



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Estudio de la Eficacia de Bioestimulantes en un
Modelo Animal de Exéresis Cutánea en
Ratón SKH1/CR Inmunocompetente**

D. Carlos Soler Tornero

2019

**ESTUDIO DE LA EFICACIA DE BIOESTIMULANTES EN UN MODELO
ANIMAL DE EXÉRESIS CUTÁNEA EN RATÓN SKH1/CR
INMUNOCOMPETENTE**

AUTOR:

CARLOS SOLER TORNERO

DIRECTORES:

PÍA LÓPEZ JORNET

FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. PIA LOPEZ JORNET , Catedrática de Universidad del Área de Estomatología en el Departamento de Departamento de DERMATOLOGIA,ESTOMATOLOGÍA,MEDICINA FISICA Y RADIOLOGÍA ,
AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "ESTUDIO DE LA EFICACIA DE BIOESTIMULANTES EN UN MODELO ANIMAL DE EXÉRESIS CUTÁNEA EN RATÓN SKH1/CR INMUNOCOMPETENTE", realizada por D. Carlos Soler Tornero, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 23 de Julio de 2019



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Francisco Martínez Díaz , Profesor Titular de Universidad del Área de Anatomía Patológica en el Departamento de Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "ESTUDIO DE LA EFICACIA DE BIOESTIMULANTES EN UN MODELO ANIMAL DE EXÉRESIS CUTÁNEA EN RATÓN SKH1/CR INMUNOCOMPETENTE", realizada por D. Carlos Soler Tornero, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 23 de Julio de 2019

Mod:T-20



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Aníbal Nieto Díaz, Catedrático de Universidad del Área de Obstetricia y Ginecología y **Presidente Comisión Académica programa doctorado *** en Ciencias de la Salud, INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral titulada "ESTUDIO DE LA EFICACIA DE BIOESTIMULANTES EN UN MODELO ANIMAL DE EXÉRESIS CUTÁNEA EN RATÓN SKH1/CR INMUNOCOMPETENTE", realizada por D. Carlos Soler Tornero, bajo la inmediata dirección y supervisión de D^a. M^a. PÍA LÓPEZ JORNET y D. FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ, esta Comisión Académica, en sesión celebrada en fecha 16 de septiembre de 2019, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.

Murcia, a 16 de septiembre de 2019

Firmado con certificado electrónico reconocido.
La información sobre el firmante, la fecha de firma y el código de verificación del documento se encuentra disponible en los márgenes izquierdo e inferior

Doctorando: D. Carlos Soler Tornero

**Informe del Departamento para alumnos del RD 778/1998.*

**Informe de La Comisión Académica del Programa para alumnos del RD 56/2005 y RD 1393/2007.*



Mod: T-40

Código seguro de verificación: RUxFMq0I-6rkjGqUm-r98fXmGD-12ONcGfY

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Pía López Jornet, por introducirme en el mundo de la investigación, abriéndome las puertas del departamento de Medicina Bucal, depositándome su confianza y brindándome todos sus conocimientos para la confección de la presente tesis.

Al Dr. Francisco Martínez Díaz por su apoyo, no solo para la realización de las pruebas de anatomía patológica, sino también por las dosis de autoestima y seguridad que inyecta en forma de palabras cada vez que se mantiene una charla con él.

A mi familia y amigos, especialmente a mis padres y hermano, los cuales han sido y serán siempre una gran fuente de ayuda.

A todos aquellos miembros del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) por su paciencia y colaboración.

Y en especial a mi pareja, Juani, por su incansable apoyo en la elaboración del presente trabajo y en todos los aspectos de la vida.

ÍNDICE

RESUMEN	11
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	14
1.1. LA PIEL.....	15
1.1.1. Concepto y funciones	15
1.1.2. Anatomía (figura 2).....	16
1.1.2.1. Epidermis.....	16
1.1.2.2. Dermis	19
1.1.2.3. Hipodermis	20
1.2. RUPTURA DE LA INTEGRIDAD DE LA PIEL: HERIDA.....	21
1.3. CICATRIZACIÓN	21
1.3.1. Concepto.....	21
1.3.2. Fases de la cicatrización (figura 4)	23
1.3.2.1. Fase inflamatoria.....	23
1.3.2.2. Fase proliferativa	25
1.3.2.3. Fase de remodelación.....	26
1.3.3. Principales factores de crecimiento y citoquinas que intervienen en el proceso de reparación de las heridas.....	29
1.3.4. Manejo de las heridas cutáneas.....	32
1.3.5. Tratamientos actuales para la curación de heridas.	33
1.3.5.1. Agentes antimicrobianos	33
1.3.5.2. Apósitos.....	33
1.3.5.3. Injertos y sustitutos de la piel.....	34
1.3.5.4. Factores de crecimiento y citoquinas.....	35
1.3.5.5. Terapia por presión negativa.....	35
1.3.5.6. Plasma rico en plaquetas.	36
1.3.5.7. Oxígeno hiperbárico.	36
1.3.5.8. Terapia fotodinámica.	36
1.3.6. Principales sustancias empleadas en la curación de heridas.....	37
1.3.6.1. Sustancias naturales	37
1.3.6.1.1. Aloe vera.....	37

1.3.6.1.2.	<i>Quitosano</i>	38
1.3.6.1.3.	<i>Calendula officianalis</i>	38
1.3.6.2.	Fármacos	39
1.3.6.2.1.	<i>Nanopartículas de plata</i>	39
1.3.6.2.2.	<i>Ácido hialurónico</i>	40
1.3.6.2.3.	<i>Fenitoína</i>	40
1.4.	ELASTINA	41
1.5.	MODELO DE CICATRIZACIÓN EXCISIONAL EN RATONES	42
2.	HIPÓTESIS	45
3.	OBJETIVOS	45
3.1.	Objetivo general	45
3.2.	Objetivos específicos	45
4.	MATERIAL Y MÉTODOS	47
4.1.	Modelo Animal	47
4.2.	Protocolo experimental.	48
4.2.1.	Aclimatación, aleatorización e identificación.	48
4.2.2.	Realización de las lesiones.	49
4.2.3.	Obtención de registros preliminares.	50
4.2.4.	Tratamiento.	50
4.2.5.	Estudio clínico.	50
4.2.5.1.	Resumen de los procedimientos	50
4.2.5.3.	Muestreos.	57
4.2.5.3.1.	<i>Control de la salud y el estado físico de los animales</i>	57
4.2.5.3.2.	<i>Estudio macroscópico</i>	57
4.2.5.3.3.	<i>Registro ecográfico</i>	58
4.2.5.3.4.	<i>Registro histológico. Procedimiento de eutanasia.</i>	58
4.2.5.4.	Análisis de los registros.	58
4.2.5.4.1.	<i>Análisis de los registros fotográficos</i>	58
4.2.5.4.2.	<i>Análisis de los registros ecográficos.</i>	59
4.2.5.4.3.	<i>Estudio histopatológico</i>	60
4.2.5.4.5.	<i>Análisis estadístico</i>	63
5.	RESULTADOS	65
5.1.	Estado de salud y bienestar de los animales.	65
5.2.	Estudio macroscópico.	66

5.3. Análisis imágenes ecográficas modo B	71
5.4. Análisis imágenes ecográficas eco-Doppler.....	75
5.5. Estudio variables evolución histológica del proceso de cicatrización.....	78
6. DISCUSIÓN	90
7. CONCLUSIONES.....	100
BIBLIOGRAFÍA	101
ANEXOS	119

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1: Funciones de la piel	16
Ilustración 2: Anatomía de la piel humana. Fuente: Wikimedia Commons, USGOV (Dominio Público).....	20
Ilustración 3: Clasificación de las heridas según su espesor. Fuente: Da et al. Progress in development of bioderived materials for dermal wound healing. 2017	21
Ilustración 4: Etapas de la cicatrización de la piel. Fuente; Da et al. Progress in development of bioderived materials for dermal wound healing. 2017	23
Ilustración 5: Esquema de las fases de la cicatrización y los mecanismos y factores implicados....	28
Ilustración 6: Distribución de los animales para el estudio	47
Ilustración 7: Los animales estuvieron expuestos a un ciclo foto-período-luz-oscuridad de 12-12 horas, con una temperatura media de 22º C y una humedad relativa de 40-70%.....	48
Ilustración 8: Código numérico para la identificación de los ratones mediante la realización de muescas en las orejas.....	49
Ilustración 9: Aleatorización de los ratones según el compuesto a utilizar	51
Ilustración 10: Realización de las exéresis cutáneas con punch de 4 mm en la zona dorsal de los animales el día 0 del estudio.....	53
Ilustración 11: Preparación e identificación de los bioestimulantes a utilizar según el compuesto y la concentración	53
Ilustración 12: Aplicación de los productos en las zonas de lesión utilizando para ello un hisopo de algodón estéril.....	54
Ilustración 13: Toma de fotografías junto a regla milimetrada para la valoración del aspecto macroscópico de las heridas	54
Ilustración 14: Sedación de los animales en una cámara con gas de isoflurano previa a la toma de registros ecográficos	55
Ilustración 15: Registro ecográfico de las lesiones cutáneas mediante un ecógrafo	55
Ilustración 16: Eutanasia de los animales utilizando una cámara de CO2	56
Ilustración 17: Toma de muestras de la histológicas de las zonas de lesión	56
Ilustración 18: Preparación de los cortes histológicos para su posterior análisis histológico e inmunohistoquímico.	57
Ilustración 19: Perímetro y área de la lesión	59
Ilustración 20: Perímetro de la lesión obtenido mediante ecografía modo B	60
Ilustración 21: Vascularización de la zona de la lesión obtenida mediante ecografía Doppler.....	60
Ilustración 22: tabla estadística comparación del peso de los animales	66
Ilustración 23: tabla estudio macroscópico a los tres días	66
Ilustración 24: tabla análisis del estudio macroscópico a los tres días	67
Ilustración 25: tabla estudio macroscópico a los siete días	67
Ilustración 26: tabla análisis del estudio macroscópico a los tres días	68
Ilustración 27: tabla estudio macroscópico a los catorce días.....	69
Ilustración 28: tabla análisis del estudio macroscópico a los catorce días	69
Ilustración 29: Secuencia de imagen macroscópica en los distintos tiempos de estudio y grupos.	71
Ilustración 30: Resultados de la ecografía modo B.	72
Ilustración 31: Análisis estadístico de la ecografía modo B.	72
Ilustración 32: Resultados perímetro ecográfico modo B.....	73
Ilustración 33: Análisis estadísticos de los resultados ecografía modo B	74

Ilustración 34: Secuencia de imágenes ecográficas modo B en los distintos tiempos de estudio ..	75
Ilustración 35: Resultados de la ecografía Doppler.....	76
Ilustración 36: Análisis estadístico de los resultados de la ecografía doppler.....	77
Ilustración 37: Secuencia de la imagen ecográfica doppler en los distintos tiempos y diferentes grupos.....	78
Ilustración 38: Resultados histológicos día tres	79
Ilustración 39: Análisis estadístico resultados histológicos día tres	79
Ilustración 40: Resultados histológicos día siete.....	80
Ilustración 41: Análisis estadístico de las variables histológicas día siete	80
Ilustración 42: Resultados del análisis microscópico día catorce	81
Ilustración 43: Análisis estadístico de las variables microscópicas día catorce	81
Ilustración 44: Tinción hematosilina-eosina	82
Ilustración 45: Estudio histopatológico.....	83
Ilustración 46: Ratón 4 del grupo 1 (Elastina 50% día 3). Se observa costra serohemática con gran infiltrado inflamatorio, bajo la cual hay tejido de granulación con abundantes fibroblastos secretores.....	83
Ilustración 47: Ratón 0 del grupo 1 (Elastina 50% día 3). Podemos observar la ruptura de la red colágena dérmica en los márgenes de la herida (fucsia), así como de la capa muscular (fibras amarillas abajo izquierda), que son sustituidas por tejido de granulación. EVG 10x.	84
Ilustración 48: Ratón 0 del grupo 1 (Elastina 50% día 3). No se observan gran cantidad de nuevos vasos. CD 34 10x.....	84
Ilustración 49: Ratón 0 del grupo 5 (Elastina 25% día 7). Las células del infiltrado son positivas, pero en la epidermis (delimitada por las líneas azules), el marcaje es leve/moderado. PCNA 10x.	85
Ilustración 50: Ratón 3 del grupo 5 (Elastina 25% día 7). En ocasiones, el tejido de granulación presentaba una importante hiperplasia de folículos dilatados, entre los que se encontraban abundantes fibroblastos de morfología estrellada y presencia de matriz extracelular. El infiltrado inflamatorio se observaba predominantemente bajo la costra (flecha). HE 10x.	85
Ilustración 51: Abundantes vasos (flechas naranjas), infiltrado (flecha negra) y folículos pilosos dilatados (flecha azul). HE 10x	86
Ilustración 52: En estadios intermedios de curación, es cuando se ha observado mayor cantidad de vasos, como puede apreciarse en esta imagen perteneciente al ratón 3 del grupo 5 (Elastina 25% día 7). CD 34 10x.....	86
Ilustración 53: Positividad intensa para PCNA en el ratón 4 del grupo 8 (HP 50% día 7). 10	87
Ilustración 54: Se observa reepitelización completa, con retracción cutánea. Todavía hay hiperplasia folicular y algo de infiltrado. Ratón 2 grupo 8 (HP 50% día 7). HE 10x.	87
Ilustración 55: Aunque el marcaje es intenso en células mesenquimales e inflamatorias, en la epidermis (entre líneas), empieza a ser normal. Ratón 2 grupo 8 (HP 50% día 7). PCNA 10x.....	88

RESUMEN

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano y constituye una barrera eficaz contra diferentes tipos de agentes externos. Cuando hay una ruptura de la integridad de esta barrera se produce una herida. En la actualidad hay una fuerte demanda de productos de origen natural para el tratamiento de las lesiones cutáneas. El objetivo del presente estudio fue probar la eficacia de dos compuestos bioestimulantes constituidos por elastina e hidrólisis pulmón-pepsina a diferentes concentraciones en la curación de las heridas. Para ello se llevó a cabo un estudio prospectivo de 14 días de duración utilizando ratones SKH-1.

A los animales se les realizó exéresis cutáneas en la zona dorsal utilizando para ello un punch de 4 mm de diámetro. Cada día fueron aplicados los productos directamente sobre la herida, y se realizaron valoraciones macroscópicas, ecográficas, microscópicas e inmunohistoquímicas en los días cero, tercero, séptimo y décimo cuarto del estudio.

A nivel macroscópico, se encuentra a lo largo de todo el estudio una mejoría aparente en todos los grupos. Es en el grupo tratado elastina 25% donde se aprecia una peor cicatrización a los 7 días. Las ecografías modo B del área de la lesión obtenidas son diferentes en los distintos grupos. Un mejor resultado se observó en el grupo 4 (hidrólisis 25%). En cuanto a la ecografía doppler encontramos diferencias estadísticamente significativas en el día 3 del estudio entre los distintos grupos 2 (Elastina 50%) y 4 (hidrólisis 25%), no manteniéndose en los otros períodos del estudio. A nivel histológico, se observan diferencias destacables en la inflamación a los 7 días comportándose mejor el grupo 4 (hidrólisis 25%). La presencia de infiltrado inflamatorio era mayor en las muestras del tiempo de estudio más corto (3 días). La proliferación celular está algo más activa en fases intermedias. Se observó un marcaje leve en el grupo 1 (Elastina 50% 3 días), así como en los grupos 2 (Elastina 50% 7 días) y 13 (Placebo 3 días). Destacaba el tratamiento con HP al 50%, que, en todos los tiempos de estudio, la epidermis mostraba gran actividad proliferativa.

Se hacen necesarios más estudios para poder comprender el papel de los productos del estudio en el proceso cicatricial, así como su posible extrapolación para su uso en humanos.

ABSTRACT

The skin is the largest organ of the human body and constitutes an effective barrier against different types of external agents. When there is a break in the integrity of this barrier, a wound is produced. Nowadays, there is a strong demand for products of natural origin for the treatment of skin lesions. The objective of the present study was to test the efficacy of two biostimulants compounds constituted by elastin and lung-pepsin hydrolysis at different concentrations in the healing of wounds. For this purpose, a 14-day prospective study was carried out using SKH-1 mice.

The animals underwent skin excision in the dorsal area using a 4 mm diameter punch. Each day, the products were applied directly on the wound, and macroscopic, echographic, microscopic and immunohistochemical evaluations were performed on the days zero, third, seventh and fourteenth of the study.

At the macroscopic level, an apparent improvement in all the groups is found throughout the study. It is in the group treated with elastin 25% where it is seen a worse healing at 7 days. The B-mode ultrasounds obtained from the lesion area are different in each group. A better result was observed in group 4 (hydrolysis 25%). Regarding Doppler ultrasonography, we found statistically significant differences on day 3 of the study between the different groups 2 (elastin 50%) and 4 (hydrolysis 25%), not remaining in the other periods of the study. At the histological level, remarkable differences were observed in inflammation at 7 days, with group 4 behaving better (25% hydrolysis). The presence of inflammatory infiltrate was greater in the samples of the shorter study time (3 days). Cell proliferation seems to be more active in intermediate phases. A slight marking was observed in group 1 (elastin 50% 3 days), as well as in groups 2 (elastin 50% 7 days) and 13 (placebo 3 days). Highlighting the treatment with HP at 50% which in all study times the epidermis showed great proliferative activity.

Further studies are necessary to understand the role of the study products in the cicatricial process, as well as its possible extrapolation for its use in humans.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA PIEL

1.1.1. Concepto y funciones

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano y su integridad constituye la primera barrera defensiva del organismo contra diferentes tipos de agentes patógenos, mecánicos y químicos. Es un tejido u órgano heterogéneo que presenta diferencias en sus funciones y estructuras según la localización en el cuerpo ^[1,2]. La piel de los adultos ronda los 2 m² de superficie y tiene un espesor aproximado de 2,5 mm. Constituye alrededor de un 6% del peso total del organismo ^[3].

Entre sus funciones encontramos, además de la ya citada función de barrera, funciones exocrinas (secreción de sebo y sudor) y endocrinas (vitamina D), de homeostasis (regulación de la temperatura corporal, el control del intercambio hídrico con el medio externo), inmunológicas y sensoriales ^[1]. También se le atribuye una función social, mediante la secreción de feromonas que sirven de algún modo como medio de comunicación con otros individuos ^[3]. La piel además posee la capacidad de reconocer, discriminar e integrar varias señales localmente y responder adecuadamente a ellas con el objetivo de mantener la homeostasis del organismo ^[3,5].

Estas funciones están reguladas e integradas dentro de los sistemas inmune, pigmentario, epidérmico y anejo de la piel, que a su vez están en constante comunicación con los sistemas inmune, neural y endocrino sistémicos. De forma resumida se puede decir que, en reacción a los cambios del entorno, la piel puede generar señales que provoquen respuestas rápidas (neurales) o lentas (humorales o inmunes) a niveles locales y sistémicos ^[5].

La piel presenta diferencias fisiológicas e histológicas en las distintas especies animales ^[3].

• Protege al resto del organismo de agentes nocivos externos y regula la temperatura corporal.
• En relación con el sistema esquelético, activa la vitamina D, necesaria para la absorción del calcio y del fósforo que forman parte de los huesos.
• Contribuye al aporte de iones de calcio, necesarios para la contracción muscular.
• Recibe y conduce hacia el sistema nervioso diferentes tipos de sensaciones.
• En relación con el sistema endocrino, ayuda a convertir la vitamina D en la hormona calcitriol, que participa en la absorción del calcio.
• Ciertos cambios locales en la dermis contribuyen a regular el flujo de sangre.
• Participa activamente en la defensa inmunitaria, como barrera física y química y mediante las células de Langerhans y los leucocitos presentes en la dermis.
• Guarda relación con el aparato respiratorio porque los pelos de la nariz filtran las partículas extrañas que pueden penetrar con el aire, y los receptores del dolor pueden alterar el ritmo respiratorio.
• También afecta al digestivo porque la activación de la vitamina D y su transformación en calcitriol hace posible la absorción de calcio en el intestino.
• El riñón transforma la vitamina D en calcitriol. La piel complementa la función excretora de los riñones mediante la producción del sudor.

Ilustración 1: Funciones de la piel

1.1.2. Anatomía (figura 2)

La piel es un órgano compuesto por varias capas o estratos:

1.1.2.1. Epidermis

La epidermis conforma la parte más externa de la piel. Es un epitelio estratificado y no vascularizado. A su vez se subdivide en varios estratos:

- Estrato basal: es la capa más profunda y separada de la dermis por la capa basal o lámina basal. Está unida mediante hemidesmosomas. Presenta queratinocitos con propiedades de células madre mitóticamente activas ^[1] y pequeñas poblaciones de células de Merkel y melanocitos (que son productores de melanina) ^[3].
- Estrato espinoso: es irregular, con células poliédricas que contienen procesos (espinas) que se extienden hacia afuera y contactan con las células vecinas mediante desmosomas ^[1]. Contiene entre ocho y diez capas de queratinocitos con poca capacidad de división junto a células de Langerhans derivadas de la médula ósea ^[6].

- Estrato granuloso: conformado por varias capas (entre tres y cinco) de queratinocitos no mitóticos con forma de diamante que contienen gránulos de queratohialina (precursor de la queratina). Agregan filamentos de queratina presentes en las células córneas ^[1,3]. Los lípidos que son liberados desde los gránulos lamelares en el estrato granuloso son lípidos probarrera que son procesados en espacios extracelulares y posteriormente metabolizados u organizados espontáneamente en múltiples capas ^[3,7].

- Estrato lúcido: solamente está presente en piel gruesa (de palmas de las manos y planta de los pies). Es una capa consistente en eleidina (producto de transformación de la queratina) ^[1].

- Estrato córneo: es la capa más externa, compuesta por queratina y células muertas anucleares (células escamosas). Es la capa cuyo grosor más varía (sobre todo en zonas callosas) ^[1]. Compuesta por entre quince y treinta líneas de células no viables pero bioquímicamente activas llamadas corneocitos unidos por corneodemosomas y rodeados por lípidos que tienen un papel muy importante en la función de barrera de la epidermis. Esta barrera protege de los elementos fisicoquímicos del entorno así como de invasiones microbianas mediante un pH ácido (4-5.5) o la presencia de sustancias con actividad antimicrobiana o antivírica ^[5,7]. Esta capa está continuamente descamándose de forma que elimina productos metabólicos y liberando cada día corneocitos que quizá tengan una carga microbiana o sean dañinos para los elementos de homeostasis locales y sistémicos. Los poros de las glándulas sudoríparas y de los folículos pilosos rompen esta barrera epidérmica y provee de potenciales puntos de entrada de factores externos por un lado y sirviendo como puntos de actividad excretora para proteger la homeostasis local por el otro ^[3,5].

Las principales características de las células de la epidermis son:

- Queratinocitos:
 - Células más predominantes en la epidermis.

- Originados en el estrato basal.
- Producen queratina.
- Forman la barrera hídrica de la epidermis.
- Melanocitos:
 - Derivados de las células de la cresta neural.
 - Productores de melanina.
 - Se encuentran usualmente entre células la capa basal.
 - La melanina se encuentra en el estrato basal y protege de la radiación ultravioleta.
 - De los melanocitos parten unos largos procesos que se extienden entre las células epidérmicas y contactando con ellas. A través de ellos se produce el intercambio de melanina con los queratinocitos basales, mediante un sistema que implica la fagocitosis de partes de estos procesos por parte del queratinocito.
- Células de Langerhans:
 - Células dendríticas.
 - Se encuentran sobre todo en estrato espinoso
 - Origen mesenquimal, derivadas de las células madre de la médula ósea. Son parte del sistema fagocítico-mononuclear.
 - Contienen gránulos de Birbeck
 - Expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad I y II.
 - Toma antígenos en la piel y los transporta al nódulo linfático.
- Células de Merkel:
 - Células epidérmicas modificadas en el estrato basal.

- Función sensorial táctil, más presentes en las yemas de los dedos.
- Unidas a los queratinocitos adyacentes por desmosomas y tienen filamentos intermedios de queratina ^[1].

La epidermis está separada de la dermis por una membrana basal que define la polaridad de la renovación y diferenciación continua del epitelio ^[3].

1.1.2.2. Dermis

Subyacentemente a la epidermis encontramos una capa de tejido conjuntivo llamada dermis. Consiste en dos estratos de tejido conjuntivo que emergen juntos, sin una diferenciación clara:

- Estrato papilar: más externa y fina, compuesta por tejido conjuntivo laxo y contacta con la epidermis.
- Estrato reticular: más profunda y gruesa, con menos contenido de células y consistente en tejido conjuntivo denso o paquetes de fibras colágenas ^[1].

La dermis está conformada en su mayor parte por fibroblastos y fibrocitos, un tipo de células mesenquimales que producen componentes densos de tipo fibroso o elástico, así como proteoglicanos, glicoproteínas, y ácido hialurónico, y la matriz extracelular ^[3]. También aparecen otros tipos celulares mesenquimales, incluidas las células lipídicas, y los sistemas y redes vasculares, neurales y linfáticos, las glándulas excretoras y secretarias (glándulas sebáceas, ecrinas y apocrinas) y las estructuras queratinizantes, incluidos los folículos capilares y las uñas.

Están presentes también los receptores de los nervios sensoriales de los corpúsculos de Meissner (tacto), corpúsculos de Pacini (presión), corpúsculos de Pilo-Ruffini (mecanorreceptores), terminales nerviosos libres que penetran también en la epidermis y los folículos capilares ^[5,7,8].

1.1.2.3. Hipodermis

Por último y bajo la dermis encontramos una capa de tejido adiposo subcutáneo o hipodermis, compuesta de tejido conjuntivo rico en grasa que conecta la dermis a los componentes esqueléticos y alberga las estructuras anexas ^[9]. Los lóbulos grasos que forman la hipodermis están separados por septos fibrosos transversales ricos en la vasculatura y desempeñan una función importante en el aislamiento, amortiguación y almacenamiento de energía. Además, los lechos vasculares profundos y superficiales proveen de oxígeno y factores nutricionales y reguladores a la dermis e hipodermis (y por difusión también a la epidermis). Además, los factores epidérmicos y dérmicos (entre los que se encuentran la vitamina D, citoquinas, leptina, factores de crecimiento, neuropéptidos, hormonas y metabolitos específicos de la piel) pueden pasar a la circulación para ser enviados a otros centros coordinadores del cuerpo ^[5,9,10].

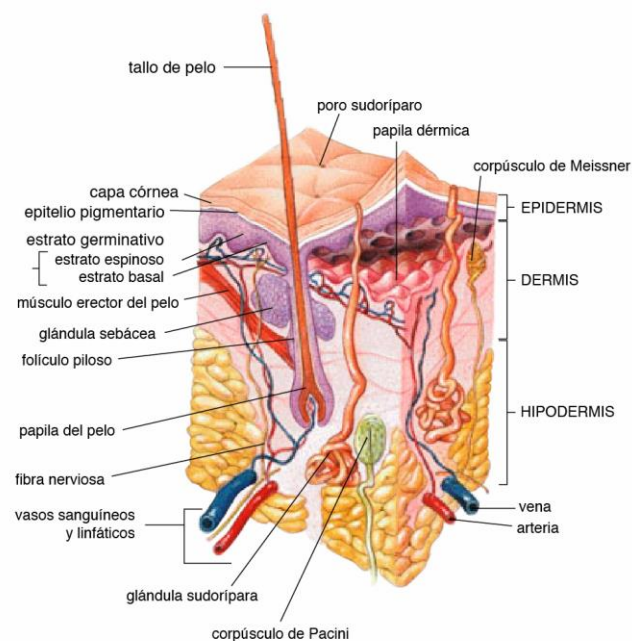


Ilustración 2: Anatomía de la piel humana. Fuente: Wikimedia Commons, USGOV (Dominio Público)

1.2. RUPTURA DE LA INTEGRIDAD DE LA PIEL: HERIDA.

Una herida o lesión cutánea ocurre cuando la integridad física de los tejidos de la piel es alterada por algún estímulo, que puede ser físico, químico, eléctrico o térmico y puede provenir del exterior o ser interno ^[11].

Esta ruptura de la integridad puede alterar algunas funciones de la piel, especialmente la de barrera, y por ello la regeneración o reparación de las heridas juega un papel crítico ^[12]. Las heridas pueden también tienen el potencial de generar cicatrices ^[13]. Estas están compuestas en su mayor parte por tejido conjuntivo y carecen de varios apéndices como glándulas sudoríparas y folículos pilosos ^[14].

