



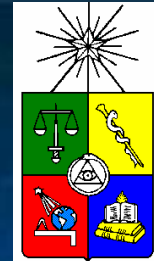
UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
GRUPO DE ESPECTROSCOPIA
VIBRACIONAL



UNIDAD DE BIOCIRUGIA
(Ondas de Choque / ESWT)



MATERIALS AND SURFACE
SCIENCE GROUP
DEPARTMENT OF CHEMISTRY &
BIOCHEMISTRY



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
GRUPO DE FISIOLÓGIA
Y BIO-FÍSICA

ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADO POR SUPERFICIE: ESTUDIO DE TEJIDOS DEL MANGO ROTADOR DEL HOMBRO TRATADO CON ONDAS DE CHOQUE

J. J. Cárcamo, E. Clavijo, M. Brañes¹, H. Contreras²,
R. Aroca³ and M.M. Campos Vallette.

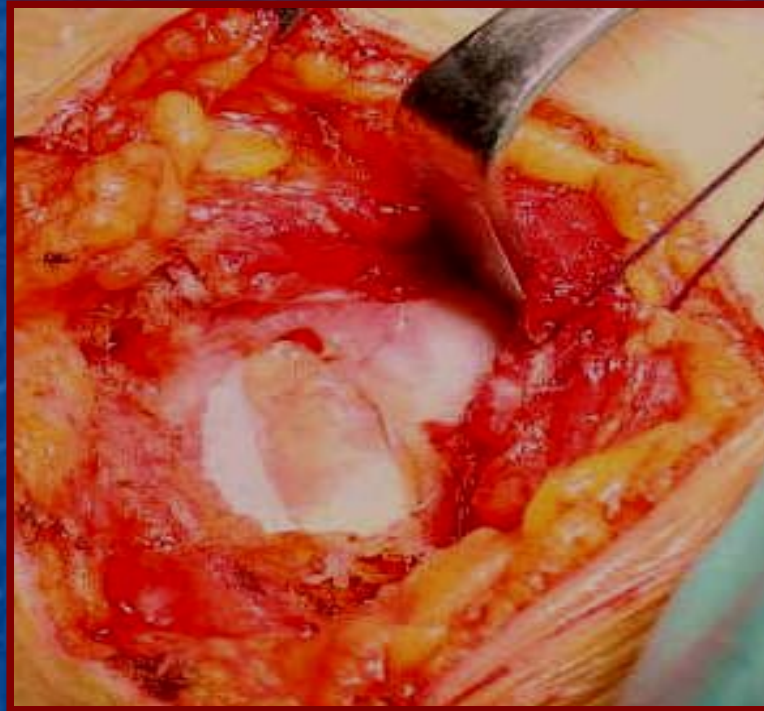
Universidad de Chile, Facultad de Ciencias POBox 653 Santiago 21. Chile

¹ Unidad de Biocirugía, Clínica Arauco Salud, Avda. Presidente Kennedy 5413-B, Las Condes. Chile.

² Universidad de Chile, Inst. Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina,
Avda. Independencia 1027, Santiago, Chile

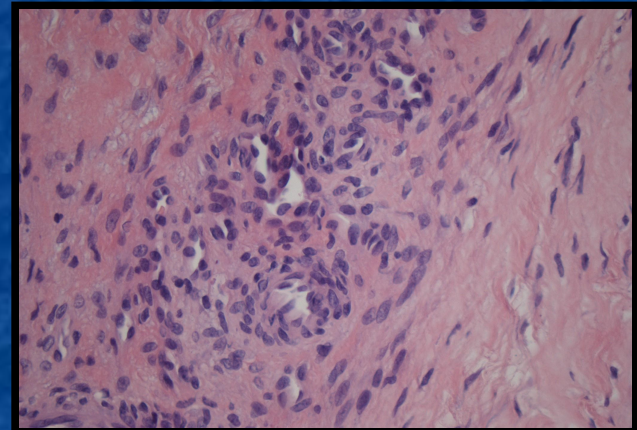
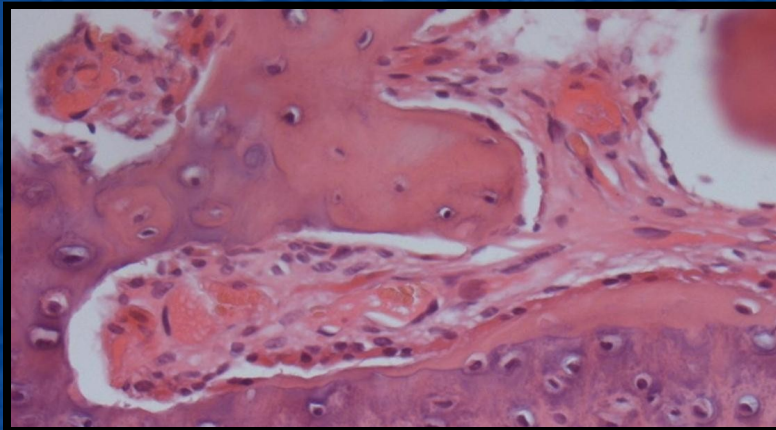
³ University of Windsor, Materials & Surface Science Group, N9B3P4 Ontario, Canada.

¿Ondas de Choque, Medicina, Tendinosis y ahora Química?



Biopsias humanas del mango rotador del hombro

- **Trabajo dirigido a hacer una contribución Médica/Clínica consistente en la aplicación de Ondas de Choque sobre tendinopatias crónicas, no consolidación de fracturas y otras efermedades relacionadas.**
- **Se ha observado que la exposición al tratamiento de Ondas de Choque produce una inducción biológica que trae como consecuencia neo-angiogenesis e hipervascularización en los pacientes tratados.**



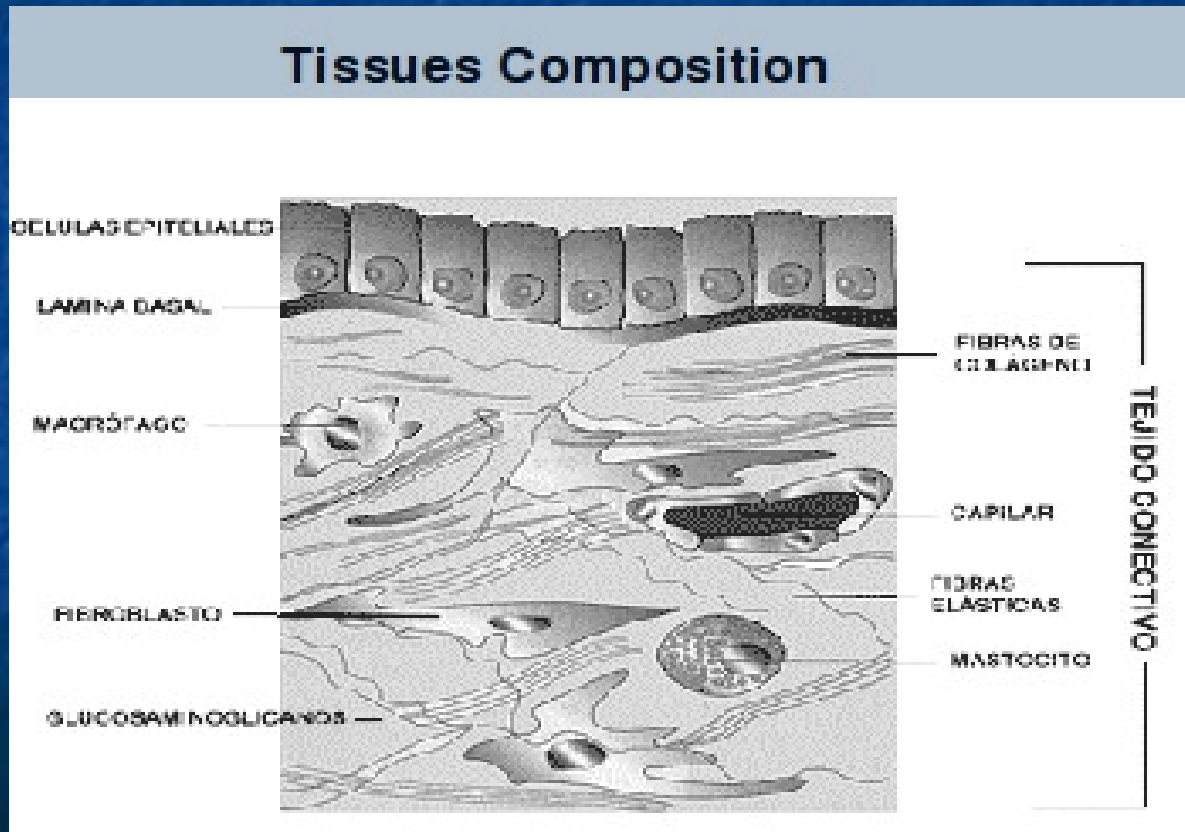
- **El objetivo de este trabajo esta dirigido a dar una explicación a estos bioprocesos.**

Muestras en estudio

- Cortes histológicos de 2 μm de espesor del mango rotador del hombro.
- Los cortes son:
Patológicos tratados y no tratados con Ondas de Choque.

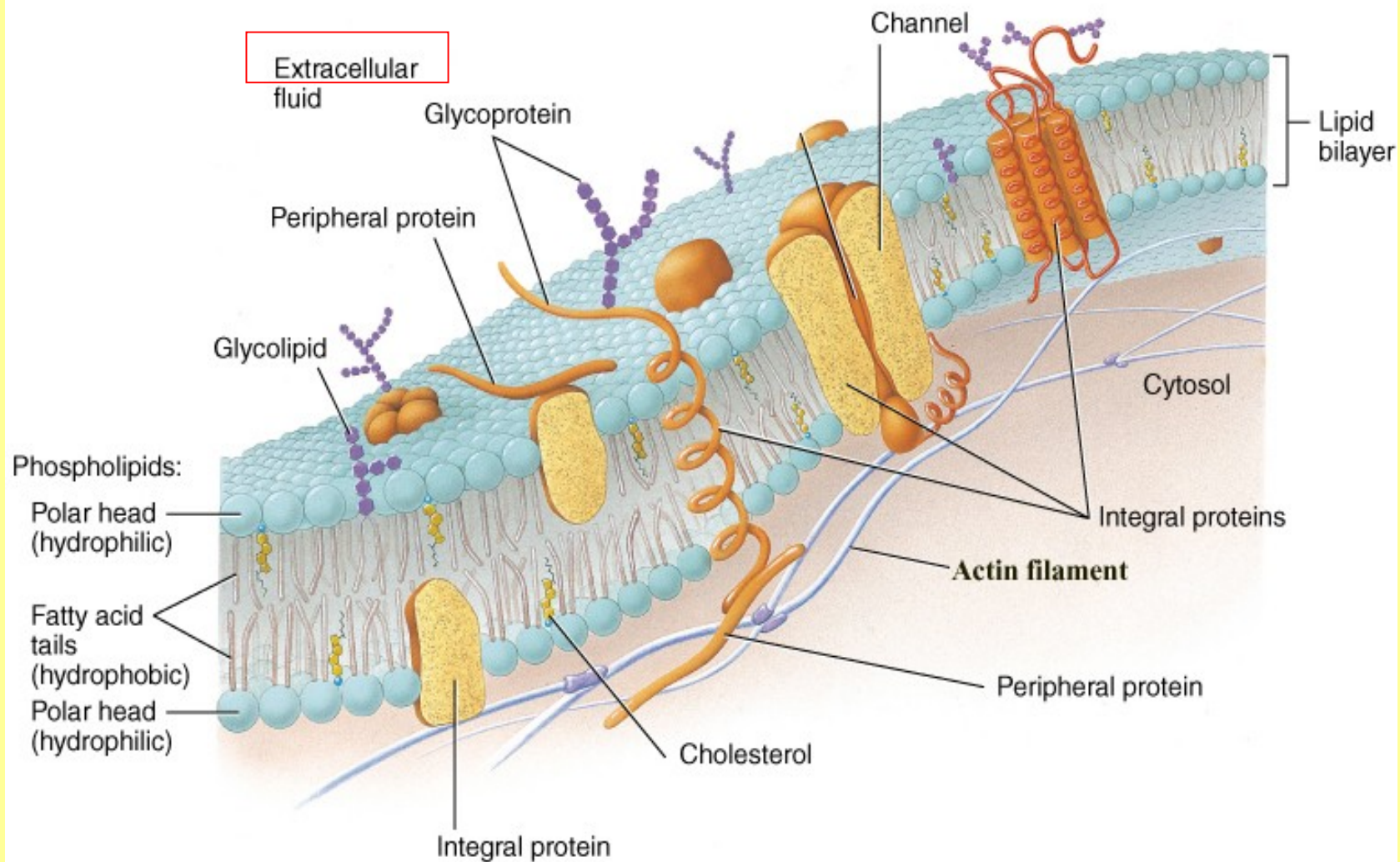
Muestras de tejidos humano

- Las biopsias son tratadas bajo las tecnicas habituales de histología para tejidos, esto es: Elaboración de tacos en parafina solida, corte en microtomo, Tinción con H-E, Tricromo de Masson y Azul de Toluidina



