

DESARROLLO Y EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE UN NUEVO APÓSITO CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE PARA EL TRATAMIENTO DE HERIDAS CUTÁNEAS

LEIOA 2016

Iker Azcoitia Ramsden

Directores de tesis:

Prof. Dra. Ana Isabel Alonso Varona

Prof. Dr. Teodoro Palomares Casado

Departamento de Biología Celular e Histología

Facultad de Medicina y Odontología

Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea

Este trabajo de tesis doctoral ha sido realizado gracias a la financiación recibida en la convocatoria de Ayudas para el programa de apoyo al capital humano y la movilidad geográfica de los recursos humanos, Programa IKERTU, del Departamento de Industria, Comercio y Turismo y el Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno vasco.

A mis aitas

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar un trabajo tan arduo y lleno de dificultades como el desarrollo de una tesis doctoral es inevitable mencionar a todas aquellas personas e instituciones que han facilitado las cosas para que este proyecto salga adelante.

En primer lugar me gustaría expresar mi agradecimiento a mis directores, la Doctora Ana Alonso y al Doctor Teodoro Palomares, por la confianza que depositaron en mí para llevar a cabo este proyecto, su asesoramiento, paciencia y el esfuerzo que han realizado durante todo este tiempo.

En segundo lugar, quiero agradecer a la empresa Histocell la oportunidad de permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones. Agradecer a Julio Font y Marta Acilu, como presidentes de la compañía, y a Begoña Castro, como directora científica, la confianza que han depositado en mí desde el primer día.

Así mismo, me gustaría agradecer a todas aquellas personas que han estado conmigo desde que terminé la carrera. Agradecer a mis compañeros del departamento de Biología Celular (los que están y los que no están), así como a los compañeros que han pasado por Histocell, en todos estos años, sus palabras de ánimo y apoyo.

Por último, dar las gracias a mi familia y amigos. Este trabajo está dedicado a ellos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE MATERIAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
ABREVIATURAS	xiv

ÍNDICE DE MATERIAS

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. LAS HERIDAS CRÓNICAS, UN PROBLEMA SOCIOSANITARIO	3
I.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA CICATRIZACIÓN	5
I.2.1. Fase inflamatoria	6
I.2.2. Fase proliferativa	9
▪ Fibroplasia	9
▪ Neo-angiogénesis.....	10
▪ Re-epitelización	11
▪ Retracción de la herida	12
I.2.3. Fase de remodelación	13

I.3. TRATAMIENTO ACTUAL DE LAS HERIDAS.....	14
I.3.1. Clasificación de los apósitos.....	17
I.4. INFLUENCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA CRONICIDAD DE LAS HERIDAS.....	23
I.4.1. Radicales libres	23
I.4.2. Fisiopatología del estrés oxidativo.....	26
I.4.3. Estrés oxidativo y cicatrización	30
I.4.4. Estrés oxidativo y heridas crónicas.....	30
I.5. AGENTES ANTIOXIDANTES.....	32
I.5.1. Terapia antioxidante en el tratamiento de heridas crónicas.....	35
I.6. NUEVAS PROPUESTA TERAPEÚTICA PARA EL TRATAMEINTO DE LAS HERIDAS.....	39
I.6.1. N-acetilcisteína.....	39
I.6.2. Curcumina.....	41
I.6.3. El polisacárido galactomanano <i>Locust Beam gum</i> (LBG).....	42
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45

III. MATERIALES, METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	49
III.1. MATERIALES	51
III.1.1. Materiales empleados en el desarrollo del apósito HR006	51
III.1.2. Materiales utilizados en los ensayos <i>in vitro</i>	53
III.1.3. Animales utilizados en los ensayos <i>in vivo</i>	55
III.2. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	55
III.2.1. Diseño y caracterización del apósito HR006	55
III.2.1.1. Matriz de LBG	56
▪ Análisis de la microestructura de la matriz.....	57
▪ Determinación del grado de hinchamiento de la matriz....	57
▪ Evaluación del grado de pureza de la matriz.....	58
▪ Análisis de la citotoxicidad de la matriz LBG.....	58
▪ Evaluación de la capacidad antioxidante del LBG.....	60
III.2.1.2. Solución de hidratación antioxidante (AHsol)	61
▪ Estudio de la capacidad antioxidante de la NAC y la curcumina.....	61
▪ Determinación de las dosis terapéuticas de la NAC y la curcumina.....	61

III.2.2. Modelo <i>in vitro</i> de estrés oxidativo y análisis del efecto modulador de los componentes del apósito HR006 sobre fibroblastos sometidos a estrés oxidativo	62
III.2.2.1. Modelo de estrés oxidativo.....	62
▪ Modelo celular.....	62
▪ Inducción de estrés oxidativo	63
▪ Análisis del efecto del estrés oxidativo sobre la viabilidad, la proliferación y la senescencia de la población celular.....	63
▪ Análisis de los niveles intracelulares de ROS	65
▪ Análisis del efecto del estrés oxidativo sobre los niveles intracelulares de GSH.....	65
▪ Análisis del efecto del estrés oxidativo sobre los niveles de expresión de genes proinflamatorios	66
III.2.2.2. Análisis del efecto individual de los componentes de la AHsol (NAC y curcumina) sobre los fibroblastos sometidos a estrés oxidativo	68
▪ Análisis del efecto de la NAC y la curcumina sobre la proliferación celular.....	68
▪ Análisis del efecto de la NAC y la curcumina sobre los niveles de ROS	68
▪ Análisis del efecto de la NAC y la curcumina sobre los niveles de expresión génica de genes proinflamatorios.....	69

III.2.2.3. Estudio del efecto combinado de los componentes del apósito (LBG+NAC+Curcumina) sobre fibroblastos sometidos a estrés oxidativo	70
▪ Análisis de la viabilidad celular.....	70
▪ Análisis de los niveles intracelulares de ROS	71
III.2.3. Estudio de la biocompatibilidad del apósito HR006.....	71
▪ Evaluación de la citotoxicidad.....	72
▪ Evaluación de la hemocompatibilidad.....	73
▪ Evaluación de la capacidad de irritación dérmica	74
III.2.4. Evaluación <i>in vivo</i> de la eficacia del apósito HR006.....	75
III.2.4.1. Modelo <i>in vivo</i> de lesión dermo-epidérmica	75
III.2.4.2. Evaluación clínica de la eficacia del apósito HR006 sobre el proceso de cicatrización	76
▪ Análisis macroscópico de las heridas	76
▪ Análisis histopatológico	77
III.2.5. Análisis estadístico.....	79
▪ Media y desviación estándar.....	79
▪ Comparación de medias (prueba t-student)	80
▪ Análisis de varianza (ANOVA).....	80
▪ Correlación y regresión lineal.....	81

IV. RESULTADOS.....	83
IV.1. DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DEL APÓSITO HR006	85
IV.1.1. Síntesis de la matriz de LBG.....	85
IV.1.2. Análisis de la microestructura de la matriz.....	86
IV.1.3. Determinación de la capacidad de hidratación de la matriz.....	87
IV.1.4. Evaluación del grado de pureza de la matriz.....	88
IV.1.5. Análisis de la citotoxicidad del LBG	88
IV.1.6. Evaluación de la capacidad antioxidante del LBG	89
IV.1.7. Análisis de la capacidad antioxidante de la NAC y la curcumina y su efecto sobre la viabilidad celular y los niveles intracelulares de GSH.....	90
IV.1.7.1. Estudio de la capacidad antioxidante de la NAC y la curcumina	91
IV.1.7.2. Determinación de las dosis de la NAC y la curcumina.....	92
▪ Efecto sobre la viabilidad celular	92
▪ Efecto sobre los niveles intracelulares de GSH.....	94
IV.2. ANÁLISIS DEL EFECTO <i>IN VITRO</i> DE LOS COMPONENTES DEL APÓSITO HR006 SOBRE FIBROBLASTOS SOMETIDOS A ESTRÉS OXIDATIVO	96
IV.2.1. Efecto del estrés oxidativo sobre fibroblastos humanos	96

<ul style="list-style-type: none"> ▪ Efecto sobre la viabilidad, proliferación y senescencia celular 96 ▪ Efecto sobre los niveles de ROS..... 100 ▪ Efecto sobre los niveles intracelulares de GSH..... 100 ▪ Efecto sobre los niveles de expresión génica de genes proinflamatorios..... 101 	
IV.2.2. Análisis del efecto protector de la NAC y la curcumina sobre fibroblastos sometidos a estrés oxidativo	102
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Análisis de la viabilidad celular..... 103 ▪ Análisis de los niveles intracelulares de ROS 	104
IV.2.3. Análisis del efecto de la combinación de los componentes de AHsol sobre la expresión génica y la proliferación celular de los fibroblastos sometidos a estrés oxidativo.....	107
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Efecto sobre la expresión de genes proinflamatorios ▪ Efecto sobre la proliferación celular 	108
IV.2.4. Análisis del efecto combinado de los componentes que forman el apósito HR006 (LBG+NAC+curcumina) sobre fibroblastos sometidos a estrés oxidativo	109

IV.3. ANÁLISIS DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DEL APÓSITO	
HR006	111
▪ Análisis de la citotoxicidad.....	111
▪ Evaluación de la hemocompatibilidad.....	112
▪ Determinación de la capacidad de irritación dérmica.....	113
IV.4. EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i> DE LA EFICACIA DEL APÓSITO	
HR006 SOBRE LA CICATRIZACIÓN	115
▪ Análisis macroscópico	115
▪ Análisis histopatológico	117
V. DISCUSIÓN	123
VI. CONCLUSIONES	139
VII. BIBLIOGRAFÍA	143

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución temporal de las fases del proceso de cicatrización ...	6
Figura 2. Fase inflamatoria de la cicatrización.....	9
Figura 3. Fase proliferativa de la cicatrización	13
Figura 4. Fase de remodelación de la cicatrización.....	14
Figura 5. Estructura molecular de la goma de algarrobo	51
Figura 6. Estructura molecular de la curcumina.....	52
Figura 7. Estructura molecular de la N-acetilcisteína	53
Figura 8. Cultivo de fibroblastos humanos	54
Figura 9. Imágenes secuenciales del proceso quirúrgico en el modelo de herida.....	75
Figura 10. Imágenes secuenciales de la colocación del apósito HR006 ...	76
Figura 11. Matriz entrecruzada de LBG y criterio de solubilidad del proceso de entrecruzamiento	86
Figura 12. Imágenes macroscópica y microscópica de la matriz de LBG .	86
Figura 13. Capacidad de hinchado de la matriz de LBG.....	87
Figura 14. Citotoxicidad de la matriz de LBG.	89
Figura 15. Capacidad antioxidante del LBG. Ensayo ORAC	90
Figura 16. Capacidad antioxidante de la curcumina. Ensayo ORAC.....	91
Figura 17. Capacidad antioxidante de la NAC. Ensayo ORAC	91
Figura 18. Efecto de la curcumina y NAC sobre la viabilidad de fibroblastos	93

Figura 19. Efecto de la curcumina y NAC sobre los niveles intracelulares de GSH.....	94
Figura 20. Viabilidad celular de fibroblastos sometidos a concentraciones crecientes de H ₂ O ₂	97
Figura 21. Porcentaje de células senescentes a las 72 horas de cultivo post-oxidación.....	98
Figura 22. Marcaje de senescencia celular en fibroblastos sometidos a concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mM de H ₂ O ₂	99
Figura 23. Niveles intracelulares de ROS en fibroblastos sometidos a concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mM de H ₂ O ₂	100
Figura 24. Niveles de GSH en fibroblastos sometidos a concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mM de H ₂ O ₂	101
Figura 25. Análisis de la expresión génica de COX-2, NFκβ, TGFβ, IL-1β, TNF-α en fibroblastos sometidos a estrés oxidativo con concentraciones de 0.25 y 1 mM de H ₂ O ₂	102
Figura 26. Efecto de la curcumina y de la NAC sobre la viabilidad de fibroblastos oxidados sometidos a estrés oxidativo.....	103
Figura 27. Efecto de las combinaciones de curcumina y NAC sobre la viabilidad de fibroblastos oxidados sometidos a estrés oxidativo.....	104
Figura 28. Efecto de la curcumina y NAC sobre los niveles de ROS en fibroblastos sometidos a estrés oxidativo.....	105
Figura 29. Efecto de las combinaciones de curcumina y NAC sobre los niveles de ROS en fibroblastos sometidos a estrés oxidativo.....	106
Figura 30. Efecto de <i>AHsol</i> sobre los niveles de expresión de genes proinflamatorios en fibroblastos sometidos a estrés oxidativo.....	108

Figura 31. Efecto de la AHsol sobre la viabilidad de fibroblastos sometidos a estrés oxidativo.....	109
Figura 32. Efecto de la combinación de los componentes del apósito sobre los niveles intracelulares de ROS y la viabilidad de fibroblastos sometidos a estrés oxidativo.....	110
Figura 33. Viabilidad de fibroblastos en contacto con el apósito HR006..	111
Figura 34. Hemocompatibilidad del apósito HR006.....	112
Figura 35. Capacidad de irritación dérmica del apósito HR006	113
Figura 36. Evolución del cierre de la herida en el estudio <i>in vivo</i> de la eficacia del apósito HR006.....	115
Figura 37. Imágenes macroscópicas de la evolución del cierre de la herida.....	116
Figura 38. Microfotografías de biopsias obtenidas en los días 6, 10 y 16 durante el estudio de eficacia <i>in vivo</i> del apósito HR006. Tinción Tricrómico de <i>Masson</i>	119
Figura 39. Microfotografías de biopsias obtenidas en los días 6, 10 y 16 durante el estudio de eficacia <i>in vivo</i> del apósito HR006. Inmunodetección de citoqueratinas	121

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características ideales de un apósito destinado a cura en ambiente húmedo (CAH)	16
Tabla 2. Relación de antioxidantes enzimáticas	33
Tabla 3. Relación de antioxidantes no enzimáticos.....	24
Tabla 4. Valores de equivalentes de ácido ascórbico (EAA) para curcumina y NAC.....	92

ABREVIATURAS

AAPH: 2,2'-Azobis(2-amidino-propanol) diclorhidrato

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AH_{sol}: Solucion de hidratación antioxidante (del inglés, *Antioxidant hydration solution*)

ARNm: Acido ribonucleico mensajero

ATTC: American type cell culture

AUC: Área bajo la curva (del inglés, *Area under curve*)

bFGF: Factor básico de crecimiento de fibroblasto (del inglés, *basic Fibroblast Growth factor*)

CAH: Cura en ambiente húmedo

CEEAH: Comisión de ética en experimentación animal y humana

CKs: Citoqueratinas

COX-2: Ciclooxygenasa 2

DAB: Diaminobencidina

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DPX: Medio de montaje DPX

EAA: Equivalentes de ácido ascórbico

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (del inglés, *Epidermal growth factor*)

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés, *Fibroblast growth factor*)

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GMP: Buenas prácticas de fabricación (del inglés, *Good manufacturing practice*)

GPx: Glutación peroxidasa

GSH: Glutation reducido

GTA: Glutaraldehido

H₂DCF-DA: 2,7-diclorofluoresceína diacetato

Hb: Hemoglobina

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

IGF: Factor de crecimiento similar a la insulina (del inglés, *Insulin-like Growth factor*)

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

ISO: Organización Internacional de Normalización (del inglés, *International Organization for Standardization*)

I κ β : Inhibidor específico de NF κ β

KGF: Factor de crecimiento de queratinocitos (del inglés, *Keratinocyte Growth factor*)

LBG: Goma de algarrobo (del inglés, *Locust bean gum*)

mBCI: Monoclorobimano

MEB: Microscopía electrónica de barrido

MMPs: Metaloproteasas

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NAC: N-acetilcisteína

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NF κ β : Factor nuclear kappa beta (del inglés, *Nuclear factor-kappa beta*)

¹O₂: Oxígeno singlete

$O_2^{\cdot-}$: Radical superóxido

OH^{\cdot} : Radical hidroxilo

ORAC: Capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno (del inglés, *Oxygen radical absorbance capacity*)

PBS: Tampón fosfato salino (del inglés, *Phosphate buffered saline*)

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés, *Platelet derived Growth factor*)

RNS: Especies reactivas del nitrógeno (del inglés, *Reactive nitrogen species*)

ROS: Especies reactivas del oxígeno (del inglés, *Reactive oxygen species*)

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (del inglés, *Real time-quantitative polymerase chain reaction*)

SBF: Suero bovino fetal

SDS: Dodecilsulfato sódico

SGIker: Servicios generales de investigación, Ikerkuntzarako zerbitzu orokorrak (UPV/EHU)

SOD: Superóxido dismutasa

TGF α : Factor de crecimiento transformante alfa (del inglés, *Transforming Growth factor alpha*)

TGF β : Factor de crecimiento transformante beta (del inglés, *Transforming Growth factor beta*)

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés, *Tumor necrotic factor alpha*)

UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia

UEI: Úlceras de extremidad inferior

UPP: Úlceras por presión (UPP)

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés, *Vascular endothelial growth factor*)

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

I. INTRODUCCIÓN

I.1. LAS HERIDAS CRÓNICAS, UN PROBLEMA SOCIOSANITARIO

Las heridas crónicas, definidas como aquellas heridas cuyo proceso de cicatrización se ve retrasado en el tiempo, constituyen un importante problema de salud pública desde un punto de vista epidemiológico, económico y social (Soldevilla Agreda y cols., 2007). Dentro de los diferentes tipos de heridas crónicas, las úlceras por presión (UPP) y las úlceras de extremidad inferior (UEI) constituyen el mayor porcentaje de las mismas.

El *National European Pressure Ulcer Advisory Panel (EPUAP)* define a las UPPs como lesiones localizadas en la piel y en el tejido subyacente y situadas, por lo general, sobre una prominencia ósea, como resultado de una presión o una combinación de presión y cizalla.

En el cuarto estudio nacional de prevalencia de las UPPs en España, realizado en 2013 por la GNEAUPP (*Grupo nacional para el estudio y asesoramiento en UPP*) se establecieron las cifras de prevalencia de UPPs en hospitales, en atención primaria y en centros socio-sanitarios. En atención hospitalaria dicha prevalencia se sitúa entre el 7% y el 8,5%, en atención primaria entre un 8% y el 9% y en los centros socio-sanitarios el valor se ha duplicado en los últimos tres años, alcanzando un rango entre un 12 y un 14%. Estos resultados indican un aumento en las cifras de prevalencia de UPPs en los tres niveles asistenciales en relación a estudios anteriores (Pancorbo-Hidalgo y cols., 2014). El aumento de la prevalencia en los centros socio-sanitarios se ha relacionado con los efectos de la crisis económica y los recortes sanitarios experimentados en nuestro sistema de salud, que han afectado principalmente a este tipo de centros, con una reducción del gasto tanto en recursos materiales como en personal sanitario (Pancorbo-Hidalgo y cols., 2014).

En relación a la prevalencia en países europeos, Vanderwee y cols. en 2007 llevaron a cabo un estudio sobre UPPs en el ámbito hospitalario en diferentes países de la Unión Europea, estableciendo una prevalencia media de 18,1%, pero con diferencias importantes entre los países del norte y del sur de Europa. La prevalencia en países del norte (Suecia, Irlanda y Reino Unido) se sitúa entre un 18 y un 23%, mientras que en los países del sur de Europa estudiados (Italia y Portugal) oscila entre un 8,3 y un 12,5%. En relación al centro de Europa, países como Alemania presentan una prevalencia hospitalaria intermedia (10,2%) entre los dos casos anteriores.

Las úlceras de extremidad inferior (UEI) se definen según la CONUEI (*Conferencia Nacional de Consenso sobre las úlceras de extremidad inferior*) como lesiones espontáneas o accidentales, cuya etiología puede ser un proceso patológico sistémico o de la extremidad, y que no cicatriza en el intervalo temporal esperado.

La CONUEI estableció en 2009 una prevalencia global de UEIs entre 0,1 y 0,3%, rango éste que se incrementa con la edad (CONUEI, 2009). Así, en el grupo de personas de 41 a 60 años la prevalencia se sitúa entre el 0,2% y el 2,5% y en el grupo de edad superior a los 80 años de edad, oscila entre el 2,1% y el 10% (Alvarez-Fernandez y cols., 2008).

En cuanto a su duración, se estima que entre un 40% y un 50% de las UEI permanecen abiertas o activas por un periodo no inferior a los seis meses. Un porcentaje muy similar supera los doce meses de evolución y casi el 10% permanece sin cicatrizar por encima de los cinco años. Además, se ha observado que un tercio de las heridas recidiva dentro del año siguiente a la cicatrización (Marinel Lo Roura, 2005).

El tratamiento de todas estas heridas crónicas conlleva un elevado gasto sanitario asociado a los tratamientos, las estancias hospitalarias o el tiempo de atención profesional (Gurtne y Chapman, 2015). En relación a las UPPs, Soldevilla Agreda y cols., en el último estudio realizado en España, establecieron en 2007 un coste de 461 millones de euros para el tratamiento de las UPPs en España, lo que supone el 5,2% del gasto sanitario total, y en el que alrededor del 15% va asociado al gasto en apósitos. Este gasto ha aumentado previsiblemente de forma paralela al incremento de la prevalencia de las UPPs en los últimos años.

En relación a las UEIs, aunque se dispone de pocos datos concretos sobre el coste económico que representa la atención de este tipo de pacientes, debido a la cronicidad y recidiva de esta patología, la CONUEI ha establecido una horquilla de gasto sanitario situado entre el 1.5% y el 3.0% del presupuesto total en los países europeos (CONUEI 2009).

I.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA CICATRIZACIÓN

La cicatrización es un conjunto de procesos de acción sincronizada que finaliza con la reparación del tejido dañado dando lugar a un tejido con características similares, aunque no idénticas, a la del tejido original. Con el objetivo de facilitar su estudio, la cicatrización se ha dividido clásicamente en tres fases consecutivas que se caracterizan por eventos bioquímicos y celulares característicos, pero que interactúan entre sí y en muchas ocasiones se superponen: la fase inflamatoria, la fase proliferativa y la fase de remodelación (Figura 1).

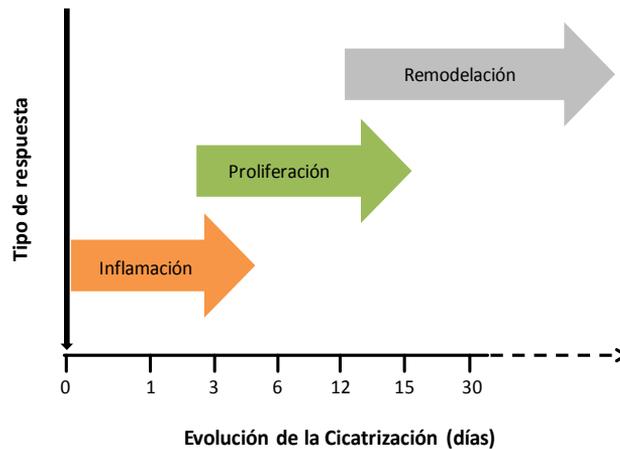


Figura 1. Evolución temporal de las fases de la cicatrización de una herida.

I.2.1. Fase inflamatoria

La fase inflamatoria es la primera etapa de la cicatrización y tiene lugar durante los tres primeros días siguientes a la lesión. La principal función de esta fase es eliminar los restos celulares y preparar la herida para la regeneración tisular. Clínicamente se caracteriza por eritema local, edema y maceración del tejido afectado. Durante esta fase actúan los elementos responsables de la coagulación y los de la respuesta inflamatoria, todos ellos necesarios para evitar la pérdida de sangre y fluidos, eliminar los restos celulares y tisulares, y evitar la contaminación de la zona por microorganismos.

En esta fase, la primera respuesta a la lesión es la vasoconstricción local, que da lugar a una ralentización del flujo sanguíneo en la zona, iniciando el proceso de hemostasia. El daño de la pared vascular expone el colágeno y proteínas de la membrana basal a la luz del endotelio, lo que induce la agregación y adhesión de las plaquetas y su activación (Semple y cols., 2011).

La activación plaquetaria induce la liberación de trombina estimulando la degranulación de las plaquetas, liberando factores de crecimiento como el derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento transformante α (TGF- α) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), además de poner en marcha la cascada de la coagulación para formar una matriz de fibrina. Una vez formado, el tapón de fibrina constituye una matriz provisional para la migración de células inflamatorias, atraídas quimiotácticamente al sitio de la lesión, fibroblastos y queratinocitos (Tsala y cols., 2013).

Tras la hemostasia se produce una vasodilatación local, caracterizada por un aumento de la permeabilidad capilar, con la consiguiente acumulación de líquido en el compartimento intersticial, y la extravasación y migración de neutrófilos a la zona de la lesión (Page y Pitchford, 2013). Los neutrófilos liberan citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) y eliminan bacterias presentes en el lecho de la herida mediante fagocitosis, la actividad de enzimas específicos (hidrolasas, proteasas y lisozima) y a través de la acción de radicales libres de oxígeno (ROS) presentes en los fagosomas de los neutrófilos.

La generación de radicales libres durante la fagocitosis se realiza a través de la enzima NADPH-oxidasa, que cataliza la reducción del oxígeno molecular O₂ en forma de radical superóxido O₂⁻. A su vez, dicho radical induce la formación de otras especies reactivas como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (OH[·]). Esta formación de radicales libres se conoce como *respiratory burst*. Mientras altas concentraciones de ROS tienen un efecto bacteriostático, las concentraciones bajas actúan como segundos mensajeros. De esta forma, si durante la fase inflamatoria las concentraciones de ROS superan la capacidad antioxidante celular, se produce una situación de estrés oxidativo local que conlleva un retraso en el inicio de la siguiente fase de la cicatrización (Sen CK y cols., 2002).

Durante el segundo o tercer día de la lesión se produce una disminución de la población de neutrófilos y un aumento del número de monocitos en el lecho de la herida. Éstos se convierten en macrófagos aumentando su tamaño y adquiriendo una gran capacidad fagocítica. La expresión de moléculas de adhesión como selectinas e integrinas por parte de las células endoteliales próximas a la lesión permite la fijación y posterior extravasación de leucocitos a la zona de la lesión. La migración de los monocitos a dicha zona está regulada por gradientes de diferentes moléculas quimiotácticas producidas por plaquetas, fibroblastos, queratinocitos y células leucocitarias (Eming y cols., 2007).