Las heridas de la piel pueden ser clasificadas según su espesor como superficiales, de espesor parcial o de espesor completo (figura 2) ^[15]. Según su duración en el tiempo, pueden ser agudas o crónicas ^[14,16].

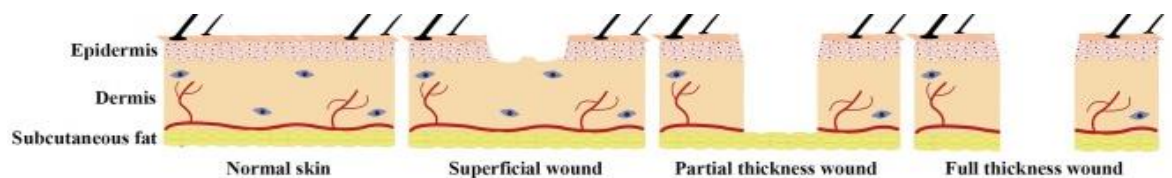


Ilustración 3: Clasificación de las heridas según su espesor. Fuente: Da et al. Progress in development of bioderived materials for dermal wound healing. 2017

1.3. CICATRIZACIÓN

1.3.1. Concepto

La reparación o curación de heridas cutáneas es un proceso complejo que tiene como objetivo la reparación de las estructuras dañadas y consta de varias fases que se solapan, y en las que interactúan de forma organizada diversos factores de crecimiento, citoquinas, quimiocinas así como varios tipos celulares. Cualquier alteración de estos procesos o factores puede dar lugar a la formación de heridas crónicas y formación de tejido de

cicatrización anormal ^[17,18]. Este mecanismo representa una ventaja evolutiva debido a que la curación de heridas es un paso importante para la restauración de las funciones de barrera de la piel que finalizan con el cierre de la herida, ayudando así a la supervivencia del individuo ^[12].

La piel humana ha desarrollado la habilidad de repararse tras una lesión. La formación de tejidos cicatriciales fibróticos es una consecuencia asociada al rápido proceso de curación de la piel ^[13]. Las células responsables de la restauración de la epidermis son los queratinocitos, mediante un proceso llamado reepitelización. La migración, proliferación y diferenciación de fibroblastos y queratinocitos, así como las interacciones entre estos, son claves para una efectiva reepitelización y curación de heridas ^[19].

Las células y los eventos bioquímicos de la reparación de heridas pueden ser divididas en varias fases (figura 4):

- Inflamación
- Proliferación
- Remodelación

Estas etapas no son excluyentes entre sí y suelen solaparse en el tiempo ^[11]. Además, a veces es considerada la coagulación como una fase más de la cicatrización ^[20].

La reparación está usualmente comprometida en individuos con presencia de diabetes, síndrome metabólico, fallo renal crónico y en ancianos, debido a que las capacidades de reepitelización y revascularización rápida están mermadas ^[21]. También ciertos factores externos e internos pueden afectar la calidad y la velocidad de la curación, como son la inmunosupresión, el tabaquismo, uso de corticoides, y otros ^[11].

En estos individuos la aparición de heridas crónicas es posible, siendo las úlceras por presión y las úlceras venosas las formas más frecuentes. Generalmente están relacionadas con una reserva pobre de células madre funcionales ^[17].

De cualquier manera, una herida nunca alcanzará la fuerza elástica máxima de una piel no dañada, y como mucho conseguirá un 70% de esta. Pero la curación devolverá la mayor parte de las funciones de la piel ^[22,23].

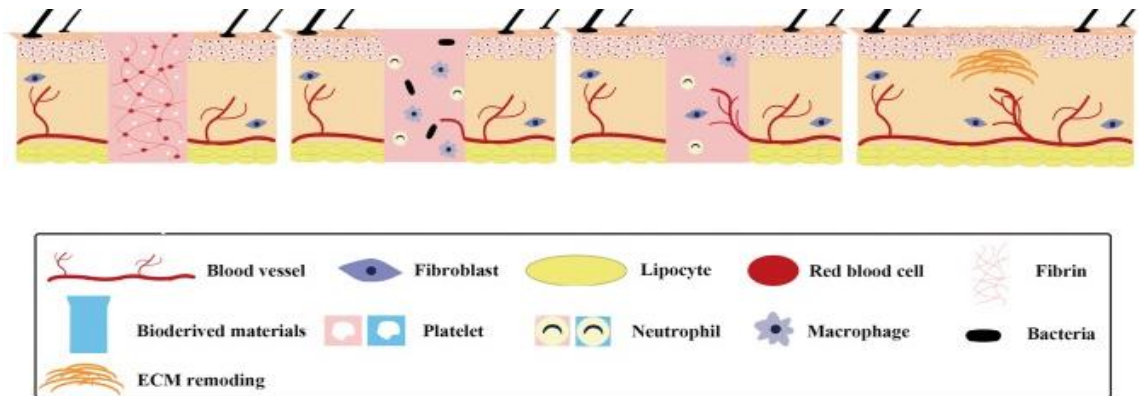


Ilustración 4: Etapas de la cicatrización de la piel. Fuente; Da et al. Progress in development of bioderived materials for dermal wound healing. 2017

1.3.2. Fases de la cicatrización (figura 4)

1.3.2.1. Fase inflamatoria

Es la primera fase, que comienza después de la lesión. Se caracteriza por reacciones mediadas por citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Estas sustancias son producidas por células que migran al área de la lesión. Se puede dividir en fase temprana (1-2 días después de la lesión) y tardía (días 2-3 después de la lesión). Mientras que en la fase temprana se activa el complemento y la infiltración de granulocitos neutrófilos, la presencia de monocitos sanguíneos que cambian a macrófagos tisulares es típico de la fase tardía ^[20]. Este último proceso es a menudo considerado como el regulador principal de la fase inflamatoria de la curación de heridas. Los macrófagos no solo fagocitan y digieren los restos de tejido y los neutrófilos remanentes, sino que también secretan factores de crecimiento y citoquinas que promueven la proliferación de tejidos y la migración celular ^[22].

La tarea de esta fase es iniciar la reparación de heridas ^[20] así como eliminar los patógenos y el material extraño de la herida y contener el daño en un área localizada ^[22].

El proceso de curación de heridas se inicia con la coagulación y la formación de coágulos de fibrina, dentro de un mecanismo denominado hemostasia ^[17]. En una respuesta inflamatoria vascular, los vasos sanguíneos lesionados se contraen y la sangre filtrada se coagula, lo que contribuye al mantenimiento de su integridad. La coagulación

consiste en una agregación de trombocitos y plaquetas en una red de fibrina, basándose en la acción de factores específicos a través de la activación y agregación de estas células. La red de fibrina, además de restablecer la homeostasis y formar una barrera contra la invasión de microorganismos, organiza la matriz temporal necesaria para la migración celular ^[11].

Las plaquetas de los vasos sanguíneos cutáneos dañados quedan expuestas a la matriz extracelular debido al daño tisular. La fibrina se une a monocitos y neutrófilos a través del receptor de integrina CD11b / CD18 y participa en la fase inflamatoria. La fibrina también se une a las células endoteliales y de fibroblastos a través de la integrina $\alpha v \beta 3$ ^[21] y estimula la angiogénesis. Las plaquetas y los mastocitos liberan diversos factores, como el factor de necrosis tumoral (TNF-) α y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), y ejercen una respuesta inflamatoria ^[24]. Los agentes inflamatorios locales, como el complemento activado y la histamina, causan enrojecimiento e hinchazón. Esta matriz es rápidamente invadida por neutrófilos, seguidos de monocitos y otras células inmunocompetentes para eliminar los tejidos muertos y controlar la infección. Las células polimorfonucleares son las primeras células inflamatorias que llegan al sitio de una herida cutánea en grandes cantidades entre 24-48 horas. Varios factores de crecimiento y citoquinas participan en el arrastre de los polimorfonucleares al lecho de la herida. Estos polimorfonucleares son la principal fuente de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α , y ejercen una cascada de reacciones inflamatorias y previenen la infección. Los polimorfonucleares, son eliminados por los macrófagos mediante la apoptosis. Los monocitos llegan al lecho de la herida después de los polimorfonucleares y se transforman en macrófagos, que son abundantes durante los días 2 y 3, pero permanecen durante semanas. Diferentes factores, como la proteína quimioatrayente de macrófagos (MCP) 1, la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP) 1 α , el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), PDGF y el factor de crecimiento transformante (TGF) β , atraen monocitos al lecho de la herida y los macrófagos activados secretan IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α para perpetuar las reacciones inflamatorias. Esta fase inflamatoria dura los primeros cuatro días en el proceso normal de curación de heridas ^[17].

1.3.2.2. Fase proliferativa

Tras aproximadamente 48 horas desde la aparición de la lesión, comienza la fase proliferativa. El objetivo es disminuir el área lesionada del tejido por contracción y fibroplasia, así como establecer una barrera epitelial viable para activar los queratinocitos. Esta etapa es responsable del cierre de la lesión en sí misma, e incluye procesos de angiogénesis, fibroplasia y reepitelización. Esta fase puede alargarse hasta el día 14 del proceso cicatricial ^[11].

La fase proliferativa se centra alrededor de los fibroblastos y la producción de colágeno y sustancia fundamental que formará la base del andamio tisular del área previa de la herida. Mientras tanto, las células endoteliales entran en una fase de crecimiento rápido y formación de nuevos vasos sanguíneos dentro del tejido de granulación, creando una rica red vascular que abastece este área ^[22].

Durante la segunda fase de la cicatrización o fase proliferativa, los fibroblastos se desplazan hacia el interior de la herida desde los bordes de esta, y producen proteoglicanos, glicosaminoglicanos y colágeno producen el tejido de granulación. La migración está activada por el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF) producido por los macrófagos y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) de las plaquetas. Es también un proceso de naturaleza quimiotáctica. En esta fase los queratinocitos y las células endoteliales también proliferan ^[20].

Las células inflamatorias promueven el reclutamiento y la proliferación de fibroblastos, células endoteliales vasculares y queratinocitos. Aproximadamente 4 días después de la lesión, la matriz extracelular provisional comienza a ser reemplazada por el tejido de granulación ^[35]. Este está compuesto de fibroblastos, colágeno, vasos sanguíneos y macrófagos. Varias metaloproteinasas de matriz (MMP), como MMP-1, -2 y -3, desempeñan papeles importantes en la migración de fibroblastos en la matriz de herida provisional. Los fibroblastos secretan colágeno, aumentan la cantidad de colágeno depositado, y mejoran la reticulación, lo que resulta en un aumento en la resistencia mecánica de la herida. La producción de colágeno comienza aproximadamente de 3 a 5

días después de la lesión tisular. Esta es estimulada por varios factores de crecimiento, incluidos PDGF, TGF- β , factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) 1 y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) 2. Los fibroblastos se diferencian en miofibroblastos, lo que promueve la contracción de la herida y da como resultado la reducción del área de la herida ^[36,37,38].

La neovascularización también se produce en concierto con la ayuda de capilares invadidos, células endoteliales vasculares reclutadas y células progenitoras endoteliales para soportar el tejido recién formado y para transportar las células circulatorias a la herida. La migración de células endoteliales se inicia en el segundo día y es estimulada por VEGF, FGF, angiopoyetina y TGF- β . Numerosas MMPs juegan un papel crucial en varios aspectos de la angiogénesis. El depósito de tejido de granulación media la reepitelización en el lecho provisional de la herida. Los queratinocitos migran desde los bordes de la herida y proliferan en la superficie del tejido de granulación. Interacciones bidireccionales entre queratinocitos y fibroblastos son necesarias para el avance de la curación. La aparición de tejido de granulación se observa entre 5 y 20 días tras la herida. En la fase de maduración, la herida se reepiteliza y la dermis recupera la mayor parte de su resistencia a la tracción ^[17].

1.3.2.3. Fase de remodelación

Después de aproximadamente 2-3 semanas, la herida pasa a una fase de remodelación o maduración, donde el tipo de colágeno se restablece a lo habitual (tipo I, en lugar del tipo III) y el tejido de la herida madura, lo que resulta en completa reticulación y restauración de una estructura parecida a la normal ^[22], pero siendo esta menos celular y vascular ^[11]. La conversión del tejido de granulación en tejido cicatricial es lograda por la remodelación de la matriz extracelular ^[20], y tiene como objetivo principal de lograr la máxima resistencia a la tracción ^[11]. La red vascular también es reconstruida rápidamente ^[22].

Tan pronto como la superficie de la lesión está cubierta por una monocapa de queratinocitos, cesa su migración epidérmica y se restablece una nueva epidermis

estratificada con una lámina basal subyacente desde los bordes de la herida hasta su porción interna ^[11].

Tras el cierre completo de la herida, la remodelación del tejido se lleva a cabo bajo la epidermis y puede durar un año hasta completarse ^[17], o incluso extenderse más tiempo ^[11]. Sin embargo, nunca se alcanzará la resistencia normal previa a la lesión ^[22].

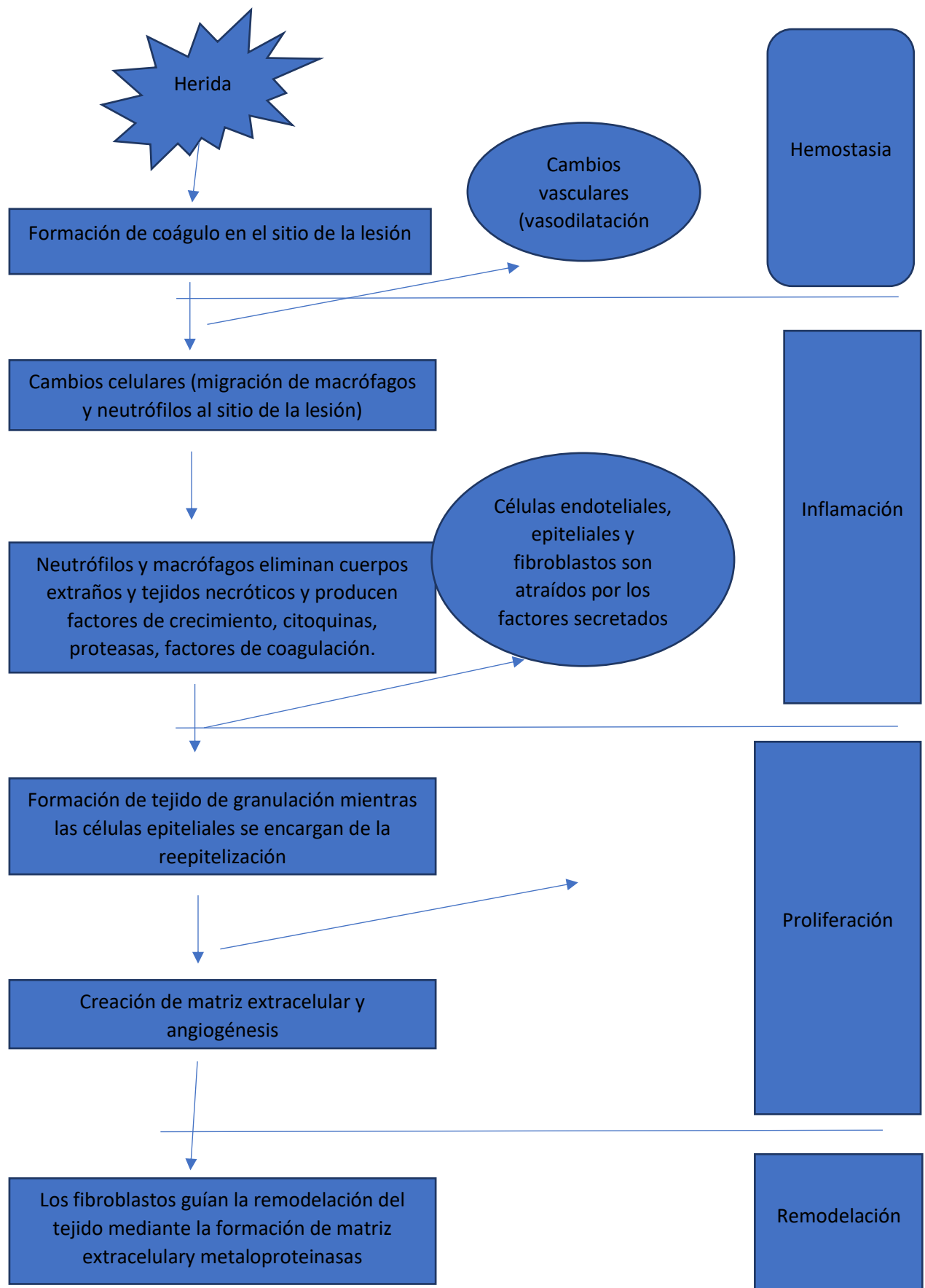


Ilustración 5: Esquema de las fases de la cicatrización y los mecanismos y factores implicados.

1.3.3. Principales factores de crecimiento y citoquinas que intervienen en el proceso de reparación de las heridas.

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

Es uno de los primeros factores secretados después de una lesión y promueve las reacciones celulares en todas las fases del proceso de curación de la herida. El PDGF estimula muchos procesos metabólicos, como la síntesis de proteínas y colágeno, y la actividad colagenasa y la quimiotaxis de los fibroblastos y las células del músculo liso. También estimula el proceso de angiogénesis, la contracción de la herida, la formación de tejido de granulación y la herida remodelación ^[39]. Este factor es producido por varios tipos celulares y estructuras, pero la fuente más temprana y mayor son las plaquetas ^[42].

Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

Es secretado principalmente por las plaquetas, aunque otros tipos celulares como macrófagos, fibroblastos y células mesenquimales también pueden liberarlo. Aparece sobre todo en fases iniciales de curación de la herida ^[39]. Acelera el proceso de reepitelización e incrementa la fuerza elástica de la herida ^[44], y tiene un papel vital en la proliferación, diferenciación, crecimiento y migración de células epiteliales y de queratinocitos. Promueve también la angiogénesis ^[39]. Se ha informado que el EGF es eficaz para inducir la epitelización de quemaduras de espesor parcial y heridas de granulación y estudios muestran la mejora de la cicatrización de heridas ^[44] y la reducción de cicatrices cutáneas en heridas de espesor total en ratones ^[45].

Factor de crecimiento de insulina (IGF)

El IGF participa activamente principalmente en la fase inflamatoria y proliferativa de cicatrización de la herida. Es secretada por los fibroblastos, que liberan principalmente IGF-1 que ejerce un efecto autocrino sobre ellos mismos ^[39].

Se han observado concentraciones bajas de IGF en heridas crónicas diabéticas. Sin embargo, el uso de este factor de crecimiento podría ayudar a la regeneración de las heridas en individuos no diabéticos ^[46].

Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

Contribuye a la reepitelización, la angiogénesis y la formación de tejido de granulación ^[39]. Dentro de esta familia de factores de crecimiento podemos numerosos factores estructuralmente relacionados, siendo los más importantes el FGF-2, FGF-7, y el FGF-10 ^[47]. El FGF estimula la proliferación de fibroblastos, la acumulación de colágeno y acelera la formación de tejido de granulación. En modelos animales han observado resultados positivos en el manejo de heridas en individuos diabéticos así como para el tratamiento de la cicatriz hipertrófica ^[39].

Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

Esta familia de factores de crecimiento regula los procesos de vasculogénesis fisiológica y patológica, la angiogénesis, la linfangiogénesis y permeabilidad vascular ^[39]. Es generado por varios tipos de células que participan en

La curación de heridas: células endoteliales, fibroblastos, células de músculo liso, plaquetas, neutrófilos, y macrófagos ^[48]. El uso de VEGF en estudios experimentales y clínicos presenta resultados exitosos, acelerando la reparación de heridas al aumentar la epitelización, angiogénesis y formación de tejido de granulación, tanto en modelos animales como en pacientes humanos ^[39].

Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF β)

Presenta tres isoformas diferentes: TGF β 1, - β 2, - β 3, que se solapan pero llevan a cabo diferentes funciones en el proceso de curación de heridas. La isoforma TGF β 1 está presente en una concentración más alta durante el proceso de curación de la herida. El TGF β 3 está relacionado con la angiogénesis y TGF β 1

y $\beta 2$ se asocian con cicatrización y fibrosis, promueven la diferenciación de fibroblastos y miofibroblastos, la deposición de la matriz extracelular, la contracción de la herida y la formación de cicatrices. El TGF β ejerce un efecto quimiotáctico para los macrófagos, induce la producción de colágeno y fibronectina e inhibe la actividad metaloproteinasa. El TGF $\beta 3$ reduce también la deposición de colágeno durante las fases proliferativa y de remodelación, evitando así la formación de cicatrices ^[39].

Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)

Este factor de crecimiento es secretado por células mesenquimales. Está relacionado con la reparación epitelial, la formación de tejido de granulación y la neovascularización, mediante la regulación de los procesos de crecimiento celular y la motilidad y morfogénesis en células tales como las células epiteliales y endoteliales ^[49].

Factor de crecimiento de queratinocitos (KGF)

Induce la proliferación y migración de queratinocitos durante el proceso de curación de heridas, principalmente en la fase de remodelación ^[39].

Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)

Es una citoquina altamente pleiotrópica con muchos efectos sobre granulocitos / macrófagos, incluyendo quimiotaxis y adhesión celular, también regulando la producción de citoquinas proinflamatorias. Mejora la cicatrización de heridas promoviendo la reepitelización, el reclutamiento de leucocitos, aumento de la angiogénesis y regulación positiva de mediadores proinflamatorios ^[50].

Citoquinas proinflamatorias

Algunas citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-6 (IL-6), y TNF- α se regulan al alza durante la fase inflamatoria de la curación de heridas. IL1 β e IL-6 tienen efectos mitogénicos y proliferativos sobre los queratinocitos y contribuyen al proceso de curación de heridas ^[51].

El TNF- α por otra parte, puede ejercer varias funciones dependiendo de la concentración y la duración de la exposición a esta citoquina. Niveles bajos de TNF- α pueden promover la curación de heridas estimulando indirectamente la inflamación y potenciando la secreción de factores de crecimiento producidos por macrófagos. Sin embargo, TNF- α tiene un efecto perjudicial sobre la curación cuando está presente a mayores niveles y periodos de tiempo prolongados ^[52].

Quimioquinas

Constituyen una familia de citoquinas quimioatrayentes que reclutan selectivamente monocitos, neutrófilos y linfocitos, que inducen la quimiotaxis a través de la unión a receptores acoplados a proteína G (GPCR).

Las quimiocinas podrían actuar como mediadores proinflamatorios secundarios siendo inducidos por mediadores proinflamatorios primarios como IL-1 y / o TNF- α . Mediante el reclutamiento de leucocitos, la actividad de la quimioquina conduce a la activación de los mecanismos de defensa del huésped y estimula los primeros eventos de curación de heridas ^[53].

Las quimiocinas también se agrupan en dos subfamilias funcionales principales: inflamatorias y quimiocinas homeostáticas. Las primeras controlan el reclutamiento de leucocitos en la inflamación y lesión tisular, mientras que las segundas cumplen funciones de protección mediante el reclutamiento de leucocitos hacia y a través de los órganos linfoides secundarios ^[54].

1.3.4. Manejo de las heridas cutáneas.

Las heridas cutáneas pueden cicatrizar por primera intención (consiguiendo una aproximación máxima de los bordes de la herida) o segunda intención (dejando la herida abierta). El cierre de heridas cutáneas tiene como objetivo evitar infecciones, conseguir una buena hemostasia y obtener un mejor aspecto estético de la cicatriz. En algunos casos, el cierre de la herida por primera intención es esencial para conseguir esos objetivos. Para ello puede hacerse uso de diferentes tipos de materiales, como son las suturas, grapas o adhesivos epiteliales ^[26].

1.3.5. Tratamientos actuales para la curación de heridas.

1.3.5.1. Agentes antimicrobianos

Existen numerosos enfoques para el tratamiento de las infecciones de las heridas. Algunos compuestos que contienen plata o yodo en su composición han sido descritos como antimicrobianos, aunque en la actualidad su uso está en entredicho pese a que todavía son utilizados [22].

El uso de fórmulas que contienen antibióticos para aplicarse en las zonas con heridas sigue siendo popular en la actualidad, pese a que la evidencia científica actual parece demostrar que el uso de antibióticos tópicos solo produce mejorías en la cicatrización de heridas infectadas y no se observan beneficios si se utilizan sobre heridas no infectadas [27]. Además, parece que no solo no produce beneficios, sino que puede llegar a provocar resistencias bacterianas, así como producir reacciones alérgicas en el paciente [28]. Algunos estudios sin embargo destacan los beneficios del uso de estas sustancias en heridas en niños [29].

1.3.5.2. Apósitos

Se han desarrollado muchos tipos de apósito para tratar de proteger tanto la herida de la infección como también ayudar a promover el proceso de cicatrización de la herida.

Los apósitos convencionales de gasa seca pueden ser perjudiciales para la cicatrización exitosa de la herida e incluso pueden ser causa de más lesiones cuando son retirados [22]. Un vendaje oclusivo húmedo ayuda a soportar la fase inflamatoria creando un entorno con baja tensión de oxígeno (activando factores tales como el factor 1 inducible por hipoxia) y también aumenta la tasa de reepitelización [30]. Además, una cantidad limitada de exudado retenido en la herida permite el desbridamiento autolítico, que sirve para promover aún más la cicatrización exitosa de la herida.

Los vendajes poco adherentes y las películas semipermeables representan los tipos básicos de apósitos para heridas de uso común, que tienen el objetivo de restringir la penetración de líquidos y microbios, pero permitiendo el paso de aire y vapor de agua. Los hidrocoloides e hidrogeles aprovechan un material hidrófilo que absorbe una cierta cantidad de exudado, pero mantiene un ambiente húmedo [22].

También se encuentran en el mercado apósitos de alginato, fibras no tejidas derivadas de algas marinas. Se utilizan para heridas altamente exudativas debido a su capacidad para absorber grandes cantidades de líquido^[31]. De forma similar, las espumas tienen cierta capacidad de absorción y se pueden usar en heridas moderadamente exudativas, especialmente útiles porque minimizan el trauma durante los cambios de apósito.

Por último, los productos de colágeno se han utilizado en heridas recalcitrantes y úlceras crónicas. Si bien este colágeno no pretende ser un reemplazo directo de la nueva producción de colágeno en el tejido lesionado (ya que puede derivarse de múltiples fuentes, incluido el colágeno bovino y porcino), se cree que ayuda a facilitar un entorno que atraiga tipos celulares críticos para la curación de la herida mientras se erradican los efectores negativos tales como radicales libres y proteasas^[22].

Recientemente se han desarrollado algunos apósitos que contienen sustancias microbianas. Estos materiales combinan vendajes de heridas tradicionales como espumas o hidrogeles con compuestos antimicrobianos como plata, betaína, quitina o polihexametileno biguanida. Pese a que su uso no está recomendado para todos los tipos de heridas, sí que parecen ser útiles en el tratamiento de úlceras por presión crónicas o úlceras venosas^[32].

1.3.5.3. Injertos y sustitutos de la piel.

La piel es el primer tejido que se obtuvo con éxito en el laboratorio para su aplicación clínica. Se siguieron dos líneas para la obtención de piel mediante bioingeniería: una basada en la matriz, donde se utilizó la matriz biodegradable, y otra basada en células, donde se usaron las células para la aplicación. Existen construcciones cutáneas de bioingeniería, que actualmente están disponibles y están aprobadas para la práctica clínica. Sin embargo, no están exentas de problemas: el coste, el tiempo necesario para la fabricación, así como la posibilidad de rechazo del injerto se postulan como los principales problemas a la hora de generalizar el uso de injertos cutáneos^[17].

Al margen de los injertos de piel, que han sido utilizados durante mucho tiempo, los avances en este campo han permitido el desarrollo de nuevos sustitutos de la piel. Estos

materiales generalmente consisten en una sustancia derivada biológicamente combinada con un material para permitir su colocación en una herida. Por regla general, estos apósitos son bastante costosos, lo que no permite un uso a gran escala. Sin embargo, se han realizado varios estudios para evaluar la relación costo-efectividad y muchos de ellos han mostrado una ventaja con el uso de estos costosos sustitutos ya que pueden reducir el tiempo de estancia hospitalario ^[22].

