



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**Efectos de la Aplicación Tópica de Matriz Acelular  
de Vejiga Urinaria de Cerdo y Extracto de Centella  
Asiática en la Regeneración de Heridas en  
Lengua de Rata**

**D<sup>a</sup> María Rosa Torralba Ruiz**

**2018**



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D. Fabio Camacho Alonso, Profesor Titular de Universidad del Área de Estomatología en el Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Efectos de la aplicación tópica de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo y extracto de centella asiática en la regeneración de heridas en lengua de rata", realizada por D<sup>a</sup>. María Rosa Torralba Ruiz, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 19 de Julio de 2018



UNIVERSIDAD DE  
**MURCIA**

D<sup>a</sup>. Nuria García Carrillo, Doctora de Universidad del Área de Patología Experimental en el Departamento de Oftalmología, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Efectos de la aplicación tópica de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo y extracto de centella asiática en la regeneración de heridas en lengua de rata", realizada por D<sup>a</sup>. María Rosa Torralba Ruiz, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 19 de Julio de 2018



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

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

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral titulada "Efectos de la aplicación tópica de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo y extracto de centella asiática en la regeneración de heridas en lengua de rata", realizada por D<sup>a</sup> María Rosa Torralba Ruiz, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. Fabio Camacho Alonso y D<sup>a</sup>. Nuria García Carrillo, esta Comisión Académica, en sesión celebrada en fecha 30 de julio de 2018, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.

Murcia, a 30 de julio de 2018

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

**Doctorando: D<sup>a</sup>. María Rosa Torralba Ruiz**

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

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

**Mod: T-40**

Código seguro de verificación: RUXFMI3p-iK/AvF3r-iKNfhNwd-iJQkKays

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 2 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mis padres, agradeceremos todo vuestro sacrificio que ha permitido establecer una buena educación a nivel académico, profesional y, sobre todo, personal.

A ti Tomás, gracias por tu apoyo incondicional en todo momento.

A mi hermano Carlos, gracias por tus muestras de cariño.

Y, por último, agradecer a mis directores, el Prof. Dr. Fabio Camacho Alonso y la Dra. Nuria García, la gran ayuda y dedicación en la elaboración de este proyecto, que sin ellos no hubiera sido posible.

Gracias a todos de corazón...

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**ADN:** ácido dexosiribonucleico.

**Ang-1:** angiopoyetina-1.

**ARNasa/ADNasa:** ribonucleasa/endonucleasa.

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero.

**AS:** asiaticósido.

**BDNF:** factor neurotrópico derivado del cerebro.

**bFGF:** factor de crecimiento de fibroblastos básico.

**BMP:** proteína morfogenética ósea.

**BP:** curva de factores de reflexión para un cuerpo blanco perfecto.

**°C:** grados centígrados.

**CA:** Centella asiática.

**CATFF:** fracción triterpénica total de centella asiática.

**CD31:** cúmulo de diferenciación 31 o cluster of differentiation 31.

**CD68:** cúmulo de diferenciación 68 o cluster of differentiation 68.

**CM:** células madre.

**cm:** centímetros.

**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono.

**D:** dimensiones.

**DAPI:** dihidrocloruro de 4,6-diamino-2-fenilindol, D952.

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium.

**DMRB:** sistema de microscopio de contraste de fase.

**ECA:** extracto de Centella asiática.

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético.

**EDX:** Energy Dispersive Spectroscopy.

**EGF:** factor de crecimiento epidérmico.

**eNos:** óxido nítrico sintetasa endotelial.

**EOR:** especies de oxígeno reactivo.

**ETCA:** extracto titulado de centella asiática.

**FBS:** suero bovino fetal.

**FDA:** Food and Drug Administration.

**FGF:** factor de crecimiento de fibroblastos.

**g:** gramos.

**GAGs:** glicosaminoglicanos.

**GDNF:** factor neurotrópico derivado de células gliales.

**h:** horas.

**HB:** heparina.

**HB-EGF:** factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina.

**HGF:** factor de crecimiento de hepatocitos.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno.

**H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:** ácido tetraoxofosfórico.

**IGF-1:** factor de crecimiento de insulina 1.

**IL-I:** interlukina I.

**IL-1 $\beta$ :** interlukina 1  $\beta$ eta.

**iNos:** óxido nítrico sintetasa inducible.

**KCl:** Cloruro de potasio.

**KDa:** KiloDalton.

**Kg:** kilogramo.

**KGF:** factor de crecimiento de queratinocitos.

**LP:** filtro de emisión.

**m:** metros.

**MA:** madecanosido.

**MAVU:** Matriz Acelular de Vejiga Urinaria Porcina.

**MDA<sub>1</sub>:** malondialdehído.

**MDA<sub>2</sub>:** matriz dérmica acelular.

**MEC:** matriz extracelular.

**mg:** miligramo.

**mg/kg:** miligramos por kilogramos.

**mg/ml:** microgramos por mililitros.

**microARN:** micro ácido ribonucléico.

**MIP-4:** proteína inflamatoria de macrófagos.

**MIS:** mucosa intestino delgado.

**ml:** mililitro.

**mm:** milímetros.

**mmol/L:** milimol por litro.

**mol/L:** mol por litro.

**MPO:** mieloperoxidasa.

**MW:** masa molecular promedio en peso.

**$\mu$ m:** microlitro.

**μm:** micrómetros.

**n:** muestra.

**NaCl:** Cloruro de sodio.

**NaEDTA:** ácido etilendiaminotetraacético.

**NaPO<sub>4</sub>:** Fosfato de sodio.

**NGF:** factor de crecimiento nervioso.

**NHDFs:** fibroblastos dérmicos humanos normales.

**NH<sub>4</sub>OH:** hidróxido de amonio.

**nm:** nanómetros.

**nmol/g:** nanomol por gramo.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**p:** p-valor.

**PAS:** reacción del ácido peryódico-reactivo de Schiff.

**PBS:** solución salina tamponada con fosfato.

**PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas.

**RFE:** Real Farmacopea Española.

**RKP:** filtro dicroico separador de haces.

**SDS:** dodecil sulfato sódico.

**SEM:** microscopía electrónica de barrido.

**SPSS:** Statistical Package for the Social Science.

**TECA:** extracto titulado de CA.

**TGF:** factor de crecimiento transformante.

**TGF-β:** factor de crecimiento transformante βeta.

**TNF:** factor de necrosis tumoral.

**TTFC:** fracción triterpénica total.

**TTFCA:** fracción triterpenoide total de CA.

**UVB:** radiación ultravioleta tipo B.

**VEGF:** factor de crecimiento de células endoteliales vasculares.

## RESUMEN

**Objetivos:** Evaluar los efectos de la aplicación tópica de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo (MAVU) y extracto de Centella asiática (ECA) en la regeneración de heridas en lenguas de rata, realizadas con un bisturí frío. **Material y Métodos:** Las heridas se realizaron en el dorso de la lengua, utilizando un punch de biopsia, en 64 ratas macho Sprague-Dawley que fueron randomizadas en cuatro grupos (n=16 por grupo): Grupo 1 (control), Grupo 2 (ECA), Grupo 3 (MAVU con orabase), Grupo 4 (orabase). No se aplicó ningún producto en el Grupo 1 y los animales de los Grupos 2-4 recibieron tres aplicaciones tópicas diarias de los productos. Los animales se controlaron diariamente para determinar el estado de la herida y, el peso se evaluó el día 0 y el día de los sacrificios (para el estudio postoperatorio de la ingesta oral). Cuatro ratas de cada grupo fueron sacrificadas en los días 2, 7, 14 y 21 y, las lenguas fueron analizadas mediante: un análisis macroscópico morfogénico de la reparación de las heridas (porcentaje de la lengua ocupada por la herida), niveles de mieloperoxidasa (MPO) y malondialdehído (MDA), estudio histológico de la reparación de las heridas (grado de reepitelización e inflamación) y el análisis inmunohistoquímico de CD31. **Resultados:** El aumento de peso de los animales, la reparación histológica de la herida y la positividad para CD31 de mayor a menor fueron: MAVU>ECA>orabase>control, donde el grupo de MAVU presentaba diferencias estadísticamente significativas ( $p\leq 0,05$ ) con el resto de grupos, en los días 7, 14 y 21 para el aumento de peso, y en los días 2 y 7 para el estudio histológico de la herida y positividad para CD31. Finalmente, el porcentaje de lengua ocupada por la herida y los niveles de MPO y MDA de menor a mayor fueron: MAVU<ECA<orabase<control, donde el grupo de MAVU presentaba diferencias estadísticamente significativas ( $p\leq 0,05$ ) con el resto de los grupos en los días 2, 7, 14 y 21 para porcentaje de lengua ocupada por la herida y MDA; y en los días 7, 14 y 21 para MPO. **Conclusiones:** El ECA es efectivo en la regeneración tisular de la mucosa oral; sin embargo, la aplicación tópica de MAVU sobre heridas del dorso lingual ha resultado ser un tratamiento incluso más potente sobre la regeneración tisular de la mucosa oral. En este sentido, la MAVU puede ser beneficiosa en pacientes con heridas en la mucosa oral; aunque este hallazgo requiere mayor investigación clínica y de laboratorio.

## SUMMARY

**Objectives:** To evaluate the effects of topical applications of porcine acellular urinary bladder matrix (AUBM) and Centella asiatica extract (CAE) on the healing of tongue wounds created with a steel scalpel in an *in vivo* rat model. **Materials and Methods:** Wounds were made in the dorsum of the tongue using a punch tool in 64 male Sprague-Dawley rats, randomized into four groups (n=16 per group): Group 1 (control); Group 2 (CAE); Group 3 (AUBM mixed with orabase); Group 4 (orabase). No product was applied in Group 1; the animals in Groups 2-4 received three daily topical applications. Wound status was assessed daily and the animals were weighed on day 0 and at the time of euthanasia (to assess post-operative oral intake). Four rats in each group were euthanized at days 2, 7, 14 and 21 and the tongues were processed for: macroscopic morphometric analysis of wound repair (percentage of tongue occupied by wound); myeloperoxidase (MPO) and malondialdehyde (MDA) levels; histological wound repair (degree of reepithelialization and inflammation); and CD31 positivity. **Results:** The animals weight gain, histological wound repair and CD31 positivity from greatest to least were: AUBM>CAE>orabase>control, whereby the AUBM Group showed statistically significant differences ( $p\leq 0.05$ ) in comparison with the other groups at days 7, 14 and 21 for weight gain, and at days 2 and 7 for histological wound repair and CD31 positivity. Percentage of tongue occupied by wound, MPO and MPA levels from least to greatest were: AUBM<CAE<orabase<control, whereby the AUBM group showed significant differences ( $p\leq 0.05$ ) in comparison with the other groups on days 2, 7, 14 and 21 for percentage of tongue occupied by wound and MDA; and on days 7, 14 and 21 for MPO. **Conclusions:** CAE is effective for oral mucosa tissue regeneration, while topical applications of AUBM are an even more potent means of oral mucosa regeneration. In this sense, AUBM may be beneficial to patients with wounds to the oral mucosa; this finding requires further clinical and laboratory investigation.

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>I.1 RECUERDO MORFOLÓGICO DE LA CAVIDAD ORAL</b>	<b>2</b>
<b>I.1.1 HISTOLOGÍA DE LA MUCOSA DE LA CAVIDAD ORAL</b>	<b>2</b>
<b>I.1.2 CLASIFICACIÓN DE LA MUCOSA DE LA CAVIDAD ORAL</b>	<b>7</b>
<b>I.1.3 LA LENGUA. RECUERDO MORFOLÓGICO</b>	<b>7</b>
<b>I.1.3.1 HISTOLOGÍA DE LA LENGUA</b>	<b>8</b>
<b>I.1.3.2 PARTICULARIDADES DE LA LENGUA</b>	<b>10</b>
<b>I.2 HERIDAS</b>	<b>13</b>
<b>I.2.1 CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN</b>	<b>13</b>
<b>I.2.2 CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO</b>	<b>15</b>
<b>I.2.3 TRATAMIENTO</b>	<b>15</b>
<b>I.3 PROCESO DE CICATRIZACIÓN E INFLAMACIÓN DE LA HERIDA</b>	<b>17</b>
<b>I.3.1 CICATRIZACIÓN DE LAS HERIDAS</b>	<b>17</b>
<b>I.3.1.1 FASES DE LA CICATRIZACIÓN</b>	<b>20</b>
<b>I.3.1.2 CICATRIZACIÓN POR 1ª INTENCIÓN</b>	<b>24</b>
<b>I.3.1.3 CICATRIZACIÓN POR 2ª INTENCIÓN</b>	<b>26</b>
<b>I.3.2 PROCESO DE NO CICATRIZACIÓN</b>	<b>27</b>
<b>I.3.3 INFLAMACIÓN</b>	<b>29</b>
<b>I.3.3.1 AGUDA</b>	<b>30</b>
<b>I.3.3.2 CRÓNICA</b>	<b>33</b>
<b>I.4 INGENIERÍA TISULAR</b>	<b>34</b>
<b>I.4.1 CONCEPTO</b>	<b>34</b>
<b>I.4.2 APLICACIONES TERAPÉUTICAS</b>	<b>36</b>

<b>I.4. 3 REGENERACIÓN DE LA MUCOSA ORAL MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR</b>	<b>37</b>
<b>I.4.4 SISTEMA DE ADMINISTRACIÓN DE LA INGENIERÍA DE TEJIDOS</b>	<b>38</b>
I.4.4.1 CÉLULAS MADRE	38
I.4.4.2 BIOMOLÉCULAS, INDUCTORES O FACTORES DE CRECIMIENTO	40
I.4.3.3 BIOMATERIALES	40
<b>I.5 MATRIZ ACELULAR DE VEJIGA URINARIA (MAVU) PORCINA</b>	<b>45</b>
I.5.1 PREPARACIÓN DE LA MAVU	46
I.5.2 ESTRUCTURA, POROSIDAD Y PROPIEDADES INTRÍNECAS DE LA MAVU	47
I.5.3 FACTORES DE CRECIMIENTO Y ANGIOGÉNESIS	49
<b>I.6 ORABASE®</b>	<b>50</b>
<b>I.7 EXTRACTO DE CENTELLA ASIÁTICA (ECA)</b>	<b>53</b>
I.7.1 DESCRIPCIÓN	53
I.7.2 RECUERDO HISTÓRICO	55
I.7.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PRINCIPIOS ACTIVOS	56
I.7.4 ACCIONES FARMACOLÓGICAS	59
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>64</b>
<b>III. METODOLOGÍA</b>	<b>70</b>
III.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	71
III.2 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO PARA PROVOCAR LA HERIDA	71
III.3 GRUPOS EXPERIMENTALES	72
III.4 PREPARACIÓN DE LA MAVU	73
III.5 AUMENTO O DESCENSO DEL PESO POSTOPERATORIO	80
III.6 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO MACROSCÓPICO DE LA REPARACIÓN DE HERIDAS	80

<b>III.7 NIVELES DE MPO</b>	<b>82</b>
<b>III.8 NIVELES DE MDA</b>	<b>82</b>
<b>III.9 REEPITELIZACIÓN</b>	<b>83</b>
<b>III.10 INFLAMACIÓN</b>	<b>83</b>
<b>III.11 IMMUNOHISTOQUÍMICA</b>	<b>84</b>
<b>III.12 ANÁLISIS HISTOQUÍMICO</b>	<b>84</b>
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>85</b>
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>92</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>99</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>101</b>
<b>VIII. ANEXOS</b>	<b>116</b>

# I. INTRODUCCIÓN

---

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1 RECUERDO MORFOLÓGICO DE LA CAVIDAD ORAL

#### I.1.1 HISTOLOGÍA DE LA MUCOSA DE LA CAVIDAD ORAL

La cavidad oral está tapizada por una membrana mucosa húmeda que forma la barrera estructural entre el cuerpo y el medio externo denominada mucosa oral. Esta humedad es aportada por la secreción de saliva por las glándulas salivares, la cual es necesaria para evitar la aparición de procesos regresivos.