Además de la función inmunológica de los macrófagos como células fagocíticas y presentadoras de antígenos, estas células desempeñan un papel importante en la regeneración tisular a través de la síntesis de factores de crecimiento ($TGF\alpha$ y β , PDGF, FGF y IGF-1) que inducen la proliferación celular y la formación de nueva matriz extracelular.

Por último, los mastocitos, granulocitos que también intervienen en la fase inflamatoria al igual que los basófilos, liberan histamina, heparina y serotonina, con actividad proinflamatoria.

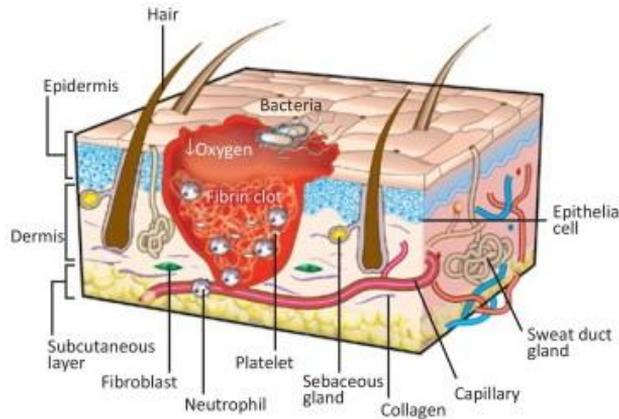


Figura 2. Fase inflamatoria de la cicatrización. La zona de la lesión se caracteriza por la presencia de plaquetas, neutrófilos y bacterias. Así mismo, la vasoconstricción provoca una reducción de la concentración de oxígeno en la zona de la lesión. Imagen tomada de Gurtner y cols. (2008).

I.2.2. Fase proliferativa

La fase proliferativa se extiende entre los días 3 y 12 posteriores a la lesión. Durante esta fase, la matriz provisional es reemplazada por tejido de granulación, en el que la nueva matriz extracelular formada favorece los procesos que tienen lugar durante la fase proliferativa: fibroplasia, neoangiogénesis, reepitelización y contracción de la herida (Kirsner y Eaglstein, 1993; Figura 3).

- *Fibroplasia*

Los fibroblastos son las células más activas en la producción de la matriz dérmica. Llegan al lecho de la herida desde las zonas adyacentes 48-72 horas tras la lesión, atraídos por factores de crecimiento locales, especialmente PDGF y TGF β 1, liberados por macrófagos adyacentes a la lesión, cuya actividad es estimular la proliferación de los fibroblastos y su migración a través de la

matriz de fibrina, mediante la expresión de receptores para integrinas (Epstein, 1999).

Las células presentes en el lecho de la herida secretan diferentes factores de crecimiento –los fibroblastos secretan IGF-1, bFGF, TGF- β , PDGF, KGF; las células endoteliales producen VEGF, bFGF y PDGF; los queratinocitos TGF- β , TGF- α e IL-1 β – que actúan de mediadores para el estímulo de la proliferación celular, la síntesis de proteínas de la matriz extracelular y también la formación de nuevos vasos sanguíneos (Tsala y cols., 2013).

Por otro lado, la migración de los fibroblastos a través de la matriz extracelular de fibrina requiere la expresión metaloproteasas (MMPs) que degradan dicha matriz. Durante la migración, los fibroblastos van depositando una nueva matriz de fibronectina y ácido hialurónico, proporcionando un molde para las fibras de colágeno e interviniendo en la contracción de la herida. Tras la migración, los fibroblastos comienzan a sintetizar fibras de colágeno I, II y III que sustituyen la matriz provisional de fibrina para dar lugar a una nueva matriz extracelular. Este proceso está regulado por el interferón gamma, el TNF α y por la propia matriz neoformada que inhibe la síntesis de colágeno y la proliferación de los fibroblastos.

▪ *Neoangiogénesis*

La generación de nuevos vasos sanguíneos es un proceso fundamental para la formación del tejido de granulación. Las condiciones microambientales de la herida, como un pH bajo, la reducida concentración de oxígeno o el incremento del ácido láctico, inician la liberación de los factores angiogénicos necesarios para la neovascularización (VEGF, TGF- β y bFGF, entre otros) producidos por macrófagos, fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales (Epstein, 1999). Durante esta fase, las células endoteliales de los vasos

sanguíneos adyacentes a la lesión sufren un cambio fenotípico que les permite proliferar y avanzar a través de la matriz extracelular. Así mismo, recientes estudios sugieren que células madre originarias de la médula ósea –denominadas hemangioblastos–, que circulan por el torrente sanguíneo pueden favorecer también, la formación de nuevos capilares (King y cols., 2014).

La migración de las células endoteliales forma brotes capilares que se dividen en sus extremos y se unen posteriormente formando plexos capilares. Estos nuevos capilares sanguíneos embebidos en la matriz extracelular, formada durante la etapa de la proliferación de los fibroblastos, suministran O_2 y nutrientes a la zona de la lesión y son responsables del aspecto macroscópico granular y rojizo característico del tejido de granulación.

▪ *Re-epitelización*

La formación del nuevo epitelio de revestimiento se denomina epitelización. Este proceso es estimulado por la presencia de EGF, FGF y TGF- α producidos por los macrófagos, queratinocitos y plaquetas activadas.

La epitelización se inicia a partir de la proliferación de células epiteliales no dañadas presentes en los márgenes de la herida, las cuales migran hacia el centro de la lesión tras la disolución de los desmosomas y hemidesmosomas y la emisión de pseudópodos que permiten el desplazamiento celular. Este proceso requiere la expresión de laminina 5 e integrinas que interactúan con la matriz provisional favoreciendo la migración celular. Tras la formación de una monocapa de células epiteliales, se produce una inhibición por contacto que conduce al cese de la migración celular.

En heridas muy superficiales en las que la membrana basal se mantiene íntegra, los queratinocitos migran sobre ella formando un estrato celular basal, a

partir del cual se produce un auténtico proceso de regeneración tisular (Tsala, 2013).

En heridas más profundas en las que la membrana basal se ha destruido, la epitelización se inicia por la migración de los queratinocitos sobre la matriz extracelular provisional producida por los fibroblastos, con posterior proliferación y diferenciación de los queratinocitos, responsables de la generación de una nueva membrana basal.

Finalmente, los queratinocitos basales, por un lado, restablecen la unión dermoepidérmica, a través de hemidesmosomas, expresando laminina y colágeno tipo IV y, por otro lado, comienzan a dividirse para restablecer todos los estratos de la epidermis.

▪ *Retracción de la herida*

La diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos marca el comienzo de la etapa de retracción de la herida, que tiene como objetivo la reducción de su tamaño (Singer y Clark, 1999).

Los miofibroblastos son fibroblastos especializados que contienen en su citoplasma el mismo tipo de filamentos de actina que las células del músculo liso. Estas células son atraídas a los bordes de la herida y se unen a la matriz extracelular a través de hemidesmosomas. Cuando se produce la contracción de las fibras de actina, la matriz se retrae reduciendo el tamaño de la herida y facilitando el cierre de la misma. Finalmente, la población de miofibroblastos inician un proceso de apoptosis que conduce a la desaparición de esta población celular en la zona de la lesión (Darby y cols., 2014).

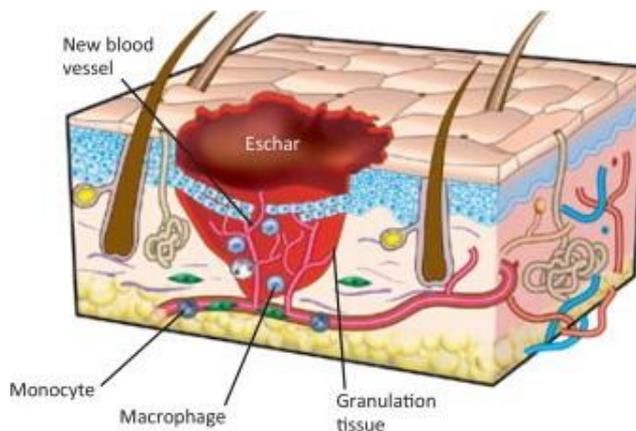


Figura 3. Fase proliferativa de la cicatrización. En esta fase se produce la proliferación y migración de los fibroblastos y queratinocitos así como la formación de nuevos vasos sanguíneos. Imagen tomada de Gurtner y cols. (2008).

I.2.3. Fase de remodelación

La fase de remodelación constituye el final del proceso de cicatrización, estando caracterizada por la formación de un tejido cicatricial a partir de una matriz colagénica inmadura. Durante este periodo, la proliferación celular y neovascularización se interrumpe, se alcanza un equilibrio entre las actividades de síntesis de componentes de la nueva matriz y su degradación por las MMPs, la fibronectina desaparece gradualmente y el ácido hialurónico, así como otros glicosaminoglicanos, son reemplazados por proteoglicanos (Majewska y Gendaszewska-darmach, 2011).

En esta fase, el colágeno es remodelado y realineado a lo largo de las líneas de tensión. El colágeno tipo III, mayoritario durante la proliferación, se degrada progresivamente por la acción de MMPs y es sustituido por colágeno tipo I.

Al final de esta fase, que puede extenderse durante varios meses, se reduce significativamente el número de células y vasos sanguíneos y la dermis recupera gradualmente las características previas a la lesión, alcanzando una resistencia a las fuerzas de tensión equivalente al 70% de la del tejido original (Figura 4).

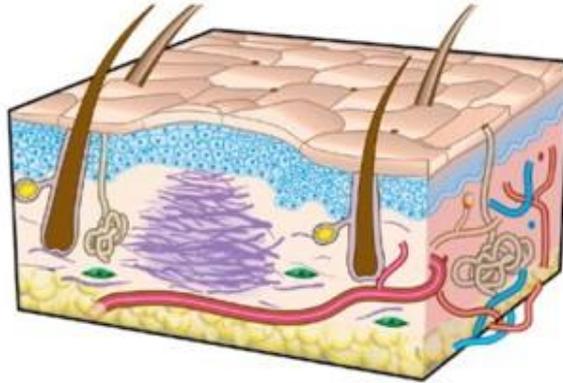


Figura 4. Fase de remodelación. Se caracteriza por una reducción de la población de fibroblastos dérmicos, la regeneración de la epidermis y la ausencia de apéndices cutáneos (folículos pilosos o glándulas sebáceas). Imagen tomada de Gurtner y cols. (2008).

I.3. TRATAMIENTO ACTUAL DE LAS HERIDAS

La gran variedad de tipos de heridas ha dado lugar a la necesidad de diseñar diferentes apósitos adaptados a cada una de las etapas del proceso de cicatrización. Estos apósitos constituyen un segmento importante del mercado farmacéutico mundial (Boateng y cols., 2008).

En el pasado, el tratamiento tradicional de las heridas se llevaba a cabo manteniendo expuesta la zona de la lesión o cubriéndola con apósitos de algodón o lino, con diversos grados de absorción, cuya función principal era mantener la herida seca permitiendo la evaporación de los exudados y limitando la

contaminación bacteriana de la herida. El resultado habitual de este tipo de cura era la formación de una costra fijada a los bordes de la herida, la cual interfería el proceso de generación de tejido sano (Boateng y cols., 2008).

En 1962, George D. Winter publicó en la revista Nature su trabajo sobre cicatrización titulado “*Formation of the Scab and the Rate of Epithelization of Superficial Wounds in the Skin of the Young Domestic Pig*“, en el que demostraba que las heridas cicatrizaban más rápidamente en un ambiente húmedo (cubiertas por un polímero que mantenía la humedad en la herida) en comparación con la cura seca tradicional (expuestas al aire o cubiertas por una gasa estéril). Este hecho supuso la incorporación de un nuevo concepto en el tratamiento de heridas, la cura en ambiente húmedo (CAH).

Como consecuencia, desde la década de los 80 y asociado al desarrollo de biomateriales, han ido apareciendo una enorme cantidad y diversidad de apósitos sintéticos, basados en la CAH, que permiten mantener unos niveles de humedad adecuados en el lecho de la herida impidiendo, al mismo tiempo, la desecación y la maceración de la lesión. Estos apósitos se basan en el concepto de crear un ambiente óptimo que permita mantener húmedo el entorno de la herida, la circulación eficaz de oxígeno que ayude a la regeneración de células y tejidos y una reducción de la carga bacteriana.

Aunque no existe un único apósito útil para el tratamiento de todos los tipos de heridas, analizando los resultados obtenidos con la utilización de diferentes tipos de apósitos, diversos autores (Torra y cols., 2004; Jones y cols., 2006; Boateng y cols., 2008) han descrito las características ideales de los apósitos destinados a la CAH (Tabla 1).

Tabla 1. Características que debe reunir un apósito de cura en ambiente húmedo (CAH)

Características ideales de un apósito	Significancia clínica en la cicatrización
Ser biocompatible	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Evita una respuesta inmunológica ante la presencia del apósito.
Proporcionar y mantener un ambiente húmedo en el lecho de la herida	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Previene la desecación de la herida y favorece los procesos de desbridamiento autolíticos. ▪ Aumenta la migración epidérmica, promueve la angiogénesis y la síntesis de matriz extracelular.
Controlar el exudado (absorber y retener) evitando la maceración de la piel y el agravamiento de la lesión	<ul style="list-style-type: none"> ▪ El exceso de exudado contiene enzimas que degradan el tejido y bloquean la proliferación y la actividad de las células y rompen la matriz extracelular, impidiendo la cicatrización. El exceso de humedad puede macerar la herida.
Permitir el paso de vapor de agua y aire	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La permeabilidad al vapor de agua controla el manejo del exudado evitando la maceración de la piel perilesional. ▪ El control de la concentración de oxígeno en la herida favorece los procesos de angiogénesis (en hipoxia) y proliferación de fibroblastos y reepitelización (en normoxia).
Proteger la herida frente a microorganismos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La infección prolonga la fase inflamatoria e impide la cicatrización.
Mantener la temperatura	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La temperatura fisiológica mejora la circulación sanguínea al lecho de la herida y favorece la migración de células epidérmicas.
Ser de fácil aplicación y retirada (sin lesionar la piel)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Los apósitos muy adherentes pueden ser muy dolorosos en su retirada y causar daño en el tejido.

I.3.1. Clasificación de los apósitos

A partir del desarrollo de nuevos materiales para la síntesis de apósitos basados en la CAH se estableció una primera clasificación, en función de su actividad, en apósitos pasivos y apósitos activos.

Los apósitos pasivos son materiales simples, como gasas de algodón o vendajes, cuya función es proteger, aislar y taponar las heridas. Aunque proporcionan una cierta protección frente a la contaminación bacteriana, dicha protección pierde eficacia cuando el apósito se humedece debido al contacto con los exudados o los fluidos externos. Por otro lado, tienden a adherirse a la herida, lo que ocasiona dolor al paciente al ser retirados. Por estas razones, este tipo de apósitos han sido sustituidos en el tratamiento de heridas crónicas y quemaduras por formulaciones más avanzadas que permiten mantener la humedad en la zona de la lesión.

Los apósitos activos son aquellos que tienen la capacidad de crear y mantener un ambiente húmedo alrededor de la herida, favoreciendo la cicatrización. Actualmente existen numerosos tipos de apósitos activos en el mercado, que pueden ser clasificados según dos criterios: composición y características, y efecto biológico que ejercen sobre la herida.

Atendiendo a la composición y características del apósito se pueden describir los siguientes tipos:

- *Alginatos*

Los apósitos de alginato se obtienen a partir de las sales de ácido algínico (sales de calcio y sodio), un polisacárido natural formado por la unión de los ácidos glucurónico y manurónico. Los apósitos de alginato,

en contacto con el exudado de la herida, forman un gel hidrofílico que mantiene un ambiente húmedo en el lecho de la lesión, limita la secreción de la herida y reduce la contaminación bacteriana (Heenan, 2007). Estos apósitos presentan una alta capacidad de absorción que puede alcanzar de 15 a 20 veces su propio peso y, por ello, son muy utilizados en heridas que producen elevadas cantidades de exudado (Jones y *cols.*, 2006).

Los iones de calcio contribuyen al proceso de hemostasia llevado a cabo en la primera fase de la cicatrización. Además, se ha demostrado que son capaces de activar a los macrófagos estimulando en ellos la producción de $TNF\alpha$, factor que inicia la cascada de señales inflamatorias durante el proceso de cicatrización (Thomas y *cols.*, 2000).

▪ *Hidrocoloides*

Los hidrocoloides son los apósitos más utilizados en la cura de heridas. El término hidrocoloide describe una familia de apósitos compuestos por moléculas coloidales (carboximetil celulosa sódica, pectina o gelatina) combinados con otros materiales tales como elastómeros o adhesivos. Estos apósitos se utilizan en la clínica porque, a diferencia de otros, son capaces de adherirse tanto a las zonas húmedas como a las secas de la herida.

Este apósito gelifica al absorber el exudado de la herida contribuyendo a mantener un ambiente húmedo e incrementando progresivamente su permeabilidad al vapor de agua y al aire. El hecho de que su retirada no provoque dolor hace que sea un apósito especialmente utilizado en heridas agudas y crónicas que afectan a niños (Boateng y *cols.*, 2008).

▪ *Hidrogeles*

Los hidrogeles son apósitos insolubles en agua que se obtienen mediante el entrecruzamiento de polímeros hidrofílicos, como polimetacrilatos y polivinilpirrolidina. Estos apósitos pueden ser aplicados como un gel amorfo o como una lámina, para lo cual deben de ser previamente entrecruzados. Los hidrogeles contienen aproximadamente entre un 70-90% de agua y, por ello, carecen de alta capacidad de absorción. Por esta razón, en heridas exudativas, la acumulación de exudado puede dar lugar a la maceración y proliferación bacteriana en la herida. Sin embargo, el hecho de aportar humedad a la herida, favorece el desbridamiento autolítico, permitiendo la eliminación de tejido necrótico (Boateng y cols., 2008).

▪ *Películas de poliuretano*

Las láminas o películas de poliuretano son apósitos flexibles, impermeables a fluidos y bacterias y carecen de capacidad para absorber exudado. Aunque el carácter de material impermeable permite crear un ambiente húmedo en la herida, puede ocasionar la maceración de los tejidos debido al exceso de humedad. Este tipo de apósito fue utilizado por Winter (1962) para evaluar el efecto de la humedad en la cicatrización. Aunque las láminas de poliuretano se utilizan preferentemente en heridas escasamente exudativas que se encuentran en fase de epitelización, los actuales apósitos de poliuretano tienen una porosidad y permeabilidad variables al vapor de agua, a los gases y a los exudados, lo que permite su utilización en diversos tipos de lesiones.

- *Espumas de materiales hidrofílicos*

Estas espumas son apósitos formados por una capa hidrofílica absorbente, que está en contacto con la herida, y un lámina exterior de poliuretano que puede ser permeable o semipermeable, manteniendo el ambiente húmedo alrededor de la herida y proporcionando un aislamiento térmico (Wound Care Guidelines, 2005). Debido a su alta capacidad de absorción, incluso en condiciones de presión, reducen el número de cambios de apósitos y evitan la maceración de la piel perilesional. Además, su utilización está indicada en el tratamiento de heridas con un exceso de tejido de granulación, debido a su capacidad para limitar la formación de cicatrices queloides (Young, 1997).

Por último, el avance en el conocimiento de los procesos implicados en la cicatrización ha dado lugar al desarrollo de materiales con un efecto biológico sobre las diferentes fases de la cicatrización de la herida. Así, atendiendo al efecto biológico de los apósitos se puede establecer la siguiente clasificación:

- *Efecto desbridante*

El desbridamiento es el proceso por el cual se elimina del lecho de la herida restos de tejido necrótico, cuya presencia constituye un obstáculo para el proceso de cicatrización y que favorece, además, el crecimiento bacteriano.

La desbridación inducida por apósitos activos puede ser autolítica o enzimática. La desbridación autolítica es aquella que se produce de manera natural por la acción fagocitaria de leucocitos y macrófagos en el lecho de la herida. Los apósitos que inducen este tipo de desbridamiento son aquellos capaces de mantener un alto grado de humedad en la zona de

la lesión. La desbridación enzimática se basa en la aplicación de enzimas exógenas que degradan el tejido necrótico tales como colagenasa, papaína o tripsina. Los apósitos activos pueden liberar de manera controlada dichas enzimas proteolíticas en el lecho de la herida.

▪ *Efecto antimicrobiano*

La presencia de una alta carga bacteriana en la herida interfiere en el desarrollo normal del proceso de cicatrización.

Los apósitos con capacidad para reducir y controlar la carga bacteriana utilizan antisépticos de amplio espectro de absorción. El nitrato de plata es el antiséptico más utilizado en los apósitos con efectos antimicrobiano, aunque también se utilizan otras moléculas como la clorhexidina o la polihexametil biguanida.

Otro compuesto con actividad antimicrobiana es la miel. Utilizada ampliamente en determinadas culturas, ha demostrado su capacidad para inhibir la proliferación de más de 50 tipos de bacterias, sin evidencia de desarrollo de mecanismos de resistencia bacteriana (Lipsky y Hoey, 2009).

En algunos casos se utilizan antibióticos (tetraciclina, ofloxacina) incorporados en diversos tipos de apósitos, para reducir la toxicidad asociada a la antibioterapia sistémica y conseguir una dosis de antibiótico local suficiente. Están especialmente indicados en pacientes que presentan heridas en extremidad inferior como consecuencia de insuficiencia vascular (Boateng y cols., 2008).

▪ *Efecto analgésico*

Un importante porcentaje de heridas crónicas cursan con dolor que afecta de forma considerable a la calidad de vida de los pacientes.

Los apósitos con actividad analgésica actúan liberando localmente analgésicos en el lecho de la herida, contribuyendo así a reducir su ingesta por vía oral. Entre los analgésicos con actividad local utilizados en apósitos activos podemos destacar el ibuprofeno (Jørgensen y cols., 2006) o la morfina (Huptas y cols., 2011).

▪ *Apósitos activadores de la matriz extracelular*

Estos apósitos se caracterizan por actuar directamente sobre la síntesis de nueva matriz extracelular dérmica, aportando componentes propios de dicha matriz, como colágeno o ácido hialurónico, o limitando la degradación de ésta, como los que inhiben la actividad de MMPs.

Este tipo de apósitos se utiliza específicamente durante la fase proliferativa del proceso de cicatrización.

▪ *Apósitos que incorporan factores de crecimiento*

Los factores de crecimiento actúan en el proceso de cicatrización activando la angiogénesis y la proliferación celular, que afectan a la producción y degradación de matriz extracelular y desempeñan un papel importante en la actividad de los fibroblastos y en las células inflamatorias.

En bibliografía se han descrito la síntesis de apósitos para administración tópica de factores de crecimiento implicados en la cicatrización como el TGF β 1, PDGF, EGF o el FGF (Boateng y cols., 2008). A pesar de ello, los altos costes de producción y la baja biodisponibilidad de los factores de crecimiento han dificultado su presencia como terapia de uso clínico.

I.4. INFLUENCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA CRONICIDAD DE LAS HERIDAS

I.4.1. Radicales libres

Un radical libre es aquella especie química (átomo o molécula) que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital más externo. Los radicales libres tienden a recuperar la situación de estabilidad perdida, bien cediendo un electrón desapareado, actuando como agente reductor, o bien captando un electrón y, por tanto, actuando como un agente oxidante. Así, en este proceso, el radical libre recupera su estabilidad a expensas de desestabilizar a los átomos o moléculas con los que reacciona (Halliwell y Gutterdine-John, 2006).

En los sistemas biológicos, los radicales libres más abundantes son las especies reactivas dependientes del oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) y las especies reactivas dependientes del nitrógeno (*Reactive Nitrogen Species*, RNS). En los organismos aeróbicos, el O₂ es el principal responsable de la formación de radicales libres. Se denominan ROS, tanto a sus radicales libres como a las moléculas precursoras y derivadas de ellos (Halliwell, 2006). A continuación, se citan los principales tipos de ROS:

- *Oxígeno singlete (1O_2)*

El oxígeno singlete es la forma más reactiva del oxígeno molecular, obtenida por absorción de energía electromagnética. No es un radical libre pero, al ser una molécula muy reactiva, reacciona fácilmente con otras moléculas como proteínas, DNA o lípidos.

- *Radical superóxido (O_2^-)*

Es el radical de oxígeno más abundante. Se produce mayoritariamente en la mitocondria y en el retículo endoplásmico por la reducción del oxígeno molecular al aceptar un electrón desapareado. La principal fuente de producción de radical superóxido es la cadena transportadora de electrones, transformándose en dicho radical entre el 1 y 2% del oxígeno consumido a través de la enzima NADPH oxidasa, aunque también se produce como resultado del estallido respiratorio de células fagocíticas durante la inflamación, por la actividad de múltiples reacciones enzimáticas, especialmente las que implican a las deshidrogenadas flavoproteínicas, oxidasas e hidroxilasas, o por la autooxidación de moléculas (cisteínas o hemoproteínas) en presencia de trazas de metales. El O_2^- , aunque no es un radical muy tóxico, es la principal fuente de formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y, a su vez, precursor del radical hidroxilo (OH), la especie reactiva de mayor toxicidad. Además de su actividad prooxidativa, estudios más recientes sugieren que el radical superóxido forma parte de varias rutas de reacciones bioquímicas en el interior celular (Weidinger y Kozlov, 2015).

- *Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)*

No se puede considerar estrictamente como un radical libre porque no posee electrones desapareados en su último orbital, pero se le considera una especie reactiva porque da lugar a radicales libres. Su importancia reside en que es capaz de atravesar la membrana plasmática, con lo que puede dar lugar a oxidación en lugares alejados de su lugar de producción. El peróxido de hidrógeno se puede formar a partir de diversas fuentes: reducción directa de una molécula de oxígeno por dos electrones, mediante una reacción catalizada por la enzima SOD, como producto de algunas enzimas y por reacciones químicas de autooxidación.

El H_2O_2 no es tóxico a concentraciones fisiológicas e interviene directamente en numerosas rutas bioquímicas como proliferación o migración celular. La reactividad del H_2O_2 reside en su capacidad para generar radicales hidroxilo en presencia de metales de transición, como el hierro y el cobre, mediante la reacción de *Fenton–Harber–Weiss*.