1.3.5.4. Factores de crecimiento y citoquinas.

Los efectos terapéuticos de diversos factores de crecimiento y citoquinas se probaron en el tratamiento clínico de las heridas crónicas. Los más estudiados han sido el PDGF, VEGF, bFGF, y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). PDGF-BB fue el más popular y aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el tratamiento de las úlceras neuropáticas diabéticas del pie, anunciando más tarde sin embargo la misma FDA el riesgo de malignidad asociado con este producto, por lo que la investigación continúa ^[17]. De cualquier forma, pese a que el empleo de estos factores ha demostrado su eficacia en varios modelos de cicatrización usados en diferentes estudios ^[33], el costo de estos factores también supone un impedimento que ralentiza su investigación y expansión ^[22,37].

1.3.5.5. Terapia por presión negativa.

Esta terapia comenzó a usarse en Estados Unidos en 1997. Como ventajas presenta el mantenimiento de un ambiente húmedo, optimización del flujo sanguíneo, eliminación de exudados y aplicación de presión para promover el cierre de la herida. Además, numerosos estudios han demostrado tasas reducidas de infección en estas heridas ^[31], sobre todo en casos de pie diabético ^[40,41].

Estos dispositivos constan de un apósito de espuma (que requiere cambios, hasta cada dos días) y un tubo de evacuación. Pueden ser unidades domésticas portátiles simples hasta máquinas más complejas diseñadas para entornos de cuidados intensivos, como unidades de quemados. La terapia a presión negativa puede reducir el volumen de la herida, lo que simplifica la posterior reparación quirúrgica de esta ^[22].

1.3.5.6. Plasma rico en plaquetas.

El plasma rico en plaquetas es una tecnología terapéutica endógena que está ganando popularidad en la medicina regenerativa debido a su potencial para estimular y acelerar la cicatrización del tejido. Es un producto biológico autólogo derivado de la sangre, que tras un proceso de centrifugación de esta, se obtiene una fracción plasmática con una concentración de plaquetas superior a la de la sangre circulante. Las plaquetas desempeñan un papel crucial en el proceso de curación de heridas gracias a su función hemostática y a la presencia de citoquinas y factores de crecimiento ^[39].

Hoy en día se utiliza en multitud de campos de la medicina, siendo una de las ventajas principales de estas preparaciones el hecho de que se obtienen fácilmente de la sangre del paciente después de un simple proceso de centrifugación, por lo tanto, es un producto seguro, sencillo y rentable ^[59,60].

1.3.5.7. Oxígeno hiperbárico.

El oxígeno hiperbárico se ha utilizado en la curación de heridas sobre la base del principio de que puede promover la proliferación de fibroblastos, mejorar la función inmune y estimular la angiogénesis ^[17, 22]. Sin embargo, hay muy poca evidencia que avale los beneficios de su uso como terapia para la curación de las heridas, lo que ha llevado a cierto grado de controversia en su utilización ^[55].

Es importante destacar que esta terapia se aplica al paciente en una cámara de oxígeno hiperbárico ya que la administración localizada de oxígeno no ha demostrado ser efectiva. Esto puede conducir también a la aparición de ciertos efectos secundarios indeseados como miopía, y efectos de toxicidad del oxígeno en el cerebro que provoca convulsiones y neumotórax ^[56]. Su uso se limita pues, a ciertos tipos concretos de úlceras crónicas en diabéticos que presentan hipoxia ^[55].

1.3.5.8. Terapia fotodinámica.

La terapia fotodinámica ha demostrado su efectividad en el tratamiento de heridas, contribuyendo de varias maneras al proceso de curación de la herida. Los mecanismos que intervienen son: estimulación de la muerte celular; reducción o aumento de la inflamación;

estimulación de la proliferación de fibroblastos y, en consecuencia, del colágeno y la elastina; aumento del factor de crecimiento transformante beta y metaloproteinasas. En base a esto, la terapia fotodinámica proporciona buenos resultados en el proceso de curación de heridas ^[57].

1.3.6. Principales sustancias empleadas en la curación de heridas.

1.3.6.1. Sustancias naturales

1.3.6.1.1. Aloe vera

El *Aloe vera* es una planta tropical que ha sido utilizada durante siglos con fines terapéuticos. El gel extraído del parénquima de la hoja contiene una amplia gama de componentes naturales que poseen importantes actividades antiinflamatorias, antioxidantes, antifúngicas y angiogénicas. También ha sido comprobada su capacidad para mejorar la curación de úlceras gástricas, úlceras infectadas, y úlceras aftosas recurrentes ^[58].

Dado que la manosa-6-fosfato es el principal azúcar en el gel de *Aloe*, se ha estudiado la posibilidad de que sea una sustancia activadora del crecimiento. La aplicación de la manosa-6-fosfato aislada parece promover una mejor cicatrización en ratones. Además, también podría poseer cierta capacidad antiinflamatoria. De cualquier modo, se hacen necesarias más investigaciones para esclarecer el potencial efecto de este azúcar en la curación de heridas ^[59].

El mecanismo de actuación del gel de *Aloe vera* parece estar explicado por una mayor infiltración de células inflamatorias, proliferación de fibroblastos, deposición de colágeno, angiogénesis y niveles de expresión de TGF- β -1 y bFGF. Además, el proceso de contracción de la herida también parece ser acelerado al aplicar *Aloe vera* ^[60]. El gel de *Aloe* tiene una fuerte actividad inmunomoduladora en la que regula negativamente la producción de citoquina inflamatoria inducida por lipopolisacáridos y la expresión de inflammasoma NLRP3 (NACHT, LRR y PYD) en macrófagos humanos. También podría inhibir el proceso inflamatorio que sigue a la lesión por quemaduras, reduciendo la adhesión de leucocitos ^[61]. Está ampliamente documentado que la administración de *Aloe vera* da lugar

a un marcado aumento en la actividad fagocítica y proliferativa del sistema reticuloendotelial ^[62]. En adición, inhibe directamente la ruta de la ciclooxygenasa y reduce la producción de prostaglandina de E2, que juega un papel importante en la inflamación. El aloe también contiene antraquinonas y cromona en el gel interno, que posee fuertes efectos antiinflamatorios ^[61]. Además, tiene efecto potencial para aumentar la proporción de linfocitos CD4 + / CD8 +, lo cual influye en el mecanismo de la curación de heridas disminuyendo el porcentaje del área de la herida, infiltración de neutrófilos y angiogénesis y, sin embargo, aumentando el espesor epidérmico y los fibroblastos en el tejido de la herida ^[62].

La eficacia de esta planta ha sido estudiada para numerosos usos terapéuticos, entre los que destacan la curación de quemaduras, prevención del cáncer, antidiabético, hepatoprotector, antioxidante, para mejorar la absorción intestinal de otros compuestos, regulador estrogénico, antimicrobiano y antiviral ^[61], y como apoyo en el tratamiento de la estomatitis aftosa recurrente menor ^[63].

1.3.6.1.2. *Quitosano*

El quitosano es un polímero catiónico natural no tóxico, biocompatible y biodegradable conocido por su baja inmunogenicidad y sus efectos antimicrobianos, y antioxidantes, así como su actividad en la curación de heridas ^[64].

Se ha utilizado solo o en combinación con otros biopolímeros, productos biocerámicos o factores de crecimiento para mejorar la regeneración de los tejidos conectivos blandos y duros. Las diferentes formas de presentación incluyen hidrogeles, esponjas, películas y membranas de nanofibras ^[65].

La actividad antimicrobiana del quitosano depende de una serie de factores, que incluyen su peso molecular, grado de desacetilación, grado de sustitución, forma física, así como propiedades estructurales de la pared celular del microorganismo objetivo.

El quitosano tiene una amplia gama de aplicaciones en el campo de la industria farmacéutica, biomédica, química, cosmética, textil y alimentaria ^[66].

1.3.6.1.3. *Calendula officianalis*

Calendula officinalis ha sido empleada tradicionalmente para el tratamiento de trastornos dermatológicos, y posee una serie de acciones farmacológicas que conducen a la curación de heridas [67]. Se le atribuyen múltiples propiedades, entre las que destacan la capacidad analgésica, antiséptica y cicatrizante por su efecto colagenogénico [68].

Sin embargo, hay ciertas discrepancias en cuanto a su potencial uso en la curación de heridas. Mientras que algunos autores defienden que hay poca evidencia de su efecto beneficioso [67], otros han demostrado sus efectos positivos para el manejo de diferentes patologías, sobre todo a nivel oral, disminuyendo la reabsorción ósea en casos de periodontitis o tras extracciones dentales [68, 69, 70]. También se le atribuyen propiedades beneficiosas en el tratamiento de la vaginosis bacteriana [71].

1.3.6.2. Fármacos

1.3.6.2.1. Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata (AgNP) de 100 nm de dimensión o menos tienen propiedades físicas, químicas y biológicas únicas. Los AgNP se consideran uno de los nanomateriales más prometedores, con un eficaz efecto antimicrobiano contra un amplio espectro de bacteriano, además de antiinflamatorio, antifúngico, y efectos antivirales [58]. Muchos investigadores demostraron el uso efectivo de AgNP como tratamiento para quemaduras, úlceras crónicas, necrólisis epidérmica tóxica y pénfigo [72].

Los AgNPs ejercen su efecto curativo al disminuir la cantidad de bacterias y hongos en el sitio de la herida. Ello se consigue a través de la disrupción de la membrana celular que causa la muerte celular y la capacidad de bloquear las vías respiratorias enzimáticas, alterar el ADN microbiano e inhibir el proceso normal de formación fúngica. Además, los AgNP mejoran el proceso de reepitelización, que se puede atribuir a la capacidad de regular negativamente la respuesta inflamatoria, disminuir el nivel de citoquinas y metaloproteinasas de matriz, así como inducir la apoptosis de células inflamatorias, lo que conduce a una cicatrización más temprana [58,73,74,75].

El empleo de estos compuestos parece ser eficaz en el tratamiento de casos de úlceras venosas de las piernas [73] y de quemaduras [77].

1.3.6.2.2. *Ácido hialurónico*

El ácido hialurónico es un polisacárido que pertenece a la familia de glicosaminoglicanos. Consta de una unidad básica de dos azúcares, ácido glucurónico y N-acetil-glucosamina. Generalmente se encuentra como una masa molecular alta en el líquido sinovial que rodea las articulaciones, el cartílago y los tejidos del ojo y piel [78].

Numerosas investigaciones evidencian las implicaciones biomédicas de esta sustancia en los procesos reparadores de la piel, el pronóstico del cáncer, la cicatrización de heridas, la regeneración tisular, inflamación e inmunomodulación [79].

El mecanismo de acción que podría explicar su capacidad analgésica es la capacidad que tiene el ácido hialurónico de modular la excitabilidad de los nociceptores articulares. Siguiendo esta misma línea, algunos autores sugieren que las inyecciones de este compuesto tienen capacidad para reducir la sensibilidad de los canales iónicos de las terminales nerviosas nociceptivas a los diferentes estímulos mecánicos. Los autores defendían que este efecto podría explicarse, en parte, a la capacidad del ácido hialurónico para atenuar la síntesis de prostangandina E y bradicinina. Además, tiene un efecto sobre la sustancia P, molécula involucrada en los mecanismos de producción del dolor, mostrando inhibir la permeabilidad vascular inducida por esta sustancia.

Por otro lado, el ácido hialurónico parece tener efectos en la síntesis de proteoglicanos. Diferentes estudios han demostrado que el AH inhibe la degradación y estimula la síntesis de prostanglandinas del cartílago [80].

Se utiliza comúnmente como un agente terapéutico en una amplia gama de aplicaciones, incluida la osteoartritis, cirugía oftálmica, aplicación cosmética e ingeniería de tejidos. Se puede inyectar por vía intradérmica o puede ser usado tópicamente. Los extractos de ácido hialurónico son productos seguros y eficaces para ser utilizados en la reparación de la piel [78].

1.3.6.2.3. *Fenitoína*

La fenitoína oral se introdujo por primera vez como un medicamento anticonvulsivo en 1937. Numerosos autores han mostrado interés en cómo la fenitoína tópica se podría utilizar para promover la curación de heridas en una variedad de heridas crónicas [81].

Uno de los efectos secundarios que afectan a una gran parte de los pacientes tratados es el sobrecrecimiento gingival. Seguramente podría haber una correlación entre este efecto estimulante y el efecto de la sustancia en la curación de heridas [82].

Pese a que algunos estudios muestran posibles usos terapéuticos de la fenitoína en la curación de heridas, especialmente en casos de úlceras por presión, se hacen necesarias más investigaciones al respecto para respaldar su uso [82,83].

1.4. ELASTINA

La elastina es una proteína del tejido conjuntivo que provee de elasticidad e integridad estructural a los tejidos. Es parte integral de la matriz extracelular de numerosos tejidos de los vertebrados, como los vasos sanguíneos, los pulmones y la piel [84]. Tiene una estructura muy entrecruzada y una estructura secundaria en espiral beta. Es una de las proteínas más estables en el cuerpo, que puede ser estirada y relajada más de mil millones de veces y permanecer extremadamente insoluble [85].

La elastina es una de las proteínas humanas más duraderas, sin embargo, la síntesis efectiva de fibra elástica en los tejidos, incluida la dermis, cesa en las primeras fases de la infancia, tras lo cual la regeneración de fibras elásticas en heridas de espesor completo se ve fuertemente comprometida [84].

Aunque los fibroblastos dérmicos son capaces de secretar elastina, su síntesis es reprimida en la piel y en muchos tejidos adultos mediante mecanismos postranscripcionales [86,87].

La elastina se compone principalmente de una proteína llamada tropoelastina, que se une con la ayuda de un conjunto de proteínas de fibra elástica. La formación de elastina se produce en un proceso que consta de varias etapas que implican la asociación de la tropoelastina, una deposición molecular masiva y reticulación. Las proteínas microfibrilares

como miembros de las familias de fibrilina y fibrilina son necesarias para la organización de fibras elásticas *in vivo* ^[84].

La anteriormente citada durabilidad e insolubilidad de la elastina, obstaculizó los primeros intentos de construir biomateriales versátiles. Posteriormente, el campo ha progresado mediante el uso adaptado de elastina solubilizada, péptidos basados en elastina y la disponibilidad creciente de formas recombinantes del precursor de elastina soluble natural, la tropoelastina. Esto permite la fabricación de una gama sofisticada de compuestos que se benefician de las propiedades físicas de la elastina ^[88,89], películas y revestimientos, partículas y esferas, y biomateriales compuestos de elastina ^[85].

1.5. MODELO DE CICATRIZACIÓN EXCISIONAL EN RATONES

El objetivo de los modelos de curación de heridas animales es replicar la fisiología humana y predecir los resultados terapéuticos. Pese a la amplia investigación realizada en este campo, todavía no existe un modelo de curación de heridas en roedores que sea muy similar a la cicatrización de heridas humanas y ningún modelo animal predice completamente todos los resultados clínicos. Los roedores son candidatos atractivos para los estudios de curación de heridas debido a su disponibilidad, bajo costo y facilidad de manejo.

Sin embargo, los modelos de roedores han sido criticados porque el principal mecanismo de cierre de la herida es la contracción, mientras que en los humanos la reepitelización y la granulación son los principales mecanismos implicados en la formación del tejido. Las diferencias entre la reparación de la piel de los roedores y la piel humana, como la contracción promovida por el panículo carnoso y el papel de los nichos específicos de las células madre de la piel, hacen que sea difícil cerrar la brecha entre los estudios preclínicos y clínicos ^[90,91,92]. El modelo excisional ferulizado de cicatrización en ratones evita algunos de estos inconvenientes, al incorporar un aro alrededor de la herida que mantiene los bordes tensos y evita la contracción, consiguiéndose un tipo de cicatrización más parecida a la humana ^[92,93,94].

El uso de ratones sin pelo para el estudio de la curación de heridas cutáneas es frecuente. Debido a que los ratones son lampiños, no se requiere depilación antes del inicio de la cicatrización de la herida, lo que supone una evidente ventaja ^[95].

JUSTIFICACIÓN: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS

La hipótesis que se manejó para la realización del estudio fue que dada la función de la elastina se pensó que la aplicación por vía tópica de diferentes soluciones que contienen elastina e hidrólisis pulmón-pepsina podría afectar positivamente al proceso de curación de heridas, reduciendo el tiempo necesario para la completa curación de estas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Investigar la eficacia de distintos principios activos, constituidos por elastina, hidrólisis pulmón-pepsina, y placebo, mediante la aplicación por vía tópica y utilizando para ello un modelo de cicatrización en ratón.

3.2. Objetivos específicos

- Describir las características macroscópicas de las heridas de cada uno de los grupos y comprobar los cambios.
- Determinar las diferencias en el proceso de cicatrización a nivel microscópico.
- Establecer registros ecográficos en las diferentes etapas del proceso cicatricial y valorar los factores influyentes.
- Analizar inmunohistoquímicamente las muestras de tejidos en diferentes puntos cronológicos del estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Modelo Animal

Para la realización del estudio se utilizaron 75 ratones hembra tipo SOPF SKH1/CRL g de 4 semanas de edad y con un peso medio de 24 gramos, estableciéndose 5 grupos de 15 animales cada uno.

Este tipo de ratón es un modelo eutímico y sin pelo. La decisión de decantarse por el modelo de ratón SKH-1 fue debida a las ventajas que esto presentaba frente a otros modelos. La ausencia de pelo en la piel de estos animales evita realizar rasurados periódicos.

Los animales fueron mantenidos en jaulas de metacrilato color transparente (tintado de amarillo) de 40x30 cm, con cubierta metálica de rejas y con espacio para alimento y agua. Éstas se ubicaron en una sala con foto-período-luz-oscuridad de 12-12 horas. La temperatura media a la que estuvieron expuestos los animales fue de 22º C, con una humedad relativa de 40-70%. El aporte de comida y bebida fue "*ad libitum*". Los animales fueron manipulados según las normas de la Unión Europea sobre la protección de animales utilizados en experimentación Directiva 2010/ 63/ UE, así como el Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero de 2013, España. Asimismo, el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia aprobó todos los experimentos (No 413170104). Los animales se alojaron aleatoriamente en jaulas debidamente identificadas según una codificación alfanumérica simple tal como se detalla en la siguiente tabla:

GRUPO	SEXO	FRECUENCIA DE TTX	n
1	Hembras	Cada 24h	15
2	Hembras	Cada 24h	15
3	Hembras	Cada 24h	15
4	Hembras	Cada 24h	15
5	Hembras	Cada 24h	15

Ilustración 6: Distribución de los animales para el estudio



Ilustración 7: Los animales estuvieron expuestos a un ciclo foto-período-luz-oscuridad de 12-12 horas, con una temperatura media de 22º C y una humedad relativa de 40-70%.

4.2. Protocolo experimental.

4.2.1. Aclimatación, aleatorización e identificación.

Los animales fueron aclimatados al nuevo ambiente durante una semana. Tras ello, el día anterior al inicio del experimento (día 0), se procedió a aleatorizar, pesar e identificar los animales, estableciendo así los grupos a estudio según el principio activo que se aplicaría a las lesiones:

- **Grupo 1:** elastina 50.
- **Grupo 2:** elastina 25.
- **Grupo 3:** hidrólisis pulmón-pepsina 50.
- **Grupo 4:** hidrólisis pulmón pepsina 25.
- **Grupo 5:** placebo

Cada grupo estuvo conformado por 15 ratones. Para el registro y diferenciación de los animales, se utilizaron muescas en las orejas, realizadas por medio de un sacabocados especialmente diseñado para ello, siguiendo un código numérico predeterminado.

Este sistema es de fácil lectura y permite una perfecta identificación de los animales. Además, ejecutado correctamente, no requiere de la sedación de los animales ya que es poco traumático.

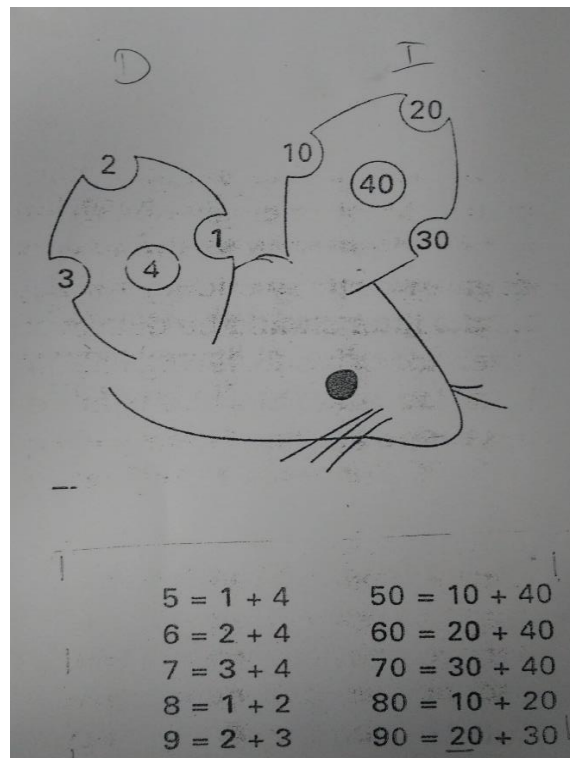


Ilustración 8: Código numérico para la identificación de los ratones mediante la realización de muescas en las orejas

4.2.2. Realización de las lesiones.

Se procedió a realizar una anestesia al animal con ketamina al 50% (Anaestamine 100 mg/ml, Fatro Ibérica S.L.) y xilacina 50% (Nerfasin 20 mg/ml, Fatro Ibérica S.L.) con analgesia subcutánea y local para realización de exéresis. A continuación, fueron realizadas 2 exéresis cutáneas a ambos lados de la región dorsal del recorrido vertebral a nivel postescapular, utilizando para ello un punch de 4 mm (Laboratorios Stiefel). Se marcaron dos heridas sobre la piel del animal para definir el perímetro de las exéresis a realizar. Con

la ayuda de un bisturí se extirparon los colgajos de piel (epidermis y dermis) hasta llegar al espacio subcutáneo, respetando la musculatura dorsal. No se realizó sutura.

4.2.3. Obtención de registros preliminares.

Antes de la aplicación del producto, se procedió a la obtención de los registros iniciales de las heridas inducidas: fotografías y registro del perímetro de las lesiones. Tras esto, se procedió a la aplicación vía tópica de los tratamientos según la randomización definida (las dos heridas siempre corresponderán al mismo producto). Para finalizar, cada animal fue distribuido a su jaula de recuperación. A partir del día siguiente a la inducción quirúrgica del modelo y aplicación inicial de los tratamientos se evaluó la evolución del proceso de cicatrización aplicando por vía tópica los compuestos a estudio durante un periodo de 15 días.

4.2.4. Tratamiento.

Los tratamientos aplicados fueron la elastina hidrolizada e hidrólisis de pulmón/pepsina. Tanto la elastina hidrolizada como la hidrólisis de pulmón /pepsina se prepararon al 0,5% y 0,25w/w en goma arábiga y glicerina vegetal. El placebo se preparó utilizando ambos vehículos y agua.

4.2.5. Estudio clínico.

4.2.5.1. Resumen de los procedimientos

- ✓ Anestesia intraperitoneal mediante ketamina-xilacina junto con analgesia subcutánea y local para realización de exéresis cutánea (dos excisiones mediante punch en la zona del dorso)
- ✓ Aplicación del producto a estudio mediante un hisopo estéril, de forma tópica.
- ✓ Realización de ecografía cutánea previa anestesia inhalatoria.
- ✓ Analgesia preoperatoria y post quirúrgica mediante administración de buprenorfina 0.1-0,05 mg/kg ip (Bupredine 0,3 mg/ml, Fatro Ibérica S.L.), previa al inicio de la cirugía y durante las próximas 24-48 horas cada 12 horas.
- ✓ Sacrificio mediante liberación progresiva de CO₂ para la toma de muestras.

Número TOTAL DE ANIMALES (n=75)
--

ALEATORIZACION
2 heridas punch 4mm
n= 150 muestras

DIA 3	DIA 7	DIA 14
• Control clínico • Control peso • Registro fotográfico • Ecografía modo B, doppler	• Control clínico • Control peso • Registro fotográfico. • Ecografía modo B, doppler	• Control clínico • Control peso • Registro fotográfico. • Ecografía modoB y Doppler

GRUPO1 ELASTINA 50 (n=5)	GRUPO1 ELASTINA 50 (n=5)	GRUPO1 ELASTINA 50 (n=5)
GRUPO 2 ELASTINA 25 (n=5)	GRUPO 2 ELASTINA 25 (n=5)	GRUPO 2 ELASTINA 25 (n=5)
GRUPO3 HIDROLISIS P 50(n=5)	GRUPO3 HIDROLISIS P 50(n=5)	GRUPO3 HIDROLISIS P 50(n=5)
GRUPO 4 HIDROLISIS P 25(n=5)	GRUPO 4 HIDROLISIS P 25(n=5)	GRUPO 4 HIDROLISIS P 25(n=5)
GRUPO5 PLACEBO (n=5)	GRUPO5 PLACEBO (n=5)	GRUPO5 PLACEBO (n=5)

Ilustración 9: Aleatorización de los ratones según el compuesto a utilizar

4.2.5.2. Cronología de los procedimientos.

Día 0: Aleatorización e individualización de los animales. Establecimiento de los grupos definidos en el diseño experimental (5 grupos de 15 animales cada uno y dos heridas por animal total 150 muestras).

Día 1: Registro del peso de los animales; realización de las cirugías excisionales; registro fotográfico; dimensionado de las lesiones; control postquirúrgico de los animales y sus lesiones; aplicación de tratamientos.

Día 2: Control de todos los animales y tratamiento de los animales. Análisis ecográfico.

Día 3: Realización del registro fotográfico y dimensionado de las lesiones control y tratamiento de todos los animales. Análisis ecográfico: Eutanasia grupos (1, 4, 7, 10, 13).

Día 4: Control de todos los animales y tratamiento de los animales del grupo.

Día 5: Control de todos los animales y tratamiento de los animales del grupo.

Día 6: Control de todos los animales y tratamiento de los animales del grupo.

Día 7: Anestesia de los animales para la realización del registro fotográfico y dimensionado de las lesiones; control y tratamiento de todos los animales. Análisis ecográfico modo B y doppler. Eutanasia grupos (2, 5, 8, 11, 14).

Día 8: Control de todos los animales y tratamiento de los animales del grupo.

Día 9: Control y tratamiento de los animales restantes.

Día 10: Control de todos los animales, registro fotográfico y tratamiento de los animales del grupo. Análisis ecográfico.

Día 11: Control de todos los animales y tratamiento de los animales del grupo.

Día 12: Control de todos los animales y tratamiento de los animales del grupo.

Día 13: Control de todos los animales y tratamiento de los animales del grupo.

Día 14: Realización del registro fotográfico y dimensionado de las lesiones. Análisis ecográfico. Eutanasia (grupos 3, 6, 9, 12, 15) y muestreo final.