La mucosa oral está integrada por dos capas de tejido estructural y embriológicamente diferentes:

1. Tejido epitelial, de origen ectodérmico.
2. Tejido conectivo, de origen mesenquimatoso (también llamado lámina propia, corion o estroma).

Las dos capas están conectadas por una membrana basal, en una relación ondulada y no lisa. Esto es debido a que el tejido conectivo emite prolongaciones hacia el epitelio, denominadas papilas coriales, que son invaginaciones, mientras que el epitelio emite proyecciones hacia la lámina propia, en forma de evaginaciones que reciben el nombre de crestas epiteliales. Esta disposición en papilas y crestas facilita la nutrición del epitelio avascular a partir del tejido conectivo que es de carácter vascular.

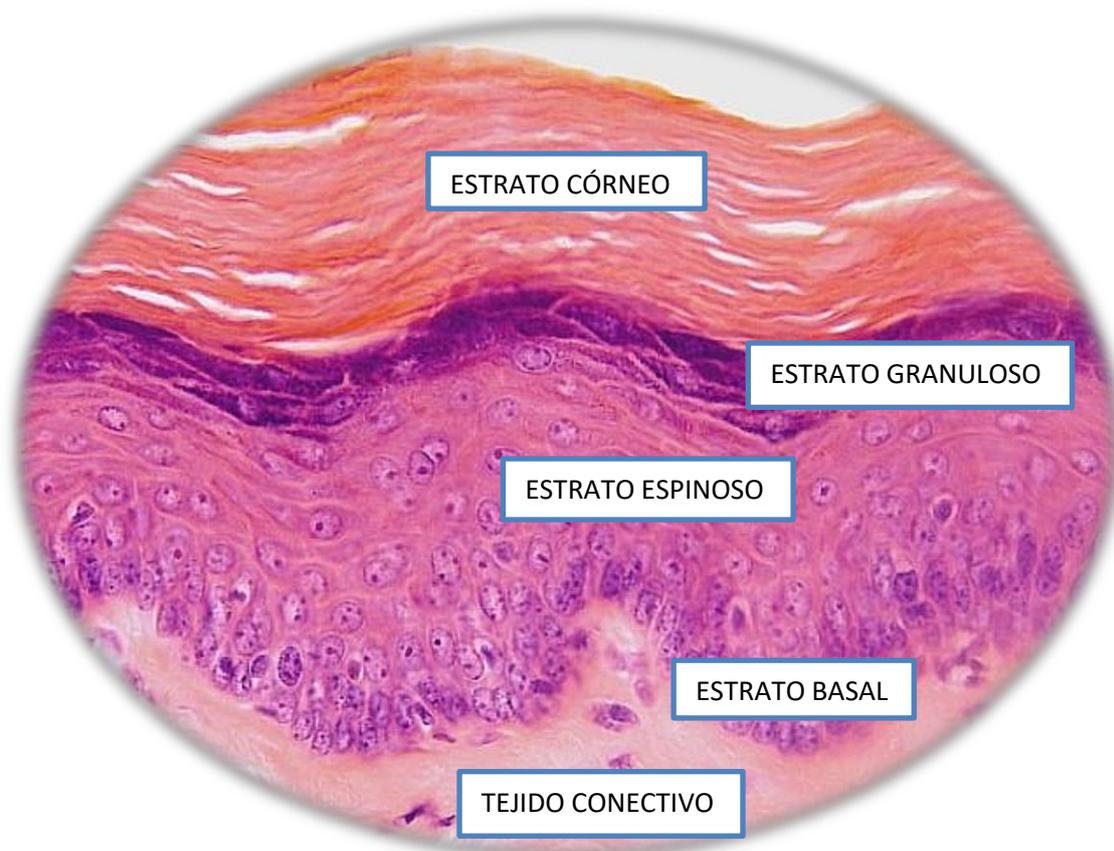
La mucosa oral está formada por:

1. **Epitelio:** puede ser de tipo plano o pavimento estratificado y, dependiendo del grado de queratinización de los queratinocitos en la cavidad oral, podemos encontrar diferentes tipos de epitelio:
  - A. Epitelio plano estratificado ortoqueratinizado.
  - B. Epitelio plano estratificado paraqueratinizado.
  - C. Epitelio plano estratificado no queratinizado.
- A. **Epitelio plano estratificado queratinizado** (Figura 1). Está constituido por dos tipos de poblaciones celulares: intrínseca formada por queratinocitos y

extrínseca de origen ajeno al epitelio formada por una población permanente y otra transitoria.

- **Población intrínseca** está constituida por los queratinocitos (células del epitelio destinadas a queratinizarse), los cuales constituyen el 90% de la población celular del epitelio de la mucosa oral, que se disponen formando cuatro capas o estratos: basal, espinoso, granuloso y córneo.

**Figura 1.** Diferenciación celular en un epitelio plano estratificado queratinizado.



Estrato basal: está constituido por una capa única de células de forma cúbica o cilíndrica, cuyo núcleo es redondo u oval. El citoplasma es intensamente basófilo conferido por los ribosomas. Los queratinocitos junto los fibroblastos del corion son los responsables de la formación de la lámina basal.

Estrato espinoso: formado por varias hileras de queratinocitos. Las células que lo constituyen son poligonales de núcleo redondo, más o menos pequeño, con citoplasma ligeramente basófilo. También se encuentran células de langerhans y células de Merkel.

Estrato granuloso: está constituido por dos o tres capas de células aplanadas o escamosas con un núcleo pequeño. El citoplasma está lleno de gránulos de queratohialina. Es la zona en la que comienza la degeneración del núcleo.

Estrato córneo: se caracteriza por estar constituido por células planas sin núcleo evidente. No presentan gránulos de queratohialina y carecen de organoides. La célula queratinizada se torna una escama compacta y deshidratada.

- **Población extrínseca permanente** representa el 9% de la población celular del epitelio y está formada por tres tipos celulares:
    - Melanocitos: células claras con núcleo pequeño, que se caracterizan por poseer abundantes gránulos precursores de melanina.
    - Células de Merkel: células claras con escasos gránulos densos de forma esférica. Son células sensoriales adaptadas para la percepción de la presión.
    - Células de langerhans: procesan y presentan los antígenos a los linfocitos T que inician una rápida respuesta inmunológica.
  
  - **Población extrínseca transitoria** representa alrededor del 1% de las células del epitelio y está constituida por granulocitos, linfocitos y monocitos.
- B. Epitelio plano estratificado paraqueratinizado. Presenta el estrato basal, espinoso y granuloso con iguales características que el queratinizado. En el estrato córneo las células conservan sus núcleos y algunas organelas celulares.
- C. Epitelio plano estratificado no queratinizado. No produce la capa superficial córnea y carece de estrato granuloso. Sus capas son: basal, intermedia y

superficial (Ferraris y Campos, 2004; Evans, 2017; Kispely y cols., 2014; Sáez, 1998).

2. **Membrana basal:** la separación entre el epitelio y el tejido conjuntivo se realiza mediante la membrana basal. Si se observa con microscopia electrónica, la membrana basal posee dos regiones: la lámina basal, sintetizada por las células del epitelio, y la lámina reticular, sintetizada por las células del conectivo.

Lámina basal: consta de dos estratos, la lámina lúcida y la lámina densa, ambos de un grosor de 50nm. En la lámina densa se detectan preferentemente colágeno tipo IV, heparansulfato y fibronectina, mientras que en la lámina lúcida encontramos laminina y entactina.

Lámina reticular: está constituida por fibras en una matriz de glucosaminoglicanos. Su espesor varía de acuerdo al grado de fricción con el epitelio suprayacente, siendo más gruesas en los epitelios queratinizados. Sus fibras son:

- Fibras de anclaje: son fibras de colágeno tipo VII que finalizan en la lámina densa y forman bucles en pequeñas áreas de anclaje con colágeno tipo IV, denominadas placas de anclaje.
- Fibras reticulares: son fibras de reticulina (colágeno tipo III). Están distribuidas paralelamente al epitelio entre las fibras de anclaje. La fibronectina colabora a fijar la lámina reticular a la lámina basal.

La membrana basal posee varias funciones, entre ellas destaca, el ser una estructura de fijación entre el epitelio y el tejido conectivo, un filtro molecular físico y químico (malla de colágeno tipo IV), por restringir el paso de cargas negativas.

Otras funciones adicionales de la membrana basal es su papel de guía para la migración celular en la reepitelización de heridas y su contribución como barrera al sistema defensivo del organismo.

Es importante mencionar que la membrana basal en la cavidad bucal presenta algunas características especiales: es más gruesa en su conjunto en los epitelios no queratinizados y con la edad disminuye progresivamente el espesor (Ferraris y Campos 2004; Evans, 2017; Qin y cols., 2017; Sáez, 1998).

3. **Lámina propia o corion:** es una lámina de tejido conectivo de espesor variable que confiere sostén y nutrición al epitelio. Estas funciones se ven reforzadas por la presencia de papilas que llevan vasos y nervios. Las papilas varían de longitud y anchura de acuerdo con la zona. El tejido conectivo puede ser laxo, denso o semidenso según la región, al igual que la distribución de células, fibras y sustancia fundamental, en función de las necesidades de las regiones de la cavidad bucal.

Entre las células podemos mencionar: fibroblastos, macrófagos, linfocitos, células cebadas y células plasmáticas. Respecto a las fibras podemos destacar tres tipos: fibras de colágeno (resisten fuerzas de tracción y evitan deformaciones de la mucosa), fibras elásticas (devuelven al tejido la normalidad después de la tensión) y fibras reticulares (refuerzan las paredes de los vasos sanguíneos). Y, respecto a la sustancia fundamental existe gran cantidad de glucosaminoglucanos que retienen el agua y permiten la difusión de nutrientes desde los vasos hacia el epitelio.

En algunas zonas, la lámina propia se adhiere al periostio o bien se dispone recubriendo la submucosa. A nivel de la lámina propia de la mucosa bucal existe una rica inervación con terminaciones nerviosas sensoriales que recogen información sobre la percepción del dolor, la temperatura, el tacto y la presión.

4. **Submucosa:** está formada por tejido conectivo laxo, destinado a unir la mucosa a los sitios adyacentes. Puede existir o no como una capa bien definida, existiendo submucosa en zonas donde se requiere movimiento y que están expuestas a choque masticatorio. Su espesor es variable y en ella se encuentran glándulas salivares, vasos, tejido adiposo y nervios. En ella las grandes arterias se dividen para formar ramas más pequeñas que penetrarán en la lámina propia. Las fibras nerviosas son mielínicas cuando atraviesan la submucosa, pero pierden la vaina de mielina antes de dividirse en la lámina propia (Sáez, 1998; Ferraris y Campos, 2004; Evans, 2017).

### I.1.2 CLASIFICACIÓN DE LA MUCOSA DE LA CAVIDAD ORAL

La mucosa de la cavidad bucal puede clasificarse de acuerdo a su localización y función en:

1. Mucosa de revestimiento.
2. Mucosa masticatoria.
3. Mucosa especializada o sensitiva.

#### 1. MUCOSA DE REVESTIMIENTO

Es la que tapiza las mejillas, el paladar blando, las porciones lateral y ventral de la lengua e interna de los labios. Rara vez percibe el impacto directo del acto masticatorio. Por lo tanto, el epitelio que lo forma es plano, estratificado y «no queratinizado». Además, por debajo del corion se encuentra otra capa conectiva denominada submucosa, que le brinda gran movilidad.

#### 2. MUCOSA MASTICATORIA

Corresponde a la zona de la encía y paladar duro. Esta mucosa es la que recibe todos los roces y fuerzas que se realizan durante la masticación. El epitelio que la constituye es plano, estratificado y «paraqueratinizado» y el corion puede ser más o menos fibroso. La submucosa está ausente y, por lo tanto, se fija fuertemente al hueso y carece de movilidad.

#### 3. MUCOSA ESPECIALIZADA Y SENSITIVA

Se denomina así a la superficie dorsal de la lengua porque la mayoría de las papilas linguales poseen intraepitelialmente corpúsculos o botones gustativos. Estas estructuras son las encargadas de recibir estímulos para captar las diferentes sensaciones gustativas (Ferraris y Campos, 2004; Sepúlveda, 2014).

### I.1.3 LA LENGUA. RECUERDO MORFOLÓGICO.

La lengua llena la mayor parte de la cavidad oral y se extiende de la boca a la faringe. De hecho, es un órgano muscular tapizado por mucosa capaz de movimientos vigorosos y precisos, tales como la preparación y manipulación de alimentos dentro de la cavidad

oral y la vocalización. El cuerpo de la lengua se compone de una masa de haces con variada disposición de fibras musculares estriadas esqueléticas que permiten una gran variación de movimientos de la lengua. Las fibras pueden ser clasificadas en dos grupos: las fibras que se originan fuera de la lengua (músculos extrínsecos) y los que se originan dentro de la lengua y que se insertan en la misma (músculos intrínsecos) (Reginato Gde y cols., 2014). Su función especial es la de participar en la recepción de los estímulos del gusto.