La detoxificación del peróxido de hidrogeno, a nivel intracelular, se lleva a cabo por la enzimas catalasa y glutatión peroxidasa (GPx).

- *Radical hidroxilo (OH)*

Es el radical de oxígeno más reactivo y, por tanto, uno de los más dañinos a nivel celular. Carece de capacidad de difusión y se desconoce un enzima que lo detoxifique directamente, posiblemente porque el propio OH lo destruiría. En los seres vivos se puede producir por varios mecanismos: *i*) Ruptura fotolítica del peróxido de hidrogeno, en la que la luz divide una molécula de H_2O_2 en dos radicales hidroxilo, *ii*) Reacción de *Fenton–Harber–Weiss*, en la que la molécula de H_2O_2 , en presencia de

cofactores como el hierro o el cobre, da lugar a un radical hidroxilo (Halliwell y Gutterdine-John, 2006).

El radical hidroxilo puede afectar a las proteínas, modificando su conformación e inhibiendo su actividad, inducir peroxidación lipídica y ejercer un efecto genotóxico al reaccionar con las bases nitrogenadas.

I.4.2. Fisiopatología del estrés oxidativo

Los radicales libres son moléculas con alta reactividad, sintetizadas como resultado del metabolismo celular, que intervienen como segundos mensajeros en una gran variedad de rutas de señalización intracelular (Le Bras y *cols.*, 2005).

Por ello, en los sistemas biológicos existe un preciso equilibrio entre la formación de moléculas oxidantes y la acción de los sistemas antioxidantes. En ocasiones, cuando la generación de radicales libres supera la capacidad antioxidante del organismo, se produce una alteración del equilibrio oxidante/antioxidante que producen lo que se conoce como estrés oxidativo (Le Bras y *cols.*, 2005).

La exposición a los radicales libres genera un daño interno continuado que amenaza la integridad de las biomoléculas mediante la puesta en marcha de reacciones de peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y oxidación de ADN.

▪ *Peroxidación lipídica*

Los lípidos son las biomoléculas más susceptibles de ser dañadas por radicales libres, especialmente aquellas que poseen mayor número de dobles enlaces en su estructura, es decir, los ácidos grasos poliinsaturados, tales como el ácido araquidónico, ácido linoleico o el ácido eicosapentaenoico, ocasionando como resultado un daño en la integridad de las membranas celulares. Este proceso se conoce como peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica es una reacción en cadena que comienza con la oxidación de un carbono de la cadena alifática de un ácido graso dando lugar a un ácido graso radical. Esta molécula es muy inestable y rápidamente reacciona, de nuevo, con el oxígeno molecular, formando un ácido graso peroxil radical. Este radical reacciona con fosfolípidos adyacentes generando otro ácido graso radical e iniciando una cascada de oxidación lipídica que se extiende por toda la membrana plasmática. La reacción termina por la acción de los sistemas antioxidantes o por la fragmentación de los ácidos grasos lipoperoxidados hasta agotar el sustrato, lo que implica la muerte celular.

Entre las consecuencias patológicas de la peroxidación lipídica se pueden citar el incremento de la rigidez y la permeabilidad de las membranas plasmáticas, lo que conlleva su pérdida de funcionalidad, y el daño en las proteínas de membrana, inactivando receptores, enzimas o canales iónicos (Halliwell y Gutterdine-John, 2006).

▪ *Oxidación de proteínas*

La oxidación de proteínas puede dar lugar a una alteración de su estructura primaria, provocando un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, una pérdida o inhibición de su función.

Las alteraciones bioquímicas que se producen incluyen oxidaciones de las cadenas laterales, fragmentación de enlaces peptídicos, modificación de puentes disulfuro y enlaces no covalentes como los de hidrógeno, cambios de conformación, o alteración de la hidrofobicidad. En el caso especial de MMPs, cuando los radicales interaccionan en los sitios de unión de los metales se generan más radicales libres capaces de oxidar al resto de aminoácidos de la proteína, anulando su funcionalidad (Halliwell, 1996; Sharma y cols., 2012).

▪ *Oxidación de ácidos nucleicos*

El ADN también es susceptible de daño oxidativo. Cuando un radical libre reacciona con una desoxirribosa del ADN se produce una ruptura en la cadena a nivel del lugar de reacción. En otros casos, el daño oxidativo es la modificación de las bases del ADN dando lugar a subproductos como la 8-oxoadenina, 8-oxoguanina o la 8 hidroxil-2'-deoxiguanosina (Sharma y cols., 2012).

La división de una célula dañada antes de la reparación completa del ADN puede producir mutaciones que afectan al control de la replicación e inducir el desarrollo de un tumor.

En los casos en los que el daño oxidativo es muy intenso, los mecanismos de reparación dependientes de las enzimas reparadores de

ADN resultan insuficientes y la consecuencia del daño oxidativo es la muerte celular.

I.4.3. Estrés oxidativo y cicatrización

Durante el proceso de cicatrización se observan incrementos temporales de los niveles de radicales libres, debido a que varios tipos de células inflamatorias como los neutrófilos, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos producen radicales superóxidos a través de la actividad de la enzima NADPH oxidasa.

En condiciones normales, los sistemas antioxidantes eliminan el exceso de radicales libres, recuperando el equilibrio *redox* de la célula. Así, la regulación de los sistemas antioxidantes permite controlar los niveles adecuados de radicales libres en cada etapa del proceso de cicatrización.

Durante la hemostasia inicial, los ROS generados en la cascada de coagulación inducen un aumento de la expresión del factor tisular que desencadena la puesta en marcha de la vía extrínseca de la coagulación y la subsecuente formación de trombina. Los ROS también están implicados en el reclutamiento de plaquetas y la activación de las mismas por el colágeno. La agregación y activación plaquetaria son esenciales, además de para formar el tapón plaquetario, para liberar factores de crecimiento y citoquinas que ponen en marcha el proceso de cicatrización (Soneja y cols., 2005).

Durante la fase inflamatoria, algunos factores de crecimiento y citocinas liberados localmente, entre las que se encuentra la proteína inflamatoria de macrófago 1 alpha, son responsables de la migración y activación de neutrófilos y monocitos en el lecho de la herida. El H₂O₂ actúa como segundo mensajero de

los factores de crecimiento PDGF y TGF- β , de forma que este radical actúa como mediador de la respuesta inflamatoria. El factor TGF- β , liberado por fibroblastos y leucocitos, induce en estas células, de una manera autocrina, la síntesis de otras citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β y PDGF. Además, el PDGF activa el factor de transcripción NF κ β y la proteína quimioatrayente de macrófagos, estimulando también la respuesta inflamatoria. La formación de nuevos vasos sanguíneos en la zona de la lesión está inducida por FGF-2 y VEGF. Los radicales libres intervienen en este proceso aumentando la expresión de los receptores FGF-2 e induciendo la expresión de VEGF en queratinocitos (Soneja y cols., 2005; Fitzmaurice y cols., 2011).

Durante la reepitelización, los radicales libres participan en la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, los cuales inician la contracción de la herida, activan la expresión de colagenasas que degradan la matriz extracelular para favorecer la migración celular, y estimulan la liberación del factor de crecimiento epidérmico (EGF) que induce la proliferación de los queratinocitos (Soneja y cols., 2005).

I.4.4. Estrés oxidativo y heridas crónicas

Una herida crónica se puede definir como una herida con nula o escasa tendencia a la cicatrización espontánea.

Recientes estudios relacionan de forma directa la fisiopatología de las heridas crónicas con el estrés oxidativo presente en el lecho de la herida, como consecuencia del ambiente pro-inflamatorio de la zona lesionada. Así, se ha demostrado que el desajuste en los mecanismos reguladores de la producción ROS y sus procesos de detoxificación, puede ser una de las causas principales de cronicidad en las heridas (Soneja y cols., 2005). De hecho, en las heridas

crónicas, los niveles de ROS alcanzados durante la fase inflamatoria persisten en el zona dañada y el sistema antioxidante no es capaz de reducir y controlar el exceso de dichos radicales, dando lugar a un estado continuo de estrés oxidativo. En 2003, James y cols., describieron un aumento de los niveles de estrés oxidativo en úlceras vasculares, medido en el exudado de estas lesiones. Previamente, este mismo autor había descrito cómo las heridas crónicas no son capaces de controlar el exceso de ROS, debido, en parte, a una disminución de la actividad enzimática (James y cols., 2001).

Al persistir durante la inflamación los altos niveles de ROS en el lecho ulceroso, se mantienen los parámetros bioquímicos que definen dicha etapa: alta presencia de citocinas proinflamatorias, expresión de proteínas de adhesión en los capilares, y la migración de neutrófilos y macrófagos al área de la lesión. Además tienen un efecto directo sobre la migración, proliferación y síntesis de matriz extracelular por parte de los fibroblastos dérmicos y queratinocitos (Mosley y cols., 2004). Los leucocitos que han migrado al lecho de la herida durante la fase inflamatoria liberan proteasas que degradan la matriz extracelular provisional y remodelan sus componentes. De esta forma, se establece un equilibrio entre la actividad de las proteasas y los inhibidores de éstas durante el proceso de cicatrización. Cuando se concentra un exceso de radicales libres, se produce un desequilibrio con predominio de la actividad de moléculas que degradan la matriz extracelular (Wysocki y cols., 1993; Schreml y cols., 2010).

Este microambiente metabólico descrito anteriormente, condiciona la cronicidad de las heridas, en parte porque, según se ha demostrado, induce senescencia en los fibroblastos. De hecho se ha observado que el cultivo en estas células en presencia de exudado de heridas crónicas induce su senescencia de forma prematura (Mendez y cols., 1998). Además, en estudios *in vivo* se ha comprobado que las heridas crónicas se caracterizan por tener un alto porcentaje de fibroblastos senescentes y se ha sugerido que valores por encima del 15% de

fibroblastos senescentes en una herida interfieren en la síntesis de la matriz extracelular, necesaria para la migración de los queratinocitos y la reepitelización de la zona (Harding y cols., 2005).

I.5. AGENTES ANTIOXIDANTES

En 1995 Halliwell definió los antioxidantes como “*cualquier sustancia que en bajas concentraciones, comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de dicho sustrato*”. Desde un punto de vista bioquímico, los antioxidantes se clasifican en enzimáticos (tabla 2) y no enzimáticos (tabla 3). Los primeros son proteínas de alto peso molecular que eliminan radicales libres catalizando reacciones químicas. Los antioxidantes no enzimáticos son moléculas de bajo peso molecular que reaccionan directamente con los radicales libres evitando que ejerzan su poder oxidante sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

Tabla 2: Principales antioxidantes enzimáticos.

ANTIOXINDANTES ENZIMÁTICOS			
Antioxidante		Localización	Mecanismo de acción
Superoxido dismutasa (SOD)	SOD 1	Citoplasma y membrana mitocondrial	Catalizan la transformación de O_2^- a H_2O_2 (Fridovich, 1995)
	SOD 2	Mitocondria	
	SOD 3	Espacio extracelular	
Catalasa		Peroxisomas y Citosol	Cataliza la eliminación de H_2O_2
Glutación peroxidasa (GPx)		Intracelular	Detoxifica H_2O_2 y otros hidroperóxidos (Pastore y <i>cols.</i> , 2003)
Peroxirredoxinas		Intracelular	Reducen el H_2O_2 y peróxidos orgánicos (Rhee y <i>cols.</i> , 2005)

Tabla 3. Principales antioxidantes no enzimáticos.

ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS		
Antioxidante	Localización	Mecanismo de acción
Glutati3n	Intracelular	Sustrato de la glutati3n peroxidasa (Dickinson y Forman, 2002)
Coenzima Q	Mitocondrial	Protege frente al proceso de peroxidaci3n lipídica y regenera la vitamina E
Ácido lipoico	Membranas lipídicas	Elimina radicales libres, quela metales de transici3n y regenera las vitaminas C y E
Ácido úrico	Amplia distribuci3n	Elimina radicales libres y quela metales de transici3n
Cisteína	Amplia distribuci3n	Reduce compuestos orgánicos
Azúcares	Amplia distribuci3n	Elimina radicales hidroxilo
Vitamina C	Amplia distribuci3n	Reduce radicales libres generando radical semidehidroascorbato (Passage y cols., 2004)
Vitamina E	Membranas lipídicas	Inhibe la peroxidaci3n lipídica y quela el hierro (Parks y Traber , 2000)
Carotenoides	Membranas lipídicas	Elimina radicales libres
Compuestos fenólicos	Ex3genos	Quela metales de transici3n y eliminan radicales libres

I.5.1. Terapia antioxidante en el tratamiento de heridas crónicas

Durante los últimos años, diversos autores han investigado el efecto de los antioxidantes como agentes inductores del proceso de cicatrización, con la finalidad de su utilización en el tratamiento de las heridas crónicas. Así, los estudios *in vitro* e *in vivo* llevados a cabo indican que estos agentes, a través de la reducción del estrés oxidativo local, pueden proteger a las células del lecho de la herida y mejorar la cicatrización.

Como ejemplo de estos estudios *in vitro* que corroboran estos efectos, se pueden citar los estudios de Hehenberger y Hansson (1997) y Deveci y cols. (2005). Los ensayos que simulan las condiciones microambientales de las úlceras diabéticas (medio de cultivo con alto contenido en glucosa), estos autores observaron que se reducía la capacidad proliferativa de los fibroblastos y aumentaba la susceptibilidad de los queratinocitos para la apoptosis. En ambos casos, la adición de glutatión recupera la actividad proliferativa de los fibroblastos y protege a los queratinocitos de la apoptosis (Deveci y cols., 2005). Estos mismos resultados se obtuvieron con la adición de antioxidantes como el ácido ascórbico, la selenita, carotenoides y la coenzima Q10 (Hehenberger y Hansson, 1997).

En relación a los estudios *in vivo*, a continuación se describen los más significativos en función de los datos de eficacia obtenidos con los diferentes agentes antioxidantes utilizados en los ensayos de cicatrización.

- Superóxido dismutasa (SOD)

La enzima SOD cataliza la reacción que transforma el anión superóxido en H_2O_2 y oxígeno molecular.

Esta enzima presenta tres isoformas: la SOD1, localizada en el citoplasma, la SOD2 situada en la matriz mitocondrial, y la SOD3, que se encuentra en el espacio extracelular.

En algunas heridas se ha observado un aumento de los niveles de expresión de las enzimas SOD-1 y SOD2 (Steiling y *cols.*, 1999). Para estudiar el efecto de dichas enzimas, Iuchi y *cols.* en 2010 analizaron el proceso de cicatrización en ratones deficientes para la enzima SOD1. Los resultados mostraron un aumento del tiempo de cicatrización comparado con ratones control, si bien dicho efecto no fue observado en animales jóvenes (5-6 semanas). Así mismo, Blander y *cols.* en 2003, describieron un aumento de la senescencia de fibroblastos en ratones deficientes de SOD1.

Estos resultados sugieren que el efecto de la reducción de SOD1 durante la cicatrización implica un envejecimiento de la piel, directamente relacionado con la senescencia celular, impidiendo la regeneración de la nueva piel (Kurahashi y Junichi, 2015).

La enzima SOD de uso terapéutico se encuentra disponible tanto en formulación oral (suplementos nutricionales) como en formulación tópica, a la que se atribuye también un efecto antienvjecimiento.

▪ Vitamina C

La vitamina C desempeña un papel destacado en el proceso de cicatrización al modular la síntesis de colágeno y actuar como cofactor en la hidroxilación de los aminoácidos prolina y lisina.

El efecto beneficioso de la administración oral de vitamina C en la cicatrización únicamente se ha descrito en individuos con deficiencia de dicha vitamina en la dieta. De hecho, en los casos en los que no hay deficiencia de esta vitamina, el aumento de sus niveles no produce una mejoría significativa del proceso de cicatrización de heridas crónicas (ter Riet y *cols.*, 1995; Fitzmaurice y *cols.*, 2011).

▪ Vitamina D

La vitamina D interviene en el proceso de cicatrización a través de la inducción de la expresión, por parte de macrófagos, de catelicidinas, que son péptidos antimicrobianos que intervienen en la inmunidad innata. Dichos péptidos aumentan su concentración en las primeras etapas de la cicatrización, inducen la angiogénesis y mejoran la reepitelización (Mostafa y Hegazy, 2014).

Aunque existen algunos estudios clínicos de eficacia en el tratamiento de heridas crónicas con vitamina D que sugieren que la administración de vitamina D tras la lesión puede resultar beneficiosa en el proceso de cicatrización (Ramesh y *cols.*, 1993; Tian y *cols.*, 1995), otros estudios, en cambio, demuestran que su eficacia es limitada (Fitzmaurice y *cols.*, 2011).

▪ Vitamina E

La vitamina E es una molécula liposoluble con propiedades antioxidantes. En relación con la cicatrización, Musalmah y *cols.* (2005) evaluaron el efecto de la administración oral de vitamina E sobre la cicatrización de las heridas en ratas diabéticas. Estos autores observaron una reducción de la peroxidación lipídica y un aumento de los niveles de

enzimas antioxidantes, con el consiguiente efecto cicatrizante y la curación de las heridas. Un estudio más reciente (Zampieri y *cols.*, 2009) evaluó la aplicación tópica de vitamina E en heridas quirúrgicas en niños. En este caso, aunque se observó una mejoría en la cicatrización y una reducción en la formación de queloides, la utilización de un grupo control inadecuado no permitió extraer conclusiones significativas.

- Ácido α -lipoico

El ácido α -lipoico es una molécula antioxidante, presente en pequeñas cantidades en el interior de la célula. Debido a su actividad antioxidante, esta molécula reduce los niveles de ROS y contribuye, además, a la regeneración de otros antioxidantes como la vitamina E, el ácido ascórbico y la coenzima Q10 (Biewenga y *cols.*, 1997).

Los estudios de eficacia llevados a cabo con el ácido α -lipoico demuestran que la administración tópica (Külkamp-Guerreiro y *cols.*, 2013), oral (Alleva y *cols.*, 2005) o parenteral (Lateef y *cols.*, 2005) mejora la cicatrización de las heridas.

I.6. NUEVAS PROPUESTA TERAPEÚTICA PARA EL TRATAMIENTO DE LAS HERIDAS

Tal y como hemos señalado previamente, durante los últimos años se han llevado a cabo numerosos análisis y estudios clínicos para encontrar moléculas antioxidantes que aporten un beneficio en la cicatrización de heridas. Precisamente, una de las propuestas terapéuticas más novedosas para el tratamiento de las heridas es la utilización de este tipo de agentes bioactivos, aislados o en combinación, que permitan regular la duración e intensidad de la fase inflamatoria de la cicatrización.

Como continuación del apartado anterior, en este nuevo apartado se revisan las características y propiedades de las moléculas cuya utilización podría favorecer la consecución de dicho objetivo terapéutico. Estos agentes son: la N-acetilcisteína (NAC), la curcumina y el galactomanano *locust bean gum* (LBG).

I.6.1. N-Acetilcisteína (NAC)

La NAC es una variante acetilada del aminoácido L-cisteína que actúa como prodroga proporcionando cisteína disponible metabólicamente para la síntesis de GSH, un tripéptido tiol intracelular (Meister y Anderson, 1983) implicado en la regulación del ciclo celular, la síntesis de proteínas, la regulación de la expresión génica, la protección frente a agentes oxidantes y la detoxificación de las células, entre otras funciones. Así, el efecto de la NAC a nivel celular está asociado, entre otros, a su capacidad de incrementar el nivel intracelular de GSH y de neutralizar el exceso de los ROS, mediante reacción directa con su grupo sulfhidrilo (Agnihotri y Mishra, 2009).

Debido a su efecto antioxidante, desde los años 60 la NAC se ha utilizado como agente terapéutico en un amplio rango de enfermedades, en las cuales el estrés oxidativo desempeña un papel crítico en su etiopatogenia, como es el caso de enfermedades cardiovasculares, diabetes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedades neurodegenerativas, nefropatía inducida por la utilización de contrastes radiológicos, sobredosis por acetaminofeno, etc. (Rushworth y Megson, 2014). En estas patologías, el GSH intracelular limita el impacto del estrés oxidativo y protege componentes celulares vitales, como los lípidos, las proteínas y el ADN.

Como se ha señalado previamente, el incremento de los ROS en el lecho de la herida interfiere en el proceso de cicatrización, debido al daño que se produce en las membranas celulares, lípidos, proteínas y DNA. Por esta razón, se ha propuesto la utilización de la NAC en el tratamiento de las heridas, habiéndose observado su eficacia terapéutica en estudios *in vitro* e *in vivo*.

En ensayos *in vitro* se ha observado que la NAC produce los siguientes efectos biológicos: favorece la actividad de los neutrófilos (Nygren y cols., 2004), reduce la síntesis de citocinas proinflamatorias a través de la inhibición de la ruta de señalización de NFκβ (Lappas y cols., 2003; Kim do y cols., 2007), inhibe la expresión de TGFβ1, incrementa la producción de VEGF, induce la conversión de fibroblastos en miofibroblastos (Sugiura y cols., 2009) y estimula la proliferación y migración celular (Tsai y cols., 2014).

Los estudios de eficacia *in vivo* llevados a cabo por Deniz y cols. (2013) demostraron que la NAC, suministrada por vía oral y parenteral, mejora la cicatrización de heridas y quemaduras. Así mismo, Oguz y cols. (2015) establecieron que la administración tópica de NAC mejora el proceso de cicatrización y que dicho efecto es comparable al del dexapantenol –alcohol

biológicamente activo del ácido pantoténico que induce un incremento de los niveles de coenzima A, ampliamente utilizado en el tratamiento de heridas—.

I.6.2. Curcumina

La curcumina (diferulmetano) es un polifenol, obtenido del rizoma o raíz de la cúrcuma (*Curcuma longa*), que ha sido muy utilizado en la medicina tradicional india y china para el tratamiento de diversas patologías entre las que se incluyen dolencias hepáticas, alteraciones digestivas y lesiones cutáneas.

El estudio *in vitro* de la curcumina ha demostrado un amplio rango de actividades farmacológicas entre las que se incluyen la actividad antioxidante, la actividad antiinflamatoria y un efecto antimicrobiano (Maheshwari y cols., 2006).

La actividad antioxidante de la curcumina viene determinada, por un lado, por una acción antioxidante directa debido a su capacidad para atrapar radicales libres de oxígeno y, por otro lado, por una acción antioxidante indirecta ya que puede regular la expresión de enzimas antioxidantes como la SOD, la catalasa o la GPx y la GSH sintetasa.

En relación a su acción antioxidante indirecta, debido a su estructura química, la curcumina, tiene la capacidad de acomodar electrones extra en sus anillos aromáticos, lo que le permite reaccionar directamente con radicales libres como los radicales peróxido, generados durante el proceso de peroxidación lipídica, o radicales superóxido (Gopinath y cols., 2004; Jain y cols., 2006).

La reducción del estrés oxidativo producido por el efecto antioxidante directo de la curcumina señalado previamente, causa según algunos autores, una

disminución de la expresión de enzimas antioxidantes como la SOD, la catalasa o la GPx (Akbik y cols., 2014; Mohanty y cols., 2012), mientras que otras investigaciones han descrito el aumento de las mismas (Panchatcharam y cols., 2006). Además, la curcumina puede regular los niveles de GSH por medio de un incremento en la expresión de la GSH sintetasa (Biswas y cols., 2005).

La actividad antiinflamatoria de la curcumina viene definida por su capacidad inhibir la síntesis de TNF α , e IL-1, dos citocinas proinflamatorias liberadas por monocitos y macrófagos, y por la inhibición del factor de transcripción NF κ B. Mohanty y cols. (2012) observaron *in vivo* el efecto antiinflamatorio de la curcumina en heridas de rata sobre la regulación de dicha actividad. La acción de la curcumina sobre NF κ B se produce por la regulación de varias quinasas que intervienen en la ruta del factor de transcripción; así este agente induce la disminución de la concentración de PI3K y pAKT y el aumento de la concentración de I κ B, inhibidor específico de NF κ B.

I.6.3. El polisacárido galactomanano *Locust beam gum* (LBG)

Los polisacáridos son moléculas de alto peso molecular formadas por la unión de unidades repetidas de monosacáridos. Los polisacáridos, junto con los oligosacáridos, constituyen un importante grupo de biomoléculas que participan en numerosos procesos biológicos como la comunicación célula-célula, la inmunidad celular o el desarrollo embrionario (Liu y cols., 2015).

Además, se ha demostrado en estudios *in vitro* propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antiinflamatorias (Yildiz y Oner, 2014).

Durante los últimos años se ha producido un avance en la utilización de los polisacáridos en aplicaciones terapéuticas y, especialmente, en la síntesis de

biomateriales, en el desarrollo de sistemas de transporte y liberación controlada de fármacos y en el área de la viscosuplementación (Liu y *cols.*, 2015).

El uso terapéutico de un polisacárido está condicionado por su solubilidad, biocompatibilidad, bioactividad y la posibilidad de ser modificado químicamente con la finalidad de incrementar sus potenciales aplicaciones (Yildiz y Oner, 2014).

Los galactomananos son un grupo de polisacáridos formados por una cadena lineal de manosas, unidas por enlace $\beta(1-4)$, con ramificaciones de unidades de galactosa unidas por enlace $\alpha(1-6)$. La estructura molecular de los diferentes galactomananos se diferencia entre sí por el ratio de unidades de manosa/galactosa que presentan, confiriendo a estos polisacáridos distintas propiedades químicas y aumentando así su versatilidad para el uso en diferentes aplicaciones.

Entre las aplicaciones farmacéuticas, los galactomananos se han propuesto como agentes transportadores de moléculas activas hacia el colon. Así, en el 2006, Das y *cols.* sintetizaron matrices de galactomanano para el transporte y liberación controlada de ibuprofeno hasta el colon. Estos polisacáridos permanecen intactos en el estómago e intestino delgado y son, en cambio, degradados por las polisacaridasas específicas de la flora bacteriana presente en el colon.

Otra de las aplicaciones terapéuticas descrita para los galactomananos es la síntesis de biomateriales mediante entrecruzamiento químico. El control de la reacción de entrecruzamiento permite obtener materiales con diferentes características reológicas para su uso en distintas aplicaciones terapéuticas. Así, por ejemplo, en el 2007 Castro y *cols.* desarrollaron un biomaterial para la viscosuplementación destinado al tratamiento de la artritis.