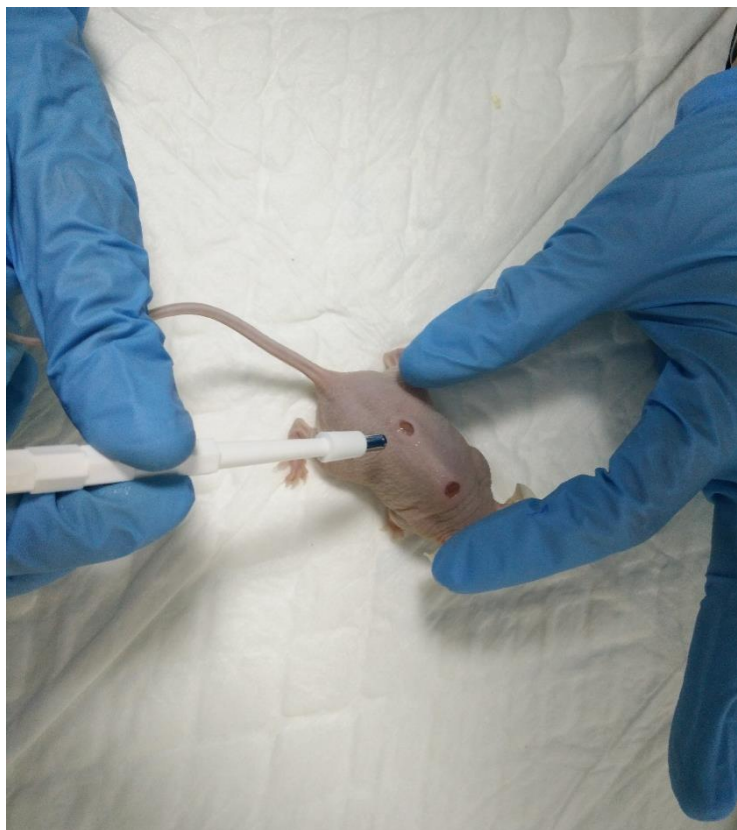


Ilustración 10: Realización de las exéresis cutáneas con punch de 4 mm en la zona dorsal de los animales el día 0 del estudio

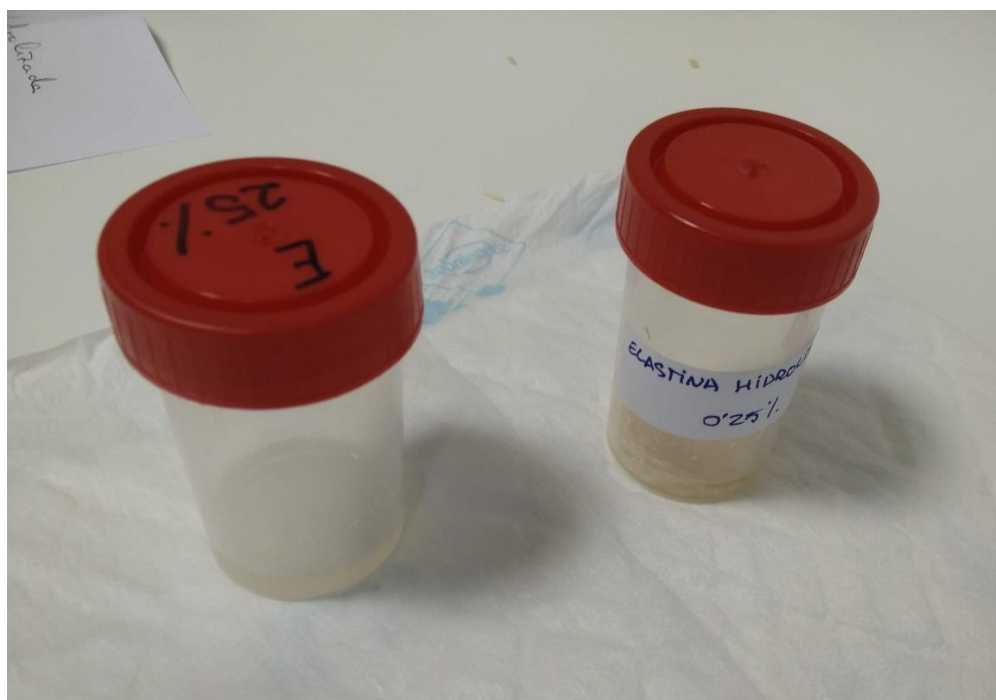


Ilustración 11: Preparación e identificación de los bioestimulantes a utilizar según el compuesto y la concentración



Ilustración 12: Aplicación de los productos en las zonas de lesión utilizando para ello un hisopo de algodón estéril

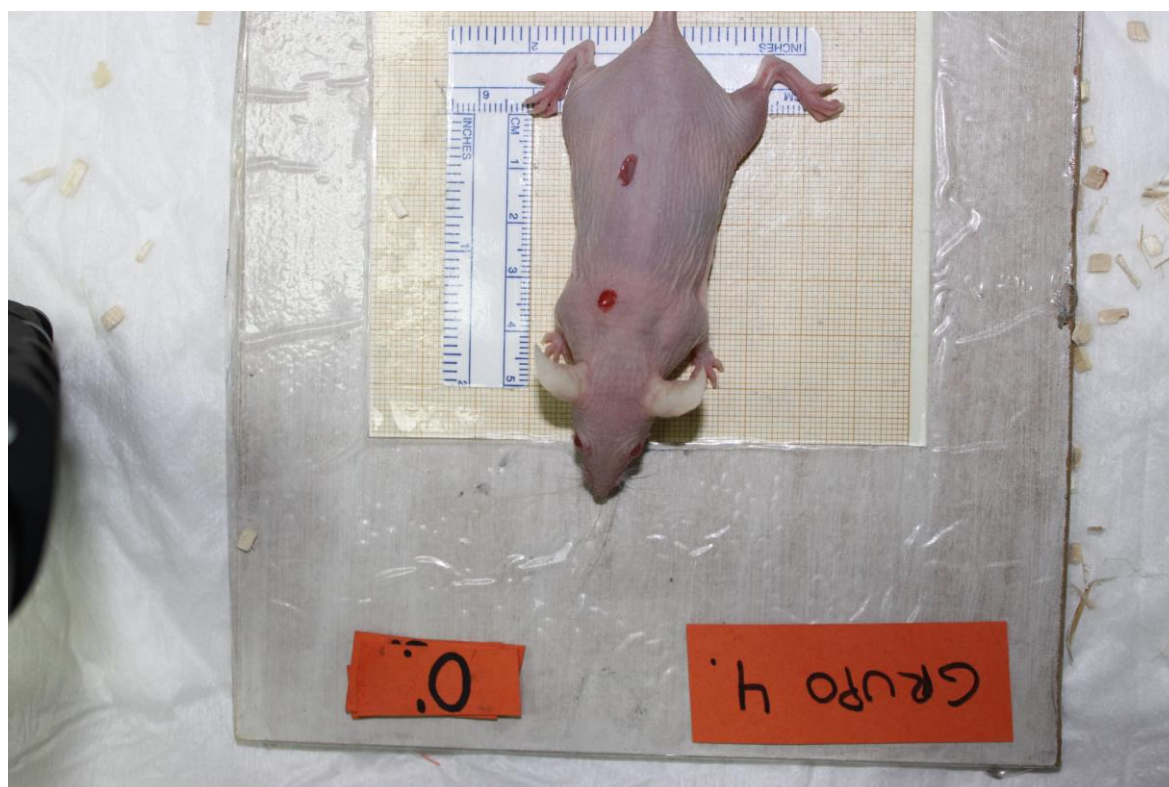


Ilustración 13: Toma de fotografías junto a regla milimetrada para la valoración del aspecto macroscópico de las heridas



Ilustración 14: Sedación de los animales en una cámara con gas de isoflurano previa a la toma de registros ecográficos

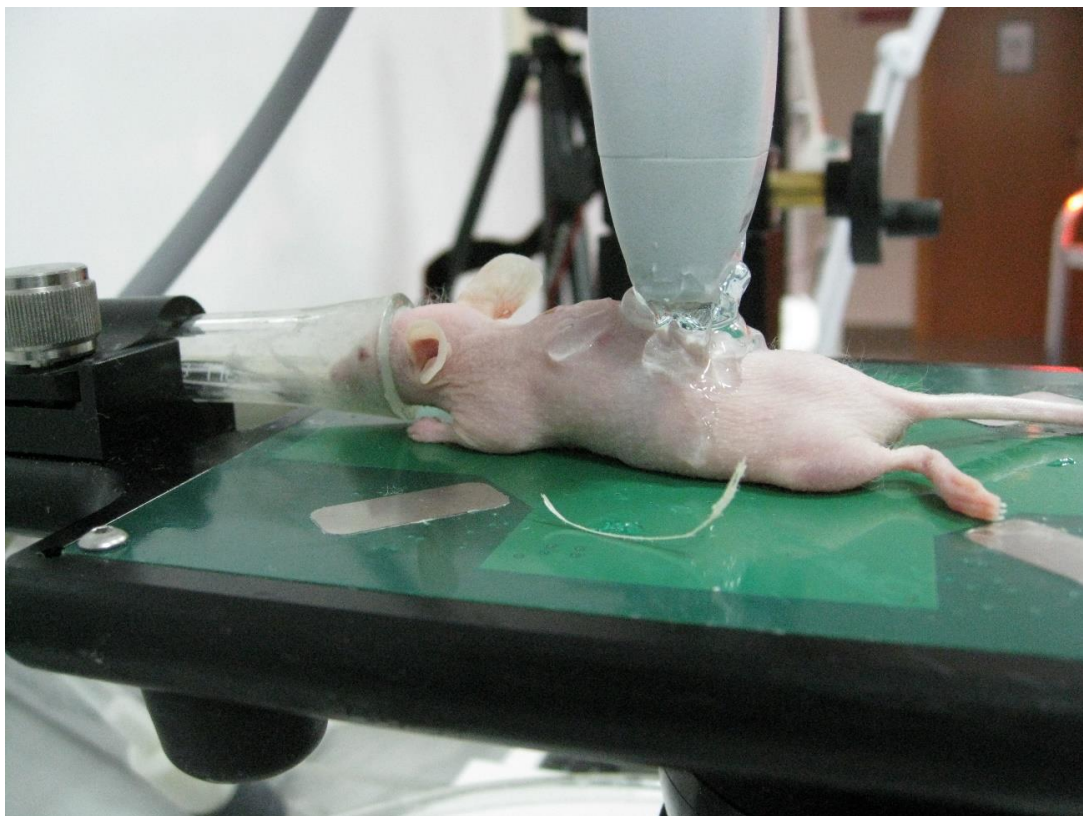


Ilustración 15: Registro ecográfico de las lesiones cutáneas mediante un ecógrafo



Ilustración 16: Eutanasia de los animales utilizando una cámara de CO2



Ilustración 17: Toma de muestras de la histológicos de las zonas de lesión

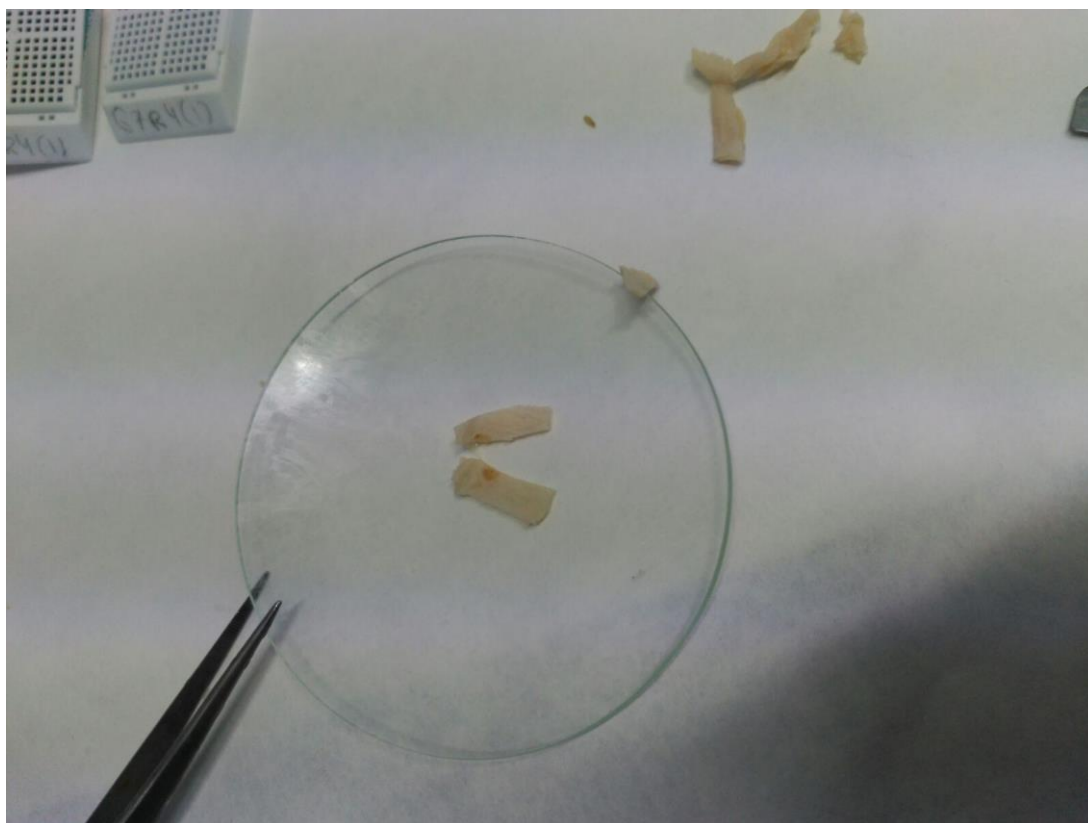


Ilustración 18: Preparación de los cortes histológicos para su posterior análisis histológico e inmunohistoquímico.

4.2.5.3. Muestreos.

4.2.5.3.1. Control de la salud y el estado físico de los animales

- Evaluación diaria del comportamiento y estado físico general.
- Registro del peso corporal (cada 72 horas).
- Control de las deposiciones.
- Evaluación del aspecto externo de las lesiones inducidas antes de la aplicación de cada tratamiento.

4.2.5.3.2. Estudio macroscópico

Se realizaron fotografías de las lesiones (previamente a la aplicación de los tratamientos), pertenecientes a los animales que permanecen en el estudio. Para el estudio de las lesiones macroscópicas los animales fueron anestesiados mediante inhalación de isoflurano (Isoflurin 1000 mg/ml, Fatro Ibérica S.L.) junto a papel milimetrado (cámara digital Canon EOS-500D). La distancia de foco a las lesiones fue de 15 cm.

4.2.5.3.3. Registro ecográfico

Se realizó empleando un sistema de ultramicrosonografía (Vevo® 3100, Visualsonic Inc., Toronto, Canadá), valorando la evolución y vascularización de la lesión mediante modo B, y Doppler respectivamente con una sonda de 70 MHz.

Se realizó estudio ecográfico in vivo; para la realización del protocolo, cada animal fue anestesiado con inhalación de isoflurano 1.00mg/g. Las ecografías se realizaron en modo B con sentido horizontal, haciendo el barrido por la piel del lomo y obteniendo la imagen más representativa.

4.2.5.3.4. Registro histológico. Procedimiento de eutanasia.

Tras los experimentos, se procedió al protocolo de sacrificio de los animales mediante sobredosis de CO₂ en cámara de eutanasia, y posterior necropsia de todos los animales del estudio. En el momento de realizar el sacrificio programado de cada animal se obtuvieron muestras del tejido cicatricial de ambas heridas para la valoración histológica de la evolución del proceso de cicatrización

Las muestras de piel se fijaron con formalina 10% tamponada a pH 7.2 durante un mínimo de 24h.

4.2.5.4. Análisis de los registros.

4.2.5.4.1. Análisis de los registros fotográficos

Para el estudio de los registros fotográficos se utilizó un software de análisis de imágenes con el que se midió el diámetro, la circunferencia y el área de cada herida en cada tiempo de estudio (Analysing digital imaging, Global System Science, University of California, Berkeley, EEUU, <http://dew.globalsystemscience.org/software>). Estos registros fueron procesados con el programa *Imagen J* para la cuantificación macroscópica de la

evolución del proceso de cicatrización. El calibrado se llevó a cabo utilizando la regla milimetrada colocada durante la obtención de la imagen.

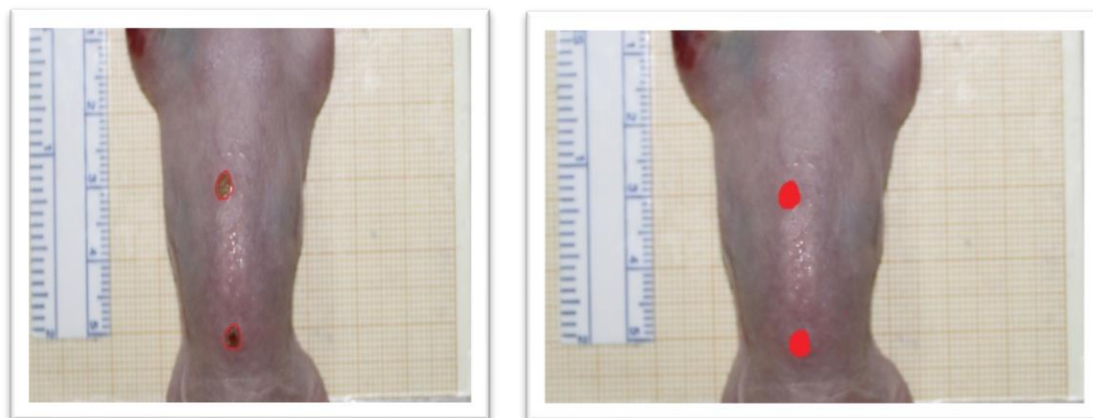


Ilustración 19: Perímetro y área de la lesión

Las fotografías fueron valoradas siguiendo un modelo de un estudio ciego con dos observadores independientes. El coeficiente de correlación entre los observadores fue de 0,96 y 0,97; calculado a partir de 20 medidas repetidas del perímetro y del área de la herida, respectivamente.

4.2.5.4.2. Análisis de los registros ecográficos

Mediante el antes mencionado software de análisis de imagen *Imagen J*, se evaluó la evolución de las lesiones teniendo en cuenta su vascularización, profundidad, área, y distancia entre bordes de la herida. Para el calibrado se utilizó como referencia la escala milimetrada incluida en el software del ecógrafo.

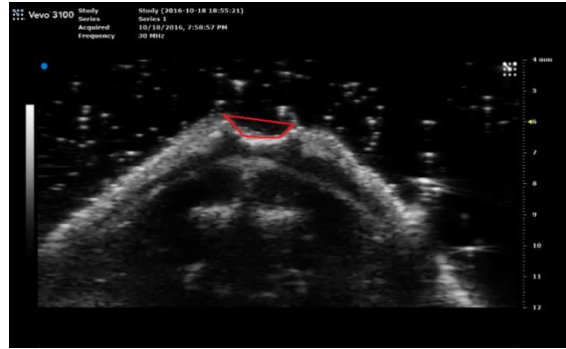


Ilustración 20: Perímetro de la lesión obtenido mediante ecografía modo B

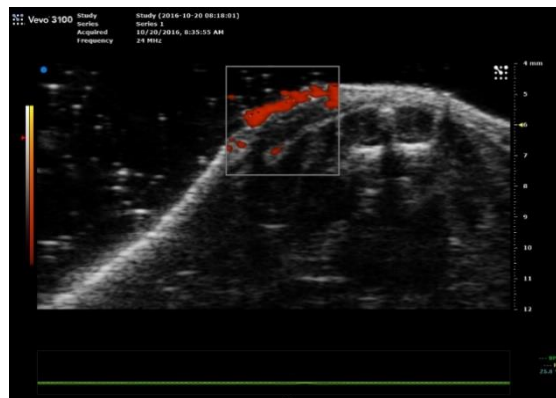


Ilustración 21: Vascularización de la zona de la lesión obtenida mediante ecografía Doppler

- Inflamación
- Reepitelización
- Vascularización

4.2.5.4.3. Estudio histopatológico

Para llevarlo a cabo se utilizó el microscopio Leica DM. Mediante una escala semicuantitativa se evaluó el grado de lesión, siendo 0 ausencia de lesión y 3 la máxima lesión observada en las muestras. La semicuantificación se ha hecho a ciegas por triplicado utilizando un microscopio óptico Axioscope (Zeiss™) acoplado a una cámara AxioCam MRc5 (Zeiss™).

Las alteraciones morfológicas que hemos considerado de interés para nuestro estudio han sido la presencia o ausencia de inflamación, reepitelización y vascularización. Para la valoración de la inflamación se le dio un valor de 1 a la nula/baja presencia de infiltrado inflamatorio, 2 a la presencia de un infiltrado inflamatorio medio, y 3 a aquellas

muestras donde el infiltrado inflamatorio era muy abundante. El grado de reepitelización se cuantificó dando un valor de 1 a aquellas heridas con un grado de cicatrización menor a 1/3 del tamaño de la lesión, 2 a aquellas cuyo grado de reparación estaba por encima de 1/3 pero aún no había reparación completa, y 3 cuando la reparación era total. En cuanto a la revascularización, la nula presencia de vasos se cuantificó como 1, la presencia de al menos 1 vaso se cuantificó como 2, y la presencia de 2 o más vasos como 3 o casi completa [96,97].

Técnicas y tinciones

Tinción para fibras elásticas de VerHoef-Van Gieson. Después de desparafinar e hidratar, se realizó un baño de 30 minutos con Hematoxilina de VerHoeff, lavado, un pase de cloruro férrico al 1%, lavado con agua corriente, un baño de pirofucsina, deshidratación y posterior aclaramiento con xilol previo al montaje. Esta técnica permite la tinción de fibras colágenas y elásticas. El colágeno, que capta el colorante ácido, se tiñe de rojo, las fibras elásticas de negro, así como los núcleos celulares, y el citoplasma de amarillo.

4.2.5.4.4. *Análisis inmunohistoquímico*

Fue realizado con la ayuda del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Reina Sofía de Murcia. Se realizó el estudio inmunohistoquímico de las pieles en todos los animales tratados y control.

Descripción del protocolo de tinción:

Se realizó en primer lugar la desparafinización en el equipo OMNIS-DAKO (Agilent) y se realizó un pretratamiento con EnVision FLEX, Low pH (n.º de catálogo GV805), (recuperación del epítipo inducida por calor (HIER) durante 30 min. El Anticuerpo listo para su uso estuvo incubando durante 20 min, con un control negativo FLEX Negative Control, Rabbit (n.º de catálogo GA600) al mismo tiempo.

La visualización se realizó mediante EnVision FLEX (n.º de catálogo GV800) + EnVision FLEX+ Rabbit LINKER (n.º de catálogo GV809) en un bloque durante 3 min de Link: 10 min; polímero: 20 min; y cromógeno: 5 min. Posteriormente se realizó

una contratinción con Hematoxylin (n.º de catálogo GC808) con un tiempo de 3 min de incubación. Después de la tinción, deshidratamos, enjuagamos y montamos los portaobjetos con un medio de montaje permanente (Eukit).

La desparafinización, rehidratación y recuperación del objetivo se realizan en el instrumento Dako Omnis. Todos los pasos de incubación se realizan a 32 °C en el instrumento Dako Omnis.

Tras de desparafinar y bloquear la peroxidasa endógena con agua oxigenada al 3% durante 30 minutos, se desenmascaró el antígeno de las muestras con tampón citrato (Panreac) a pH=6 en microondas a potencia 1 durante 10 minutos, y se dejaron enfriar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después se lavaron con PBS y se incubaron los tejidos con suero normal de cabra (Milipore) al 10% durante 1 hora a Tª ambiente. Después se incubaron las secciones con el anticuerpo primario monoclonal contra PCNA y CD34 (Dako) a dilución 1:200 durante toda la noche a 4°C. Más tarde, fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario Goat anti-mouse biotinado (Dako) durante 1 hora a Tª ambiente, y finalmente se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Cultek) a dilución 1:1000 durante 1 hora más a Tª ambiente. El revelado de la inmunotinción se hizo con diaminobenzidina (Sigma Aldrich) durante 3,5 minutos, y las muestras se contrastaron con Hematoxilina de Mayers.

Posteriormente procedimos la cuantificación semicuantitativa de la expresión de cada anticuerpo, realizada por dos patólogos experimentados, cegados, encargados de los resultados del estudio. Se valoró de una a tres cruces la intensidad del marcaje observada en la periferia de la herida cutánea, con una magnificación de 10x. El marcaje leve se valoró con una cruz (+), el moderado con dos (++) y el severo con tres (+++).

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína auxiliar necesaria para la síntesis y reparación del ADN. Ha sido ampliamente utilizado como biomarcador de proliferación celular en modelos similares de exéresis cutánea (Wu, 2016). Se entiende, que cuanto mayor sea la presencia de células PCNA positivas en la epidermis de los márgenes de la herida, existe una mayor actividad reparadora.

CD34 es una glicoproteína de 110 kD situada en la superficie celular que actúa como molécula de adhesión y se expresa selectivamente en células endoteliales de muchos tejidos y en células madre precursoras de la hematopoyesis. La cicatrización por segunda intención (con bordes separados), como es nuestro caso, requiere contracción por parte de los miofibroblastos, una proliferación celular abundante, y una gran formación de vasos, por lo que se decidió marcar inmunohistoquímicamente las células endoteliales para realizar una cuantificación vascular.

4.2.5.4.5. *Análisis estadístico*

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 23.0 para Windows. La normalidad de la distribución de las variables en todas las columnas de datos se analizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para el análisis estadístico descriptivo de la muestra se han empleado los métodos descriptivos básicos, de modo que, para las variables cualitativas, se ha obtenido el número de casos presentes en cada categoría y el porcentaje correspondiente; y para las variables cuantitativas, los valores mínimo, máximo, media y desviación típica. La correlación entre las variables se realizó mediante coeficiente de Rho de Spearman.

La comparación entre grupos se ha utilizado Anova y las diferencias consideradas estadísticamente significativas son aquellas cuya $p < 0.05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Estado de salud y bienestar de los animales

Para la evaluación del estado de salud y bienestar de los animales se registraron diariamente las siguientes variables:

- Comportamiento: No se detectaron alteraciones destacables en el comportamiento de los animales a estudio a lo largo de la fase experimental.
- Estado físico general: No se detectaron alteraciones destacables en el estado físico general de los animales a lo largo de la fase experimental.
- Aspecto de las deposiciones: No se detectaron alteraciones destacables en el aspecto de las deposiciones de los animales a estudio a lo largo de la fase experimental.
- Aspecto externo de las heridas: No se detectaron signos externos de inflamación y/o infección local, ni de reacciones de hipersensibilidad en ninguna de las heridas a lo largo de la fase experimental.

El comportamiento y la condición física general de los animales no se vieron afectados por las heridas inducidas ni por el procedimiento del diseño experimental. La utilización del bisturí circular para la creación de las heridas cutáneas es un método rápido y seguro, que produce una exposición superficial del tejido subcutáneo y del musculo esquelético.

Además del registro diario de las variables mencionadas, cada tres días se registró el peso de los animales

Peso de los animales distribuidos por los distintos grupos de tratamiento:

- GRUPO 1 ELASTINA 50
- GRUPO 2 ELASTINA 25
- GRUPO 3 HIDROLISIS P 50
- GRUPO 4 HIDROLISIS P 25
- GRUPO 5 PLACEBO

Grupo	Mín. de dif. peso	Máx. de dif. peso	Desviación de dif. peso	Desviación de dif. peso
1	-1	5	1,67	2,16
2	-2	2	-0,17	1,47
3	-4	4	0,33	2,73
4	-2	2	0,5	1,38
5	-4	5	0,33	3,01
Total	-4	5	0,53	2,18

Ilustración 22: tabla estadística comparación del peso de los animales

5.2. Estudio macroscópico

El estudio morfométrico se llevó a cabo para valorar la evolución de la respuesta inflamatoria en las diferentes fases del proceso de cicatrización y diariamente se realizó un control visual de las heridas, previo al tratamiento de los animales. El aspecto general de las heridas a lo largo del estudio fue, en general, satisfactorio. No se detectó la presencia de síntomas de infección local, en la inspección macroscópica de las escisiones, a lo largo de la fase experimental.

En el estudio macroscópico a los tres días:

Se observaron valores más altos en los ratones del grupo 4.

DESCRIPTIVO 3 DÍAS									
	Grupo	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Área (µm ²)	1	10	9107323,6	2884773,9	912245,61	7043680,67	11170966,6	5,82E+06	1,44E+07
	2	10	8214407,64	1332391,13	421339,07	7261272,45	9167542,84	6,03E+06	1,01E+07
	3	10	8557924,67	1366156,71	432016,685	7580635,03	9535214,31	5,74E+06	1,10E+07
	4	10	10720852,7	4044041,41	1278838,18	7827919,74	13613785,6	7,06E+06	2,08E+07
	5	10	8598576,81	2276918,04	720024,706	6969767,77	10227385,9	4,25E+06	1,23E+07
	Total	50	9039817,09	2637664	373022,02	8290201,27	9789432,9	4,25E+06	2,08E+07
Perímetro (µm)	1	10	11034,856	1851,98298	585,64844	9710,0272	12359,6848	8803,8	14443,7
	2	10	10510,3351	961,72653	304,12463	9822,3574	11198,3128	8942,89	11997,03
	3	10	10900,9537	1083,57463	342,65638	10125,8111	11676,0963	9287,61	13370,93
	4	10	11964,2218	2295,41334	725,87343	10322,182	13606,2616	9596,27	17297,04
	5	10	10755,7472	1412,94293	446,81179	9744,9887	11766,5057	7995,97	12907,71
	Total	50	11033,2228	1613,05021	228,11975	10574,799	11491,6466	7995,97	17297,04

Ilustración 23: tabla estudio macroscópico a los tres días

Al realizar el estudio comparativo para este período, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los grupos de estudio, como puede verse en la siguiente tabla:

ANOVA 3 DÍAS						
	Suma de cuadrados		gl	Media cuadrática	F	Sig.
Área (µm ²)	Entre grupos	3,9387E+13	4	9,8466E+12	1,47	0,227
	Dentro de grupos	3,0152E+14	45	6,7004E+12		
	Total	3,4091E+14	49			
Perímetro (µm)	Entre grupos	12346611,8	4	3086652,94	1,206	0,321
	Dentro de grupos	115148007	45	2558844,6		
	Total	127494619	49			

Ilustración 24: tabla análisis del estudio macroscópico a los tres días

Estudio macroscópico a los 7 días:

A los 7 días se observaron áreas menos extensas en el grupo 4.

