



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Estudio del Efecto del Tratamiento Tópico
con Diferentes Formulaciones de Curcumina
sobre un Modelo de Reparación Tisular
en Ratas Sprague-Dawley Sanas y Diabéticas

D. Antonio Ramírez Andreo

2021

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO TÓPICO CON DIFERENTES
FORMULACIONES DE CURCUMINA SOBRE UN MODELO DE REPARACIÓN
TISULAR EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY SANAS Y DIABÉTICAS**

Autor: Antonio Ramírez Andreo

Directores: Francisco José Gómez García

Francisco Martínez Díaz

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento y reconocimiento más sincero a mis tutores de tesis los doctores D. Francisco José Gómez García y D. Francisco Martínez Díaz. Este trabajo de investigación no habría visto la luz de no ser por el constante apoyo moral y supervisión de estos dos incansables profesores. Ha sido un honor y un auténtico aprendizaje el poder compartir con ellos las distintas fases de este trabajo, en las que nunca me faltó su sonrisa, su tiempo y su empuje para la consecución de esta tesis.

Quiero agradecer a mi mujer Beatriz y nuestras maravillosas hijas Natalia e Irene, su enorme generosidad al haber renunciado a un tiempo de valor incalculable para que yo pudiera dedicarme a esta investigación.

Me gustaría acabar agradeciendo a todas las personas que con el más sincero de los desintereses me ayudaron a dar un paso detrás de otro para poder arribar a buen puerto, todos sus nombres los guardo como uno de mis mejores recuerdos, ojalá pueda poder estar a su lado cuando me necesiten.

ÍNDICE

RESUMEN	6
1.- INTRODUCCIÓN	7
1.1 LA PIEL COMO SISTEMA	7
1.1.1 Concepto	7
1.1.2 Ontogenia	9
1.1.3 Histología de la piel	12
1.2. SOLUCIÓN DE CONTINUIDAD DE LA INTEGRIDAD CUTÁNEA	15
1.3 PROCESO DE REPARACIÓN CUTÁNEA-CICATRIZACIÓN	20
1.3.1 Fases del proceso de cicatrización	20
1.3.2 Tratamiento de las heridas cutáneas	25
1.2 CURCUMINA	31
1.2.1 Curcumina y cáncer	33
2.- JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	37
3.- HIPÓTESIS	38
3.1 OBJETIVO GENERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4.- MATERIAL Y MÉTODOS	40
4.1 ANIMALES	40
4.2 NANOPARTÍCULAS DE CURCUMINA	40
4.3 AGENTES	41
4.4 MÉTODO	42
4.4.1 Modelo en ratas sanas	42
4.4.2 Modelo en ratas diabéticas	43
4.4.3 Realización de heridas cutáneas	43

4.4.4 Administración del tratamiento con curcumina.....	44
4.4.5 Recogida de muestras.....	44
4.4.6 Sacrificio.....	44
4.4.7 Procedimiento histopatológico.....	44
4.4.8 Procedimiento inmunohistoquímico.....	45
4.4.9 Variables del estudio.....	47
4.4.10 Método estadístico.....	52
5.- RESULTADOS.....	53
5.1 ÁREAS DE LESIÓN.....	53
5.1.1 Ratas sanas.....	53
5.1.2 Ratas diabéticas.....	55
5.2 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.....	56
5.2.1 Ratas sanas.....	56
5.2.2 Ratas diabéticas.....	61
5.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	64
5.3.1 Inmunohistoquímica con PCNA.....	64
5.3.2 Inmunohistoquímica con TIMP-1, MMP-9 y CD-34.....	65
6.- DISCUSIÓN.....	67
7.- CONCLUSIONES.....	76
8.- BIBLIOGRAFÍA.....	77
9.- ANEXOS.....	86

RESUMEN

La piel es sin duda el órgano por excelencia en la anatomía humana, por extensión y por su implicación en múltiples funciones que incluye la síntesis de vitamina D(1)(2)(3). La integridad de la piel en muchas ocasiones se puede ver alterada por distintos mecanismos lesivos, que abocan muchas veces en una herida.

El objetivo de este estudio experimental ha sido comprobar la eficacia de diferentes formulaciones de curcumina en nanopartículas, aplicadas en las heridas de espesor total en ratas (Sprague-Dawley) sanas y en ratas diabetizadas.

Las distintas preparaciones se aplicaron a diario en las heridas y se hizo una evaluación macroscópica del diámetro de la herida, así como un estudio histomorfométrico e inmunohistoquímico (sólo en ratas diabéticas) en los días 3, 7 y 14.

En el estudio macroscópico de ratas sanas se obtuvo una más rápida cicatrización en las tratadas con curcumina en glicerosomas recubiertos de ácido hialurónico (AH). Los resultados de las variables histomorfométricas demostraron una clara tendencia a la reepitelización precoz del grupo de ratas sanas tratadas con curcumina en glicerosomas+AH, si bien no se hallaron diferencias estadísticamente significativas (d.e.s). El resto de variables histomorfométricas no mostraron d.e.s El estudio inmunohistoquímico no relevó d.e.s.

Concluimos que la eficacia de la encapsulación de curcumina en glicerosomas+AH frente a otras presentaciones se haya debido a la consecución de una mayor concentración de curcumina en la herida y mayor estabilidad, así como por el efecto adyuvante del AH (antiinflamatorio y promotor de la movilidad celular).

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 LA PIEL COMO SISTEMA

1.1.1 Concepto

La piel comprende la “cubierta” que cubre toda la anatomía del cuerpo humano y que se compone fundamentalmente de 3 capas bien diferenciadas anatómicamente y funcionalmente. Éstas son la epidermis, la dermis y la hipodermis o tejido celular subcutáneo. (19).

En un adulto la extensión de la piel puede llegar hasta 2 m² y un peso de hasta 4-5 kg.

Cuando describimos a esta estructura como sistema es por su compleja estructura y por el desempeño de múltiples funciones en distintos campos como el endocrino entre otros(1)(20). Hay que reconocer que muchas de las funciones que conocemos actualmente se han identificado después de que éstas hayan desaparecido o hayan sido defectuosas.

Así pues, la primera de estas funciones que es evidente en cuanto existe una solución de continuidad es su función barrera. Dicha función comprende de entrada la barrera física, en tanto en cuanto impide que penetren a través de ella distintas moléculas, partículas, y microorganismos. Dicha función viene determinada por su compacta capa córnea (más adelante desarrollada) y por las constantes físicas como resistencia eléctrica (media de 100.000 ohmios)(21), carga eléctrica, ph, e hidrofobia. De la misma forma evita la salida descontrolada hacia el exterior de importantes moléculas como son el agua y sales minerales entre otras.

La presencia del sistema inmunológico en el seno de la piel, con poblaciones procedentes del torrente sanguíneo y de otras específicas de tejido cutáneo hacen que sea de suma importancia su conocimiento para entender su función y su disfunción en forma de dermatosis inflamatorias y tumorales. La presencia de este sistema inmune asegura la captación temprana de moléculas o microorganismos por parte de células especializadas como las células dendríticas y su presentación a otras células fundamentales como son los linfocitos T.(22) .Este excepcionalmente complejo sistema inmunológico cutáneo es capaz de contener dichos elementos y evitar la mayor parte de las veces, progresión infecciosa y/o daño tisular. Esta inmunidad así mismo es fundamental en el control de aquellas poblaciones celulares cutáneas

que se “desacoplen” de los sistemas de control del crecimiento celular, es decir son capaces de reconocer y eliminar células neoplásicas; es lo que se denomina control tumoral(23). Esta función es tan relevante que actualmente la gran revolución en tratamiento de algunos de los tumores cutáneos de peor pronóstico son los fármacos que estimulan la función inmunológica (ej. antiPD1-PDL1).(24)

Durante la embriogénesis aparecen múltiples estructuras especializadas en el seno de la piel que son fundamentales para otra de sus funciones como son (22):

- Tacto fino: corpúsculos de Meissner.
- Presión/textura: corpúsculos de Merkel.
- Presión profunda/Vibración: corpúsculos de Pacini.
- Frío: corpúsculos de Krause.
- Calor: corpúsculos de Ruffini.
- Dolor: terminaciones nerviosas/ células de Schwann especializadas(25).

La piel es fundamental dentro en el control de la temperatura corporal (homeotermia) (26). Para disipar el exceso de calor generado por el medio interno disponemos de varios mecanismos como son: son la irradiación, la convección y conducción, vasodilatación(27) y sudación.

En el caso de tener que evitar el enfriamiento y tener que conservar el calor la piel dispone de otros mecanismos:

- Vasoconstricción(27): se impide la pérdida de calor al llegar menos sangre a territorios acrales.
- Piloerección: la contracción de la musculatura lisa asociada a los folículos pilosos contribuye a crear una capa de aire de mayor grosor que resiste a la convección.

1.1.2 Ontogenia

Durante la gestación, en la 3ª semana de desarrollo embrionario, la gástrula presenta 3 capas celulares diferenciadas: ectodermo, mesodermo y endodermo. La capa ectodérmica se especializará hacia una capa ectodérmica superficial o hacia neuroectodermo. La primera se diferenciará hacia la formación de queratinocitos, que se dispondrán en una capa monocelular. En etapas posteriores aparecerá una capa más superficial denominada peridermo, que constituye la primera “barrera” epidérmica hasta que aparezca la queratinización en el 2º trimestre de desarrollo; el peridermo se pasará a constituir parte del vérmix caseoso de los recién nacidos. La estratificación de la epidermis comienza aproximadamente en la 8 semana de gestación y es a mediados del 3º trimestre cuando la piel embrionaria tiene morfología “adulta”. En la consecución de la diferenciación epidérmica son numerosos los genes implicados, destacando el papel de “director de orquesta” del gen TP63, que a través de su proteína p63 consigue dicho proceso(28). Las mutaciones de este gen, producen fenotipos con buena correlación genotipo-fenotipo.

El proceso de migración de las células epidérmicas durante la embriogénesis sigue un patrón de extensión próximal-distal que se denominan líneas de Blaschko(29). Estos patrones de migración son visibles cuando se producen mutaciones en el genoma de las células madre epidérmicas, apareciendo mosaicismo genético y manifestándose en patrones en forma de “S” o “V” fundamentalmente (30).

La presencia de los melanocitos en la piel aparece antes de la 12 semana de edad fetal, estos derivan de la cresta neural(22). Para poder llegar a la epidermis, las células precursoras de los melanocitos denominadas melanoblastos, se desplazan por el mesodermo siguiendo la vía de migración dorsolateral de la cresta neural y central en el tronco, anterior en cara y cuello y distan en las extremidades. Otra forma de llegar a piel es a través de la diferenciación de los precursores de las células de Schwann derivadas de la cresta neural, que migran a través de los tractos nerviosos.

En este proceso de migración-diferenciación es fundamental el papel del MITF a través de la regulación de distintos grupos de genes y siguiendo una secuencia temporal determinada(31).

Durante el desarrollo del embrión, podemos encontrar los melanocitos localizados en la dermis, siendo el polo cefálico su ubicación más precoz (antes de la 10 semana de gestación), pero en su migración llegan hasta la capa basal de la epidermis y los restantes melanocitos dérmicos desaparecen vía apoptosis. Hay una excepción, al final de la gestación queda un remanente de melanocitos dérmicos con capacidad de síntesis de melanina y que se localizan en el polo cefálico, zona sacra y dorso de pies y manos (32).

Los melanocitos epidérmicos se disponen a lo largo de la membrana basal y constituyen la denominada unidad melanocito-queratinocito, en la que un sólo melanocito establece contacto a través de sus dendritas con aprox 30 queratinocitos adyacentes y transfiere los melanosomas(22). Estos melanosomas se disponen en la parte apical del melanocito, ejerciendo así su protección sobre el material genético celular. Los melanocitos también migran hasta el bulbo piloso y promontorio, esta última localización se ha identificado recientemente como la “reserva” de células madre melanocíticas, responsables de la repigmentación cutánea y pilosa en el proceso de reparación cutánea(33). El número de melanocitos es similar en las distintas razas humanas, lo que determina el color de la piel es la actividad de dichos melanocitos a la hora de producir melanina.

Otro tipo celular de gran relevancia por su papel inmunológico en la piel son las células de Langerhans. Derivadas de precursores de la médula ósea se detectan precozmente en la piel embrionaria (antes de las 6 semanas). Se caracterizan por ser células dendríticas y por la presencia de los gránulos de Birbeck, organelas intracelulares relacionadas con la función de captación y presentación antagónica de estas células especializadas. En el desarrollo de su función pueden migrar a la dermis y posteriormente a los ganglios linfáticos locorreregionales y amplificar la respuesta inmune.

Las células de Merkel(34) también aparecen en la piel embrionaria en las etapas iniciales de embriogénesis, en primer lugar en palmas y plantas, donde serán especialmente abundantes. Clásicamente se le ha atribuido un origen neural, sin embargo se ha podido demostrar que su origen es ontogénicamente epidérmico. Su disposición individual a lo largo de la membrana basal y en íntima aposición con las neuronas sensoriales Abeta y formando “grumos”

denominados domos táctiles en piel pilosa hacen que este tipo celular cumpla su función de receptor táctil. Las células de Merkel contiene gránulos neurosecretores cuyo contenido se piensa tiene función neurotransmisora, neuroendocrina y posiblemente trafica sobre los queratinocitos adyacentes. Su localización en la vaina pilosa externa, en la zona de inserción del músculo piloerector hace pensar su implicación en la inducción de la fase de anagen folicular. Por su capacidad neurosecretora, se piensa que las células de Merkel pueden ser un actor principal en la homeostasis cutánea a través de mecanismos autocrinos, paracrinos, influyendo en los sistemas vascular, inmunológico y pigmentarlo.

El origen de las dermis varía en función de localización anatómica. Si bien en tronco y extremidades deriva de las células mesodérmicas embrionarias, en la cara y mitad anterior del cuero cabelludo su origen reside en las células ectodérmicas de la cresta neural.

La presencia de fibroblastos en el embriones de 8 semanas se puede demostrar y son capaces de sintetizar abundante colágeno III y en menor proporción colágeno I. Hasta el final del segundo trimestre, la capacidad de regeneración dérmica permite que la reparación cutánea no deje cicatrices visibles. La organización del sistema vascular y de tractos nerviosos a través de la dermis es evidente a partir del primer trimestre y no son definitivos hasta el final de la gestación.

La aparición de las estructuras de soporte entre la dermis y la epidermis constituyen la denominada unión dermoepidérmica. A parte de estabilidad mecánica y estructural a la piel, también cumple otras funciones como son la regulación del tráfico de moléculas y células entre dermis y epidermis, así como de “andamiaje” en el proceso de reparación cutánea.

La membrana basal se constituye con distintos componentes sintetizados por los queratinocitos basales y los fibroblastos dérmicos, dando lugar al citoesqueleto, hemidesmosomas, lámina lúcida, lámina densa y fibras de anclaje. Es en la semana 12 cuando se puede comprobar que esta importante estructura ya está plenamente constituida.

1.1.3 Histología de la piel

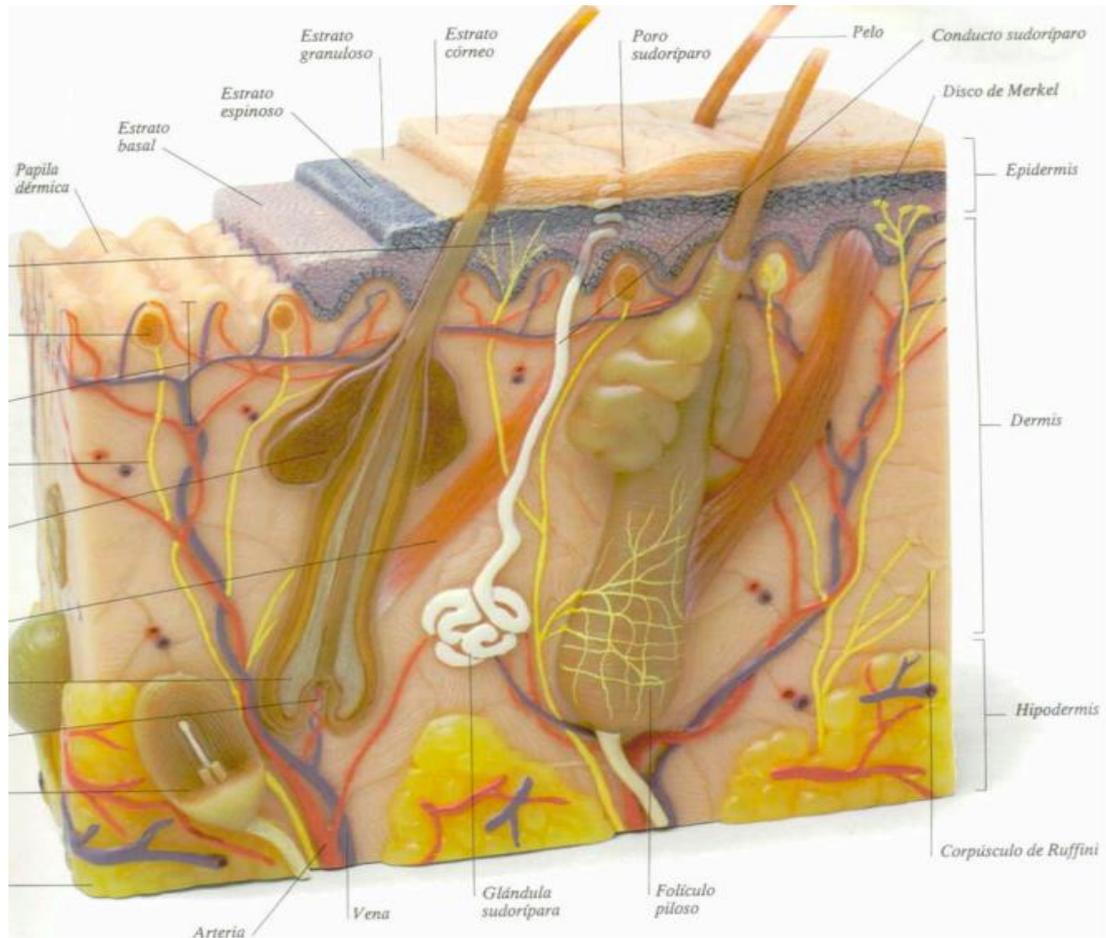


Imagen 1: Esquema anatomía de la piel. (<http://www.stetikmed.cl/articulos-PDF/Steikmed-Anatomia-y-fisiologia-de-la-piel.pdf>.)

En el estudio microscópico de la piel diferenciamos 3 capas claramente diferenciadas(35):

1.1.3.1 Epidermis

La epidermis es la capa más superficial de la piel, y se dispone en 5 niveles con algunas modificaciones en determinadas localizaciones del cuerpo que contribuyen a su función específica de zona.

a) Capa basal: es el estrato más profundo de la epidermis. Constituida por los queratinocitos basales, melanocitos y células de Merkel, así como por las stem cell de los queratinocitos. Los primeros son más basófilos que en el resto de capas de la piel, por su alto contenido en ribosomas. La zona de transición entre esta capa y la dermis se denomina membrana basal y

que hemos descrito en líneas anteriores, siendo fundamental el papel de los hemidesmosomas como anclaje al resto de elementos.

b) Estrato espinoso o capa de Malphigio: constituido por varias hileras de queratinocitos nucleares y que mantienen unidos a través de estructuras especializadas denominadas desmosomas y que les dan el aspecto de “espinas”. En este nivel se disponen las células de Langerhans y bajo determinados estímulos (exposición UV) podemos encontrar células de Merkel.

c) Capa granulosa: formada por escasas filas de queratinocitos que pierden el núcleo celular y acumulan gránulos de queratohialina, contribuyendo al proceso de cornificación. También se localizan a este nivel los cuerpos lamelares que contienen lípidos.

d) Capa lúcida: monocapa de queratinocitos anulados y con contenido en elina y hialina, y que están presentes en localizaciones como las plantas de los pies y palmas.

e) Capa córnea: es la capa más superficial de la epidermis. Constituida por queratinocitos anucleados y que contiene queratina (corneocitos), embebidos en una matriz hidrolipídica cuyo pH entre 5-6 ejerce un efecto antimicrobiano. En el polo inferior de esta capa se mantienen uniones desmosómicas (corneosomas) hasta que desaparecen en la zona superior de esta capa, produciéndose el fenómeno de descamación. Dicha descamación fisiológica es un mecanismo que dificulta la presencia estable de múltiples microorganismos potencialmente patógenos. Hasta la capa córnea llegan los orificios de drenaje de las glándulas sudoríparas ecrinas y se produce la salida del pelo del folículo piloso.

1.1.3.2 Dermis

La dermis o corion es un tejido conectivo de soporte, compresible y elástico que subyace a la epidermis, y que permite que en su interior asienten las estructuras vasculares y nerviosas. Se compone de células, moléculas fibrosas y una sustancia fundamental que se renuevan constantemente. El grosor de la dermis varía considerablemente con la ubicación anatómica,

siendo mayor en la espalda o palmo-plantar que en la cara medial de los brazos, su estructura microscópica varía según el nivel de profundidad que evaluemos.

La dermis papilar, más superficial, forma proyecciones digitiformes hacia la epidermis (papilas dérmicas) y se alternan con las crestas de la epidermis, lo que aumenta la superficie de contacto entre la dermis y la epidermis y permite una mejor adhesión entre estas capas. Contiene varias células (fibroblastos, dendrocitos dérmicos, mastocitos), vasos y terminaciones nerviosas. Está hecho de fibras de colágeno tipo I y III, dispuestas en haces sueltos y de finas fibras elásticas que se extienden perpendicularmente a la unión dermoepidérmica. En los dedos, las papilas dérmicas contienen corpúsculos táctiles, terminaciones nerviosas especializadas que actúan como mecanorreceptores. La dermis reticular, más profunda, está hecha de haces de colágeno más gruesos, que tienden a estar paralelos a la superficie de la piel. La red elástica también es más gruesa. La dermis reticular contiene la parte profunda de los apéndices cutáneos, los plexos vasculares y nerviosos.