Entre los diferentes galactomananos de origen vegetal se encuentra el LBG, polisacárido procedente de las semillas del fruto del algarrobo (*Ceratonia Siliqua*), cuya localización se extiende por toda la zona geográfica del Mediterráneo y en regiones de América del sur y Asia.

Las propiedades bioactivas y las características físico-químicas del LBG hacen de este galactomanano un agente con amplio potencial terapéutico (Pinheiro y cols., 2011; Dionisio y Grenha, 2012).

Entre sus propiedades bioactivas destacan su capacidad para reducir los niveles de LDL, reducir la síntesis hepática de colesterol o reducir la absorción de nutrientes (Zavoral y cols., 1983; Evans y cols., 1992; Brennan, 2005). Así mismo, Trommer y Neubert (2005) describieron la actividad antioxidante de LBG.

A nivel molecular, este galactomanano permite formar reacciones de entrecruzamiento o interaccionar, de forma sinérgica, con otros polisacáridos permitiendo el desarrollo de biomateriales con diferentes propiedades reológicas. Esta característica convierte a esta molécula en un polisacárido idóneo como vehículo para la liberación controlada de agentes farmacológicos en el colon (Raghavan y cols., 2002), mucosa oral (Vijayaraghavan y cols., 2008), en la superficie ocular (Suzuki y Lim, 1994) y dérmica (Carafa y cols., 2011).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El incremento de la incidencia de heridas crónicas es un problema relevante de salud pública, que conlleva un importante coste sanitario.

Estudios previos indican que la pérdida del equilibrio *redox*, con la consecuente situación de estrés oxidativo local, dificulta la curación de las heridas y puede resultar ser un factor determinante de la cronicidad de las mismas, dificultando su resolución terapéutica y aumentando la morbilidad del paciente.

En el presente trabajo se plantea un abordaje terapéutico de las heridas con la siguiente **hipótesis**:

El efecto antioxidante y antiinflamatorio ejercido por la combinación de LBG, NAC y curcumina puede favorecer la recuperación de fibroblastos humanos sometidos a estrés oxidativo. El diseño y desarrollo de un nuevo apósito para cura húmeda constituido por estos agentes combinados podría favorecer la cicatrización de las heridas cutáneas.

Para desarrollar esta hipótesis se establecen los siguientes **objetivos específicos**.

1. Diseñar y desarrollar un apósito para cura húmeda con capacidad antioxidante y antiinflamatoria.
2. Establecer un modelo de estudio de estrés oxidativo *in vitro* sobre una línea primaria de fibroblastos humanos.
3. Determinar la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de los componentes del apósito y analizar su efecto sobre la línea de fibroblastos humanos, sometidos a estrés oxidativo.

4. Analizar la biocompatibilidad *in vitro* del producto desarrollado.
5. Evaluar la eficacia *in vivo* del producto en un modelo porcino de cicatrización de heridas.

IV. RESULTADOS

IV.1. DISEÑO Y CARACTERIZACION DEL APÓSITO HR006

Con el objetivo de desarrollar un nuevo apósito antioxidante para el tratamiento de heridas cutáneas, se diseñó un producto constituido por una matriz, con una alta capacidad de absorber exudado, y una solución acuosa de carácter antioxidante (*AHsol*).

IV.1.1. Síntesis de la matriz de LBG

Para la síntesis de la matriz se seleccionó la goma de algarrobo, un galactomanano de origen vegetal, procedente de fuente renovable y extraído de las semillas del árbol del algarrobo (*Ceratonia siliqua*). Este polisacárido, soluble en agua, está formado por cadenas de manosas unidas entre sí por enlaces β -(1,4), con ramificaciones de galactosas unidas por enlaces β -(1,6) (figura 5, ver página 51). El galactomanano se caracteriza por presentar una ramificación de galactosa por cada cuatro manosas en su estructura lineal.

El proceso químico de la formación de la matriz es el resultado de la reacción de polimerización entre los grupos hidroxilos (OH^-) de la molécula de algarrobo y el glutaraldehído, como agente entrecruzante. Dicha reacción se llevó a cabo a pH ácido con el fin de permitir la activación de los grupos funcionales de ambas moléculas. El resultado final de la reacción de polimerización es la formación de una estructura tridimensional insoluble en agua, de color blanquecino y moderadamente translúcida (Figura 11).

Para la consideración de la formación de la matriz se utilizó un criterio de solubilidad. Así, cuando el polímero está entrecruzado, la tendencia del disolvente a entrar en la red es contrarrestada por la tensión elástico-retráctil que produce el entrecruzamiento. Por el contrario, cuando el polímero no está

entrecruzado, no existe ninguna fuerza que contrarreste la entrada del disolvente y se produce la disolución del material.

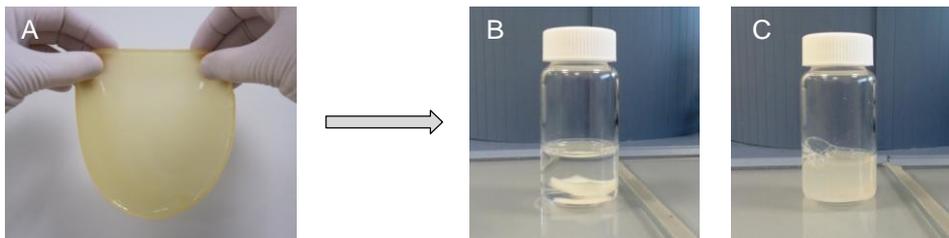


Figura 11. (A) Matriz entrecruzada tras la reacción de polimerización con GTA. Criterio de solubilidad (B) Matriz entrecruzada (C) Matriz disuelta en agua por una ineficaz reacción de entrecruzamiento.

IV.1.2. Análisis de la microestructura de la matriz

Como se observa en la figura 12, la matriz de algarrobo sintetizada presenta una estructura porosa. Los poros tienen un tamaño irregular, cuyo diámetro abarca entre 50-200 μm , y una interconexión interna entre los mismos que dota a la estructura de una alta capacidad para permitir la difusión de oxígeno y nutrientes.

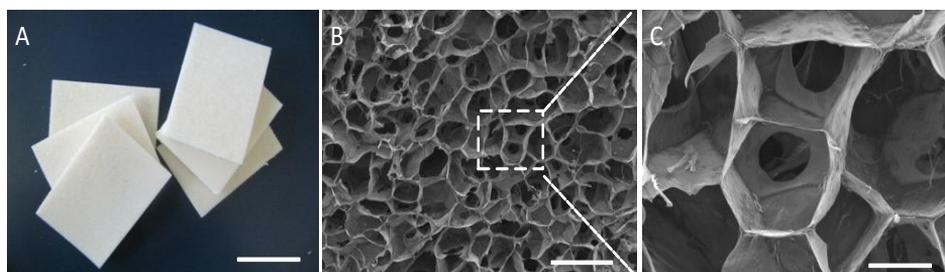


Figura 12. Imágenes de la matriz de algarrobo. A) Matriz de tamaño comercial de 7×5 cm. B) Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (aumento ×60). C) Detalle de la interconexión entre poros (aumento ×250).

IV.1.3. Determinación de la capacidad de hidratación de la matriz

La cantidad de agua retenida en un hidrogel depende, entre otros factores, de la cantidad de grupos hidroxilo y el grado de entrecruzamiento alcanzado al final de la reacción de polimerización.

Con el objetivo de caracterizar el material, se evaluó el grado de hinchamiento de la matriz liofilizada siguiendo la norma ISO 13726-1. Como se observa en la figura 13A, el material desarrollado permite una rápida absorción de la solución, similar al exudado de una herida (ver materiales y metodología) durante los primeros minutos, alcanzando un grado de hidratación de 17.6 veces su peso seco (79% de su capacidad máxima) a los 5 minutos de hidratación. A las 24 horas de hidratación, el material alcanzó su equilibrio con un valor de absorción de 22 veces su peso seco (Figura 13B).

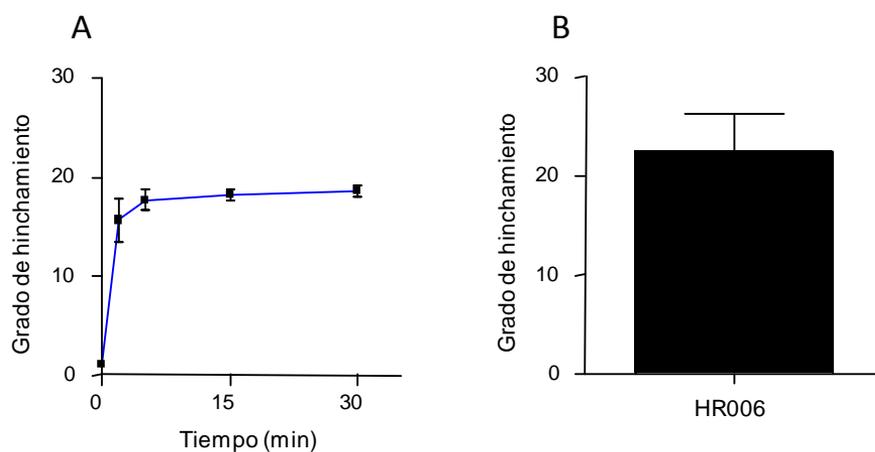


Figura 13. Grado de hinchamiento, expresado como el número de veces de aumento de peso en relación al peso de la matriz en seco, en tiempos cortos (A) y tras 24 horas de hidratación (B).

IV.1.4. Evaluación del grado de pureza de la matriz

Con el objetivo de determinar el grado de pureza de la matriz, se cuantificó el porcentaje de impurezas inorgánicas presente en la misma. Para ello, se llevó a cabo un análisis de determinación de cenizas totales mediante un proceso de calcinación de la materia orgánica. En la bibliografía referente a productos sanitarios no se ha encontrado ningún valor de referencia en el contenido total de cenizas. Por esta razón, para establecer un límite máximo de cenizas en el control de calidad del apósito, se estableció el valor de 1.0%, recogido en el código de sustancias químicas para alimentos (*Food Chemical Codex 9th Edition, 2014*), para la goma de algarrobo.

El contenido de impurezas presentes en el material analizado fue muy bajo. En todos los casos analizados el contenido total de cenizas fue <0.1%.

IV.1.5. Análisis de la citotoxicidad del LBG

Con el fin de evaluar la citotoxicidad de la matriz sintetizada, se analizó la viabilidad y morfología de fibroblastos humanos en contacto con el material.

Por un lado, la cuantificación de la viabilidad celular se llevó a cabo mediante la incubación de las células con el medio de cultivo obtenido tras el contacto previo con el material (norma ISO 10993-5). La viabilidad celular alcanzó un valor de un $84.9 \pm 2.4\%$ con respecto al control a las 24 horas de cultivo (Figura 14A).

Por otro lado, la morfología celular fue analizada por microscopía de fluorescencia mediante el marcaje con calceína. Como se observa en la figura 14B, los fibroblastos sembrados sobre el material presentaron un alto grado de viabilidad y una morfología fusiforme tras 72 horas en cultivo.

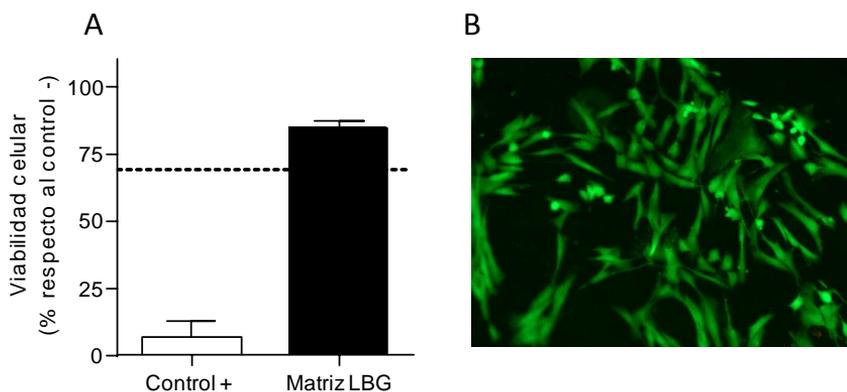


Figura 14. Análisis de la citotoxicidad de la matriz de algarrobo. A) Determinación de la viabilidad de las células cultivadas en medio extractivo. La línea punteada marca el límite de toxicidad celular (70%) definido en la norma ISO 10993-5. B) Imagen de microscopía de fluorescencia de fibroblastos humanos sembrados sobre una película de LBG, tras 72 horas en cultivo, y marcados con la sonda fluorescente calceína (en verde las células viables).

IV.1.6. Evaluación de la capacidad antioxidante del LBG

Con el objetivo de evaluar la capacidad antioxidante del LBG, se midió la capacidad de neutralizar el estrés oxidativo, inducido en un sistema libre de células, mediante el ensayo ORAC.

El LBG mostró una elevada capacidad de neutralizar específicamente radicales libres peroxilo. Dicha capacidad antioxidante fue dosis-dependiente entre las concentraciones de 0.1% y 5% de LBG ensayadas, dando lugar esta última a una completa neutralización de los radicales libres generados en el ensayo (Figura 15A).

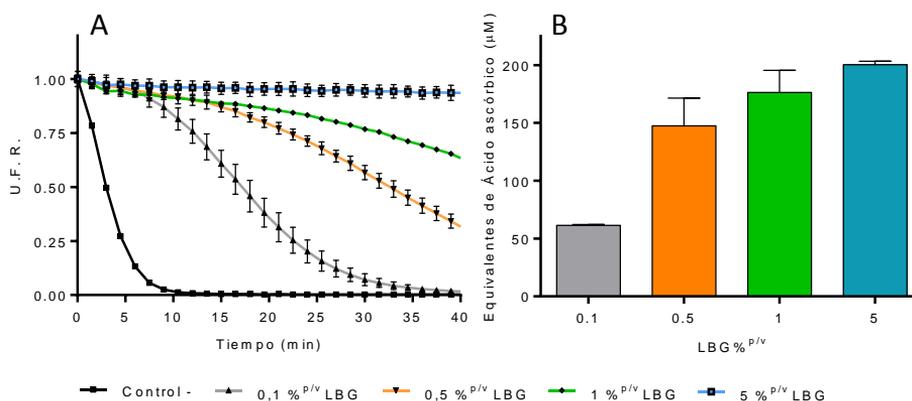


Figura 15. Actividad antioxidante del LBG. A) Análisis cinético de la fluorescencia emitida por la fluoresceína tras la exposición a concentraciones crecientes de LBG. B) Cuantificación de la capacidad antioxidante del LBG tomando como referencia la capacidad antioxidante del ácido ascórbico.

La figura 15B muestra la capacidad antioxidante del LBG expresada como Equivalentes de Ácido Ascórbico (EAA). La capacidad antioxidante alcanzada con la concentración de 1% de LBG es de 176.3 μM EAA. Concentraciones superiores de LBG no aumentaron de forma significativa dicha capacidad.

IV.1.7. Análisis de la capacidad antioxidante de la NAC y la curcumina y su efecto sobre la viabilidad celular y los niveles intracelulares de GSH

Con el fin de aumentar el carácter antioxidante del producto HR006, se formuló una solución acuosa (AHsol) compuesta por dos moléculas con demostrada capacidad antioxidante, la curcumina y la NAC.

En este estudio, se evaluó la capacidad antioxidante *per se* de dichas moléculas en ausencia de células. Así mismo, mediante ensayos *in vitro* con fibroblastos humanos, se determinó su efecto sobre la viabilidad celular y los niveles intracelulares de GSH.

IV.1.7.1. Estudio de la capacidad antioxidante de la NAC y la curcumina

El análisis de la capacidad antioxidante directa de dichas moléculas, en ausencia de células, se determinó mediante el ensayo de ORAC. Ambos compuestos mostraron una elevada capacidad para neutralizar radicales libres peroxilo. Dicha capacidad antioxidante fue dosis-dependiente, alcanzando una neutralización completa a partir de la concentración de 50 μM en el caso de la curcumina (Figura 16) y 1 mM en el caso del NAC (Figura 17).

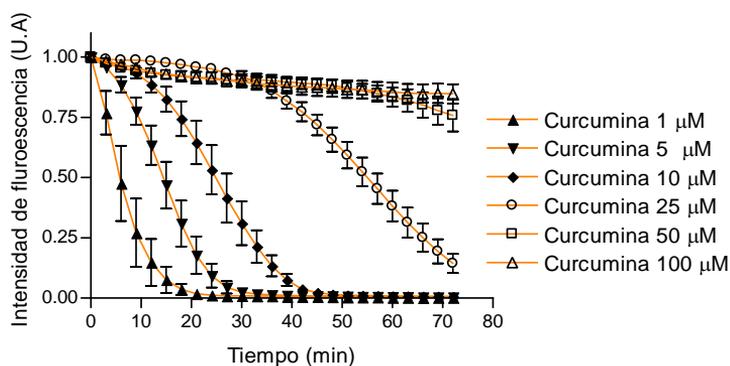


Figura 16. Actividad antioxidante de la curcumina. Cinética de la fluorescencia emitida por la fluoresceína con diferentes concentraciones de curcumina.

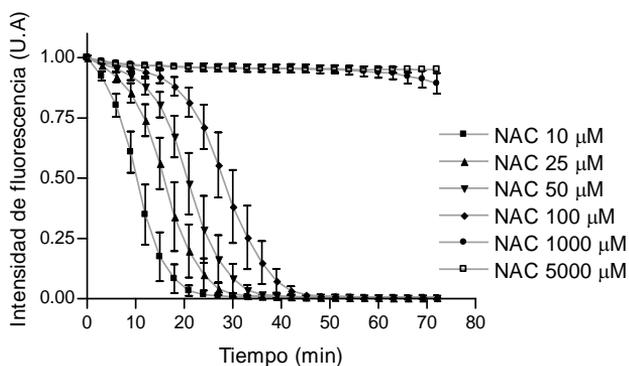


Figura 17. Actividad antioxidante de la NAC. Cinética de la fluorescencia emitida por la fluoresceína con diferentes concentraciones de NAC.

La tabla 4 muestra el análisis comparativo de la actividad antioxidante de la curcumina y la NAC expresada en EAA. Así, para las concentraciones de 10 y 50 μM , la curcumina presentó una capacidad de reducir el estrés oxidativo de 3.4 y 3.9 mayor que la NAC, respectivamente.

Tabla 4. Valores de EAA para las concentraciones de 10 y 50 μM de curcumina y NAC.

Equivalentes ácido ascórbico (EAA)	NAC		CURCUMINA	
	10 μM	50 μM	10 μM	50 μM
	47,3 μM^{EAA}	130,7 μM^{EAA}	167,4 μM^{EAA}	508,5 μM^{EAA}

IV.1.7.2. Determinación de las dosis de la NAC y la curcumina

Para este fin, se llevó a cabo un estudio del efecto de diferentes concentraciones de ambos compuestos, sobre la viabilidad y proliferación celular, y sobre los niveles intracelulares de GSH.

▪ *Efecto sobre la viabilidad y proliferación celular*

El análisis de la viabilidad celular a las 24 horas demostró que las concentraciones de curcumina situadas en el rango entre 0.5 μM y 5 μM producen una reducción significativa ($p < 0,05$) de la viabilidad celular (11.4% y 28%; Figura 18A), aunque en ningún caso es inferior al límite establecido en la norma ISO 10993-5. Sin embargo, la concentración de 10 μM redujo la viabilidad celular en un 59.4% ($p < 0,05$). En el caso del NAC, sólo la concentración de 15 mM dio lugar a una reducción en la viabilidad celular (8.2%; $p < 0,05$; Figura 18B).

En el estudio de la proliferación celular, en los cultivos tratados con curcumina se observó una reducción dosis-dependiente del número de células a las 72 horas. Así, como se observa en la figura 18C, las concentraciones $\leq 5 \mu\text{M}$ permiten mantener una buena capacidad proliferativa. Por el contrario, las concentraciones $\geq 10 \mu\text{M}$ producen una rápida reducción de la tasa proliferativa con respecto a la proliferación del cultivo control (reducción de un 51% y un 74% con las concentraciones de 10 y 20 μM a las 72h, respectivamente).

En el caso de la NAC (Figura 18D), solo las concentraciones $\geq 10 \text{ mM}$ redujeron significativamente la tasa proliferativa con respecto al control (reducción de un 21% y un 42% con las concentraciones de 10 y 15 mM a las 72 h, respectivamente).

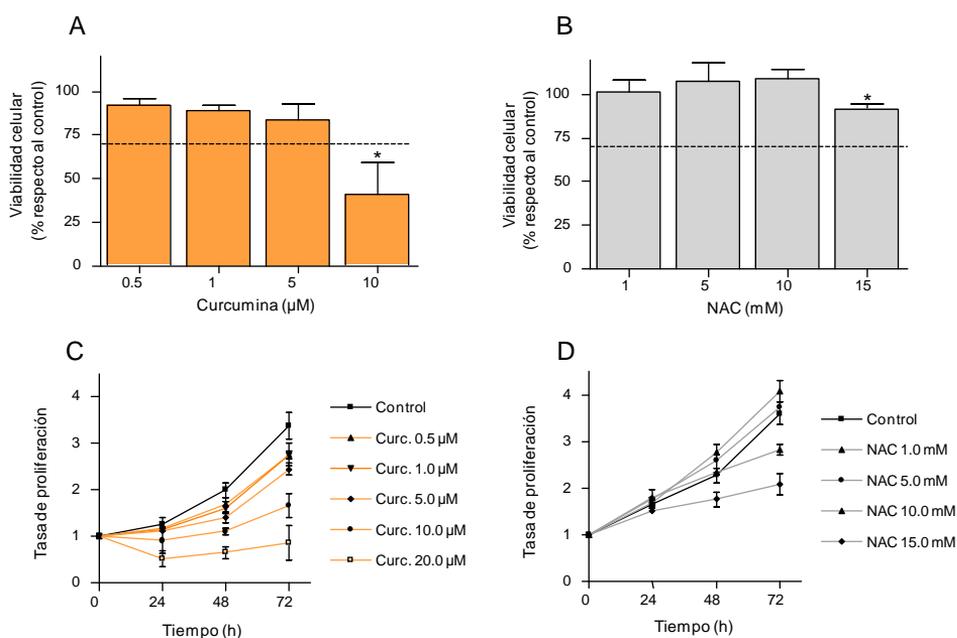


Figura 18. Efecto de diferentes concentraciones de curcumina y NAC sobre la viabilidad de fibroblastos humanos a las 24 horas (A y B), y sobre la proliferación celular (C y D). (* $p < 0.05$). La línea discontinua establece el límite mínimo de viabilidad establecido en la norma ISO.

▪ *Efecto sobre los niveles intracelulares de GSH*

La valoración del efecto de la curcumina y del NAC sobre los niveles de GSH se llevó a cabo con concentraciones que no mostraron citotoxicidad sobre los fibroblastos. Así, se utilizaron las concentraciones de 1 y 5 μM de curcumina y 1 y 5 mM de NAC.

En el caso de la curcumina no se observaron variaciones significativas en los niveles intracelulares de GSH a lo largo del tiempo (Figura 19A). Por el contrario, como se muestra en la figura 19B, la NAC aumentó los niveles de GSH de forma dosis y tiempo dependiente. Así, a las 4 horas se observa un incremento de 2.2 y 2.3 veces con respecto a los valores del control con las concentraciones de 1 y 5 mM, respectivamente ($p < 0.05$).

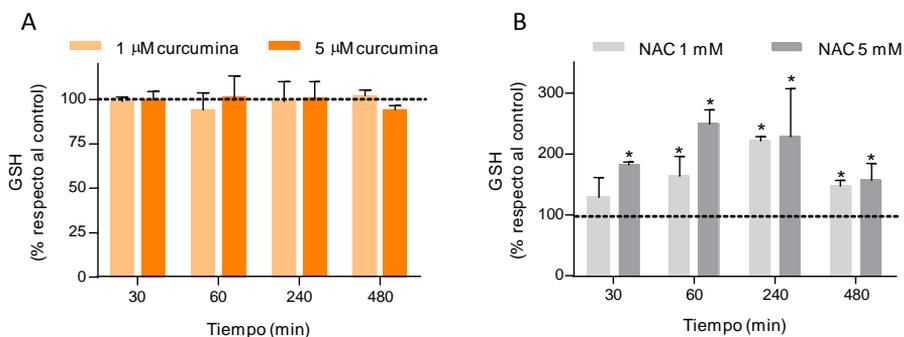


Figura 19. Efecto de los tratamientos de curcumina (A) y NAC (B) sobre los niveles intracelulares de GSH en fibroblastos humanos. Datos expresados en % con respecto al control (* $p < 0.05$).

- Se ha diseñado un nuevo apósito (HR006) compuesto por una matriz porosa de LBG y una solución de hidratación antioxidante (AHsol).
- El proceso de síntesis de la matriz de LBG permite obtener un material con un alto grado de pureza e insoluble en agua.
- La matriz de LBG presenta poros interconectados, que favorecen la difusión de oxígeno y nutrientes, posee una elevada capacidad de absorción, tiene propiedades antioxidantes y no es citotóxica.
- La AHsol está compuesta por NAC y curcumina, habiéndose establecido las concentraciones de 1 y 5 mM de NAC y de 1 y 5 μ M de curcumina, a partir de las cuales determinar, en un modelo *in vitro* de estrés oxidativo, las dosis terapéuticas finales a utilizar.
- A continuación, se presenta el estudio del efecto *in vitro* de los tres componentes del HR006 (LBG, NAC y curcumina), aislados y en combinación, sobre fibroblastos humanos sometidos a estrés oxidativo.

IV.2. ANÁLISIS DEL EFECTO *IN VITRO* DE LOS COMPONENTES DEL APÓSITO HR006 SOBRE FIBROBLASTOS SOMETIDOS A ESTRÉS OXIDATIVO

Con el fin de evaluar el efecto protector de los componentes del apósito, se desarrolló un modelo *in vitro* de estrés oxidativo mediante la exposición de fibroblastos humanos a H₂O₂.

IV.2.1. Efecto del estrés oxidativo sobre fibroblastos humanos

La respuesta celular al estrés oxidativo se determinó mediante el análisis de los siguientes parámetros biológicos: viabilidad y proliferación celular, senescencia celular, niveles de ROS, niveles intracelulares de GSH y la expresión de genes asociados a procesos inflamatorios.