**Biología
Bioquímica**

Singer-Nicholson model



Composición Química de la Matriz Extracelular

Componentes Fibrosos: Las proteínas fibrosas son los elementos básicos estructurales de los tejidos conjuntivos. Los más importantes son: **colágeno, elastina, fibronectina, laminina.**

Componentes fluidos: glicosaminoglicanos y proteoglicanos.

Los glicosaminoglicanos son polisacáridos complejos. Los mas importantes son:

- **Ácido hialurónico** (es el de mayor tamaño y no se encuentra sulfatado),
- **condroitín sulfato,**
- **dermatán sulfato,**
- **heparán sulfato y**
- **queratán sulfato.**

Estos, al combinarse con proteínas, pasan a llamarse proteoglicanos. También reciben en general la denominación de "mucopolisacáridos".

Los glicosaminoglicanos son moléculas muy ácidas, con numerosas cargas negativas que atraen grandes cantidades de iones sodio y, por lo tanto, de agua.

Componentes enzimático: Constituido principalmente por **metaloproteinas,** las que son las responsables del equilibrio homeostático en la remodelación de los tejidos

Collagen proteins

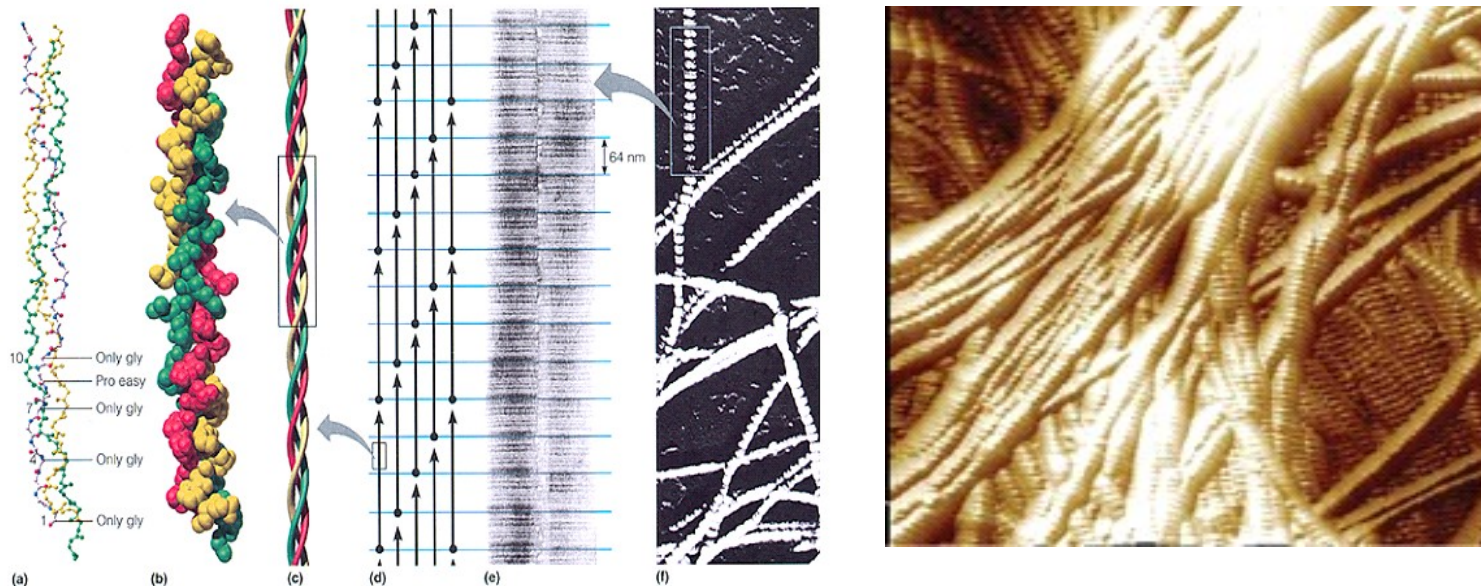
25 to 33 % of the total proteins in humans equivalent to 6 % of the weight

Contains:

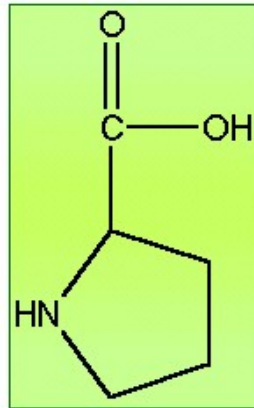
33% gly, 21% proline and its hydroxyl derivatives in position 3 and 4, and 11% alanine.

Collagen contains hydroxiproline and 5-hydroxylisine.

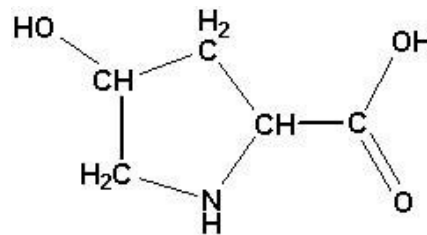
Fibers interact each other through glucosamineglycans



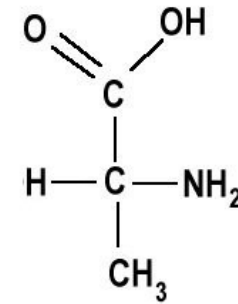
Aminoacids (collagen constituents)



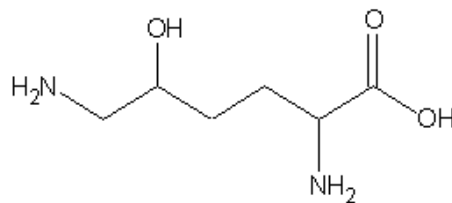
Prolina



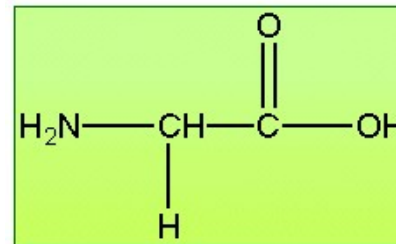
Hidroxirolina



Alanina



5-Hidroxisilina.



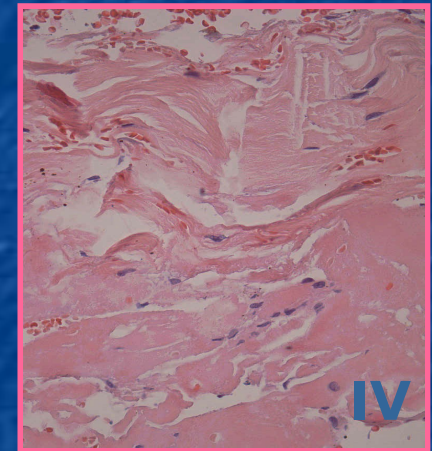
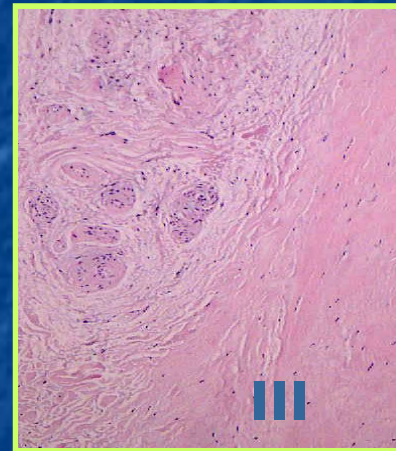
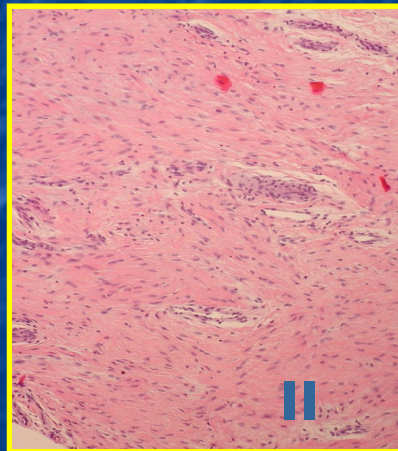
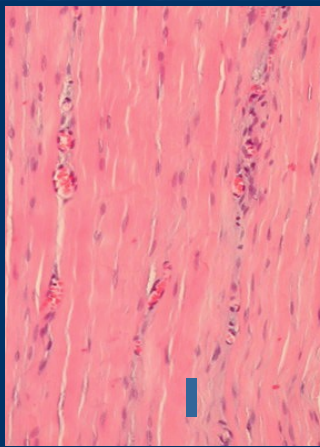
Glicina

Estudios de tejidos patológicos !!!

¿Hay información de estructura
molecular de estos sistemas?

