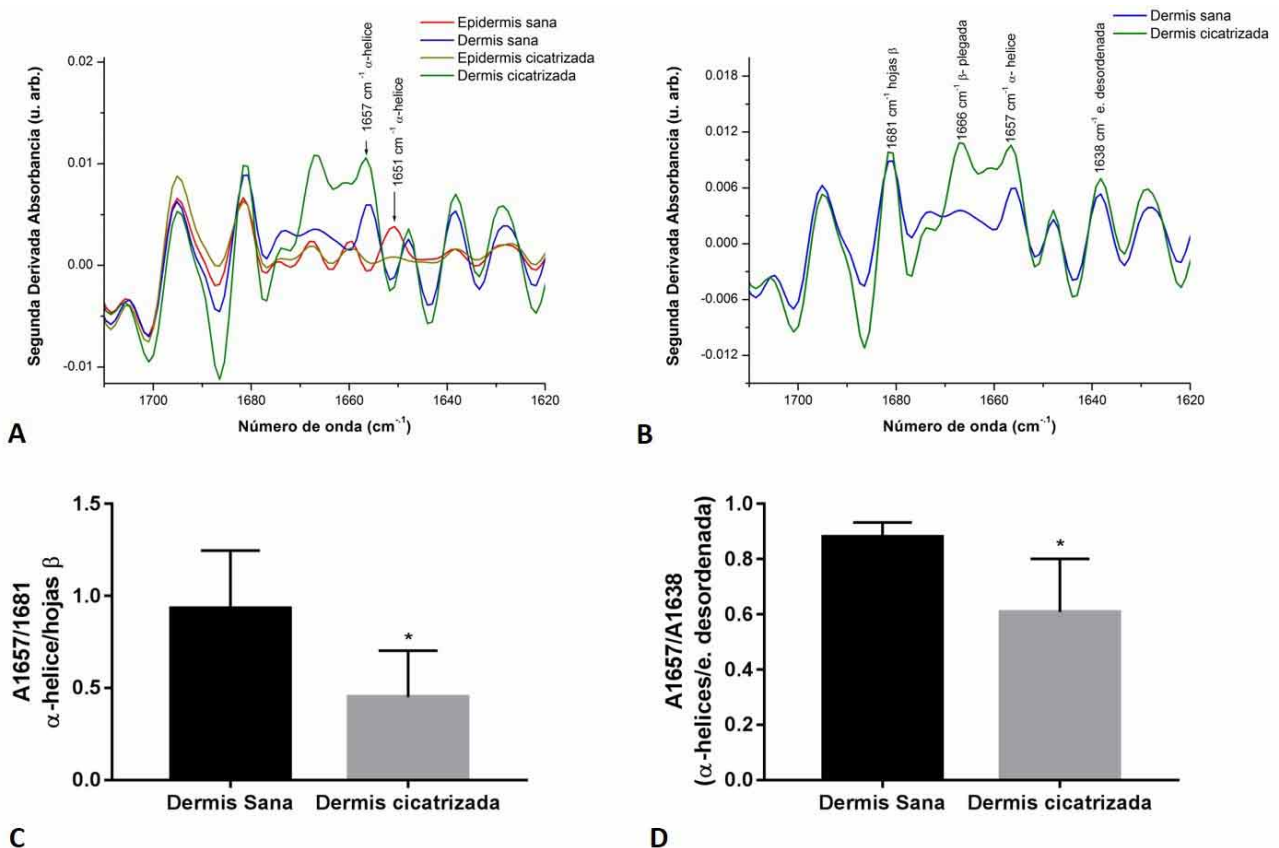


Fig. 4. Análisis de la estructura secundaria de las proteínas mediante microespectroscopía FTIR (MFTIR). A. Segunda derivada de los espectros promediados obtenidos por MFTIR de epidermis y dermis de piel sana y piel cicatrizada en la región de las proteínas amida I (1700-1600 cm⁻¹). Se identifican las α-hélices de la queratina de la epidermis (1651 cm⁻¹) y de la colágena de la dermis (1657 cm⁻¹). B. Cambios en las principales estructuras secundarias de la colágena entre dermis sana y dermis cicatrizada. C y D. Radios relacionados con el reordenamiento de las fibras de colágena (α-hélice/hojas β), (α-hélice/estructura desordenada) respectivamente. n=16, los valores representan la media ± SD. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. *p< 0,05 versus piel sana realizando una t de student pareada.