- *Análisis del efecto del estrés oxidativo sobre la viabilidad, la proliferación y senescencia celular*

La determinación del efecto del estrés oxidativo sobre la viabilidad y la proliferación celular se llevó a cabo mediante un estudio de la respuesta celular a un amplio rango de dosis de H₂O₂.

La exposición celular a concentraciones ≤ 0.1 mM de H₂O₂ permitió una recuperación de la tasa proliferativa hasta los valores del control. Las células oxidadas con concentraciones inferiores a 1.0 mM mostraron cierta capacidad de recuperación de la tasa proliferativa, mientras que los cultivos tratados con concentraciones ≥ 1.0 mM no fueron capaces de recuperar su actividad proliferativa (Figura 20A). Estos resultados, permitieron clasificar las

concentraciones de H_2O_2 en bajas –inferiores a 0.1 mM–, moderadas –rango entre 0.1 y 0.5 mM– y altas –superiores a 0.5 mM–.

A partir de los datos de viabilidad celular observados en los cultivos de fibroblastos tras 24 h de oxidación, se calculó el valor de la IC_{50} para el H_2O_2 , que se situó en 0.91 mM (Figura 20B).

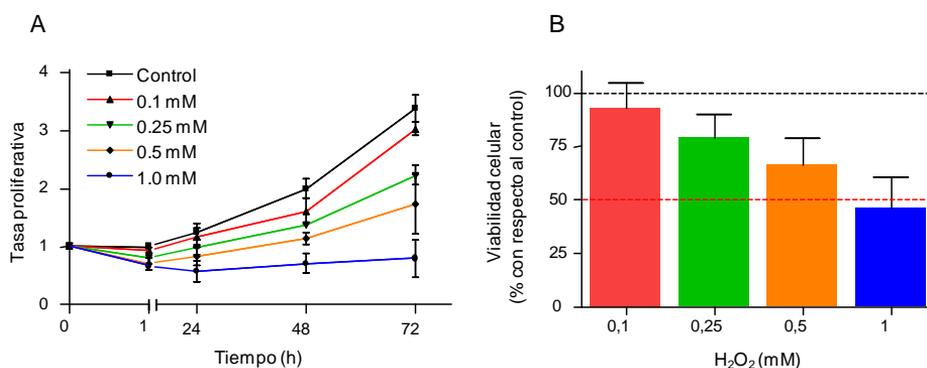


Figura 20. A) Tasa proliferativa de fibroblastos humanos oxidados con concentraciones moderadas de H_2O_2 (0.1 mM – 0.5 mM) y altas (>0.5 mM) de H_2O_2 . B) Viabilidad celular a las 24 h tras la oxidación.

Por otro lado, la exposición a H_2O_2 incrementó el porcentaje de células senescentes, objetivable por el aumento de la actividad de la enzima β -galactosidasa. Este efecto es dosis-dependiente, alcanzando a las 72 h post-oxidación un porcentaje de células senescentes de 40.6%, 41.7%, 48.1% y 51.7% para las concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mM de H_2O_2 , respectivamente (Figura 21 y 22).

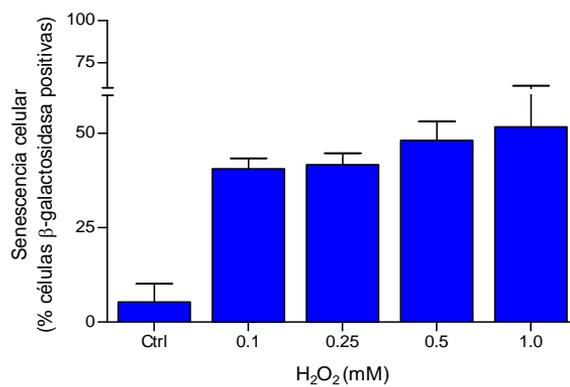


Figura 21. Porcentaje de células senescentes en cultivos oxidados con diferentes concentraciones de H₂O₂.

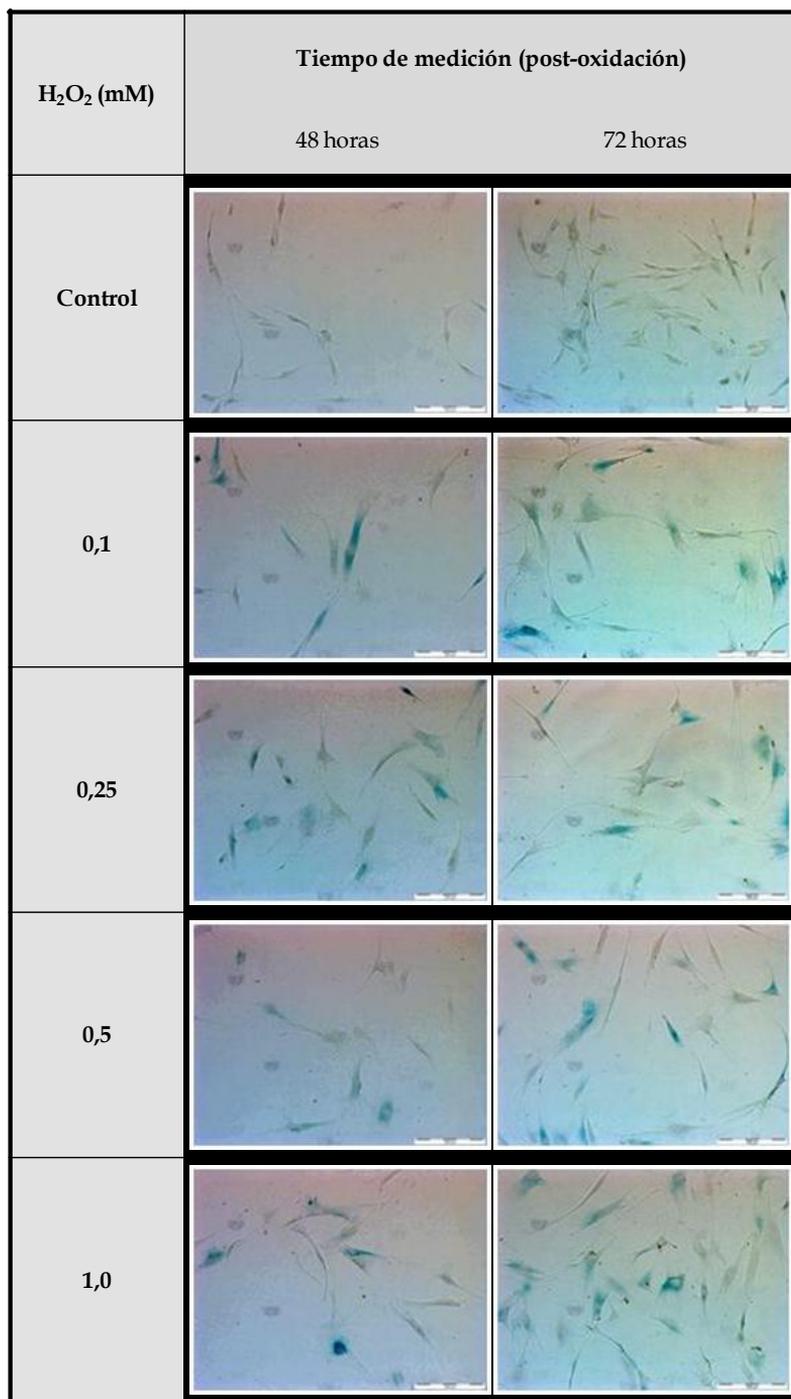


Figura 22. Marcaje de células senescentes en cultivos de fibroblastos oxidados con H₂O₂, a las 48 y 72 horas post-oxidación.

- *Análisis del efecto del estrés oxidativo sobre los niveles de ROS*

La exposición de fibroblastos humanos a concentraciones moderadas y altas de H_2O_2 produjo un aumento dosis-dependiente de los niveles de ROS. En concreto, a los 60 minutos se observa un aumento significativo de 9.6, 18.7, 35.4 y 44.0 veces con respecto al control para las concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5, y 1 mM, respectivamente ($p < 0.05$; Figura 23).

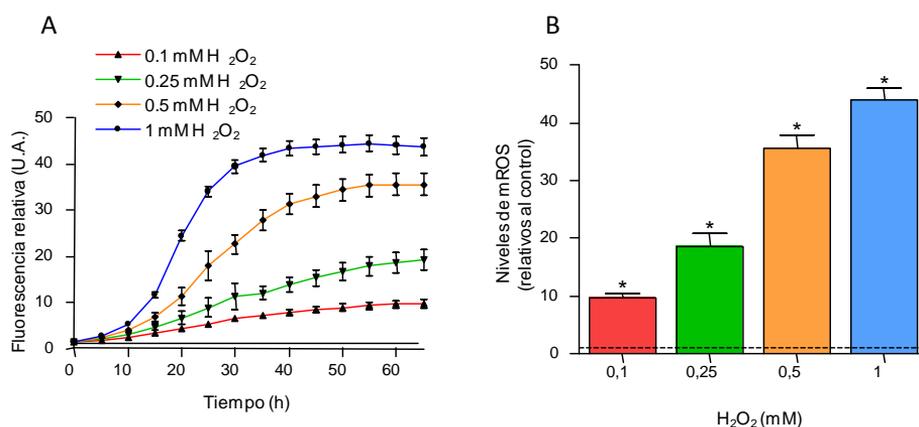


Figura 23. A) Cinética de la producción de ROS en fibroblastos humanos tras inducir estrés oxidativo con concentraciones crecientes de H_2O_2 . B) Niveles de ROS (número de veces con respecto al control) a los 60 minutos de la oxidación. (* $p < 0.05$).

- *Análisis del efecto del estrés oxidativo sobre los niveles intracelulares de GSH*

La oxidación con dosis moderadas y altas de H_2O_2 produjo una disminución de los niveles de GSH a lo largo del tiempo. Así, durante los primeros 30 minutos de exposición, las células oxidadas con cualquiera de las concentraciones ensayadas sufrieron un descenso significativo de los niveles de GSH con respecto al control ($p < 0.05$). A los 60 minutos, tras la eliminación del peróxido, las células oxidadas con la concentración de 0.1 mM de H_2O_2

recuperaron los valores de GSH del control. Esta recuperación también se hace parcialmente efectiva a las 8 h de la oxidación con la concentración de 0.25 mM de H_2O_2 , no existiendo diferencias significativas con respecto al control. Por el contrario, la oxidación con las concentraciones de 0.5 y 1.0 mM no permitió la recuperación de los niveles de GSH, los cuales se redujeron en más de un 50% con respecto al control.

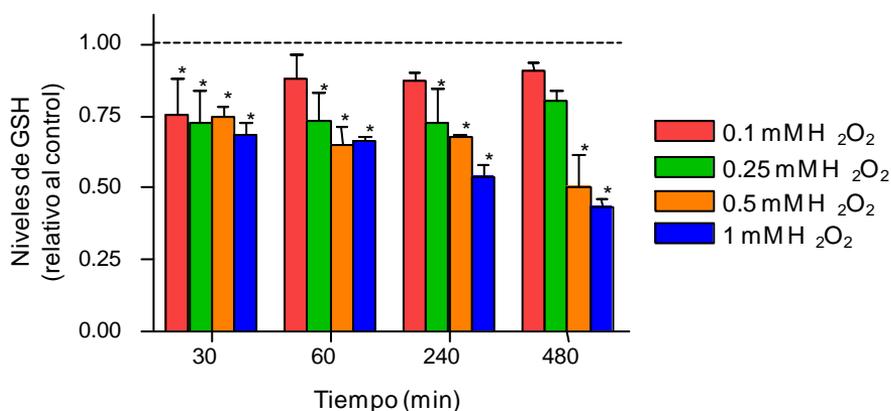


Figura 24. Niveles de GSH con respecto al control de fibroblastos humanos sometidos a estrés oxidativo con H_2O_2 . (* $p < 0.05$).

- *Análisis del efecto del estrés oxidativo sobre los niveles de expresión génica (COX-2, NF κ B, TGF β , IL-1 α , IL-1 β , TNF- α)*

La oxidación celular con las concentraciones de 0.25 y 1.0 mM provocó modificaciones en la expresión de genes relacionados con el proceso inflamatorio. Estas modificaciones no fueron dependientes de la dosis.

La oxidación con 0.25 mM de H_2O_2 aumento la expresión de los genes COX-2, IL-1 α , TNF- α e IL-1 β en 3.7 ± 1.7 , 5.4 ± 0.9 , 3.4 ± 0.4 y 2.5 ± 0.4 veces, respectivamente en comparación al control ($p < 0.05$). Del mismo modo, la

oxidación con 1.0 mM, aumentó dicha expresión en 3.4 ± 1.1 , 9.8 ± 4.0 , 9.0 ± 2.2 y 1.4 ± 0.9 veces, respectivamente ($p < 0.05$).

Finalmente, la expresión de TGF- β y NF κ B no varió de forma significativa con respecto al control con ninguna de las concentraciones de H₂O₂ analizadas (Figura 25).

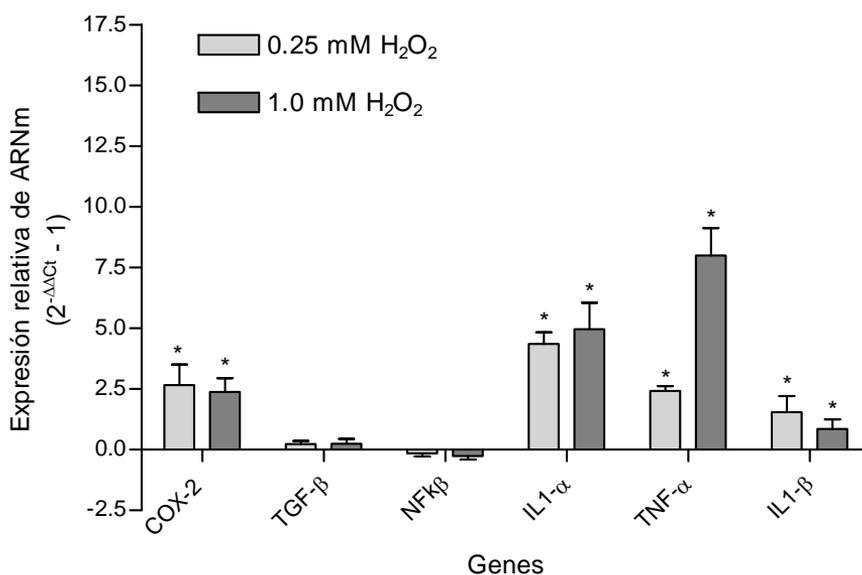


Figura 25. Niveles de expresión relativa de genes asociados a la inflamación en fibroblastos sometidos a estrés oxidativo con H₂O₂. (* $p < 0.05$).

IV.2.2. Análisis del efecto protector de la NAC y la curcumina sobre los fibroblastos sometidos a estrés oxidativo

Con el objetivo de evaluar el efecto citoprotector de la NAC y la curcumina (aislados y en combinación) frente al estrés oxidativo, se analizó la viabilidad celular y los niveles intracelulares de ROS en los fibroblastos

humanos, a los 60 minutos de la exposición a la concentración más alta de H_2O_2 (1 mM).

▪ *Análisis de la viabilidad celular*

Los antioxidantes analizados, NAC y curcumina, mostraron diferente eficacia citoprotectora. En el caso de la curcumina, ninguna de las concentraciones analizadas dio lugar a un aumento significativo en la viabilidad celular con respecto al control oxidado (Figura 26A). En relación a la NAC, únicamente la concentración de 5 mM produjo un aumento de la viabilidad respecto al control oxidado ($p < 0.05$), llegando a alcanzar los niveles del control no oxidado (Figura 26B).

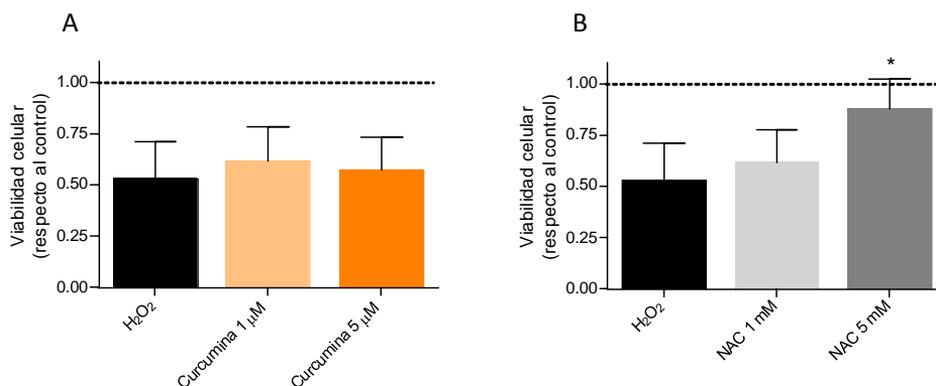


Figura 26. Viabilidad de fibroblastos humanos a los 60 minutos tras la exposición a 1.0 mM de H_2O_2 y tratados con curcumina (A) y NAC (B). Los valores están expresados en valores relativos al control no oxidado. (* $p < 0.05$).

El análisis del efecto protector de la combinación de NAC y curcumina, permitió observar un aumento significativo ($p < 0.05$) de la viabilidad celular con las combinaciones de 5 mM NAC+1 μM de curcumina, y 5 mM NAC + 5 μM de curcumina, llegando a alcanzar los niveles del control no oxidado. No se

observaron diferencias significativas en la viabilidad celular entre dichas combinaciones (Figura 27).

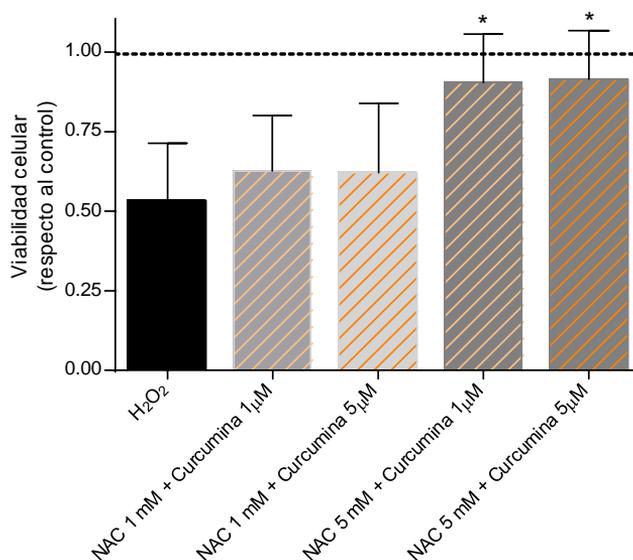


Figura 27. Viabilidad de los cultivos oxidados y tratados con las combinaciones de NAC y curcumina. (* $p < 0.05$).

▪ *Análisis de los niveles intracelulares de ROS*

Ambos antioxidantes redujeron los niveles de ROS en los fibroblastos expuestos a H₂O₂. En el caso de la curcumina, se observó una reducción del 27.2% y 66.9%, con las concentraciones de 1 y 5 μM, respectivamente, en comparación al control. Sin embargo, dicha reducción alcanzó niveles significativos sólo con la concentración de 5 μM ($p < 0.05$). En relación a la NAC, las dos concentraciones utilizadas redujeron de forma significativa ($p < 0.01$) los niveles de ROS (reducción del 82.5% y 92.0% con las concentraciones de 1 y 5 mM, respectivamente).

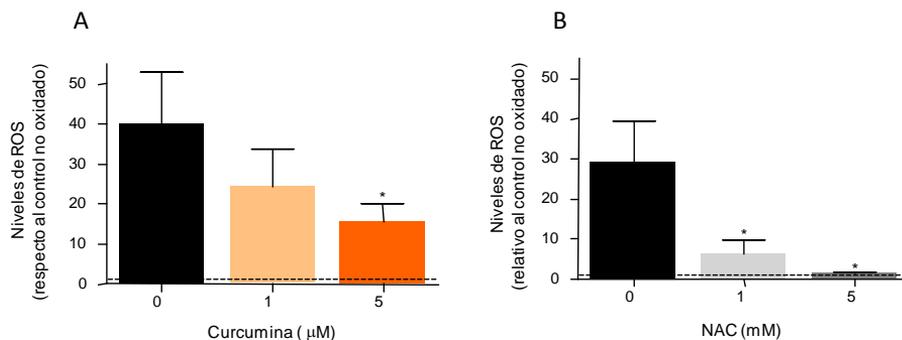


Figura 28. Niveles intracelulares de ROS a los 60 minutos en cultivos oxidados con 1 mM de H_2O_2 y tratados con curcumina (A) y NAC (B). Los resultados están expresados en valores relativos al control no oxidado.

La asociación de ambos antioxidantes dio lugar a una importante disminución de los niveles intracelulares de ROS con todas las combinaciones ensayadas. Así, las combinaciones de 1 mM de NAC con 1 o 5 μM de curcumina redujeron hasta un $16.0 \pm 6.9\%$ y $18.0 \pm 7.7\%$ los niveles de ROS, siendo significativamente diferente al control no oxidado ($p < 0.01$). Las combinaciones de 5 mM de NAC con 1 o 5 μM de curcumina redujeron los niveles de ROS hasta alcanzar valores inferiores al 10%, no existiendo diferencias significativas respecto al control no oxidado (Figura 29).

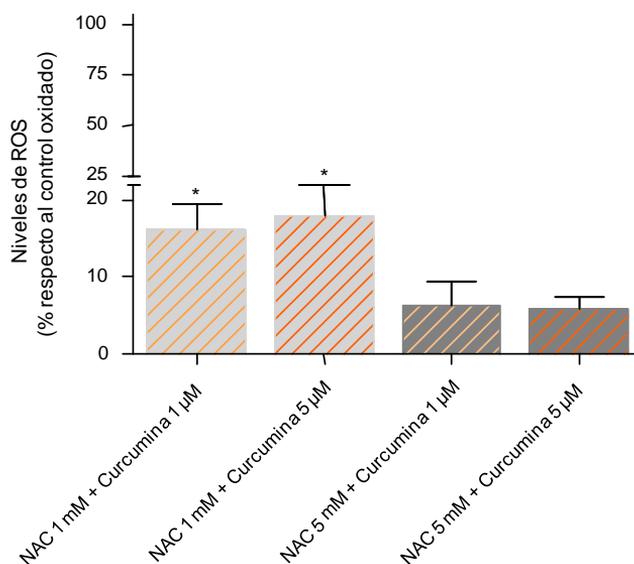


Figura 29. Porcentaje de los niveles de ROS con respecto al control oxidado de las combinaciones de NAC y curcumina. (* $p < 0.05$).

- A partir de los resultados expuestos sobre el efecto citoprotector precoz de la NAC y la curcumina, aislados y en combinación, se determinaron las concentraciones de 5 mM de NAC y 5 μ M de curcumina como las dosis terapéuticas finales a utilizar en la composición de *AHsol*.
- A continuación se expone el estudio del efecto de la combinación de los componentes de *AHsol* sobre la expresión de genes proinflamatorios y la proliferación celular de los fibroblastos humanos sometidos a estrés oxidativo.

IV.2.3. Análisis del efecto de la combinación de los componentes del AHsol sobre la expresión génica y la proliferación celular de los fibroblastos sometidos a estrés oxidativo

Con el fin de analizar el efecto de la combinación de los principios activos de la AHsol (5mM NAC + 5 μ M curcumina) sobre los fibroblastos oxidados, se indujo un estrés oxidativo con dos concentraciones de H₂O₂, la concentración moderada de 0.25 mM, que representa el valor estimado en una lesión durante el proceso inflamatorio (Roy y cols. 2006), y la concentración alta de 1.0 mM. Tras la oxidación se procedió a la determinación de la expresión de genes proinflamatorios y el análisis de la proliferación celular.

- *Efecto sobre la expresión de genes proinflamatorios*

Para evaluar el efecto antiinflamatorio *in vitro* de la combinación de antioxidantes seleccionada, se analizó mediante *PCR* cuantitativa la expresión de los genes COX-2, TNF α , IL-1 α e IL-1 β . Se pudo observar que, en comparación al control oxidado, dicha combinación redujo de forma significativa ($p < 0.01$) la expresión de COX-2 (5.7 \pm 3.1 y 1.9 \pm 0.8 veces con las concentraciones de 0.25 y 1 mM de H₂O₂, respectivamente), IL-1 α (8.1 \pm 13.1 y 2.3 \pm 2.2 veces, respectivamente) e IL-1 β (5.5 \pm 6.4 y 1.7 \pm 1.5 veces, respectivamente). La expresión de TNF α también se vio reducida en 9.7 \pm 8.7 y 4.4 \pm 1.5 veces con las concentraciones de 0.25 ($p=0.88$) y 1.0 mM ($p=0.91$) respectivamente, pero dicha diferencias no fueron significativas con respecto al control oxidado (Figura 30).

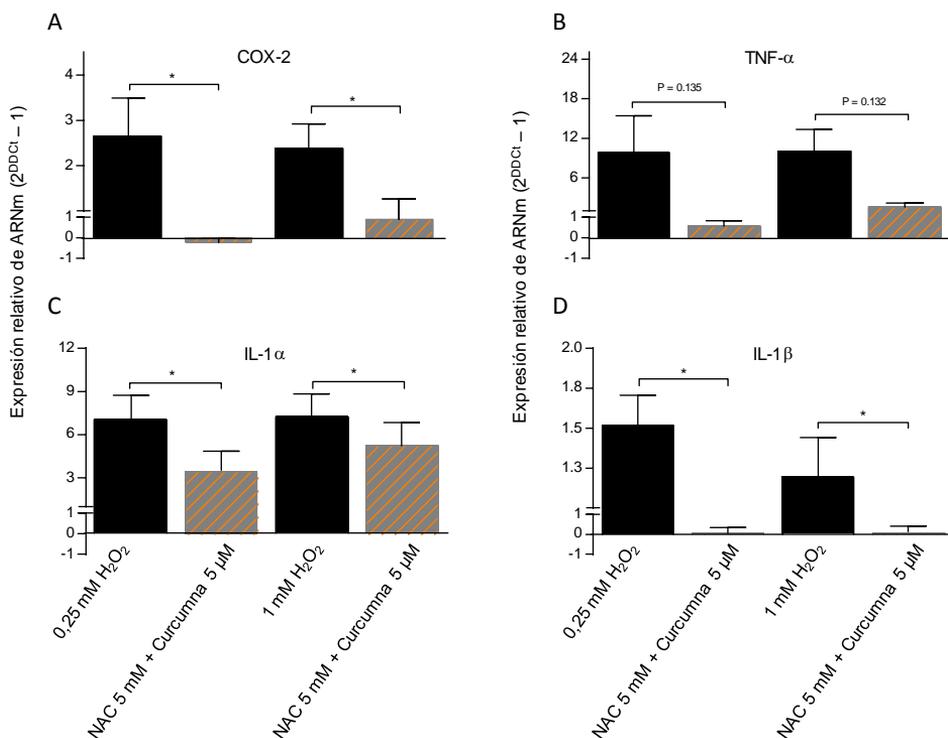


Figura 30. Niveles de expresión de genes pro-inflamatorios en fibroblastos oxidados y tratados con la combinación de antioxidantes propuestos para el producto HR006. A) COX-2, B) TNF- α , C) IL-1 α , D) IL-1 β . (* $p < 0.01$).