Información obtenida por tinción y microscopía

• Clasificación Riley



Normal

- vasodilatación
- neoangiogénesis inicial
- aumento nº fibroblastos / otras
- aumento cel's. endoteliales
- expresión céls. mesenquimales
- alteración relación col I : III

- metaplasia focos angiogénesis
- mayor alteración matriz
- metaplasia condral
- microcalcificación / calcificación
- microrupturas

- disminución focos angiogénesis
- apoptosis progresiva
- pérdida estructura matriz

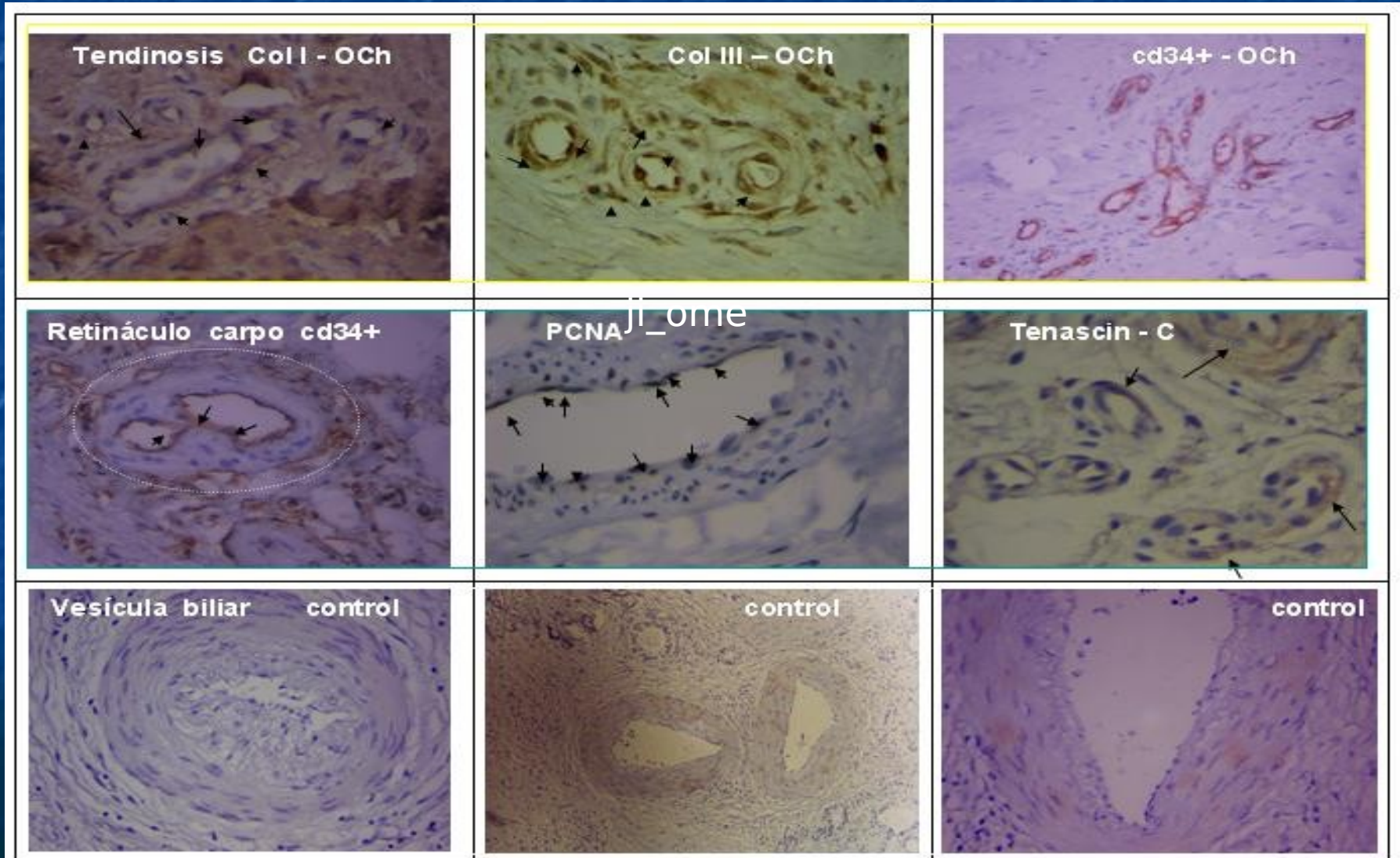
en homeostasis

inflamación reactiva

inflamación crónica

consecuencia

Información obtenida por ensayos Inmunohistoquímicos



¿Que hay en espectroscopía?

BIOPOLYMERS

VOL. 14, 379-391 (1975)

Raman Scattering of Collagen, Gelatin, and Elastin

BRUCE G. FRUSHOUR and JACK L. KOENIG, *Department of
Macromolecular Science, Case Western Reserve University,
Cleveland, Ohio 44106*

TABLE 10
Summary of conformationally sensitive protein Raman lines

	Amide I	Amide III	Skeletal mode
Alpha helix	1655-1659 cm ⁻¹ (s)	1250-1280 cm ⁻¹ (w)	900-960 cm ⁻¹ (s)
Antiparallel beta sheet	1667-1672 cm ⁻¹ (s)	1229-1240 cm ⁻¹ (s)	900-960 cm ⁻¹ (w)
Random coil (disordered)	1665-1675 cm ⁻¹ (s)	1243-1265 cm ⁻¹ (m)	900-960 cm ⁻¹ (w)

Classification of the degenerative grade of lesions of supraspinatus rotator cuff tendons by FT-Raman spectroscopy

Bianca Palma Fogazza^a, Carolina da Silva Carvalho^a, Sergio Godoy Penteado^a, Cláudio S. Meneses^b,
Airtton Abrahão Martin^a, *Herculano da Silva Martinho^a

^aInstituto de Pesquisa & Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi,
2911, 12244-000, São José dos Campos, São Paulo, Brazil;

^bCIPAX – Medicina Diagnóstica, Av. Nove de Julho, 507, 12243-000, São José dos Campos, São
Paulo, Brazil

Relacion de Colagenos I y III

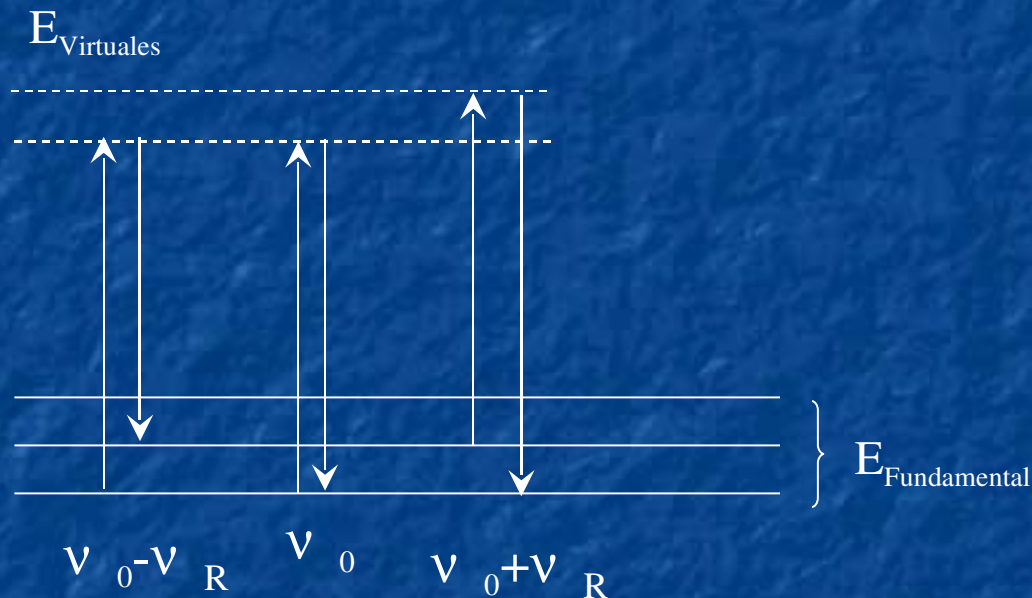
Disciplina que estudia la componente estructural: Raman y SERS

ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

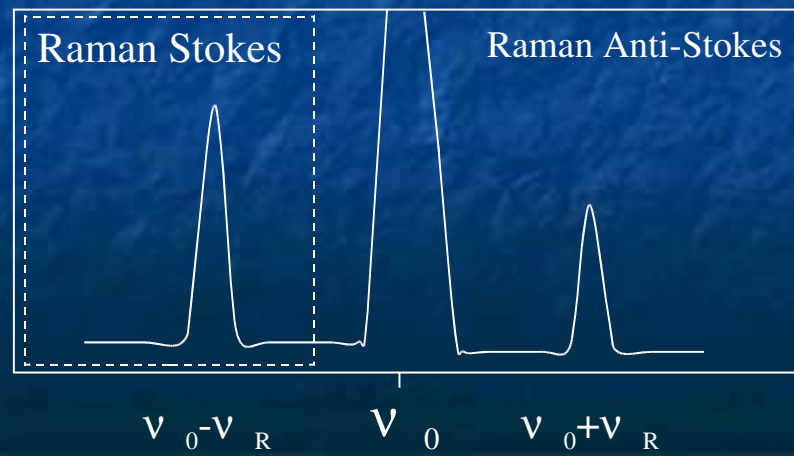
ESPECTROSCOPIA RAMAN

Sección eficaz pequeña
N° fotones dis./Area

10 millones incidente
1 dispersados



Espectro Raman

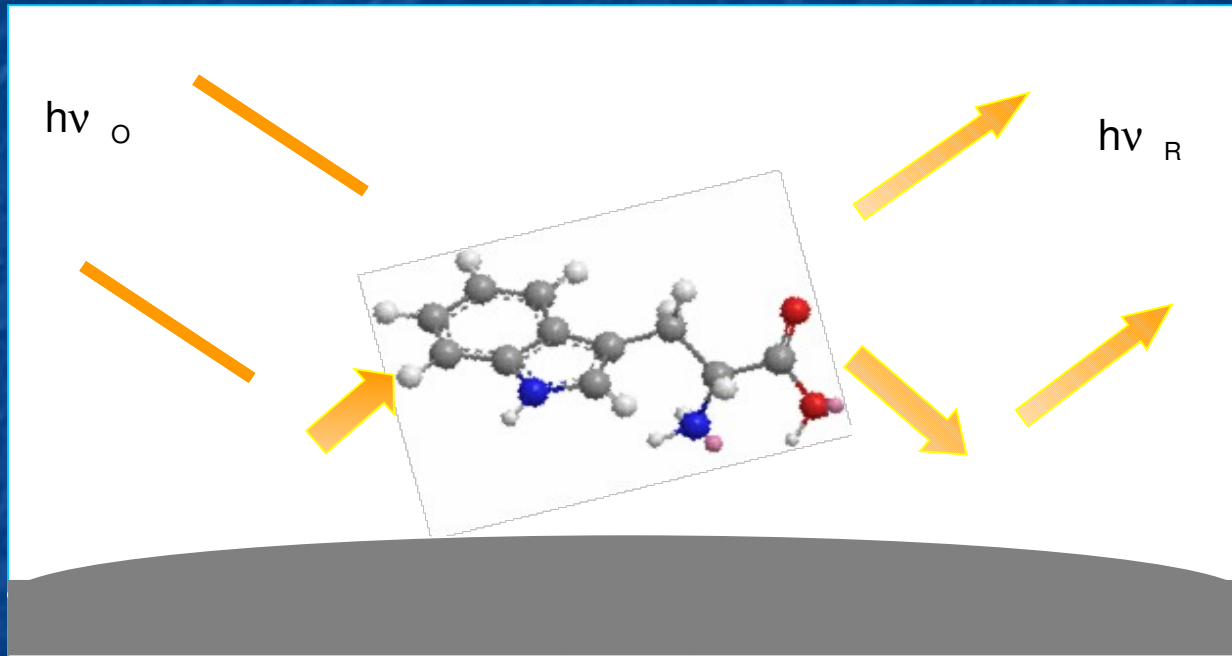


ESPECTROSCOPIA RAMAN

AMPLIFICADA POR SUPERFICIE

- **Raman permite el estudio de materiales biológicos en condiciones fisiológicas.**
- **Alta intensidad puede ser alcanzada por SERS, donde el analito es puesto sobre la superficie de una nanopartícula metálica, amplificando las señales en 10^6 - 10^8 y en algunos casos a 10^{15} .**

ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL AMPLIFICADA POR SUPERFICIE



$$I = I_0 \times 10^6$$

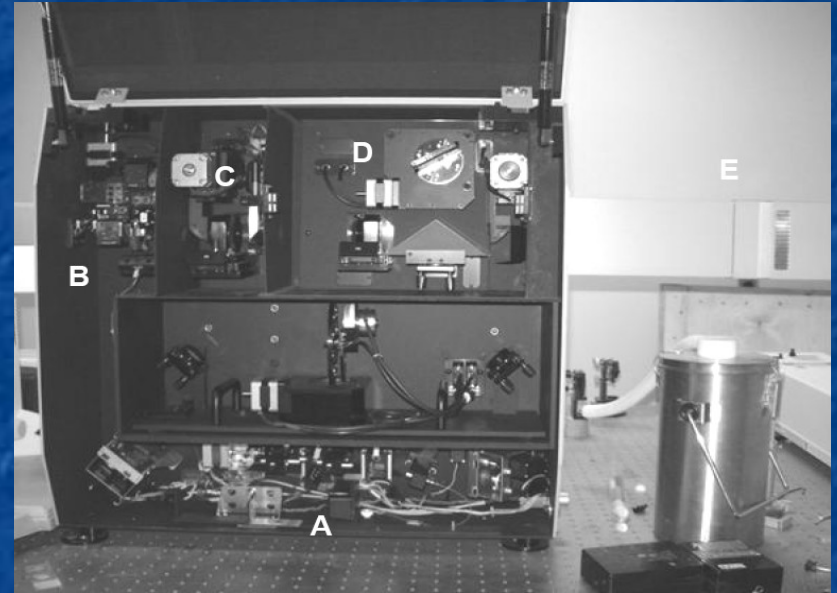
Características del efecto:

- Alta sensibilidad: aumento de la sección eficaz Raman.
- Atenuación de la fluorescencia.
- Mayor efecto cerca de la superficie.