- Los fibroblastos son los productores de colágeno, fibras elásticas y sustancia fundamental.
- Los miofibroblastos aparecen durante el proceso de reparación tisular y contienen actina muscular.
- Los dendrocitos dérmicos forman parte del grupo de células presentadoras de antígenos y no contienen los gránulos de Birbeck de las células de Langerhans.
- Por último, los mastocitos son células que rodean vasos y anejos y forman parte de la vigilancia y respuesta inmunológica.

1.1.3.3 La hipodermis

El tejido celular subcutáneo es la parte más profunda de la piel y la separa de las estructuras esqueléticas como son fascia, hueso y estructuras tendinosas. Contribuye de forma activa en la termorregulación, ya que por un lado actúa como aislante térmico y por otro lado puede generar calor a partir del consumo de tejido adiposo pardo. A través de distintas rutas metabólicas puede almacenar energía en forma de lípidos que acumula en las células más abundantes que son los

adipocitos. Por otro lado, la hipodermis actúa como barrera física y es capaz de amortiguar fuerzas de compresión mecánica.

Los adipocitos se organizan en lobulillos, que a su vez se disponen en lóbulos de mayor tamaño y que están separados por tractos fibrosos (septos) en los que se disponen los plexos nerviosos y vasculares más profundos de la piel. El grosor del panículo adiposo muestra una gran variabilidad dependiendo del área anatómica y hay variaciones dependiendo del sexo. La movilización de grasas dependiendo del estado anabólico-catabólico provoca que esta parte del tegumento pueda variar de grosor en poco tiempo. Finalmente hay que decir que el tejido adiposo se ha mostrado como una fuente potencial de células madre y de tratamiento de tejidos de origen mesenquimal (36)(37).

1.2. SOLUCIÓN DE CONTINUIDAD DE LA INTEGRIDAD CUTÁNEA

El concepto de ruptura de la integridad cutánea o herida engloba la aparición de una solución de continuidad en la epidermis, pudiendo afectar a capas más profundas. Los mecanismos de acción para producir una herida cutánea incluyen abarcan los factores físicos, químicos, térmicos y eléctricos.

Una herida cutánea supone un compromiso en la función de la piel y supone una vía de entrada a distintos agentes biológicos con el consiguiente riesgo de infección local y posteriormente generalizada. En el mismo momento de la generación de la herida, se inicia una cascada de fenómenos de reparación en los que ahora insistiremos. Después del periodo fetal, la reparación cutánea no es perfecta en cuanto a que siempre quedará un tejido cicatrizal que preserva la integridad cutánea pero que puede no contener todos los componentes histológicos descritos anteriormente, y ser por tanto ser idéntica a la piel inicial desde el punto de vista funcional.

Otro aspecto fundamental es el tiempo de cicatrización, pues el retraso en la reparación tisular y la inflamación crónica pueden comprometer la viabilidad de la herida y favorecer fenómenos infecciosos, incluso la degeneración en tumores cutáneos como la úlcera de Marjolin(38).

De modo genérico podemos diferenciar las heridas cutáneas según su duración: en agudas y crónicas(39).

Las heridas agudas generalmente tienen un mecanismo de lesión fácilmente identificable con la integridad de la piel alterada, generalmente debido a alguna forma de trauma. La disrupción cutánea aguda y traumática puede resultar de mecanismos contundentes o penetrantes con una variedad de tamaños, profundidades y ubicaciones de heridas.

Las heridas quirúrgicas son una forma controlada de herida aguda que se crea en el entorno de la sala de operaciones. Las heridas quirúrgicas se clasifican según el grado de carga bacteriana o la contaminación de la herida quirúrgica y se utilizan para predecir el riesgo de infección de la herida quirúrgica que puede afectar la cicatrización de la herida. Las cuatro categorías son limpias, limpias-contaminadas, contaminadas y sucia(40). La mayoría de las heridas limpias y limpias-contaminadas se cierran principalmente al finalizar la cirugía, sin embargo las heridas contaminadas y sucias, así como las heridas quirúrgicas que requieren la extracción de grapas o suturas debido a una infección de la herida postoperatoria, se dejan abiertas y requieren cuidado de la herida para su cierre por segunda intención.



Imagen 2: Herida tras exéresis de tumor en cuero cabelludo con injerto parcialmente necrosado en periferia. (Archivo personal)



Imagen 3: Amplio defecto quirúrgico tras exéresis de carcinoma espinocelular en zona temporoparietal drcha. (Archivo personal)



Imagen 4: Hidradenitis supurativa grave en axila drcha. Preparación prequirúrgica. (Archivo personal)



Imagen 5: Amplio defecto quirúrgico tras exéresis que incluye todo el espesor de la piel de la zona afectada de hidradenitis supurativa. (Archivo Personal)

Cuando el proceso de curación se detiene, puede desarrollarse una herida crónica, y es más probable que esto ocurra en pacientes con trastornos médicos subyacentes. Una herida crónica se define como una herida que no responde al tratamiento inicial o mantenido, sin mostrar una mejora significativa hacia la curación en 4-6 semanas(41)(42). Las heridas crónicas pueden desarrollarse a partir de lesiones cutáneas agudas traumáticas o quirúrgicas o como resultado de la ruptura de la piel previamente intacta. Los pacientes con la percepción del dolor alterada son vulnerables a lesiones repetitivas agudas y crónicas. En algunos pacientes con neuropatía sensorial, la lesión puede pasar desapercibida si el área lesionada no se inspecciona rutinariamente. Los pacientes con diabetes, particularmente aquellos con obstrucción arterial, tienen un alto riesgo de este tipo de lesiones. Las heridas crónicas generalmente se asocian con alteraciones fisiológicas que retrasan o impiden la cicatrización de la herida. En concreto las heridas crónicas se observan con más frecuencia en los miembros inferiores de pacientes que presentan a insuficiencia venosa crónica, enfermedad arterial periférica y/o diabetes mellitus.

1.3 PROCESO DE REPARACIÓN CUTÁNEA-CICATRIZACIÓN

El proceso de cicatrización supone una ventaja evolutiva, pues se consigue reparar las funciones de barrera física, química y bacteriana. No se debe confundir dicho concepto con la regeneración cutánea que ocurre en la piel fetal, hasta aproximadamente la 24 semanas de gestación(22). Pues en ésta, hay una sustitución íntegra del tegumento dañado, sin embargo el proceso de reparación supone una forma poco específica de cicatrización en la que parte del tegumento es sustituido por tejido conjuntivo fibroso, que deja finalmente una cicatriz.

La cura de las heridas ha sido considerada de gran importancia desde tiempos ancestrales, existiendo referencias documentadas ya en el Antiguo Egipto(43).

El proceso de cicatrización es un fenómeno dinámico que se inicia en el mismo momento de la aparición de la solución de continuidad de la piel y que implica un enorme abanico de actores celulares y químicos y que puede durar años.

Las heridas de espesor parcial, que incluyen la epidermis y parte de la dermis, curan preservando las faneras. Sin embargo cuando hay una destrucción de la epidermis y todo el espesor de la dermis, el proceso de cura acaba en forma de cicatriz(44).

1.3.1 Fases del proceso de cicatrización

1.3.1.1 Respuesta vascular

La primera etapa de la cicatrización fisiológica de una herida cutánea se centra en la contención del sangrado o hemostasia y en la formación de una matriz provisional. Esto sucede inmediatamente después del proceso lesivo y se completa en pocas horas.

El daño vascular sanguíneo y linfático produce la ingurgitación de la herida, y este flujo de líquido contribuye a la expulsión de microorganismos y antígenos. A continuación se activan los sistemas extrínseco (factores de coagulación) e intrínseco (plaquetas) para formar el tapón plaquetario y fibrina. Las plaquetas inducen también un proceso de vasoconstricción que

durante 5-10 minutos reduce el sangrado y permite que se forme y rellene la herida de un coágulo rico en factores de crecimiento y citoquinas. Este coágulo contiene además fibronectina, vitronectina, fibrina y trombospondinas(45) que forman una matriz a través de la cual pueden migrar las células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos y leucocitos.

El fenómeno de vasoconstricción junto con la presencia del coágulo hacen que la concentración de oxígeno tisular disminuya, se produzca glicolisis y varíe se acidifique el pH tisular, dificultando la colonización por determinados gérmenes.

A continuación se produce una vasodilatación (reconocible por el edema y eritema) que contribuye a que lleguen más plaquetas y leucocitos al lecho de la herida y que se liberen más citoquinas y factores de crecimiento que inician la fase inflamatoria (fase tardía). De este modo la liberación de citoquinas interviene en:

- IL-1, IL1, IL-6 y TNF-alfa: contribuye a la inflamación.
- IL-1, IL1, IL-6 y TNF-beta: estimula la síntesis de colágeno.
- TGF-beta: induce la transformación miofibroblástica de los fibroblastos.
- FGF-2, VEGF-A, HIF-1 alfa , TGF-beta: activa la neoangiogénesis.
- EGF, FGF-2, IGF-1, TGF-alfa: induce la reepitelización.

1.3.1.2 Respuesta celular: inflamación

El inicio de la inflamación se activa con el inicio de la hemostasia/coagulación. De forma simplificada podemos diferenciar una fase inicial en la que existe un reclutamiento de neutrófilos y otra más tardía que se caracteriza por la llegada y transformación de los monocitos.

La llegada temprana de los neutrófilos es inducida por la presencia de moléculas de origen bacteriano, productos procedentes de la activación plaquetaria y por la activación de la vía del complemento. Su presencia en la herida dura hasta 5 días, prologándose en caso de que haya infección de la herida. Su capacidad de fagocitosis, secreción de moléculas antibacterianas (péptidos catiónicos, eicosanoides) y de liberación de proteasas (elastasa, catépsina G, proteinasa 3 y uroquinasa) son claves en la destrucción bacteriana y del tejido necrótico, además

de liberar factores como el TNFalfa- , IL-1 e IL-6 y que son responsables de la llegada al lecho de la herida de otros actores implicados en la inflamación. Además de todo esto, los neutrófilos son capaces de modificar el perfil de secreción de citoquinas y su fenotipo, aumentando “in situ” su capacidad innata fagocítica.

Aproximadamente a los 3 días del inicio de la reparación cutánea, aparecen los macrófagos, que contribuyen a la fase inflamatoria con su acción fagocítica de restos de microorganismos y tisulares. La secreción por su parte de otros factores de crecimiento, quimiotácticos y citoquinas, favorecen la transición hacia la siguiente fase de la cicatrización y que es la fase proliferativa. Así, la liberación de TGF- beta y alfa, FGF básico, PDGF y VEGF promueve la síntesis de la matriz extracelular y proliferación celular.

Parece existir cierta relación entre la intensidad de la inflamación y la calidad/cantidad de tejido cicatrizal frente el tejido normal que se está reparando(45). El paralelismo que se establece entre la ausencia de esta fase inflamatoria en la reparación del tejido embrionario sin cicatrización apoya la contribución esta fase con la fibrosis(46). La inducción de inflamación en la herida de tejido fetal induce la aparición de cicatrices.

Las heridas de evolución tórpida y con dificultad para curar muestran una fase inflamatoria crónica que favorece que finalmente la cicatriz sea hipertrófica o queloidea.

1.3.1.3 Respuesta proliferativa y reparación

1.3.1.3.1 Reepitelización

El proceso de reepitelización lo llevan a cabo los queratinocitos de los bordes de la herida y las células madre epiteliales localizadas en glándulas sudoríparas y unidades pilosebáceas(47)(48). Se ha demostrado una depleción de estas células madre en las heridas crónicas, atribuible a la inflamación crónica e hipoxia (44). La reepitelización se activa mediante vías de señalización de células epiteliales y no epiteliales localizadas en los bordes de la herida, que liberan citoquinas y factores de crecimiento, como EGF, KGF, IGF-1 y NGF. La producción de elastasa y colagenasa produce la pérdida de los anclajes por desmosomas y

hemidesmosomas de los queratinocitos del borde de la herida, produce un aumento de su permeabilidad de la membrana celular a iones como el calcio, esto a su vez favorece que el citoesqueleto se organice para favorecer la migración celular sobre la matriz de fibrina del coágulo ya existente. Esta migración se realiza mediante la emisión de lamelopodios, los cuales son constituidos por polimerización de los microfilamentos de actina, el anclaje de estas prolongaciones celulares con la matriz extracelular corre a cargo de las integrinas. Para poder orquestar esta reorganización y polarización del citoesqueleto de los queratinocitos, son fundamentales las Rho GTPasas, además son las responsables de la interrupción de esta migración en cuanto existe contacto entre las células migratorias. A continuación estos contactos se consolidan a través de moléculas de adhesión intercelular, desapareciendo los lamolopodios(49).

1.3.1.3.2 Angiogénesis

El inicio de la neovascularización se debe a los factores de crecimiento como, PDGF, β FGF VEGF y por proteasas como la trombina. La unión de estos factores a las células endoteliales de los vasos de la herida inducen su activación a través de proliferación y secreción de enzimas proteolíticas que destruyen la membrana basal, y metaloproteinasas para disolver la matriz extracelular y así a modo de “brotes” los neovasos penetran en el coágulo, siendo la metaloproteinasa 9 un actor relevante en esta fase(50) . La migración endotelial se organiza mediante la síntesis moléculas de adhesión como las integrinas. Mediante la integración de células musculares lisas y pericitos mejora la integridad de las paredes vasculares. Cuando ha habido un compromiso del todo el espesor dérmico, los vasos inicialmente se disponen a modo de anillo en la parte más profunda y emiten neovasos que ascienden de forma perpendicular a la piel (“sola cutis se reficientis”), posteriormente estos vasos iniciales y profundos desaparecen y se forman anastomosis de los vasos más superficiales.

1.3.1.3.3 Fibrinogénesis

Supone la última etapa cronológica de la fase proliferativa, siendo sinérgica con la remodelación y que viene a sustituir la matriz de fibrina y fibronectina que ocupaba el espacio de la herida en reparación.

El tejido de granulación se caracteriza por una alta densidad de fibroblastos, granulocitos, macrófagos, capilares y haces de colágeno desorganizados (44). Como el proceso de angiogénesis continúa en esta fase es típico el color rojo intenso que posee este tejido, sangrando con facilidad. En este momento cronológico, el fibroblasto es el actor principal: pues sintetiza colágeno, sobre todo tipo III (inducido por el TNF β)(51), y la matriz extracelular, que ahora está constituida por fibronectina, ácido hialurónico, glicosaminoglicanos y proteoglicanos. Esta matriz extracelular proporciona el soporte y constituye las vías por la que las células emigran y se diferencian. Conforme nos acercamos al final de esta fase, los fibroblastos se diferencian en miofibroblastos y el resto muere por apoptosis(52).

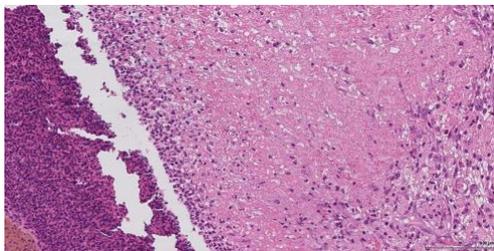


Imagen 6 Herida activa con abundante tejido de granulación. H-E (50x)

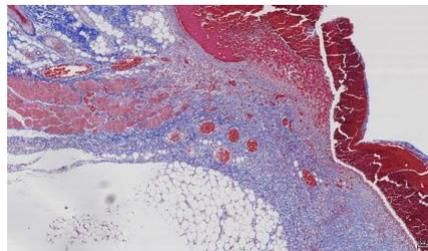


Imagen 7: Tinción de tricómico de Masson que muestra abundante deposición de colágeno y marcado proceso de neovascularización. (20x)

1.3.1.3.4 Remodelación

La cicatrización de las heridas acaba con el proceso de remodelación, que se inicia a partir de la 3ª semana y puede durar hasta un año. La etapa de granulación finaliza con la muerte celular por apoptosis, de tal forma que una herida en su estadio final es avascular y con escaso

componente celular. En esta fase el colágeno tipo I, con mayor resistencia mecánica, sustituye al colágeno tipo III que fue producido durante la fase proliferativa. Este tipo de colágeno está orientado en pequeños haces paralelos y, por lo tanto, es diferente del colágeno de tejido de cesta en la dermis sana. Como hemos comentado antes, el proceso angiogénico cesa, disminuyendo el flujo de sangre a la herida. Los miofibroblastos, a través de su capacidad de unión a las fibras de colágeno y a su capacidad contráctil, disminuyen el área de cicatrización.

Al final del proceso de cicatrización es evidente que no existe la capacidad de regeneración de las glándulas sudoríparas ni de las unidades pilosebáceas, si la herida produjo un intenso daño tisular. La epidermis cicatricial difiere de la no cicatricial en que suele ser algo más atrófica al final de este proceso y con frecuencia adolece de las crestas interpilares.

Finalmente el estrés mecánico puede estimular los receptores mecanosensitivos y a través de la liberación de neuropéptidos por las fibras nerviosas, pueden alterar el proceso de neoangiogénesis y de producción de colágeno y matriz extracelular por parte de los fibroblastos(53).

1.3.2 Tratamiento de las heridas cutáneas

Previo a la exposición del arsenal terapéutico disponible hasta este momento para el tratamiento de las heridas cutáneas, considero importante señalar cuáles son los principales factores de riesgo que pueden comprometer dicho proceso de reparación cutánea:

1.3.2.1 Factores de riesgo

Infeción: La infección retrasa el proceso de cicatrización por varios mecanismos. Los microorganismos producen mediadores inflamatorios que inhiben la fase inflamatoria como la reepitelización. La infección también provoca la muerte celular, lo que aumenta el entorno inflamatorio local, entorpece la granulación y además es un entorno favorable para perpetuar la infección. El grado de contaminación de una herida quirúrgica en el momento de la operación es un factor de riesgo importante para la infección. Las heridas se clasifican como limpias (no

infectadas), limpias- contaminadas (entrada en las vías respiratorias, alimentarias, urinarias o genitales), contaminadas (heridas traumáticas, técnica de rotura estéril) o sucias-infectadas(54).

La definición de la infección de la herida quirúrgica es cuando se produce en o cerca de la incisión quirúrgica dentro de los 30 días del procedimiento o dentro de los 90 días de la implantación del material protésico(40). La infección de la herida quirúrgica es con frecuencia localizada, pero también pueden extenderse a estructuras adyacentes más profundas. Así, la celulitis se refiere a una inflamación no necrotizante de la piel y el tejido celular subcutáneo. Cuando es de causa infecciosa, la vía de entrada suele ser la misma herida cutánea, aunque en ocasiones se produce una celulitis infecciosa a través de heridas no visibles a simple vista.

Tabaco: Los componentes del humo del tabaco y los mecanismos responsables de los efectos vasoactivos y otros efectos del tabaquismo no se han dilucidado completamente. El humo del tabaco es una mezcla compleja de compuestos (monóxido de carbono, nicotina, alquitrán, cianuro de hidrógeno, óxidos de nitrógeno, N-nitrosaminas, formaldehído, benceno)(55). El efecto patogénico sobre la cicatrización de heridas es multifactorial, incluyendo vasoconstricción que causa una isquemia relativa de los tejidos operados, una respuesta inflamatoria reducida, mecanismos bactericidas deteriorados y alteraciones del metabolismo del colágeno. El paciente fumador y exfumador tiene más complicaciones postoperatorias de curación de heridas, en comparación con los no fumadores. (39). Una revisión sistemática identificó cuatro ensayos aleatorios que evaluaron el impacto del abandono del hábito de fumar preoperatorio (intervalo de abstinencia de cuatro a ocho semanas) en la cicatrización de heridas postoperatorias. El abandono del hábito de fumar preoperatorio redujo significativamente la incidencia de infección del sitio quirúrgico(56). Aunque la vasoconstricción inducida por fumar, mediada por la nicotina, puede reducir el flujo sanguíneo hasta en un 40 por ciento, el efecto parece ser temporal, recuperándose el flujo previo antes de una hora(57).

Envejecimiento: El envejecimiento cutáneo se caracteriza por procesos intrínsecos y extrínsecos.

a) El **envejecimiento intrínseco o cronológico** está genéticamente determinado y se caracteriza por el adelgazamiento de todas sus capas de la piel y hay una disminución de la capacidad de reclutamiento celular epidérmica, lo que puede explicar una cicatrización más lenta de la herida:

- A nivel histológico la epidermis es más delgada con aplanamiento de la unión dérmica-epidérmica con disminución de la red de crestas, reduciendo así el área de contacto dérmica-epidérmica que aumenta la fragilidad de la piel y reduce el aporte de nutrientes.
- La dermis se vuelve atrófica con un número reducido de fibroblastos y hay una disminución en el tejido adiposo subdérmico, disminución de la vascularización, pérdida progresiva de colágeno y una capacidad disminuida para producirlo.
- El número y el diámetro de los haces de colágeno disminuye con la edad y hay una sustitución de colágeno I por colágeno III, invirtiéndose la proporción habitual de 80%-20% del colágeno dérmico(51).

b) El **envejecimiento extrínseco** es producido tanto por factores externos, a los que están expuestos la piel, y que se incluyen dentro del concepto de exposoma(58). La exposición solar crónica se considera el más relevante, siendo signos macroscópicos de fotoenvejecimiento la xerosis cutánea, léntidos solares, telangiectasias, arrugas, menor elasticidad y púrpura por fragilidad capilar. Histológicamente, es característica la acumulación y desestructuración de las fibras elásticas a nivel de dermis superficial, conocida como elastosis solar(59). La atrofia epidérmica y la fragmentación del colágeno son también signos de este fotoenvejecimiento.

Estos cambios fisiológicos y estructurales asociados con el envejecimiento contribuyen a que el proceso de cicatrización sea más lento y peor calidad.