▪ Efecto sobre la proliferación celular

La combinación de NAC y curcúmina aumentó significativamente la viabilidad de los fibroblastos oxidados con ambas concentraciones de H₂O₂. Como se observa en la figura 31A, en comparación al control oxidado con 0.25 mM de H₂O₂, el tratamiento con dicha combinación incrementó un 25.2 y 36.1 % la viabilidad celular a las 24 y 48 h, respectivamente ($p < 0.05$). En el caso de los fibroblastos oxidados con 1 mM de H₂O₂, dicho incremento fue de 33.2 y 40.5 %, respectivamente ($p < 0.05$; Figura 31B).

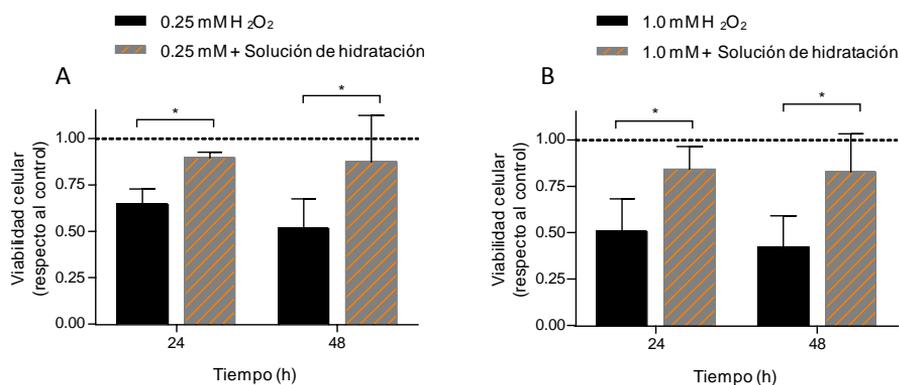


Figura 31. Viabilidad celular en cultivos oxidados con 0.25 mM (A) y 1 mM (B) de H₂O₂ y tratados con la combinación de NAC y Curcumina. (*p < 0.05).

IV.2.4. Análisis del efecto combinado de los componentes que forman el apósito HR006 (LBG+NAC+Curcumina) sobre fibroblastos sometidos a estrés oxidativo

Con el fin de analizar la capacidad antioxidante de la combinación de los tres componentes que forman el apósito HR006 (LBG+NAC+Curcumina), se procedió a analizar el efecto de dicha combinación sobre los niveles intracelulares de ROS y la viabilidad celular de fibroblastos sometidos a estrés oxidativo (1.0 mM H₂O₂).

La combinación de LBG+NAC+Curcumina redujo significativamente los niveles intracelulares de ROS (p < 0.05; Figura 32A) e incrementó la viabilidad (p < 0.05; Figura 32B) de fibroblastos oxidados, alcanzando en ambos casos los valores de los fibroblastos no oxidados.

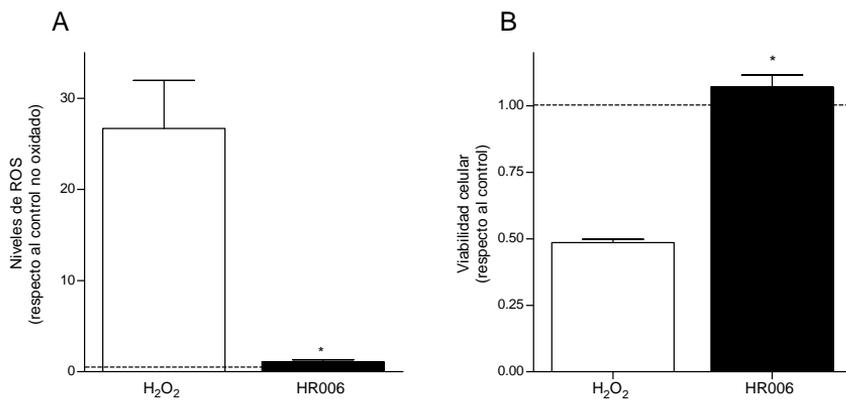


Figura 32. Niveles intracelulares de ROS (A) y viabilidad celular (B) en cultivos oxidados con 1.0 mM de H₂O₂ y tratados con la combinación de LBG+NAC+curcumina. (*p< 0.05).

- Una vez comprobada la capacidad antioxidante de la combinación de los tres componentes del apósito HR006 (LBG+NAC+curcumina), a continuación se evalúa la biocompatibilidad de dicho apósito como paso previo al estudio de su eficacia *in vivo*.

IV.3. ANÁLISIS DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DEL APÓSITO HR006

El estudio de la biocompatibilidad del producto HR006 se llevó a cabo mediante el análisis de la citotoxicidad, la evaluación de la hemocompatibilidad y la determinación de la capacidad de irritación dérmica del mismo.

IV.3.1. Análisis de la citotoxicidad

El estudio de la posible citotoxicidad del producto se llevó a cabo mediante el análisis del medio extractivo, el cual fue obtenido tras poner en contacto el apósito con medio de cultivo celular, siguiendo la metodología establecida en la norma ISO 10993-5.

El cultivo de fibroblastos L-929 con el medio extractivo dio lugar a una viabilidad celular de un $84.2 \pm 9.6\%$ con respecto al control negativo (Figura 32), valor superior al límite establecido en la norma ISO para considerar un producto como no citotóxico.

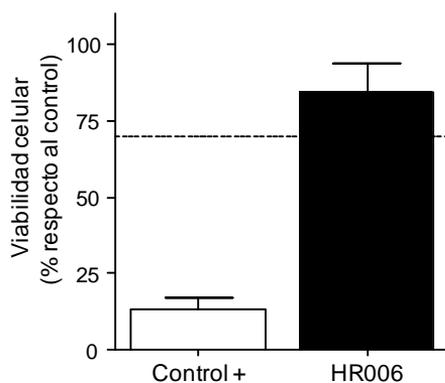


Figura 33. Determinación de la viabilidad celular del producto HR006. La línea punteada marca el límite de viabilidad celular descrita en la norma ISO 10993-5.

IV.3.2. Evaluación de la hemocompatibilidad

La utilización del apósito en heridas abiertas hace necesario confirmar la ausencia de efecto hemolítico por parte del producto. Para ello, se llevó a cabo un ensayo *in vitro* de hemocompatibilidad, siguiendo la norma ISO 10993-4, en el cual se procede a la cuantificación del porcentaje de hemólisis inducido por parte del medio extractivo en contacto con el apósito. Dicha norma establece el límite del 5% para considerar a un producto no hemolítico.

En nuestro estudio, el contacto del medio extractivo con los eritrocitos ocasionó la liberación del 0.3% de la hemoglobina con respecto a la hemoglobina liberada por el control + del ensayo, valor muy inferior al límite anteriormente establecido.

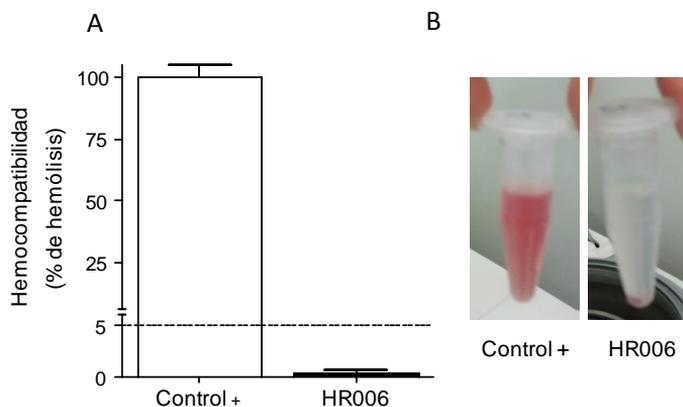


Figura 34. (A) Determinación del porcentaje de hemólisis del producto HR006. La línea punteada marca el límite de hemólisis descrito en la norma ISO 10993-4 por encima del cual se considera un producto hemolítico. (B) Imagen de hemólisis producida por el control+ y el apósito HR006.

IV.3.3. Determinación de la capacidad de irritación dérmica

La determinación del posible efecto irritante del HR006 sobre la piel se llevó a cabo mediante un ensayo de irritación dérmica *in vitro*, que cuantifica la viabilidad de queratinocitos en contacto con el producto, utilizando para ello los constructos de piel de los laboratorios *Skinethic*. Como se ha señalado en material y métodos, un producto es considerado irritante cuando la viabilidad de las células en contacto con él es inferior al 50% del valor del control negativo.

En nuestro estudio, la viabilidad de los queratinocitos, en contacto directo con el apósito HR006, fue de un $82.8 \pm 4.0\%$ con respecto al control, valor muy superior al límite de toxicidad establecido.

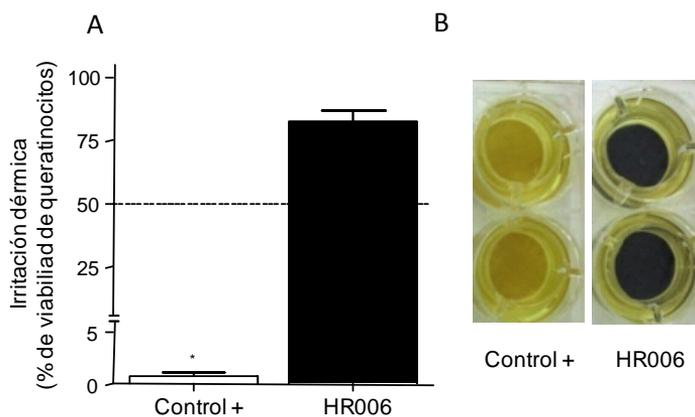


Figura 35. (A). Determinación del porcentaje de viabilidad de queratinocitos tras contacto con el producto HR006. La línea punteada marca el límite establecido por los laboratorios *Skinethic* para considerar un producto irritante (B). Imagen de los insertos teñidos con el colorante MTT.

- A partir de los resultados obtenidos en la determinación de la citotoxicidad *in vitro*, la capacidad hemolítica y la capacidad de irritación dérmica, se determinó la biocompatibilidad el nuevo apósito HR006.
- A continuación se presenta el ensayo de eficacia *in vivo* del apósito HR006 en un modelo porcino de cicatrización.

IV.4. EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA EFICACIA DEL APÓSITO HR006 SOBRE LA CICATRIZACIÓN

Una vez comprobada la biocompatibilidad del apósito HR006, la evaluación *in vivo* de su eficacia sobre el proceso de cicatrización se llevó a cabo en un modelo porcino, analizando la evolución macroscópica (modificación del tamaño de las lesiones) e histopatológica (a partir de las biopsias obtenidas a diferentes tiempos) de las heridas.

IV.4.1. Análisis macroscópico

Las heridas tratadas con el apósito HR006 mostraron una mayor reducción de su tamaño con respecto a las de los controles, a lo largo de todo el proceso de cicatrización. De este modo, el porcentaje de incremento de cierre de la herida obtenida con el apósito HR006 con respecto al de control fue de $14.8 \pm 3.8\%$, $20.7 \pm 6.2\%$, $22.8 \pm 12.1\%$, $33.4 \pm 14.5\%$ y $63.4 \pm 33.9\%$, para los días 3, 6, 10, 13 y 16, respectivamente ($p < 0,05$; Figura 35).

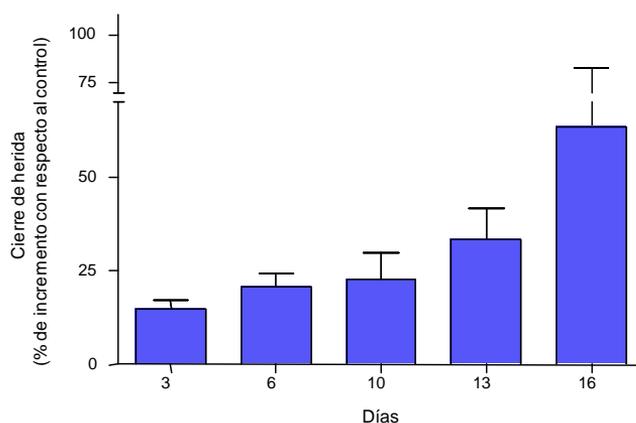


Figura 36. Evolución del cierre de las heridas tratadas con HR006, expresado como porcentaje de incremento con respecto al control.

La figura 36 muestra, mediante fotografías macroscópicas, un ejemplo representativo de la evolución de la cicatrización de la herida del control y de la tratada con HR006, en los días 3, 10 y 16 post-cirugía.

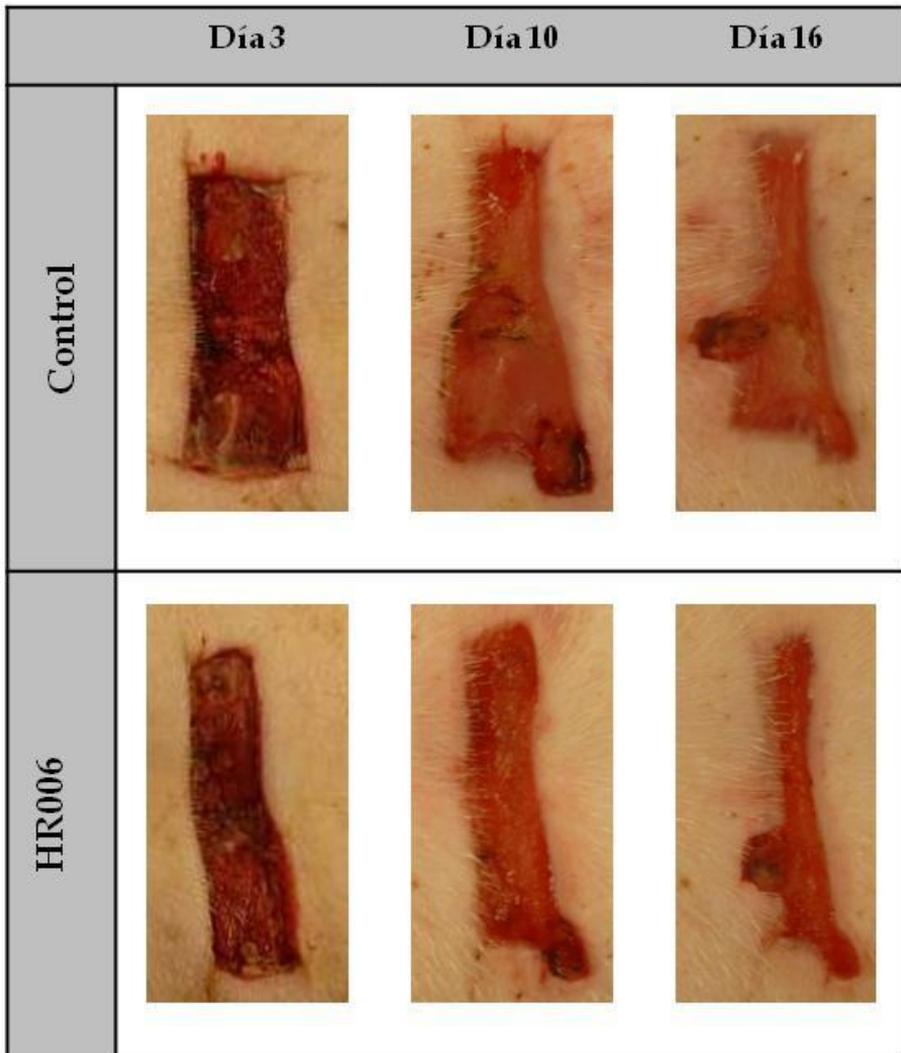


Figura 37. Imágenes macroscópicas de la evolución del cierre de la herida tratada con un apósito control y con el apósito HR00

IV.4.2. Análisis histopatológico

El análisis histopatológico se llevó a cabo en los días 6, 10 y 16 post-cirugía. La evaluación histológica del proceso de cicatrización se realizó mediante el estudio de secciones histológicas teñidas con el tricrómico de Masson, que permite determinar la distribución de colágeno (Figura 37), y secciones sobre las que se detectan citoqueratinas mediante técnicas de inmunohistoquímica (Figura 38) con el objetivo de identificar los límites epiteliales (epidermis).

Como se observa en la figura 37a, en el día 6 de evolución (fase inflamatoria de la cicatrización), la herida control muestra zonas hemorrágicas, presencia de numerosas células inflamatorias y ausencia de actividad neoangiogénica evidente. Por el contrario, la herida tratada con HR006 (figura 37d), presenta un menor número de células inflamatorias, mayor densidad de fibroblastos y signos evidentes de neoangiogénesis, proceso éste esencial para garantizar el acceso tanto de nutrientes como de monocitos que eliminen el *debris* celular presente, en esta fase, en el lecho de la herida. Estos hallazgos histopatológicos demuestran una progresión del proceso de cicatrización, de manera que se observa una transición más rápida desde la fase inflamatoria a la fase proliferativa en las heridas tratadas con el apósito HR006.

En las secciones histológicas correspondientes al día 10 (fase proliferativa de la cicatrización), la lesión tratada con HR006 muestra también una mejor evolución de la cicatrización que las heridas control. Como se observa en la figura 37b, la lesión control mantiene todavía una densidad importante de células inflamatorias. Sin embargo, en las heridas tratadas con el apósito HR006 (Figura 37e) se aprecia una progresiva sustitución de las células inflamatorias por fibroblastos, un aumento del depósito de colágeno extracelular y la formación de nuevos vasos sanguíneos (neoangiogénesis). Todos estos hallazgos

corresponden con las características propias de la fase proliferativa del proceso de cicatrización.

En las secciones histológicas obtenidas el día 16, la herida tratada con HR006 muestra un tejido de granulación que comienza a involucionar, reduciendo la población de fibroblastos y de los vasos sanguíneos neoformados y mostrando una matriz extracelular más organizada, en la que las fibras de colágeno se orientan de una forma más regular. En cuanto a la reparación de la epidermis, la herida tratada con HR006 (Figura 37f) muestra una reepitelización más rápida que la herida control (Figura 37c); así, se observa una neoepidermis recubriendo la región de la herida, similar a la de las regiones sanas y con una capa córnea evidente. En el caso del control, en este día de evolución, la epidermis no consigue recubrir por completo la región de la herida y no hay evidencia de capa córnea.

Tomando estas observaciones en conjunto se puede concluir que las heridas tratadas con HR006 muestran un proceso cicatrización y reepitelización más favorable, cuya evolución a través de las distintas fases (inflamatoria, proliferativa y de reepitelización) se lleva a cabo de forma más rápida que en las heridas control, obteniendo además una mejor calidad del tejido cicatricial cuando se comparan las secciones histológicas obtenidas en el mismo día de evolución.

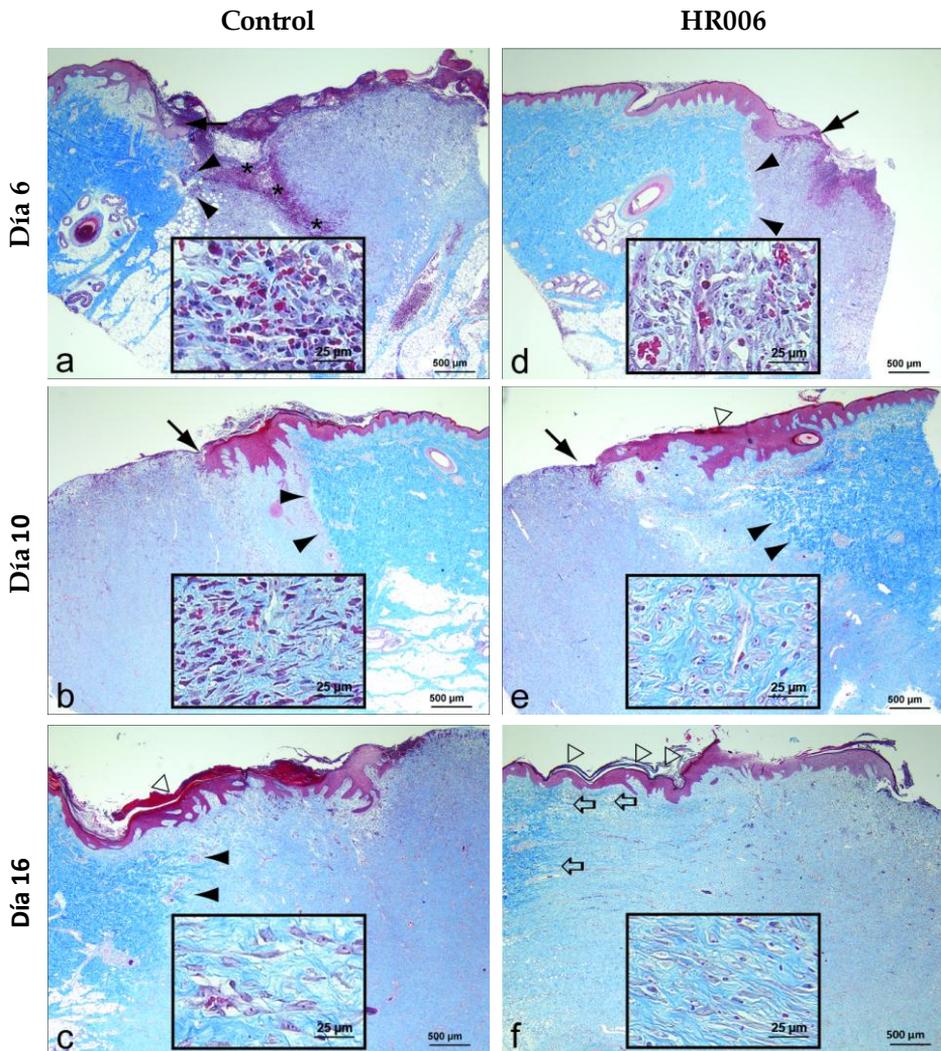


Figura 38. Microfotografías de las biopsias obtenidas de la herida control y de la tratada con HR006 en los días 6 (a, d), 10 (b, e), y 16 (c, f), teñidas con el tricrómico de Masson. El cuadro insertado en cada imagen corresponde a un mayor aumento del área representativa de la lesión. ► línea que delimita la cicatrización y el tejido sano, * regiones hemorrágicas, → frente de re-epitelización, ⇨ fibras de colágeno, ▷ capa córnea.

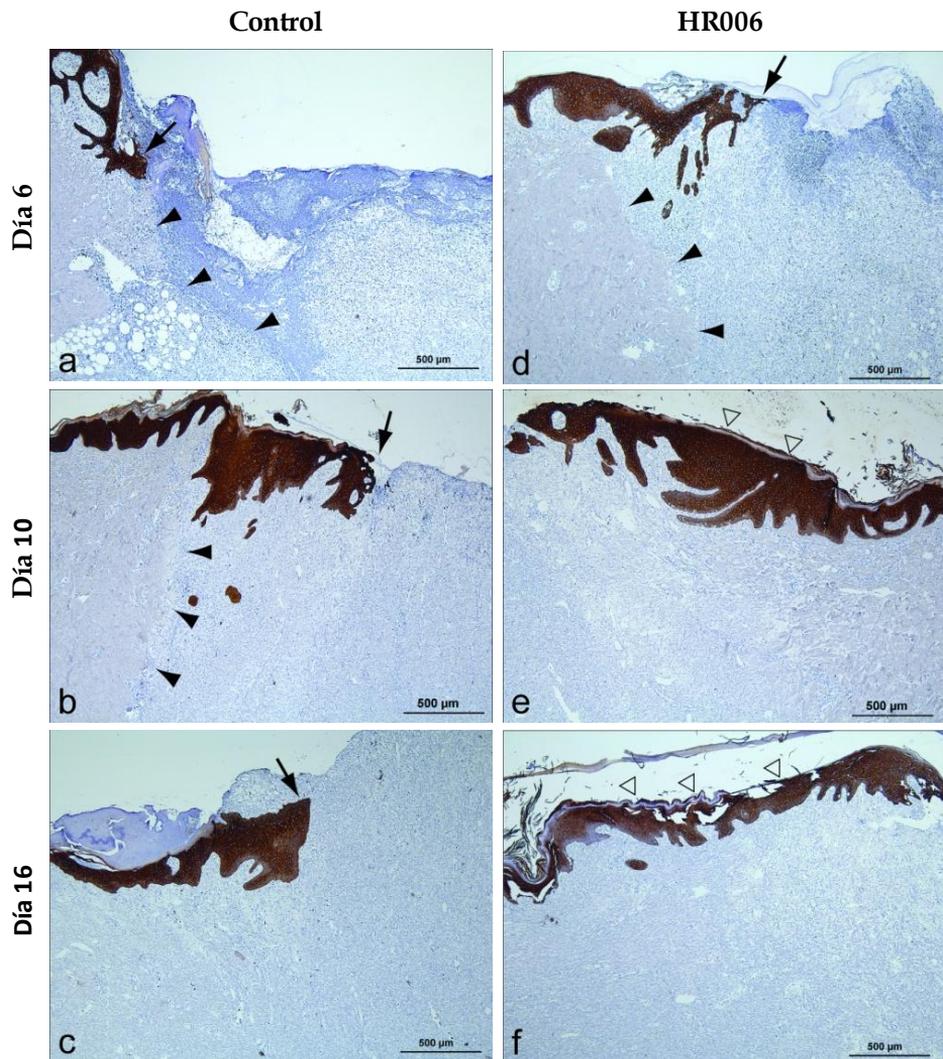


Figura 39. Microfotografías de inmunodetección de citoqueratinas en las biopsias obtenidas de la herida control y de la tratada con HR006 en los días 6 (a, d), 10 (b, e), y 16 (c, f). \blacktriangleright línea que delimita la cicatrización y el tejido sano, \rightarrow frente de re-epitelización y \triangleright capa córnea.