el área entre las α-hélices y la estructura desordenada (1656/1638) (Fig. 4D), siendo ambos radios menores significativamente en la dermis cicatrizada en comparación con la dermis sana.

Mapeo bioquímico. Para evidenciar los cambios espectrales cualitativamente respecto a las proteínas queratina y colágena en la piel sana y piel cicatrizada, se realizó un mapeo bioquímico a partir de la MFTIR, analizándose las regiones espectrales entre 1653-1648 cm⁻¹ y 1659-1653 cm⁻¹ respectivamente. Las Figuras 5A y 5B muestran las imágenes visibles de piel sana y cicatrizada sobre las cuales se realizó el mapeo. En las Figuras 5C y 5D se observa la concentración de queratina a nivel epidérmico en ambas muestras, apreciando una mayor absorbancia de esta proteína en la piel sana comparada con la piel cicatrizada. Del mismo modo, en las Figuras 5E y 5F se observa la absorbancia correspondiente a las α-héli-

ces de la colágena, donde se evidencia mayor concentración de esta estructura proteica en la dermis de la piel sana respecto a la piel cicatrizada.

DISCUSIÓN

El proceso de cicatrización es un evento dinámico y altamente complejo que requiere de la intervención de múltiples factores que interactúan de manera organizada para reparar a nivel histológico el área dañada. El modelo de cicatrización de heridas excisionales es tan complicado que no puede ser reproducido *in vitro* (Shaw & Martin, 2009). Por lo tanto, sigue siendo necesario el análisis de este proceso con métodos rápidos y precisos para poder proponer tratamientos que ayuden en la cicatrización o regeneración de la piel.