Inmovilización: Los pacientes que se someten a períodos de inmovilización prolongada, particularmente aquellos con enfermedad de la médula espinal, tienen un mayor riesgo de desarrollar heridas crónicas. Son sobre todo heridas por presión, similares en patogénesis y apariencia a las heridas neuropáticas que ocurren en áreas de prominencia ósea como el sacro,

las rodillas, los maléolos de tobillo y los talones. La zona sacra es especialmente susceptible si además hay presencia de incontinencia urinaria-fecal. La inmovilización en ausencia de presión probablemente no sea un factor de riesgo para el desarrollo de la herida o para su cicatrización(39).

Tratamiento inmunosupresor: Durante el tratamiento inmunosupresor, los pacientes tienen mayor riesgo en el desarrollo de heridas crónicas por el retraso en la cicatrización y en la infección de la herida, esto se observa sobre todo en los pacientes trasplantados y oncológicos(60).

Quimioterapia: la administración de quimioterapia puede tener un efecto perjudicial en la cicatrización de heridas, específicamente a través de sus efectos directos o indirectos sobre el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)(61). La neurotoxicidad que puede producir la quimioterapia(62) puede contribuir a la aparición de las úlceras por presión.

Corticoides: Los corticoides se prescriben con frecuencia en pacientes oncológicos, para disminuir el dolor provocado por el proceso inflamatorio peritumoral y al crecimiento tumoral. La disregulación de la fase inflamatoria y posterior fase de fibroplasia, la neoangiogénesis, y deposición de colágeno puede explicar una mayor probabilidad de infecciones y dehiscencias postoperatorias, siendo este fenómeno más evidentes cuando se trata de tratamiento crónicos(63)(41). Retrasar su uso después de dicha fase inflamatoria podría evitar estos efectos adversos, así se ha demostrado en modelos animales a retrasar su administración a los 3 días de la intervención quirúrgica(63). Estos efectos por otro lado pueden ser en parte revertidos con el uso de retinoides tópicos o sistémicos. La vitamina A es una promotora de la angiogénesis, síntesis de colágeno, reepitelización y fibroplasia(41). Además, dado que estimulan la función inmunológica local, disminuye el riesgo de infecciones.

Radiación: hoy en día la radioterapia es una arma terapéutica fundamental en el proceso oncológico.

El efecto de los distintos tipos de radiación, a nivel celular, pueden ir desde la inducción de apoptosis celular hasta la necrosis extensa con dosis altas. Las fases inflamatoria y

proliferativa se ven afectadas de forma aguda. También se afecta la fase de remodelación en la que las metaloproteinasas (MMP) y sus inhibidores del tejido son fundamentales. Así, MMP-1 disminuye después de la radioterapia, lo que puede contribuir a una remodelación inadecuada de la matriz extracelular(64).

Los cambios agudos en el tejido conectivo incluyen inflamación y edema de paquetes de colágeno con deposición de un exudado fibroso por debajo de la epidermis. Esto es seguido por la sustitución gradual del tejido adiposo y la matriz extracelular por tejido fibroso denso y fibroblastos atípicos que no proliferan y que depositan un subtipo de colágeno inmaduro(60). A nivel vascular las arterias y arteriolas dentro del tejido irradiado sufren pérdida de elasticidad y esclerosis vascular progresiva, lo que resulta en hipoxia tisular crónica. Microscópicamente, se observa estrechamiento de la luz vascular por proliferación excéntrica miointimal, que puede progresar hacia la oclusión con trombos de fibrina. Esta situación de hipoxia se mantiene de forma crónica de tal forma que los tejidos irradiados invariablemente cicatrizan más lentamente. Finalmente a nivel macroscópico la piel irradiada en la etapa crónica es delgada, hipovascularizada, y que fácilmente puede presentar heridas ante mínimo traumatismo.

Nutrición: el proceso de reparación tisular depende del estado nutricional, es un proceso de alta exigencia energética. El fuerte aumento en la proliferación celular, la síntesis de proteínas y la actividad enzimática durante el proceso de curación requiere energía y de elementos para la reconstrucción. En condiciones normales, estos requerimientos los aportan las reservas energéticas y proteicas del paciente. Esto no es así cuando hay desnutrición. Además de macronutrientes básicos como proteínas o aminoácidos, los carbohidratos, las grasas y todos los electrolitos y micronutrientes son también necesarios.

La cicatrización de heridas se retrasa en sujetos que sufren de inanición debido a la falta de sustratos endógenos, además de por los siguientes factores(42):

- Retraso en la neovascularización y disminución en la síntesis de colágeno.
- Prolongación de la fase inflamatoria.
- Disminución de la función fagocítica de los leucocitos.
- Disfunción de los linfocitos T y B.

Diabetes: múltiples factores contribuyen al deterioro de la cicatrización de heridas en pacientes con diabetes. Estos incluyen disminución o disminución de la producción de factor de crecimiento, neoangiogénesis, función de macrófagos, síntesis de colágeno, función barrera de la epidermis, producción de tejido granulante, migración y proliferación de queratinocitos y fibroblastos, número de nervios epidérmicos, y desequilibrio entre la acumulación restos celulares, componentes de la matriz extracelular y su remodelación por las metaloproteinasas(65).

La diabetes es un factor de riesgo particularmente importante para el desarrollo de heridas crónicas por neuropatía y vasculopatía, que aumentan el riesgo de infección y retrasan la curación(65). La diabetes se asocia frecuentemente con enfermedad arterial periférica con aterosclerosis(66) desarrollándose a una edad más temprana y afectando más arterias distales debajo de la rodilla.

La neuropatía asociada con la diabetes afecta los nervios sensoriales, motores y autónomos(67). La neuropatía sensorial disminuye la percepción del dolor que es protector cuando se ha producido una lesión tisular. Además, la neuropatía autonómica hace que la piel se seque y sea susceptible a las fisuras, rasgaduras e infecciones de la piel debido a la pérdida de la función del sudor y la glándula sebácea.

Enfermedad vascular: la enfermedad arterial periférica disminuye el flujo sanguíneo arterial, disminuye el suministro de oxígeno y nutrientes a los tejidos y dificulta la eliminación de los productos de desecho metabólico.

La presencia de factores concomitantes como diabetes, insuficiencia renal, estado nutricional deficiente y presencia de infección, así como la extensión de la herida pueden requerir una mayor perfusión para su cura.

Las úlceras venosas de los miembros inferiores, en el contexto de insuficiencia venosa periférica crónica, representan aproximadamente el 40 por ciento de las heridas de la extremidad inferior [57].

Las válvulas venosas defectuosas, la obstrucción venosa o el defecto de funcionamiento de la "bomba venosa" conducen a un flujo anormalmente dirigido desde los sistemas venosos profundos a superficiales a través de las venas perforantes. El sitio más común de perforantes incompetentes es de 5 a 10 cm por encima del maléolo medial [61]. La congestión y la acumulación de sangre en las venas superficiales conduce a la hipertensión venosa, que, si se mantiene, se asocia con cambios histológicos en la pared venosa ocasionada por la activación de metaloproteinasas y por la presencia de células inflamatorias, citoquinas proinflamatorias que posteriormente se trasvasarán al espacio extravascular y que contribuyen a la disfunción de fibroblastos, con disminución de la síntesis de colágeno, y otros elementos estructurales de la matriz extracelular, también hay un aumento en la degradación del colágeno ya existente(68). Además se ha comprobado que el compromiso del flujo linfático es proporcional al grado de insuficiencia venosa(69).

1.2 CURCUMINA

La curcumina es un polifenol que se obtiene de las raíces de la planta *Curcuma longa*. Dicha planta es originaria de la India y sudeste Asiático. Usada en el tratamiento de múltiples patologías en el contexto de la medicina Ayurveda(70).

El interés en esta molécula reside en su amplio espectro de efectos biológicos (pleiotrópica): antioxidante(6), antifúngico(9), antibacteriano, antiviral, antiinflamatorio(7)(8)(16), antiamiloides, antifibrosis(17) hasta su uso como adyuvante en múltiples procesos oncológicos como el mieloma múltiple, cáncer de páncreas, colorrectal, pulmón, próstata y carcinoma epinocelular en cuello y cabeza(10)(11). En esta última indicación destacan los siguientes efectos:

- Inhibición del transportador ABC que aumenta la biodisponibilidad de agentes quimioterápicos.
- Parada de las fases G2/M del ciclo celular por procesos p-53 dependientes o independientes.

- Inhibición de angiogénesis, promoción de apoptosis que incluye inhibición de proteínas antiapoptóticas y de señales de supervivencia.

La molécula de la curcumina muestra una baja solubilidad en agua (hidrófoba). Su baja biodisponibilidad tisular, es uno de los principales factores limitantes a la hora de plantearla como terapia adyuvante y se debe principalmente a los siguientes factores(71):

Pobre absorción

Rápida degradación

Rápido metabolismo

Eliminación sistémica

Por otro lado la uniones que establece la molécula de curcumina con los lípidos presentes en la membrana celular junto a su condición hidrófoba, limita enormemente su paso al citoplasma(11).

En cuanto a su aplicación tópica, las altas dosis que se requerirían para tener efecto “in vivo”, pueden producir toxicidad(16).

Por todo esto, en los últimos años son múltiples las líneas de investigación en las que se pretende aumentar la biodisponibilidad, estabilidad y toxicidad específica frente a células neoplásicas.

Una de las primeras opciones consiste en combinar la ingesta de curcumina con otros productos fitoquímicos. La piperidina, que se extrae de la pimienta negra, al reducir de sulfotransferasa y UDP-sulfotransferasa en el aparato digestivo aumenta su absorción a nivel intestinal(6). Otros productos fitoquímicos que se han combinado con la curcumina son el resveratrol, quercetina, sulforafano, ácido retinoico y folatos en el tratamiento del cáncer de mama, colorectal, pulmón y cervix.

Las últimas líneas de investigación que se imponen actualmente para aumentar la biodisponibilidad de curcumina en los tejidos, tanto en su administración tópica como sistémica, es a través de la nanotecnología, encapsulándola en partículas de menos de 300 nm(17):

- Liposomas: son vesículas de fosfolípidos.
- Nanopartículas de polímeros: quitosano, D,L-láctido-co-glicólido, poli-etilenglicol, poli(n-butil) cianoacrilato, fibroína de sea, N-iso, propil acrilamida, y almidón modificado hidrofóbico.
- SLNs: compuestas por lecitinas o triglicéridos y que mantienen su estado sólido a temperatura corporal (37°C).
- Micelas de polímeros.
- Microesferas y microcápsula.
- Microemulsión: partículas de 1-100 micras, formadas por una mezcla isotrópica (con las mismas características en todas su superficie) de agua y aceites (ej: triacilglicerol), a las que se añade una sustancia surfactante (ej: Tween-20). Especialmente útil para el transporte de sustancias hidrofóbicas como la curcumina.
- Complejos de inclusión: entre 6-8 unidades de ciclodextrinas crean un centro lipofílico y una superficie exterior hidrofílica.
- Nanogeles: redes tridimensionales de polímeros con alta capacidad de absorción de agua, en su interior se puede encapsular a la curcumina.
- Nanocurcumina: la curcumina se disuelve con etanol y homogeneizada a alta presión con una ácido cítrico al 0,1% en solución acuosa.
- Dispersiones sólidas.

1.2.1 Curcumina y cáncer

En relación con el tratamiento adyuvante de tumores la curcumina ha demostrado múltiples efectos beneficiosos en distintos tipos de cáncer de forma directa como aumentando eficacia y tolerancia de otros tratamiento quimioterápicos(10):

CURCUMINA- CÁNCER DE MAMA

- Aumenta la sensibilidad de las células tumorales resistentes a doxorubicina, reduciendo su supervivencia.
- Efecto inmuno, hepato y cardioprotector frente a la doxorubicina.
- Se ha descrito que la doxorubicina a través de la activación de las vías TGF β y PI3K/AKT, puede promover la transición epitelio-mesénquima. La curcumina inhibe dichas vías de progresión tumoral.
- La administración oral de curcumina en un modelo de ratón “nude” con xenotransplante humano de tumor de mama, disminuyó la frecuencia de metástasis pulmonares: se confirmó la supresión en la expresión tumoral de metaloproteinasa-9, NF- κ B, y ciclooxigenasa-2 (COX-2).
- La combinación de curcumina con paclitaxel en un modelo experimental de cáncer de mama en ratones “nude” demostró: disminución de índice proliferativo, inducción de apoptosis, disminución en la expresión de metaloproteinasa-9 y de la carga tumoral.
- La combinación con tamoxifeno en células MCF-7 resistentes a tamoxifeno, resultó en la reversión de dicha resistencia.
- La combinación con gemcitabina en células MCF-7 y MDA-MB-231, resultó en aumento en inducción de apoptosis y menor índice proliferativo, constatándose la supresión de la activación de NF- κ B inducida por la propia gemcitabina.
- La combinación de curcumina con mitomicina-C aumentó el efecto antiproliferativo de ésta sobre células MCF-7 de cáncer de mama y disminuyó la toxicidad inducida por las vías ERK/p38MAPK.

CURCUMINA-CÁNCER COLORRECTAL

- Combinándolo con 5-Fluoracilo: incremento de la expresión de proteínas proapoptóticas (caspasa-8,9,3, PARP y BAX) y disminución de la expresión de proteínas antiapoptóticas (BCL-xL) y proliferativas (ciclina D1).
- Disminución en la expresión de COX-1,2 y de metaloproteinasa 2,9.

CURCUMINA LINFOMA-LEUCEMIA

- Aumento de la captación de metotrexato y ácido fólico en células KG-1.
- La combinación de curcumina y doxorubicina en nanopartículas evitó la aparición de quimiorresistencia inhibiendo la expresión de MDR1 y Bcl-2 células K562 (células similares a blastos de la leucemia mieloide crónica).
- A través de la inhibición dosis dependiente de JAK, fosforilación de STAT, ciclina D1, cdk1, Cdc25c, XIAP, y survivina: supresión del crecimiento de células T transformadas por HTLV-1, y líneas celulares MT-2, HuT-102, SLB-1.
- Bloqueo de la expresión de STAT5, bloquea la activación de las células WEHI-3b y su transformación en Leucemia Mieloide Crónica.
- Inducción de la apoptosis a través de la inhibición de la telomerasa II, en líneas celulares TK-1° y UACC-62.
- La administración oral de curcumina (50-200 mg/kg) en ratones “nude”, inhibe el desarrollo de leucemia por xenotrasplante de células HL-60 y de linfoma por xenotrasplante de células SGC7901.
- La curcumina inhibe tanto “in vivo” como “in vitro”, el crecimiento de las células de linfoma B, al disminuir la activación de la vía AKT y de la actividad tirosinquinasa.
- Ha disminuido la expresión del gen Wnt1 en 35 de 70 muestras obtenidas de leucemias infantiles.

CURCUMINA Y CÁNCER DE PULMÓN

- Micelas cargadas con doxorubicina y curcumina han demostrado en modelos de cáncer pulmonar la respuesta antitumoral.
- En ratones “nude” con xenotrasplante de cáncer de mama, la ingesta de curcumina redujo la incidencia de metástasis pulmonares por inhibición de NF- κ B, MMP-9 y COX-2.
- Reduce la capacidad de invasión de las células CL1-5 y además inhibe la proliferación de las células NCI-H460 y H520.
- Reducción de resistencia a cisplatino en cáncer de pulmón no microcítico.

CURCUMINA Y CÁNCER DE CÉRVIX

- Inhibición de la activación de NF- κ B por el tabaco y de la expresión de COX-2, provocando la apoptosis de la línea celular SCC-25.
- Efecto radiosensibilizador en línea celular SCC-25.
- La ingesta de curcumina 0,5-12 gr/día en pacientes con historia de cáncer oral durante 3 meses, hubo una “mejora histológica” en el 29% de los pacientes.

CÉLULAS MADRE TUMORALES

La curcumina sola o en combinación con la piperina, ha demostrado que puede afectar a la población de células madre tumorales, que son la subpoblación más quimio y radioresistente.

Dada la pleiotropia de la curcumina son múltiples los ensayos clínicos que se están planteando en múltiples campos de la medicina. A día de hoy hay al menos 40 ensayos clínicos en fase de reclutamiento

(https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=curcumin&Search=Apply&recrs=a&age_v=&gndr=&type=&rslt=), 15 en marcha

(https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=curcumin&Search=Apply&recrs=d&age_v=&gndr=&type=&rslt=) y 131 ya finalizados

(https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=curcumin&Search=Apply&recrs=e&age_v=&gndr=&type=&rslt=).

Este hecho marca el interés actual de acoplar la curcumina en el tratamiento con quimioterapia y/o radioterapia, potenciando y complementando los tratamientos actuales, además de mejorar su perfil de seguridad.

2.- JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Uno de los problemas que nos encontramos en la práctica clínica es la cicatrización de las soluciones de continuidad cutáneas, sobre todo en los tratamientos de pie diabético, úlceras de distinta etiología, y también últimamente en la reparación de grandes defectos cutáneos tras intervenciones quirúrgicas que necesitan injertos, colgajos y cierres por segunda intención. Esta cicatrización muchas veces, se dilata en el tiempo con el consiguiente riesgo de sufrir infecciones para el paciente y junto con la presencia de diversos compuestos que parecen acortar el tiempo de cicatrización, nos ha llevado a plantear un modelo experimental de solución de continuidad y estudiar el proceso reparativo con dichos compuestos, planteando la siguiente hipótesis.

3.- HIPÓTESIS

Dadas las características pleiotrópicas de la curcumina, planteamos aplicar en distintas presentaciones que aumentan su biodisponibilidad (6), utilizando para ello dos modelos de rata una diabética y otra no diabética, para conseguir disminuir el tiempo y mejorar la calidad de la cicatrización.

Para ello, nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

3.1 OBJETIVO GENERAL

Comprobar el efecto del tratamiento tópico de la herida quirúrgica con curcumina en diferentes formulaciones (nanopartículas y glicerosomas cargados con curcumina solamente y envueltos con ácido hialurónico) sobre el proceso de cicatrización cutánea en ratas sanas y diabéticas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar el efecto de la diabetes inducida por estreptozotocina sobre la cicatrización en heridas cutáneas.

- Determinar el efecto de los diferentes tratamientos mediante el análisis de imagen de las lesiones macroscópicas.

- Realizar un estudio histomorfométrico en muestras tisulares teñidas con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson valorando la reepitelización, angiogénesis, formación de tejido de granulación, colagenización e inflamación en 3 tiempos de estudio diferentes en los distintos grupos experimentales.

- Valorar la proliferación celular (PCNA), angiogénesis (CD-31) y actividad de metaloproteinasas (MMP-9) en las distintas fases de la cicatrización mediante estudio inmunohistoquímico, en los grupos de estudio más representativos.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 ANIMALES

Para la realización de este estudio se utilizaron 63 ratas Sprague-Dawley macho, con un peso entre 140-184 gramos desde el inicio de estudio hasta su sacrificio. Los animales fueron mantenidos en jaulas de metacrilato de 40x30 cm por cada 3 animales, con cubierta metálica de rejillas y con espacio para alimento y agua. Las jaulas se colocaron en una sala donde se mantuvieron periodos de luz-oscuridad de 12 horas alternativamente. La temperatura media a la que estuvieron expuestos los animales fue de 22 grados Celsius, con una humedad relativa de 40-70%. El aporte de comida y bebida fue "ad libitum". La localización de las ratas ha sido en el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia. Los animales fueron manipulados siguiendo las normas de la Unión Europea sobre la protección de animales utilizados en experimentación Directiva 2010/ 63/ UE, así como el Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero de 2013. Además, de acuerdo con la política de investigación adoptada en la Universidad de Murcia, se solicitó el permiso del Comité de Bioética de la Universidad de Murcia, consiguiendo la aprobación para nuestro proyecto.

4.2 NANOPARTÍCULAS DE CURCUMINA

El tratamiento constituido por curcumina fue desarrollado y distribuido en base al método reglamentario establecido por Dipartimento de Scienze della Vita e dell' Ambiente, Sezione di Scienze del Farmaco, Universidad de Cagliari, Cerdeña, Italia.(72)

Se prepararon liposomas y glicerosomas vacíos o cargados con curcumina mediante la hidratación de la película lipídica en dos pasos. En una preparación típica P90H (300 mg), se hidrató colesterol (10 mg) y curcumina (0,5 mg/ml) cuando fue apropiado con 5 ml de agua (para obtener liposomas) o glicerol / agua (10, 20, 30% v / v) solución (para obtener glicerosomas) y la dispersión concentrada se agitó mecánicamente durante 1 hora a temperatura ambiente(66). Luego, se añadieron otros 5 ml de agua o solución de glicerol / agua (10, 20, 30% v / v) y la dispersión se agitó durante una hora más. A continuación, las suspensiones obtenidas

se sonicaron (20 ciclos 5 s ON y 2 s OFF) usando un desintegrador ultrasónico Soniprep 150 (MSE Crowley, Reino Unido).

Las dispersiones se purificaron del fármaco no incorporado mediante diálisis exhaustiva. Cada muestra (2 ml) se colocó en una membrana Spectra / Por1 (corte de PM de 12-14 kDa, tamaño de poro de 3 nm; Spectrum Laboratories Inc., DG Breda, Países Bajos) y se dializó contra agua destilada (2 l) a 25°C. C durante 2 h, que fueron suficientes para eliminar el fármaco no encapsulado. La eficiencia de encapsulación del fármaco (EE%) se expresó como el porcentaje de la cantidad de fármaco utilizado inicialmente frente a la encontrada después de la diálisis. La cantidad de fármaco se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) después de la rotura de las vesículas con metanol (dilución 1: 100). El análisis se realizó a 227 nm usando un cromatógrafo Alliance 2690 (Waters, Milán, Italia) equipado con un detector de matriz de fotodiodos y un aparato de integración de computadora (Millennium 32) usando una columna Symmetry C18 (3,5 m, 4,6 100 mm, Waters). La fase móvil fue una mezcla de agua y acetonitrilo (30/70 v / v), a un caudal de 0,5 ml / min. Las partículas cargadas con curcumina fueron añadidas lentamente a una solución de ácido hialurónico de 250 kDa (Creative PEG Works) y agua destilada (5 mg/ml).