### I.1.3.1 HISTOLOGÍA DE LA LENGUA

Desde el punto de vista histológico está constituida por:

- Mucosa
- Submucosa
- Tejido muscular estriado

**A. Mucosa.** La lengua presenta una cara dorsal y una ventral. La mucosa que recubre a cada una de ellas es diferente (Figura 2).

- Cara o superficie ventral: presenta un epitelio de revestimiento plano estratificado delgado y liso. La lámina propia es delgada y está formada por tejido conjuntivo laxo con papilas cortas y numerosas. Es una lámina elástica que permite los cambios rápidos en forma y diámetro de la lengua durante el movimiento. Presenta numerosos cúmulos de células adiposas, glándulas salivales, y vasos sanguíneos y linfáticos. No existe submucosa. El corion está adherido a los haces musculares.

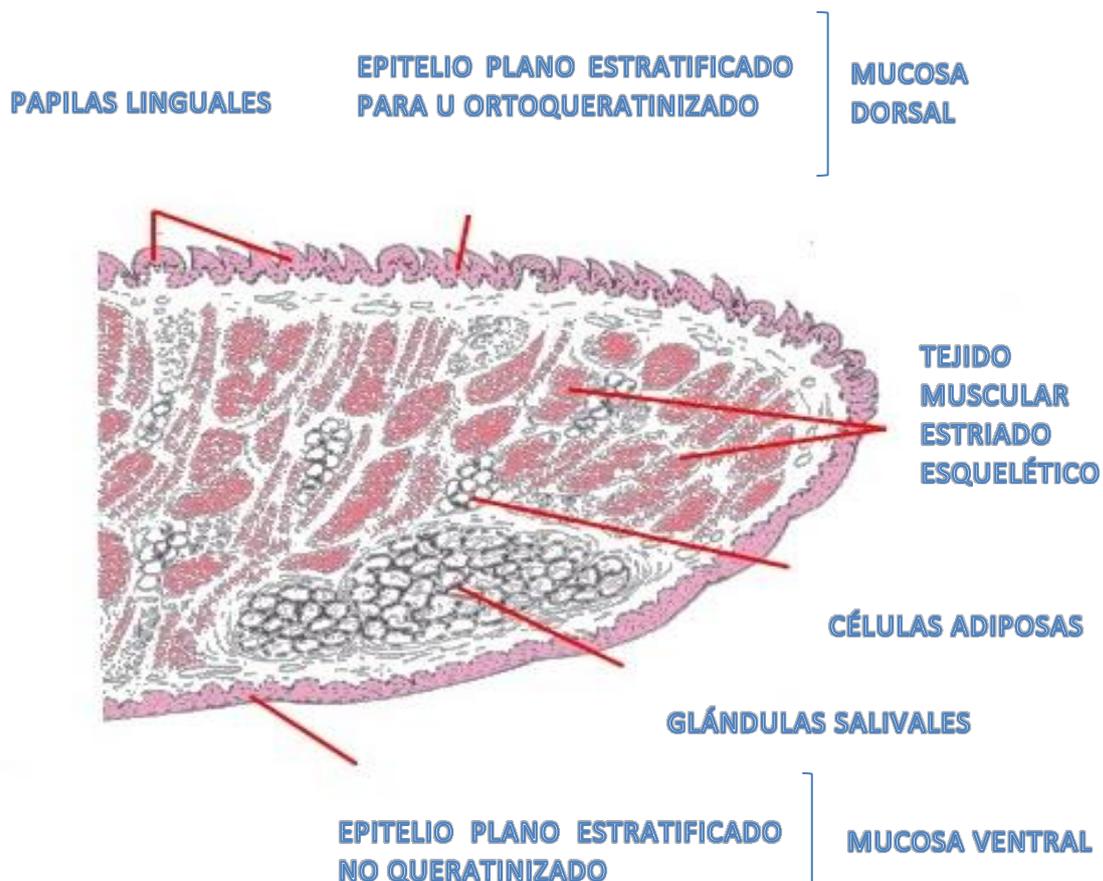
- Cara o superficie dorsal: esta mucosa está dividida en dos partes por una línea en forma de V: la que cubre los dos tercios anteriores o cuerpo lingual y, a la que cubre el tercio posterior, raíz o base de la lengua.

En el cuerpo lingual el epitelio que lo constituye es de tipo plano estratificado parcialmente cornificado; la lámina propia está formada por tejido conectivo laxo con células adiposas. Existe una separación neta de la mucosa con la submucosa que está formada por tejido conectivo denso y firme, sobre todo en la punta de la lengua donde forma la fascia lingual. En la

superficie de esta porción se evidencia un aspecto aterciopelado debido a la presencia de pequeñas proyecciones llamadas papilas linguales.

En la raíz o base de la lengua, la mucosa que la recubre no contiene papilas verdaderas y encontramos la amígdala lingual, de naturaleza linfoide. La amígdala lingual, junto con las amígdalas palatinas tubáricas y faríngeas constituye el anillo linfático de Waldeyer. Histológicamente es importante por ser la primera barrera de defensa ante las infecciones, que tienen a la boca como puerta de entrada. Este anillo linfático se ubica en la zona limítrofe entre la boca, las fosas nasales y la faringe.

**Figura 2.** Esquema de un corte sagital de la lengua.



**B. Submucosa.** Está constituida por tejido conectivo de tipo denso. A este nivel se encuentran glándulas salivales menores que reciben diferentes nombres, las glándulas de Blandin y Nuhn, situadas cerca de la punta de la lengua, y las glándulas de Weber, que están en posición lateral y posterior a las papilas caliciformes en relación con la amígdala lingual.

**C. Capa muscular.** Está constituida por una masa de haces entrelazados de fibras musculares estriadas esqueléticas, insertadas en la submucosa, que permiten la amplia gama de movimientos de este órgano.

Existen en la lengua vasos sanguíneos y linfáticos, que constituyen una red, tanto en la mucosa, como en la submucosa. Además, está inervada por nervios sensitivos como el lingual y el glossofaríngeo, en el tercio posterior.

### I.1.3.2 PARTICULARIDADES DE LA LENGUA

La mucosa del dorso lingual es diferente al resto de la mucosa oral, ello se debe a que además de su función masticatoria, tiene diferentes tipos de papilas linguales dotadas de función sensorial.

Son cuatro los tipos de papilas que se encuentran sobre la superficie de la lengua: filiformes, fungiformes, caliciformes o circunvaladas y foliadas.

- Papilas filiformes: constituyen el tipo más numeroso. De forma cónica que se descaman con regularidad. En el organismo humano suelen ser paraqueratinizadas. Presentan un eje escaso de lámina propia y carecen de papilas secundarias y botones gustativos. Se distribuyen en hileras más o menos paralelas a la V lingual, que atraviesan toda la superficie dorsal de la lengua y le otorgan el aspecto aterciopelado típico. Por la escasez de corion, clínicamente están sujetas a cambios nutricionales.
- Papilas fungiformes: reciben este nombre porque se proyectan como pequeños hongos, más delgados en la base y más dilatados en el extremo proximal. Son

menos numerosas que las filiformes y se hallan en mayor porción en la punta y en los bordes laterales de la lengua. La superficie epitelial no sigue los contornos de las papilas secundarias y, por lo tanto, los capilares llegan muy cerca de la superficie; esto último, sumado a la poca cornificación del epitelio, hace que estas papilas tengan un intenso color rojizo. Presentan los corpúsculos gustativos intraepiteliales localizados en la superficie libre y no lateral de la papila. Estas papilas por su localización y por no contener mayor cantidad de corion, son las más afectadas por procesos inflamatorios provocados por irritaciones.

- Papilas caliciformes o circunvaladas: son las más grandes de la lengua. Hay de 7 a 12 distribuidas a lo largo de la V lingual. A diferencia de las fungiformes y las filiformes no sobresalen en la superficie lingual. Cada papila, de 1 a 2mm de altura, está rodeada por un profundo surco circunvalador en cuyo fondo se abren los conductos de pequeñas glándulas salivales serosas o glándulas de von Ebner; que fabrican un líquido acuoso que se vacía en el surco y disuelve los alimentos, lo que facilitó la recepción del gusto.
- Papilas foliadas: se encuentran en un número de tres a ocho, a cada lado de la lengua (región lateral posterior). Son pliegues perpendiculares al borde de la lengua, tienen lámina propia y contienen corpúsculos gustativos. Están separadas unas de otras por el surco interpapilar. Presentan una papila primaria y, por lo general, tres secundarias. Son muy abundantes en el recién nacido y escasas en los adultos.

El sentido del gusto no está dado por las papilas gustativas, sino por pequeños corpúsculos gustativos contenidos en ellas. Son más abundantes en las papilas caliciformes, pero pueden también encontrarse en el epitelio del paladar blando y en el de otras áreas de la región bucofaríngea.

Se perciben cuatro sensaciones gustativas (salado, ácido, dulce y amargo) que pueden detectarse regionalmente en la lengua (Ferraris y Campos, 2004):

- En la punta: dulce y salado.
- Sobre los bordes: ácido.

- En el área de las papilas caliciformes, así como en el paladar blando: amargo.

La similitud entre la lengua humana y la de rata es asombrosa; sin embargo, existen unas mínimas diferencias en la distribución de las papilas, que aparecen descritas en la tabla 1 (Hendricks y cols., 2002).

**Tabla 1:** Diferencias morfológicas en la distribución de las papilas, entre la lengua humana y la de rata.

DISTRIBUCIÓN DE LAS PAPILAS EN EL DORSO LINGUAL		
PAPILAS LINGUALES	LENGUA HUMANA	LENGUA DE RATA
<b>Filiformes</b>	En ambas, cubren toda la parte anterior de la lengua, y son estructuras cónicas, con un núcleo de tejido conectivo que está cubierto de epitelio queratinizado.	
<b>Fungiformes</b>	En ambas, se hallan dispersas entre las numerosas papilas filiformes, aparecen como estructuras rojas, debido a su eje conectivo ricamente vascularizado y la falta de queratinización. Poseen receptores gustativos en el epitelio de la superficie.	
<b>Foliadas</b>	En ambas, se localizan bilateralmente en la parte posterior de los márgenes de la lengua, y tienen unos pocos botones gustativos en su pared lateral.	
<b>Caliciformes</b>	Se localizan en la región anterior de la "V" lingual. Aparecen de 8 a 12 papilas caliciformes, donde existen receptores gustativos	Se localiza en la parte más posterior del dorso lingual, detrás incluso, de las papilas foliáceas. Aparece como una única estructura circular de gran diámetro, donde existen receptores gustativos.

## I.2 HERIDAS

### I.2.1 CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN

Una herida es una solución de continuidad del tejido afectado por una falta de absorción de la fuerza traumática que la ha provocado. Cuando el tejido que ha sido herido no puede curar de forma natural, debe ser reparado manteniendo sus bordes unidos por medios mecánicos, hasta que haya cicatrizado lo suficiente como para resistir tensiones sin necesidad de dichos soportes (Cohen y cols., 1994).

La mucosa que cubre la cavidad oral consiste en una capa externa de tejido epitelial sostenido por una variable de tejido conjuntivo, dependiendo de la zona anatómica en la que se encuentre. Esta mucosa es una barrera que protege el organismo, ya que impide la penetración de cualquier agente externo que puede poner en peligro su salud (Piva y cols., 2013). Los agentes físicos o químicos (Tabla 2) pueden interrumpir la continuidad del tejido causando una lesión tisular o herida (Hupp, 2014).

**Tabla 2. CAUSAS DE LESIÓN TISULAR**

#### Físicas

- Flujo sanguíneo alterado.
- Aplastamiento.
- Deseccación.
- Incisión.
- Irradiación.
- Sobreenfriamiento.
- Sobrecalentamiento.

#### Químicas

- Sustancias con pH no fisiológico.
- Sustancias con tonicidad no fisiológica.
- Proteasas.
- Vasoconstrictores.
- Sustancias trombogénicas.

Existen múltiples clasificaciones de la herida (Bowler y cols., 2001):

### **Según el espesor de los tejidos afectados:**

- Epidérmicas o arañazos.
- Erosión: pérdida de sustancia o desprendimiento de epidermis.
- Superficiales: hasta tejido celular subcutáneo.
- Profundas, complicadas o complejas: afecta a tejidos más profundos.
- Penetrantes: a cavidades naturales, habitualmente no comunicadas con el exterior (abdomen, tórax, articulaciones, etc).
- Perforantes: afectan a vísceras huecas albergadas en aquellas cavidades.
- Por empalamiento: por orificio anal o vaginal.

### **Según la dirección:**

- Longitudinales.
- Transversales.
- Oblicuas.
- Espiroideas.

### **Según la forma:**

- Simples.
- Angulares.
- Estrelladas.
- Avulsivas o con colgajos: cuando afectan al cuero cabelludo se denominan Scalp.
- Con pérdida de sustancia.

### **Según el agente que las provoca:**

- Incisas: por instrumentos cortantes y se caracterizan por bordes limpios y netos.
- Contusas: por instrumentos romos y se caracterizan por bordes irregulares y desflecados.
- Penetrantes: producidas por agentes punzantes.

### I.2.2 CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO

La clínica se puede dividir en:

- **General:** síncope o lipotimia (por el dolor o estado emocional), shock hipovolémico (si la hemorragia es importante), cuadros clínicos por afectación de órganos.
- **Local:** dolor, hemorragia (arterial: sangre roja con latidos; venosa: oscura y sin presión; capilar: roja en sábana), y separación de los bordes de la herida.

El diagnóstico consiste en: conocer el tiempo transcurrido y mecanismo de la misma, buscar si existe hemorragia activa, revisar si existe daño a nervios, tendones, músculos y huesos, buscar posible afectación de órganos y valorar la viabilidad de los tejidos afectados (Bowler y cols., 2001).

### I.2.3 TRATAMIENTO

Las úlceras orales, originadas por procesos traumáticos, inmunológicos u otros procesos patológicos, son una de las quejas más comunes que implican a la mucosa oral y que pueden causar dolor de leve a severo. Estas lesiones se caracterizan por daños tanto del epitelio como del tejido conectivo (lámina propia) y son generalmente reparados en cuestión de semanas si el factor etiológico es remoto. El objetivo del tratamiento es aliviar los síntomas y acelerar el proceso de reparación, ya que en los pacientes con úlceras orales tales como la estomatitis aftosa recurrente y la mucositis, se asocia una reducción de la calidad de vida relacionada con la salud oral.