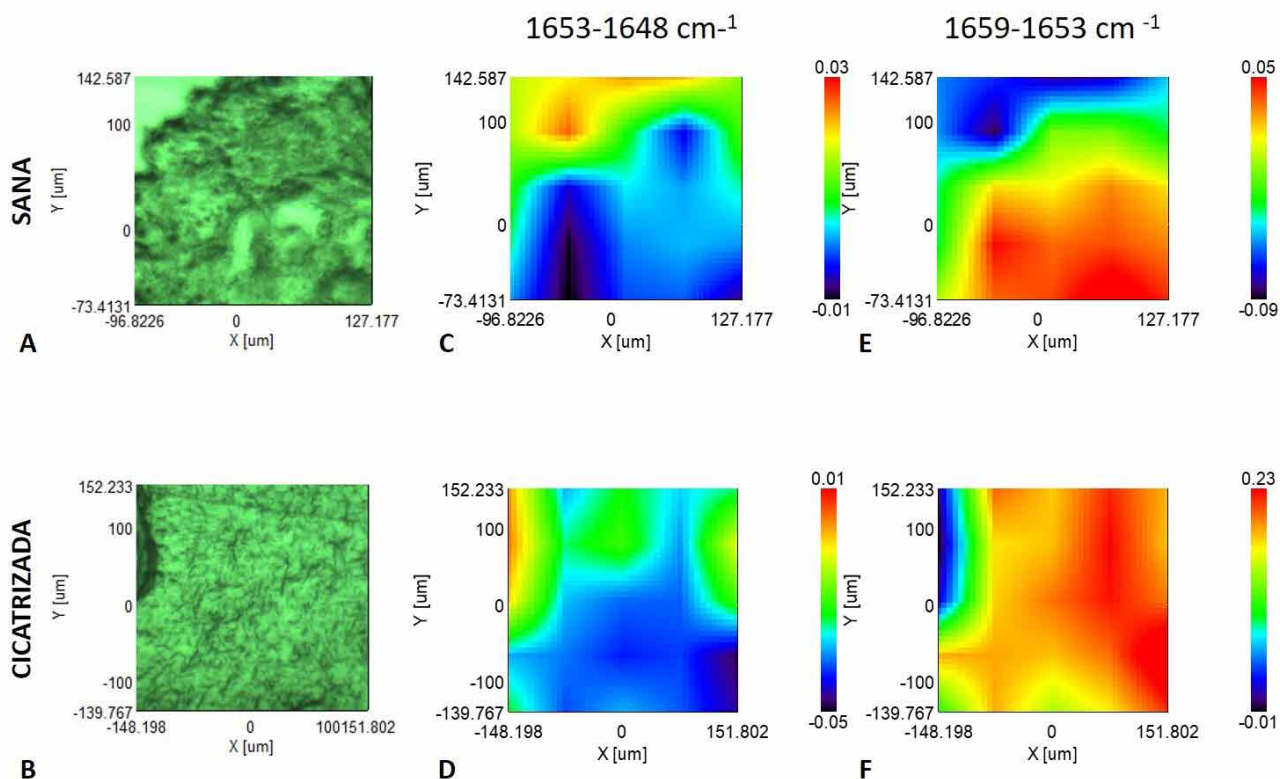


Fig. 5. Mapeo bioquímico. A y B. Microfotografías representativas en campo claro de la piel sana y cicatrizada a los 15 días respectivamente. C y D. Mapeo bioquímico de la región de la α -hélices relacionada a queratina ($1653-1648\text{ cm}^{-1}$), la cual muestra mayor intensidad en la zona de la epidermis de piel sana. E y F. Mapeo bioquímico de la región de la α -hélices relacionada a colágena ($1659-1653\text{ cm}^{-1}$), la cual muestra mayor intensidad en la zona de la dermis de piel sana.

Respecto a los resultados morfométricos de este trabajo, observamos que al día 15 encontramos una reducción del área de la herida del 87,60 %, resultado que concuerda con los hallazgos de Le *et al.* (2012), quienes reportaron que los ratones al día 11 ya presentaban un cierre completo de la herida tras provocarles una herida excisional de 8 mm de diámetro.

Por otro lado, nosotros observamos que el grosor de la epidermis cicatrizada fue del 88,60 % al día 15 en comparación con el grosor de la piel sana, resultado similar a los obtenidos por Konop *et al.* (2017), quien tras realizar heridas excisionales en ratones, concluyeron que la piel cicatricial tenía una epidermis delgada que cubría el área de la herida, sin realizar una medición micrométrica en comparación a la piel sana, y con un grupo tratado con un apósito a base de un derivado de queratina, es decir, el grosor de la epidermis de la cicatriz era menor.

Yu *et al.* (2012) mencionan que antes de la segunda semana se lleva a cabo la formación del tejido de granulación, incrementando la proliferación celular y el inicio de la

biosíntesis de fibras colágenas y elásticas; sin embargo, a partir de la segunda semana inicia la fase de remodelación en la cual disminuye la celularidad y se lleva a cabo el remodelamiento de las fibras de colágena mediante síntesis y degradación de la matriz extracelular, además, las fibras de colágena sintetizadas se encuentran desordenadas. Estas características concuerdan con lo que observamos a los 15 días post-lesión, fase en la que el índice de celularidad en la piel cicatrizada fue de 88,72 %, menor que en la piel sana, aunque no fue estadísticamente significativo y, también coincide con investigaciones anteriores, en donde se concluyó que la piel cicatricial tiene un menor índice de celularidad en comparación con la piel sana (Zhang *et al.*, 2017). Con base en estas evidencias, la dermis se encontraba en una fase tardía del proceso de cicatrización, puesto que el índice de celularidad no fue significativo. Estos datos orientan a que un tiempo de 15 días es suficiente para evaluar los cambios relacionados con la fase de remodelación en un modelo de herida excisional para ratones NIH.