4.3 AGENTES

Nanopartículas: Se adquirió hialuronano sódico (AH) de bajo peso molecular (200-400 kDa) de DSM Nutritional Products AG Branch Pentapharm (Aesch / Suiza). Se adquirieron curcumina (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona) y todos los demás productos de grado analítico de Sigma (Milán, Italia).

Estreptozotocina: Sigma Aldrich©MerckGaA Darmstadt, Alemania).

Inmunohistoquímica: Los anticuerpos primarios utilizados han sido monoclonales contra PCNA, CD31, TIMP-1 y MMP9 (Dako S.A, Barcelona, España).

4.4 MÉTODO

4.4.1 Modelo en ratas sanas

Se dispuso de 45 ratas no diabéticas a las que se les realizó 4 heridas por animal (180 heridas en total), con un punch de 8 mm. Los animales fueron aleatorizados en los siguientes grupos (G.):

- Grupo 1: Curcumina en liposomas
- Grupo 2: Curcumina en glicerosomas.
- Grupo 3: Curcumina en liposomas+ ácido hialurónico(AH).
- Grupo 4: Curcumina en glicerosomas+ ácido hialurónico(AH)
- Grupo 5: Grupo control (sin tratamiento)

CRONOGRAMA:

GRUPO	DÍA 0 (23/10)	Día 3 (2/11)	Día 7 (6/11)	Día 14 (9/11)
GRUPO 1 N=9 Curcumina en liposomas	Cirugía 9 animales Fotos	Sacrificio de 3 animales Fotos	Sacrificio 3 animales Fotos	Sacrificio de 3 animales (todos) Fotos
GRUPO 2 N=9 Curcumina en glicerosomas	Cirugía 9 animales Fotos	Sacrificio de 3 animales Fotos	Sacrificio 3 animales Fotos	Sacrificio de 3 animales (todos) Fotos
GRUPO 3 N=9 Curcumina en liposomas+AH	Cirugía 9 animales Fotos	Sacrificio de 3 animales Fotos	Sacrificio 3 animales Fotos	Sacrificio de 3 animales (todos) Fotos
GRUPO 4 N=9 Curcumina en glicerosomas+AH	Cirugía 9 animales Fotos	Sacrificio de 3 animales Fotos	Sacrificio 3 animales Fotos	Sacrificio de 3 animales (todos) Fotos
GRUPO 5 N=9 Control sin nada	Cirugía 9 animales Fotos	Sacrificio de 3 animales Fotos	Sacrificio 3 animales Fotos	Sacrificio de 3 animales (todos) Fotos

4.4.2 Modelo en ratas diabéticas

Con posterioridad a la obtención de los datos del objetivo principal en ratas sanas se decidió añadir 2 grupos de cicatrización comprometida (18 ratas diabéticas) con las que se llevó a cabo aleatorización para tratar con curcumina en glicerosomas recubiertos de ácido hialurónico dado que fue la formulación que había presentado diferencias significativas con el resto de grupos. Los grupos también estaban formados por 9 animales cada uno y se sacrificaron de 3 en 3 en 3 tiempos (mismo cronograma que la ratas no diabéticas).

- Grupo 6: Ratas diabéticas sin tratamiento (control).
- Grupo 7: Ratas diabéticas tratadas con curcumina en glicerosomas recubiertas con ácido hialurónico.

Para la inducción de la diabetes, los animales fueron sometidos a dosis de 30mg/kg de estreptozotocina disuelta en tampón citrato(67), administrada por vía intraperitoneal. Se procedió a la administración en 3 pulsos con un intervalo de 48 horas en cada uno de ellos. El día después de cada dosis se realizó un test de glucemia capilar. Se esperaron 4 semanas para realizar las heridas en las ratas diabetizadas.

4.4.3 Realización de heridas cutáneas

A cada de uno de los animales se le realizó 4 heridas cutáneas con un punch de 8mm (previo afeitado de la espalda) bajo anestesia general inhalatoria con isoflurano y anestesia local (inyección subcutánea) con lidocaína al 2%. Los fragmentos de piel se extrajeron con bisturí, incluyendo epidermis y dermis y parcialmente tejido celular subcutáneo, no se llegó a plano fascial. El día de este procedimiento es considerado el punto de inicio del estudio para su posterior análisis macro-microscópico así como análisis estadístico.

4.4.4 Administración del tratamiento con curcumina

Los tratamientos se aplicaron diariamente de forma tópica mediante una pipeta Pasteur para cubrir toda la herida, sacando a cada animal de su jaula. A continuación cada animal se devolvió a su jaula hasta la siguiente aplicación del tratamiento.

4.4.5 Recogida de muestras

En el procedimiento de recogida de muestras (días 0,3,7 y 14) se realizó un control del estado físico general del animal, además de anotar el peso de cada animal. La obtención del material para estudio macro y microscópico se realizó a los 3, 7 y 14 días (fotografías digitales y muestras tisulares respectivamente).

4.4.6 Sacrificio

3 animales de cada grupo fueron sacrificados mediante cámara de CO₂ a los 3, 7 y 14 días tras la cirugía. En cada animal sacrificado se realizó fotografía digital de las heridas y posteriormente se tomaron las muestras cutáneas para su posterior inclusión en formol y parafina para el estudio anatomopatológico de las heridas. Los animales no sacrificados eran sedados para registro fotográfico el mismo día.

4.4.7 Procedimiento histopatológico

Las muestras tisulares fueron fijadas en formol neutro tamponado al 4% al menos durante 48 horas, incluidas en parafina por el método habitual y cortadas a 3 micras para su posterior tinción:

a) Hematoxilina Eosina

Se desparafiniza la muestra y se hidrata con pasos sucesivos en alcoholes de concentración decreciente para continuar con el siguiente procedimiento:

- Hematoxilina de Harris 20”.
- Agua de Lítio, para contraste 30”.
- Eosina 20”.

Secado y montaje previa deshidratación en alcoholes de concentración creciente.

b) Tinción para fibras elásticas de Tricrómico de Masson.

Después de desparafinar e hidratar las muestras, se realizaron los siguientes pasos:

- Baño de 30 minutos con Hematoxilina de VerHoeff.
- Lavado con agua destilada.
- Cloruro férrico al 1%.
- Lavado con agua destilada.
- Baño de pirofucsina.
- Deshidratación.
- Aclaramiento con xilol previo al montaje con cubreobjetos.

Esta técnica permite la tinción de fibras colágenas y elásticas. El colágeno, que capta el colorante ácido, se tiñe de rojo, las fibras elásticas de negro, así como los núcleos celulares, y el citoplasma de un color amarillento.

4.4.8 Procedimiento inmunohistoquímico

El estudio inmunohistoquímico fue realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Reina Sofía de Murcia. Para ello se seleccionaron cortes de todas las lesiones cutáneas de animales tratados y de control.

En primer lugar se hizo la desparafinización de las muestras en el equipo OMNIS-DAKO (Agilent) y se realizó un pretratamiento con EnVision FLEX, Low pH (Ref. GV805), (recuperación del epítipo inducida por calor (HIER) durante 30 min. El Anticuerpo listo para

su uso estuvo incubando durante 20 min, con un control negativo FLEX Negative Control, Rabbit (Ref. GA600) al mismo tiempo.

La visualización se realizó mediante EnVision FLEX (Ref. GV800) + EnVision FLEX+ Rabbit LINKER (Ref. GV809) en un bloque durante 3 min de Link: 10 min; polímero: 20 min; y cromógeno: 5 min. Posteriormente se realizó una contratinción con Hematoxilina (Ref. GC808) con un tiempo de 3 min de incubación. Después de la tinción, deshidratamos, enjuagamos y montamos los portaobjetos con un medio de montaje permanente (Eukit).

Todos los pasos de desparafinización, rehidratación y recuperación antigénica, incubación del anticuerpo, lavados y método de visualización se realizan en el instrumento Dako Omnis.

Los anticuerpos primarios utilizados han sido monoclonales contra PCNA, CD34, TIMP-1 y MMP9 (Dako) a dilución 1:200 durante 40 minutos.

PCNA: El PCNA es una proteína multifuncional de 36 kDa que se encuentra expresada en la fase última de G1 y en el primer tercio de la fase S en aquellas células dentro de fases activas del ciclo celular. Sin embargo, ahora ha quedado claro que el PCNA es un componente esencial de la replicación del ADN, actuando como proteína auxiliar de la ADN polimerasa necesaria para la replicación del ADN y reparación del ADN dañado. La ausencia o los niveles bajos de PCNA funcional en un tejido en reparación indicarían una falta de la misma. Su sobreexpresión indicaría un incremento en la actividad reparativa en esos tejidos.

CD31: es una glicoproteína de 110 kD situada en la superficie de células endoteliales que interviene en la diapédesis como una molécula de adhesión, por lo que está expresada en células endoteliales de todos los tejidos e igualmente es un marcador de célula “stem” que sobre todo en la médula ósea hematopoyética constituye un reservorio para la restauración de la hematopoyesis. En nuestro estudio, la cicatrización por segunda intención (con bordes separados), requiere de una proliferación de vasos, miofibroblastos y migración de células epiteliales, por lo que con este anticuerpo tratamos de demostrar la proliferación y presencia de yemas vasculares que al marcarlas inmunohistoquímicamente podemos realzar una cuantificación vascular.

MMP9: enzima que se encuentra asociada a los procesos de angiogénesis, crecimiento y migración celular y apoptosis, estando relacionada con la degradación del colágeno tipo IV de la membrana basal, colágenos V, XI y XIV. También tiene como sustratos a la elastina y fibrina entre otros(68). Para su detección hemos usado un anticuerpo policlonal del tipo IgG. (RabMAb antibody, ab76003) que detecta a una proteína de 105 Kd en tejidos humanos.

TIMP-1 que inhibe la mayor parte de las MMPs. Para su detección hemos usado el anticuerpo monoclonal, clon VT7 (Dako Diagnosticos, S,A, Barcelona, España) a una dilución de 1:400.

4.4.9 Variables del estudio

1. **Áreas de lesión.** Análisis de imagen macroscópico: Tras realizar las heridas quirúrgicas se hicieron fotografías digitales que fueron analizadas mediante el programa imageJ tras calibración morfológica, para determinar el área ocupada por las lesiones y compararla entre los distintos grupos en los diferentes tiempos (días 3, 5 y 7). Para poder obtener las imágenes en los animales vivos, se les sedaba con isofluorano.

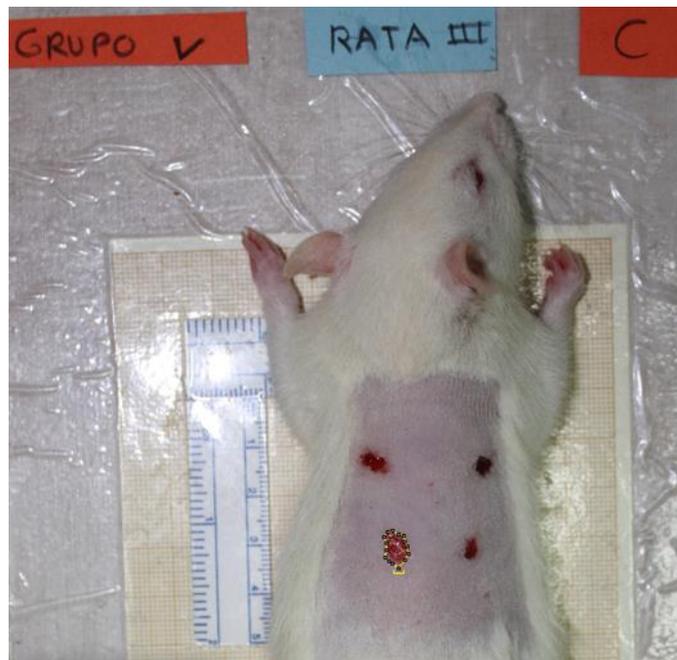


Imagen 8: Medición de área lesional mediante ImageJ en un animal perteneciente al grupo control.



Imagen 9: "Listado de resultados de las áreas de lesión."

2. **Estudio histopatológico:** Seguimos la clasificación de Abramov(69) (escala de 0 a 3 de 5 aspectos histopatológicos: epitelización, angiogénesis, tejido de granulación, depósito de colágeno e inflamación). Si bien finalmente el parámetro de **epitelización** lo medimos objetivamente de borde a borde de la herida, obteniendo una variable cuantitativa continua de la distancia entre bordes (micras).

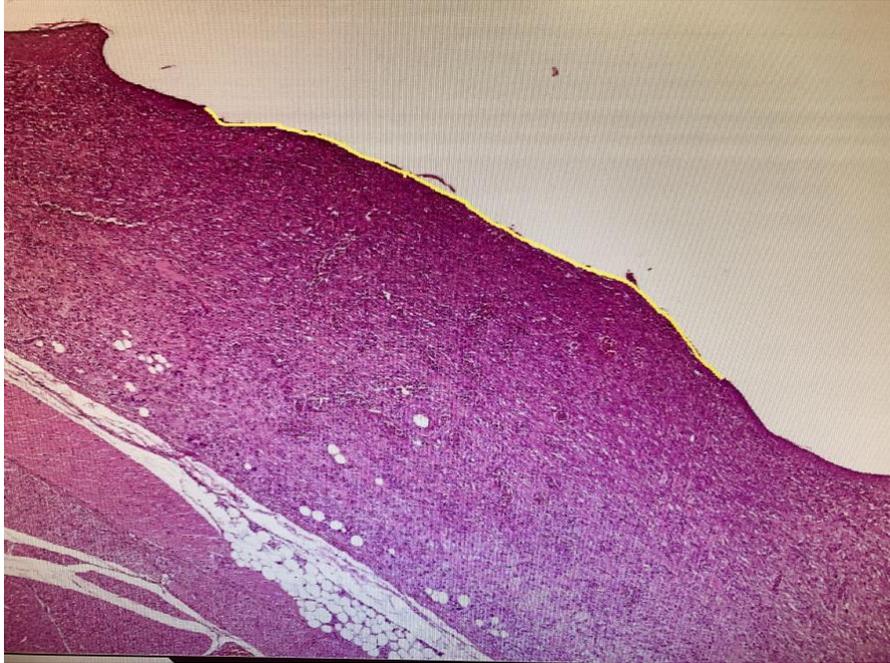


Imagen 10: Superficie donde se midió la longitud de la herida. Hematoxilina-eosina 40x.

La variable **inflamación** fue definida como la presencia de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos, células plasmáticas e histiocitos en la herida.

El **grado de maduración del tejido de granulación** se valoró atendiendo la disposición de los fibroblastos, considerándose que eran maduros cuando tenían un núcleo pequeño y alargado, disponiéndose en bandas paralelas, las formas inmaduradas eran aquellas con forma “estrellada” y en menor grado epiteloide.

La **neovascularización** debido a que es un parámetro importante y la clasificación anterior solamente recoge el número pero no el tamaño de los vasos, hicimos un estudio histomorfométrico de los vasos, dibujando el contorno de los vasos presentes en 3 áreas de 100 micras cogidas al azar de la zona de la herida.

Con respecto al **depósito de colágeno** se valoró tanto la cantidad como el grosor y disposición de las fibras de colágeno.

Variable	Score			
	0	1	2	3
Acute inflammation	Nene	Scant	Moderate	Abundant
Chronic inflammation	Nene	Scant	Moderate	Abundant
Granulation tissue amount	Nene	Scant	Moderate	Abundant
Granulation tissue fibroblast maturation	Inmature	Mild maturation	Moderate maturation	Fuly matured
Collagen deposition	Nene	Scant	Moderate	Abundant
Reepithelialization	Nene	Partial	Complete but immature or thin	Complete and mature
Neovascularization	Nene	Up to Five vessels per HPF	6-10 vessels per HPF	More than 10 vessels per HPF

HPF, high-power

Reproducido de: Abramov Y, Golden B, Sullivan M, et al. Histologic characterization of vaginal vs. abdominal surgical wound healing in a rabbit model. Wound Repair Regen. 2007;15(1):80-86.

- 3. Angiogénesis:** Mediante análisis de imagen (imageJ) se realizó la cuantificación de área ocupada por vasos sanguíneos del área de reparación tisular. En primer lugar se realizaron las capturas de imagen de las zonas de estudio a un aumento 20x. Posteriormente procedimos a su calibración morfológica y se procedió a perimetrado a mano alzada de cada uno de los vasos identificados. El programa calculaba automáticamente el perímetro y área total en cada imagen y los datos numéricos se volcaban a una hoja Excel. Este parámetro se evaluó únicamente en el grupo de ratas diabéticas.

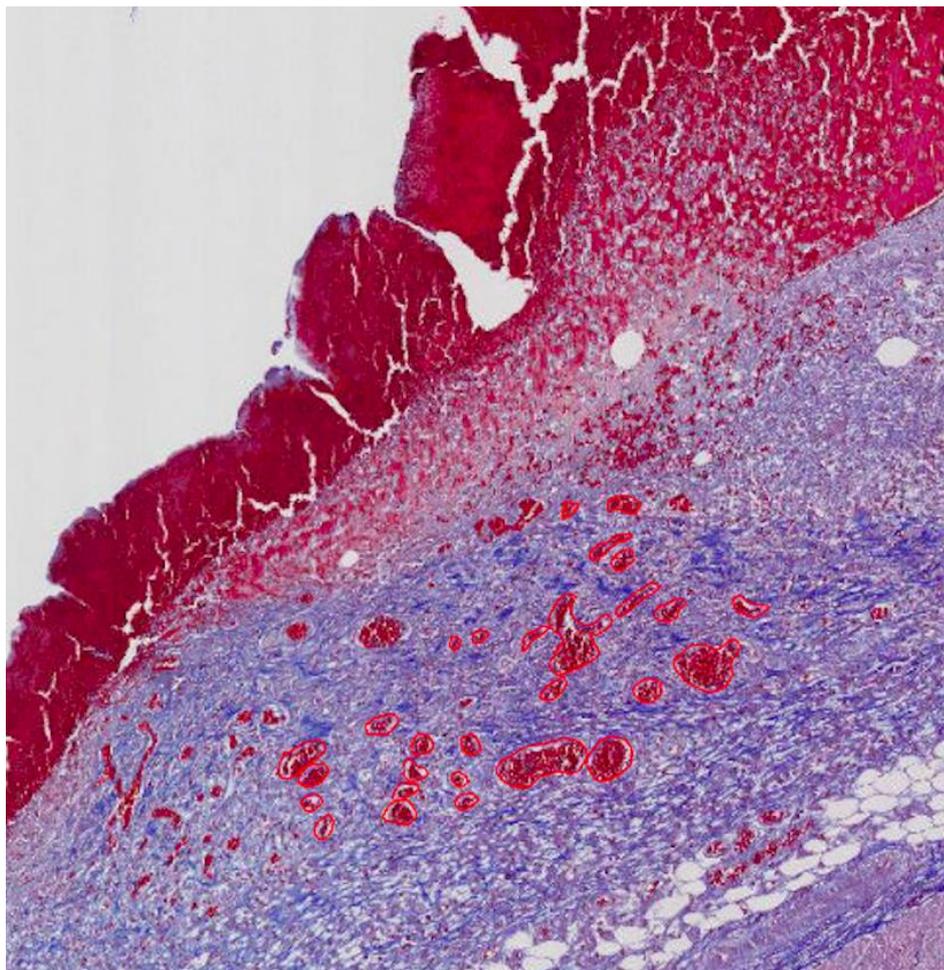


Imagen 11: “Análisis de área de angiogénesis mediante ImageJ”. Tricómico de Masson 125x.

4. **Inmunohistoquímica con PCNA:** Se hizo una valoración cuantitativa de los núcleos positivos a este anticuerpo en los bordes de la herida. Con un programa de análisis de imagen (ImageJ) se seleccionó el borde epidérmico de la herida, se contó el área total del campo, el área ocupada por núcleos y el área ocupada por núcleos positivos. Esta técnica se hizo de los cristales de rata sana y rata diabética (control sano y control diabético, no en las ratas a las que se les aplicó tratamiento).
5. **Inmunohistoquímica con TIMP-1, MMMP-9 y CD-34:** Se hizo una valoración semicuantitativa de estos 3 anticuerpos, asignando un número de 0 a 3 según el marcaje (0: nada, 1: leve, 2: moderado, 3: severo). Se hizo con el control diabético, control sano y ratas diabéticas tratadas con el fármaco que mejor había funcionado (curcumina en glicerosomas con ácido hialurónico).

4.4.10 Método estadístico

Los datos fueron analizados usando el software estadístico SPSS versión 20.0 (SPSS® Inc., Chicago, IL, USA). Se hizo un estudio descriptivo de cada variable. Para las variables cuantitativas se realizó el test ANOVA y la prueba de Klomogorov-Smirnow, para determinar si las variaciones eran homogéneas en cada caso. Las diferencias fueron consideradas como significativas cuando el valor de probabilidad (p-valor) era ≤ 0.05 .