Diferentes protocolos terapéuticos, tales como analgésicos, corticosteroides, agentes antiinflamatorios y la fototerapia, se han probado para acelerar la cicatrización de heridas, procesar y reducir el dolor (Wagner y cols., 2013).

La curación satisfactoria de una herida se produce por cicatrización de la misma. Su tratamiento básico consistirá en afrontar por planos sus bordes y mantener este contacto en reposo el tiempo suficiente para que el organismo ponga en marcha el fenómeno de la cicatrización, que puede ser (Bowler y cols., 2001):

**Por primera intención:**

Se realiza de forma inmediata; es la más frecuentemente utilizada y la que produce una cicatriz de mejor calidad y en el menor tiempo posible. Se realiza en las primeras 24 horas y cuando ésta no está contaminada y es posible obtener unos bordes regulares que permitan un aceptable afrontamiento de los mismos.

**Por segunda intención:**

Se produce cuando el cierre se ha demorado más de 24 horas. Requiere un Friedrich o refresco de sus bordes previa a su sutura, o bien, se deja que cierre sin nuestra intervención. Produce una cicatriz de peor calidad y tarda más tiempo en curar.

Nuestra actuación será la infiltración con anestesia local de los bordes, en primer lugar, a continuación, se procederá a su limpieza y exploración, con extracción de cuerpos extraños y una buena hemostasia. Se valorarán daños a otros tejidos y lavado enérgico tanto de la herida como de las regiones adyacentes con agua y jabón neutro, seguida de abundante irrigación con solución salina. Rasurado de las zonas cercanas a la herida, excepto las cejas, que no deben rasurarse. Hemostasia con compresión digital o gasas, mediante ligaduras o incluso con bisturí eléctrico.

Debemos tener en cuenta dos factores para decidir en qué momento se realizará el cierre de la herida:

- **Aspecto de la herida:**

Presencia de suciedad, cuerpos extraños, cuantía de la necrosis, desvitalización, vascularización y presencia de signos inflamatorios (celulitis perilesional, edema, olor, etc).

- **Tiempo de producción:**

Va a determinar en gran medida la actitud a seguir. Si han pasado menos de 3 horas, se procederá al cierre primario. Si han pasado entre 3 y 12 horas, se realizará cierre primario, aunque la tasa de infección será mayor. Si han pasado más de 12 horas, se valorará la localización y la posible infección local, ya que en la mayoría de las heridas no estaría indicado el cierre primario; se

puede hacer un Friedrich y revisión en 24 horas, y si en este intervalo no aparecen signos inflamatorios ni necrosis, podemos hacer un cierre diferido en 48-72 horas.

Por último, aproximaremos los bordes mediante técnicas de sutura por planos (eliminando espacios muertos y evitando el acúmulo de secreciones que formarían seromas, hematomas o abscesos), sin tensión, con el mínimo material extraño y manteniéndola en reposo. Utilizando para ello: puntos de sutura, agrafes, puntos de esparadrapo, o pegamentos tisulares (Quinn y cols., 2000).

Para prevenir la contaminación, aislar y proteger las heridas del medio ambiente y para mayor comodidad del paciente cubrirlas con apósitos. En las heridas no complicadas, basta con gasas secas cuando no se ha dejado un drenaje; en heridas muy amplias, exudativas o en las que se prevé una fuerte reacción inflamatoria, se colocarán apósitos con abundantes gasas o compresas que recojan esas secreciones y ligeramente compresivos para contrarrestar el edema.

La herida debe mantenerse en reposo durante el tiempo que dure su cicatrización, ya que el movimiento de la zona aumenta la tensión de los bordes, aumentando la irritación de los puntos de sutura o adhesivos tisulares e interfiriendo con el proceso cicatricial.

La retirada de los puntos de sutura (en caso de no ser reabsorbibles o de no usar adhesivos tisulares) se realizará cuando la cicatriz formada sea capaz de mantener la unión de los bordes de la herida por sí sola. Esto depende en gran medida del espesor de los tejidos afectados, extensión de la herida y del tipo de material de sutura empleado en la misma. Lo habitual es mantener los puntos durante una semana a 12 días (Parell y Becker, 2003).

### I.3 PROCESO DE CICATRIZACIÓN E INFLAMACIÓN DE LA HERIDA

#### I.3.1 CICATRIZACIÓN DE LAS HERIDAS

La cicatrización de heridas es un proceso dinámico que implica interacciones complejas entre las moléculas de la matriz extracelular, mediadores solubles, células

residentes y la infiltración de leucocitos, con el objetivo inmediato de restaurar la integridad y la homeostasis del tejido (Soley Bday cols., 2016).

Los principales responsables de la cicatrización son (Cohen y cols., 1994):

- Las células sanguíneas.
- Los mediadores solubles (citoquinas).
- La matriz extracelular (MEC).
- Las células parenquimatosas.

Las citoquinas son hormonas sintetizadas por diversas células que regulan una gran variedad de procesos. Sus acciones se producen localmente o a distancia, y se clasifican en:

- Acción endocrina: actuando sobre receptores situados a distancia, utilizando como medio de transporte el torrente sanguíneo.
- Acción paracrina: actuando sobre los receptores de células vecinas.
- Acción autocrina: actuando sobre los receptores de la propia célula que la produce.
- Acción intracrina: actuando sobre su propio citoplasma sin ser secretada fuera de la célula.

La curación de las heridas se logra mediante la adecuada activación e infiltración de células inflamatorias, neutrófilos y macrófagos, que producen citoquinas pro-inflamatorias tales como factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleukina-1 (IL-1) (Shah y Amini-Nik, 2017). Estas citoquinas pro-inflamatorias resultan de la activación de varios factores de crecimiento en la superficie y bordes de la herida, tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), que tienen actividades biológicas para estimular la infiltración de células inflamatorias en el espacio de la herida.

Estos factores de crecimiento inducen la proliferación de los queratinocitos y fibroblastos, dirigidos a la nueva formación de capilares en el tejido de granulación, a la deposición de matriz extracelular modulada y a la reconstitución del área lesionada (El Gazaerty y cols., 2013). Los queratinocitos son las células tipo más prevalentes en la

epidermis, y los fibroblastos son las células tipo predominante en la dermis. Los queratinocitos secretan el PDGF y, el TGF- $\beta$ . Los fibroblastos activados migran al sitio de la herida y ponen en marcha la producción de componentes de la MEC, tales como colágeno, gelatina y fibronectina (Seo y cols., 2017).

El TGF  $\beta$  es una familia de proteína multifuncional 25 KDa (TGF  $\beta$  1, 2, 3), que estimula el colágeno y la formación de fibronectina en variedad de fibroblastos. Además, TGF  $\beta$  es conocido por regular la diferenciación de las células, inducir la quimiotaxis de células inflamatorias y la acumulación de proteína de la matriz extracelular (El Gazaerty y cols., 2013). La excesiva producción de TGF  $\beta$  se ha visto relacionada con la formación de cicatrices hipertróficas y queloides (Chao y cols., 2003).

Los principales componentes de la sustancia fundamental intercelular son (Soley Bda y cols., 2016):

- Colágeno: es una molécula con tres cadenas peptídicas  $\alpha$  y es la única proteína con hidroxiprolina. Es sintetizado en los fibroblastos en forma de procolágeno. Una vez glicosilado se secreta al espacio intercelular en forma de colágeno. En este espacio forma un entramado por medio de la lisil oxidasa. El colágeno es degradado por colagenasas. Existen unos trece tipos de colágeno, siendo el tipo I es el más importante.

La deposición de colágeno y la remodelación contribuyen a aumentar la resistencia a la tracción del tejido lesionado. Sin embargo, excesivo o disminuido, la síntesis de colágeno puede dar lugar a daños en el proceso de reparación, resultando en la formación de cicatrices anormales.

- Elastina.

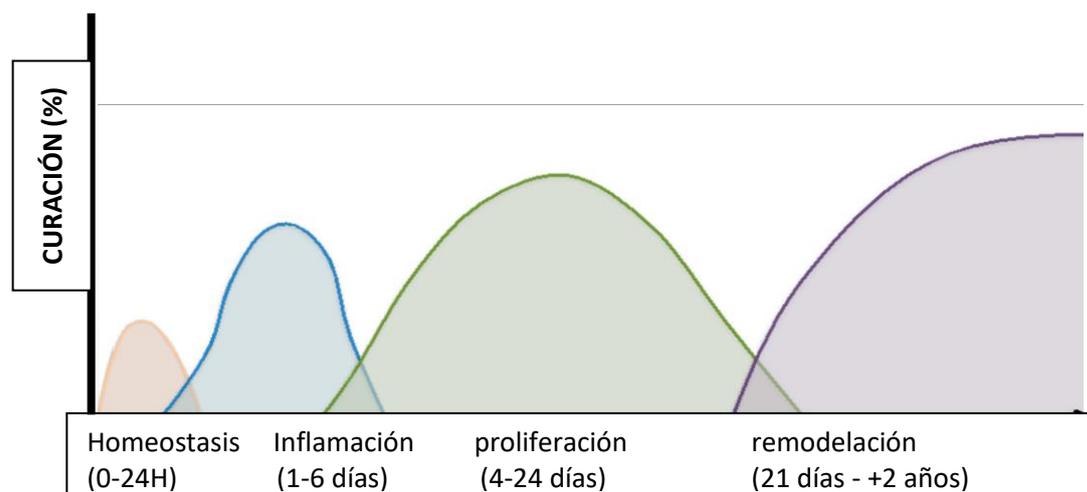
- Fibronectina, la laminina, los proteoglicanos y el ácido hialurónico.

La cicatrización de las heridas cutáneas se describe específicamente como un proceso que supone una regeneración epitelial y la formación de una cicatriz de tejido conjuntivo y que, por tanto, ejemplifica los principios generales aplicables a la curación de todas las heridas. Sin embargo, es preciso tener en cuenta que cada tejido del organismo posee células y características específicas que modifican el esquema básico expuesto (Cotran y cols., 2000).

### I.3.1.1 FASES DE LA CICATRIZACIÓN

Una cascada de etapas sucesivas y superpuestas están implicados en la cicatrización de heridas cuyo resultado es restablecer la integridad del tejido y la función (Deshpande y cols., 2016). La cicatrización de las heridas se produce en cuatro fases: hemostasia, inflamación, proliferación celular o reparación y remodelación (Lopez Jornet y cols., 2014; Than y cols., 2017). Cualquier fracaso de este proceso puede conducir a la formación de cicatrices hipertróficas, queloides o cicatrices crónicas (Soley Bda y cols., 2016) (Figura 3).

**Figura 3.** Fases del proceso de curación de las heridas: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación (Than y cols., 2017).



#### ○ Fase de hemostasia o coagulación

Esta fase inicia inmediatamente después de presentarse la lesión y se altera la integridad del tejido; tiene una duración de hasta 15 minutos. Su objetivo principal es evitar la pérdida de fluido sanguíneo mediante el cese de la hemorragia y la formación del coágulo, protegiendo así el sistema vascular y la función de los órganos vitales (Guarin Corredor y cols., 2013). Inmediatamente, tras la agresión quirúrgica, se produce una vasoconstricción por la liberación de catecolaminas en un primer intento hemostático del organismo. En este instante las plaquetas ya

producen fibrina y se liberan los mediadores de la inflamación. El coágulo sanguíneo mantiene la hemostasia y sirve de “matriz extracelular” para la migración celular (Yücel y cols., 2003).

○ **Fase inflamatoria**

Esta fase tiene su inicio hacia el minuto 16 y presenta una duración de hasta seis días; se presenta como respuesta protectora e intenta destruir o aislar aquellos agentes que representen peligro para el tejido, ya que sin dicha remoción de las células afectadas no se dará inicio a la formación de nuevo tejido (Guarin Corredor y cols., 2013). Es clínicamente caracterizada por el signo cardinal de enrojecimiento, picor, hinchazón, dolor y pérdida de la función, que comienza inmediatamente después de la lesión del tejido, que es iniciada y mantenida por la cascada de la coagulación, la ruta del ácido araquidónico y la creación de factores de crecimiento y citoquinas (El Gazerly y cols., 2013). Se considera como un período crítico para la cicatrización de las heridas porque las células inmunes eliminan tejidos dañados, cuerpos extraños y el tejido muerto (Lopez Jornet y cols., 2014).

Como respuesta a la agresión, y una vez finalizado el fenómeno de vasoconstricción transitoria, tiene lugar una vasodilatación, con aumento de la permeabilidad capilar y migración celular. Esta respuesta, propia de la inflamación, se debe a la liberación de mediadores, como son las citoquinas, histamina, cininas y prostaglandinas. Los elementos celulares que más participan son:

- Las plaquetas: que además de participar en la hemostasia son células secretoras de importantes mediadores para la cicatrización, como por ejemplo el factor de crecimiento derivado de las plaquetas que atrae y activa a macrófagos y fibroblastos.
- Los neutrófilos: que limpian la herida de partículas extrañas y bacterias. Después de realizar su labor son expulsados con la escara de fibrina o fagocitados por los macrófagos.
- Los monocitos: que habitualmente circulan por el torrente sanguíneo son también reclutados por quimiotaxis. Estos se transforman en macrófagos activados que liberan diversos factores de crecimiento, los que favorecen el inicio de la formación del tejido de granulación. Los macrófagos se adhieren a la

matriz extracelular y hacen que otros monocitos se transformen en macrófagos inflamatorios y reparadores. Los macrófagos tienen un papel fundamental en la transición entre inflamación y reparación (Coulombe, 2003; Benavides, 2008).

○ **Fase de reparación o proliferación celular**

La fase proliferativa comienza aproximadamente 2-3 días después de la herida (El Gazerly y cols., 2013), dura aproximadamente de 15 a 20 días (Guarin Corredor y cols., 2013) e incluye la producción de nuevo de células epiteliales y endoteliales y fibroblastos del tejido residente (Deshpande y cols., 2016). Un nuevo tejido va sustituyendo el defecto producido por la agresión. Este tejido procede de la epidermis adyacente y del nuevo tejido conjuntivo que se va formando, también llamado tejido de granulación. De esta manera se producen tres hechos fundamentales: epitelización, formación de tejido de granulación y neovascularización.