Novaes *et al.* (2015) reportaron mediante la tinción de Masson que a los siete días disminuye la cantidad de

colágena y esta aumenta casi a niveles normales a los 15 días; nuestros resultados sugieren que existe un incremento en la cantidad de colágena en la dermis cicatrizada, como lo reportado por Caetano *et al.* en el 2016 (Novaes *et al.*; Caetano *et al.*, 2016); sin embargo, Novaes *et al.* compararon diversas técnicas para evaluar el contenido de colágena en heridas y observaron que los datos obtenidos mediante la tinción de Masson es la menos confiable respecto a otras tinciones como PicroSirius Red o técnicas bioquímicas como determinación de hidroxiprolina, ya que la tinción de Masson también tiñe moléculas no colágenas presentes en la dermis como glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas, características que denotan su inespecificidad para determinar el contenido real de colágena, por lo que en nuestra investigación realizamos además del estudio histológico, el análisis de la epidermis y dermis mediante MFTIR.

Referente a la MFTIR, se pudo observar una disminución en la región de los lípidos (1773-1720 cm^{-1}) en la epidermis cicatrizada con respecto a la epidermis sana, disminución que puede estar relacionada con el decremento en el grosor de la epidermis concordando con lo reportado por Kumar *et al.* (2015), quienes reportaron que una disminución en la queratina afecta el tráfico entre el retículo endoplásmico y las mitocondrias, teniendo un impacto en la distribución de los lípidos, demostrando también que el bloqueo genético de la expresión de queratina resulta en un desbalance de la producción de lípidos, el cual se ve reflejado en la disminución de la producción de ácidos grasos libres, colesterol y ceramidas que se encuentran formando el manto ácido de la piel (Kumar *et al.*).

Por otro lado, en la dermis no se observaron cambios significativos en la región amida I entre los dos grupos, sin embargo, se apreció una disminución de la colágena del 34,50 % (1430 cm^{-1}) en la dermis cicatrizada, similar a lo reportado con técnicas histológicas por Novaes *et al.*, quienes reportan una disminución del 23,78 % respecto a la piel sana. Sin embargo, se observó un incremento en la proporción entre amida I y colágena, lo cual sugiere que predomina la colágena en la dermis cicatrizada respecto a la dermis sana, corroborando que las cicatrices analizadas al día 15 se encontraban en fase de remodelación, como lo reportado por Caetano *et al.*, quienes reportaron un incremento en los niveles de colágena mediante la técnica de PicroSirius Red y tricrómica de Gomori, así como la técnica de hidroxiprolina al día 14 en ratas Wistar.

Empleando la segunda derivada de los espectros obtenidos mediante MFTIR en la región de las proteínas amida I (1700-1600 cm^{-1}), observamos una banda de absorción a 1651 cm^{-1} relacionada con las α -hélices de queratina, resultado que concuerda con Andrew Chan *et al.*, quienes las

reportan a 1652 cm^{-1} . Es importante mencionar, que este hallazgo se comprobó mediante el mapeo bioquímico, donde se definió el área de la epidermis que correspondía al rango de dicha molécula en la piel sana y su ausencia en la dermis, resultados congruentes a lo observado histológicamente (Adrew Chan *et al.*).

Respecto a la fase de remodelación, la cual involucra un reordenamiento de las fibras (Xue & Jackson, 2015), se pudo evidenciar mediante el análisis de la segunda derivada en la región amida I, donde se observaron bandas espectrales a 1656 cm^{-1} correspondientes a las α -hélices de la colágena tipo I, bandas a 1681 cm^{-1} y 1638 cm^{-1} correspondientes a las hojas β y a la estructura desordenada de las proteínas de la dermis respectivamente, similar a lo reportado por Greve *et al.* (2008).