5.- RESULTADOS

5.1 ÁREAS DE LESIÓN

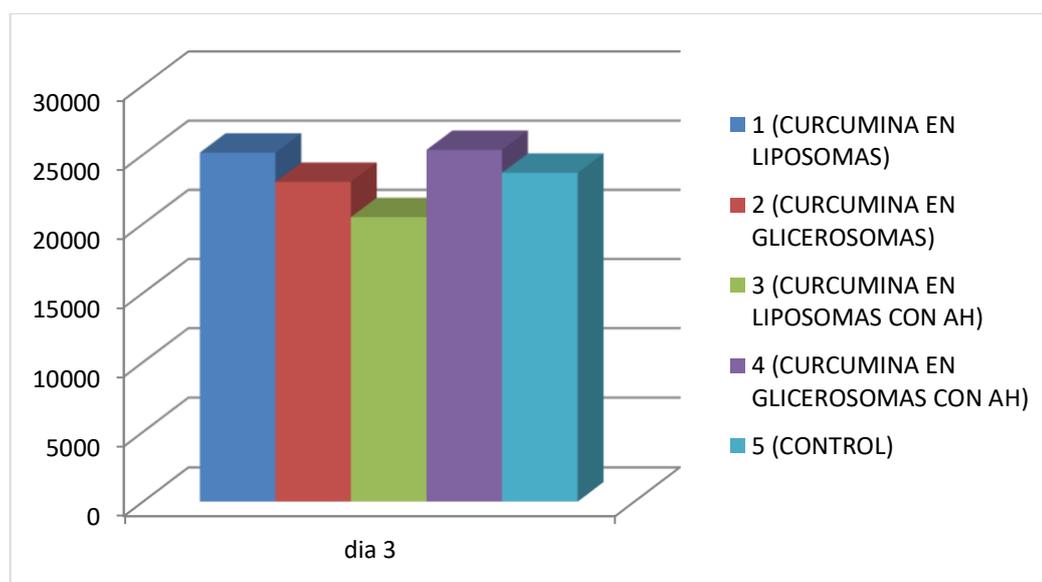
5.1.1 Ratas sanas

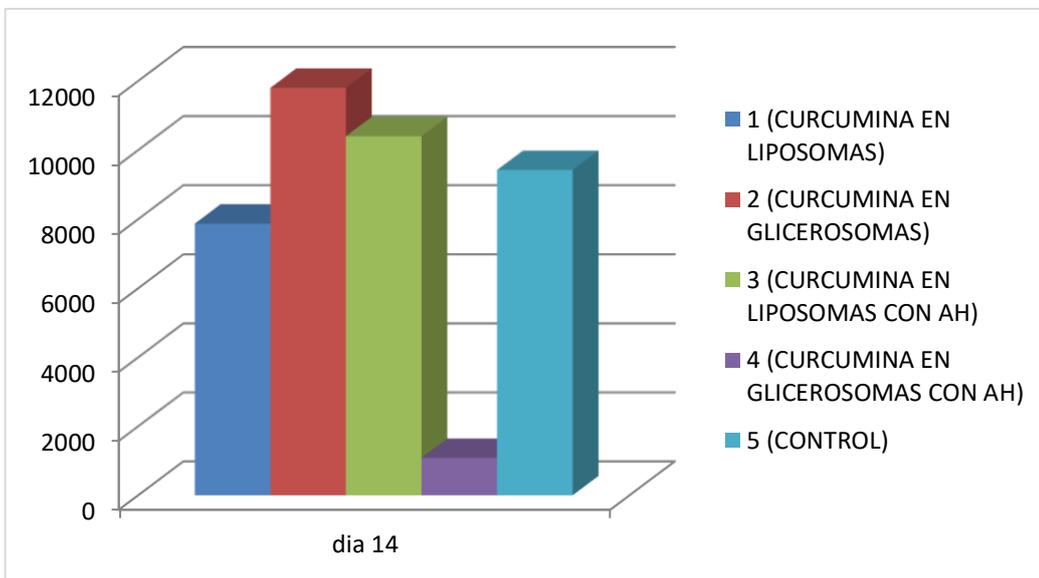
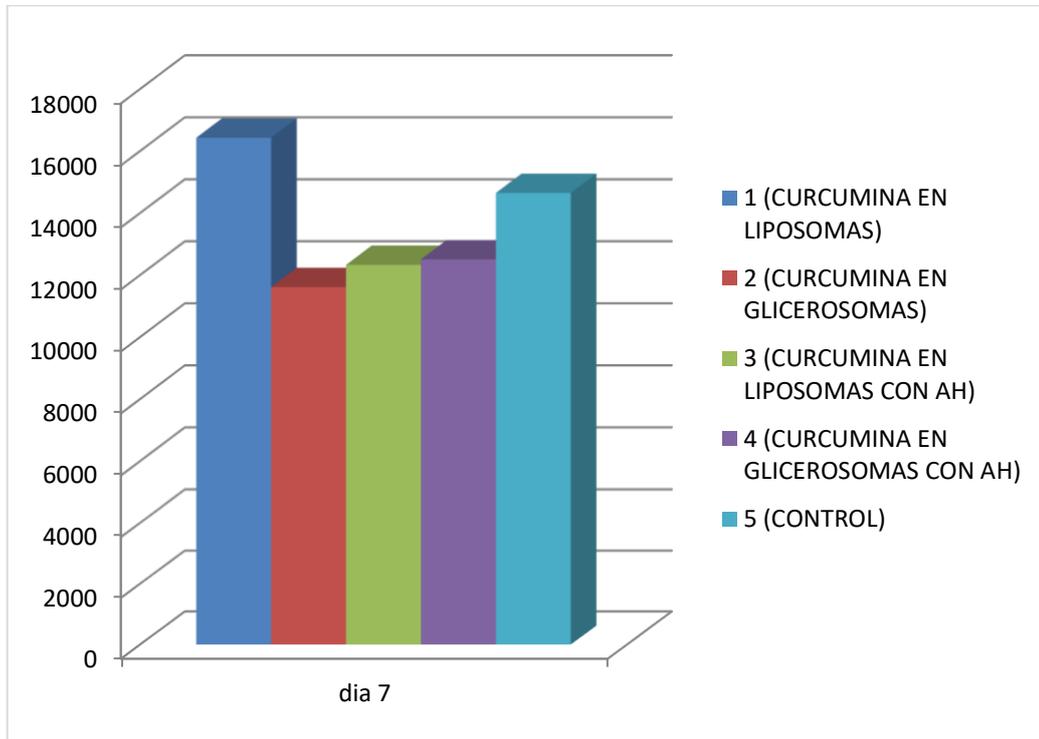
En el estudio de las áreas de lesión no encontramos diferencias estadísticamente significativas (d.e.s) entre los grupos en el día 3, pero sí en los días 7 y 14, sobre todo en este último, donde el cierre de la herida en los animales del grupo 4 (glicerosomas con curcumina y AH) era mucho más evidente que en el resto de grupos ($p < 0,05$).

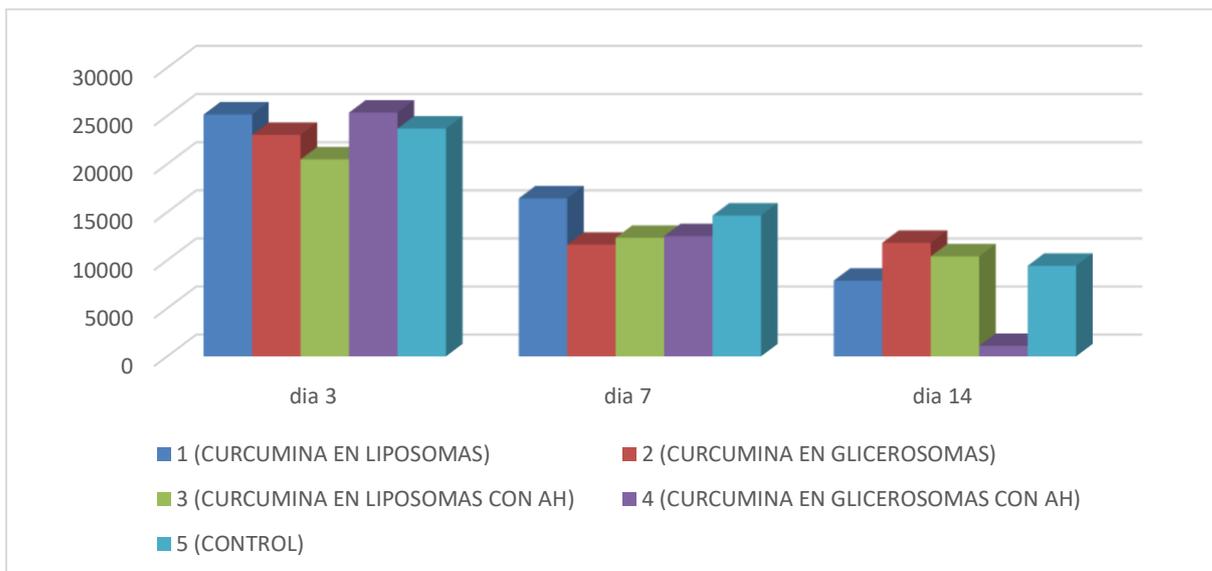
	Día 3	Día 7	Día 14
	MEDIA±SD	MEDIA±SD	MEDIA±SD
1.-Curcumina en Liposomas	25138,83±10635,65	16429,04#±8224,33	7872,417±3533,31
2.-Curcumina en Glicerosomas-	23020,36±8315,59	11613,58±5457,78	11801,75±6253,41
3.- Curcumina en Liposomas+AH	20478,19±7888,25	12328,13±4974,66	10401,45±3061,73
4.- Curcumina en Glicerosomas+AH	25338,33±8278,31	12506,88±6312,58	1083,433*±1042,52
5.- Control	23680,25±11750,54	14647±6566,34	9421,545±7932,60

#: Diferencias estadísticamente significativas con grupo 2 (p -valor $< 0,05$)

*: Diferencias estadísticamente significativas con grupos 1, 2, 3 y 5 (p -valor $< 0,05$)



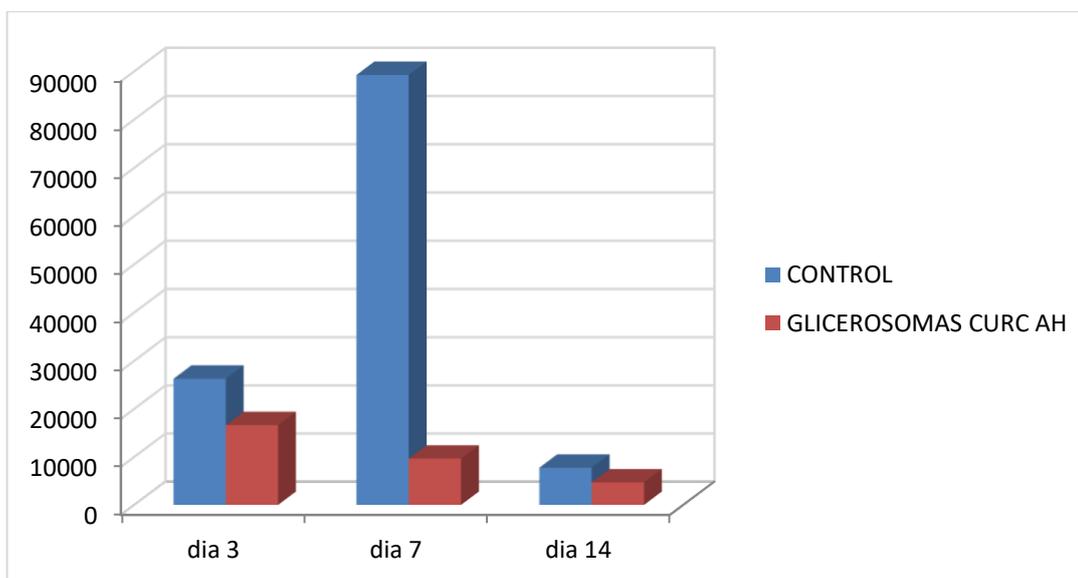




5.1.2 Ratas diabéticas

En el modelo de ratas diabéticas observamos un mayor cierre de la herida en los días 3 y 7 en el grupo 2 respecto al control aunque no existían d.e.s.

	Día 3	Día 7	Día 14
	MEDIA±SD	MEDIA±SD	MEDIA±SD
1.- Control	26249,94±9496,89	8921,5±2669,25	7742,93±4201,1
2.- Curcumina en Glicerosomas+AH	16595,39±4091,75	9634,37±4973,83	4250,99±2574,56



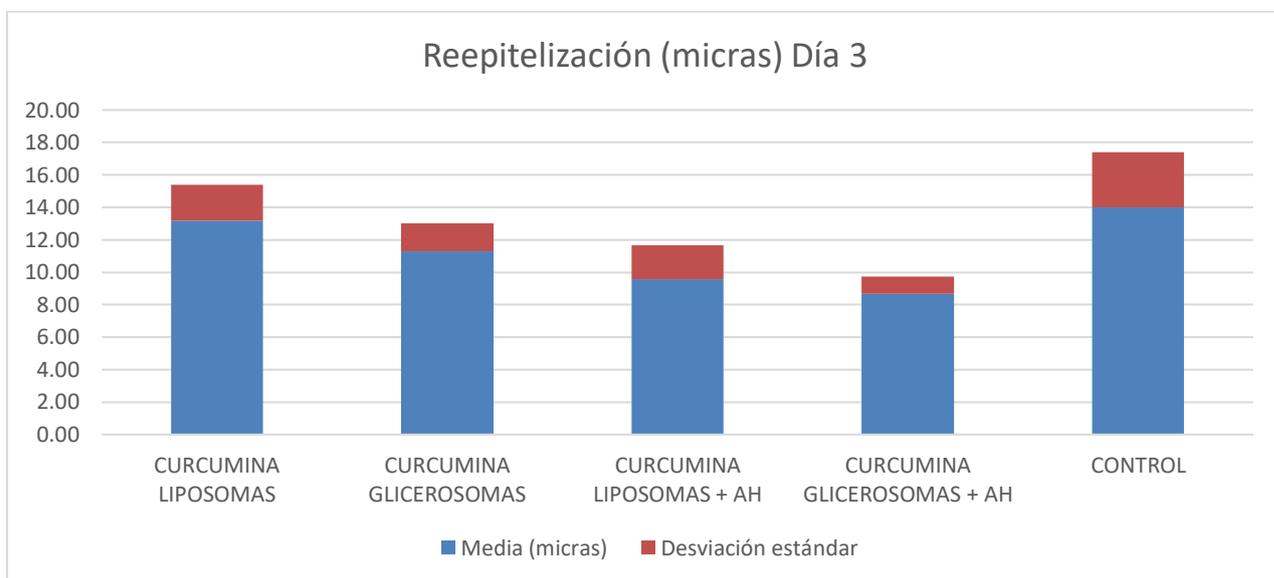
5.2 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

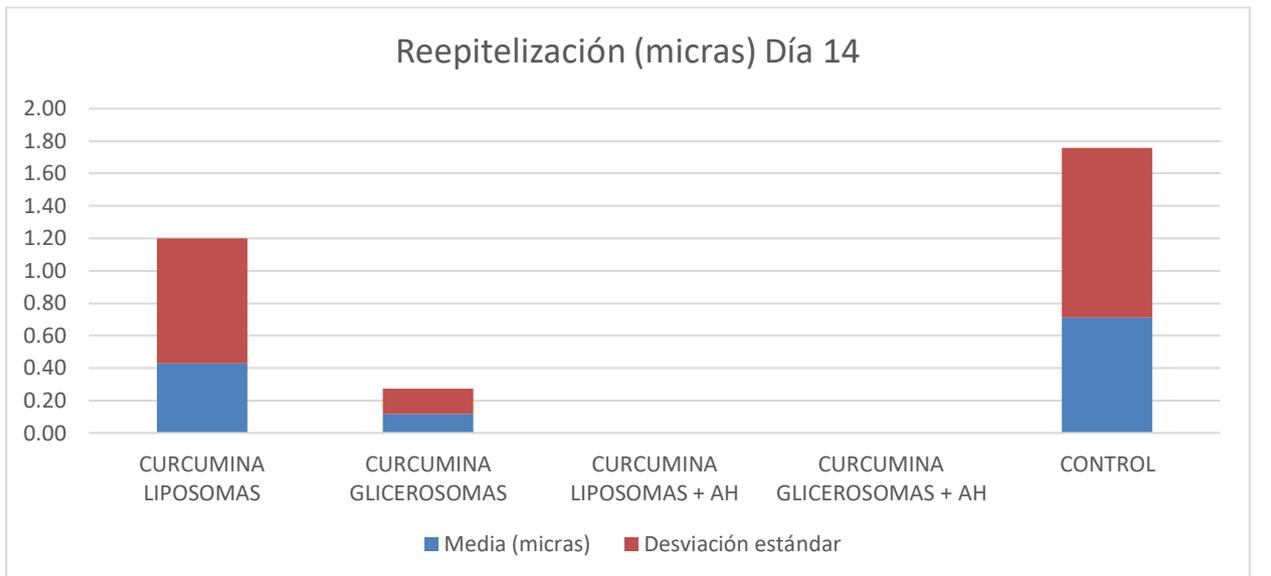
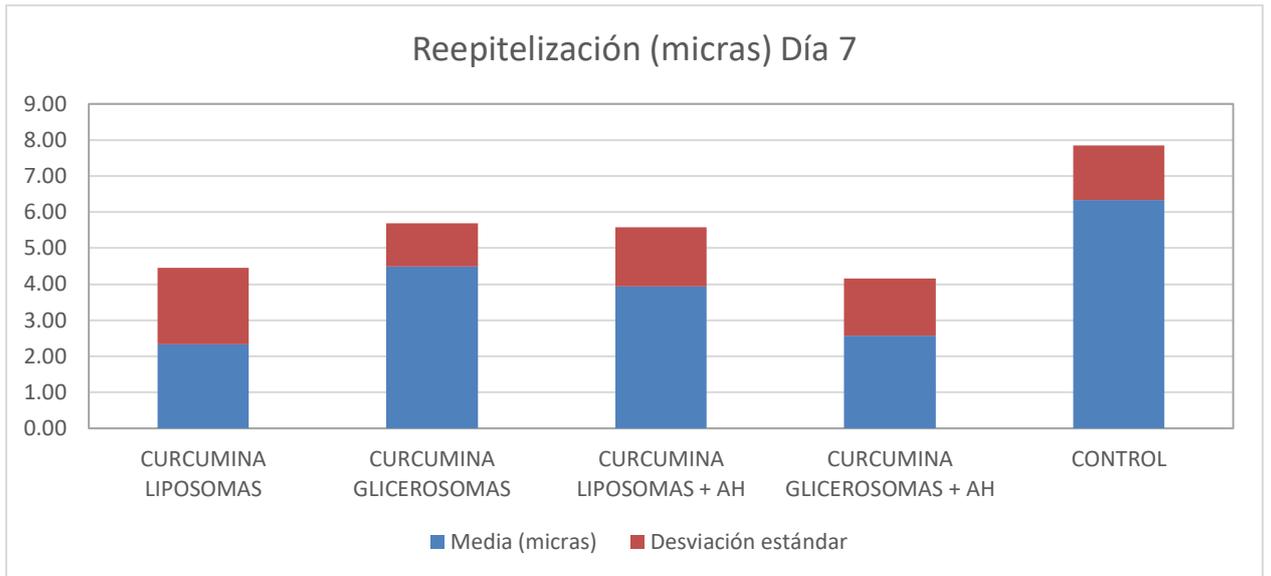
5.2.1 Ratas sanas

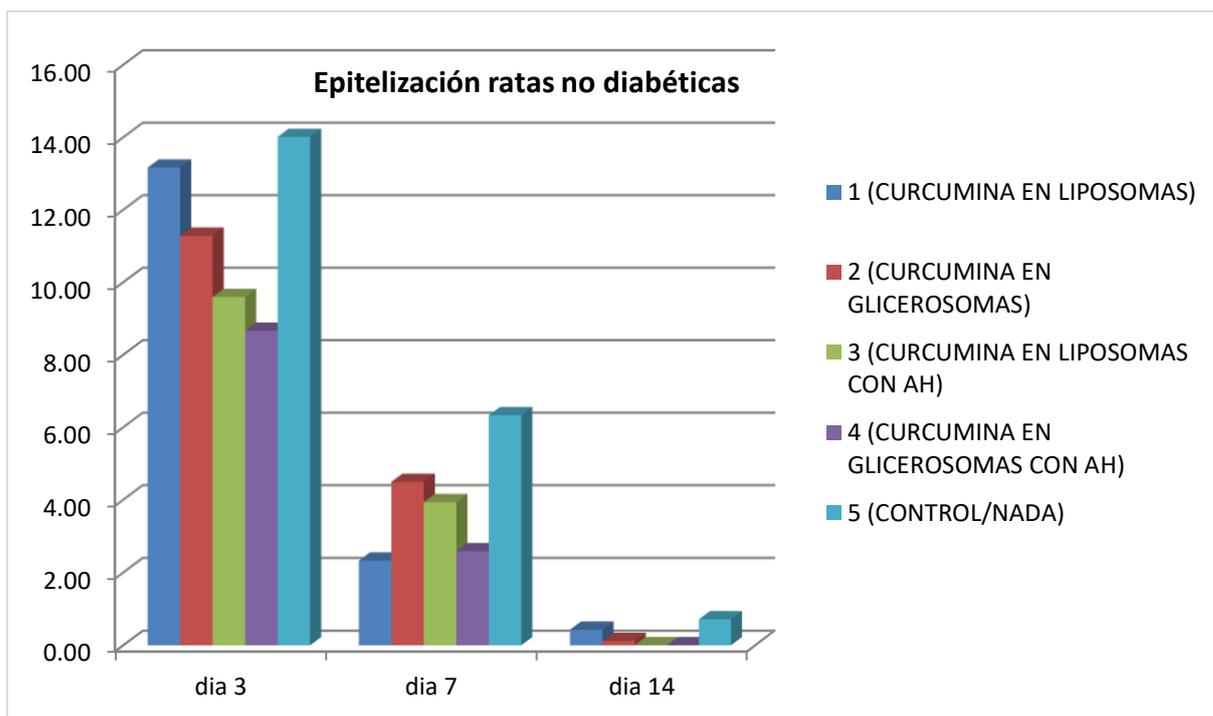
5.2.1.1 Epitelización

En el primer tiempo de estudio (día 3) no existían diferencias evidentes entre los grupos, sin embargo ya en el día 7 puede observarse como existe una mayor reepitelización en todos los grupos tratados, que a día 14 es completa en los grupos en los que el tratamiento incluye AH.