Ventajas de SERS:

- **Minima preparación de muestra**
- **Alta resolución espacial en el caso de microscopía Raman**
- **Detección de una molécula (ppm–ppb, atomomol), bajas concentraciones en solución acuosa**
- **Bajo poder de laser ($100 \mu W$ y $10 mW$), capacidad no invasiva sobre la muestras**
- **Alta sensibilidad, sencibilidad a pequeños cambios estructurales**
- **Rapida capacidad de detección**
- **Espectro único para un analito en matrices complejas**

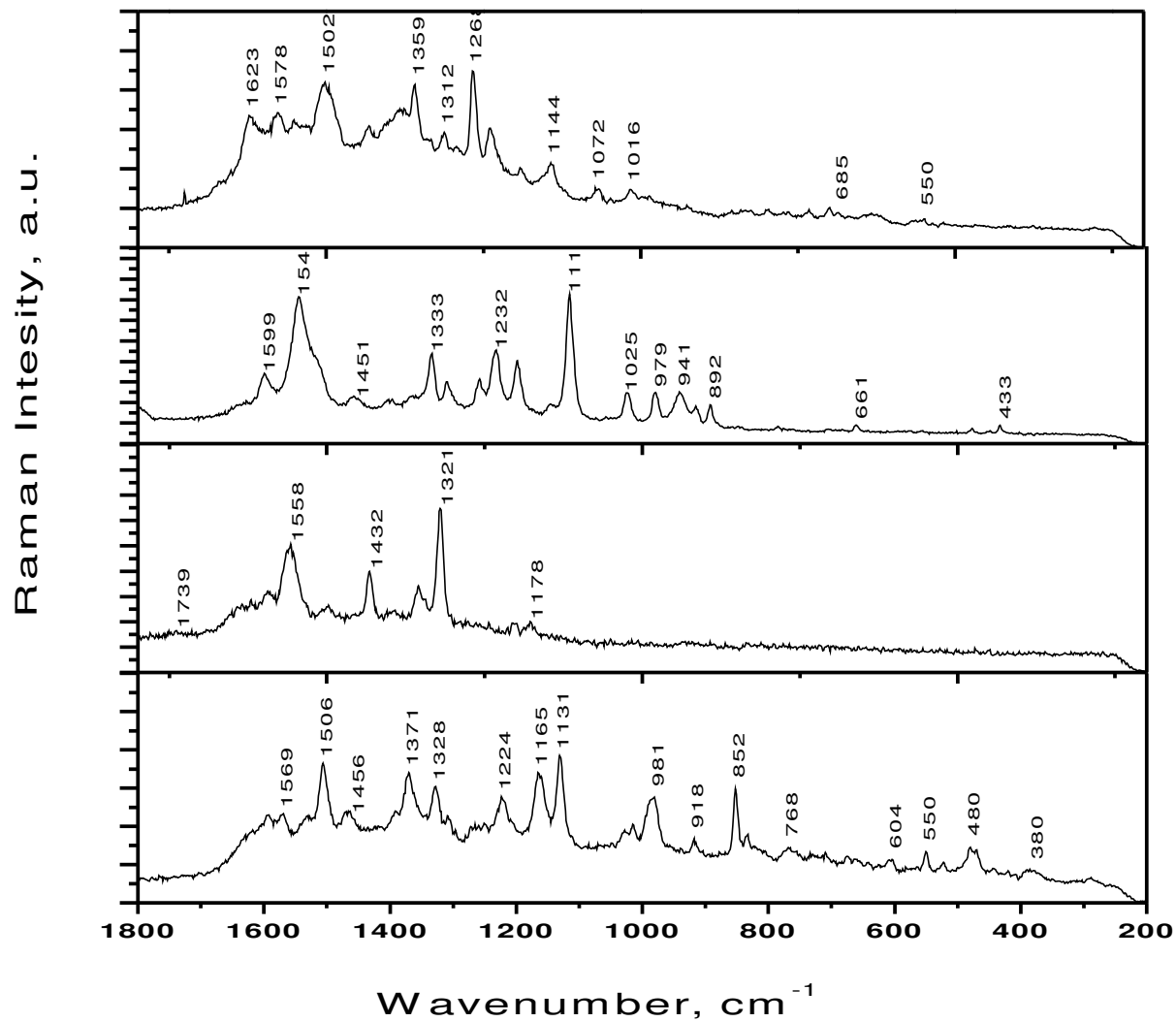
EQUIPO RAMAN LABORATORIO DE ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL



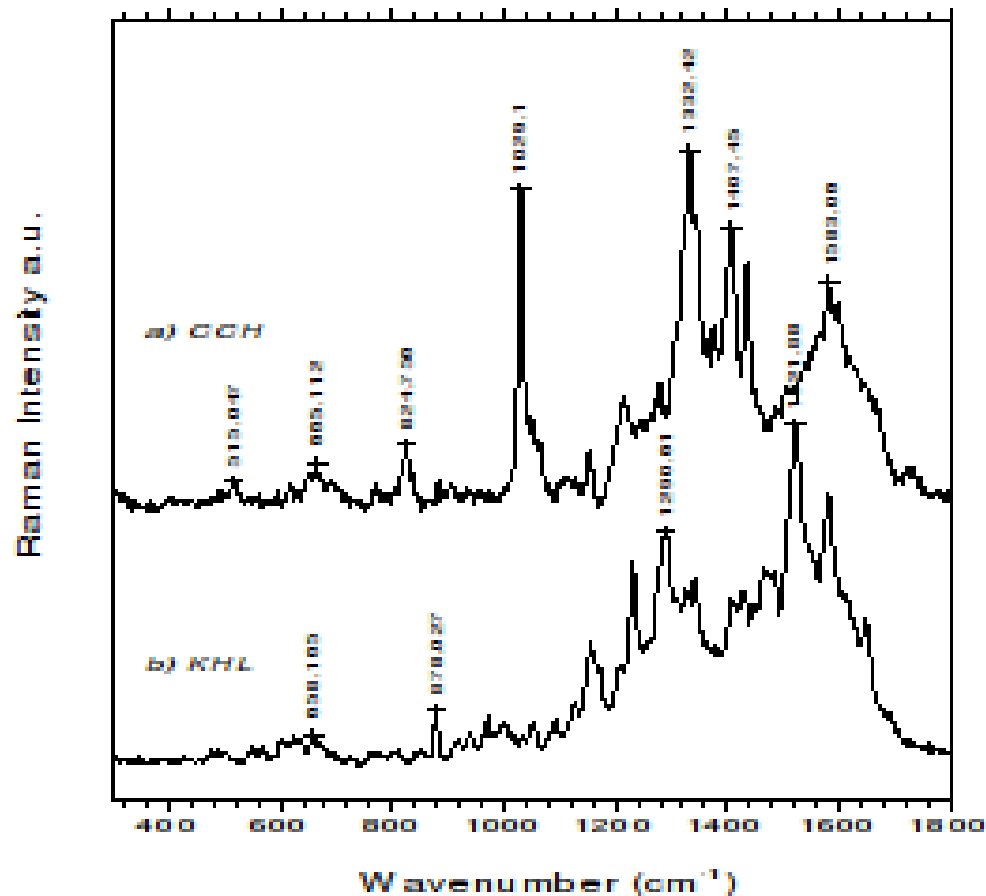
Espectrometro Micro-Raman Renishaw laser 514 nm y 633 nm.
Detector CCD.

**ESTUDIOS SOBRE MATERIAL
BIOLOGICO EN EL
LABORATORIO
DE ESPECTROSCOPIA
VIBRACIONAL**

Espectros SERS del aminoacido lisina sobre coloide de Ag medido en distintos tiempos