DESCRIPTIVO 7 DÍAS									
	Grupo	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Área (µm ²)	1	10	4642333,08	2660038,66	841178,083	2739456,06	6545210,11	2095427	11145094
	2	10	7959626,12	2180592,56	689563,912	6399724,18	9519528,06	4234603	10903781
	3	10	4777908,63	1652444,37	522548,791	3595821,14	5959996,12	2706058	7647335
	4	10	4091824,29	1808793,66	571990,779	2797891,25	5385757,33	767838	6562907
	5	10	5970046,1	1397890,96	442051,935	4970055,15	6970037,05	4210387	8524372
	Total	50	5488347,64	2361185,64	333922,076	4817306,11	6159389,18	767838	11145094
Perímetro (µm)	1	10	7700,35	1899,442	600,656	6341,57	9059,13	5251	12018
	2	10	10194,88	1440,538	455,538	9164,38	11225,38	7502	12042
	3	10	7919,7	1305,331	412,782	6985,92	8853,47	6090	10003
	4	10	7254,81	1680,342	531,371	6052,77	8456,86	3857	9554
	5	10	9068,02	1261,945	399,062	8165,28	9970,76	7573	11157
	Total	50	8427,55	1824,906	258,081	7908,92	8946,18	3857	12042

Ilustración 25: tabla estudio macroscópico a los siete días

Al realizar el estudio comparativo de las áreas clínico-macroscópicas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos tratamiento a los 7 días. El grupo 2 tiene diferencias significativas respecto a los grupos 1, 3 y 4.

(grupo de tratamiento $p=0,005$; grupo de tratamiento 3 $p=0,007$; grupo de tratamiento 4 $p=0,001$). No se encuentran diferencias respecto al placebo ($p=0,185$)

El estudio del perímetro clínico-macroscópico, arroja diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos tratamiento. A los 7 días nos encontramos que el grupo 2 tiene diferencias significativas respecto a los grupos 1,3,4 (con el grupo de tratamiento 1 $p=0,006$); grupo de tratamiento 3 $p=0,015$; grupo de tratamiento 4 $p=0,001$). De nuevo no se observan diferencias respecto al placebo ($p=0,481$).

ANOVA 7 DÍAS						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Área(μm^2)	Entre grupos	9,51E+13	4	2,3775E+13	6,008	0,001
	Dentro de grupos	1,7808E+14	45	3,9574E+12		
	Total	2,7318E+14	49			
Perímetro(μm)	Entre grupos	56956959,2	4	14239239,8	6,032	0,001
	Dentro de grupos	106226768	45	2360594,84		
	Total	163183727	49			

Ilustración 26: tabla análisis del estudio macroscópico a los tres días

Estudio macroscópico a los 14 días:

DESCRIPTIVO 14 DÍAS									
	Grupo	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Área (µm²)	1	12	2443480,96	1054877,85	304517,006	1773243,55	3113718,38	860859	4446826
	2	12	2407381	582320,417	168101,425	2037392,26	2777369,74	1413874	3205297
	3	10	2465790,43	1109674,04	350909,743	1671977,44	3259603,42	780029	4255751
	4	10	1786560,13	765012,287	241918,126	1239303,31	2333816,95	624391	2785160
	5	12	2281058,81	994744,691	287158,058	1649028,19	2913089,44	1001402	3939149
	Total	56	2287617,05	919456,113	122867,491	2041385,1	2533849,01	624391	4446826
Perímetro (µm)	1	12	6478,92	1170,356	337,853	5735,31	7222,52	4586	8824
	2	12	6066,76	881,925	254,59	5506,41	6627,11	4490	7047
	3	12	5900,58	1303,107	376,175	5072,63	6728,53	3831	7775
	4	12	5496,86	1272,614	367,372	4688,28	6305,44	3038	7714
	5	12	6208,25	1707,558	492,929	5123,32	7293,18	3830	9816
	Total	60	6030,27	1292,86	166,908	5696,29	6364,25	3038	9816

Ilustración 27: tabla estudio macroscópico a los catorce días

Al final del periodo estudiado a los 14 días se aprecia la rápida evolución de la cicatrización en todos los grupos, no encontrando diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tratamientos realizados.

ANOVA 14 DÍAS						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Área (µm²)	Entre grupos	3,2922E+12	4	8,2305E+11	0,972	0,431
	Dentro de grupos	4,3205E+13	51	8,4715E+11		
	Total	4,6497E+13	55			
Perímetro (µm)	Entre grupos	6427713,62	4	1606928,41	0,959	0,438
	Dentro de grupos	92190014,1	55	1676182,08		
	Total	98617727,8	59			

Ilustración 28: tabla análisis del estudio macroscópico a los catorce días

ESTUDIO MACROSCÓPICO

DÍA 1

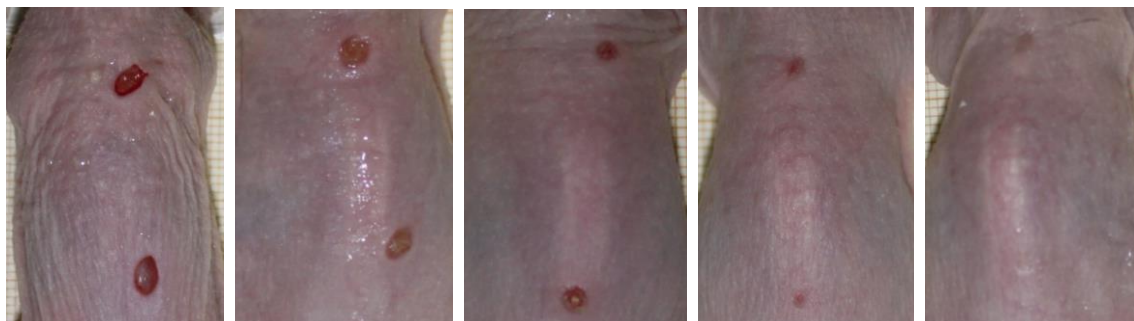
DÍA 3

DÍA 7

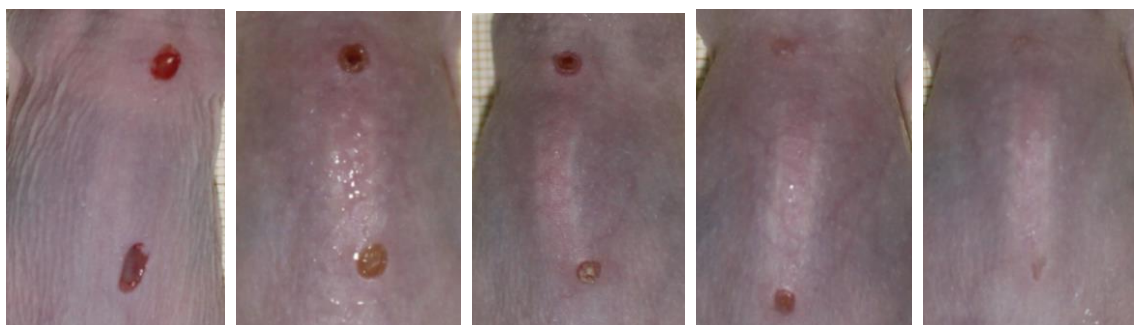
DÍA 10

DÍA 14

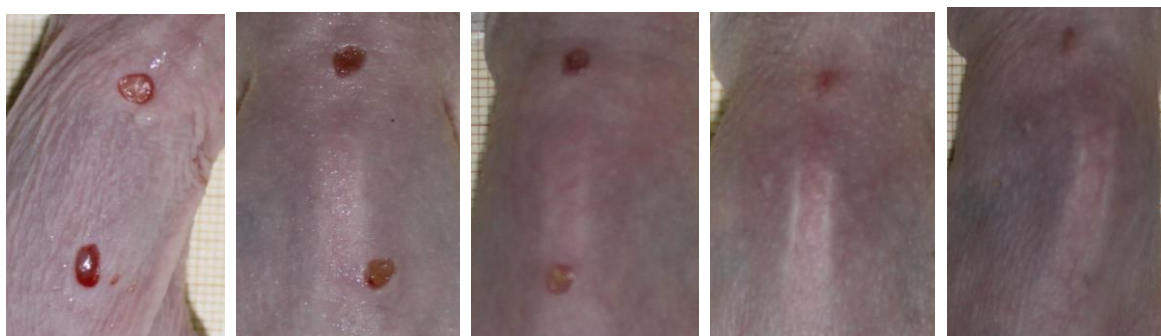
ELASTINA 50%



ELASTINA 25%



HIDRÓLISIS P-P 50%



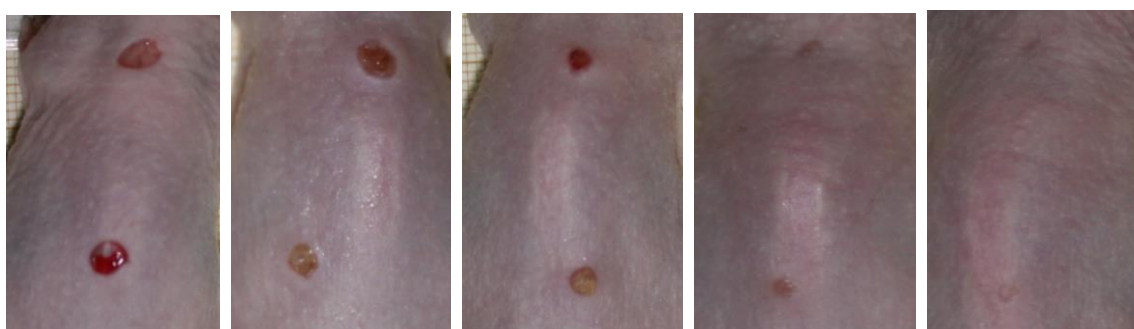
HIDRÓLISIS P-P 25%**PLACEBO**

Ilustración 29: Secuencia de imagen macroscópica en los distintos tiempos de estudio y grupos

5.3. Análisis imágenes ecográficas modo B

En la siguiente tabla podemos observar las diferentes medidas del área en los distintos grupos de tratamiento y diferentes períodos de tiempo:

DESCRIPTIVO									
	Grupo	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Área eco día 3 (µm²)	1	12	2243534,45	387177,401	111768,488	1997533,67	2489535,24	1,74E+06	2,92E+06
	2	12	2746875,96	447349,053	129138,548	2462643,93	3031107,99	1,99E+06	3,37E+06
	3	12	2706254,64	546177,332	157667,815	2359230,12	3053279,16	1,89E+06	3,74E+06
	4	12	2514004,08	670454,154	193543,443	2088017,84	2939990,33	1,79E+06	4,21E+06
	5	12	3348270,82	1220031,13	352192,65	2573100,03	4123441,62	1,66E+06	5,07E+06
	Total	60	2711787,99	785747,678	101439,589	2508807,84	2914768,14	1,66E+06	5,07E+06

Área eco día 7 (μm^2)	1	12	2026346,54	899013,624	259522,879	1455140,53	2597552,54	548255,14	4314292,14
	2	12	2791136,77	897732,874	259153,158	2220744,52	3361529,03	1540331,54	4577199,15
	3	12	2082160,44	561083,726	161970,92	1725664,84	2438656,03	1341030	3168015,58
	4	12	1897021,78	578303,243	166941,766	1529585,43	2264458,13	1202791,88	3301950,31
	5	12	1963280,38	433399,317	125111,606	1687911,59	2238649,16	1051574,25	2878973,91
	Total	60	2151989,18	751507,772	97019,2362	1957854,14	2346124,22	548255,14	4577199,15
Área eco día 14 (μm^2)	1	12	643600	254712,615	73529,1985	481763,325	805436,675	366000	1,07E+06
	2	12	534400	170054,964	49090,6397	426352,231	642447,77	215600	823200
	3	12	871333,333	428576,208	123719,295	599029,002	1143637,66	378400	1,88E+06
	4	12	479000	166845,165	48164,0505	372991,64	585008,36	165200	720000
	5	11	436945,455	144336,748	43519,1669	339978,708	533912,201	194800	668000
	Total	59	595701,695	293367,3	38193,1694	519249,76	672153,63	165200	1,88E+06

Ilustración 30: Resultados de la ecografía modo B.

Al realizar el estudio comparativo, en las distintas áreas se aprecian diferencias entre los tiempos; así, en el área día 3 se observan diferencias entre los distintos grupos $p=0,008$. También hay diferencias estadísticamente significativas en el día 3 en los grupos 1 y 5 ($p=0,004$) y entre el grupo 4 y 5 ($p=0,047$)

En el día 7 las diferencias se encuentran en el grupo tratamiento 2 con respecto al grupo 4 ($p=0,023$) y grupo 5 ($p=0,041$).

ANOVA		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Área eco día 3 (μm^2)	Entre grupos	7,977E+12	4	1,9943E+12	3,855	0,008
	Dentro de grupos	2,845E+13	55	5,1726E+11		
	Total	3,6427E+13	59			
Área eco día 7 (μm^2)	Entre grupos	6,3575E+12	4	1,5894E+12	3,242	0,019
	Dentro de grupos	2,6964E+13	55	4,9025E+11		
	Total	3,3321E+13	59			
Área eco día 14 (μm^2)	Entre grupos	1,425E+12	4	3,5624E+11	5,393	0,001
	Dentro de grupos	3,5668E+12	54	6,6051E+10		
	Total	4,9917E+12	58			

Ilustración 31: Análisis estadístico de la ecografía modo B.

En cuanto al perímetro, se hallaron en los distintos periodos de estudio y en los diferentes tratamientos aplicados diferencias estadísticamente significativas:

DESCRIPTIVO									
	Grupo	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Perim. Eco día 3 (µm)	1	12	8384,943	1329,94805	383,92293	7539,9327	9229,95	6293,4	11387,58
	2	12	8790,686	770,84239	222,52303	8300,9147	9280,4545	7004,06	9549
	3	12	7902,143	820,76523	236,93451	7380,652	8423,6307	6449,27	9371,61
	4	12	8210,1105	1039,07293	299,95452	7549,9151	8870,3059	6404,39	10282,24
	5	12	8604,9021	1251,66636	361,32496	7809,6312	9400,1729	5886,68	10752,95
	Total	60	8378,556	1075,38042	138,83102	8100,7557	8656,3562	5886,68	11387,58
Perim. Eco día 7 (µm)	1	12	6313,762	1382,8871	399,20512	5435,1175	7192,4065	3344,61	8608,77
	2	12	7815,5494	1313,74153	379,24451	6980,8379	8650,261	5259,87	10152,1
	3	12	6915,6846	1090,8109	314,88998	6222,6164	7608,7528	5576,16	9063,24
	4	12	6003,444	740,01221	213,62312	5533,2627	6473,6253	5098,62	7805,25
	5	12	6152,1713	808,18953	233,30422	5638,6721	6665,6704	4233,55	7262,93
	Total	60	6640,1223	1254,20523	161,9172	6316,1267	6964,1178	3344,61	10152,1
Perim. Eco día 14 (µm)	1	12	3280,7233	721,27324	208,21365	2822,4482	3738,9985	2525,17	4795,99
	2	12	3071,9224	478,57906	138,15388	2767,8478	3375,997	2219,2	4041,4
	3	12	3827,0374	993,7524	286,87161	3195,6373	4458,4376	2584,86	5668,14
	4	12	2861,5999	564,47987	162,9513	2502,9465	3220,2533	1731,85	3577,5
	5	11	2747,0154	516,10403	155,61122	2400,292	3093,7388	1818,4	3273,66
	Total	59	3164,6198	763,6601	99,42008	2965,6089	3363,6307	1731,85	5668,14

Ilustración 32: Resultados perímetro ecográfico modo B

Al realizar estudio comparativo encontramos diferencias en los días 7 y 14.

En los valores de los perímetros, en el día 7 se encuentran diferencias entre el grupo 2 con respecto al grupo 1 ($p=0,12$), grupo 4($p=0,02$) y grupo 5($p=0,004$)

ANOVA		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Perím. Eco día 3 (μm)	Entre grupos	5717617,35	4	1429404,34	1,258	0,298
	Dentro de grupos	62512522,9	55	1136591,33		
	Total	68230140,3	59			
Perím. Eco día 7 (μm)	Entre grupos	26490360,1	4	6622590,03	5,492	0,001
	Dentro de grupos	66318454,1	55	1205790,08		
	Total	92808814,2	59			
Perím. Eco día 14 (μm)	Entre grupos	8550619,93	4	2137654,98	4,567	0,003
	Dentro de grupos	25273631,6	54	468030,215		
	Total	33824251,5	58			

Ilustración 33: Análisis estadísticos de los resultados ecografía modo B

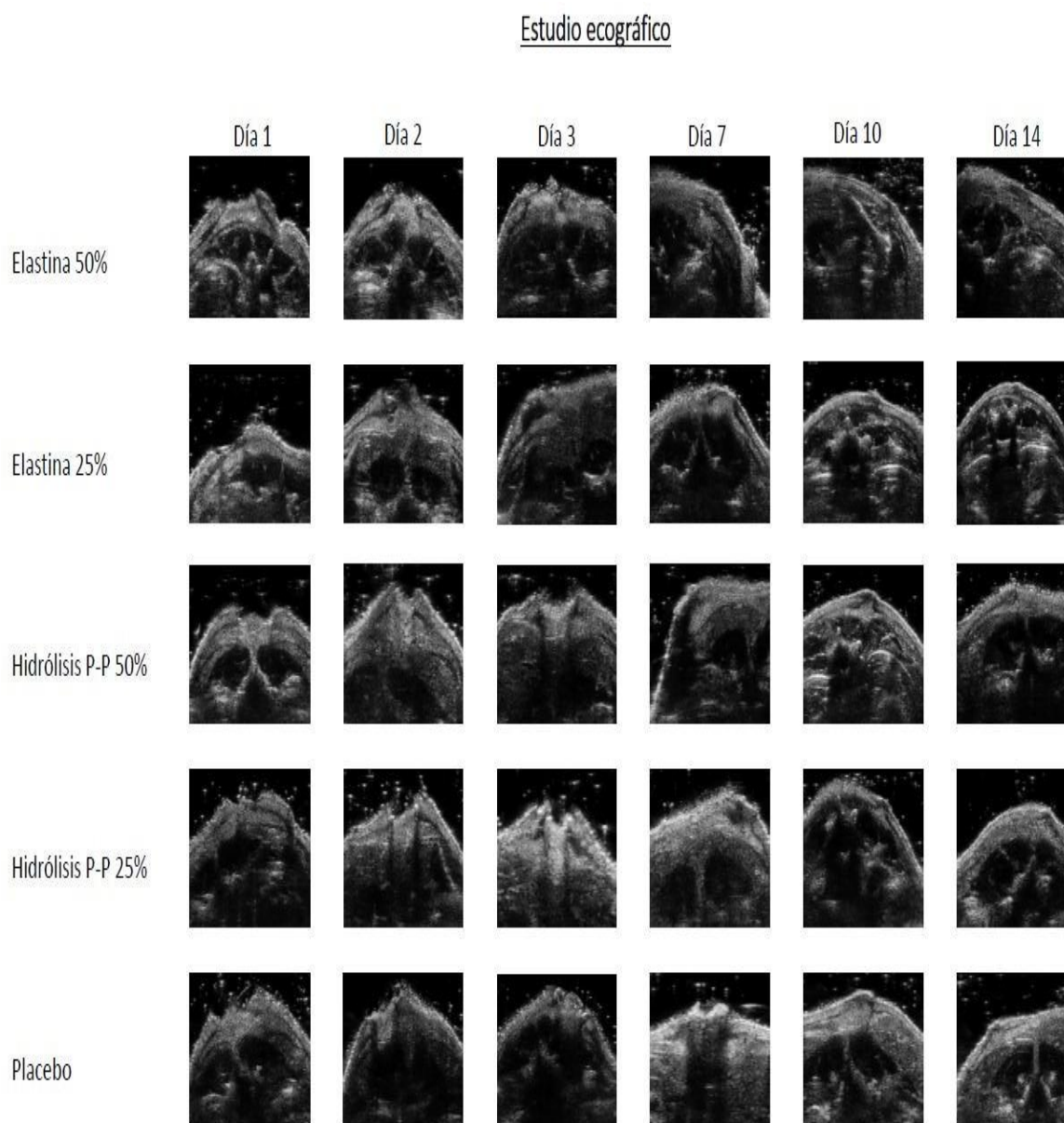


Ilustración 34: Secuencia de imágenes ecográficas modo B en los distintos tiempos de estudio

5.4. Análisis imágenes ecográficas eco-Doppler.

Tras el estudio de los resultados de las imágenes ecográficas eco-doppler a los 3, 7, 14 días, se describieron los valores medios junto con los intervalos de confianza al 95% del área y porcentaje de área, encontrando diferencias significativas entre área y porcentaje de área en el día 3 del tratamiento post-cirugía.

DESCRIPTIVO	Grupo	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Área eco-doppler día 3 (μm ²)	1	12	2136632,95	1208688,07	348918,192	1368669,18	2904596,71	707007,73	4,71E+06
	2	12	2674535,00	1148583,69	331567,55	1944759,75	3404310,26	1,24E+06	4,71E+06
	3	12	2213127,09	966044,701	278873,084	1599331,57	2826922,61	809042,24	3,38E+06
	4	12	1419472,54	558665,238	161272,763	1064513,58	1774431,5	804092,8	2,77E+06
	5	12	1602538,17	584959,354	168863,22	1230872,73	1974203,62	718429,5	2,80E+06
	Total	60	2009261,15	1010189,26	130414,873	1748301,59	2270220,71	707007,73	4,71E+06
Área eco-doppler día 7 (μm ²)	1	12	1545343,86	726884,005	209833,338	1083503,8	2007183,93	567381	3325470
	2	12	2030021,34	1191639,43	343996,673	1272889,77	2787152,91	652698	4698585
	3	12	1533642,98	941513,967	271791,671	935433,55	2131852,42	309898	3079082
	4	12	1471408,39	742072,574	214217,9	999917,97	1942898,81	540599	3181999
	5	12	1398269,98	576142,628	166318,051	1032206,42	1764333,54	405163	2470765
	Total	60	1595737,31	862446,917	111341,418	1372943,65	1818530,97	309898	4698585
Área eco-doppler día 14 (μm ²)	1	12	1619343,11	934843,398	269866,044	1025371,96	2213314,27	331705	3113516
	2	12	2026546,15	807212,853	233022,279	1513667,57	2539424,73	581154	3036232
	3	12	2874907,09	1229830,4	355021,457	2093510,14	3656304,05	604874	5127086
	4	12	2244016,54	1123110,57	324214,094	1530426,13	2957606,95	625534	3746702
	5	12	1949964,43	1003744,89	289756,191	1312215,36	2587713,51	840167	3529008
	Total	60	2142955,47	1080073,55	139436,895	1863942,88	2421968,05	331705	5127086
Porcentaje área día 3	1	12	0,9158	0,51791	0,14951	0,5867	1,2448	0,3	2,02
	2	12	1,1153	0,47512	0,13716	0,8135	1,4172	0,53	1,93
	3	12	0,9081	0,39636	0,11442	0,6562	1,1599	0,33	1,39
	4	12	0,5823	0,22924	0,06618	0,4366	0,7279	0,33	1,14
	5	12	0,6573	0,23999	0,06928	0,5048	0,8098	0,3	1,15
	Total	60	0,8358	0,42395	0,05473	0,7262	0,9453	0,3	2,02
Porcentaje área día	1	12	0,66	0,31	0,089	0,46	0,86	0	1
	2	12	0,87	0,508	0,147	0,54	1,19	0	2
	3	12	0,65	0,402	0,116	0,4	0,91	0	1
	4	12	0,63	0,316	0,091	0,43	0,83	0	1
	5	12	0,60	0,246	0,071	0,44	0,75	0	1
	Total	60	0,68	0,368	0,047	0,59	0,78	0	2
Porcentaje área día 14	1	12	0,69	0,399	0,115	0,44	0,94	0	1
	2	12	0,86	0,344	0,099	0,65	1,08	0	1
	3	12	1,23	0,525	0,151	0,89	1,56	0	2
	4	12	0,96	0,479	0,138	0,65	1,26	0	2
	5	12	0,83	0,428	0,124	0,56	1,1	0	2
	Total	60	0,91	0,461	0,059	0,79	1,03	0	2

Ilustración 35: Resultados de la ecografía Doppler.

En el día 14 se obtienen diferencias del grupo 3 con respecto grupo 4 ($p=0,009$) y grupo 5 ($p=0,003$).

Se pueden ver en el área del día 3, diferencias significativas entre el grupo 2 y 4 ($p=0,015$); a los 7 días no se hallaron diferencias y a los 14 días sí que se aprecian diferencias entre el grupo 1y 3($p=0,033$). Lo mismo sucede respecto al porcentaje de área, encontrando diferencias en los días 3 y 14.

ANOVA		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Área eco-doppler día 3 (μm^2)	Entre grupos	1,2164E+13	4	3,0409E+12	3,481	0,013
	Dentro de grupos	4,8045E+13	55	8,7354E+11		
Total		6,0208E+13	59			
Área eco-doppler día 7 (μm^2)	Entre grupos	2,9934E+12	4	7,4835E+11	1,007	0,412
	Dentro de grupos	4,0892E+13	55	7,4349E+11		
Total		4,3885E+13	59			
Área eco-doppler día 14 (μm^2)	Entre grupos	1,0451E+13	4	2,6128E+12	2,462	0,056
	Dentro de grupos	5,8376E+13	55	1,0614E+12		
Total		6,8827E+13	59			
Porcentaje área día 3	Entre grupos	2,231	4	0,558	3,663	0,01
	Dentro de grupos	8,374	55	0,152		
Total		10,604	59			
Porcentaje área día 7	Entre grupos	0,545	4	0,136	1,007	0,412
	Dentro de grupos	7,439	55	0,135		
Total		7,984	59			
Porcentaje área día 14	Entre grupos	1,902	4	0,475	2,463	0,056
	Dentro de grupos	10,618	55	0,193		
Total		12,52	59			

Ilustración 36: Análisis estadístico de los resultados de la ecografía doppler

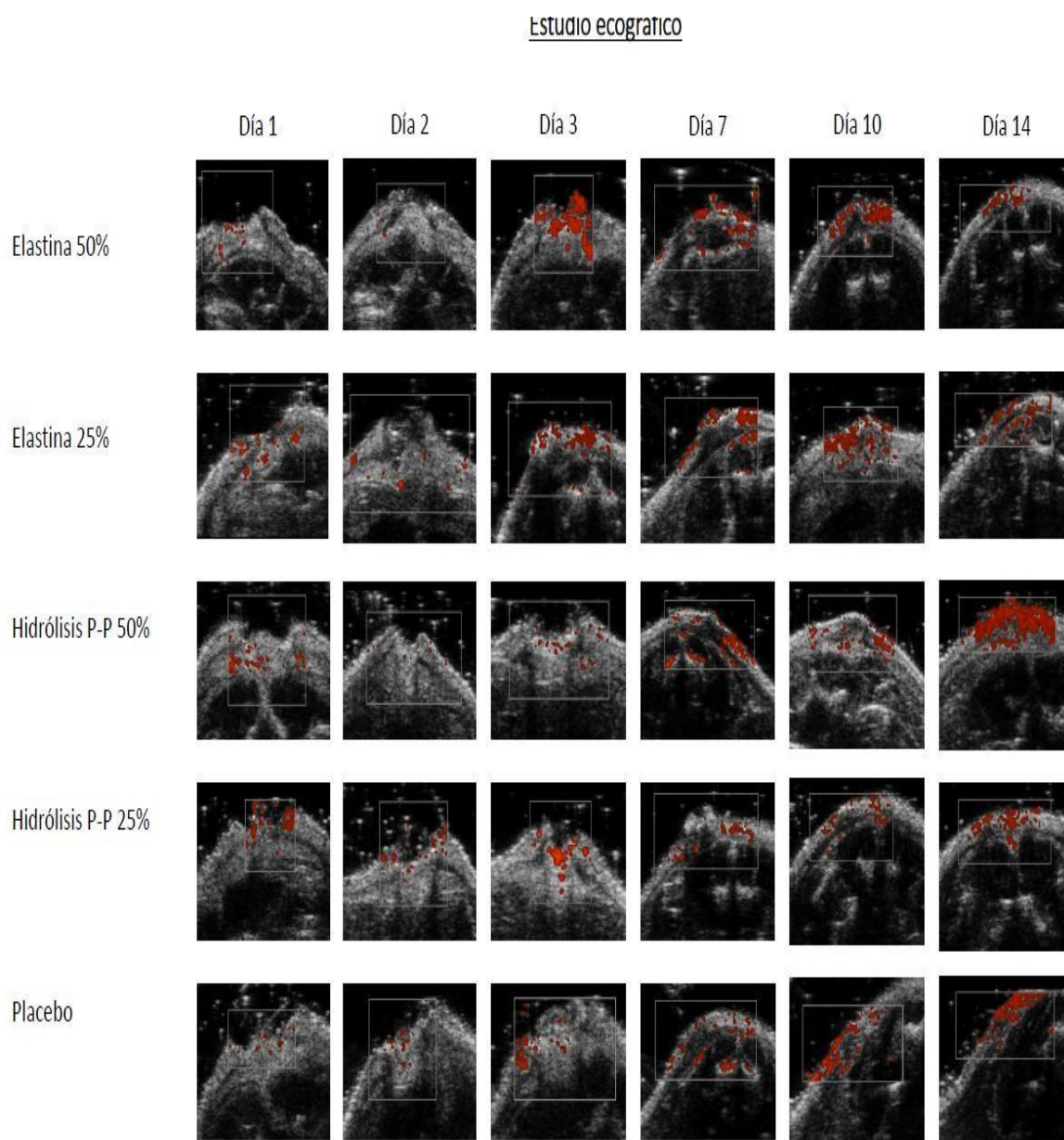


Ilustración 37: Secuencia de la imagen ecográfica doppler en los distintos tiempos y diferentes grupos

5.5. Estudio variables evolución histológica del proceso de cicatrización.

A continuación, se detalla el resumen de los resultados obtenidos en la evaluación histológica de las muestras recogidas los días 3, 7, y 14.