V. DISCUSIÓN

El envejecimiento de la población y el aumento de enfermedades crónicas, como son la hipertensión o la diabetes, han dado lugar a un incremento significativo de la prevalencia de heridas crónicas, lo cual, se ha convertido en muchos países, en un importante problema de salud pública, con el consiguiente aumento del gasto sanitario (Sen y *cols.*, 2009; Hopman y *cols.*, 2013; Dhall y *cols.*, 2014).

Las heridas crónicas, como las venosas, las úlceras por presión o las de origen diabético, son difíciles de curar y son fuente de una importante morbilidad asociada, incluyendo infecciones y amputaciones. Las terapias actuales permiten cicatrizar las heridas en una parte de los pacientes, mientras que en otros, perduran a pesar de recibir diferentes tipos de tratamientos.

Una estrategia terapéutica que supuso una mejora significativa en el proceso de cicatrización de las heridas crónicas y, por tanto, una reducción del gasto sanitario, fue la utilización de la cura en ambiente húmedo. La implementación de esta terapia, asociada al avance en el conocimiento de las causas y de los mecanismos moleculares que intervienen en la cicatrización de las heridas, ha dado lugar al desarrollo de una gran diversidad de tipos de apósitos con enfoques mejor adaptados a la fisiopatología de este tipo de lesiones.

Atendiendo a la funcionalidad de los apósitos que existen en el mercado, se pueden diferenciar aquellos cuyo objetivo exclusivo es el mantenimiento de la humedad en la herida, otros con actividad antibiótica o antiinflamatoria (Heilmann y *cols.*, 2013) y aquellos que intervienen directamente en el proceso fisiológico de la cicatrización, reduciendo el nivel de MMPs, aportando colágeno o ácido hialurónico o bien, liberando factores de crecimiento (Yan y *cols.*, 2012).

La utilización de antioxidantes como terapia para el tratamiento de heridas ha sido propuesto por varios autores (Galeano y cols., 2001; auf dem Keller y cols., 2006); sin embargo, en la actualidad ningún apósito comercial aborda la utilización tópica de antioxidantes como diana terapéutica para la reducción del estrés oxidativo generado en la herida.

Desde hace más de tres décadas, diversos investigadores han analizado la influencia de los ROS en la fisiopatología de las heridas, tanto en el proceso de cicatrización como en el desarrollo de la cronicidad de las mismas. En el 2003, James y cols. evidenciaron la presencia de estrés oxidativo en las úlceras vasculares crónicas. Posteriormente, otros autores han relacionado el incremento del estrés oxidativo con una disminución de la capacidad antioxidante celular (auf dem Keller y cols., 2006), con la inducción de senescencia (Harding y cols., 2005; Wall y cols., 2008) y con el aumento de la actividad de MMPs (Telgenhoff y Shroot, 2005). De este modo, en la actualidad se considera que la pérdida del equilibrio *redox*, asociado a un desajuste en los mecanismos que regulan los procesos de generación y detoxificación de los ROS, es una de las causas principales de la cronicidad de las heridas (Dhall y cols., 2014).

A pesar de la descrita relación entre el exceso de ROS en el lecho de la herida y la cronicidad de la misma, desde un punto de vista fisiológico, los ROS son moléculas clave en la progresión del proceso de regeneración tisular (Kurahashi y Junichi, 2015). Así, durante la fase inflamatoria de la cicatrización, los ROS inducen la agregación plaquetaria responsable de la coagulación. Además, la producción de H₂O₂ favorece la activación de neutrófilos y monocitos, y la migración de los macrófagos (Fracicelli y cols., 1996; Shi y cols., 1996). Estas células, a través de la enzima NADP oxidasa, liberan una alta cantidad de radicales superóxido, interviniendo, de este modo, en el sistema de defensa frente a los microorganismos presentes en la herida. Por otro lado, los ROS actúan como segundos mensajeros de factores de crecimiento como PDGF,

TGF- β y FGF, con una función quimiotáctica de los neutrófilos, macrófagos y fibroblastos al área de la lesión. Durante la re-epitelización, dichos radicales activan señales intracelulares implicadas en la angiogénesis o la migración celular (Niethamer y cols., 2009; Gauron y cols., 2013; Love y cols., 2013). En la última etapa de esta fase, los ROS juegan también un importante papel en la diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos, células contráctiles que consolidan el cierre de la herida (Sen, 2003). Sin embargo, este papel beneficioso de los ROS en el proceso de cicatrización requiere de una precisa regulación de sus niveles, mediante los sistemas antioxidantes celulares. De este modo, la regulación del equilibrio *redox* supone una atractiva diana para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas destinadas a mejorar el proceso de cicatrización y el tratamiento de las heridas cutáneas.

En este trabajo de investigación, tomando como fundamento terapéutico la cura húmeda y la regulación del estrés oxidativo, hemos desarrollado un nuevo apósito (HR006) para el tratamiento de heridas cutáneas, constituido por una combinación novedosa de los siguientes componentes: un biomaterial liofilizado y una solución antioxidante (AHsol).

El biomaterial seleccionado para la síntesis de la matriz del apósito es la goma de algarrobo (LBG). Este polisacárido de origen vegetal es un galactomanano compuesto por una cadena lineal de D-manosas unidas por enlaces β -D1-4, a la cual se asocian ramificaciones de D-galactosa conectadas por enlaces α -D1-6 (Coviello y cols., 2007)

Los polisacáridos constituyen una fuente de materia prima para el desarrollo de múltiples biomateriales, en función de las diferentes estructuras químicas y, por tanto, diferentes propiedades físicas que pueden llegar a presentar. A esto hay que añadir sus múltiples ventajas, como son el reducido impacto ambiental, debido a su origen en fuentes renovables, el relativo bajo

coste económico y su escasa toxicidad (Barbucci y *cols.*, 2008). De este modo, en los últimos años se han ido incrementado sus aplicaciones industriales, en el transporte y liberación controlada de fármacos y en la ingeniería tisular (Rinaudo, 2008; Laurienzo y *cols.*, 2015). La síntesis de la matriz de LBG precisa de una reacción de entrecruzamiento entre el galactomanano y un agente entrecruzante, en este caso, el GTA. Esta reacción se produce, habitualmente, a una baja velocidad, lo que permite un mayor control del proceso de síntesis de la matriz y la posibilidad de obtener materiales con distintos grados de entrecruzamiento y, por tanto, con diferentes propiedades mecánicas (Cunha y *cols.*, 2005; Sandolo y *cols.*, 2007). Sin embargo, para el desarrollo industrial del biomaterial fue necesario el diseño de una metodología de síntesis de la matriz que permitiera reducir el tiempo de entrecruzamiento y la concentración de GTA –esto limita la toxicidad del agente entrecruzante y reduce el coste del producto–. Para ello, se incorporó la metodología de reacción de entrecruzamiento en fase sólida. Así, la disolución acuosa inicial de LBG se liofilizó para obtener la fase sólida del monómero. Posteriormente, el liofilizado se entrecruzó con GTA en una solución de acetona:HCl. Esta solución permitió, por un lado, favorecer la reacción de entrecruzamiento con un pH ácido y, por otro lado, evitar la disolución del LBG durante dicha reacción. El material resultante, tras el correspondiente lavado, se liofilizó para obtener la matriz final. La insolubilidad de la matriz en agua, tras la reacción con GTA, indicó un alto grado de entrecruzamiento del material.

El biomaterial de LBG obtenido presenta tres características relevantes. En primer lugar, una alta capacidad absorción de líquidos –una de las características más importantes de los apósitos destinados a cura húmeda–. La matriz del HR006 posee una capacidad de absorción de líquidos correspondiente a 22 veces su peso seco, la cual es superior a la de otros apósitos comerciales utilizados en la actualidad, como el Aquacel® (19.1), el Mepilex® (11.9) o el Biatain® (7.4) (Uzun y *cols.*, 2013). Esta característica está asociada al elevado

peso molecular del LBG, al grado de entrecruzamiento de la matriz y a la estructura porosa del material. En segundo lugar, los estudios de viabilidad de las células cultivadas con medio extractivo y los ensayos de *live/dead* en contacto con el material, demostraron que la matriz sintetizada carece de toxicidad y cumple los requisitos exigidos por la ISO 10993:5. Por último, la matriz presenta capacidad antioxidante, la cual es dosis-dependiente en las concentraciones ensayadas. Esta propiedad ha sido descrita previamente también por otros autores, como Trommer y Neubert (2005), que describieron la capacidad de este galactomanano para reducir la peroxidación lipídica, mediante la quelación de iones metálicos.

Con el objetivo de incrementar el carácter antioxidante y antiinflamatorio del apósito, como segundo componente del mismo, se formuló una solución de hidratación (*AHsol*) que contiene dos moléculas con reconocida capacidad antioxidante y antiinflamatoria, la NAC y la curcumina.

La NAC es una molécula que induce un incremento de la síntesis de GSH a través del aporte directo de cisteína a la célula. Se han descrito importantes efectos biológicos de este agente, entre los que destacan la actividad antioxidante –mediante neutralización directa de ROS e incremento de los niveles de GSH (Aruoma y *cols.*, 1989; Agnihotri y Mishra, 2009), la modulación de la expresión génica (Kim do y *cols.*, 2007) o la regulación de la supervivencia celular y la apoptosis; además, se ha demostrado su actividad inmunológica a través del incremento de la actividad de los neutrófilos (Nygren y *cols.*, 2004).

La curcumina, principal componente activo de la cúrcuma (*Curcuma Longa*), es un polifenol con un alto potencial terapéutico en todas las etapas de la cicatrización debido a su acción antioxidante –neutralización directa de ROS– (Jain y *cols.*, 2006), antiinflamatoria (Jobin y *cols.*, 1999; Jin y *cols.*, 2007) y

antibacteriana (Rai y *cols.*, 2008). Además, otros autores han señalado que este agente favorece la formación de tejido de granulación, la síntesis y maduración de colágeno, la vascularización y el proceso de re-epitelización (Panchatcharam y *cols.*, 2006).

En relación a las propiedades químicas de dichas moléculas, mientras que la NAC es una molécula con alta estabilidad, la curcumina se muestra inestable en disolución; sin embargo, la combinación con NAC permite incrementar la estabilidad (Wang y *cols.*, 1997) y, consecuentemente, la actividad de dicho polifenol, por lo que la citada combinación puede resultar terapéuticamente más beneficiosa que su uso como agentes aislados (Atsumi y *cols.*, 2006; Kheradpezhohu y *cols.*, 2010).

En nuestro estudio, analizamos el efecto de ambos agentes, NAC y curcumina, sobre la viabilidad y proliferación celular, la actividad antioxidante directa y la inducción de la síntesis de GSH. En el análisis de la viabilidad celular, se observó que ninguna de las concentraciones ensayadas de NAC reduce dicha viabilidad tras 24 horas en cultivo. Sin embargo, las concentraciones superiores a 5 mM reducen significativamente la proliferación celular. En el caso de la curcumina, se observó que este agente redujo de forma dosis-dependiente la viabilidad y proliferación celular; de hecho, las concentraciones $\geq 10\mu\text{M}$ disminuyeron la viabilidad celular más de un 30% a las 24 h –valor establecido en la ISO como límite de toxicidad celular para los ensayos *in vitro*–. Este efecto, descrito también por otros autores, tanto en fibroblastos (Lundvig y *cols.*, 2015) como en queratinocitos (Balasubramanian y Eckert, 2007), ha sido relacionado con la inactivación de $\text{NF}\kappa\beta$, a través de la acción de la curcumina sobre Notch-1 (Wang y *cols.*, 2006).

En cuanto a la actividad antioxidante directa, ambas moléculas mostraron una elevada capacidad para absorber radicales libres, siendo ésta

incluso mayor que la del ácido ascórbico, utilizado como antioxidante de referencia. En el caso de la NAC, la capacidad de absorber radicales libres está asociada a su grupo tiol (Agnihotri y Mishra, 2009), mientras que la estructura molecular de la curcumina, con dos anillos bencénicos, permite a esta molécula atrapar radicales libres, como el superóxido o radicales hidroxilos, de una forma directa (Jain y *cols.*, 2006). En nuestro estudio, observamos que para una misma concentración de 10 μ M, la capacidad antioxidante directa de la cúrcuma fue 3.5 veces superior a la de la NAC (167.4 vs 47.3 μ M EAA, respectivamente).

En relación a la capacidad de ambas moléculas para inducir la síntesis de GSH, la NAC incrementó los niveles intracelulares de este tripéptido de forma dosis-dependiente en los primeros 60 minutos, llegando a duplicar los valores del control a las 4 horas. Este resultado ha sido descrito con anterioridad por varios autores, en éste y otros tipos celulares (Bush y *cols.*, 1999). Sin embargo, en el caso de la curcumina no se observaron modificaciones significativas de los niveles de GSH con las concentraciones utilizadas; de hecho, Atsumi y *cols.* (2007) describieron un efecto prooxidante con concentraciones superiores a 10 μ M de curcumina, al aumentar los niveles de ROS y disminuir los de GSH.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con NAC y curcumina, se determinaron las concentraciones óptimas para su utilización en un modelo de estrés oxidativo *in vitro*. Así, se tomó como criterio la elección de aquellas concentraciones que, garantizando la viabilidad celular –según norma ISO–, demostraron tener una alta actividad antioxidante, bien de forma directa y/o a través del incremento de los niveles de GSH. De este modo, se eligieron las concentraciones de 1 y 5 mM de NAC, y 1 y 5 μ M de curcumina.

Una de las moléculas más utilizadas en modelos de estrés oxidativo es el H₂O₂, debido a su alta estabilidad en disolución, su capacidad para difundir

libremente a través de las membranas celulares y su potencial para generar radicales libres $\cdot\text{OH}$, a través de la reacción *Harber-Weiss*.

El modelo de estrés oxidativo desarrollado en este trabajo consistió en la exposición de fibroblastos humanos –población celular responsable de producir la matriz extracelular durante la cicatrización– a dosis crecientes de H_2O_2 (0-1 mM) durante un periodo de tiempo limitado (1h). En dicho modelo se observó un efecto dosis-dependiente en todos los parámetros analizados, con un incremento de los niveles de ROS, una disminución de los niveles de GSH y una reducción de la proliferación celular, asociada a un incremento en la senescencia de los cultivos. Estos efectos han sido descritos previamente por otros autores, tanto en fibroblastos (Bladier y cols., 1997) como en queratinocitos (Vessey y cols., 1992), si bien, los resultados observados varían en función de la concentración celular, la concentración de H_2O_2 y el tiempo de exposición utilizado (Gülden y cols., 2010).

A partir de la información obtenida se establecieron dos concentraciones de H_2O_2 para analizar la eficacia de la NAC y la curcumina en la reversión del efecto del estrés oxidativo (la reducción de ROS intracelular y mantenimiento de la viabilidad de los cultivos): la concentración de 0.25 mM –valor estimado en el exudado de las heridas dérmicas durante la fase inflamatoria (Roy y cols., 2006)– y la concentración de 1.0 mM, valor seleccionado por inducir un daño oxidativo intenso en los cultivos de fibroblastos.

Como hemos mencionado previamente, los efectos asociados a la administración de NAC están relacionados con su capacidad para aumentar la síntesis de GSH y su actividad antioxidante directa. Agnihotri y cols. (2009) relacionaron la capacidad de neutralización directa de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) con el grupo tiol (-SH) de su estructura molecular.

En nuestro trabajo observamos, por un lado, que la administración directa de NAC produce una reducción de los niveles intracelulares de ROS y la recuperación de la viabilidad celular de forma dosis-dependiente. Por otro lado, la administración de la curcumina, en el rango de concentraciones ensayadas, reduce también los niveles de ROS, pero en cambio dicho descenso no se traduce en una mejora de la viabilidad celular.

El efecto antioxidante y antiinflamatorio de la curcumina está asociado a su capacidad para neutralizar de forma directa radicales libres, debido a su estructura molecular, y a su capacidad para inducir la síntesis de GSH, a través de la regulación de la enzima gamma-glutamylcisteína sintetasa (γ -GCS) (Biswas y *cols.*, 2005). Sin embargo, se ha descrito también que, a altas concentraciones ($\geq 10 \mu\text{M}$ en fibroblastos humanos), la curcumina posee un efecto prooxidante como consecuencia de un proceso de auto-oxidación de la molécula (Lundvig y *cols.*, 2015).

La combinación de la curcumina con otros antioxidantes como la vitamina C, vitamina E o la NAC (Wang y *cols.*, 1997; Atsumi y *cols.*, 2006) permite revertir su efecto prooxidante, y aumentar su estabilidad química en disolución. Diversos autores han demostrado la acción sinérgica, antioxidante y antiinflamatoria, producida por la combinación de NAC y curcumina. Así, Kheradpezhough y *cols.* demostraron el efecto protector sinérgico de dicha combinación frente a la toxicidad hepática producida por altas dosis de paracetamol. Por otro lado, Scharstuhl y *cols.* han descrito que dicha combinación produce un aumento del nivel intracelular de GSH derivado del aporte de cisteína por parte del NAC y del incremento de la síntesis de la enzima γ -GCS inducido por la curcumina. En nuestro estudio hemos observado también que dicha combinación da lugar a una protección de los fibroblastos frente al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 , observando una disminución significativa de los niveles de ROS y el mantenimiento de la viabilidad celular. Se comprobó

que dichos efectos se producían con la combinación de diferentes concentraciones de NAC y curcumina, de las cuales se seleccionó la de 5 mM de NAC y 5 μ M de curcumina para formar parte del componente antioxidante del nuevo apósito (AHsol).

Una vez seleccionadas dichas concentraciones de NAC y curcumina, para continuar analizando el efecto de la combinación de dichos agentes sobre la regulación del estrés oxidativo inducido en fibroblastos humanos, se procedió a evaluar las modificaciones en la expresión génica de la enzima COX-2 y la expresión de las citocinas proinflamatorias, TNF α , IL-1 α , e IL-1 β .

La COX-2 es la isoforma de la enzima ciclooxigenasa cuya expresión está inducida durante el proceso de inflamación. Esta enzima cataliza la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. La enzima COX-2 es rápidamente inducida durante la inflamación por lipopolisacáridos y las citocinas IL-1 α e IL-1 β , y presenta una correlación directa con el estrés oxidativo celular. Por otra parte, se ha observado que la oxidación directa con H₂O₂ da lugar a un aumento de la expresión de COX-2 y que dicha activación está directamente relacionada con el aumento de la senescencia celular (Zdanov y cols., 2007; Zdanov y cols., 2009). La sobreexpresión de COX-2 ha sido descrito en diferentes situaciones de procesos inflamatorios, incluidos aquellos relacionados con las úlceras venosas (Abd-el-aleem y cols., 2001).

Las citocinas proinflamatorias IL-1 y TNF α se sobreexpresan también en diferentes poblaciones celulares como los neutrófilos, monocitos y macrófagos, presentes durante la fase inflamatoria de la cicatrización. Estas citocinas pueden ejercer un efecto prooxidante, al estimular la producción de ROS a través del factor de transcripción NF κ B, e intervenir directamente en la adquisición de fenotipo senescente de los fibroblastos humanos presentes en la herida (Dumont y cols., 2000). Además, las concentraciones elevadas de TNF- α

e IL1 β durante tiempos prolongados favorece la cronicidad de las heridas, mediada en parte por la sobreexpresión de MMPs, las cuales son responsables de la degradación de la matriz extracelular que se está formando en la cicatrización (Han y cols., 2000; Ladwig y cols., 2002; Muller y cols., 2008).

En nuestro estudio, observamos que la oxidación de fibroblastos con H₂O₂ aumentó significativamente los niveles de ROS y la expresión de COX-2, TNF- α , IL1- α e IL-1 β . Sin embargo, la presencia de la solución AHsol en los cultivos de fibroblastos sometidos a oxidación dio lugar a una reducción significativa de los niveles de ROS y revirtió la sobreexpresión de dichas moléculas mediadoras de la inflamación. Estos resultados sugieren que la neutralización de los ROS presentes en el exudado de la herida podría modular *in vivo* la fase inflamatoria de la cicatrización, favoreciendo el paso a la fases proliferativa y de remodelación de la cicatrización.

A partir del conjunto de estos resultados *in vitro*, en los que se demuestran las óptimas características físicoquímicas del LBG para el desarrollo del biomaterial del nuevo apósito junto con la actividad reguladora del estrés oxidativo obtenida con NAC y curcumina, se procedió a analizar el efecto antioxidante de la combinación de los tres componentes LBG, NAC y curcumina sobre fibroblastos humanos sometidos a estrés oxidativo. Se observó que dicha combinación ejerce un efecto antioxidante y protector celular, incrementando significativamente la viabilidad de los fibroblastos oxidados con una alta concentración de H₂O₂.

Posteriormente, y como paso previo al estudio de eficacia *in vivo* del apósito HR006 para el tratamiento de heridas, y considerando los criterios de evaluación de la norma ISO 10993, se llevó a cabo un análisis de la biocompatibilidad del nuevo producto desarrollado. Para ello, se establecieron tres ensayos: citotoxicidad, hemocompatibilidad e irritación dérmica.

La combinación de los dos componentes que forman el apósito HR006, la matriz de LBG y AHsol resultó ser no citotóxica, hemocompatible y no irritante para la piel. Esta buena biocompatibilidad permitió continuar el desarrollo del producto con la prueba de eficacia en un modelo de cicatrización de heridas en animales.

La selección del modelo animal para llevar a cabo este tipo de estudios depende de un gran número de factores, entre los que se incluye el coste del animal, la facilidad de manipulación y las similitudes anatómicas y funcionales con los humanos (Sullivan y cols., 2001). Los mamíferos pequeños, utilizados habitualmente en experimentación *in vivo* (rata, ratón, conejo) son baratos y fáciles de manipular, pero presentan grandes diferencias, tanto anatómicas como funcionales, con respecto a la piel humana. Desde un punto de vista anatómico, estos animales presentan una capa de pelo corporal (no presente en humanos) y una dermis y epidermis muy finas. Desde un punto de vista funcional, la cicatrización se produce, principalmente, a través de la contracción de la herida y no por reepitelización (Sullivan y cols., 2001). Esto hace necesario insertar una estructura en la herida (férula de silicona) para reducir dicho proceso de contracción.

La piel de cerdo, en cambio, es muy similar a la piel humana, tanto anatómica como funcionalmente. El ratio del grosor de la dermis con respecto a la epidermis oscila entre 10:1 y 13:1, siendo muy similar a la del humano (Morris y Hopewell, 1990; Vardaxis y cols., 1997), presentando además fibras de colágeno equivalentes y una orientación y distribución de vasos sanguíneos semejantes. Por otro lado, en términos de funcionalidad, ambas especies tienen una tasa de renovación de la epidermis y una composición de proteínas y de lípidos en el estrato córneo muy parecidas (Weinstein, 1966; Gray y cols., 1982).

A pesar de la dificultad en la manipulación, la menor disponibilidad y el coste más elevado de cada animal, todas las similitudes señaladas anteriormente entre la piel de cerdo y la piel humana, hacen del modelo porcino un excelente modelo *in vivo* para el estudio de la cicatrización, motivo por el cual fue seleccionado para llevar a cabo el análisis de la eficacia *in vivo* del apósito HR006. Este análisis se realizó, a nivel macro y microscópico, durante un periodo de tres semanas, a partir de la producción de las heridas mediante la exéresis de 12 cm² de tejido dermoepidérmico.

En el análisis macroscópico de la lesión, se pudo observar que, durante todo el período del estudio, las heridas tratadas con HR006 presentaron un porcentaje de cierre de la herida superior a las de los controles. Esta evolución de la cicatrización más rápida de las heridas tratadas con HR006 pudo evidenciarse también a nivel microscópico, de modo que las diferencias en la progresión de la cicatrización fueron ya evidentes desde la primera fase de dicho proceso. Así, el análisis histológico comparativo de las biopsias obtenidas en los mismos días de evolución durante la cicatrización muestra que, en comparación a las heridas control, las heridas tratadas con HR006 presentan una duración menor de la fase inflamatoria, permitiendo una transición más rápida hacia la fase proliferativa. Esto se evidencia por la menor presencia de células inflamatorias, un mayor número de fibroblastos (día 6 de evolución), la existencia de un aumento del depósito de colágeno extracelular y la mayor formación de nuevos vasos sanguíneos (día 10). Por otro lado, el cierre más rápido de la herida se ve facilitado también por una organización de la matriz extracelular más óptima y una mejor reepitalización que en las heridas control (día 16).

Estos resultados sugieren que el control que ejerce el apósito HR006 sobre los niveles de ROS presentes en la herida permite un mayor control de la fase inflamatoria de la lesión, lo cual, a su vez, puede estar relacionado con la

reducción de la expresión de los genes proinflamatorios $TNF\alpha$, $IL-1\alpha$ e $IL1\beta$, tal y como se demostró en la experimentación *in vitro*. Este control *redox* y de regulación molecular de la fase inflamatoria puede ser la responsable de la rápida transición hacia la fase proliferativa y de la consecuente mejor reepitelización señalados anteriormente.

En definitiva, este estudio ha permitido el objetivo inicial de llevar a cabo una investigación aplicada dentro del ámbito de la biomedicina, esto es, desde el diseño inicial, el análisis experimental *in vitro* e *in vivo* y posterior desarrollo de una terapia que, fundamentada en el control del estrés oxidativo, permita un abordaje novedoso en la curación de heridas cutáneas.