SERS proteínas azules de cobre *concholepas concholepas y megathura crenulata*

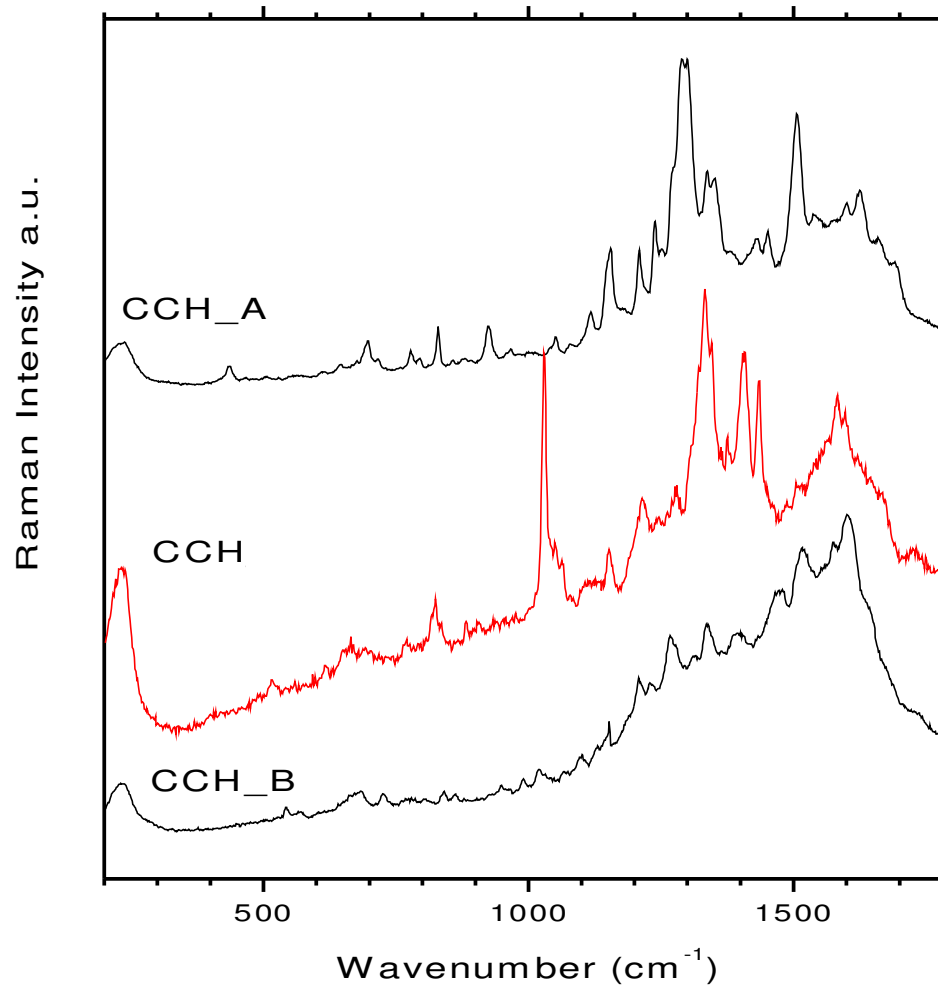


1436, 1407, 1332,
1029 cm⁻¹ Trp

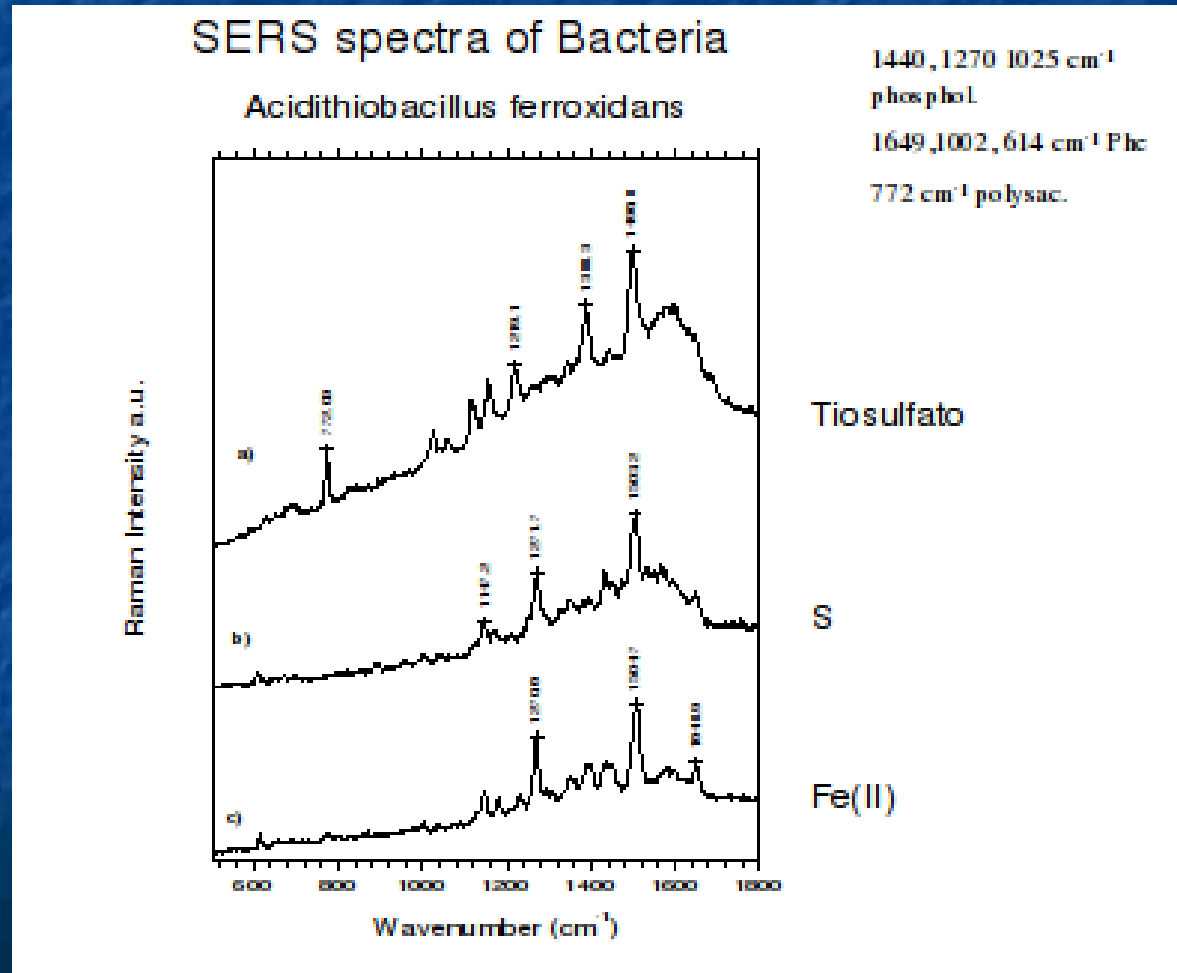
665, 515 cm⁻¹ Cys
1524 cm⁻¹ Hys

Conformational diff.

- **Difrenciación de las sub-unidades A and B fueron tambien identificadas, concluyendo que la sub-unidad A es responsable de la actividad inmunogenica**



Bacterias genéticamente modificadas para los procesos de lixiviación de metales. Los espectros de las membranas muestran diferencias según el medio en que se desarrollan



- **ESPECTROSPÍA RAMAN AMPLIFICADA POR SUPERFICIE**

TEJIDOS HUMANOS

ONDAS DE CHOQUE

- **Nosotros proponemos en términos de hipótesis, que estos procesos estarían relacionados a aspectos estructurales resultado de cambios biomecánicos, originados por las Ondas de Choque.**
- **Las herramientas utilizadas para este estudios son: Espectroscopía Raman y Raman amplificados por superficie metálica (SERS)**

PROPOSICION

- **Sobre la base de los conceptos anteriores, nos proponemos a través de la espectroscopia vibracional, dar algunas luces acerca de los sistemas biológicos y los mecanismos que participan en los procesos bioquímicos, como resultado del tratamiento de ondas de choque en Medicina**

RESULTADOS

- **Es fundamental para identificar los espectros de cada producto químico, especies que coexisten en la muestra biológica**
- **Una base de datos con las especies más comunes debe ser construido**

Estudio Raman Y SERS de Componentes aislados

- Colágeno
- Aminoácidos: Prolina, Hidroxiprolina, Glicina, Hidroxiglicina, Alanina.

¿Por qué Raman y SERS?

Hay bases de datos para las frecuencias de vibraciones Raman pero muy poco para SERS

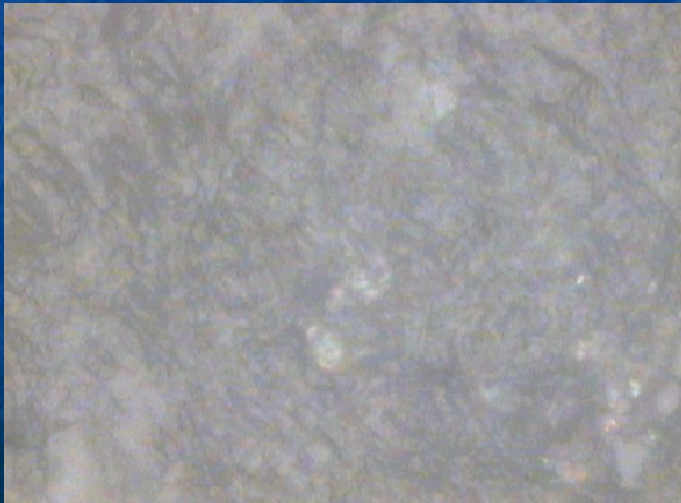
Primeras Imágenes de tejidos



a = Coloide de Plata preparado con borohidruro



b = Coloide de Oro preparado con citrato



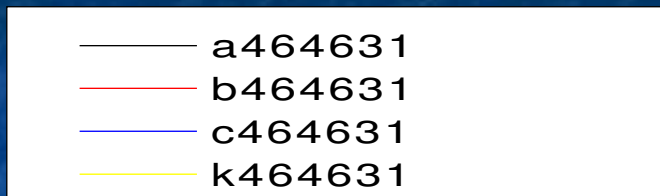
c = Coloide de Plata preparado con citrato



k = Muestra sin coloide

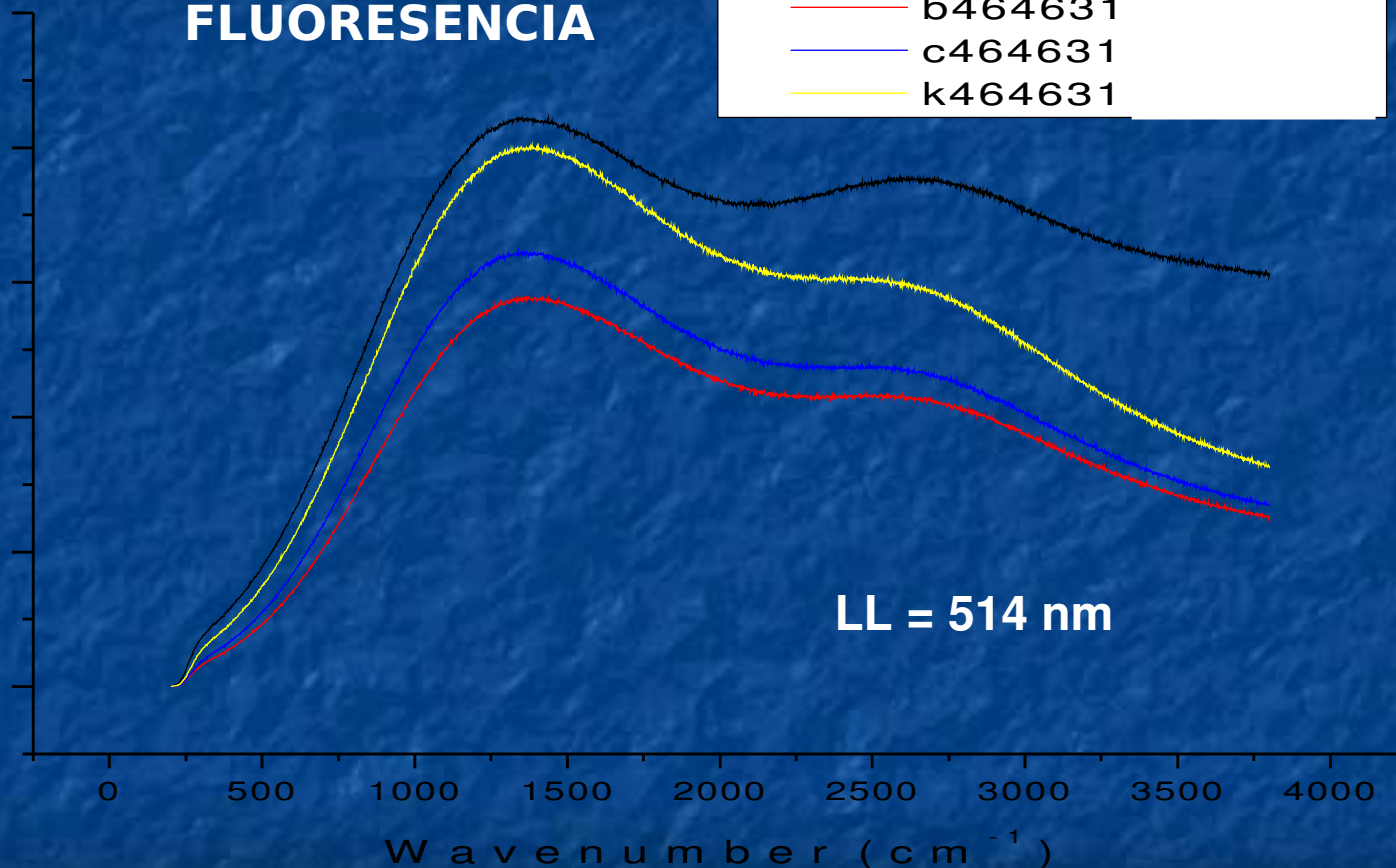
Muestra 46463, biopsia de manguito rotador