DESCRIPTIVO DÍA 3									
	N		Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Inflamación	1	8	2,125	0,83452	0,29505	1,4273	2,8227	1	3
	2	8	2,375	0,51755	0,18298	1,9423	2,8077	2	3
	3	7	2,4286	0,53452	0,20203	1,9342	2,9229	2	3
Total		23	2,3043	0,63495	0,1324	2,0298	2,5789	1	3
Reepitelización	1	8	1	0	0	1	1	1	1
	2	8	1	0	0	1	1	1	1
	3	7	1,2857	0,48795	0,18443	0,8344	1,737	1	2
Total		23	1,087	0,2881	0,06007	0,9624	1,2115	1	2
Vascularización	1	8	1,75	0,88641	0,31339	1,0089	2,4911	1	3
	2	8	1,125	0,35355	0,125	0,8294	1,4206	1	2
	3	7	1,5714	0,53452	0,20203	1,0771	2,0658	1	2
Total		23	1,4783	0,66535	0,13873	1,1905	1,766	1	3

Ilustración 38: Resultados histológicos día tres

ANOVA DÍA 3						
	Suma de cuadrados		gl	Media cuadrática	F	Sig
Inflamación	Entre grupos	0,405	2	0,203	0,479	0,626
	Dentro de grupos	8,464	20	0,423		
	Total	8,87	22			
Reepitelización	Entre grupos	0,398	2	0,199	2,783	0,086
	Dentro de grupos	1,429	20	0,071		
	Total	1,826	22			
Vascularización	Entre grupos	1,65	2	0,825	2,04	0,156
	Dentro de grupos	8,089	20	0,404		
	Total	9,739	22			

Ilustración 39: Análisis estadístico resultados histológicos día tres

DESCRIPTIVO DÍA 7									
		N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Inflamación	1	6	2,8333	0,40825	0,16667	2,4049	3,2618	2	3
	2	5	2,8	0,44721	0,2	2,2447	3,3553	2	3
	3	4	2	0,8165	0,40825	0,7008	3,2992	1	3
	4	4	1,25	0,5	0,25	0,4544	2,0456	1	2
	5	6	2,1667	0,40825	0,16667	1,7382	2,5951	2	3
	Total	25	2,28	0,73711	0,14742	1,9757	2,5843	1	3
Reepitelización	1	6	1,8333	0,40825	0,16667	1,4049	2,2618	1	2
	2	5	1,8	0,44721	0,2	1,2447	2,3553	1	2
	3	4	2	0,8165	0,40825	0,7008	3,2992	1	3
	4	4	2,25	0,95743	0,47871	0,7265	3,7735	1	3
	5	5	1,6	0,54772	0,24495	0,9199	2,2801	1	2
	Total	24	1,875	0,61237	0,125	1,6164	2,1336	1	3
Vascularización	1	6	1	0	0	1	1	1	1
	2	5	1,4	0,89443	0,4	0,2894	2,5106	1	3
	3	4	1,75	0,5	0,25	0,9544	2,5456	1	2
	4	4	2,25	0,95743	0,47871	0,7265	3,7735	1	3
	5	6	1,3333	0,5164	0,21082	0,7914	1,8753	1	2
	Total	25	1,48	0,71414	0,14283	1,1852	1,7748	1	3

Ilustración 40: Resultados histológicos día siete

ANOVA DÍA 7						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inflamación	Entre grupos	7,823	4	1,956	7,498	0,001
	Dentro de grupos	5,217	20	0,261		
	Total	13,04	24			
Reepitalización	Entre grupos	1,042	4	0,26	0,652	0,632
	Dentro de grupos	7,583	19	0,399		
	Total	8,625	23			
Vascularización	Entre grupos	4,207	4	1,052	2,618	0,066
	Dentro de grupos	8,033	20	0,402		
	Total	12,24	24			

Ilustración 41: Análisis estadístico de las variables histológicas día siete

En el estudio comparativo a los 7 días, se observa que existen variables significativas

en la $p=0,001$ inflamación entre los distintos grupos. También se aprecia que existen diferencias significativas del grupo 4 con los grupos 1,2, y 5.

DESCRIPTIVO DÍA 14	Grupo	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Inflamación	1	5	1	0	0	1	1	1	1
	2	8	1	0	0	1	1	1	1
	3	6	1	0	0	1	1	1	1
	4	8	1	0	0	1	1	1	1
	5	6	1	0	0	1	1	1	1
	Total	33	1	0	0	1	1	1	1
Reepitelización	1	5	3	0	0	3	3	3	3
	2	8	3	0	0	3	3	3	3
	3	6	2,8333	0,40825	0,16667	2,4049	3,2618	2	3
	4	8	3	0	0	3	3	3	3
	5	6	3	0	0	3	3	3	3
	Total	33	2,9697	0,17408	0,0303	2,908	3,0314	2	3
Vascularización	1	5	2	0	0	2	2	2	2
	2	8	1,875	0,99103	0,35038	1,0465	2,7035	1	3
	3	6	1,6667	0,8165	0,33333	0,8098	2,5235	1	3
	4	8	2	0,92582	0,32733	1,226	2,774	1	3
	5	6	1,6667	0,8165	0,33333	0,8098	2,5235	1	3
	Total	33	1,8485	0,79535	0,13845	1,5665	2,1305	1	3

Ilustración 42: Resultados del análisis microscópico día catorce

A los 14 días, las variables microscópicas de inflamación habían disminuido en todos los grupos. En cada uno de los grupos se observan animales que han reepitelizado total o parcialmente la úlcera. Respecto a la neovascularización, aunque no hay diferencias claras, se observa una tendencia a incrementar el número de vasos en los animales.

ANOVA DÍA 14		Suma cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inflamación	Entre grupos	0	4	0	.	.
	Dentro de grupos	0	28	0		
	Total	0	32			
Reepitelización	Entre grupos	0,136	4	0,034	1,145	0,356
	Dentro de grupos	0,833	28	0,03		
	Total	0,97	32			
Vascularización	Entre grupos	0,701	4	0,175	0,251	0,907
	Dentro de grupos	19,542	28	0,698		
	Total	20,242	32			

Ilustración 43: Análisis estadístico de las variables microscópicas día catorce

En el estudio comparativo a los 14 días, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos estudiados.

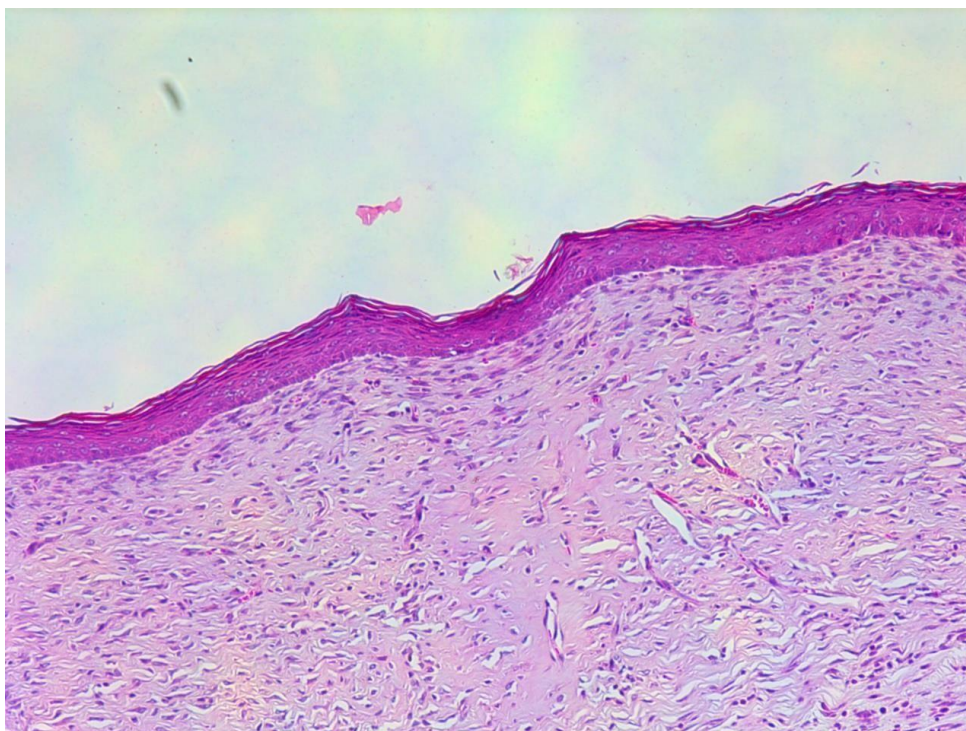


Ilustración 44: Tinción hematosilina-eosina

A continuación, se muestra una tabla donde se recogen las siguientes valoraciones:

- Hematosilina-eosina (H.E): hemos valorado la presencia o ausencia de herida (SI o NO). En cuanto a la presencia de heridas, en el tiempo más corto (3 días), en todos los grupos la incidencia era alta, pero destacaba el grupo tratado con HP al 50%, donde solamente el 60% de los animales presentaba herida.

- PCNA (Proliferating cell nuclear antigen): de 0 a 3, solamente en los casos en los que hay herida. Se ha hecho la media aritmética.

- Van Gieson (EVG): hemos vuelto a valorar, como con la HE, la intensidad del infiltrado. También es valorable la intensidad de la coloración del colágeno, que indica su grado de maduración.

- CD 34 (cúmulo de diferenciación 34): de 0 a 3, solamente en los casos en los que hay herida. Se ha hecho la media aritmética.

Grupo	Herida	HE	PCNA	EVG	CD 34
Elastina 50% día 3	(100%)	2,6	1	2,6	2,5
Elastina 50% día 7	(33,3 %)	2,5	1	3	1
Elastina 50% día 14	(20%)	0	-	1	-
Elastina 25% día 3	(66,6%)	2	-	2	1
Elastina 25% día 7	(80%)	2,25	2,75	2,25	2,5
Elastina 25% día 14	(0%)	-	-	-	-
HP 50% día 3	(60%)	2	2	2	2
HP 50% día 7	(40%)	3	3	3	2
HP 50% día 14	(0,16%)	3	3	3	3
HP 25% día 3	(100%)	2,5	-		3
HP 25% día 7	(66,6%)	2	2	2	2,33
HP 25% día 14	0 (0%)	-	-	-	-
Placebo 3 días	(75 %)	2,66	1	2,33	1,33
Placebo 7 días	(75 %)	2	1,5	2	2,5
Placebo 14 días					

Ilustración 45: Estudio histopatológico.

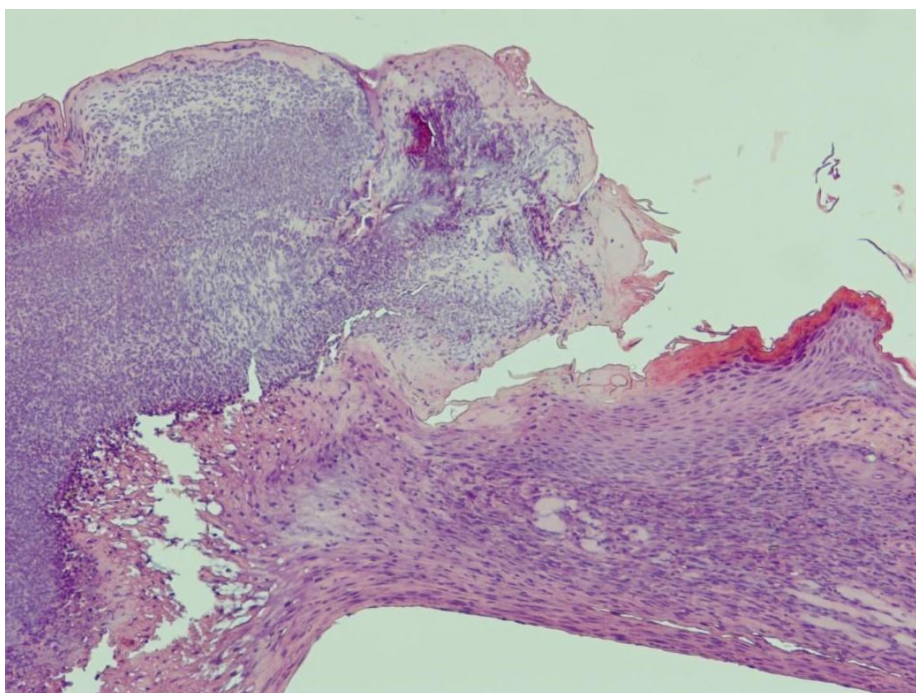


Ilustración 46: Ratón 4 del grupo 1 (Elastina 50% día 3). Se observa costra serohemática con gran infiltrado inflamatorio, bajo la cual hay tejido de granulación con abundantes fibroblastos secretorios. La epidermis en la periferia se muestra hiperplásica. En la dermis periférica también hay infiltrado inflamatorio severo (grado 3), formado fundamentalmente por polimorfonucleares neutrófilos. HE 10x.

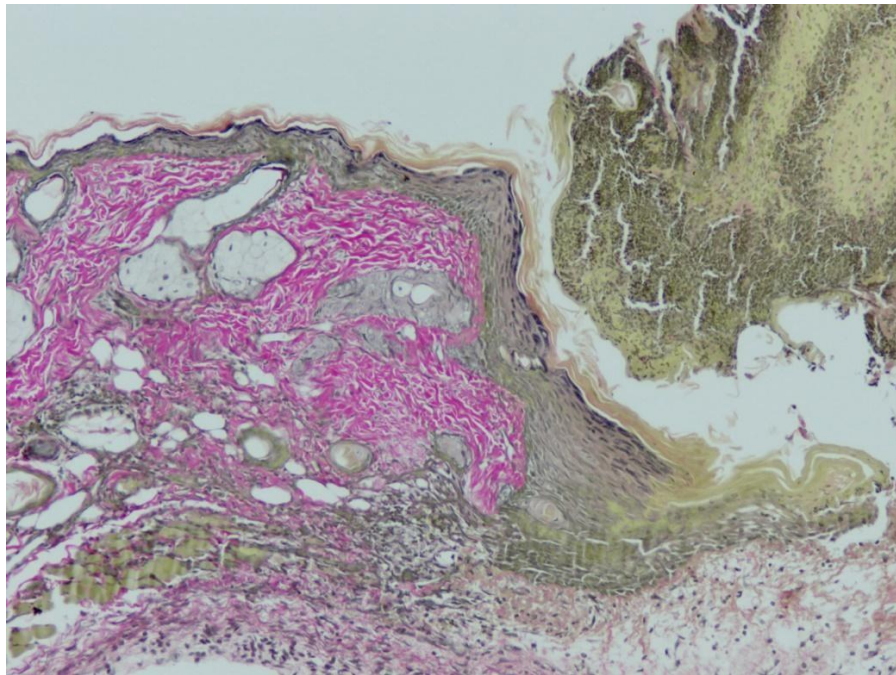


Ilustración 47: Ratón 0 del grupo 1 (Elastina 50% día 3). Podemos observar la ruptura de la red colágena dérmica en los márgenes de la herida (fucsia), así como de la capa muscular (fibras amarillas abajo izquierda), que son sustituidas por tejido de granulación. EVG 10x.

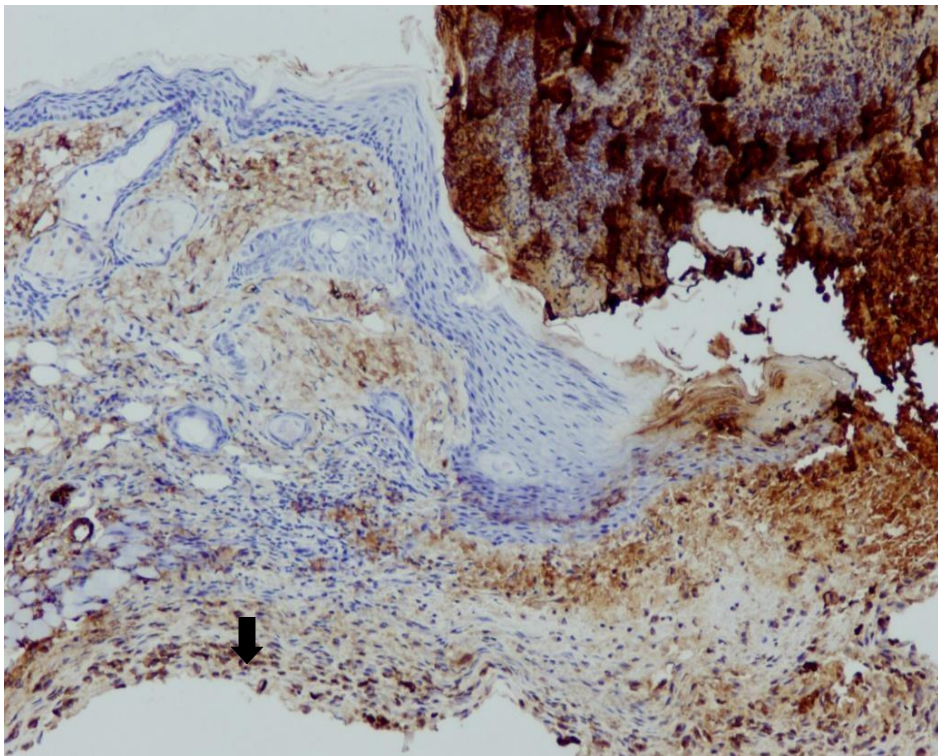


Ilustración 48: Ratón 0 del grupo 1 (Elastina 50% día 3). No se observan gran cantidad de nuevos vasos. CD 34 10x.

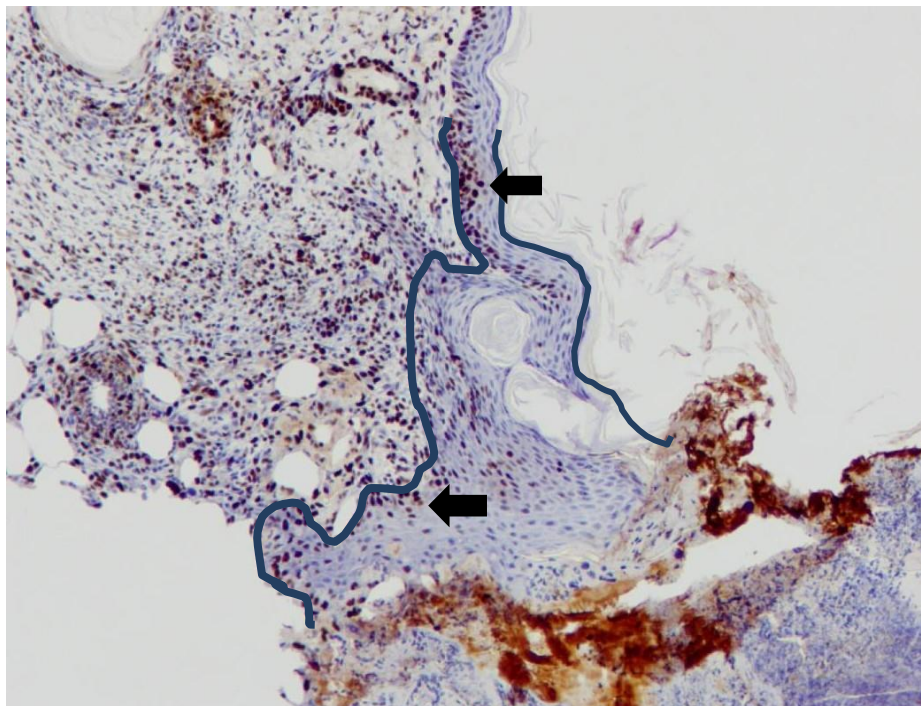


Ilustración 49: Ratón 0 del grupo 5 (Elastina 25% día 7). Las células del infiltrado son positivas, pero en la epidermis (delimitada por las líneas azules), el marcaje es leve/moderado. PCNA 10x.

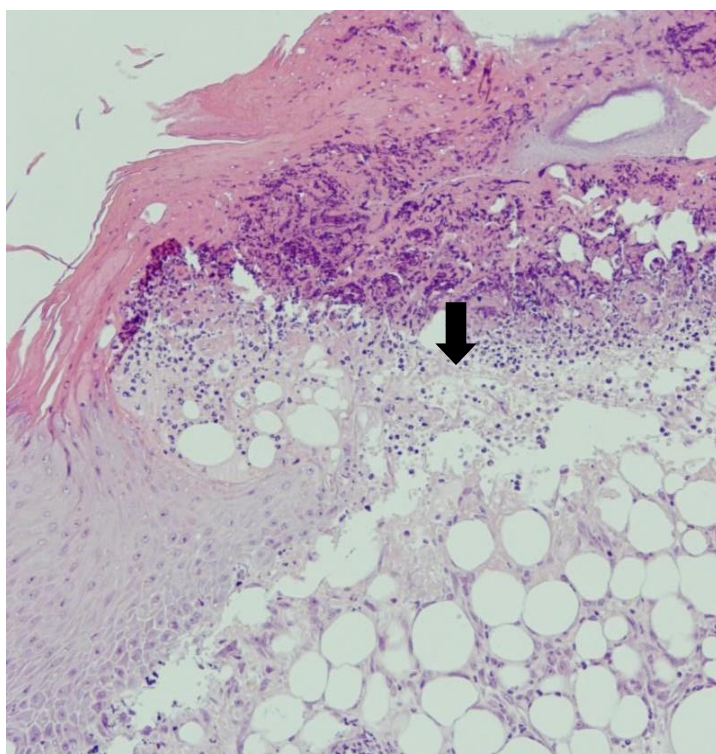


Ilustración 50: Ratón 3 del grupo 5 (Elastina 25% día 7). En ocasiones, el tejido de granulación presentaba una importante hiperplasia de folículos dilatados, entre los que se encontraban abundantes fibroblastos de morfología estrellada y presencia de matriz extracelular. El infiltrado inflamatorio se observaba predominantemente bajo la costra (flecha). HE 10x.

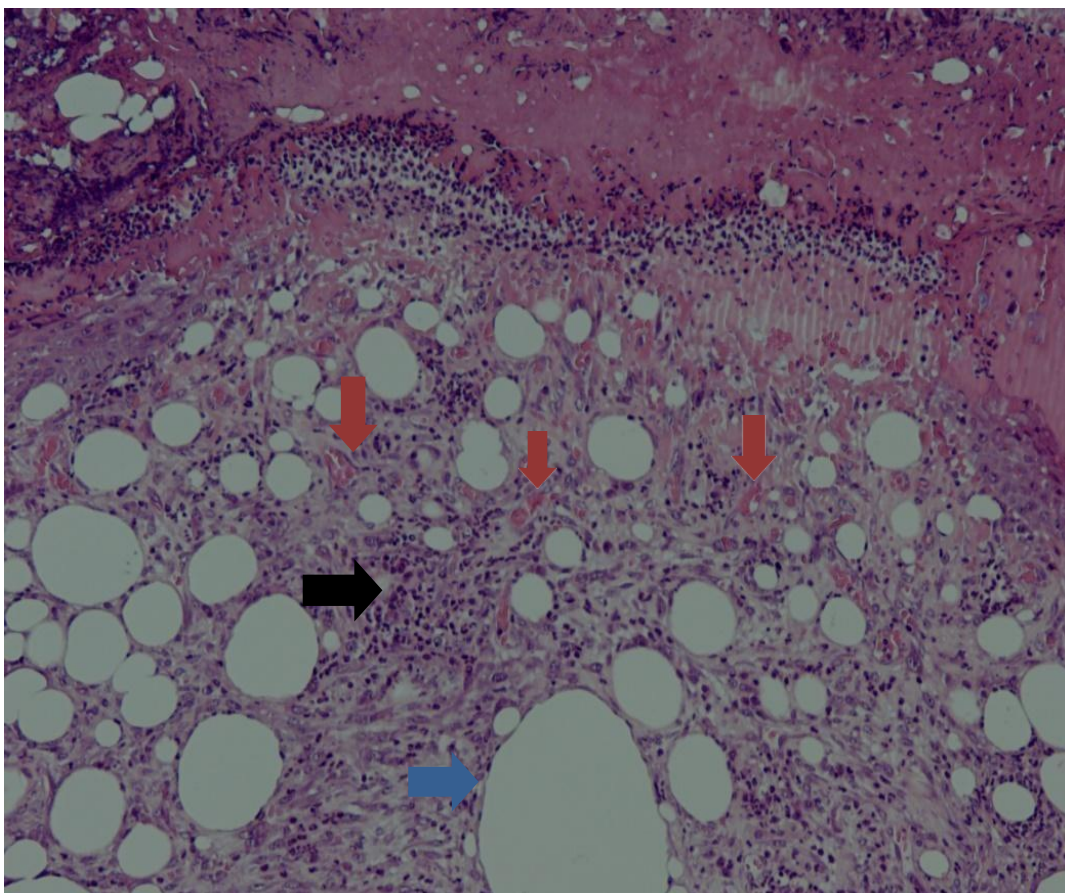


Ilustración 51: Abundantes vasos (flechas naranjas), infiltrado (flecha negra) y folículos pilosos dilatados (flecha azul). HE 10x

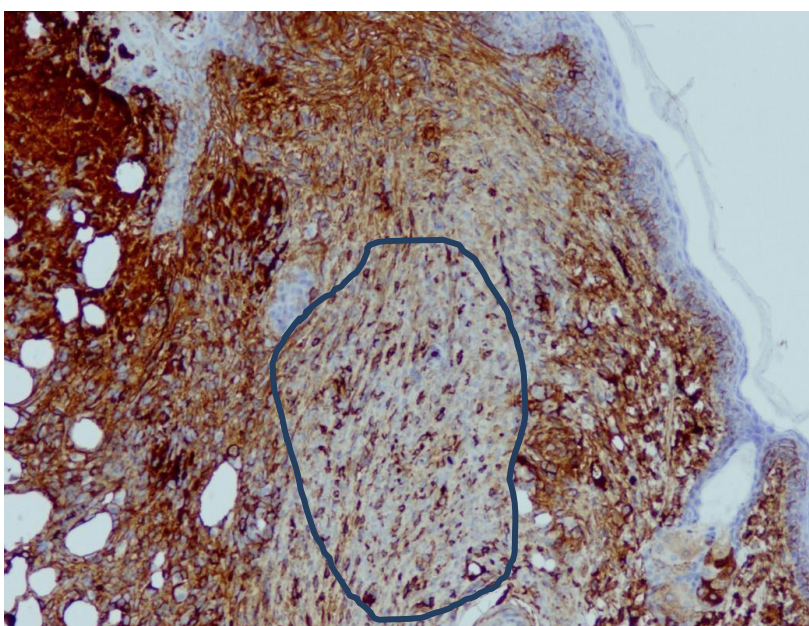


Ilustración 52: En estadios intermedios de curación, es cuando se ha observado mayor cantidad de vasos, como puede apreciarse en esta imagen perteneciente al ratón 3 del grupo 5 (Elastina 25% día 7). CD 34 10x.