1. La epitelización: o crecimiento de la epidermis desde sus capas basales.
2. La formación de tejido de granulación: o formación de matriz extracelular mediante la síntesis de colágeno y sustancia fundamental.
3. La neovascularización: neoangiogénesis o neoformación vascular, que consiste en el crecimiento de yemas vasculares desde los vasos hemostáticos.

1. Epitelización:

La reepitelización de las heridas comienza unas horas después de producida la lesión. Inmediatamente después, las células epiteliales retraen sus tonofilamentos, pierden sus desmosomas (uniones intercelulares) y forman filamentos de actina para desplazarse. De esta forma, estas células migran sobre la herida, en un proceso mediado por unos receptores (integrinas) que expresan sobre la superficie celular. Uno o dos días después de la lesión se produce la proliferación desde los bordes de la herida. Las células epiteliales adquieren su fenotipo normal al restablecerse la integridad de la membrana basal (Ortonne y cols., 1981; Singer y McClain, 2003; Garlick y Taichman, 1994; Paladini y cols., 1996).

## 2. Formación del tejido de granulación:

Es el nuevo estroma al que denominamos tejido de granulación. Al cuarto día comienza a invadir el defecto de la herida. Los macrófagos se encargan de liberar los mediadores de la angiogénesis y la fibroplasia. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas y el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF  $\beta 1$ ) estimulan la proliferación de fibroblastos. Estos comienzan la formación de una matriz extracelular constituida por fibrina, fibronectina y ácido hialurónico. Esta matriz provisional es sustituida posteriormente por una matriz colagenosa, por la acción del TGF  $\beta 1$ . Las alteraciones de este proceso de sustitución son las responsables de la formación de los queloides y las cicatrices hipertróficas. Aunque antes se pensaba que el colágeno se sintetizaba días después de la agresión, ahora se ha demostrado que su síntesis comienza después de 10 horas, y que se alcanza la máxima función sintética entre el quinto y el séptimo día (Luo y cols., 2003).

## 3. Neovascularización:

La angiogénesis es estimulada inicialmente por los factores de crecimiento fibroblásticos procedentes de los macrófagos activados. Posteriormente, la hipoxia produce la liberación del factor de crecimiento endotelial de las células epidérmicas. La fibronectina parece jugar un papel importante en el movimiento de las células endoteliales. La proliferación de yemas vasculares cesa cuando el tejido de granulación cubre la herida (Soybir y cols., 2003; Cherry y Hughes, 2003; Rodgers y cols., 2003; Than y cols., 2017).

### ○ **Fase de remodelación o maduración**

En esta fase se originan los fenómenos de:

#### 1. Contracción de la herida:

Durante la segunda semana de cicatrización, los fibroblastos forman microfilamentos de actina en la cara citoplasmática de su membrana celular y multiplican sus uniones intercelulares. Estos miofibroblastos interactúan entre sí, y con la matriz colagenosa, para producir la contracción de la herida. Este proceso facilita la cicatrización de la lesión, aproximando los bordes del defecto.

Su acción se manifiesta en las cicatrices por segunda intención (Milbourn y Israelsson, 2004).

## 2. Reorganización de la matriz extracelular:

Una vez que cesan la inflamación, la fibroplasia y la angiogénesis se produce un equilibrio entre síntesis y catabolismo de colágeno. El catabolismo del colágeno depende de las denominadas metaloproteasas sintetizadas por diversas líneas celulares. De esta forma, el tejido de granulación se transforma en cicatriz propiamente dicha, aumentando su resistencia. Así, las fibras de colágeno se alinean en el sentido de las fuerzas tensionales a la que es sometido el tejido cicatricial, para poder alcanzar una máxima resistencia. Después de tres semanas la cicatriz sólo alcanza el 20% de su fuerza final. Posteriormente, alcanza lentamente su máxima resistencia. En la piel, por ejemplo, la máxima fuerza de resistencia que alcanza la cicatriz es el 70% de la que tendría sin sufrir lesión. Esta resistencia la alcanza al año de producirse la lesión (Sheridan y Padgett, 2004).

### I.3.1.2 CICATRIZACIÓN POR PRIMERA INTENCIÓN

Uno de los ejemplos más simples de reparación de las heridas es la cicatrización de una incisión quirúrgica limpia, no infectada, con los bordes aproximados mediante suturas quirúrgicas. Se denomina cicatrización primaria o por primera intención. La incisión sólo causa una interrupción focal de la continuidad de la membrana basal epitelial y, la muerte de un número relativamente escaso de células epiteliales y de tejido conjuntivo. En consecuencia, la regeneración epitelial predomina sobre la fibrosis. La fibrina procedente de la sangre coagulada ocupa con rapidez el estrecho espacio de la incisión: la deshidratación de la superficie produce una costra que recubre y protege el lugar de la reparación (Cotran y cols., 2000).

#### En las primeras 24 horas:

Se observan neutrófilos en los bordes de la incisión, que se desplazan hacia el coágulo de fibrina. Las células basales del borde cortado de la epidermis comienzan a mostrar un aumento de la actividad mitótica. En 24 a 48 horas, las células epiteliales de ambos bordes han comenzado ya a desplazarse y proliferar a lo largo de la dermis,

depositando componentes de la membrana basal conforme avanzan. Las células se encuentran en la línea media bajo la superficie de la costra y forman una capa epitelial delgada pero continua.

#### En el día 3:

Gran parte de los neutrófilos se han reemplazado por macrófagos y el tejido de granulación invade de forma progresiva el espacio de la incisión. Las fibras de colágeno son ya evidentes en los bordes de la herida, pero están orientadas verticalmente y no se extienden de un borde a otro. La proliferación de células epiteliales continúa y la capa epidérmica es más gruesa.

#### En el día 5:

La neovascularización alcanza su máxima expresión a medida que el tejido de granulación ocupa el espacio de la incisión. Las fibrillas de colágeno son más abundantes y comienzan a unir los bordes de la herida. La epidermis recupera su espesor normal a medida que la diferenciación de las células de superficie produce una estructura epidérmica madura con queratinización superficial.

#### Durante la segunda semana:

Tiene lugar una acumulación continua de colágeno y proliferación de fibroblastos. El infiltrado leucocítico, el edema y la mayor vascularización son mucho menores. Se inicia el proceso prolongado de “blanqueamiento”, debido al depósito creciente de colágeno en el seno de la cicatriz y a la regresión de los conductos vasculares.

#### Al final del primer mes:

La cicatriz está formada por un tejido conjuntivo celular carente, en gran parte, de células inflamatorias, y recubierto por una epidermis prácticamente normal. No obstante, los anejos cutáneos destruidos en la línea de incisión no se recuperan. El tiempo aumenta la resistencia a la tensión de la herida (Felzani, 2005).

Este proceso de cicatrización requiere de una menor reepitelización, depósito de colágeno, contracción y remodelación. Por lo tanto, la cicatrización ocurre mucho más

rápido, con un bajo riesgo de infección y con una menor formación de cicatriz que en las heridas que lo hacen por segunda intención. Ejemplos de este tipo de reparación son: reducción adecuada de fracturas de hueso, reposición de laceraciones o incisiones bien suturadas, colgajos y reanastómosis anatómica de los nervios (Hupp, 2014).

### I.3.1.3 CICATRIZACIÓN POR SEGUNDA INTENCIÓN

Cuando la pérdida de células o de tejido es más extensa, como sucede en: un infarto, una úlcera inflamatoria, en la formación de abscesos o incluso en heridas extensas, el proceso de reparación es más complejo. En estas circunstancias, la mera regeneración de las células parenquimatosas no puede restablecer la estructura original. En consecuencia, existe una penetración importante de tejido de granulación desde los bordes de la herida, seguida con el tiempo de una acumulación de matriz extracelular y formación de una cicatriz. Esta forma de curación se conoce como cicatrización secundaria o por segunda intención.

La cicatrización secundaria difiere de la primaria en (Cotran y cols., 2000):

- Los defectos hísticos extensos contienen, por su propia naturaleza, mayores volúmenes de restos necróticos, exudado y fibrina que deben eliminarse. Por consiguiente, la reacción inflamatoria es más intensa, con un mayor potencial de lesiones secundarias, mediadas por la inflamación.
- La cantidad de tejido de granulación formada es mucho mayor. Los defectos de mayor extensión acumulan un mayor volumen de tejido de granulación para ocupar las soluciones de continuidad de la estructura del estroma y proporcionar el andamiaje subyacente para el crecimiento del nuevo tejido epitelial. En general, cuanto mayor es el volumen de granulación, mayor es la masa de tejido cicatricial.
- La cicatrización secundaria muestra el fenómeno de contracción de la herida. En un plazo de seis semanas, por ejemplo, los defectos cutáneos extensos pueden experimentar una reducción del 5% al 10% de su tamaño original, en gran parte por contracción. Este proceso se atribuye a la presencia de

miofibroblastos, unos fibroblastos modificados que poseen muchas de las características estructurales y funcionales de las células contráctiles del músculo liso.

En definitiva, la cicatrización por segunda intención significa que existe pérdida de tejido que impide la reaproximación de los bordes de la herida. Esta cicatrización se da regularmente en tejidos poco flexibles, cuyos bordes no se pueden aproximar, por lo que se requiere una gran cantidad de migración epitelial, depósito de colágeno, contracción y remodelación durante la curación. Su evolución es muy lenta y genera una cicatriz de mayor tamaño que en el caso de la cicatrización por primera intención existiendo un mayor riesgo de infección en la herida. Ejemplos de este tipo de cicatrización son los alvéolos dentarios postextracción, fracturas mal consolidadas, úlceras profundas y cualquier herida extensa con avulsión de tejido blando.

Algunos cirujanos utilizan el término de cicatrización por tercera intención o cierre primario diferido, para referirse a la cicatrización que ocurre cuando se cierra una herida después de un período de cicatrización por segunda intención. El cierre se hace cuando se está seguro de que se ha superado el riesgo de infección. Por ejemplo, heridas que curan mediante injertos tisulares para cubrir grandes áreas y salvar el espacio entre sus márgenes (Hupp, 2014).

### **I.3.2 PROCESO DE NO CICATRIZACIÓN**

El proceso de cicatrización o curación de heridas está determinado por la continuidad de cada una de las fases que lo caracteriza (hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación); cuando se presenta algún tipo de alteración que entorpezca su desarrollo en el tiempo preestablecido como normal, se genera una lesión crónica, la cual presenta un detenimiento o retraso en la fase de inflamación o en la fase proliferativa.

La respuesta humoral ante estas lesiones refleja exceso en la producción de metaloproteinasas, factores de crecimiento y citoquinas. Las metaloproteinasas son proteínas adhesivas necesarias para que se genere el proceso normal de curación de una herida y son importantes en el proceso de degradación de la MEC y la remodelación del tejido que está en proceso de cicatrización. Adicional a esta respuesta, un factor

común es la presencia de microorganismos que colonizan las lesiones y retardan el proceso de cicatrización.

La remodelación de la matriz en las heridas crónicas no se genera de la misma forma que en una herida aguda. El aumento del proceso proteolítico produce una degradación incontrolada del tejido lo que conduce a una herida que no cicatriza. Esto se debe a que el fluido presente en la herida que no cicatriza contiene una alta concentración de metaloproteinasas. Éstas generan una disminución en la proliferación celular y en la angiogénesis, incrementando la degradación de la MEC y alterando la adecuada reparación tisular (Guarin Corredor y cols., 2013).

Existen cuatro factores que pueden dificultar la cicatrización de las heridas en una persona sana:

**Cuerpo extraño.** Un cuerpo extraño es cualquier elemento que el sistema inmunitario del organismo del huésped interpreta como <<no propio>>, como bacterias, suciedad y material de suturas. Los cuerpos extraños causan tres problemas básicos. En primer lugar, las bacterias pueden proliferar y producir una infección en la que las proteínas liberadas atacan al tejido del huésped. En segundo lugar, el cuerpo extraño actúa como refugio de las bacterias frente a las defensas del organismo, lo que favorece la infección. En tercer lugar, un cuerpo extraño suele ser antigénico y estimular la formación de una reacción crónica inflamatoria que disminuye la fibroplasia.

**Tejido necrótico.** El tejido necrótico en la herida provoca dos problemas. El primero es que su presencia actúa como una barrera que impide el crecimiento de las células reparativas. De esta forma se prolonga la fase inflamatoria mientras los leucocitos eliminan el material de desecho, mediante procesos de lisis enzimática y fagocitosis. El segundo problema es que, como ocurre con los cuerpos extraños, el tejido necrótico sirve de nicho protector para las bacterias. Este tejido con frecuencia tiene sangre que procede de la herida (hematoma), actuando así, como una excelente fuente de nutrientes para las bacterias.

**Isquemia.** La disminución del aporte sanguíneo a la herida interfiere de diferentes formas con la reparación de la misma. Este menor aporte puede causar más necrosis tisular o disminuir el aporte de anticuerpos, leucocitos y antibióticos en la herida, con lo que el riesgo de infección aumenta. La isquemia reduce el aporte de oxígeno y nutrientes necesarios para una cicatrización adecuada. La isquemia puede a su vez estar causada por varios factores, entre ellos suturas demasiado apretadas o colocadas de manera incorrecta, colgajos mal diseñados, excesiva presión externa sobre la herida, presión interna sobre la misma (ej. Hematoma), hipotensión sistémica, enfermedad vascular periférica y anemia.

**Tensión.** La tensión sobre la herida es otro factor que puede dificultar su cicatrización. En este caso, la tensión se refiere a cualquier situación que tienda a separar los márgenes de las heridas. Si las suturas se utilizan para aproximar los tejidos por tracción, el tejido comprendido entre las suturas será estrangulado y se producirá isquemia. Si las suturas se retiran demasiado pronto, es probable que se reabra la herida bajo tensión y que cicatrice con una formación excesiva de tejido cicatricial y contracción de la herida. Si las suturas se dejan demasiado tiempo con el fin de vencer la tensión de la herida, ésta todavía tenderá a abrirse durante la fase de remodelación y, además, se epitelizará el trayecto de las suturas a través del epitelio, lo que dejará marcas permanentes y desfigurantes (Hupp, 2014).