FLUORESENCIA



Condiciones:

A = 1
T = 10 s
L = 25 % Sb
Obj = 50x



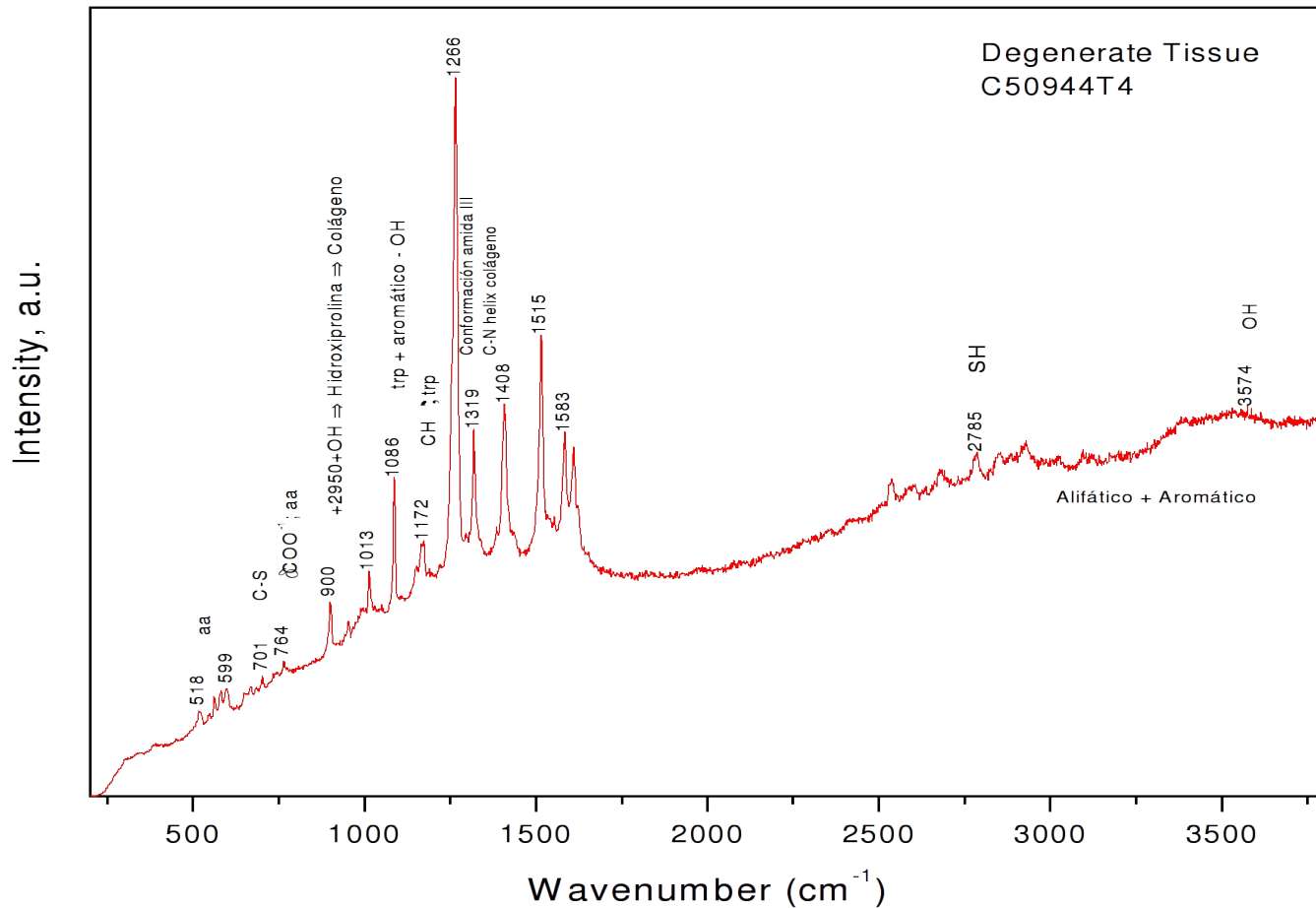
a = Coloide de Plata preparado con borohidruro
b = Coloide de Oro preparado con citrato
c = Coloide de Plata preparado con citrato
k = Muestra sin coloide

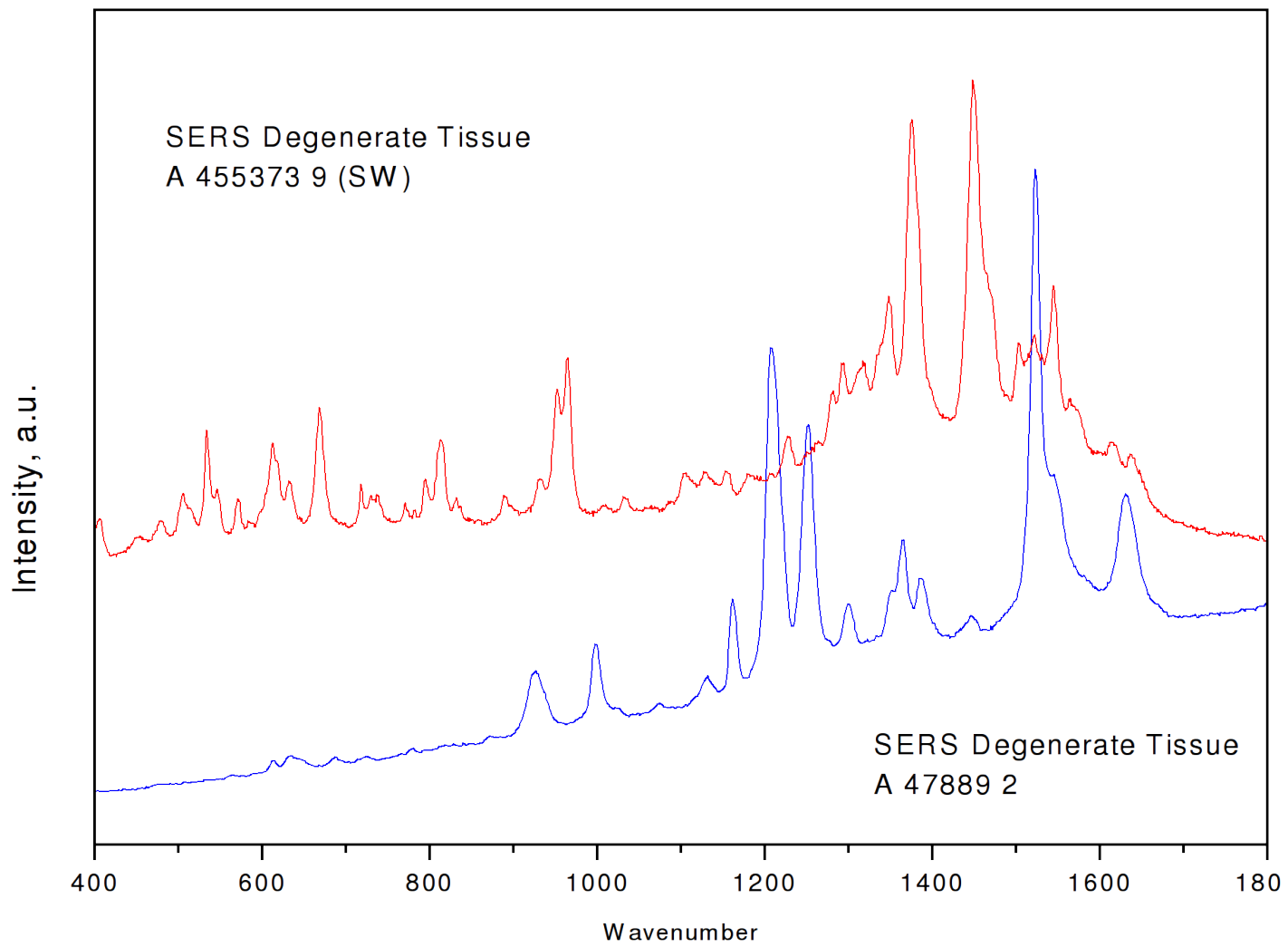
Imágenes muestra 46463



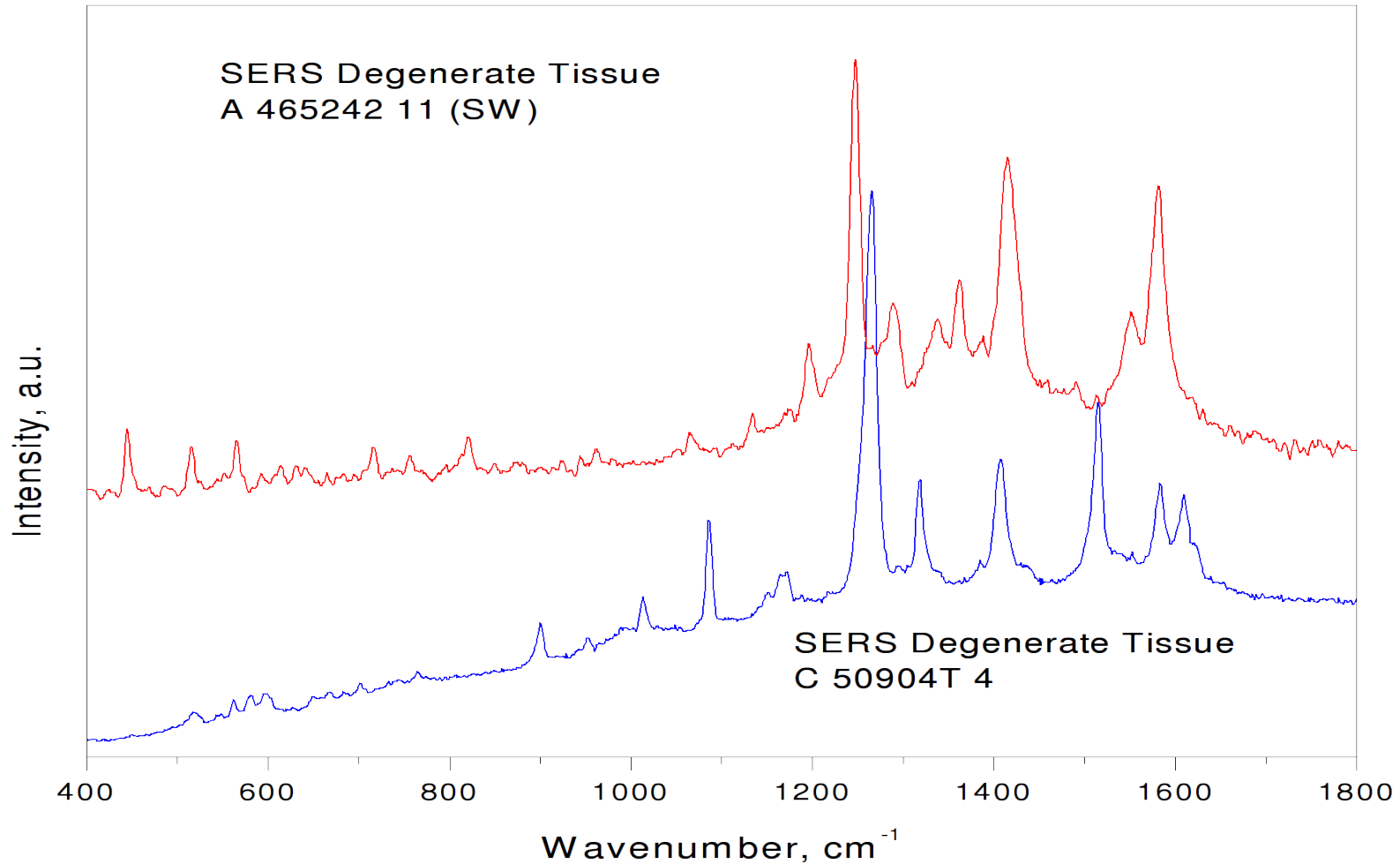
a = Coloide de Plata preparado con borohidruro

Hemos registrado más de 1000 espectros de 52 biopsias preparadas. Este espectro muestra que coexisten varios materiales biológicos. Hemos identificado proteínas, aminoacidos, fosfolipidos y particularmente colágeno.