	Día 3	Día 7	Día 14
1.- CURCUMINA EN LIPOSOMAS	13,16	2,32	0,43
2.- CURCUMINA EN GLICEROSOMAS	11,28	4,49	0,12
3.- CURCUMINA EN LIPOSOMAS+AH	9,59	3,93	0
4.- CURCUMINA EN GLICEROSOMAS+AH	8,66	2,58	0
5.- CONTROL	14,01	6,33	0,71







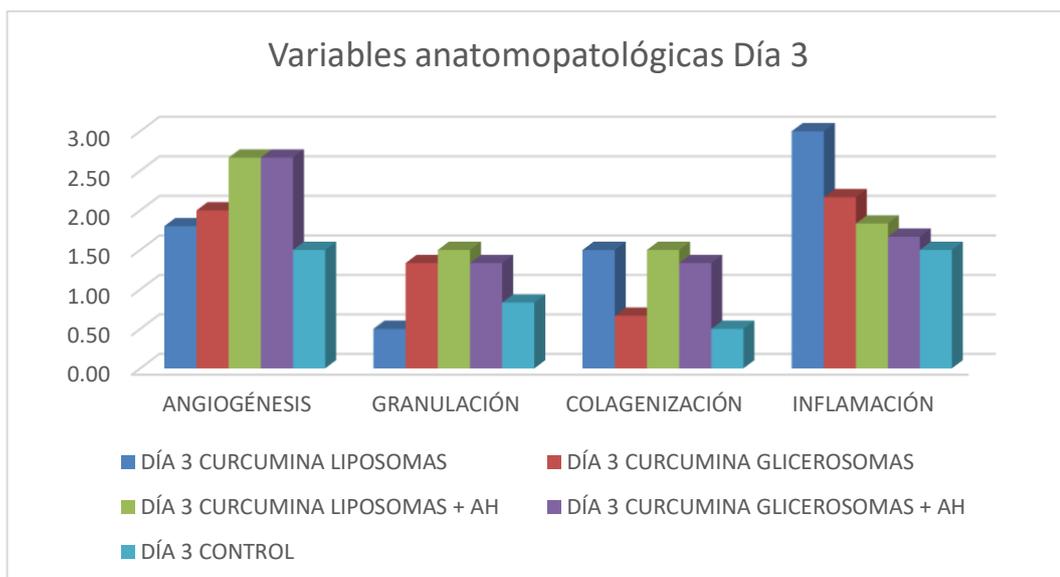
5.2.1.2 Angiogénesis, granulación, colagenización e inflamación

En cuanto al resto de variables histopatológicas (angiogénesis, granulación, colagenización e inflamación) los resultados son más irregulares, pudiendo destacar la menor presencia de tejido de granulación en el día 7 para el grupo 4 (glicerosomas con curcumina y AH) indicando una maduración más rápida de la herida.

Queremos destacar la tendencia a presentar mayor tasa de angiogénesis en periodos tempranos (día 3) en los animales tratados con nanopartículas con AH.

DÍA 3

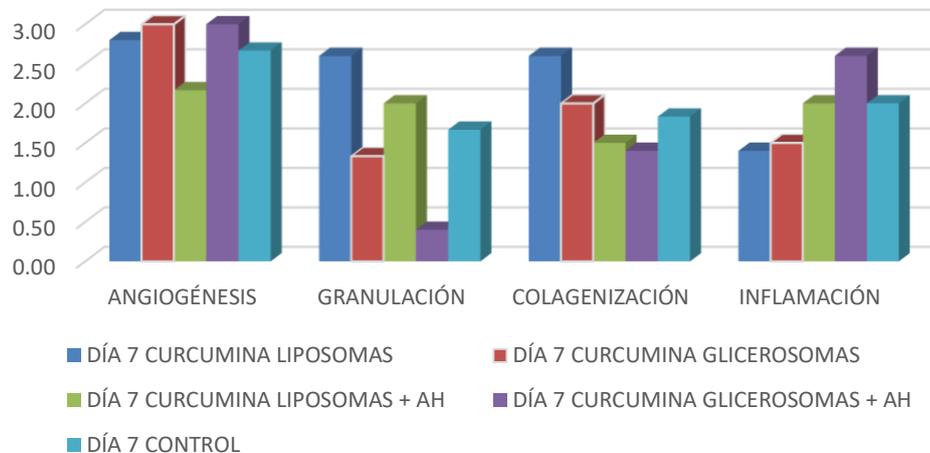
	CURCUMINA LIPOSOMAS	CURCUMINA GLICEROSOMAS	CURCUMINA LIPOSOMAS + AH	CURCUMINA GLICEROSOMAS + AH	CONTROL
<i>ANGIOGÉNESIS</i>	1,80	2,00	2,67	2,67	1,50
	1,095	1,09	0,51	0,81	0,54
<i>GRANULACIÓN</i>	0,50	1,33	1,50	1,33	0,83
	0,54	0,81	0,54	0,51	0,75
<i>COLAGENIZACIÓN</i>	1,50	0,67	1,50	1,33	0,50
	0,83	0,51	0,54	0,51	0,54
<i>INFLAMACIÓN</i>	3,00	2,17	1,83	1,67	1,50
	0	0,75	0,98	0,51	0,54



DÍA 7

	CURCUMINA LIPOSOMAS	CURCUMINA GLICEROSOMAS	CURCUMINA LIPOSOMAS + AH	CURCUMINA GLICEROSOMAS + AH	CONTROL
<i>ANGIOGÉNESIS</i>	2,80	3,00	2,17	3,00	2,67
	0,44	0	0,75	0	0,81
<i>GRANULACIÓN</i>	2,60	1,33	2,00	0,40	1,67
	0,54	0,51	0	0,54	0,81
<i>COLAGENIZACIÓN</i>	2,60	2,00	1,50	1,40	1,83
	0,83	0,63	0,54	0,54	0,98
<i>INFLAMACIÓN</i>	1,40	1,50	2,00	2,60	2,00
	0,89	0,83	0,63	0,54	1,26

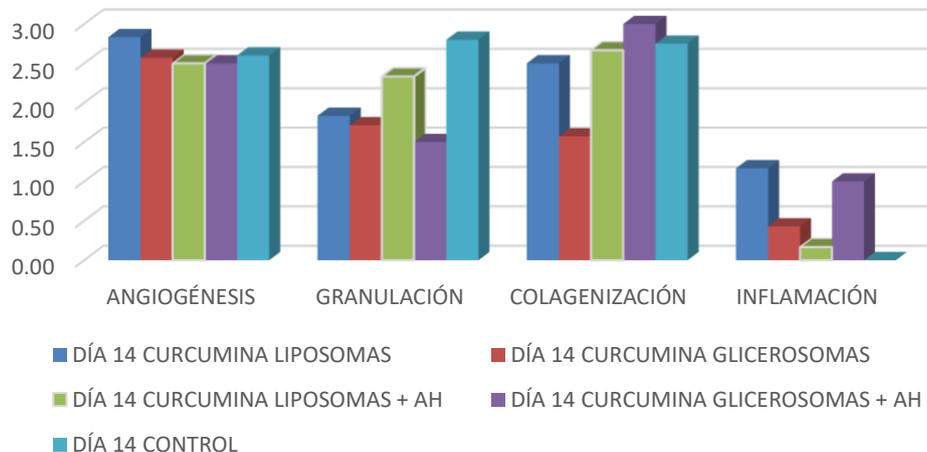
Variables anatomopatológicas Día 7



DÍA 14

	CURCUMINA LIPOSOMAS	CURCUMINA GLICEROSOMAS	CURCUMINA LIPOSOMAS + AH	CURCUMINA GLICEROSOMAS + AH	CONTROL
<i>ANGIOGÉNESIS</i>	2,83	2,57	2,50	2,50	2,60
	0,40	0,53	0,54	0,83	0,54
<i>GRANULACIÓN</i>	1,83	1,71	2,33	1,50	2,80
	0,40	0,48	0,51	0,83	0,44
<i>COLAGENIZACIÓN</i>	2,50	1,57	2,67	3,00	2,75
	0,54	0,53	0,81	0	0,5
<i>INFLAMACIÓN</i>	1,17	0,43	0,17	1,00	0,00
	0,75	0,53	0,40	0,63	0

Variables anatomopatológicas Día 14



5.2.2 Ratas diabéticas

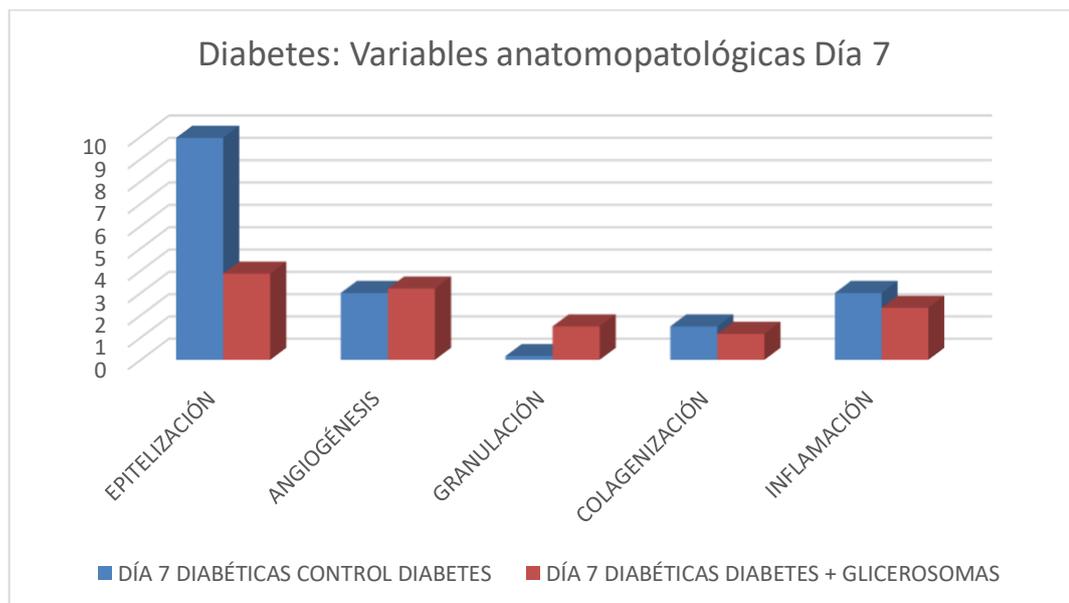
5.2.2.1 Epitelización

En el modelo de ratas diabéticas el tratamiento los glicerosomas cargados con curcumina y recubiertos por AH mejoró los datos de reepitelización de forma evidente respecto al control.

En relación al resto de variables histopatológicas no existían d.e.s.

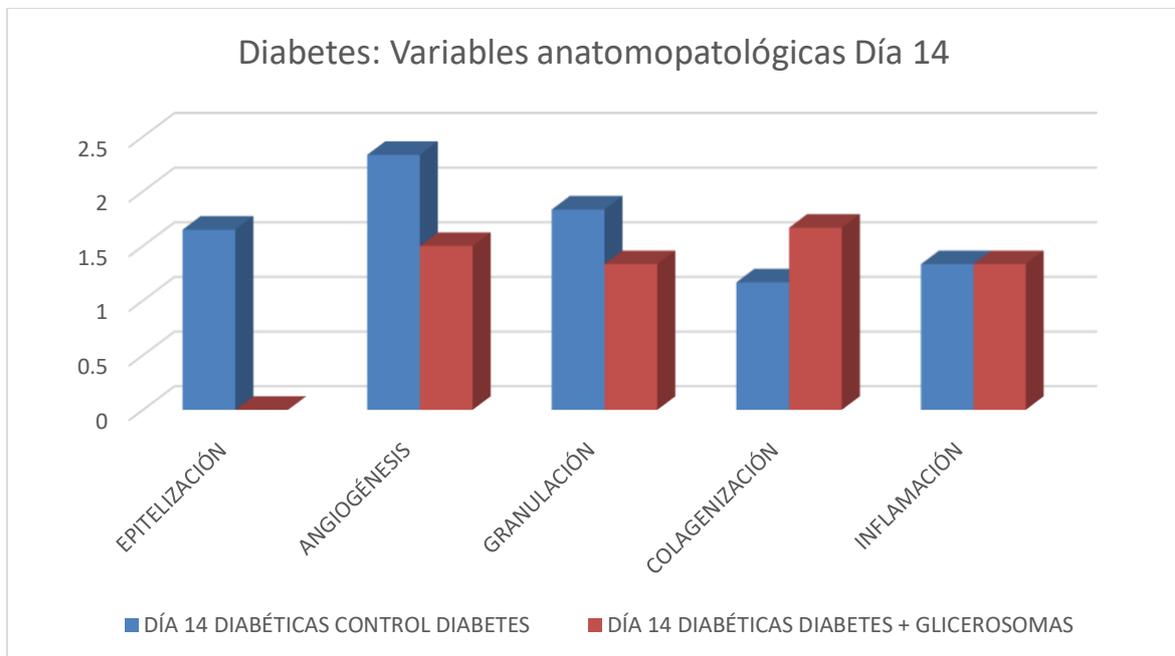
DÍA 7

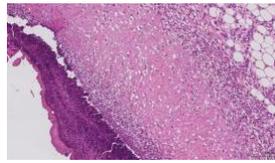
	CONTROL DIABETES	DIABETES + GLICEROSOMAS-AH
<i>EPITELIZACIÓN</i>	9,94	3,86
	0,99	1,50
<i>ANGIOGÉNESIS</i>	3	3,19
	0	0,54
<i>GRANULACIÓN</i>	0,16	1,5
	0,40	0,54
<i>COLAGENIZACIÓN</i>	1,5	1,16
	0,54	0,75
<i>INFLAMACIÓN</i>	3	2,33
	0	0,51



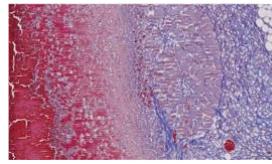
DÍA 14

	CONTROL DIABETES	DIABETES + GLICEROSOMAS-AH
<i>EPITELIZACIÓN</i>	1,64	0
	0,83	0
<i>ANGIOGÉNESIS</i>	2,33	1,5
	0,81	0,54
<i>GRANULACIÓN</i>	1,83	1,33
	0,40	0,51
<i>COLAGENIZACIÓN</i>	1,16	1,66
	0,40	0,51
<i>INFLAMACIÓN</i>	1,33	1,33
	0,51	

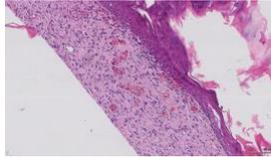




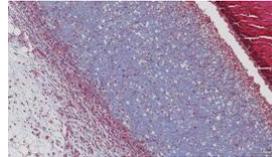
G. 1, día 3: H-E (40x)



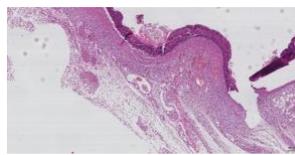
G. 1, día 3: T. de Masson (100x)



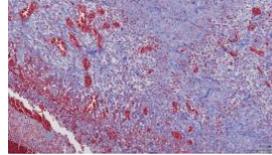
G. control, día 3: H-E (40x)



G. control, día 3: T. de Masson (100x)



G. 4, día 3: H-E (12,5x)



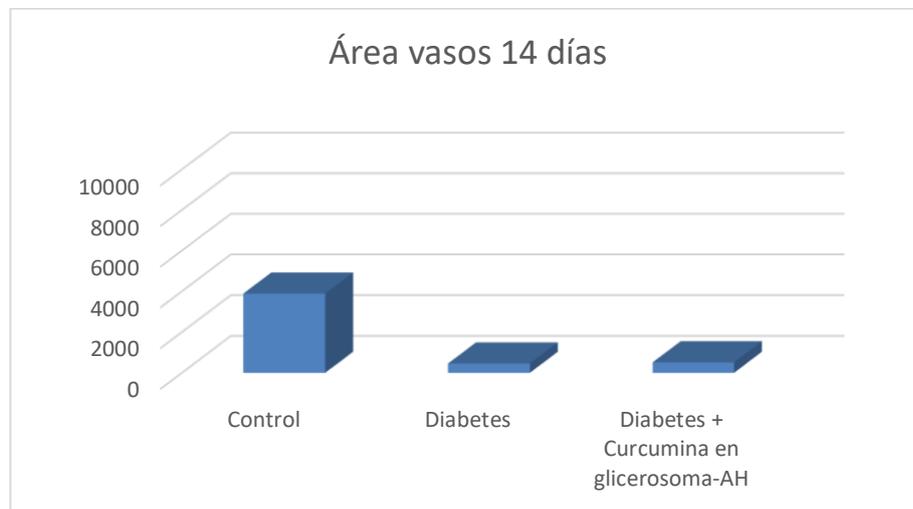
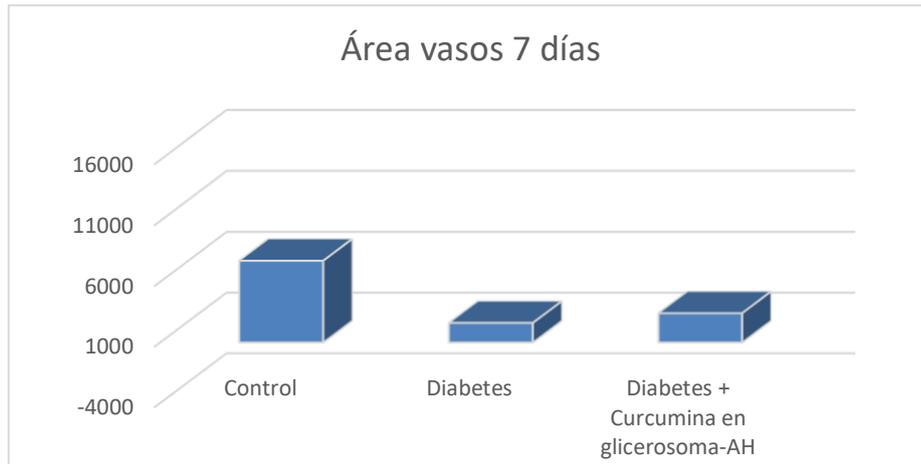
G. 4, día 3: T. de Masson (100x)

Imagen 12: “Secciones con tinción de H-E y Tricómico de Masson para valoración de variables histopatológicas”

5.2.2.2 Angiogénesis (Área)

En esta variable es evidente el impacto negativo de la diabetes en el proceso de neovascularización, siendo los resultados muy similares en ambos grupos diabéticos, con o sin tratamiento.

	7 días	14 días
<i>Control</i>	6734,92 ± 8815,70	3886,99± 6203,15
<i>Diabetes</i>	1608,98± 2368,02	454,85± 1274,63
<i>Diabetes + Curcumina en glicerosoma-AH</i>	2410,87± 3826,52	513,61± 181,86

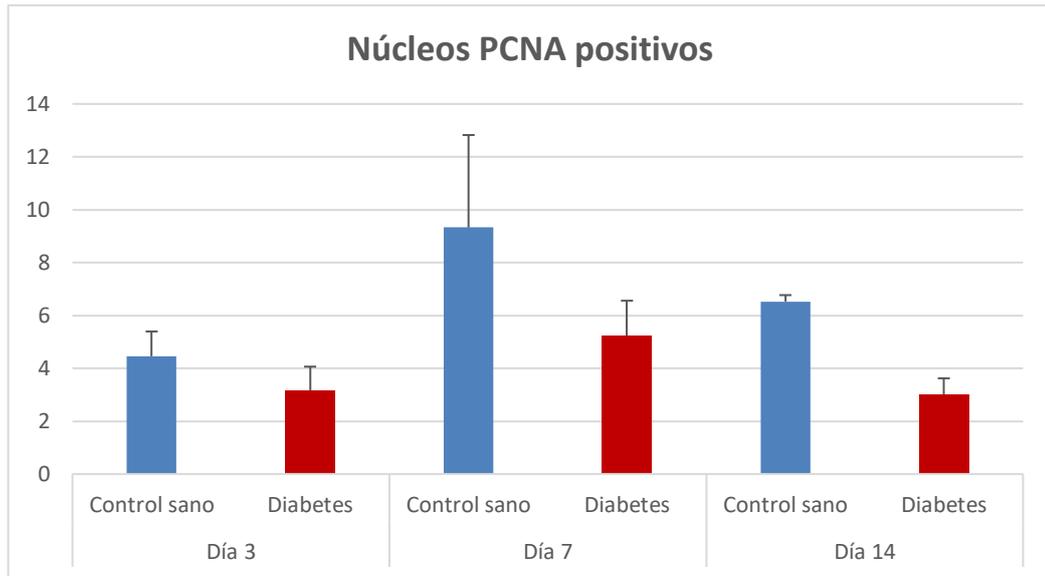


5.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

5.3.1 Inmunohistoquímica con PCNA

En todos los tiempos de estudio existe mayor número de núcleos celulares en división en los bordes epidérmicos de las heridas en los animales sanos respecto a los diabéticos, aunque sin d.e.s.

	Día 3		Día 7		Día 14	
	Control sano	Diabetes	Control sano	Diabetes	Control sano	Diabetes
MEDIA	4,45	3,14	9,32	5,22	6,52	3
SD	0,93	0,91	3,49	1,32	0,24	0,61



5.3.2 Inmunohistoquímica con TIMP-1, MMP-9 y CD-34

En el estudio de estos marcadores no encontramos d.e.s entre los dos grupos estudiados.