Esta fase del proceso de cicatrización involucra la estabilización de las fibras de colágena mediada por lisil-oxidasa en el borohidrato reducible; inicialmente, se lleva a cabo el reticulado de aldimina durante la maduración primaria de la histidinohidroxiilinanorleucina (HHL). En las cicatrices hay un cambio en el patrón del reticulado caracterizado por la presencia de hidroxilisina en los telopéptidos, resultando en la formación de reticulados de 3-hidroxipiridin y pirroles (Robins *et al.*, 2003). Vidal & Mello (2011) reportaron que el radio entre A1655/A1690, incrementa en los tendones de bovinos, relacionados con mayor reticulación piridolina, prolina y/o hidroxipronina y enlaces hidrógeno, por lo que estas fibras son más compactas y supraorganizadas de forma ordenada; sin embargo, este radio no se encuentra en la piel.

Paschalis *et al.* reportaron que este radio A1660/A1690 es para determinar la mineralización de la colágena en hueso, y que la reticulación y maduración de estas fibras en la piel se puede determinar mediante el radio A1660/A1680, el cual está relacionado con la proporción entre piridinolina (PYD) /deoxipiridinolina (DPD); estos datos concuerdan con nuestros resultados, ya que nosotros observamos las bandas 1657 y 1681 cm^{-1} , observando una disminución en el radio A1657/A1681 en la dermis cicatrizada, lo cual sugiere menor organización de estas fibras concordando con los hallazgos histológicos mediante la tinción de Masson y lo reportado por Kwan *et al.* (2011), quienes demostraron que en el proceso normal de cicatrización las fibras de colágena son depositadas con una orientación azarosa formando agregados, lo cual está relacionado con una disminución en la resistencia del tejido cicatricial, sugiriendo la disminución en la maduración de dichas fibras (Verhaegen *et al.*, 2009).

Los resultados espectroscópicos fueron congruentes con las características morfológicas presentadas en nues-

tros resultados y con las histológicas reportadas por otros autores. Además, se demostró la capacidad de la MFTIR para caracterizar de forma precisa los cambios biomoleculares de la piel cicatrizada como es el depósito y ordenamiento de las fibras de colágena asociadas a su maduración mediante el cálculo del radio A1657/A1681, así como su versatilidad para el análisis de diferentes moléculas en una misma muestra de una manera rápida y precisa.

Es necesario continuar evaluando el proceso de cicatrización en sus diferentes fases, con la finalidad de analizar el depósito y reordenamiento de las fibras de colágena tempranamente durante del proceso de remodelación.

AGRADECIMIENTOS. Apreciamos la colaboración de la Subtte. Pas. Med. Brenda Nayeli López Lagunas por sus contribuciones en este trabajo.

VÁZQUEZ-ZAPIÉN, G. J.; MATA-MIRANDA, M. M.; GARCÍA-SÁNCHEZ, F. J.; CAMPOS-SOTO, S. S.; SÁNCHEZ-BRITO, M. & MARTÍNEZ-CUAZITL, A. Biomolecular characterization by FTIR microspectroscopy in theremodeling phase of wound cicatrization in a murine model of excisional injury. *Int. J. Morphol.*, 37(4):1234-1244, 2019.

SUMMARY: The skin cicatrization is a complex and organized process that involves three phases: inflammatory, proliferative, and remodeling. It is essential to analyze this process biomolecularly, in order to investigate and propose new therapeutic strategies that improve the healing or promote regeneration. The objective of this project was to analyze histological and biomolecularly through Fourier Transform infrared microspectroscopy (FTIRM) and its biochemical mapping function, samples of an excisional skin wound, comparing the morphological and spectroscopic changes between healthy skin and scarred skin. An excisional skin wound healing model was standardized using female, NIH strain 8-week-old mice (n = 16), provoking an excisional wound of 1 cm². Healthy skin (day 0) and scarring skin (day 15 post-injury) were morphometrical, histological, and biomolecularly analyzed by digital picture analysis, histological technique, and FTIRM with its mapping function. The morphometric analysis showed a reduction of the wound area of 87.6 % at day 15 after wound. Histologically, in the scarred skin a thinning of the epidermis was evidenced, besides reduced cellularity in the dermis, granulation tissue formation, and disorganized collagen fibers were observed. Spectroscopically, changes between the study groups were appreciated, mainly in the lipid bands and in the protein region. The calculation of the areas under the curve and the biochemical mapping showed a lower concentration of keratin and collagen in the scarred skin, as well as collagen fibers disorganization. The ability of the FTIRM to accurately characterize biomolecular changes in cicatrization process was demonstrated, such as the amount of keratin, collagen, and the deposition and ordering of the collagen fibers associated with their maturation.