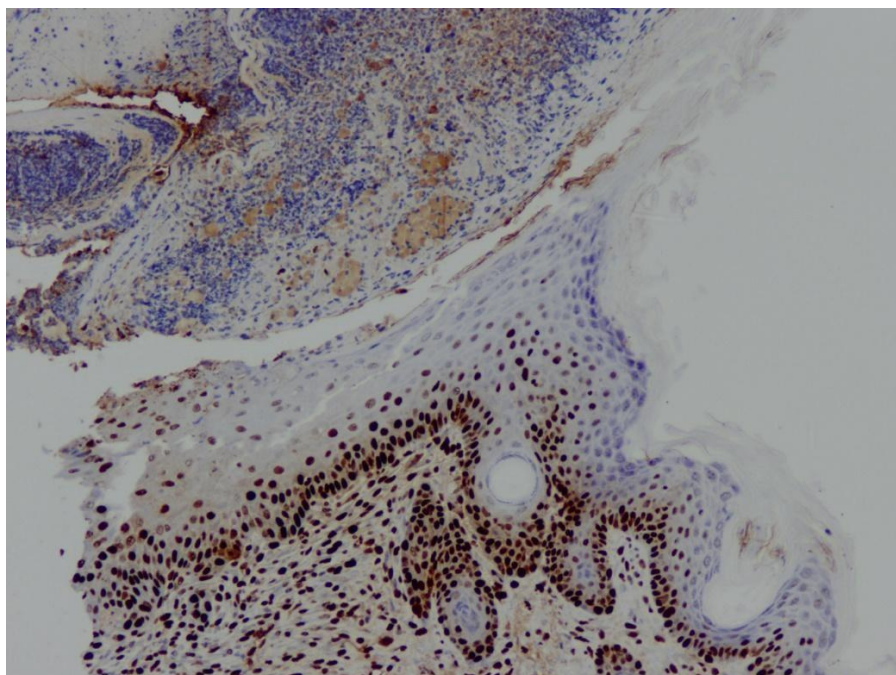


Ilustración 53: Positividad intensa para PCNA en el ratón 4 del grupo 8 (HP 50% día 7). 10

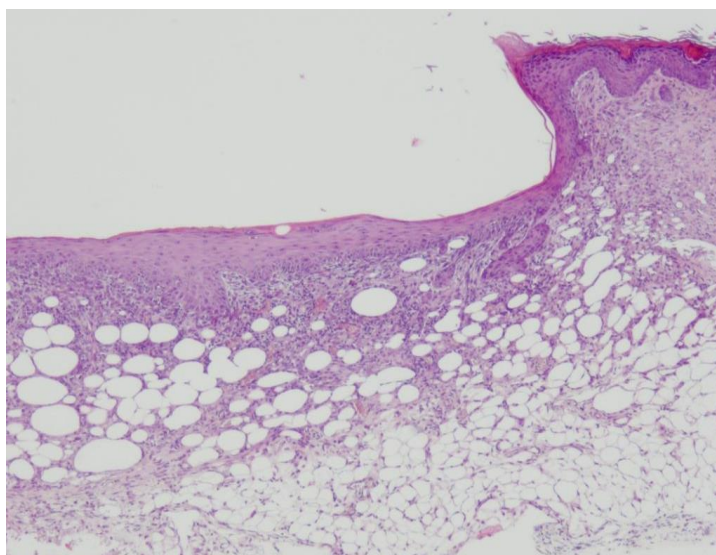


Ilustración 54: Se observa reepitelización completa, con retracción cutánea. Todavía hay hiperplasia folicular y algo de infiltrado. Ratón 2 grupo 8 (HP 50% día 7). HE 10x.

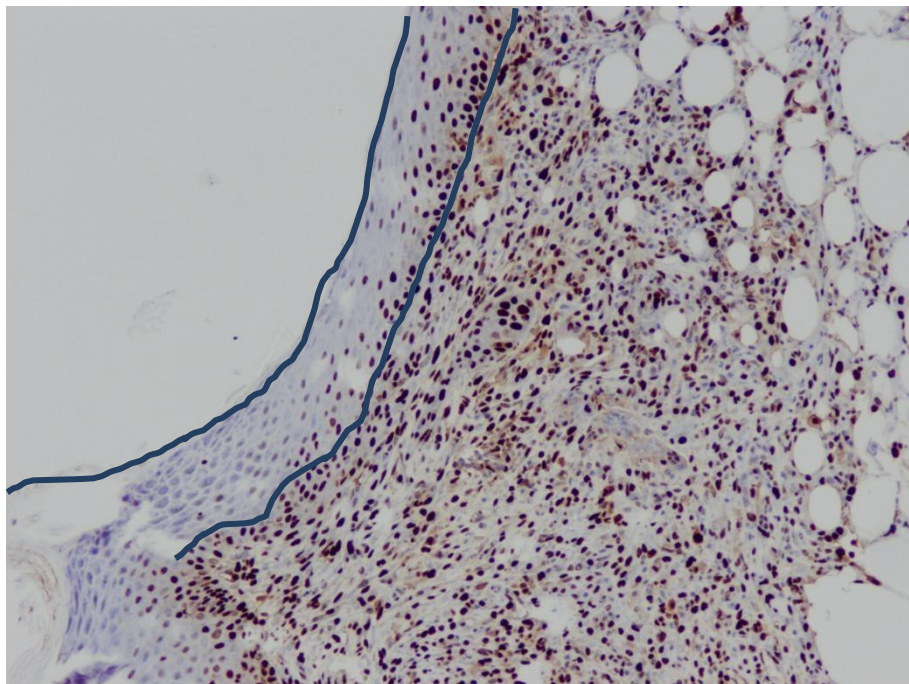


Ilustración 55: Aunque el marcaje es intenso en células mesenquimales e inflamatorias, en la epidermis (entre líneas), empieza a ser normal. Ratón 2 grupo 8 (HP 50% día 7). PCNA 10x.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Como se comentó anteriormente, la piel juega un papel muy importante en la supervivencia, ya que se encuentra en la interfaz con el medio externo. La piel ha ido evolucionando para ser capaz de detectar, integrar y responder a numerosos factores estresantes, y de ese modo garantizar la homeostasis del organismo ^[4,5].

Cuando se produce una lesión o ruptura en la estructura y función normal de la piel, se crea una herida. La curación de las heridas es un proceso complejo que trata de recomponer la forma función del tejido lesionado. Este proceso es regulado por diferentes factores de crecimiento y citoquinas liberadas en el sitio de la lesión. Sin embargo, cualquier alteración que interrumpa los procesos de curación empeorará el daño tisular y alargará el proceso de reparación. Numerosos factores pueden influir en el proceso de cicatrización de la piel dañada, entre las que se incluyen la presencia de infecciones, enfermedades subyacentes y/o uso de medicamentos ^[98].

El manejo terapéutico de las heridas en la actualidad tiene una efectividad limitada, y además es costoso. Además, con la tendencia al envejecimiento de la población, el número de individuos con patologías crónicas que afectan al normal proceso de reparación de heridas se ha incrementado ^[17]. Es por ello que se están llevando a cabo numerosas investigaciones con el fin de encontrar nuevos tratamientos que obtengan mejores resultados tanto en la velocidad como en calidad de la cicatrización de las heridas, así como hacerlos más accesibles económicamente ^[99].

El objetivo del presente estudio fue investigar el efecto de distintos principios activos, constituidos por elastina e hidrólisis pulmón-pepsina, en la cicatrización de heridas, utilizando para ello un modelo de cicatrización en ratón.

Para llevar a cabo el experimento, se escogieron ratones del tipo SKH1. Las ventajas principales de este tipo fueron detalladas anteriormente, pero se podrían resumir en facilidad de manejo, disponibilidad, y bajo costo. Además, para el seguimiento de las heridas, el hecho de que no posean pelo evita la necesidad del rasurado frecuente de las zonas a explorar, que podría desencadenar reacciones inflamatorias locales debido a la irritación provocada por el propio procedimiento o como consecuencia de infecciones

secundarias a este y que alterarían los resultados de las mediciones. La ausencia de pelo se debe a una mutación en el gen Hr, pero a pesar de esta falta de pelo, la piel conserva los folículos pilosos, aunque son atróficos ^[95].

La piel de ratones sin pelo se usa ampliamente como sustituto de la piel humana para medir la penetración percutánea de fármacos in vitro. En general, la piel del ratón sin pelo es más permeable que la piel humana ^[100]. Como principal desventaja, se aprecia que las heridas incisionales y escisionales de grosor completo en el dorso que se dejan curar por segunda intención muestran una marcada contracción debido a la actividad del *panniculus carnosus*. Dicha contracción de la herida puede representar hasta el 90% del cierre de la herida en ratones, un proceso que difiere con el proceso que ocurre en humanos ^[101]. Esta contracción de la herida ocurre muy temprano durante la cicatrización de la herida y es bastante distinta de la contracción debido a la migración de los fibroblastos y la actividad de los miofibroblastos en la fase de remodelación tisular de la cicatrización de las heridas en personas ^[102]. Además, la respuesta inmune de los ratones sin pelo ha sido objeto de relativamente poco estudio, lo que limita su utilidad en los estudios del sistema inmunológico de la piel ^[95].

Para controlar posibles variables que afectasen al desarrollo del estudio, tanto el comportamiento como el estado físico general fueron monitorizados a lo largo del estudio, sin que se apreciase ninguna anomalía, tal y como se esperaba debido a la poca invasividad del procedimiento. El aspecto externo de las heridas también se valoró, no detectándose signos externos de inflamación y/o infección local, ni reacciones de hipersensibilidad en ninguna de las heridas a lo largo del experimento. El registro de los pesos de los animales también se mantuvo sin anomalías. Todo ello limita la posibilidad de que factores ajenos al estudio pudieran falsear los resultados.

Los resultados del estudio macroscópico no arrojan diferencias significativas en la cicatrización en los días 3 y 14 de estudio. Sin embargo, en las mediciones obtenidas el séptimo día de estudio, sí que se observaron valores con diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. El grupo 2, tratado con elastina al 25%, presentaba valores más altos en área y perímetro de lesiones, siendo estas diferencias significativas respecto a los demás grupos de estudio exceptuando el grupo placebo.

A los siete días, la herida se encuentra en la fase proliferativa de la cicatrización, que tiene como objetivo reducir el área de la herida. El hecho de que en esta etapa la presencia de lesiones más amplias coincida con los animales tratados con elastina al 25%, podría deberse al efecto de la elastina en la curación de heridas, ya que se ha comprobado que la presencia de esta disminuye la contracción de la herida favoreciendo así la regeneración dérmica ^[103].

Sin embargo, el grupo tratado con elastina al 50% presentaba valores similares al resto de los grupos, lo que lleva a pensar que en caso de que la elastina haya influido en la menor contracción de las heridas, debe haber otros factores que influyan en ello, más allá de la presencia o no del compuesto.

El hecho de que no haya diferencias en las demás etapas del estudio invita a pensar que la elastina podría jugar un papel importante en la fase proliferativa, por lo que su uso en etapas anteriores y posteriores podría no ser tan interesante. Aquí entraría en juego también el tipo de herida a tratar, pues en ocasiones puede ser mejor sacrificar calidad de cicatrización con tal de que esta sea rápida, mientras que otras veces como por ejemplo en zonas estéticas, puede ser mejor alargar el proceso para conseguir una cicatriz más elástica. La elastina se expresa de manera inadecuada durante la cicatrización de la herida, y la red de fibra elástica intacta no existe después de la lesión cutánea, lo que contribuye a la disminución de las propiedades físicas de las cicatrices en comparación con la piel no lesionada ^[104]. La producción de elastina está ausente en la madurez, pero su síntesis es inducida por una lesión o enfermedad ^[105]. Pesa a la expresión de elastina al inicio de la injuria, la deposición de esta en la dermis es mínima. La elastina solo se ha detectado muchos meses después de las etapas iniciales de cicatrización de la herida ^[106].

De cualquier modo, como se ha discutido anteriormente, el proceso de contracción de la herida durante la cicatrización en el ratón es diferente al que ocurre en los humanos, por lo que se harían necesarios más estudios para esclarecer las posibilidades terapéuticas del producto en personas.

El análisis de las áreas ecográficas en modo B, a los tres días encontramos los valores más bajos en el grupo 1, tratado con elastina al 50%, mientras que el grupo placebo presenta las lesiones más extensas, siendo esta diferencia significativa.

De nuevo, a los 7 días, encontramos que el grupo 2 obtiene los valores más altos, siendo esta diferencia significativa respecto a los grupos 4 y 5. Estos datos concuerdan con los obtenidos en el estudio macroscópico y vuelven sugerir un posible papel de la elastina en la atenuación de la contracción de la herida. A diferencia de los datos del análisis macroscópico, el grupo tratado con elastina al 50% presenta en este caso valores mayores de área de lesión, que, pese a no ser estadísticamente significativas, sí que son bastante más elevados que en el resto de grupos y bastante cercanos al grupo de elastina al 25%.

A los 14 días no se aprecian diferencias.

El perímetro ecográfico fue también medido. En este aspecto, se encuentran también diferencias entre grupos en los días 7 y 14. No obstante, consideramos estas mediciones menos importantes de cara a la valoración de la curación, pues pequeños cambios en la posición del animal durante la medición pueden dar lugar a perímetros diferentes pese a ser la misma herida.

Debido a lo novedoso del uso de la ecografía en ratones, hay escasa o nula literatura científica con la que estos resultados puedan ser comparados y analizados. No obstante, la técnica resulta prometedora debido a su sencillez y a la cantidad de datos que aporta. Con el avance de la técnica las mediciones podrán optimizarse y protocolizarse, haciendo más fácil su posterior estudio.

Con el fin de observar el flujo sanguíneo en la zona de la lesión, se empleó la ecografía eco-Doppler de pulso continuo. Christian Doppler, en 1843, describió un efecto que explicaba un cambio en la frecuencia percibida del sonido emitido por una fuente en movimiento. Esto fue nombrado más tarde como "efecto Doppler". El mismo principio puede ser extendido al campo de la imagen de ultrasonido, en el que la frecuencia de insonación del transductor experimenta un cambio cuando se refleja en los objetos en movimiento ^[107].

El Doppler es una herramienta importante para el diagnóstico vascular no invasivo.

Hay cinco métodos de obtención de imágenes empleando el principio Doppler:

- Doppler de onda continua.
- Doppler de onda pulsada.
- Doppler color
- Doppler de potencia
- Doppler espectral o escaneo dúplex ^[108].

Para nuestro estudio se utilizó la ecografía Doppler de onda continua. La transmisión del sonido y recepción de la información ocurren simultáneamente en el transductor. Esto permite una mayor sensibilidad del método, pero no la ubicación espacial de la señal ^[109,110].

Pese a ser una herramienta útil en numerosas situaciones clínicas, tiene algunas limitaciones:

- Presencia de grasa
- Presencia de aire
- Movimientos (respiratorios, peristálticos, ritmo cardíaco, etc.) ^[108].

En nuestro caso, los mayores problemas de este sistema apenas tienen relevancia, pues debido a la localización de las lesiones la presencia de grasa y aire son nulas. Los movimientos respiratorios se tuvieron en cuenta, obteniendo la imagen justo al final de la respiración, para que esta no influyese. El resto de los movimientos no influyen pues nos encontramos lejos de la zona abdominal y el ritmo cardíaco era bajo debido al estado de sedación de los ratones durante la exploración.

Para hacer la medición del área vascularizada, se midieron tanto el área total como el porcentaje de área. Para el área total no se tuvo en cuenta el tamaño de la lesión, mientras que para el porcentaje del área se comparó el área vascularizada de la lesión respecto al área total de esta.

En los resultados obtenidos se pueden apreciar diferencias significativas en el área total del día 3. Estas se establecen entre el grupo 2 y 4 ($p=0,015$); a los 7 días no se hallaron

diferencias, y a los 14 días sí que se aprecian diferencias entre el grupo 1 y 3 ($p=0,033$). Lo mismo sucede respecto al porcentaje de área, encontrando diferencias en los días 3 y 14.

De nuevo es el grupo tratado con elastina al 25% el que parece mostrar valores más elevados en fases tempranas de la cicatrización (días 3 y 7). Los valores de área vascularizada total y porcentual son más altos en ambos días, pese a que esta diferencia no sea significativa en el día 7. Sin embargo, a los 14 días, es el grupo 3, tratado con hidrólisis pulmón-pepsina al 50% el que obtiene valores mayores.

La elastina parece influir en la angiogénesis al mejorar la migración endotelial y la expresión del tipo de membrana MMP-1 (MT1-MMP). La angiogénesis es un proceso vital en la fase reparadora de la cicatrización de la herida, que se asocia con la formación de tejido de granulación y la migración y proliferación celular^[104]. Esto podría explicar en parte como la aplicación de elastina a las heridas podría provocar mejoras en la vascularización de la zona. Sin embargo, volvemos a encontrarnos con la incógnita de por qué el grupo de elastina al 50% no responde tan bien.

En cuanto al análisis histológico, en el estudio comparativo a los 7 días se observa que existen variables significativas en la $p=0,001$ de inflamación entre los distintos grupos. Los valores más altos se obtuvieron en los grupos 1 y 2. También se aprecia que existen diferencias significativas del grupo 4 con los grupos 1,2, y 5. En las variables de reepitelización y vascularización no se aprecian diferencias. El aumento de la inflamación podría deberse, quizá, al incremento de la irrigación sanguínea en la zona, aunque no se puede establecer con claridad.

Con la tinción de hematosilina-eosina se valoró la presencia o ausencia de herida (SI o NO). A los 3 días, como es lógico, la presencia de herida era todavía alta, pero destaca el grupo tratado con hidrólisis pulmón-pepsina al 50%, donde solamente el 60% de los animales presentaba herida. Esto concuerda con lo analizado anteriormente, ya que posiblemente la elastina tenga cierta influencia en la contracción del tejido. A los 14 días, la mayoría de heridas estaban curadas, sin diferencias entre tratamientos y placebo.

A nivel inmunohistoquímico se observa, como era de esperar, la presencia de infiltrado inflamatorio era mayor en las muestras del tiempo de estudio más corto (3 días).

El infiltrado moderado o severo se asociaba siempre a la presencia de herida. Sin embargo, la proliferación celular está algo más activa en fases intermedias. Hemos observado un marcaje leve en el grupo 1 (Elastina 50% 3 días), así como en los grupos 2 (Elastina 50% 7 días) y 5 (Placebo 3 días). En los grupos en los que había mayor porcentaje de regeneración cutánea, el marcaje era en las células basales, como ocurre en la piel normal, por lo que no fue valorada su intensidad. Destacaba el tratamiento con HP al 50%, que en todos los tiempos de estudio, la epidermis mostraba gran actividad proliferativa.

Pese a la abundante evidencia científica que avala el uso de elastina para el manejo terapéutico de heridas, los resultados de nuestro estudio no demuestran, al menos de forma evidente, que el tratamiento con elastina tópica tenga un efecto beneficioso. De cualquier modo, tal y como se ha ido comentando a lo largo del texto, el éxito del proceso de cicatrización no solo debería mirarse desde un punto de vista descriptivo-cronológico, sino que también sería interesante analizar la calidad de la reparación, pudiendo buscar también diferencias según la causa de la herida.

La evidencia señala que elastina realiza múltiples funciones durante la cicatrización de heridas en virtud de sus propiedades mecánicas y de señalización. Es especialmente importante la restauración de una red de fibra elástica intacta y funcional, ya que es fundamental para recuperar la función completa de la piel después de una lesión. La curación de heridas sin tejido cicatricial solo se logra en el período gestacional temprano y medio, en un período de desarrollo antes de que se haya formado una red de fibra elástica completamente funcional. Esto podría implicar un papel para la tropoelastina, que es precursora de la elastina, y enfatizar las propiedades interactivas y de señalización celular de la elastina, como promover la migración celular, el crecimiento y la proliferación.

La tropoelastina también apoya la adhesión de varios tipos de células, incluidos los fibroblastos, las células musculares lisas vasculares, las células endoteliales y los condrocitos. Los péptidos de tropoelastina y elastina modulan el comportamiento celular en un rango de tipos de células para provocar respuestas biológicas, que abarcan la quimiotaxis de monocitos, la migración de fibroblastos, la proliferación y la producción de proteasas, migración de queratinocitos proliferación del músculo liso, y promoción de un fenotipo angiogénico en células endoteliales. Otras funciones celulares afectadas por los

péptidos de elastina incluyen la regulación de la liberación de proteasas, producción de matriz extracelular y supervivencia celular.

La elastina y sus derivados también modifican la actividad celular, lo que tiene implicaciones en la curación de heridas en adultos. Los fibroblastos dérmicos se adhieren a la tropoelastina e interactúan con los péptidos de elastina, lo que afecta su comportamiento celular ^[104].

En cuanto al compuesto de hidrólisis pulmón-pepsina, no hay nada establecido ya que no encontramos literatura científica al respecto.

Las sustancias que fueron utilizadas durante nuestro proyecto son fuente de estudio en la actualidad debido a la importancia tanto económica como a nivel de salud de la curación de las heridas, siendo este un campo que está en constante e intensa investigación ^[22].

Las líneas de investigación futuras en el contexto de la cicatrización de heridas son numerosas. Algunos trabajos se centran en líneas de estudio de moléculas novedosas, como el óxido nítrico, que parece tener buenas cualidades para su empleo para mejorar la cicatrización de heridas ^[111,112]. Otros han investigado el uso de polisacáridos (como la celulosa, el quitosano o el ácido hialurónico), proteínas naturales (como la fibroína de seda, el fibrinógeno y el colágeno) y biomateriales compuestos, obteniendo resultados aceptables, pero con un amplio abanico de posibilidades de mejora ^[14].

Debido a la actual demanda de productos con cualidades medicinales de origen natural, se sigue estudiando la eficacia de diversas sustancias como aceites vegetales ^[113,114], miel ^[115] y probióticos ^[116] entre otras.

Se ha descubierto recientemente que los ARN no codificantes, como los microARN y los ARN largos no codificantes, son moduladores significativos de la expresión génica en diversas rutas celulares. La investigación ahora ha implicado ARN no codificantes en casi todas las etapas del proceso de curación de heridas, lo que sugiere que pueden servir como objetivos terapéuticos clínicos ^[117].

El estudio de la regeneración tisular por medio de células madre, se postula como uno de los campos más prometedores en el ámbito de la medicina regenerativa. Las células madre tienen un enorme potencial para la regeneración del tejido cutáneo, ya que estas células no solo pueden regenerar el tejido perdido, sino que también son capaces de promover la reparación de la herida por vía paracrina. Varios tipos de células madre, como las células madre embrionarias, células madre mesenquimales, células madre de tejidos residentes, células madre epiteliales, células madre derivadas de tejido adiposo y células madre hematopoyéticas, están actualmente bajo intensa investigación [17,118,119,120,121].

El estudio, por otro lado, cuenta con varias limitaciones. El empleo de un modelo murino, pese a sus numerosas ventajas, no permite extrapolar los resultados, ya que los procesos y fases de la cicatrización son ligeramente diferentes. Además, el hecho de que exista poca investigación respecto al compuesto de hidrólisis pulmón-pepsina así como la falta de estudios que usen el método ecográfico en ratones para el seguimiento de la evolución de lesiones cutáneas, hicieron más compleja la planificación del estudio así como su análisis.

En definitiva, el uso de elastina parece que podría tener algún impacto en la reparación de lesiones cutáneas según la evidencia científica actual; sin embargo, se hacen necesarios más estudios para dirigidos a comprender tanto el mecanismo de actuación de esta en las diferentes etapas del proceso reparativo, como esclarecer las posibles dosis, concentraciones y posología, con el fin de conseguir una regeneración epitelial total. Sería interesante comprobar la eficacia de la elastina utilizando mayores intervalos temporales, de modo que se pudiese comprobar el aspecto de las cicatrices tras varios meses de evolución y así comprobar si hay alguna mejoría en el aspecto estético de los diferentes tipos de cicatrices (atróficas, hipertróficas, queloides, hiperpigmentadas, etc.). También serían interesantes más estudios en humanos sobre el efecto de este compuesto en la cicatrización de heridas.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Atendiendo al protocolo utilizado y a los parámetros analizados, se puede concluir que el proceso de cicatrización de todas las escisiones generadas se ha desarrollado de forma rápida y sin grandes diferencias entre los grupos establecidos. Esta rápida evolución, puede comprometer la detección de diferencias entre los grupos de estudio.

1. Respecto a la cicatrización a nivel macroscópico, se encuentra a lo largo de todo el estudio una mejoría en todos los grupos. Es en el grupo tratado elastina 25% donde se aprecia una peor cicatrización a los 7 días. No se observan reacciones de hipersensibilidad local a nivel macroscópico ni microscópico

2. Las valoraciones de las lesiones en piel medidas mediante ecografía modo B del área de la lesión obtenidas son diferentes en los distintos grupos. Un mejor comportamiento se observó en el grupo 4 (hidrólisis 25%). A nivel de ecografía Doppler encontramos diferencias estadísticamente significativas en el día 3 del estudio entre los distintos grupos 2 (Elastina 50%) y 4 (hidrólisis 25%), no manteniéndose en los otros períodos del estudio.

3. A nivel histológico, se observan diferencias destacables en la inflamación a los 7 días comportándose mejor el grupo 4 (hidrólisis 25%). El infiltrado moderado o severo se asociaba siempre a la presencia de herida.

4. En el análisis inmunohistoquímico encontramos que la proliferación celular está algo más activa en fases intermedias. Se observó un marcaje leve en el grupo 1 (Elastina 50% 3 días), así como en el grupo 2 (Elastina 50% 7 días). Destacaba el tratamiento con HP al 50%, que, en todos los tiempos de estudio, la epidermis mostraba gran actividad proliferativa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yousef H, Sharma S. (2019). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. StatPearls Publishing.
2. Herskovitz, I., Macquhae, F., Fox, J. D., & Kirsner, R. S. (2016). Skin movement, wound repair and development of engineered skin. *Experimental Dermatology*, 2, 99–910.
3. Slominski, A. T., Manna, P. R., & Tuckey, R. C. (2015). On the role of skin in the regulation of local and systemic steroidogenic activities. *Steroids*, 72–88.
4. Slominski, A., Wortsman, J., Paus, R., Elias, P. M., Tobin, D. J., & Feingold, K. R. (2008). Skin as an endocrine organ: implications for its function. *Drug discovery today. Disease mechanisms*, 2, 137–144.
5. Slominski, A. T., Zmijewski, M. A., Skobowiat, C., Zbytek, B., Slominski, R. M., & Steketee, J. D. (2012). Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Advances in Anatomy, Embryology, and cell Biology*, 1-115.
6. Hoath, S. B., & Leahy, D. G. (2003). The organization of human epidermis: functional epidermal units and phi proportionality. *The Journal of Investigative Dermatology*, 6, 1440–1446.
7. Elias, P. M. (2005). Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2, 183–200.
8. Stenn, K. S., & Paus, R. (1999). What controls hair follicle cycling? *Experimental Dermatology*, 4, 229-33.
9. Klein, J., Permana, P. A., Owecki, M., Chaldakov, G. N., Böhm, M., Hausman, G., Lapière, C. M., Atanassova, P., Sowinski, J., Fasshauer, M., Hausman, D. B., Maquoi, E., Tonchev, A. B., Peneva, V. N., Vlachanov, K. P., Fiore, M., *Aloe*, L.,

Slominski, A., Reardon, C. L., Ryan, T. J., Pond, C. M., & Ryan, T. J. (2007). What are subcutaneous adipocytes really good for? *Experimental Dermatology*, 1, 45–70.