### 1.3.3 INFLAMACIÓN

La definición de la inflamación sería como la reacción del tejido vivo vascularizado a una agresión local. Los invertebrados sin aparato circulatorio, los organismos unicelulares y los parásitos multicelulares tienen sus respuestas particulares a las agresiones locales; pero lo que caracteriza al proceso inflamatorio en las formas biológicas superiores es la reacción de los vasos sanguíneos, que conduce al acúmulo de líquido y células sanguíneas (Chao y cols., 2003; Benavides, 2008).

La inflamación destruye, diluye o aísla el agente lesivo y pone en marcha una serie de acontecimientos que curan y reconstruyen el tejido lesionado. La reparación comienza en las primeras fases de la inflamación, pero sólo suele ser completa cuando la influencia lesiva ha sido neutralizada (Yücel y cols, 2003).

Los signos característicos de la inflamación son (Villalba Herrera, 2014; Hupp, 2014):

- 1) Calor: o aumento local de la temperatura secundario a la vasodilatación y aumento de consumo local de oxígeno.
- 2) Rubor: o enrojecimiento producido por el aumento de irrigación en la zona afectada, por incremento del flujo sanguíneo.
- 3) Dolor: provocado por distensión de los tejidos y liberación de prostaglandinas como mediadores químicos.
- 4) Edema: o hinchazón resultante del aumento de la permeabilidad capilar y consiguiente sufusión de líquido en el tejido intersticial.

A estos signos se le suma un quinto signo clínico, *functio laesa* (Virchow, 1821-1902) que es la pérdida de funcionalidad, resultante de la limitación a la que conduce la conjugación de los cuatro signos ya mencionados.

### I.3.3.1 AGUDA

La inflamación aguda tiene una duración relativamente corta, desde unos minutos a varias horas o uno o varios días, y sus principales características son la exudación de líquido y proteínas plasmáticas (edema) y la emigración leucocitaria, predominantemente, de neutrófilos. Independientemente de la naturaleza del agente agresivo, la inflamación aguda es bastante estereotipada (Villalba Herrera, 2014).

Aunque no es fácil diferenciar claramente distintos momentos en un proceso dinámico, podemos distinguir tres fases fundamentales (Chao y cols., 2003):

#### 1. Cambios del flujo y calibre vascular:

Primero se produce una vasoconstricción transitoria de las arteriolas. El siguiente y fundamental acontecimiento es la vasodilatación, que primero afecta a las arteriolas y luego da lugar a la apertura de nuevos lechos vasculares en la zona. Esto se sigue de una menor velocidad de la circulación, consecuencia del incremento de la permeabilidad de la microvascularización.

A medida que se desarrolla la estasis, comienza a observarse el desplazamiento de los leucocitos, principalmente neutrófilos, hacia el endotelio vascular, proceso denominado marginación leucocitaria. Los leucocitos se adhieren al endotelio,

primero de forma transitoria, luego más ávidamente; poco después emigran a través de la pared vascular, hacia el tejido intersticial, proceso denominado migración.

### 2. Cambios de la permeabilidad vascular:

La vasodilatación y el aumento de la presión hidrostática pueden dar lugar a cierto grado de trasudación. Sin embargo, ésta es enmascarada pronto por el incremento de la permeabilidad y exudación de proteínas plasmáticas, el hecho característico del edema inflamatorio agudo.

En el edema inflamatorio se produce una pérdida de líquido rico en proteínas que se escapa a través del endotelio y, por lo tanto, hay una reducción de la presión osmótica intravascular, acompañada de incremento de la presión osmótica en el líquido intersticial, lo que conduce a una alteración en el retorno del líquido a la sangre, en el extremo venoso del capilar. Por consiguiente, existe una marcada salida de líquido.

### 3. Participación celular: exudación leucocitaria y fagocitosis:

El acúmulo de leucocitos (principalmente neutrófilos y monocitos) es el rasgo más importante de la reacción inflamatoria. Los leucocitos engloban y fagocitan las bacterias, inmunocomplejos, restos celulares necróticos y sus enzimas lisosómicas, que contribuyen de otras formas en la respuesta defensiva. El paso de leucocitos del interior del vaso sanguíneo al foco de la lesión se produce por:

#### - Marginación:

Conforme se produce la pérdida de velocidad y el estancamiento del flujo, los leucocitos se separan de la columna central del vaso sanguíneo, y se colocan en contacto con el endotelio. Primero las células ruedan lentamente a lo largo de las paredes de los capilares y vénulas y, finalmente, se paran en algún punto.

#### - Adherencia:

Los leucocitos se adhieren en gran número a la superficie endotelial. En el incremento de la adhesión leucocitaria intervienen interacciones específicas entre moléculas de adherencia complementarias, presentes en las superficies leucocitarias y endotelial.

- Emigración y quimiotaxis:

La emigración alude al proceso mediante el cual los glóbulos blancos móviles escapan de los vasos hacia los tejidos perivasculares. Todos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y linfocitos, utilizan la misma vía. En la mayoría de los casos de inflamación aguda predominan los neutrófilos, en los primeros momentos de la reacción inflamatoria, siendo sustituidos por los monocitos más tarde. Esto se explica fundamentalmente debido a: a) los neutrófilos, de corta vida, se desintegran y desaparecen en 24-28 horas, en tanto que los monocitos sobreviven mucho más tiempo en los tejidos; b) la emigración de los monocitos se mantiene mucho después de haber cesado la de los monocitos, y c) los factores quimiotácticos para los leucocitos y monocitos son activados en momentos diferentes de la reacción.

- Fagocitosis y degranulación:

La fagocitosis y la liberación de enzimas por los neutrófilos y macrófagos constituyen dos de los principales beneficios derivados del acúmulo de los leucocitos en el foco inflamatorio. En primer lugar, la partícula que va a ser ingerida se adhiere a la superficie del leucocito, un fenómeno que requiere alguna forma de reconocimiento por parte del leucocito. El segundo paso es el englobamiento, con la siguiente formación de una vacuola fagocítica. El tercero es la destrucción y degradación del material ingerido.

- Liberación extracelular de los productos leucocitarios:

Las alteraciones que se producen en las membranas de los neutrófilos y monocitos, tras la unión receptor-ligando durante la quimiotaxis y fagocitosis, dan lugar a la secreción de productos no sólo dentro del fagolisosoma, sino también al espacio extracelular. Las más importantes son: a) enzimas lisosómicas; b) metabolitos activos derivados del oxígeno; y c) productos del metabolismo del ácido araquidónico, incluyendo prostaglandinas y leucotrienos. Estos productos son poderosos mediadores de los efectos celulares y vasculares de la inflamación y lesión tisular, y amplifican los efectos del estímulo inflamatorio inicial.

### I.3.3.2 CRÓNICA

La inflamación aguda puede seguir una de las siguientes evoluciones (Singer y McClain, 2003):

- A. Resolución completa: con recuperación normal de la zona inflamada; ésta es la evolución habitual cuando la lesión es leve, como en una quemadura superficial, y cuando ha habido escasa destrucción tisular.
- B. Curación por cicatrización: ocurre cuando ha habido una sustancial destrucción tisular, cuando la inflamación ha ocurrido en tejidos que no se regeneran y si ha habido una abundante exudación de fibrina.
- C. Abscesificación: se produce principalmente en las infecciones por microorganismos piógenos.
- D. Progresión a la inflamación crónica: aunque la transición entre la inflamación aguda y crónica es a veces difícil de delimitar, la respuesta inflamatoria crónica tiene algunas características particulares que permiten su descripción separada.

La inflamación crónica es un proceso prolongado, existiendo en ese tiempo destrucción tisular, inflamación activa y un repetitivo intento de reparación (Villalba Herrea, 2014).

Las características histológicas de la inflamación crónica son:

1. Infiltración de células mononucleadas, principalmente macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.
2. Proliferación de fibroblastos y, en muchos casos, de pequeños vasos sanguíneos.
3. Incremento del tejido conjuntivo (fibrosis).
4. Destrucción tisular.

La infiltración de monocitos y macrófagos es un componente, particularmente, importante de la inflamación crónica. Sin embargo, en la inflamación aguda de corta

duración, si se elimina el agente irritante, los macrófagos terminan desapareciendo (porque se destruyen o porque pasan a los vasos linfáticos y de allí a los ganglios linfáticos). Si el agente lesivo no es eliminado, como ocurre en la infección tuberculosa, en algunas reacciones inmunitarias o cuando existe un irritante crónico, el acúmulo de macrófagos puede persistir durante largos períodos de tiempo.

Otros tipos celulares presentes en la inflamación crónica son los linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y células cebadas. Aunque los leucocitos polimorfonucleares suelen ser considerados el rasgo característico de la inflamación aguda, muchas formas de inflamación crónica, que pueden durar varios meses, continúan conteniendo grandes cantidades de neutrófilos y forman el pus. En la inflamación crónica del hueso (osteomielitis), el exudado neutrófilo puede persistir durante meses.

En definitiva, la inflamación crónica se resuelve mediante la proliferación de fibroblastos y colágeno, y la reducción de los vasos; aunque en fases tempranas podemos encontrar algunos monocitos aislados (Cotran y cols., 2000).

## I.4 INGENIERÍA TISULAR

### I.4.1 CONCEPTO

Los enfoques actuales para el desarrollo de terapias regenerativas han sido influenciados por nuestra comprensión en el desarrollo embrionario, la biología de células madres (CM) y la tecnología de la ingeniería tisular.

La premisa básica de la ingeniería de tejidos es que la manipulación controlada del microambiente extracelular puede conducir al control de la capacidad de las células para organizarse, crecer, diferenciarse, formar una matriz funcional extracelular y el nuevo tejido funcional. Tal control es un proceso complejo que requiere señales autocrinas, paracrinas y endocrinas, señales de posición, interacciones célula-matriz, fuerzas mecánicas y los contactos célula-célula para mediar en la formación de la arquitectura del tejido 3D y su función (Morales Navarro, 2014).

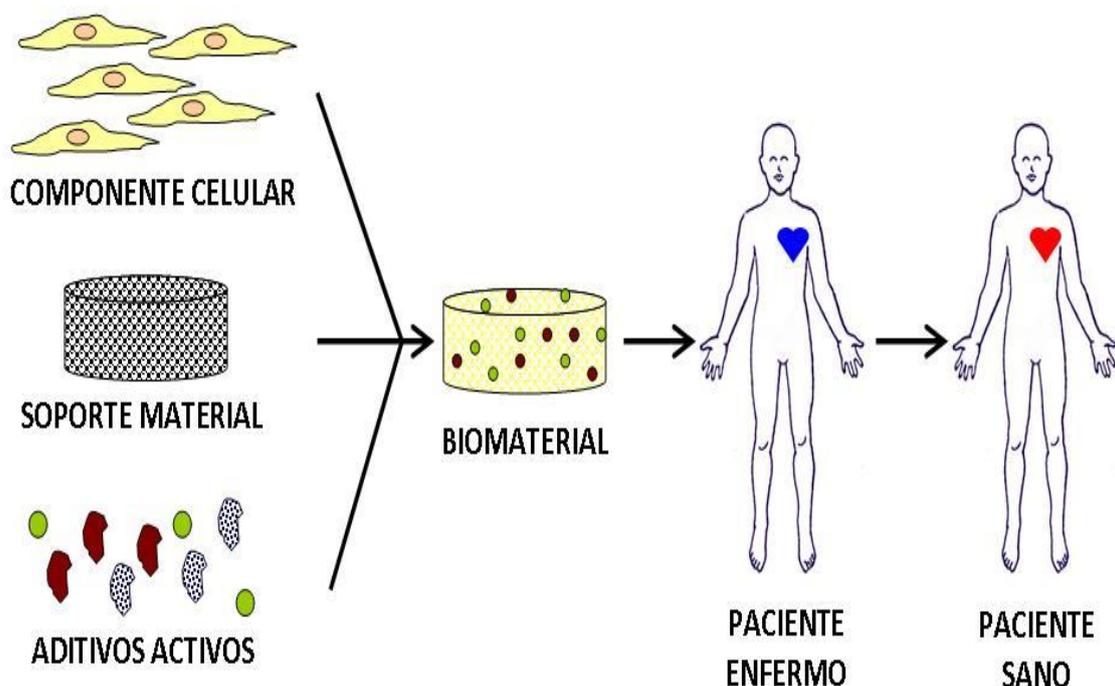
La ingeniería tisular o medicina regenerativa es el área científico-médica basada en el uso de células vivas, en la manipulación del entorno extracelular y en la creación de sustitutos biológicos, para su posterior implantación en el organismo vivo con el objetivo de reparar o reemplazar la anatomía y función de un órgano o tejido (Figura 4). Aparecen

dos pilares básicos sobre los cuales se sustenta la ingeniería tisular: el uso de andamiajes o *scaffolds* biocompatibles, encargados de proporcionar el medio adecuado para el desarrollo y diferenciación celular Y, por otro lado, el cultivo de poblaciones celulares aisladas, determinadas por el tipo de tejido a regenerar (Falke y Atala, 2000; Pokrywczynska y cols., 2014). Sin embargo, este enfoque, depende fuertemente de la biocompatibilidad del andamio, la propensión de expansión de las células autólogas y las interacciones entre el andamio y las células sembradas (Parhat y cols., 2006). El uso de células autólogas reduce los temores de rechazo inmunitario como cuando se utilizan fuentes de células alogénicas. El biomaterial ideal para este propósito debe ser biocompatible, no inmunogénico y biodegradable. Además, debe exhibir los parámetros mecánicos (elasticidad y resistencia a la tracción) (Pokrywczynska y cols., 2014).

La ingeniería tisular se nutre y se asienta en los conocimientos histológicos y recibe asimismo aportaciones de otras disciplinas fundamentales que ayudan al logro final del objetivo propuesto: la construcción de un nuevo tejido vivo y funcional capaz de sustituir con eficacia terapéutica al tejido original dañado (Campos, 2004).

**Figura 4.** Concepto de la ingeniería tisular

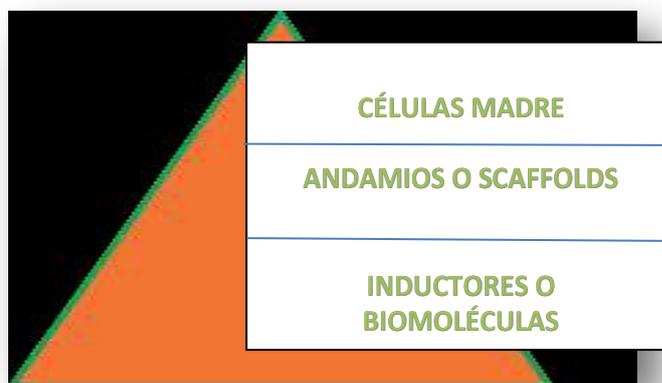
(<http://enciende.cosce.org/boletin/index.asp?item=111>).