VI. CONCLUSIONES

1. La matriz del apósito HR006, sintetizada a partir de LBG, presenta un conjunto de características fisicoquímicas idóneas –porosidad, carácter antioxidante y elevada capacidad de absorción– para la cura de heridas en ambiente húmedo.
2. El estrés oxidativo inducido en fibroblastos humanos, mediante la exposición *in vitro* a H₂O₂, ocasiona una respuesta celular dosis-dependiente objetivable a través del incremento de los niveles intracelulares de ROS, la disminución de los niveles de GSH, la reducción de la viabilidad celular y la tasa proliferativa, y la inducción de la senescencia en la población celular.
3. La combinación de los agentes NAC y curcumina reduce los efectos biológicos ocasionados por el estrés oxidativo, disminuyendo los niveles de ROS, regulando la expresión de COX-2 y citocinas proinflamatorias (IL-1 α , IL-1 β y TNF α) y facilitando la recuperación de la viabilidad celular.
4. El apósito HR006, constituido por la matriz de LBG y la solución acuosa de NAC y curcumina (AHsol), presenta una elevada capacidad antioxidante, es hemo y dermocompatible, y carece de actividad citotóxica, lo que demuestra su carácter biocompatible *in vitro*.
5. En ensayos preclínicos, el apósito HR006 reduce la duración e intensidad de la fase inflamatoria de la cicatrización. Este efecto favorece la transición hacia la fase proliferativa y mejora la reepitelización, facilitando, de este modo, el cierre de la herida.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abd-El-Aleem SA, Ferguson MW, Appleton I, Bhowmick A, McCollum CN, Ireland GW. Expression of cyclooxygenase isoforms in normal human skin and chronic venous ulcers. *Journal of Pathology* 2001; 195(5):616-23.

Agnihotri N, Mishra PC. Mechanism of scavenging action of N-acetylcysteine for the OH radical: A Quantum Computational Study. *The Journal of Physical Chemistry B* 2009; 113(35):12096-104.

Akbik D, Ghadiri M, Chrzanowski W, Rohanzadeh R. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sciences* 2014; 116(1):1-7.

Alleva R, Nasole E, Di Donato F, Borghi B, Neuzil J, Tomasetti M. Alpha-lipoic acid supplementation inhibits oxidative damage, accelerating chronic wound healing in patients undergoing hyperbaric oxygen therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 333(2):404-10.

Álvarez-Fernández LJ, Lozano F, Marinel-lo-Roura J, Masegosa-Medina JA. Encuesta epidemiológica sobre la insuficiencia venosa crónica en España: estudio DETECT-IVC 2006. *Angiología* 2008; 60(1):27-36.

Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-Acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine* 1989; 6(6):593-7.

Atsumi T, Tonosaki K, Fujisawa S. Induction of early apoptosis and ROS-generation activity in human gingival fibroblasts (HGF) and human submandibular gland carcinoma (HSG) cells treated with curcumin. *Archives of oral Biology* 2006; 51(10):913-21.

auf dem Keller U, Kümin A, Braun S, Werner S. Reactive oxygen species and their detoxification in healing skin wounds. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 2006; 11(1):106-11.

Balasubramanian S, Eckert RL. Keratinocyte proliferation, differentiation, and apoptosis –Differential mechanisms of regulation by curcumin, EGCG and apigenin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007; 224(3):214-9.

Barbucci R, Pasqui D, Favalaro R, Panariello G. A thixotropic hydrogel from chemically cross-linked guar gum synthesis, characterization and rheological behaviour. *Carbohydrate Research* 2008; 343(18):3058-65.

Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology* 1997; 29(3):315-31.

Biswas SK, McClure D, Jimenez LA, Megson IL, Rahman I. Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NF-kappa β activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells: mechanism of free radical scavenging activity. *Antioxidants and Redox Signaling* 2008; 7(18):32-41.

Bladier C, Wolvetang EJ, Hutchinson P, de Haan JB, Kola I. Response of a primary human fibroblast cell line to H₂O₂: senescence-like growth arrest or apoptosis?. *Cell Growth & Differentiation* 2007; 8(5):589-98.

Blander G, de Oliveira RM, Conboy CM, Haigis M, Guarente L. Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(40):38966-9.

Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008; 97(8):2892-923.

Brennan CS. Dietary fibre, glycaemic response, and diabetes. *Molecular Nutrition and Food Research* 2005; 49(6):560-70.

Bush JA, Ho VC, Mitchell DL, Tron VA, Li G. Effect of N-acetylcysteine on UVB-induced apoptosis and DNA repair in human and mouse keratinocytes. *DNA Repair* 1999; 70(3):329-33.

Carafa M, Marianecchi C, Di Marzio L, Rinaldi F, Meo C, Matricardi P y cols. A new vesicle-loaded hydrogel system suitable for topical applications: preparation and characterization. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2011; 14(3):336-46.

Castro RR, Feitosa JP, da Cunha PL, da Rocha FA. Analgesic activity of a polysaccharide in experimental osteoarthritis in rats. *Clinical Rheumatology* 2007; 26(8):1312-9.

Conferencia Nacional de Consenso sobre Úlceras de la Extremidad Inferior (CONUEI). *Documento de consenso CONUEI*. Ed. Barcelona: Edjkamed S,L 2009.

Committee on Food Chemicals Codex. (2014). *Food Chemicals Codex 9th edition*. U.S Pharmacopeial convention, New York.

Coviello T, Alhaique F, Dorigo A, Matricardi P, Grassi M. Two galactomannans and scleroglucan as matrices for drug delivery: Preparation and release studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007; 66(2):200-9.

Cunha PL, Castro RR, Rocha FA, de Paula RC, Feitosa JP. Low viscosity hydrogel of guar gum: Preparation and physicochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* 2005; 37(1-2):99-104.

Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 2014;7:301-11.

Das A, Wadhwa S, Srivastava AK. Cross-linked guar gum hydrogel discs for colon-specific delivery of ibuprofen: formulation and in vitro evaluation. *Drug Delivery* 2006; 13(2):139-42.

Deniz M, Borman H, Seyhan T, Haberal M. An effective antioxidant drug on prevention of the necrosis of zone of stasis: N-Acetylcysteine. *Burns* 2013; 39:320–5.

Deveci M, Gilmont RR, Dunham WR, Mudge BP, Smith DJ, Marcelo CL. Glutathione enhances fibroblast collagen contraction and protects keratinocytes from apoptosis in hyperglycemic culture. *The British Journal Dermatology* 2005; 152(2):217-24.

Dhall S, Do D, Garcia M, Wijesinghe DS, Brandon A, Kim J, Sanchez A, y cols. A novel model of chronic wounds: Importance of redox imbalance and biofilm-forming bacteria for establishment of chronicity. *Plos One* 2014; 9(10):e109848.

Dickinson DA, Forman HJ. Glutathione in defence and signalling: lessons from a small thiol. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002; 973:488-503.

Dionísio M, Grenha A. Locust bean gum: Exploring its potential for biopharmaceutical applications. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 2012; 4(3):175–85.

Dumont P, Balbeur L, Remacle J, Toussaint O. Appearance of biomarkers of *in vitro* ageing after successive stimulation of WI-38 fibroblasts with IL-1 α and TNF- α : senescence associated β -galactosidase activity and morphotype transition. *Journal of Anatomy* 2000; 197(4):529-37.

Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *The journal of investigative dermatology* 2007; 127(3):514-25.

Evans AJ, Hood RL, Oakenfull DG, Sidhu GS. Relationship between structure and function of dietary fibre: a comparative study of the effects of three galactomannans on cholesterol metabolism in the rat. *The Britihs journal of Nutrition* 1992; 68(1):217-29.

Fitzmaurice SD, Sivamani RK, Isseroff RR. Antioxidant therapies for wound healing: a clinical guide to currently commercially available products. *Skin Phamacology and Physiology* 2011; 24(3):113-26.

Fraticeilli A, Serrano CV Jr, Bochner BS, Capogrossi MC, Zweier JL. Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion molecule expression and leukocyte endothelial adhesion. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; 1310(3):251-9.

Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry* 1995; 64:97-112.

Galeano M, Torre V, Deodato B, Campo GM, Colonna M, Sturiale A y cols. Raxofelast, a hydrophilic vitamin E-like antioxidant, stimulates wound healing in genetically diabetic mice. *Surgery* 2001; 129(4):467-77.

Gauron C, Rampon C, Bouzaffour M, Ipendey E, Teillon J, Volovitch M y cols. Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. *Scientific Reports* 2013; 3:2084.

Gopinath D, Ahmed MR, Gomathi K, Chitra K, Sehgal PK, Jayakumar R. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials* 2004; 25(10):1911-7.

Gray GM, White RJ, Williams RH, Yardley HJ. Lipid composition of the superficial stratum corneum of pig epidermis. *The British Journal of Dermatology* 1982; 106(1):59-63.

Gülden M, Jess A, Kammann J, Maser E, Seibert H. Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures: Impact of cell concentration and exposure time. *Free Radical Biology and Medicine* 2010; 49(8):1298-1305.

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453(7193):314-21.

Gurtner GC, Chapman MA Regenerative medicine: charting a new course in wound healing. *Advances in Wound Care* 2015; doi: 10.1089/wound.2015.0663.

Halliwell B. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radicals in Biology and Medicine* 1995; 15(1):125-6.

Halliwell B, Gutteridge John MC (2006). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4thEd. New York: Oxford University press.

Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL. TNF- α stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF- κ B mediated induction of MT1-MMP. *Journal of Cell Science* 2000; 114(1):131-39.

Harding KG, Moore K, Phillips TJ. Wound chronicity and fibroblast senescence –implications for treatment. *International Wound Journal* 2005; 2(4):364-368.

Hehenberger K, Hansson A. High glucose-induced growth factor resistance in human fibroblasts can be reversed by antioxidants and protein kinase C-inhibitors. *Cell Biochemistry and Function* 1997; 15(3):197-201.

Heilmann S, Küchler S, Wischke C, Lendlein A, Stein C, Schäfer-Korting M. A thermosensitive morphine-containing hydrogel for the treatment of large-scale skin wounds. *International Journal of Pharmaceutics* 2013; 444(1-2):96-102.

Heenan A. Alginates: an effective primary dressing for exuding wounds. *Nursing standard* 2007; 22(7):53-4.

Hopman WM, Buchanan M, VanDenKerkhof EG, Harrison MB. Pain and health-related quality of life in people with chronic leg ulcers. *Clinical Research* 2013; 33(3):167-74.

Huptas L, Rompoti N, Herbig S, Körber A, Klode J, Schadendorf D y cols. A new topically applied morphine gel for the pain treatment in patients with chronic leg ulcers: first results of a clinical investigation. *Hautarzt* 2011; 62(4):280-6

Iuchi Y, Roy D, Okada F, Kibe N, Tsunoda S, Suzuki S y cols. Spontaneous skin damage and delayed wound healing in SOD1-deficient mice. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2010; 341(1-2):181-94.

Jain SK, Rains J, Jones K. Effect of curcumin on protein glycosylation, lipid peroxidation, and oxygen radical generation in human red blood cells exposed to high glucose levels. *Free Radical Biology and Medicine* 2006; 41(1):92-6.

James TJ, Hughes MA, Hofman D, Cherry GW, Taylor RP. Antioxidant characteristics of chronic wound fluid. *The British Journal of Dermatology* 2001; 145(1):185-6.

James TJ, Hughes MA, Cherry GW, Taylor RP. Evidence of oxidative stress in chronic venous ulcers. *Wound Repair and Regeneration* 2003; 11(3):172-6.

Jin CY, Lee JD, Park C, Choi YH, Kim GY. Curcumin attenuates the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide- BV2 microglia. *Acta Pharmacologica Sinica* 2007; 28(10):1645-51.

Jobin C, Bradham CA, Russo MP, Juma B, Narula AS, Brenner DA, Sartor RB. Curcumin blocks cytokin-mediated NF-(kappa)B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-(kappa)B kinase activity. *The Journal of Immunology* 1999; 163(6):3474-83.

Jones V, Grey JE, Harding KG. Wound dressings. *British Medical Journal* 2006; 332(7544):777-80.

Jørgensen B, Juel Friis G, Gottrup F. Pain and quality of life for patients with venous leg ulcers: proof of concept of the efficacy of Biatains-Ibu, a new pain-reducing wound dressing. *Wound Repair and Regeneration* 2006; 14:233-9.

Kheradpezhoh E, Panjehshahin MR, Miri R, Javidnia K, Noorafshan A, Monabati A y cols. Curcumin protects rats against acetaminophen-induced hepatorenal damages and shows synergistic activity with N-acetyl cysteine. *European Journal of Pharmacology* 2010; 628(1-3):274-81.

King A, Balaji S, Keswani SG, Crombleholme TM. The role of stem cells in wound angiogenesis. *Advances in Wound Care* 2014; 3(10):614–25.

Kim do Y, Jun JH, Lee HL, Woo KM, Ryoo HM, Kim GS y cols. N-acetylcysteine prevents LPS-induced pro-inflammatory cytokines and MMP2 production in gingival fibroblasts. *Archives of Pharmacal Research* 2007; 30(10):1283-92.

Kirsner RS, Eaglstein WH. The wound healing process. *Dermatologic Clinics* 1993; 11(4):629-40.

Külkamp-Guerreiro IC, Souza MN, Bianchin MD, Isoppo M, Freitas JS, Alves JA y cols. Evaluation of lipoic acid topical application on rats skin wound healing. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2013; 28(10):708-15.

Kurahashi T, Junichi F. Roles of antioxidative enzymes in wound healing. *Journal of Developmental Biology* 2015; 3(2):57-70.

Ladwig GP, Robson MC, Liu R, Kuhn MA, Muir DF, Schultz GS. Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair and Regeneration* 2002; 10(1):26-37.

Lappas M, Permezel M, Rice GE. N-Acetyl-cysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and nuclear factor-kappaB deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes *in vitro*. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88(4):1723-9.

Laurienzo P, Fernandes JC, Collic-jouault S, Fitton JH. The use of natural polysaccharides as biomaterials. *Biomed Research International* 2015; 2015:242378.

Lateef H, Aslam MN, Stevens MJ, Varani J. Pretreatment of diabetic rats with lipoic acid improves healing of subsequently-induced abrasion wounds. *Archives of Dermatological Research* 2005; 297(2):75-83.

Le Bras M, Clément MV, Pervaiz S, Brenner C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histology and Histopathology* 2005; 20(1):205-19.

Lipsky BA, Hoey C. Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. *Clin Infect Dis*. 2009; 49(10):1541-9.

Liu J, Willför S, Xu C. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 2015; 5(1):31-61.

Love NR, Chen Y, Ishibashi S, Kritsiligkou P, Lea R, Koh Y y cols. Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nature Cell Biology* 2013; 15(2):222-8.

Lundvig DM, Pennings SW, Brouwer KM, Mtaya-Mlangwa M, Mugonzibwa EA, Kuijpers-Jagtman AM y cols. Curcumin induces differential expression of cytoprotective enzymes but similar apoptotic responses in fibroblasts and myofibroblasts. *Experimental Cell Research* 2015; 330(2):429-41.

Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin : A short review. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 78(18):2081-72087.

Majewska I, Gendaszewska-Darmach E. Proangiogenic activity of plant extracts in accelerating wound healing -a new face of old phytomedicines. *Acta Biochimica Polonica* 2011; 58(4):449-60.

Marinel lo Roura J (2005) *Ulceras de extremidad inferior*. Barcelona: Glosa Ediciones

Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* 1983; 52:711-60

Mendez MV, Raffetto JD, Phillips T, Menzoian JO, Park HY. The proliferative capacity of neonatal skin fibroblasts is reduced after exposure to venous ulcer wound fluid: A potential mechanism for senescence in venous ulcers. *Journal of Vascular Surgery* 1999; 30(4):734-43.

Mohanty C, Das M, Sahoo SK. Sustained wound healing activity of curcumin loaded oleic acid based polymeric bandage in a rat model. *Molecular Pharmaceutics* 2012; 9(10):2801-11.

Morris GM, Hopewell JW. Epidermal cell kinetics of the pig: a review. *Cell Tissue Kinetics* 1990; 23(4):271-82.

Moseley R, Hilton JR, Waddington RJ, Harding KG, Stephens P, Thomas DW. Comparison of oxidative stress biomarker profiles between acute and chronic wound environments. *Wound Repair and Regeneration* 2004; 12(4):419-29.

Mostafa WZ, Hegazy RA. Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship: A review. *Journal of Advanced Research* 2015; 6(6):793-804.

Muller M, Trocme C, Lardy B, Morel F, Halimi S, Benhamou PY. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabetic Medicine* 2008; 25(4):419-26.

Musalmah M, Nizrana MY, Fairuz AH, NoorAini AH, Azian AL, Gapor MT y cols. Comparative effects of palm vitamin E and alpha-tocopherol on healing and wound tissue antioxidant enzyme levels in diabetic rats. *Lipids* 2005; 40(6):575-80.

Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 2009; 459(7249):996-9.

Nygren H, Malmberg P, Sahlin H. Development of a wound dressing targeting neutrophil function. *World Journal of Surgery* 2004; 28(3):337-42.

Oguz A, Uslukaya O, Alabalık U, Turkoglu A, Kapan M, Bozdog Z. Topical N-acetylcysteine improves wound healing comparable to dexpanthenol: an experimental study. *International Surgery* 2015; 100(4):656-61.

Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49(10):4619-26.

Page C, Pitchford S. International Immunopharmacology Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation. *International Immunopharmacology* 2013; 17(4):1176-84.

Panchatcharam M, Miriyala S, Gayathri VS, Suguna L. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2006; 290(1-2):87-96.

Pancorbo-Hidalgo PL, García-Fernández FP., Torra i Bou JE, Verdú Soriano J, Soldevilla-Agreda JJ. Epidemiología de las úlceras por presión en España en 2013: 4º Estudio Nacional de Prevalencia. *Gerokomos* 2014; 25(4): 162-70.

Parks E, Traber MG. Mechanism of vitamin E regulation: research over the past decade and focus on the future. *Antioxidants and Redox Signaling* 2000; 2(3):405-12.

Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J, Thirion X y cols. Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nature Medicine* 2004; 10(4):396-401.

Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta* 2003; 333(1):19-39.

Pinheiro AC, Bourbon AI, Rocha C, Ribeiro C, Maia JM, Gonçaves MP y cols. Rheological characterization of κ -carrageenan/galactomannan and xanthan/galactomannan gels: Comparisons of galactomannans from non-traditional sources with conventional galactomannans. *Carbohydrate Polymers* 2011;83:392-9.

Raghavan CV, Muthulingam C, Jenita JA, Ravi TK. An in vitro and in vivo investigation into the suitability of bacterially triggered delivery system for colon targeting. *Chemical and Pharmaceutical bulletin (Tokyo)* 2002; 50(7):892-5.

Rai D, Singh JK, Roy N, Panda D. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochemical Journal* 2008; 410(1):147-55.

Ramesh KV, Mahindrakar MB, Bhat EP. A new role for vitamin D: cholecalciferol promotes dermal wound strength and re-epithelization. *Indian Journal of Experimental Biology* 1993; 31(9):778-9.

Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins. A historical overview and speculative preview of novel mechanism and emerging concepts in cell signalling. *Free Radical Biology and Medicine* 2005; 38(12):1543-52.

Rinaudo, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International* 2008; 57(3):397-430.

Roy S, Khanna S, Nallu K, Hunt TK, Sen CK.. Dermal wound healing is subject to redox control. *Molecular Therapy* 2006; 13(1):211-20.

Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacology and Therapeutics* 2014; 141(2):150-9.

Sandolo C, Coviello T, Matricardi P, Alhaique F. Characterization of polysaccharide hydrogels for modified drug delivery. *European Biophysics Journal* 2007; 36(7):693-700.

Scharstuhl A, Mutsaers HA, Pennings SW, Szarek WA, Russel FG, Wagener FA. Curcumin-induced fibroblast apoptosis and in vitro wound contraction are regulated by antioxidants and heme oxygenase: implications for scar formation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2009; 13(4):712-25.

Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Karrer S, Landthaler M, Babilas P. Oxygen in acute and chronic wound healing. *British Journal of Dermatology*: 2010; 163(2):257-68.

Semple JW, Italiano JE Jr, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nature reviews, Immunology* 2011; 11(4):264-74.

Sen CK, Khanna S, Gordillo G, Bagchi D, Bagchi M, Roy S. Oxygen, oxidants and antioxidants in wound healing: an emerging paradigm. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002; 957:239-49.

Sen CK. 2003. The general case for redox control in wound repair. *Wound Repair and Regeneration* 2003; 11(6):431-8.

Sen CK, Gordillo GM, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt TK y cols. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair and Regeneration* 2009; 17(6):763-71.

Sharma P, Jha A, Dubey RS, Pessarakli M. Reactive oxygen species , oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*. Volume 2012, Article ID 217037.

Shi MM, Godleski JJ, Paulauskis JD. Regulation of macrophage inflammatory protein-1alpha mRNA by oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* 1996; 271(10):5878-83.

Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine* 1999; 341(10):738-46.

Soneja A, Drews M, Malinski T.. Role of nitric oxide , nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacological Reports* 2005; 57 Suppl:108-19.

Soldevilla Agreda JJ, Torra i Bou JE, Posnett J, Verdú Soriano J, San Miguel L, Mayan Santos JM. Una aproximación al impacto del coste económico del tratamiento de las úlceras por presión en España. *Gerokomos* 2007; 18(4):43-52.

Steiling H, Munz B, Werner S, Brauchle M. Different types of ROS-scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair. *Experimental Cell Research* 1999; 247(2):484-94.

Sugiura H, Ichikawa T, Liu X, Kobayashi T, Wang XQ, Kawasaki S y cols. Rennard SI. N-acetyl-L-cysteine inhibits TGF-beta1-induced profibrotic

responses in fibroblasts. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* 2009; 22(6):487-91.

Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair and Regeneration* 2001; 9(2):66-76.

Suzuki S, Lim JK. Microencapsulation with carrageenan-locust bean gum mixture in a multiphase emulsification technique for sustained drug release. *Journal of Microencapsulation* 1994; 11(2):197-203.

Tian XQ, Chen TC, Holick MF. 1,25-dihydroxyvitamin D3: a novel agent for enhancing wound healing. *Journal of Cellular Biochemistry* 1995; 59(1):53-6.

Telgenhoff D, Shroot B. Cellular senescence mechanisms in chronic wound healing. *Cell Death and Differentiation* 2005; 12(7):695-8.

ter Riet G, Kessels AG, Knipschild PG. Randomized clinical trial of ascorbic acid in the treatment of pressure ulcers. *Journal of Clinical Epidemiology* 1995; 48(12):1453-60.

Torra JE, Arboix M, Soldevilla JJ, Rueda J, Segovia T, Martínez F y cols (2004) Apósitos. En: Soldevilla JJ, Torra JE (eds.). *Atención Integral de las Heridas Crónicas, 1ª Ed.* Madrid: SPA 2004, 91-120.

Trommer H, Neubert RH. The examination of polysaccharides as potential antioxidative compounds for topical administration using a lipid model system. *International Journal of Pharmaceutics* 2005; 298(1):153-63.

Tsala DE, Amadou D, Habtemariam S. Natural wound healing and bioactive natural products. *Phytopharmacology* 2013; 4(3)532-60.

Tsai ML, Huang HP, Hsu JD, Lai YR, Hsiao YP, Lu FJ y cols. Topical N-acetylcysteine accelerates wound healing in vitro and in vivo via the PKC/Stat3 pathway. *International Journal of Molecular Sciences* 2014; 15(5):7563-78.

Uzun M, Anand, SC, Shah T. *In vitro* characterisation and evaluation of different types of wound dressing materials. *Journal of Biomedical Engineering and Technology* 2013; 1(1):1-7.

Vanderwee K, Clark M, Dealey C, Gunningberg L, Defloor T. Pressure ulcer prevalence in Europe: a pilot study. *Journal of evaluation in clinical practice* 2007; 13(2):227-35.

Vardaxis NJ, Brans TA, Boon ME, Kreis RW, Marres LM. Confocal laser scanning microscopy of porcine skin; implications for human wound healing studies. *Journal of Anatomy* 1997; 190(4):601-11.

Vessey DA, Lee KH, Blacker KL. Characterization of the oxidative stress initiated in cultured human keratinocytes by treatment with peroxides. *The Journal of Investigate Dermatology* 1992; 99(6):859-63.

Vijayaraghavan C, Vasanthakumar S, Ramakrishnan A. In vitro and in vivo evaluation of locust bean gum and chitosan combination as a carrier for buccal drug delivery. *Die Pharmazie* 2008; 63(5):342-7.

Wall IB, Moseley R, Baird DM, Kipling D, Giles P, Laffafian I y cols. Fibroblast dysfunction is a key factor in the non-healing of chronic venous leg ulcers. *Journal of Investigative Dermatology* 2008; 128(10):2526-40.

Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY y cols. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1997; 15(12):1867-76.

Wang Z, Zhang Y, Banerjee S, Li Y, Sarkar FH. Notch-1 down-regulation by curcumin is associated with the inhibition of cell growth and the induction of apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer* 2006; 106(11):2503-13.

Weidinger A, Kozlov AV. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: Oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules* 2015; 5(2):472-84.

Weinstein, GD. (1966) Comparison of turnover time and of keratinous protein fractions in swine and human epidermis in *Swine in biomedical research*, Bustad LK, McClellan RD Ed., Seattle.

Winter GD. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature* 1962; 20(193):293-4

Wound Care Guidelines. 2005. *Medicines Management Committee Report*: 1-33.

Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *The Journal of Investigative Dermatology* 1993; 101(1):64-8.

Yan H, Chen J, Peng X. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor hydrogel promotes healing of deep partial thickness burn wounds. *Burns* 2012; 38(6):877-81.

Yildiz YS, Oner ET (2014). Mannan as a Promising Bioactive Material for Drug Nanocarrier Systems. En Demir Sazir, A. *Application of Nanotechnology in Drug Deliver* (p. 311-342). Intech Open.

Young, T. Matching the dressing to the wound. *Community Nurse* 1997;3(3):31-4.

Zampieri N, Zuin V, Burro R, Ottolenghi A, Camoglio FS A prospective study in children: Pre- and post-surgery use of vitamin E in surgical incisions. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* 2010; 63(9):1474-8.

Zavoral JH, Hannan P, Fields DJ, Hanson MN, Frantz ID, Kuba K y cols. The hypolipidemic effect of locust bean gum food products in familial hypercholesterolemic adults and children. *The American journal of Clinical Nutrition* 1983; 38(2):285-94.

Zdanov S, Bernard D, Debacq-Chainiaux F, Martien S, Gosselin K, Vercamer C y cols. Normal or stress-induced fibroblast senescence involves COX-2 activity. *Experimental Cell Research* 2007; 313(14):3046-56.

Zdanov S, Toussaint O, Debacq-Chainiaux F. p53 and ATF-2 partly mediate the overexpression of COX-2 in H₂O₂ induced premature senescence of human fibroblasts. *Biogerontology* 2009; 10(3):291-8.