10. Slominski, A., & Wortsman, J. (2000). Neuroendocrinology of the skin. *Endocrine reviews*, 5, 457–487.

11. Gonzalez, A. C., Costa, T. F., Andrade, Z. A., & Medrado, A. R. (2016). Wound healing - A literature review. *Anais brasileiros de dermatologia*, 5, 614–620.

12. Sorg, H., Tilkorn, D. J., Hager, S., Hauser, J., & Mirastschijski, U. (2016). Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical research*, 1-2, 81–94.

13. Leavitt, T., Hu, M. S., Marshall, C. D., Barnes, L. A., Lorenz, H. P., & Longaker, M. T. (2016). Scarless wound healing: finding the right cells and signals. *Cell and tissue research*, 3, 483–493.

14. Kirby, G. T., Mills, S. J., Cowin, A. J., & Smith, L. E. (2015). Stem Cells for Cutaneous Wound Healing. *BioMed Research International*, 285869.

15. Da, L. C., Huang, Y. Z., & Xie, H. Q. (2017). Progress in development of bioderived materials for dermal wound healing. *Regenerative biomaterials*, 5, 325–334.

16. Gould, L. J. (2016). Topical Collagen-Based Biomaterials for Chronic Wounds: Rationale and Clinical Application. *Advances in wound care*, 1, 19–31.

17. Kanji, S., & Das, H. (2017). Advances of Stem Cell Therapeutics in Cutaneous Wound Healing and Regeneration. *Mediators of inflammation*, 5217967.

18. Gardner, S. E., Hillis, S. L., Heilmann, K., Segre, J. A., & Grice, E. A. (2012). The neuropathic diabetic foot ulcer microbiome is associated with clinical factors. *Diabetes*, 3, 923–930.
19. Businaro, R., Corsi, M., Di Raimo, T., Marasco, S., Laskin, D. L., Salvati, B., Capoano, R., Ricci, S., Siciliano C., Frati, G., & De Falco, E. (2016). Multidisciplinary approaches to stimulate wound healing. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1, 137–142.
20. Ambrozova, N., Ulrichova, J., & Galandakova, A. (2017). Models for the study of skin wound healing. The role of Nrf2 and NF- κ B. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 1, 1–13.
21. Bucekova, M., Sojka, M., Valachova, I., Martinotti, S., Ranzato, E., Szep, Z., Majtan, V., Klaudiny, J., & Majtan, J. (2017). Bee-derived antibacterial peptide, defensin-1, promotes wound re-epithelialisation in vitro and in vivo. *Scientific reports*, 1, 7340.
22. Han, G., & Ceilley, R. (2017). Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Advances in therapy*, 3, 599–610.
23. Hunter, J. A., & Finlay, J. B. (1976). Scanning electron microscopy of normal human scar tissue and keloids. *The British Journal of Surgery*, 10, 826–830.
24. Mosesson, M. W., Siebenlist, K. R., & Meh, D. A. (2001). The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 11–30.
25. Szpaderska, A. M., Egozi, E. I., Gamelli, R. L., & DiPietro, L. A. (2003). The effect of thrombocytopenia on dermal wound healing. *The Journal of Investigative Dermatology*, 6, 1130–1137.

26. Waheed A, Council M. (2019). Wound Closure Techniques. StatPearls Publishing.
27. Lipsky, B. A., & Hoey, C. (2009). Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 10, 1541–1549.
28. Draelos, Z. D., Rizer, R. L., & Trookman, N. S. (2011). A comparison of postprocedural wound care treatments: do antibiotic-based ointments improve outcomes? *Journal of the American Academy of Dermatology*, 3 Suppl, S23-9.
29. Langford, J. H., Artemi, P., & Benrimoj, S. I. (1997). Topical antimicrobial prophylaxis in minor wounds. *The Annals of pharmacotherapy*, 5, 559–563.
30. Jones, V., Grey, J. E., & Harding, K. G. (2006). Wound dressings. *BMJ (Clinical research ed.)*, 7544, 777–780.
31. Barnett, S. E., & Varley, S. J. (1987). The effects of calcium alginate on wound healing. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 4, 153–155.
32. Beele, H., Meuleneire, F., Nahuys, M., & Percival, S. L. (2010). A prospective randomised open label study to evaluate the potential of a new silver alginate/carboxymethylcellulose antimicrobial wound dressing to promote wound healing. *International Wound Journal*, 4, 262–270.
33. Emmerson, E., Campbell, L., Davies, F. C., Ross, N. L., Ashcroft, G. S., Krust, A., Chambon, P., & Hardman, M. J. (2012). Insulin-like growth factor-1 promotes wound healing in estrogen-deprived mice: new insights into cutaneous IGF-1R/ER α cross talk. *The Journal of Investigative Dermatology*, 12, 2838–2848.

34. Streubel, P. N., Stinner, D. J., & Obrebsky, W. T. (2012). Use of negative-pressure wound therapy in orthopaedic trauma. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 9, 564–574.
35. Gabbiani, G., Ryan, G. B., & Majne, G. (1971). Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*, 5, 549–550.
36. Yang, L., Witten, T. M., & Pidaparti, R. M. (2013). A biomechanical model of wound contraction and scar formation. *Journal of Theoretical Biology*, 228–248.
37. Mustoe, T. A., Pierce, G. F., Morishima, C., & Deuel, T. F. (1991). Growth factor-induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model. *The Journal of Clinical Investigation*, 87(2), 694–703.
38. Yannas, I. V., Tzeranis, D. S., & So, P. (2017). Regeneration of injured skin and peripheral nerves requires control of wound contraction, not scar formation. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society and the European Tissue Repair Society*, 25(2), 177–191.
39. Chicharro-Alcántara, D., Rubio-Zaragoza, M., Damián Giménez, E., Carrillo-Poveda, J. M., Cuervo-Serrato, B., Peláez-Gorrea, P., & Sopena-Juncosa, J. J. (2018). Platelet Rich Plasma: New Insights for Cutaneous Wound Healing Management. *Journal of functional biomaterials*, 1.
40. Wang, T., He, R., Zhao, J., Mei, J. C., Shao, M. Z., Pan, Y., Zhang, J., Wu, H. S., Yu, M., Yan, W. C., Liu, L. M., Liu, F., & Jia, W. P. (2017). Negative pressure wound therapy inhibits inflammation and upregulates activating transcription factor-3 and downregulates nuclear factor- κ B in diabetic patients with foot ulcerations. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 4.

41. Wang, T., Li, X., Fan, L., Chen, B., Liu, J., Tao, Y., & Wang, X. (2019). Negative pressure wound therapy promoted wound healing by suppressing inflammation via down-regulating MAPK-JNK signaling pathway in diabetic foot patients. *Diabetes research and clinical practice*, 81–89.

42. Uutela, M., Wirzenius, M., Paavonen, K., Rajantie, I., He, Y., Karpanen, T., Lohela, M., Wiig, H., Salven, P., Pajusola, K., Eriksson, U., & Alitalo, K. (2004). PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis. *Blood*, 10, 3198–3204.

43. Martin, P., Hopkinson-Woolley, J., & McCluskey, J. (1992). Growth factors and cutaneous wound repair. *Progress in Growth Factor Research*, 1, 25–44.

44. Brown, G. L., Curtsinger, L., Brightwell, J. R., Ackerman, D. M., Tobin, G. R., Polk, H. C., George-Nascimento, C., Valenzuela, P., & Schultz, G. S. (1986). Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor. *The Journal of Experimental Medicine*, 5, 1319–1324.

45. Kim, Y. S., Lew, D. H., Tark, K. C., Rah, D. K., & Hong, J. P. (2010). Effect of recombinant human epidermal growth factor against cutaneous scar formation in murine full-thickness wound healing. *Journal of Korean Medical Science*, 4, 589–596.

46. Tsuboi, R., Shi, C. M., Sato, C., Cox, G. N., & Ogawa, H. (1995). Co-administration of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-1 stimulates wound healing in animal models. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2, 199–203.

47. Bennett, S. P., Griffiths, G. D., Schor, A. M., Leese, G. P., & Schor, S. L. (2003). Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. *The British journal of Surgery*, 2, 133–146.
48. Brem, H., Folkman, J. Angiogenesis and basic fibroblast growth factor during wound healing. In: Friedlander, G.E, Lane J. M., editors. *Bone Formation and Repair*. Rosemont: American Academy of Orthopedic Surgeons; 1994. pp. 213–22.
49. Conway, K., Price, P., Harding, K. G., & Jiang, W. G. (2008). The molecular and clinical impact of hepatocyte growth factor, its receptor, activators, and inhibitors in wound healing. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society and the European Tissue Repair Society*, 1, 2–10.
50. Fang, Y., Shen, J., Yao, M., Beagley, K. W., Hambly, B. D., & Bao, S. (2009). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances wound healing in diabetes via upregulation of proinflammatory cytokines. *The British Journal of Dermatology*, 3, 478–486.
51. Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of Immunology*, 519–550.
52. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society and the European Tissue Repair Society*, 5, 585–601.
53. Graves, D. T., & Jiang, Y. (1995). Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 2, 109–118.

54. Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 6, 313–326.
55. Löndahl, M., Katzman, P., Nilsson, A., & Hammarlund, C. (2010). Hyperbaric oxygen therapy facilitates healing of chronic foot ulcers in patients with diabetes. *Diabetes care*, 5, 998–991003.
56. Wu, S. C., Marston, W., & Armstrong, D. G. (2010). Wound care: the role of advanced wound-healing technologies. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 5, 385–394.
57. Nesi-Reis, V., Lera-Nonose, D. S. S. L., Oyama, J., Silva-Lalucci, M. P. P., Demarchi, I. G., Aristides, S. M. A., Teixeira, J. J. V., Silveira, T. G. V., & Lonardoni, M. V. C. (2017). Contribution of photodynamic therapy in wound healing: A systematic review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 294–305.
58. El-Batal, A. I., & Ahmed, S. F. (2018). Therapeutic effect of *Aloe vera* and silver nanoparticles on acid-induced oral ulcer in gamma-irradiated mice. *Brazilian Oral Research*, e004.
59. Davis, R. H., Donato, J. J., Hartman, G. M., & Haas, R. C. (1994). Anti-inflammatory and wound healing activity of a growth substance in *Aloe vera*. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 2, 77–81.
60. Atiba, A., Nishimura, M., Kakinuma, S., Hiraoka, T., Goryo, M., Shimada, Y., Ueno, H., & Uzuka, Y. (2011). *Aloe vera* oral administration accelerates acute radiation-delayed wound healing by stimulating transforming growth factor- β and fibroblast growth factor production. *American Journal of Surgery*, 6, 809–818.

61. Radha, M. H., & Laxmipriya, N. P. (2014). Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of *Aloe vera*: a systematic review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 1, 21–26.
62. Im, S. A., Oh, S. T., Song, S., Kim, M. R., Kim, D. S., Woo, S. S., Jo, T. H., Park, Y. I., & Lee, C. K. (2005). Identification of optimal molecular size of modified Aloe polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. *International Immunopharmacology*, 2, 271–279.
63. Babaee, N., Zabihi, E., Mohseni, S., & Moghadamnia, A. A. (2012). Evaluation of the therapeutic effects of *Aloe vera* gel on minor recurrent aphthous stomatitis. *Dental Research Journal*, 4, 381–385.
64. Dragostin, O. M., Samal, S. K., Dash, M., Lupascu, F., Păenzariu, A., Tuchilus, C., Ghetu, N., Danciu, M., Dubruel, P., Pieptu, D., Vasile, C., Tatia, R., & Profire, L. (2016). New antimicrobial chitosan derivatives for wound dressing applications. *Carbohydrate polymers*, 28–40.
65. Oryan, A., & Sahvieh, S. (2017). Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, Pt A, 1003–1011.
66. Perinelli, D. R., Fagioli, L., Campana, R., Lam, J. K. W., Baffone, W., Palmieri, G. F., Casettari, L., & Bonacucina, G. (2018). Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 8–20.
67. Leach, M. J. (2008). *Calendula officinalis* and wound Healing: a systematic review. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*, 8, 236–243.
68. Uribe-Fentanes, L. K., Soriano-Padilla, F., Pérez-Frutos, J. R., & Veras-Hernández, M. A. Action of *Calendula officinalis* essence on bone preservation

after the extraction. Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, 1, 98–9105.

69. Alexandre, J. T. M., Sousa, L. H. T., Lisboa, M. R. P., Furlaneto, F. A. C., do Val, D. R., Marques, M., Vasconcelos, H. C., de Melo, I. M., Leitão, R., Castro Brito, G. A., & Goes, P. (2017). Anti-inflammatory and antiresorptive effects of *Calendula officinalis* on inflammatory bone loss in rats. Clinical Oral Investigations, 6, 2175–2185.

70. Lima, M. D. R., Lopes, A. P., Martins, C., Brito, G. A. C., Carneiro, V. C., & Goes, P. (2017). The Effect of on Oxidative Stress and Bone Loss in Experimental Periodontitis. Frontiers in Physiology, 440.

71. Pazhohideh, Z., Mohammadi, S., Bahrami, N., Mojab, F., Abedi, P., & Maraghi, E. (2018). The effect of versus metronidazole on bacterial vaginosis in women: A double-blind randomized controlled trial. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research, 1, 15–19.

72. Chaloupka, K., Malam, Y., & Seifalian, A. M. (2010). Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. Trends in Biotechnology, 11, 580–588.

73. Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Prunotto, M., Desmoulière, A., Varga, J., De Wever, O., Mareel, M., & Gabbiani, G. (2012). Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. The American Journal of Pathology, 4, 1340–1355.

74. Desmoulière, A., Redard, M., Darby, I., & Gabbiani, G. (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. The American Journal of Pathology, 146(1), 56–66.

75. Desmoulière, A., Chaponnier, C., & Gabbiani, G. (2005). Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society and the European Tissue Repair Society, 1, 7–12.
76. Sibbald, R. G., Contreras-Ruiz, J., Coutts, P., Fierheller, M., Rothman, A., & Woo, K. (2007). Bacteriology, inflammation, and healing: a study of nanocrystalline silver dressings in chronic venous leg ulcers. *Advances in Skin & Wound care*, 10, 549–558.
77. Chen, J., Han, C. M., Lin, X. W., Tang, Z. J., & Su, S. J. (2006). Effect of silver nanoparticle dressing on second degree burn wound. *Zhonghua wai ke za zhi* [Chinese Journal of Surgery], 1, 50–52.
78. Price, R. D., Myers, S., Leigh, I. M., & Navsaria, H. A. (2005). The role of hyaluronic acid in wound healing: assessment of clinical evidence. *American Journal of Clinical Dermatology*, 6, 393–402.
79. Chen, L. H., Xue, J. F., Zheng, Z. Y., Shuhaidi, M., Thu, H. E., & Hussain, Z. (2018). Hyaluronic acid, an efficient biomacromolecule for treatment of inflammatory skin and joint diseases: A review of recent developments and critical appraisal of preclinical and clinical investigations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 572–584.
80. Monfort, J., & Benito, P. (2008). Hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis. *Reumatologia clinica*, 1, 36–43.
81. Shaw, J., Hughes, C. M., Lagan, K. M., & Bell, P. M. (2007). The clinical effect of topical phenytoin on wound healing: a systematic review. *The British Journal of Dermatology*, 5, 997–991004.

82. Inchingolo, F., Vermesan, D., Inchingolo, A. D., Malcangi, G., Santacroce, L., Scacco, S., Benagiano, V., Girolamo, F., Cagiano, R., Caprio, M., Longo, L., Abbinante, A., Inchingolo, A. M., Dipalma, G., Tarullo, A., & Tattoli, M. (2017). Bedsores successfully treated with topical phenytoin. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*, 1, 45–48.
83. Hao, X. Y., Li, H. L., Su, H., Cai, H., Guo, T. K., Liu, R., Jiang, L., & Shen, Y. F. (2017). Topical phenytoin for treating pressure ulcers. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD008251.
84. Mithieux, S. M., & Weiss, A. S. (2016). Design of an elastin-layered dermal regeneration template. *Acta biomaterialia*, 33–40.
85. Jao, D., Xue, Y., Medina, J., & Hu, X. (2017). Protein-Based Drug-Delivery Materials. *Materials (Basel, Switzerland)*, 5.
86. Langton, A. K., Sherratt, M. J., Griffiths, C. E., & Watson, R. E. (2010). A new wrinkle on old skin: the role of elastic fibres in skin ageing. *International Journal of Cosmetic science*, 5, 330–339.
87. Zhang, M., Pierce, R. A., Wachi, H., Mecham, R. P., & Parks, W. C. (1999). An open reading frame element mediates posttranscriptional regulation of tropoelastin and responsiveness to transforming growth factor beta1. *Molecular and Cellular Biology*, 11, 7314–7326.
88. Almine, J. F., Bax, D. V., Mithieux, S. M., Nivison-Smith, L., Rnjak, J., Waterhouse, A., Wise, S. G., & Weiss, A. S. (2010). Elastin-based materials. *Chemical Society reviews*, 9, 3371–3379.
89. Ehrlich, H. P., & Hunt, T. K. (2012). Collagen Organization Critical Role in Wound Contraction. *Advances in Wound Care*, 1(1), 3–9.

90. Galiano, R. D., Michaels, J., Dobryansky, M., Levine, J. P., & Gurtner, G. C. (2004). Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society and the European Tissue Repair Society*, 4, 485–492.
91. Zomer, H. D., & Trentin, A. G. (2017). Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *Journal of Dermatological Science*, 1, 3–12.
92. Wang, X., Ge, J., Tredget, E. E., & Wu, Y. (2013). The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. *Nature protocols*, 2, 302–309.
93. Luccioli, G. M., Robertson, H.R., & Khan, D.S. (1963). The Pattern Of Contraction During The Healing Of Excised Skin Wounds In The Rabbit. *Canadian Journal of Surgery*, 499–510.
94. Cutberthson, A. M. (1959). Contraction of full thickness skin wounds in the rat. *Surgery, Gynecology & Obstetrics*, 4, 421–432.
95. Benavides, F., Oberyshyn, T. M., VanBuskirk, A. M., Reeve, V. E., & Kusewitt, D. F. (2008). The hairless mouse in skin research. *Journal of Dermatological Science*, 1, 10–18.

96. Cotran R.S., Kumar V., Collins T. Reparación de los tejidos: regeneración celular y fibrosis. In: Robbins C., ed. Patología estructural y funcional (6th ed). Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 2000:112-7.
97. Sinha U.K., Gallagher L.A. (2003). Effects of steel scalpel, ultrasonic scalpell, CO 2 laser, and monopolar and bipolar electrosurgery on wound healing in guinea pig oral mucosa. *Laryngoscope*, 113:228-36.
98. Ibrahim, N. ', Wong, S. K., Mohamed, I. N., Mohamed, N., Chin, K. Y., Ima-Nirwana, S., & Shuid, A. N. (2018). Wound Healing Properties of Selected Natural Products. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11.
99. Kasuya, A., & Tokura, Y. (2014). Attempts to accelerate wound healing. *Journal of Dermatological Science*, 3, 169–172.
100. Hinz, R. S., Hodson, C. D., Lorence, C. R., & Guy, R. H. (1989). In vitro percutaneous penetration: evaluation of the utility of hairless mouse skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 1, 87–91.
101. Greenhalgh, D. G. (). Models of wound healing. *The Journal of Burn Care & Rehabilitation*, 4, 293–305.
102. Rudolph, R. (1979). Location of the force of wound contraction. *Surgery, Gynecology & Obstetrics*, 4, 547–551.
103. de Vries, H. J., Middelkoop, E., Mekkes, J. R., Dutrieux, R. P., Wildevuur, C. H., & Westerhof, H. (1994). Dermal regeneration in native non-cross-linked collagen sponges with different extracellular matrix molecules. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society and the European Tissue Repair Society*, 1, 37–47.

104. Almine, J. F., Wise, S. G., & Weiss, A. S. (2012). Elastin signaling in wound repair. *Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews*, 3, 248–257.
105. Pierce, R. A., Moore, C. H., & Arian, M. C. (2006). Positive transcriptional regulatory element located within exon 1 of elastin gene. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 3, L391-9.
106. Raghunath, M., Bächli, T., Meuli, M., Altermatt, S., Gobet, R., Bruckner-Tuderman, L., & Steinmann, B. (1996). Fibrillin and elastin expression in skin regenerating from cultured keratinocyte autografts: morphogenesis of microfibrils begins at the dermo-epidermal junction and precedes elastic fiber formation. *The Journal of Investigative Dermatology*, 5, 1090–1095.
107. Toussay, X., Tiberi, M., & Lacoste, B. (2019). Laser Doppler Flowmetry to Study the Regulation of Cerebral Blood Flow by G Protein-Coupled Receptors in Rodents. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 377–387.
108. Moorthy, R. S. (2011). Doppler ultrasound. *Medical journal, Armed Forces India*, 1, 1–2.
109. Alan D. *Clinical Doppler Ultrasound* (2000). Harcourt Publishers Limited, 73-101.
110. Nuffer, Z., Rupasov, A., & Bhatt, S. (2017). Doppler Ultrasound Evaluation of Circulatory Support Devices. *Ultrasound Quarterly*, 3, 193–200.
111. Han, G., Nguyen, L. N., Macherla, C., Chi, Y., Friedman, J. M., Nosanchuk, J. D., & Martinez, L. R. (2012). Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing by promoting fibroblast migration and collagen deposition. *The American Journal of Pathology*, 4, 1465–1473.

112. Pelegrino, M. T., De Araujo Lima, B., Do Nascimento, M., Lombello, C. B., Brocchi, M., & Seabra, A. B. (2018). Biocompatible and Antibacterial Nitric Oxide-Releasing Pluronic F-127/Chitosan Hydrogel for Topical Applications. *Polymers*, 10(4), 452.
113. Lin, T. K., Zhong, L., & Santiago, J. L. (2017). Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. *International Journal of Molecular Sciences*, 1.
114. Schanuel, F. S., Saguie, B. O., & Monte-Alto-Costa, A. (2019). Olive oil promotes wound healing of mice pressure injuries through NOS-2 and Nrf2. *Applied physiology, Nutrition, and Metabolism*.
115. Abd Jalil, M. A., Kasmuri, A. R., & Hadi, H. (2017). Stingless Bee Honey, the Natural Wound Healer: A Review. *Skin Pharmacology and Physiology*, 2, 66–75.
116. Lukic, J., Chen, V., Strahinic, I., Begovic, J., Lev-Tov, H., Davis, S. C., Tomic-Canic, M., & Pastar, I. (2018). Probiotics or pro-healers: the role of beneficial bacteria in tissue repair. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society and the European Tissue Repair Society*, 6, 912–922.
117. Luan, A., Hu, M. S., Leavitt, T., Brett, E. A., Wang, K. C., Longaker, M. T., & Wan, D. C. (2018). Noncoding RNAs in Wound Healing: A New and Vast Frontier. *Advances in Wound Care*, 1, 19–27.
118. Sheykhasan, M., Wong, J. K. L., & Seifalian, A. M. (2019). Human Adipose-Derived Stem Cells with great Therapeutic Potential. *Current Stem Cell Research & Therapy*.
119. Naderi, N., Combella, E. J., Griffin, M., Sedaghati, T., Javed, M., Findlay, M. W., Wallace, C. G., Mosahebi, A., Butler, P. E., Seifalian, A. M., & Whitaker, I. S.

(2016). The regenerative role of adipose-derived stem cells (ADSC) in plastic and reconstructive surgery. *International Wound Journal*, 1, 112–124.

120. Gao, T., Jiang, M., Liu, X., You, G., Wang, W., Sun, Z., Ma, A., & Chen, J. (2019). Patterned Polyvinyl Alcohol Hydrogel Dressings with Stem Cells Seeded for Wound Healing. *Polymers*, 1.

121. Kolaparthi, L. K., Sanivarapu, S., Moogla, S., & Kutcham, R. S. (2015). Adipose Tissue - Adequate, Accessible Regenerative Material. *International Journal of Stem Cells*, 8(2), 121–127.

ANEXOS



Región de Murcia
Consejería de Agua,
Agricultura y Medio Ambiente

Dirección General de Agricultura,
Ganadería, Pesca y Acuicultura

Servicio de Producción Animal
Plaza Juan XXIII s/n
30008 Murcia

T. 012
F. 968 362863
www.carm.es/cagric



PÍA LÓPEZ JORNET
DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGÍA,
ESTOMATOLOGÍA, RADIOLOGÍA Y
MEDICINA FÍSICA
HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO
MORALES MESEGUER
AVDA. MARQUÉS DE LOS VÉLEZ, S/N
30008 MURCIA

RESOLUCION

Vista la solicitud para la autorización de la realización de un proyecto de investigación con animales presentada con fecha 29/11/2016 y nº de registro de entrada 201600648247, por D^a. Pía López Jornet, como responsable del mismo.

Vista la propuesta del proyecto denominado: "Evaluación de la capacidad cicatrizante de nuevos compuestos en un modelo de exéresis cutánea en ratón SKH1".

Visto el informe favorable del comité ético del establecimiento usuario con código REGA ES300305440012.

Visto el resumen no técnico del proyecto.

Visto el resultado favorable de la evaluación del proyecto por el órgano habilitado "Comité Ético de Experimentación Animal (CEEa) de la Universidad de Murcia".

Visto que en dicha evaluación se clasifica como Tipo II, y se indica que no es necesario llevar a cabo la evaluación retrospectiva del proyecto.

Visto el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Visto el Informe emitido por el Servicio de Producción Animal al respecto.

Considerando la competencia que tiene atribuida esta Dirección General sobre la base de lo dispuesto en el Decreto nº 106/2015, de 10 de julio, por el que se establecen los Órganos Directivos de la Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente, y con independencia de otras actuaciones que esta u otra Administración puedan emprender,

Proyecto de investigación A13170104

Firmante: MORALES MESEGUER, CARMEN T.
 Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico administrativo archivado por la Comunidad Autónoma de Murcia, según el artículo 30.3 de la Ley 11/2007, de 22 de junio.
 Su autenticidad puede ser contrastada accediendo a la siguiente dirección: <https://sede.carm.es/verificalibros> e introduciendo el código seguro de verificación (CSV) 8361684-e0d4-b5c-5600566685





Región de Murcia
Consejería de Agua,
Agricultura y Medio Ambiente

Dirección General de Agricultura,
Ganadería, Pesca y Acuicultura

Servicio de Producción Animal
Plaza Juan XXIII s/n
30008 Murcia

T. 012
F. 968 362863
www.carim.es/cagric

RESUELVE

Conceder autorización a D^a. Pía López Jomet, para la realización del proyecto solicitado, como responsable y usuario del mismo, asignándole el código de identificación **Nº A13170104**, teniendo esta autorización una validez que se corresponderá con la duración prevista en su memoria, con un máximo de cinco años, siempre y cuando no se produzca una modificación relevante en dicho procedimiento, en cuyo caso sería necesario efectuar una nueva solicitud de autorización a la autoridad competente.

Toda la documentación pertinente de los proyectos, incluida la información referida a los protocolos de supervisión, tratamientos administrados a los animales durante los procedimientos, bajas imprevistas y fechas y métodos de eutanasia, deberá estar a disposición del personal del "Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Murcia" y de la autoridad competente, desde el inicio del proyecto hasta al menos cinco años después de finalizar el mismo.

Lo que en cumplimiento del Art. 40 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas se le NOTIFICA, significándole que contra dicha Resolución cabe Recurso de Alzada ante la Excmo. Sra. Consejera de Agua, Agricultura y Medio Ambiente, en el plazo de un mes desde la recepción de la presente notificación, sin perjuicio de poder ejercitar, en su caso, cualquier otro que se estime pertinente.

LA DIRECTORA GENERAL DE AGRICULTURA, GANADERÍA, PESCA Y ACUICULTURA
(documento firmado electrónicamente al margen)
Fdo. Carmen T. Morales Cuenca



Firmado: MORALES CUENCA, CARMEN T.
 Este es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico administrativo archivado por la Comunidad Autónoma de Murcia, según el artículo 30.5 de la Ley 1/2000 de 7 de junio.
 Su autenticidad puede ser comprobada en la siguiente dirección: <https://sede.carim.es/verificadores> o la siguiente dirección: <https://sede.carim.es/verificadores>



Proyecto de investigación A13170104