KEY WORDS: Skin; Excisional lesion; Scarring, FTIR Microspectroscopy; Biochemical mapping.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrew Chan, K. L.; Zhang, G.; Tomic-Canic, M.; Stojadinovic, O.; Lee, B.; Flach, C. R. & Mendelsohn, R. A coordinated approach to cutaneous wound healing: vibrational microscopy and molecular biology. *J. Cell. Mol. Med.*, 12(5B):2145-54, 2008.
- Balázs, B.; Farkas, G.; Berkesi, O.; Gyulai, R.; Berkó, S.; Budai-Szucs, M.; Szabó-Révész, P.; Kemény, L. & Csányi, E. Protein structure is changed in psoriatic skin on the unaffected region - Imaging possibility with ATR-FTIR spectroscopy. *Microchem. J.*, 117:183-6, 2014.
- Caetano, G. F.; Fronza, M.; Leite, M. N.; Gomes, A. & Frade, M. A. Comparison of collagen content in skin wounds evaluated by biochemical assay and by computer-aided histomorphometric analysis. *Pharm. Biol.*, 54(11):2555-9, 2016.
- Chen, Y.; Zou, C.; Mastalerz, M.; Hu, S.; Gasaway, C. & Tao, X. Applications of micro-fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in the geological sciences--A review. *Int. J. Mol. Sci.*, 16(12):30223-50, 2015.
- Dwivedi, D.; Dwivedi, M.; Malviya, S. & Singh, V. Evaluation of wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Pongamia pinnata* in wistar rats. *J. Tradit. Complement. Med.*, 7(1):79-85, 2016.
- Enríquez Merino, J. & Caballero Centeno, A. M. Opciones terapéuticas para cicatrices queloides e hipertróficas. *Rev. Cent. Dermatol. Pas-cua*, 16(2):80-4, 2007.
- Greve, T. M.; Andersen, K. B. & Nielsen, O. F. ATR-FTIR, FT-NIR and near-FT-Raman spectroscopic studies of molecular composition in human skin in vivo and pig ear skin in vitro. *Spectroscopy*, 22(6):437-57, 2008.
- Kaplani, K.; Koutsi, S.; Armenis, V.; Skondra, F. G.; Karantzelis, N.; Champeris Tsaniras, S. & Taraviras, S. Wound healing related agents: Ongoing research and perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 129:242-53, 2018.
- Konop, M.; Sulejczak, D.; Czuwara, J.; Kosson, P.; Misicka, A.; Lipkowski, A. W. & Rudnicka, L. The role of allogenic keratin-derived dressing in wound healing in a mouse model. *Wound Repair Regen.*, 25(1):62-74, 2017.
- Kumar, V.; Bouameur, J. E.; Bär, J.; Rice, R. H.; Hornig-Do, H. T.; Roop, D. R.; Schwarz, N.; Brodesser, S.; Thiering, S.; Leube, R. E.; *et al.* A keratin scaffold regulates epidermal barrier formation, mitochondrial lipid composition, and activity. *J. Cell Biol.*, 211(5):1057-75, 2015.
- Kwan, K. H.; Liu, X.; To, M. K.; Yeung, K. W.; Ho, C. M. & Wong, K. K. Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing. *Nanomedicine*, 7(4):497-504, 2011.
- Le, M.; Naridze, R.; Morrison, J.; Biggs, L. C.; Rhea, L.; Schutte, B. C.; Kaartinen, V. & Dunnwald, M. Transforming growth factor Beta 3 is required for excisional wound repair *in vivo*. *PLoS One*, 7(10):e48040, 2012.
- Novaes, R. D.; Cupertino, M. C.; Sarandy, M. M.; Souza, A.; Soares, E. A. & Gonçalves, R. V. Time-dependent resolution of collagen deposition during skin repair in rats: a correlative morphological and biochemical study. *Microsc. Microanal.*, 21(6):1482-90, 2015.
- Olsztyńska-Janus, S.; Pietruszka, A.; Kiebowicz, Z. & Czarniecki, M. A. ATR-IR study of skin components: Lipids, proteins and water. Part I: Temperature effect. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 188:37-49, 2018.
- Palombo, F.; Cremers, S. G.; Weinberg, P. D. & Kazarian, S. G. Application of Fourier transform infrared spectroscopic imaging to the study of effects of age and dietary L-arginine on aortic lesion composition in cholesterol-fed rabbits. *J. R. Soc. Interface*, 6(37):669-80, 2009.
- Paschalis, E. P.; Gamsjaeger, S.; Tatakis, D. N.; Hassler, N.; Robins, S. P. & Klaushofer, K. Fourier transform Infrared spectroscopic characterization of mineralizing type I collagen enzymatic trivalent cross-links. *Calcif. Tissue Int.*, 96(1):18-29, 2015.