DÍA 7

	TIMP-1	CD-31	MMP-9
CONTROL DIABETES	2±0,8	1,75±0,95	1,5±0,57
DIABETES + CURC GLICEROSOMAS AH	2,33±0,57	1,66±0,57	1,66±0,57

DÍA 14

	TIMP-1	CD-31	MMP-9
CONTROL DIABETES	1,33±0,57	1	1
DIABETES + CURC GLICEROSOMAS AH	1,33±0,57	1	1,33±0,57

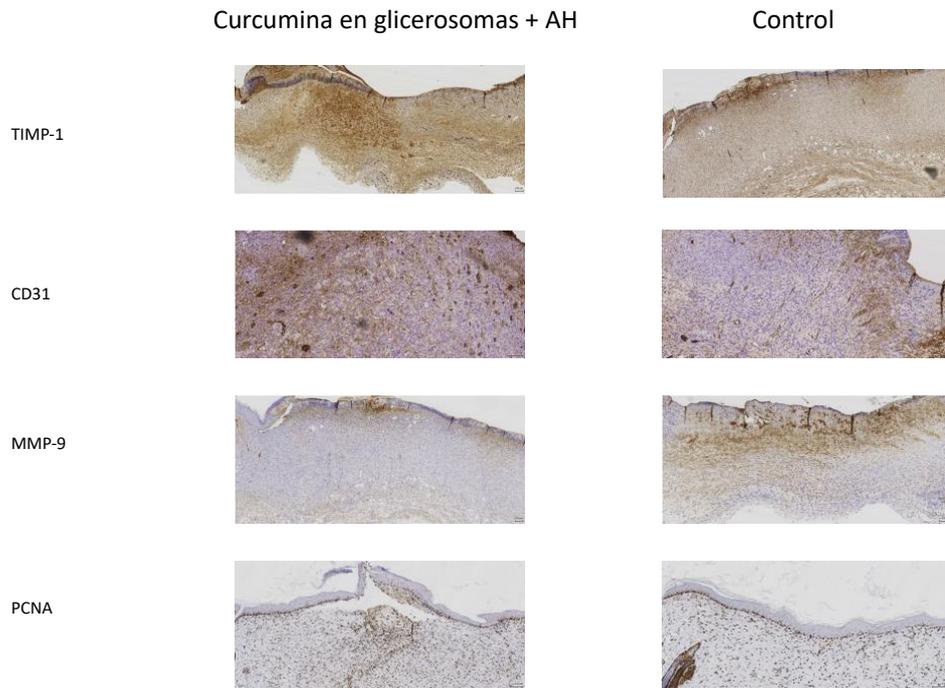


Imagen 13: Estudio inmunohistoquímico: TIMP-1 (12,5x), CD31 (20x), MMP-9 (12,5x) Y PCNA (12,5x)

6.- DISCUSIÓN

La reparación tisular es un proceso excepcionalmente especializado y que permite en mayor o menor medida la restitución de las estructuras orgánicas dañadas y de su función. Así pues, se supone que este conjunto de mecanismos fisiológicos fueron apareciendo de forma precoz, desde el punto de vista filogenético, en los organismos pluricelulares y que “ha evolucionado” también añadiendo las rutas de reparación que mejoraban la perpetuación de los organismos biológicos (70).

En el concepto de sanar de la Medicina moderna es innegable que la posibilidad de la restauración estructural y funcional de determinados órganos supone una realidad. La curación de las heridas cutáneas supone en la actualidad un reto desde el punto de vista terapéutico y también económico. Así entre 2014-2015 en Reino Unido, el gasto del tratamiento de úlcera pie diabético (incluido amputaciones) fue entre 973 y 1120 millones de euros, lo que supuso el 0,8%- 0,9% del presupuesto del NHS (Servicio Nacional de Salud)(71). La prevención y curas de úlceras de presión, con alta incidencia en pacientes con dificultades en la movilidad también supone una importante carga económica en los sistemas de salud (72). En el contexto de las tan frecuentes úlceras por insuficiencia vascular venosa periférica crónica, los gastos tanto para los sistemas de salud como para el propio paciente, son del todo relevantes, así en una revisión reciente se estimó, que el gasto anual, en Alemania, por paciente y año era de aproximadamente 9500 euros (73) y en otro estudio en Australia el coste semanal por paciente podía llegar a 242 euros (74).

Indudablemente el coste humano en cuanto a parámetros como la salud mental también es muy relevante, siendo múltiples las publicaciones que nos recuerdan las alta incidencia de cuadros depresivos en pacientes con pie diabético (75)(76), úlceras venosas crónicas en piernas (77)(78). Otra de las comorbilidades dentro del espectro emocional que acompaña a este tipo de pacientes es la ansiedad, registrándose una alta incidencia(78)(79).

Existen publicaciones y abordajes en el ámbito de la investigación en cuanto a mejorar y optimizar los procesos implicados en la reparación de tejidos orgánicos. Dentro de la extensa literatura al respecto, la curcumina es uno de los principios activos que más protagonismo adquiere. La curcumina es un compuesto polifenólico de bajo peso molecular y que se encuentra

en la cúrcuma, especia de origen indio que se obtiene de la raíz de la *Curcuma longa*. Dicha molécula muestra múltiples efectos biológicos como antiinflamatorio, antibacteriano, antiviral, antitumoral, antidiabético, antifibrosis y antiamiloides (61). En este sentido hemos propuesto un modelo de reparación de heridas cutáneas en ratas sanas y ratas diabéticas utilizando diferentes formulaciones de **curcumina**.

El estudio de modelos de curación de heridas en animales pretende conocer o aproximar la fisiología humana y poder valorar posibilidades terapéuticas. A día de hoy, no hay un modelo animal que replique en su totalidad el proceso de cicatrización en humanos. El uso de roedores como modelo de estudio se justifica por su disponibilidad, manipulación relativamente fácil y por el factor económico. El hecho de que el principal mecanismo involucrado en la cicatrización de los roedores sea la contracción y de que en los humanos sea la reepitelización (hasta el 80% de la herida)(29), hace que los modelos diverjan, sin embargo, el uso de dispositivos mecánicos que mitiguen esta contracción nos permite que se asemejen más al patrón cicatrizal de los humanos.

Si hay una patología con alta prevalencia y que dificulte y complique el proceso de cicatrización, es la **diabetes mellitus**. La prevalencia mundial en 2015 era de aprox 415 millones de afectados y la predicción para 2040 es de 642 millones (80). En esta entidad ya descrita por los egipcios(81) son bien conocidos sus efectos nocivos a nivel de macro y microcirculación. Se ha comprobado, que en los pacientes con diabetes los neutrófilos, fibroblastos y la actividad leucocitaria, así como su migración están alterados en el sitio de la úlcera(82). En pacientes adultos mayores con diabetes la grasa subcutánea disminuye, las fibras de elastina se fragmentan y el recambio epidérmico así como la producción de colágeno son menos eficaces que en pacientes sanos. Así pues, hemos considerado que junto con el modelo de reparación tisular en rata sana, para nuestra propuesta de investigación consideramos que sería enormemente interesante ver la eficacia de nuestra propuesta terapéutica en un modelo de rata diabética, en el que el proceso de reparación tisular está comprometido.

Respecto al manejo de las heridas cutáneas, dependiendo de la entidad que estemos tratando existen distintas guías terapéuticas y recomendaciones que intentan protocolizar y homogeneizar el diagnóstico de dichas heridas y su posterior tratamiento quirúrgico y médico.

Desde el punto de vista del diseño y síntesis de nanoformulaciones hay varios aspectos que deben ser tenidos en cuenta: el tamaño de las partículas, las propiedades de su superficie, la forma de dicha partículas y los ligandos de estas nuevas partículas(63). El modo de uso habitual de la curcumina es aplicarlos en la herida realizada, ahora bien, en algún caso se ha propuesto su aplicación previo sobre la piel sana antes de realizar la herida y comprobar si dicha herida cura mejor(83).

En nuestro trabajo hemos dispuesto de **liposomas y glicerosomas**. Los liposomas convencionales a menudo presentan inestabilidad estructural, baja eficiencia de encapsulación y alcanzan escasa profundidad en la piel, todo lo cual compromete la liberación local de fármacos(84). Los glicerosomas derivan de los liposomas y consisten en vesículas unilaminares o multilaminares de tamaño variable y compuestas de fosfolípidos, agua y concentraciones variables de glicerol (preferiblemente del 20 al 30% p/v). La alta viscosidad y la naturaleza higroscópica de los glicerosomas mejora la flexibilidad y fluidez de la bicapa lipídica. Estas características les permite atravesar la barrera cutánea, lo que da como resultado una mayor liberación de fármaco y una mejora permeabilidad y eficacia el uso de fármacos por vía tópica o transdérmica(85).

Aunque son múltiples las propuestas de formulación de la curcumina que aumentan su biodisponibilidad, estabilidad y afinidad, muchas han quedado como meras “pruebas conceptuales” y no han sido testadas en ensayos clínicos. Nuestro trabajo ha sido una propuesta práctica de la aplicación de glicerosomas y liposomas cargados con curcumina y envueltos en AH en un modelo animal para testar su eficacia en el contexto de reparación tisular.

La molécula de **ácido hialurónico** (AH) es un polisacárido que pertenece a la familia de los glicosaminoglicanos y consta de una unidad básica de dos azúcares, ácido glucurónico y N-acetilglucosamina. El AH está presente en grandes cantidades en el líquido sinovial que rodea las articulaciones, los cartílagos y los tejidos del ojo y la piel(86). Es uno de los principales componentes de la matriz extracelular, tiene buenas propiedades viscoelásticas y en el caso del AH de bajo peso molecular también facilita la migración celular, proliferación de los fibroblastos, síntesis de colágenos I y III y de la angiogénesis(86), (87). Su efecto sobre la

proliferación celular se puede explicar dada su capacidad de activación del receptor purinérgico P2X7 y CD44(87) . La conjugación de curcumina con AH, aumenta la solubilidad en agua y estabilidad a pH fisiológico de la primera(87)Son múltiples las publicaciones en modelo de reparación de heridas de espesor total, como en nuestro trabajo, en las que se han usado de forma aislada o en combinación con otros principios activos(61)(60). Ambos son compuestos con demostrada eficacia en la aceleración y mejora del proceso de cicatrización. El ácido hialurónico forma parte de la matriz extracelular, por lo que la elección de dicho compuesto está justificada para asegurar una mayor biocompatibilidad. Por todo esto nos planteamos combinarlo con nuestras presentaciones de curcumina en nanopartículas y comprobar si existía sinergismo entre ambos productos. Nuestro estudio ha constatado que las heridas tratadas con dicha fórmula han cerrado antes que el resto de grupos de tratamiento y control. Además de la aceleración de la cicatrización, pensamos que el efecto antibacteriano de la curcumina contribuye a su eficacia y hace de ella un componente que debería incorporarse en las preparaciones y presentaciones disponibles para las curas de heridas cutáneas.

En nuestro estudio hemos observado que la **reepitelización** a nivel **macroscópico**, en las ratas sanas, era muy evidente sobre la segunda semana en el grupo de tratamiento con curcumina vehiculizada en glicerosomas envueltos en AH. Con respecto a las ratas diabéticas, se verificó la rapidez en la disminución del tamaño de las heridas en los días 3 y 7, aunque no encontramos d.e.s. **Sharma et al** (2018) obtuvieron un resultado similar en cuanto a un cierre más rápido en un modelo de ratones diabetizados en los que tratan las heridas de espesor total con una formulación de curcumina en AH(87). En esta misma dirección **Li et al** (2017) demostraron que la aplicación en heridas de rata de curcumina contenida en nanopartículas de quitosano-ácido poli- γ -glutámico-pluronic en apósitos de quitosano, conseguían una cicatrización más rápida(88). De conformidad con lo dicho anteriormente, el grupo de **Zhang et al** (2016), utilizaron un nuevo derivado de la curcumina que incluye un sitio de unión para el zinc, similar al de las tetraciclinas, y que es responsable de su efecto inhibidor sobre las metaloproteinasas (89). La aplicación de dicho compuesto sobre las heridas en ratas diabetizadas, conseguía acelerar el proceso de cicatrización con significación estadística, tanto a nivel macroscópico como en el estudio histomorfométrico. La novedad de este trabajo respecto a otros, incluido el nuestro, es que administra dicho derivado de la curcumina de forma tópica y oral (90). Estos resultados no pudieron ser reproducidos por **Haman et al** (2020) que

trataron las heridas de ratas Wistar con curcumina vehiculizada en sílice mesoporosa (91). Al igual que **Mancha et al**, en nuestro trabajo hemos comprobado que la asociación de ácido hialurónico con curcumina vehiculizada en nanopartículas, ha acelerado el proceso de cicatrización, si bien su trabajo se fundamentó en modelo de herida en ratones(92).

El proceso de inflamación suele establecerse en las primeras 24 horas, con el reclutamiento de monocitos, macrófagos, polimorfonucleares en el lugar de la lesión y produciéndose además la activación de mastocitos y células de Langerhans. En este momento se liberan una gran variedad y cantidad de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IFN- γ) y sustancias antimicrobianas altamente activas, como el oxígeno reactivo especies (ROS), péptidos catiónicos y proteasas. Los macrófagos fagocitan patógenos y detritus además de segregar factores proangiogénicos, inflamatorios y fibrogénicos, así como radicales libres. Estos últimos son capaces de destruir agentes patógenos, pero también pueden influir negativamente en el proceso de reparación de la herida.

Esto nos ha llevado a plantearnos la necesidad de una búsqueda de nuevas formulaciones de curcumina, con la hipótesis de que consiguiendo mayor concentración tisular de curcumina podremos disminuir el componente inflamatorio durante la curación de la herida. Sin embargo, en nuestro trabajo no hemos podido constatar en ninguno de los modelos de rata que haya menor grado de **inflamación**. **Ahmad et al** (2019) consiguieron demostrar que con su nanoformulación de curcumina disminuía la presencia de inflamación en el estudio histológico de las heridas en ratas albinas.

El inicio de la **angiogénesis** está regulado positivamente por varios factores solubles, entre los que destaca el VEGF-A, en respuesta a la hipoxia tisular de la herida. Después de un crecimiento “explosivo” de neovasos se produce una “poda” vascular hasta que la densidad de vasos es parecida a la de la piel normal. En este proceso es fundamental el proceso de apoptosis y el de maduración capilar a cargo de los pericitos (93). En nuestro trabajo hemos observado que en las ratas sanas, en el día 3, el grupo control tenía un menor número de neovasos que el resto de grupos de tratamiento. En las ratas diabéticas se vio que en el día 14, el grupo de ratas tratadas tenía menor número de vasos, lo cual concuerda con la observación de menor tejido de granulación. A pesar de estos resultados, no hemos encontrado d.e.s tanto en el número de vasos

como del área total de dichos vasos, por lo que no hemos podido demostrar el efecto proangiogénico de la curcumina al igual que **Haman et al** (2020)(91) y que sí verifica **Krausz et al** (2015) comprobando una mayor formación de vasos en las heridas tratadas con curcumina encapsulada en nanopartículas(94).

El **tejido de granulación** está compuesto mayoritariamente por fibroblastos embebidos en una red de neovasos, y matriz extracelular. En nuestro trabajo hemos cuantificado el grado de maduración de los fibroblastos y su número, se manifestó que en el grupo de ratas no diabéticas (sanas) dicho tejido era menos abundante el día 3, en las ratas no tratadas (control). Esto lo interpretamos como un retraso en el proceso de cicatrización respecto de los otros grupos de tratamiento. Durante los días 7 y 14 se verificó que dicho tejido de granulación era más escaso en los grupos de tratamiento que en el grupo control, lo cual entendemos que refleja que el proceso de reparación estaba más avanzado en los grupos de tratamiento. En el grupo de ratas diabéticas hemos observado que en el día 7, era más abundante y maduro el tejido de granulación en el grupo tratado, en concordancia con las ratas no diabéticas y que en el día 14 en el grupo de tratamiento había menos granulación, lo cual volvemos a interpretar como una reparación más evolucionada. A pesar de estos hallazgos, no hemos podido encontrar significación estadística, tal y como les ocurre a **Haman et al** (2020)(91). Tampoco consiguen observar d.e.s en el proceso de granulación, **Leng et al** (2020), al aplicar nanopartículas de curcumina incorporadas a un apósito de colágeno y alcohol de polivinilo(95).

La **colagenización** forma parte de la fase proliferativa en la que los fibroblastos que se reclutaron de la dermis de los bordes de la herida cutánea producen sobre todo colágeno tipo III, posteriormente será sustituido por colágeno tipo I(96). Esta proteína supone el 70-80% de la piel y es la más abundante de la matriz extracelular, de ahí la relevancia de sus síntesis durante la reparación de heridas cutáneas. Nuestros resultados nos muestran que en el grupo de ratas no diabéticas, en el día 3 es muy evidente que el depósito de colágeno es mucho menor que en la mayoría de grupos de tratamiento, esta diferencia desaparece en el resto de días. En el grupo de ratas diabéticas fue patente un mayor grado de colagenización en el día 14 en las ratas tratadas. Este retraso en la síntesis de colágeno podría explicarse por la dificultad de reparación tisular en el contexto de la diabetes. Concuere da con nuestros resultados, los obtenidos por **Leng et al** (2020), ya que la aplicación de nanopartículas de curcumina no obtiene mayor

colagenización en las heridas de rata Sprague-Dawley que las tratadas con un apósito de colágeno y ácido polivinílico y de las tratadas con apósito. A diferencia de **Haman et al** (2005), **Krausz et al** (2015) y de **Li et al** (2017) no hemos encontrado d.e.s en este parámetro, aunque lo observado parece indicar que en los grupos de tratamiento puede haber una tendencia a colagenizar antes que en el grupo control. **Zhang et al** (2016), cuantifican el depósito de colágeno en las heridas de ratas diabéticas mediante la cuantificación de hidroxiprolina(97), comprobando que dicho depósito siempre es menor en ratas diabéticas respecto a ratas sanas, sin embargo en los grupos de tratamiento de las ratas diabéticas aumenta la cantidad de colágeno a lo largo de tiempo de estudio, de forma significativa. Por su parte, **Zahiri et al** (2020), aplicando curcumina encapsulada en nanopartículas de quitosán con poli- ϵ - caprolactona y con fibras de gelatina, a heridas de ratas Wistar, ponen de manifiesto una mayor producción de colágeno, con d.e.s, que en grupo no tratado(98).

Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) son una familia de más de 25 proteínas neutras, zinc-dependientes y que actúan en la degradación de la matriz extracelular, membrana basal y otros componentes extracelulares. Su disregulación se asocia a procesos como la artritis, aterosclerosis, periodontitis y contribuye al crecimiento tumoral y metástasis. (89). Al evaluar la tinción con inmunohistoquímica de la MMP-9 en heridas de ratas diabéticas (al igual que la MMP-8 son liberadas por los leucocitos polimorfonucleares), no hemos encontrado d.e.s entre los controles y el grupo tratamiento con curcumina en glicerosomas + AH. Nuestro resultado no difiere del de **Zhang et al** (2016), en el que no observan d.e.s al teñir MMP-13 (que es constitutiva), si bien ellos encontraron d.e.s al comparar MMP-8 de las ratas diabéticas no tratadas con respecto a las no diabéticas, lo cual es previsible en un modelo de reparación tisular anómala; además dentro del conjunto de ratas diabéticas sólo una de las presentaciones (concentración al 1%) de su derivado de curcumina mostró d.e.s respecto del control con la MMP-8. Por el contrario, **Kant et al** (2014), en su modelo de ratas diabéticas, probaron que el tratamiento tópico con curcumina en gel Pluronic® F-127, disminuyó la expresión de ARN mensajero de MMP-9 durante el periodo de estudio de 19 días(99). La elevada presencia de MMP-9 en las ratas no tratadas, justificaría (en su opinión) el escaso tejido de granulación que presentaba.

En este mismo trabajo, mostraron en el mismo grupo de tratamiento, que los niveles de ARN mensajero de TNF α e IL-1 β disminuyeron con significación estadística. Al mismo tiempo, la cantidad de IL-10 (citoquina de efecto antiinflamatorio) determinada mediante PCR (ARN mensajero) y ELISA se incrementaba a lo largo del tiempo, certificando el efecto antiinflamatorio de la curcumina.

El TIMP-1 es una glicoproteína endógena, presente en múltiples tejidos y que inhibe la acción de forma no selectiva de las metaloproteinasas(100). El nuestro estudio inmunohistoquímico de esta metaloproteinasas no hemos demostrado que haya mayor cantidad en el grupo de ratas diabéticas tratadas con curcumina en glicerosomas+AH. Esto contrasta con la observación de **Mohammadi et al** (2019) en la que la cuantificación de ARN mensajero de TIMP-1 fue mayor en el grupo de ratas tratadas con nanofibras de curcumina y crisina (101).

Otro punto que debemos señalar es el de la escasa especificidad tisular en cuanto las preparaciones actuales de curcumina. Todavía queda un importante campo de mejora en este aspecto, pudiendo diseñar formulaciones específicas dependiendo del órgano y/o patología a tratar.

En nuestra opinión uno de los objetivos a seguir a parte de una curación más rápida de la herida cutánea, es conseguir una cicatrización de mejor calidad y estéticamente más aceptables. **Redd et al** (2004) ya demostraron con ratones PU.1-null que la ausencia de inflamación durante el proceso de reparación tisular evita la aparición de cicatriz(31). El tratamiento con TGF- β 3 en la dermis y los bordes de las heridas de espesor total en embriones de ratas y ratones, disminuyó la presencia de monocitos y macrófagos en la herida y se consiguió la disminución de tejido cicatricial (30).

Los siguientes pasos deberían encaminarnos en la realización de ensayos clínicos en humanos.

Respecto a las limitaciones de nuestro estudio: Consideramos que el hecho de que nuestro estudio haya finalizado el día 14 frente a otros trabajos que finalizaron incluso el día 30, ha

podido limitar la demostración de d.e.s, sobre todo en el grupo de ratas diabéticas. Así, en la comunicación de **Zhang et al**, no pueden demostrar el incremento en la deposición de colágeno en ratas diabéticas tratadas, hasta el día 30 de estudio. Esto se explicaría porque en dichos animales es bien conocido el efecto negativo y retardante que tiene la hiperglucemia sobre la cicatrización: disfunción leucocitaria, alteración de la actividad fibroblástica y síntesis de colágeno, trastorno en la diferenciación y migración de queratinocitos, disfunción endotelial, entre otros (50). Por otra parte, el uso de un modelo animal como la rata, pese a sus numerosas ventajas, no permite extrapolar directamente los resultados a lo que ocurriría en la piel humana en condiciones similares, ya que existen ligeras diferencias en los distintos procesos y fases de la cicatrización.