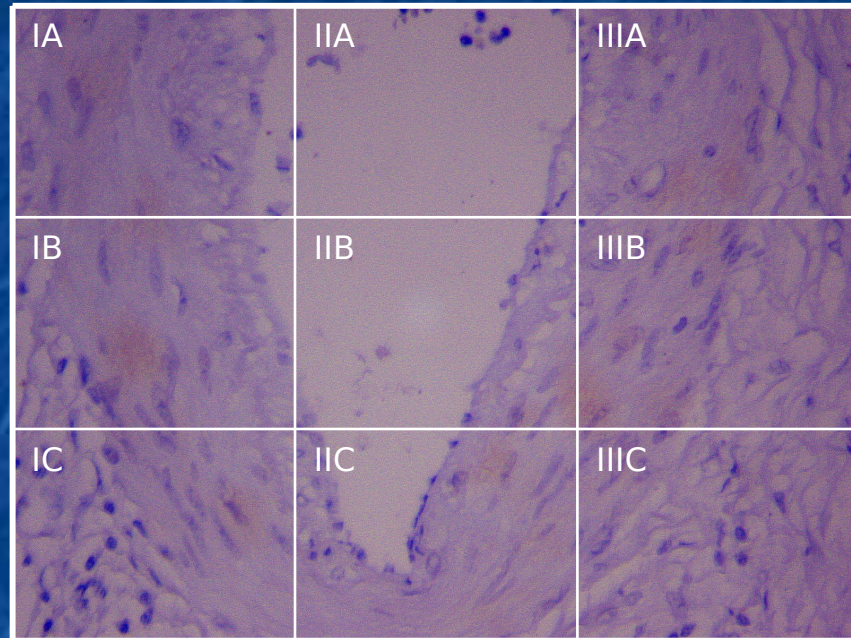


Las principales diferencias son más bien relacionadas con aspectos conformacionales de proteínas principalmente de colágeno.



¿Como estudiar el colágeno en una matriz tan compleja como un tejido?

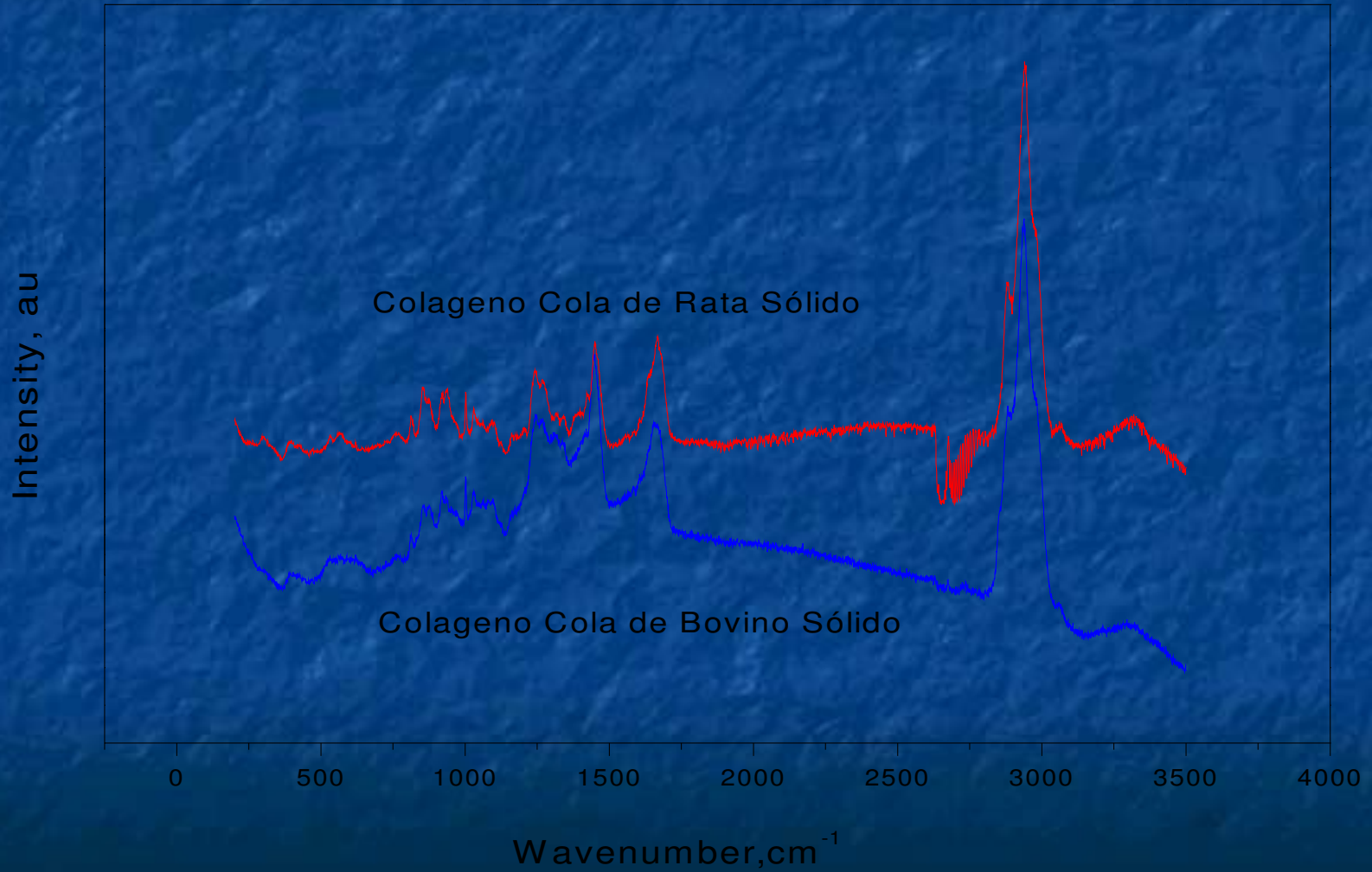
- **Mapa histologico**



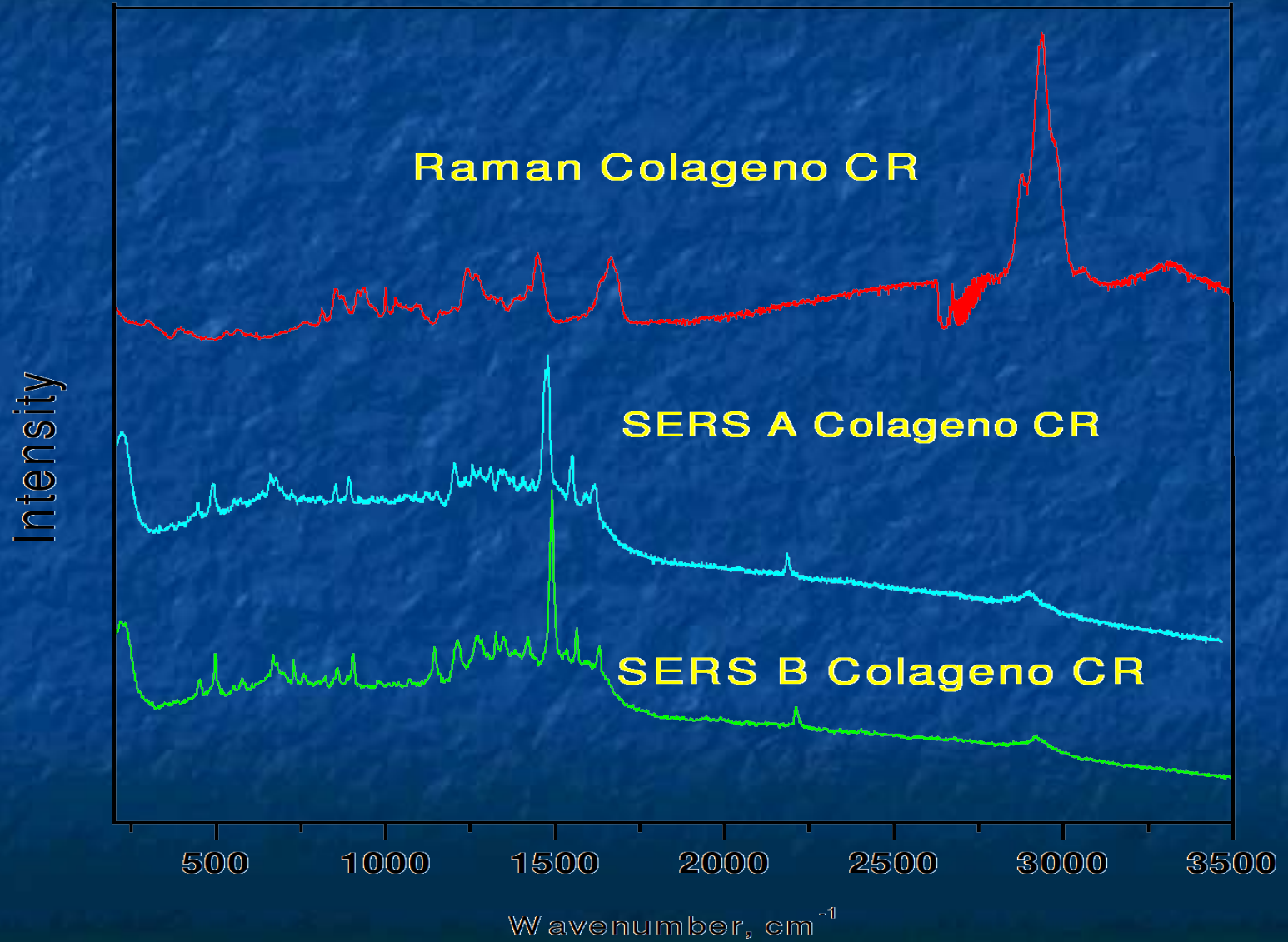
- **La técnica de inmuno-histoquímica nos dará una información adicional sobre el lugar y la composición de la muestra de tejido. En ese lugar determinado haremos un espectro SERS del ya reconocido sistema molecular.**

Lo que hemos hecho:

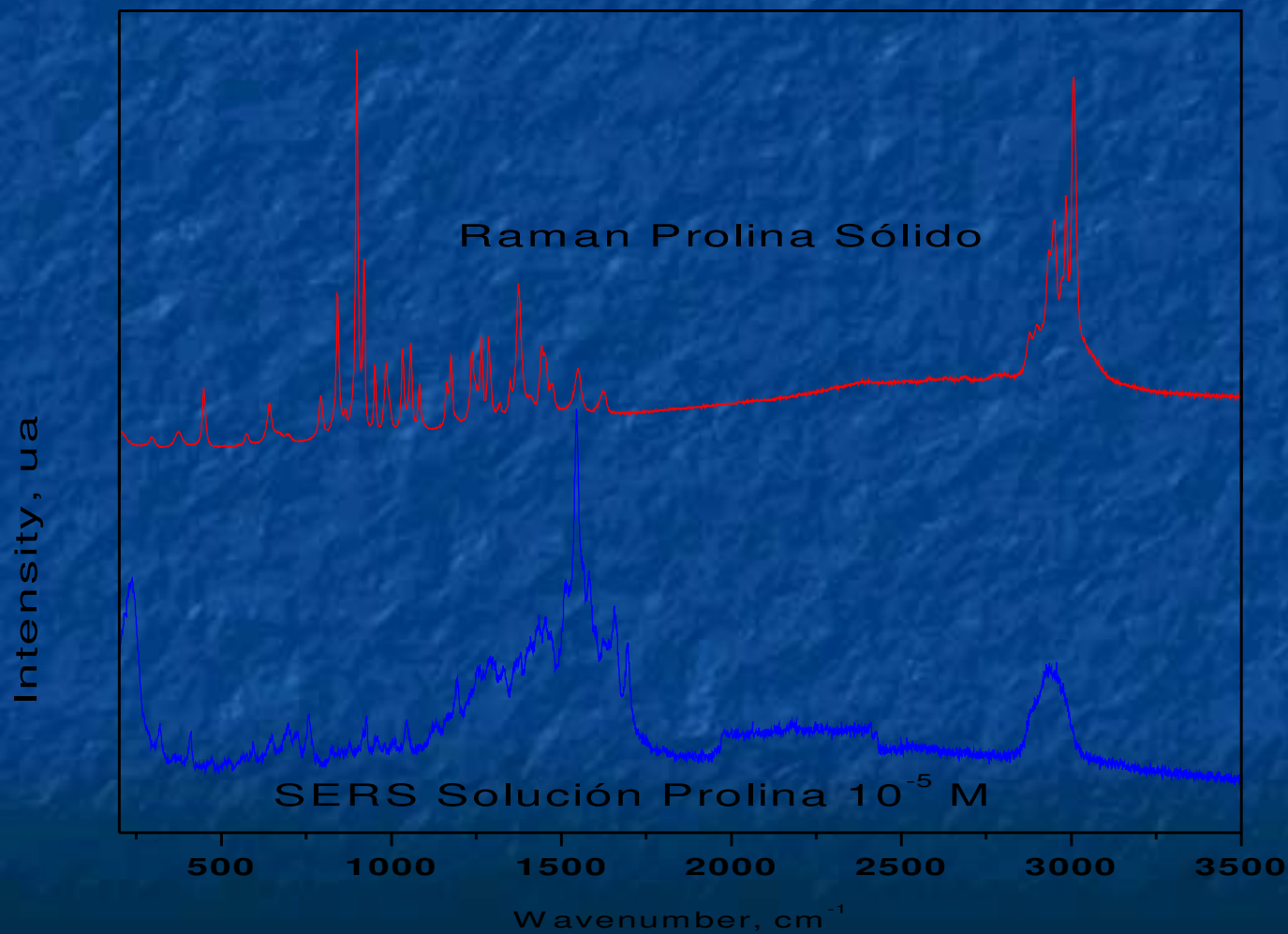
Raman Colágeno



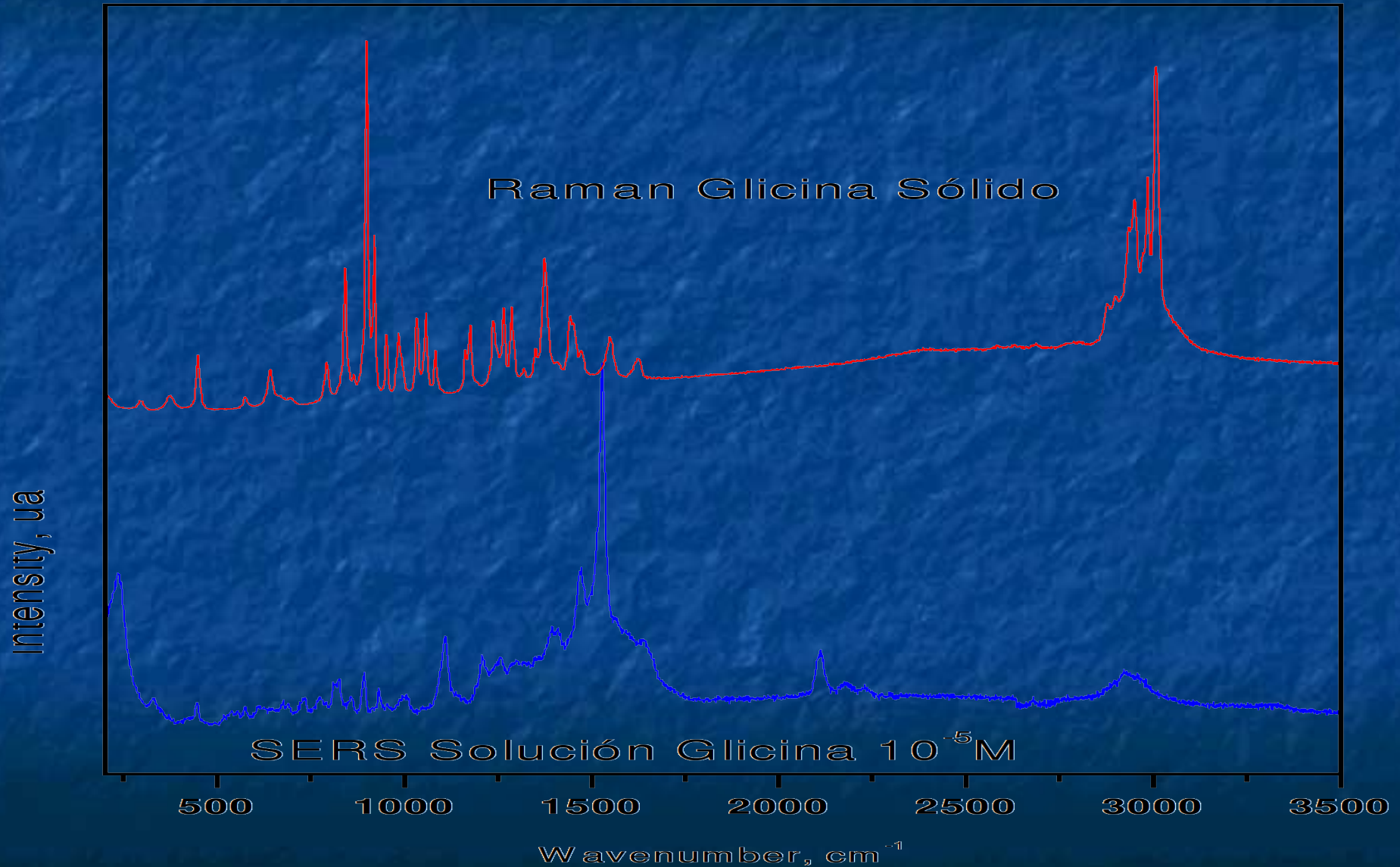
Raman y SERS Colágeno CR



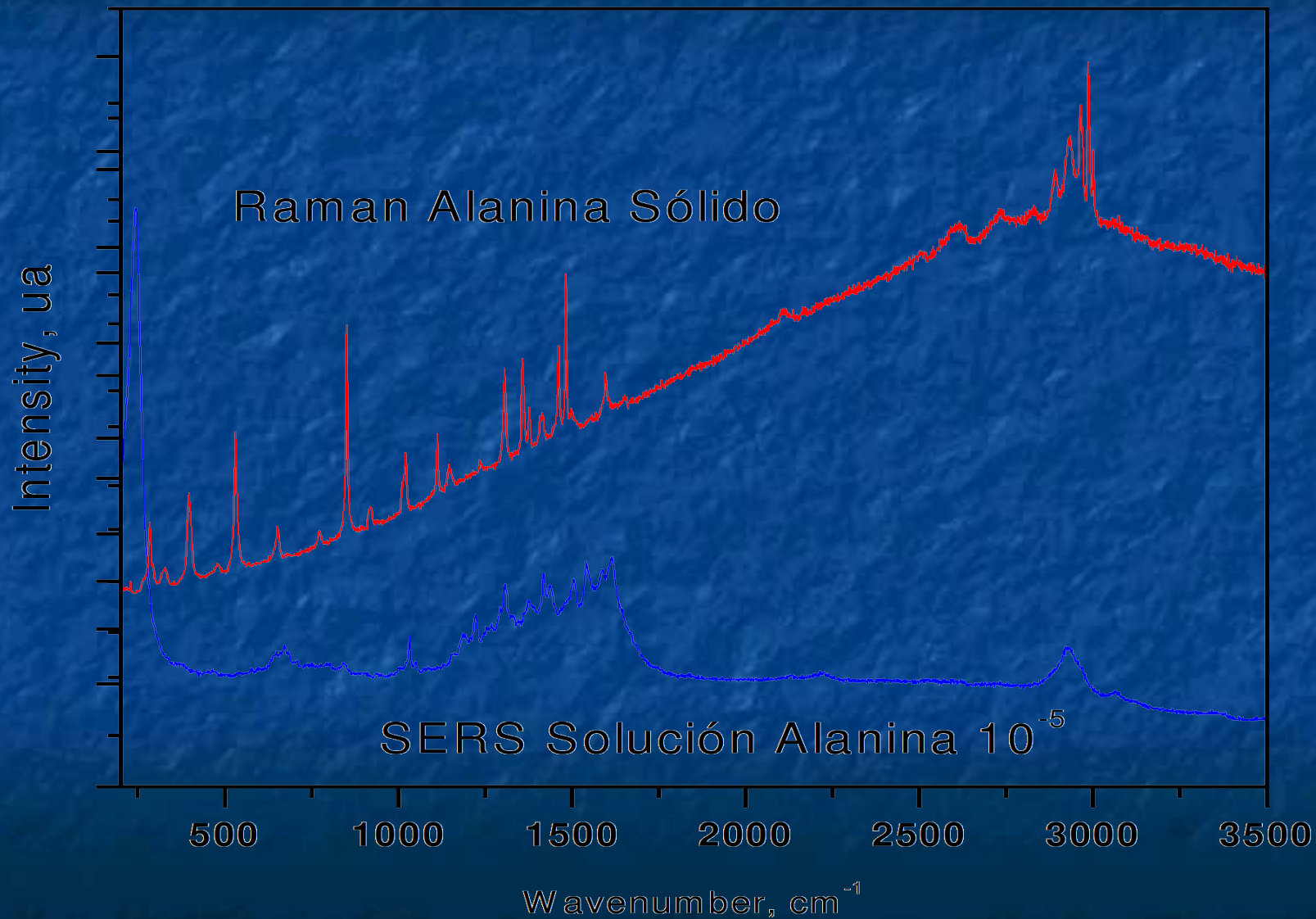
Raman y SERS Prolina



Raman y SERS Glicina



Raman y SERS Alanina



Próximos Pasos

- Construcción de bases de datos con los componentes individuales
- Análisis y asignación de todos los espectros obtenidos.
- Procesamiento estadístico de los datos espectrales
- Mapping de tejidos

Por último, estamos aún lejos de proponer mecanismos bioquímicos que expliquen los buenos resultados observados después de aplicar el tratamiento de Ondas de Choque