- Pires Rodríguez, M.; Brizuela, A.; Muñoz, A.; Lara, A. & Sáenz, A. M. Queratinización: fisiología cutánea. *Dermatol. Venez.* 49(3-4):7-11, 2011.
- Robins, S. P.; Milne, G.; Duncan, A.; Davies, C.; Butt, R.; Greiling, D. & James, I. T. Increased skin collagen extractability and proportions of collagen type III are not normalized after 6 months healing of human excisional wounds. *J. Invest. Dermatol.*, 121(2):267-72, 2003.
- Shaw, T. J. & Martin, P. Wound repair at a glance. *J. Cell Sci.*, 122(Pt. 18):3209-13, 2009.
- Vázquez-Zapién, G. J.; Mata-Miranda, M. M.; Sanchez-Monroy, V.; Delgado-Macuil, R. J.; Pérez-Ishiwara, D. G. & Rojas-Lopez, M. FTIR spectroscopic and molecular analysis during differentiation of pluripotent stem cells to pancreatic cells. *Stem Cells Int.*, 2016:6709714, 2016.
- Verhaegen, P. D.; van Zuijlen, P. P.; Pennings, N. M.; van Marle, J.; Niessen, F. B.; van der Horst, C. M. & Middelkoop, E. Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: An objective histopathological analysis. *Wound Repair Regen.*, 17(5):649-56, 2009.
- Vidal, B. de C. & Mello, M. L. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron*, 42(3):283-9, 2011.
- Xue, M. & Jackson, C. J. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, 4(3):119-36, 2015.
- Yu, G.; Stojadinovic, O.; Tomic-Canic, M.; Flach, C. R. & Mendelsohn, R. Infrared microscopic imaging of cutaneous wound healing: lipid conformation in the migrating epithelial tongue. *J. Biomed. Opt.*, 17(9):96009-1, 2012.
- Zhang, M. Z.; Dong, X. H.; Guan, E. L.; Si, L. B.; Zhuge, R. Q.; Zhao, P. X.; Zhang, X.; Liu, M. Y.; Adzavon, Y. M.; Long, X.; *et al.* A comparison of apoptosis levels in keloid tissue, physiological scars and normal skin. *Am. J. Transl. Res.*, 9(12):5548-57, 2017.

Dirección para correspondencia:
Dra. Adriana Martínez Cuazitl
Escuela Militar de Medicina
Centro Militar de Ciencias de la Salud
Secretaría de la Defensa Nacional
Cerrada de Palomas S/N
Lomas de San Isidro
Miguel Hidalgo
Ciudad de México
MÉXICO

Email: adyta0@hotmail.com

Recibido : 08-02-2019
Aceptado: 10-06-2019