Pero en definitiva, consideramos el tratamiento tópico con curcumina, sobre todo cuando ésta se aplica en nanoformulaciones de glicerosomas cubiertos con ácido hialurónico, una herramienta terapéutica a tener en cuenta para ayudar en el proceso de regeneración/reparación cutánea aunque son necesarios más estudios, en los que se apliquen técnicas que permitan dilucidar el mecanismo íntimo de acción y ayuden a ajustar dosis. Sin duda, la culminación de los ensayos clínicos que ya hay en marcha, permitirá abrir la puerta o no a un posible uso habitual en humanos.

7.- CONCLUSIONES

1. De las diferentes formulaciones de curcumina utilizadas, la que mejor resultados ha obtenido ha sido la curcumina encapsulada en glicerosomas y recubiertos de AH.
2. La curcumina en glicerosomas recubiertos de AH ha disminuido el tiempo de curación de las heridas en las ratas no diabéticas.
3. Las ratas diabéticas, inducidas por estreptozotocina, tuvieron una cicatrización más lenta que las ratas no diabéticas.
4. El estudio histomorfométrico de las heridas ha demostrado una precoz reepitelización en el grupo de tratamiento con glicerosomas+AH de ratas no diabéticas.
5. El estudio inmunohistoquímico del índice de proliferación celular (PCNA) en las heridas de ratas diabéticas era menor que el control de ratas sanas a pesar de no obtener d.e.s.
6. El estudio inmunohistoquímico de MMP-9 no ha demostrado una disminución de su expresión en las ratas diabéticas tratadas con curcumina en glicerosomas+AH.
7. El estudio inmunohistoquímico no ha demostrado un aumento en la expresión de TIMP-1 ni de CD31 en el grupo de ratas diabéticas tratadas con curcumina en glicerosomas+AH.

Como consideración final quiero resaltar la hipótesis de que el efecto antiinflamatorio del ácido hialurónico potencia los efectos tróficos de la curcumina y que por otro lado el aumento de la migración celular que promueva el AH ha debido contribuir a que las heridas del grupo de curcumina en glicerosomas+AH hayan cerrado antes.

8.- BIBLIOGRAFÍA

1. Chang S-W, Lee H-C. Vitamin D and health - The missing vitamin in humans. *Pediatr Neonatol.* junio de 2019;60(3):237-44.
2. Umar M, Sastry KS, Al Ali F, Al-Khulaifi M, Wang E, Chouchane AI. Vitamin D and the Pathophysiology of Inflammatory Skin Diseases. *Skin Pharmacol Physiol.* 2018;31(2):74-86.
3. Hewison M. Vitamin D and immune function: an overview. *Proc Nutr Soc.* febrero de 2012;71(1):50-61.
4. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002;12(4):390-401.
5. Valdés-Rodríguez R, Torres-Álvarez B, González-Muro J. La piel y el sistema endocrinológico. *Gac Médica México.* :7.
6. Benedí MJA. Resistencia de la piel al paso de la corriente eléctrica en adultos trabajadores. :405.
7. Bologna JL, Schaffer JV, Cerroni L, Callen JP. *Dermatología.* Elsevier; 2019.
8. Rosenberg AR, Tabacchi M, Ngo KH, Wallendorf M, Rosman IS, Cornelius LA, et al. Skin cancer precursor immunotherapy for squamous cell carcinoma prevention. *JCI Insight* [Internet]. [citado 24 de junio de 2021];4(6). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6483001/>
9. Sunshine J, Taube JM. PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol.* agosto de 2015;23:32-8.
10. Abdo H, Calvo-Enrique L, Lopez JM, Song J, Zhang MD, Usoskin D, et al. Specialized cutaneous schwann cells initiate pain sensation. *Science.* 16 de agosto de 2019;365(6454):695-9.
11. Khavkin J, Ellis DAF. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. *Facial Plast Surg Clin N Am.* mayo de 2011;19(2):229-34.
12. Johnson JM, Minson CT, Kellogg DL. Cutaneous vasodilator and vasoconstrictor mechanisms in temperature regulation. *Compr Physiol.* enero de 2014;4(1):33-89.
13. Koster MI, Roop DR. The role of p63 in development and differentiation of the epidermis. *J Dermatol Sci.* febrero de 2004;34(1):3-9.
14. Bologna JL, Orlow SJ, Glick SA. Lines of Blaschko. *J Am Acad Dermatol.* agosto de 1994;31(2 Pt 1):157-90; quiz 190-2.

15. Molho-Pessach V. Blaschko lines and other patterns of cutaneous mosaicism. :21.
16. Boissy RE, Nordlund JJ. Molecular basis of congenital hypopigmentary disorders in humans: a review. *Pigment Cell Res.* abril de 1997;10(1-2):12-24.
17. Chua RF, Pico J. Dermal Melanocytosis. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [citado 29 de junio de 2021]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557408/>
18. Gola M, Czajkowski R, Bajek A, Dura A, Drewa T. Melanocyte stem cells: Biology and current aspects. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 1 de octubre de 2012;18(10):RA155-9.
19. Boulais N, Misery L. Merkel cells. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(1):147-65.
20. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002;12(4):390-401.
21. Goldberg A, Mitchell K, Soans J, Kim L, Zaidi R. The use of mesenchymal stem cells for cartilage repair and regeneration: A systematic review. Vol. 12, *Journal of Orthopaedic Surgery and Research.* BioMed Central Ltd.; 2017.
22. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: Past, present, and future. Vol. 10, *Stem Cell Research and Therapy.* BioMed Central Ltd.; 2019.
23. Thompson AK, Kelley BF, Prokop LJ, Murad MH, Baum CL. Risk factors for cutaneous squamous cell carcinoma recurrence,metastasis, and disease-specific death: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Dermatol.* 1 de abril de 2016;152(4):419-28.
24. Basic principles of wound healing - UpToDate [Internet]. [citado 5 de junio de 2020]. Disponible en: https://www.uptodate.com/contents/basic-principles-of-wound-healing?search=ulceras%20cronicas&topicRef=112216&source=see_link
25. Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ, Jarvis WR, Emori TG. CDC definitions of nosocomial surgical site infections, 1992: a modification of CDC definitions of surgical wound infections. *Infect Control Hosp Epidemiol.* octubre de 1992;13(10):606-8.
26. Zinder R, Cooley R, Vlad L, Molnar J. Vitamin A and Wound Healing. *Nutr Clin Pract.* 1 de diciembre de 2019;34:839-49.
27. Wild T, Rahbarnia A, Kellner M, Sobotka L, Eberlein T. Basics in nutrition and wound healing. *Nutrition.* septiembre de 2010;26(9):862-6.
28. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35-43.
29. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin Wound Healing: An

- Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur Surg Res.* 2017;58(1-2):81-94.
30. Takeo M, Lee W, Ito M. Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(1).
 31. Redd MJ, Cooper L, Wood W, Stramer B, Martin P. Wound healing and inflammation: embryos reveal the way to perfect repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 29 de mayo de 2004;359(1445):777-84.
 32. Lau K, Paus R, Tiede S, Day P, Bayat A. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Exp Dermatol.* noviembre de 2009;18(11):921-33.
 33. Miller SJ, Burke EM, Rader MD, Coulombe PA, Lavker RM. Re-epithelialization of porcine skin by the sweat apparatus. *J Invest Dermatol.* enero de 1998;110(1):13-9.
 34. Jacinto A, Martinez-Arias A, Martin P. Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nat Cell Biol.* mayo de 2001;3(5):E117-23.
 35. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016;31(April 2017):177-83.
 36. da Silva IR, Tiveron LCR da C, da Silva MV, Peixoto AB, Carneiro CAX, dos Reis MA, et al. In Situ Cytokine Expression and Morphometric Evaluation of Total Collagen and Collagens Type I and Type III in Keloid Scars. *Mediators Inflamm [Internet].* 2017 [citado 5 de junio de 2020];2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5468593/>
 37. Hinz B. Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *J Invest Dermatol.* marzo de 2007;127(3):526-37.
 38. Sarrazay V, Billet F, Micallef L, Coulomb B, Desmoulière A. Mechanisms of pathological scarring: role of myofibroblasts and current developments. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc.* septiembre de 2011;19 Suppl 1:s10-15.
 39. 9 Surgical Site Infection (SSI) Event. 2020;36.
 40. Margham J, McAdam K, Forster M, Liu C, Wright C, Mariner D, et al. Chemical Composition of Aerosol from an E-Cigarette: A Quantitative Comparison with Cigarette Smoke. *Chem Res Toxicol.* 17 de octubre de 2016;29(10):1662-78.
 41. Sørensen LT. Wound healing and infection in surgery. The clinical impact of smoking and smoking cessation: a systematic review and meta-analysis. *Arch Surg Chic Ill 1960.* abril de 2012;147(4):373-83.

42. Jensen JA, Goodson WH, Hopf HW, Hunt TK. Cigarette smoking decreases tissue oxygen. *Arch Surg Chic Ill* 1960. septiembre de 1991;126(9):1131-4.
43. Krutmann J, Bouloc A, Sore G, Bernard BA, Passeron T. The skin aging exposome. *J Dermatol Sci*. marzo de 2017;85(3):152-61.
44. Weihermann AC, Lorencini M, Brohem CA, Carvalho CM de. Elastin structure and its involvement in skin photoageing. *Int J Cosmet Sci*. 2017;39(3):241-7.
45. Payne WG, Naidu DK, Wheeler CK, Barkoe D, Mentis M, Salas RE, et al. Wound Healing in Patients With Cancer. 8:23.
46. Sharma K, Marcus JR. Bevacizumab and Wound-Healing Complications: Mechanisms of Action, Clinical Evidence, and Management Recommendations for the Plastic Surgeon. *Ann Plast Surg*. octubre de 2013;71(4):434-40.
47. Staff NP, Grisold A, Grisold W, Windebank AJ. Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: A Current Review. *Ann Neurol*. junio de 2017;81(6):772-81.
48. Wang AS, Armstrong EJ, Armstrong AW. Corticosteroids and wound healing: clinical considerations in the perioperative period. *Am J Surg*. septiembre de 2013;206(3):410-7.
49. Haubner F, Ohmann E, Pohl F, Strutz J, Gassner HG. Wound healing after radiation therapy: Review of the literature. *Radiat Oncol Lond Engl*. 24 de septiembre de 2012;7:162.
50. Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. *Adv Ther*. 1 de agosto de 2014;31(8):817-36.
51. Poznyak A, Grechko AV, Poggio P, Myasoedova VA, Alfieri V, Orekhov AN. The Diabetes Mellitus–Atherosclerosis Connection: The Role of Lipid and Glucose Metabolism and Chronic Inflammation. *Int J Mol Sci*. 6 de marzo de 2020;21(5):1835.
52. Diabetic neuropathy. *Nat Rev Dis Primer*. diciembre de 2019;5(1):42.
53. Raffetto JD. Pathophysiology of Chronic Venous Disease and Venous Ulcers. *Surg Clin North Am*. abril de 2018;98(2):337-47.
54. Rasmussen JC, Zhu B, Morrow JR, Aldrich MB, Sahihi A, Harlin SA, et al. Degradation of lymphatic anatomy and function in early venous insufficiency. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord*. mayo de 2021;9(3):720-730.e2.
55. Nelson KM, Dahlin JL, Bisson J, Graham J, Pauli GF, Walters MA. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin: Miniperspective. *J Med Chem*. 9 de marzo de

2017;60(5):1620-37.

56. Lestari MLAD, Indrayanto G. Curcumin. En: Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology [Internet]. Elsevier; 2014 [citado 12 de junio de 2020]. p. 113-204. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128001738000039>
57. Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed Res Int*. 2014;2014:186864.
58. He Y, Yue Y, Zheng X, Zhang K, Chen S, Du Z. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked? *Mol Basel Switz*. 20 de mayo de 2015;20(5):9183-213.
59. Jiang S, Han J, Li T, Xin Z, Ma Z, Di W, et al. Curcumin as a potential protective compound against cardiac diseases. *Pharmacol Res*. mayo de 2017;119:373-83.
60. Mohanty C, Sahoo SK. Curcumin and its topical formulations for wound healing applications. *Drug Discov Today*. octubre de 2017;22(10):1582-92.
61. Karthikeyan A, Senthil N, Min T. Nanocurcumin: A Promising Candidate for Therapeutic Applications. *Front Pharmacol* [Internet]. 1 de mayo de 2020 [citado 13 de junio de 2020];11. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7206872/>
62. Panda AK, Chakraborty D, Sarkar I, Khan T, Sa G. New insights into therapeutic activity and anticancer properties of curcumin. *J Exp Pharmacol*. marzo de 2017;Volume 9:31-45.
63. Tomeh MA, Hadianamrei R, Zhao X. A Review of Curcumin and Its Derivatives as Anticancer Agents. *Int J Mol Sci* [Internet]. 27 de febrero de 2019 [citado 22 de junio de 2021];20(5). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6429287/>
64. Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IMA, Chin D, Wagner AE, Rimbach G. Curcumin-From Molecule to Biological Function. *Angew Chem Int Ed*. 29 de mayo de 2012;51(22):5308-32.
65. Manca ML, Cencetti C, Matricardi P, Castangia I, Zaru M, Sales OD, et al. Glycosomes: Use of hydrogenated soy phosphatidylcholine mixture and its effect on vesicle features and diclofenac skin penetration. *Int J Pharm*. septiembre de 2016;511(1):198-204.
66. Manconi M, Aparicio J, Vila AO, Pendás J, Figueruelo J, Molina F. Viscoelastic properties of concentrated dispersions in water of soy lecithin. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp*. julio de 2003;222(1-3):141-5.

67. Wang-Fischer Y, Garyantes T. Improving the Reliability and Utility of Streptozotocin-Induced Rat Diabetic Model. *J Diabetes Res* [Internet]. 23 de septiembre de 2018 [citado 13 de junio de 2020];2018. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6174751/>
68. Reviews M, Collection M. Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPIs): The beginning of phase I ... 2003;
69. Abramov Y, Golden B, Sullivan M, Botros SM, Miller J-JR, Alshahrour A, et al. Histologic characterization of vaginal vs. abdominal surgical wound healing in a rabbit model. *Wound Repair Regen.* enero de 2007;15(1):80-6.
70. van Bekkum DW. Phylogenetic aspects of tissue regeneration: role of stem cells. A concise overview. *Blood Cells Mol Dis.* febrero de 2004;32(1):11-6.
71. Kerr M, Barron E, Chadwick P, Evans T, Kong WM, Rayman G, et al. The cost of diabetic foot ulcers and amputations to the National Health Service in England. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* 2019;36(8):995-1002.
72. Demarré L, Van Lancker A, Van Hecke A, Verhaeghe S, Grypdonck M, Lemey J, et al. The cost of prevention and treatment of pressure ulcers: A systematic review. *Int J Nurs Stud.* noviembre de 2015;52(11):1754-74.
73. Purwins S, Herberger K, Debus ES, Rustenbach SJ, Pelzer P, Rabe E, et al. Cost-of-illness of chronic leg ulcers in Germany. *Int Wound J.* abril de 2010;7(2):97-102.
74. Barnsbee L, Cheng Q, Tulleners R, Lee X, Brain D, Pacella R. Measuring costs and quality of life for venous leg ulcers. *Int Wound J.* febrero de 2019;16(1):112-21.
75. Jiang F-H, Liu X-M, Yu H-R, Qian Y, Chen H-L. The Incidence of Depression in Patients With Diabetic Foot Ulcers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Low Extrem Wounds.* 11 de junio de 2020;1534734620929892.
76. Maydick DR, Acee AM. Comorbid Depression and Diabetic Foot Ulcers. *Home Healthc Now.* febrero de 2016;34(2):62-7.
77. Souza Nogueira G, Rodrigues Zanin C, Miyazaki MCOS, Pereira de Godoy JM. Venous leg ulcers and emotional consequences. *Int J Low Extrem Wounds.* diciembre de 2009;8(4):194-6.
78. Situm M, Kolić M, Spoljar S. [QUALITY OF LIFE AND PSYCHOLOGICAL ASPECTS IN PATIENTS WITH CHRONIC LEG ULCER]. *Acta Medica Croat Cas Hrvatske Akad Med Znan.* marzo de 2016;70(1):61-3.

79. Walburn J, Weinman J, Norton S, Hankins M, Dawe K, Banjoko B, et al. Stress, Illness Perceptions, Behaviors, and Healing in Venous Leg Ulcers: Findings From a Prospective Observational Study. *Psychosom Med.* junio de 2017;79(5):585-92.
80. Zimmet P, Alberti KG, Magliano DJ, Bennett PH. Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies. *Nat Rev Endocrinol.* octubre de 2016;12(10):616-22.
81. Kaul K, Tarr JM, Kohner' EM, Chibber' R. INTRODUCTION TO DIABETES MELLITUS. :11.
82. Bailes BK. Diabetes mellitus and its chronic complications. *AORN J.* agosto de 2002;76(2):266-76, 278-82; quiz 283-6.
83. Bhagavathula N, Warner RL, DaSilva M, McClintock SD, Barron A, Aslam MN, et al. A combination of curcumin and ginger extract improves abrasion wound healing in corticosteroid-impaired hairless rat skin. *Wound Repair Regen.* mayo de 2009;17(3):360-6.
84. Zhang K, Zhang Y, Li Z, Li N, Feng N. Essential oil-mediated glycosomes increase transdermal paeoniflorin delivery: optimization, characterization, and evaluation in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine.* 5 de mayo de 2017;12:3521-32.
85. Md S, Alhakamy NA, Aldawsari HM, Husain M, Khan N, Alfaleh MA, et al. Plumbagin-Loaded Glycosome Gel as Topical Delivery System for Skin Cancer Therapy. *Polymers.* 17 de marzo de 2021;13(6):923.
86. Neuman MG, Nanau RM, Oruña-Sanchez L, Coto G. Hyaluronic Acid and Wound Healing. *J Pharm Pharm Sci.* 29 de enero de 2015;18(1):53.
87. Sharma M, Sahu K, Singh SP, Jain B. Wound healing activity of curcumin conjugated to hyaluronic acid: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* 4 de julio de 2018;46(5):1009-17.
88. Lin Y, Lin J, Hong Y. Development of chitosan/poly- γ -glutamic acid/pluronic/curcumin nanoparticles in chitosan dressings for wound regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* enero de 2017;105(1):81-90.
89. Zhang Y, McClain SA, Lee H-M, Elburki MS, Yu H, Gu Y, et al. A Novel Chemically Modified Curcumin "Normalizes" Wound-Healing in Rats with Experimentally Induced Type I Diabetes: Initial Studies. *J Diabetes Res.* 2016;2016:1-11.
90. Zhang Y, McClain SA, Lee H-M, Elburki MS, Yu H, Gu Y, et al. A Novel Chemically

- Modified Curcumin “Normalizes” Wound-Healing in Rats with Experimentally Induced Type I Diabetes: Initial Studies. *J Diabetes Res.* 2016;2016:1-11.
91. Hamam F, Nasr A. Curcumin-loaded mesoporous silica particles as wound-healing agent: An In vivo study. *Saudi J Med Med Sci.* 2020;8(1):17.
 92. Manca ML, Castangia I, Zaru M, Nácher A, Valenti D, Fernández-Busquets X, et al. Development of curcumin loaded sodium hyaluronate immobilized vesicles (hyalurosomes) and their potential on skin inflammation and wound restoring. *Biomaterials.* diciembre de 2015;71:100-9.
 93. DiPietro LA. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *J Leukoc Biol.* noviembre de 2016;100(5):979-84.
 94. Krausz AE, Adler BL, Cabral V, Navati M, Doerner J, Charafeddine R, et al. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* enero de 2015;11(1):195-206.
 95. Leng Q, Li Y, Pang X, Wang B, Wu Z, Lu Y, et al. Curcumin nanoparticles incorporated in PVA/collagen composite films promote wound healing. *Drug Deliv.* 1 de enero de 2020;27(1):1676-85.
 96. Gonzalez AC de O, Costa TF, Andrade Z de A, Medrado ARAP. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol.* 2016;91(5):614-20.
 97. Colgrave ML, Allingham PG, Tyrrell K, Jones A. Multiple Reaction Monitoring for the Accurate Quantification of Amino Acids: Using Hydroxyproline to Estimate Collagen Content. En: Alterman MA, Hunziker P, editores. *Amino Acid Analysis [Internet].* Totowa, NJ: Humana Press; 2012 [citado 19 de septiembre de 2021]. p. 291-303. (Methods in Molecular Biology; vol. 828). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-445-2_23
 98. Zahiri M, Khanmohammadi M, Goodarzi A, Ababzadeh S, Sagharjoghi Farahani M, Mohandesnezhad S, et al. Encapsulation of curcumin loaded chitosan nanoparticle within poly (ϵ -caprolactone) and gelatin fiber mat for wound healing and layered dermal reconstitution. *Int J Biol Macromol.* junio de 2020;153:1241-50.
 99. Kant V, Gopal A, Pathak NN, Kumar P, Tandan SK, Kumar D. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int Immunopharmacol.* junio de 2014;20(2):322-30.
 100. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix

Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;147:1-73.

101. Mohammadi Z, Sharif Zak M, Majdi H, Mostafavi E, Barati M, Lotfimehr H, et al. The effect of chrysin–curcumin-loaded nanofibres on the wound-healing process in male rats. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* 4 de diciembre de 2019;47(1):1642-52.

9.- ANEXOS

Anexo I. Comité Bioética



Región de Murcia
Consejería de Agua,
Agricultura y Medio Ambiente

Dirección General de Agricultura,
Ganadería, Pesca y Acuicultura

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

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

RESUELVE

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

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

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

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



09/01/2017 14:27:08
Firmante: MORALES CUENCA, CARMEN T.
Este es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico administrativo archivado por la Comunidad Autónoma de Murcia, según el artículo 30.5 de la Ley 11/2007 de 22 de junio.
Su verificación podrá ser realizada accediendo a la siguiente dirección: <https://sede.carim.es/verificadorfirmas>. Código de verificación: 097135569Yendi3as-54516564265



Proyecto de investigación A13170104