Aunque la investigación en lo que hoy se denomina ingeniería tisular comenzó aproximadamente en 1987, desde sus orígenes, su desarrollo ha sido espectacular y la construcción de tejidos para su uso en medicina empieza a configurarse, no solo como una línea de investigación fundamental y prioritaria en las universidades y hospitales, sino también en compañías privadas.

La ingeniería tisular se basa principalmente en tres componentes fundamentales (Figura 5) (Rosales Ibañez y cols., 2012):

**Figura 5.** Los componentes principales dispuestos en pirámide que se usan para formar nuevo tejido en el laboratorio.



#### 1.4.2 APLICACIONES TERAPÉUTICAS

La comunidad científica ha estudiado el desarrollo de órganos y tejidos para casi todas las partes cuerpo humano. La piel es uno de los órganos que más interés ha despertado entre los científicos, a pesar de que un transplante es complejo debido a su potente respuesta inmune. Precisamente, un derivado tisular, el TransCyte™ (Advanced Tissue Sciences, La Jolla, CA, USA), fue el primero en ser aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) como recubrimiento temporal para quemaduras. Posteriormente, han ido surgiendo nuevos productos que emplean células epidérmicas o incluso fibroblastos embebidos en matrices tridimensionales para el tratamiento de úlceras venosas o diabéticas. Estos últimos, además de secretar de forma natural proteínas de

la matriz extracelular (como el colágeno, laminina, etc), son capaces de responder a los factores reguladores secretados por el huésped durante más de 6 meses (Kern y cols., 2001).

A estas realidades hay que sumar los avances llevados a cabo en el diseño de nuevos biomateriales que hacen posible la sustitución del hueso de mandíbulas dañadas o reseccionadas. También se ha presentado una revolucionaria técnica de regeneración de tejidos, que llega a reducir a la mitad el tiempo de recuperación en pacientes con lesiones musculares tendinosas o fracturas óseas (Orive y cols., 2003).

No obstante, el mayor de los objetivos de la ingeniería tisular es el de crear órganos completos que puedan posteriormente ser transplantados. Lo que hasta hace unos años parecía imposible, hoy se está convirtiendo en un objetivo a mediano-largo plazo. Uno de los órganos en investigación es la vejiga urinaria. En la actualidad, se han logrado crear vejigas “artificiales” capaces de funcionar en perros durante más de 11 meses (Hubbel, 1999; Oberpenning y cols., 1999).

Por último, la ingeniería tisular también puede ser empleada para diseñar modelos fisiológicos in vitro que permitan estudiar la patogénesis de muchas enfermedades e infecciones víricas con el objeto de desarrollar fármacos y terapias moleculares que prevengan o curen dichas dolencias (Orive y cols., 2003).

#### **I.4.3 REGENERACIÓN DE LA MUCOSA ORAL MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR**

La mucosa es uno de los tejidos más abundantes, por lo que la pérdida de la misma a causa de diversos procedimientos quirúrgicos, traumatismos u otras situaciones clínicas, supone un auténtico problema ante la necesidad de obtener una adecuada cobertura que repare el defecto originado de manera idónea, sin añadir morbilidad al acto terapéutico. Frente a esta necesidad, las soluciones actuales implican, como en otros casos, la aplicación de injertos de diferentes orígenes, los cuales han presentado complicaciones como rechazo, morbilidad de las zonas donantes, mantenimiento de las características originales, presencia y crecimiento de estructuras anexas, diferentes grados de queratinización y, funciones limitadas y antiestéticas. Estas implicaciones hacen imperativa la generación de sustitutos biológicos, funcionales y, anatómica y estéticamente similares a los de la zona receptora, a través de la combinación de células

y andamios. En este caso en particular, la obtención de tejido es simple y la proliferación de las células es rápida y altamente reproducible.

Varios grupos de investigación han conseguido la formación de andamios tridimensionales de agarosa y fibrina en co-cultivo con fibroblastos y queratinocitos mediante la técnica airelíquido. Este biocomplejo al ser incubado in vitro presenta una organización histológica semejante al tejido nativo y, al ser trasplantado se integra eficazmente sustituyendo al tejido ausente, reconstituyendo así el defecto con tejido funcional de espesor total, con la presencia incluso de vasos sanguíneos. La creación de mucosa oral in vitro nace como la mejor alternativa para la solución de esta problemática, ya que resuelve el rechazo, la cantidad limitada de tejido y abre la posibilidad de usarla para exámenes toxicológicos (Rosales Ibañez y cols., 2012).

#### I.4.4 LOS SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN DE LA INGENIERÍA DE TEJIDOS

En construcciones de ingeniería tisular, los sistemas de administración son una herramienta importante para proporcionar señales bioquímicas y físicas mediante la liberación o la presentación de moléculas bioactivas en el microambiente, con el objetivo de orientar la función de las células. Tales sistemas pueden ser diseñados para simular la presentación fisiológica de sustancias bioactivas o para liberar moléculas únicas o múltiples. Los medicamentos pueden provenir directamente desde el propio andamio. Alternativamente, pueden ser diseñados por separado y se añaden a la matriz de andamio. Los parámetros críticos incluyen (Morales Navarro, 2014):

1. Capacidad de carga del andamio.
2. Patrón de distribución de la sustancia bioactiva en el andamio.
3. Afinidad de unión y cinética de liberación.
4. Estabilidad y actividad biológica de las biomoléculas.

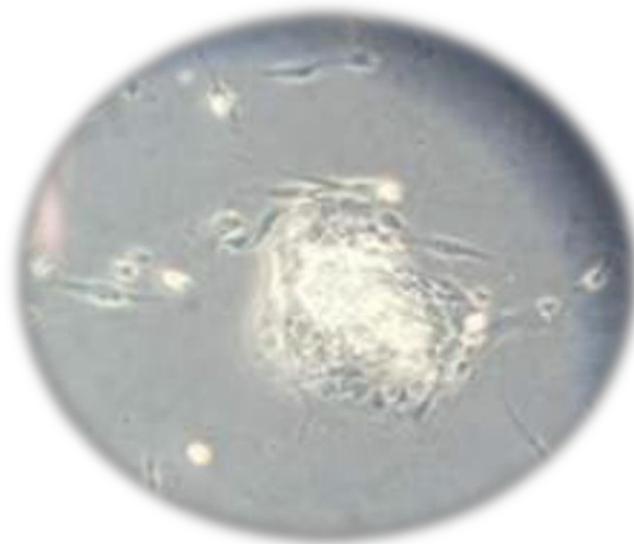
##### I.4.4.1 CÉLULAS MADRE

El cuerpo humano posee aproximadamente 100 trillones de células con aproximadamente 260 fenotipos diferentes, que se asocian en el espacio y en el tiempo, para formar los tejidos y los órganos. Las células más próximas a una lesión pueden restaurar el daño por el denominado mecanismo de diferenciación. Se entiende por este último, la posibilidad que tiene una célula de diferenciarse, perder sus características

originales y con posterioridad adquirir propiedades nuevas. Por otra parte, las células que participan en la construcción de un nuevo tejido deben tener capacidad reproductiva; esto es, células en ciclo celular que no hayan entrado todavía en el proceso de diferenciación terminal. Por lo tanto, se trata de células madre capaces de dar origen a células hijas más diferenciadas (Figura 6). Aunque no existe acuerdo universal sobre lo que es exactamente una célula madre, suele aceptarse que son aquellas células que poseen la capacidad de auto-renovarse sin límite, y que son capaces de originar células hijas destinadas a la diferenciación terminal (Rosales Ibañez y cols., 2012).

Los miofibroblastos, células que contiene actina similar a fibroblastos, están involucrados en la contracción y la fibrosis de la cicatrización de heridas mediante la secreción de matriz extracelular y contracciones celulares. Se ha demostrado que los miofibroblastos autólogos tienen potencial superior para facilitar la reparación de órganos musculares lisos, como el útero, las arterias, los conductos deferentes, la vejiga y la uretra. Las células madre derivadas de tejido adiposo son células madre pluripotentes, por lo que, son ventajosas para el aislamiento, la cosecha y la ampliación. También se ha demostrado que los miofibroblastos pueden diferenciarse en múltiples tipos de células maduras, tales como urotelio, osteocitos y lipocitos (Wang y cols., 2017).

**Figura 6.** Células madre de pulpa dental de terceros molares (Rosales Ibañez y cols., 2012).



#### I.4.4.2 BIOMOLÉCULAS, INDUCTORES O FACTORES DE CRECIMIENTO

La célula responde al medioambiente extracelular detectando señales químicas o estímulos físicos que desencadenan la apropiada respuesta de la misma, mediante la activación de distintos mecanismos moleculares y biológicos que conducen a la división, migración, diferenciación y mantenimiento del fenotipo o apoptosis. La actividad coordinada de estos procesos, por parte de las células que forman un tejido, conduce a la definición estructural y funcional de un tejido en un momento temporal determinado.

La mayor parte de la información que sobre señales moleculares se utiliza hoy en ingeniería tisular procede de estudios realizados con poblaciones aisladas en cultivos, sobre las que se han aplicado distintos factores solubles. Se trata de los denominados factores de crecimiento. La participación de estas sustancias en la construcción de nuevos tejidos es fundamental, pues contribuyen a su crecimiento y desarrollo al igual que ocurre en condiciones ortotópicas. El mecanismo por el cual pueden introducirse en el nuevo tejido con ciertas garantías, aparte de su inyección por vía directa que conduce a una rápida eliminación debido a la corta vida de los mismos, es su incorporación en los biomateriales de soporte. Esto permite una exposición y liberación prolongada de dichos factores, controlable por la tasa de difusión de los mismos o por la degradación del polímero (Rosales Ibañez y cols., 2012).

Algunos estudios han indicado que los miofibroblastos pueden secretar diversos factores de crecimiento, incluyendo angiopoyetina-1(Ang-1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF), y factores neurotrópicos derivados de células gliales (GDNF), que podrían promover la angiogénesis y el crecimiento de los axones del nervio in vitro. En definitiva, los miofibroblastos han sido ampliamente utilizados en la ingeniería de tejidos para la regeneración de la vejiga (Wang y cols., 2017).

#### I.4.4.3 BIOMATERIALES (ANDAMIOS)

La mayoría de los tejidos y órganos requieren de una estructura tridimensional en la cual estén inmersas las células. En el caso de los tejidos artificiales, esta estructura tridimensional o de soporte se denomina matriz extracelular o “*scaffold*” (Yang y cols., 2001). Los andamios de matrices extracelulares pueden modular la respuesta

reconstruyendo el tejido de cicatrización de las heridas (Corona y cols., 2014). Los usos de los productos de matrices extracelulares de origen natural como andamios para la reconstrucción de tejidos y heridas han sido estudiados tanto en el laboratorio, como en clínica (Kimmel y cols., 2010).

La ingeniería tisular se encarga de desarrollar biomateriales como una matriz de soporte extracelular artificial, que reemplace a la natural y provea un espacio tridimensional, para que las células puedan formar el nuevo tejido con su apropiada estructura y función. La matriz debe proveer las condiciones y el ambiente adecuado para que pueda ocurrir una adecuada regulación celular (adhesión, migración, proliferación y diferenciación), así como la adecuada entrega de factores bioactivos (de crecimiento y adhesión) (Fabre, 2010).

La característica en gran medida de la MEC es que conserva su tejido nativo, estructura 3D y composición. Su estructura 3D natural proporciona soporte estructural, resistencia a la tracción, sitios de receptores de superficie celular, un reservorio para los factores de la angiogénesis modulada, la migración y proliferación celular, y orientación en la cicatrización de heridas (Eweida y Marei, 2015). En la implantación, el material de la MEC se degrada rápidamente. La rápida degradación se piensa que es fundamental para el proceso de remodelación del andamio (Kimmel y cols., 2010).

La composición de la MEC es una mezcla compleja de proteínas estructurales y funcionales, glicosaminoglicanos, glicoproteínas y pequeñas moléculas dispuestas en una arquitectura tridimensional, específica y única, de tejido cicatricial (Badylak, 2004):

- Colágeno

El colágeno es la proteína más abundante en la MEC de los mamíferos. Más del 90% del peso seco de la MEC, de la mayoría de tejidos y órganos, se representa por colágeno. Más de 20 tipos diferentes de colágeno han sido identificados, cada uno con una función biológica única. El colágeno de tipo I es la principal proteína estructural presente en los tejidos y se ubica dentro de los reinos tanto animal y vegetal. El colágeno tipo IV está presente dentro de la membrana basal de la mayoría de las estructuras vasculares y dentro de los tejidos que contienen células epiteliales. El colágeno tipo III se encuentra dentro del tejido submucoso de órganos tales como la vejiga urinaria; una ubicación en los cuales se requieren flexibilidad

del tejido y el cumplimiento de la función apropiada en oposición a las propiedades más rígidas requeridas de un tendón o ligamento. El colágeno tipo VI es una molécula relativamente pequeña que sirve como una unidad de conexión entre los glicosaminoglicanos y proteínas estructurales más grandes tales como colágeno tipo I, proporcionando así un gel de consistencia similar a la MEC. El colágeno tipo VII se encuentra dentro de la membrana basal de la epidermis y funciona como unas fibrillas de anclaje para proteger a los queratinocitos suprayacentes de tensiones de cizallamiento. Cada tipo de colágeno es el resultado de los patrones de expresión de genes que especifican como las células se diferencian y, tejidos y órganos se desarrollan y organizan espacialmente. En la naturaleza, el colágeno se asocia íntimamente con proteínas glicosiladas, factores de crecimiento y otras proteínas estructurales tales como elastina y laminina para proporcionar propiedades de tejido único.

- Fibronectina

La fibronectina es sólo superada en cantidad de colágeno dentro de la MEC. La fibronectina es una molécula dimérica de 250 000 subunidades MW y existe tanto en isoformas de tejido o solubles y posee ligandos para la adhesión de muchos tipos de células. Las estructuras de submucosa de la MEC, las membranas basales y los tejidos intersticiales contienen abundante fibronectina. Las características celulares de esta proteína se han convertido en un atractivo sustrato para el cultivo de células in vitro y para su uso como un revestimiento para materiales de andamiaje sintéticos para promover la biocompatibilidad.

- Laminina

La laminina es una proteína de adhesión que se encuentra en la MEC, especialmente dentro de la membrana basal. Esta proteína juega un papel importante a principios de desarrollo embrionario. El destacado papel de la laminina, en la formación y mantenimiento de las estructuras vasculares, es particularmente notable teniendo en cuenta a la MEC como un andamio para la reconstrucción de tejidos.

- Glicosaminoglicanos

La MEC contiene varias mezclas de glicosaminoglicanos (GAGs) dependiendo de la ubicación del tejido de la MEC en el huésped, la edad del huésped y el microambiente. Los GAGs se unen a los factores de crecimiento y citoquinas y, promueven a la retención del agua y contribuyen a las propiedades del gel de la MEC.

- Factores de crecimiento

Una característica importante de la MEC intacta, que lo distingue de otros andamios para la reconstrucción de tejidos es su diversidad estructural y funcional de proteínas. Las moléculas bioactivas, que residen dentro de la MEC y su distribución espacial única, proporcionan un reservorio de señales biológicas. Aunque citoquinas y factores de crecimiento están presentes dentro de la MEC en muy pequeñas cantidades, actúan como potentes moduladores de comportamiento de la célula. La lista de factores de crecimiento que se encuentra dentro de la MEC es extensa e incluye el factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento celular epitelial (EGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y proteína morfogenética ósea (BMP), entre otros.

Los andamiajes biológicos obtenidos de matriz extracelular xenogénica han sido empleados de manera satisfactoria en estudios animales preclínicos y en aplicaciones clínicas en humanos; en la reconstrucción de una gran variedad de tejidos musculares incluyendo esófago (Badylak, 2004), miocardio, túnica muscular de vasos sanguíneos, pero especialmente músculo esquelético (Agrawal y cols., 2009), ya que presentan una excelente bioestabilidad “in vivo” (Caves y cols., 2011). Los mecanismos responsables de la respuesta remodeladora no están del todo claros (Agrawal y cols., 2009). Se piensa que intervienen diferentes procesos de reclutamiento de células pluripotenciales y diferenciadas (Valentin y cols., 2010), angiogénesis (Xiong y cols., 2015), y neoformación de tejido nervioso (Agrawal y cols, 2009).

Estos andamios, esencialmente, de matrices extracelulares se recuperan de diversos órganos o tejidos después de una descelularización apropiada. Los protocolos de descelularización están diseñados generalmente para eliminar células y desechos, mientras que preservan la organización tridimensional y la ultraestructura de la MEC (Freytes y cols., 2008). Sin embargo, la eliminación de todas las células no es práctica y los llamados "*andamios acelulares*" o "*andamios descelularizados*" pueden contener células remanentes (Anilkumar y cols., 2014). La MEC descelularizada resultante es generalmente caracterizada por una lámina bidimensional con capacidad limitada para adaptarse a las formas y tamaños tridimensionales irregulares. Por lo tanto, la utilidad clínica de un andamio biológico de MEC se limita a la administración tópica o para procedimientos quirúrgicos invasivos que pueden alojar variaciones de las formas de la lámina bidimensional (Freytes y cols., 2008).

Recientemente, ha habido un creciente interés en usar matrices acelulares derivadas naturalmente de tejidos. Estas matrices acelulares ofrecen ventajas de reconocimiento biológico (es decir, inmunogenicidad reducida), estructuras estructurales incorporadas y similitudes bioquímicas con el tejido diana. También cumplen el requisito de la reabsorción del andamio para acomodar el crecimiento del tejido. Las propiedades del andamio pueden ser optimizadas con manipulación adicional (Cheng y cols., 2010).

Podemos resumir que los biomateriales deben satisfacer los requisitos de diseño siguientes (Morales Navarro, 2014):

- 1) Biocompatibilidad.
- 2) Conductividad para la fijación y proliferación de células comprometidas o sus progenitores y la producción de una nueva MEC.
- 3) Capacidad para incorporar factores inductivos para dirigir y mejorar el crecimiento de nuevo tejido.
- 4) Apoyo del crecimiento vascular para la oxigenación y el transporte de biomoléculas.
- 5) Integridad mecánica para soportar las cargas en la zona del implante.
- 6) Controlada y predecible velocidad de degradación no tóxica.

7) Procesamiento sencillo y rentable en formas irregulares 3D de tamaño suficiente para llenar defectos clínicamente relevantes.

### I.5 MATRIZ ACELULAR DE LA VEJIGA URINARIA (MAVU) PORCINA

La MAVU es un excelente andamiaje para la regeneración o reparación tisular, además de proporcionar un fuerte soporte estructural (Abu Saleh y cols., 2016), según representa la literatura, se trataría de la Matriz Acelular de Vejiga Urinaria (Parhat y cols., 2006; Rosario y cols., 2008). Como posee la misma composición que la MEC se ha demostrado en modelos animales para inducir el crecimiento de las células uroepiteliales endógenas, células musculares lisas, células endoteliales y tejidos nerviosos en el almacén del parénquima adyacente y, en parte, mejorar la función de la vejiga después de la cistoplastia (Coutu y cols., 2014). La matriz acelular de vejiga urinaria desde fuentes alogénicas, cadavéricas y xenogénicas se usa como material de andamiaje acelular rico en colágeno, debido a la eliminación de la mayor parte de proteínas antigénicas, exhibiendo una buena compatibilidad (Zhen y cols., 2016) para la reconstrucción de tejido de laringe dañado, para la reconstrucción de tejido del esófago, y como un parche de miocardio con resultados prometedores (Mancuso y cols., 2016). Además, el injerto de MAVU está comercialmente disponible para su uso en ginecología. En este campo, los injertos han sido utilizados para la construcción de una neovagina en pacientes con hipogénesis congénita y para el reemplazo de la piel vaginal en pacientes con complicaciones graves (Ansari y Karram, 2017). En medicina veterinaria, el uso de este xenoinjerto se ha descrito en la cirugía de reconstrucción de córnea y en el manejo quirúrgico de un melanoma de gato (Balland y cols., 2016).

Históricamente, la matriz acelular de vejiga urinaria porcina fue utilizada para la reconstrucción de traumatismos, quemaduras y heridas de combate, para volver a crear músculo esquelético y dermis. Los beneficios de su uso incluyen una recuperación acelerada, una regeneración de las capas de tejido y una remodelación vascular y neural. Además, el uso de la MAVU en la reconstrucción de heridas por traumas y quemaduras puede resultar con la formación de una menor cicatriz (Ansari y Karram, 2017).

La MAVU se ha utilizado clínicamente para el refuerzo quirúrgico de los tejidos blandos, esto es debido a las espléndidas propiedades que ofrece: su carácter acelular

evita cualquier tipo de respuesta inmunitaria de rechazo del injerto por parte del organismo receptor, adecuada estabilidad dimensional, resistencia mecánica (Kim y cols., 2003), una mejor absorción de agua, propiedades de anti-biodegradación, actividad antimicrobiana y de células madre, propiedades de fijación (Liu y cols., 2012), biocompatibilidad (Eberli y cols., 2011), la presencia de diversas moléculas como proteínas de adhesión celular (colágeno, ácido hialurónico, proteoglicanos, glucosaminoglucanos, elastina y fibrina) y un gran número de factores de crecimiento y de enzimas. Estas características hacen de la MAVU un andamiaje de soporte celular que acelera y favorece la regeneración de defectos tisulares (Kim y cols., 2003), por las cuales el andamio ha sido aprobado por la FDA (Aurora y cols., 2015).

### I.5.1 PREPARACIÓN DE LA MAVU

La preparación de la MAVU se describió por primera vez en 1975. Comúnmente involucra una combinación de métodos físicos para delaminar las capas, seguido de métodos químicos y enzimáticos para eliminar las células. Es bien sabido que las propiedades intrínsecas de cualquier biomaterial pueden ser significativamente alteradas por métodos para descelularizar y esterilizar el material. Actualmente, las variaciones comunes para producir MAVU incluyen: la delaminación del tejido, los tipos de detergentes utilizados para la eliminación de células y métodos de esterilización terminal. Un óptimo protocolo de descelularización elimina completamente las proteínas que inducen el rechazo inmunitario, mientras que conservan la actividad biológica deseada de los componentes de la MAVU. La técnica utilizada para la descelularización de la MAVU puede influir mucho en las propiedades del andamio. La dirección de la eliminación de tejido, la región de la vejiga cosechada, el espesor del biomaterial de partida y si la vejiga está distendida son factores que también podrían afectar a las propiedades del andamio.

La mayoría de los estudios prefieren la delaminación mecánica de los tejidos de la vejiga con eliminación de las capas musculares y serosas, antes de procedimientos químicos y enzimáticos. Las técnicas de descelularización a menudo involucran a agentes enzimáticos y químicos tales como ácido sódico, líquidos hipotónicos, desoxicolato sódico, dodecil sulfato sódico (SDS), Tritón X - 100 + hidróxido de amonio y ARNasa / ADNasa. Las matrices que mantienen una cierta cantidad de celularidad

pueden presentar componentes inmunogénicos al destinatario. Sin embargo, muchas descelularizaciones que pretenden limitar la inmunogenicidad de la matriz no siempre son totalmente exitosas (Song y cols., 2014).

### I.5.2 ESTRUCTURA, POROSIDAD Y PROPIEDADES INTRÍNECAS DE LA MAVU

#### **Estructura de la MAVU**

Las técnicas de preparación de la matriz acelar de vejiga, que se realizan para afectar a la estructura de la MEC, se construyen a partir de colágeno, elastina, fibronectina, laminina, GAGs y factores de crecimiento. No sólo el tratamiento químico y enzimático, sino también los procedimientos mecánicos pueden influir en la estructura de la MAVU. Los estudios que comparan la estructura de la MAVU de rata, porcina y humana revelan que la composición de la MAVU es en gran medida comparable entre las especies. Sin embargo, hay diferencias entre los tipos de elastina y fibras de colágeno y su abundancia entre las especies. Las MAVUs porcinas y de seres humanos tienen más fibras elásticas que las MAVUs de ratas. El colágeno tipo I es el componente principal de las MAVUs de ratas. Por el contrario, el colágeno tipo III es abundante en las MAVUs porcinas y humanas. Se confirma la presencia de colágeno tipo I, II, III, y IV, con predominio de colágeno tipo I y colágeno tipo III. La presencia de elastina, laminina y fibronectina fue también confirmada con una pequeña cantidad de laminina y reducción de fibronectina después de la descelularización de la vejiga urinaria. La preservación del contenido adecuado de la laminina es importante debido al hecho de que estimula la unión celular al colágeno tipo IV y la diferenciación de células endoteliales. Por otro lado, la presencia de fibronectina en la estructura de la MAVU es crítica para la repoblación y la proliferación celular. Debido a los tipos de colágeno, la elastina, la fibronectina y la laminina mencionados fue sostenida la estructura de la MAVU como un biomaterial ideal para la regeneración tisular (Pokrywczynska y cols., 2015).

Bajo el microscopio electrónico de barrido, la preparación de la MAVU es una estructura reticular con espacio irregular disperso (Li y cols., 2016). Presenta una estructura con dos caras. La cara superior representa a las membranas basales y tiene una matriz acelar densa que sirve como una barrera entre el epitelio y los otros tejidos. La otra cara representa a la lámina propia (una matriz de colágeno acelar más abierta)

que proporciona la integración de los tejidos conjuntivos en el lecho de la herida (Balland y cols., 2016).

### **Porosidad de la MAVU**

La porosidad es también afectada por los métodos de descelularización. Este parámetro también debería reflejarse en el caso del diseño de la MAVU, debido al hecho de que una matriz de poro demasiado grande no proporcionaría un entorno adecuado para la fijación celular, a consecuencia de la reducción de la superficie y la densidad de ligandos. Una MAVU sin liofilizar es permeable al agua incluso a baja presión, mientras que una MAVU liofilizada tiene una impermeabilidad superior incluso después de la rehidratación. A consecuencia de esto, se confirma que la liofilización causa el aflojamiento de la estructura de la MAVU. Además, se comprobó que la porosidad de la MAVU puede ser modificada mediante la incorporación de moléculas de ácido hialurónico, que conducen a la disminución de la porosidad (Pokrywczynska y cols., 2015). Por ejemplo, en las reconstrucciones vesicales el ácido hialurónico, molécula biodegradable que puede actuar como un portador de moléculas bioactivas y factores de crecimiento demostrando un potencial significativo en el desarrollo del tejido de ingeniería, protege al andamio de los efectos tóxicos de la orina, previene la fibrosis y mejora la repoblación central de células de injerto (Cheng y cols., 2010).

### **Propiedades de la MAVU**

Aunque el andamio de MAVU es más delgado después de la descelularización, la arquitectura básica se sigue manteniendo, incluyendo colágeno, fibronectina, elastina, GAGs y factores de crecimiento. Las fibras de colágeno forman la porción principal de la MAVU comparado con el tejido normal de la vejiga. El contenido y la relación del colágeno es un factor crítico decisivo en las propiedades mecánicas de la MAVU. Se determinó que estaba compuesto principalmente de colágeno tipo I y tipo III. Dado que la proporción de colágeno tipo I y tipo III no se altera durante el proceso de injertado de la MAVU, presumiblemente conserva propiedades mecánicas similares a la vejiga normal (Song y cols., 2014).

Se informó que las propiedades mecánicas de las MAVUs eran similares para la MAVU porcina y humana, pero significativamente mayores para la MAVU de rata,

debido a la gran cantidad de colágeno tipo I presente en ésta y al menor contenido de fibras elásticas presente en la MAVU porcina y humana. Curiosamente, el módulo elástico preparado para la MAVU porcina fue tres veces mayor que el nativo. Se determina que las propiedades mecánicas de MAVU porcina, después de diferentes técnicas de descelularización, fueron probadas para tener impacto directo sobre las características mecánicas de la MAVU: liofilización, esterilización y almacenamiento (hasta 12 meses), lo que indica que los mecanismos estructurales y cambios de fuerza pueden observarse en caso de almacenamiento a largo plazo (Pokrywczynska y cols., 2015).

Además, la MAVU parece poseer propiedades antibacterianas contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, que pueden estar relacionadas con algunos péptidos de bajo peso molecular dentro de la MAVU. Se observó que las superficies de MAVU tienen menores tasas de adherencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, lo que sugiere que MAVU puede contener actividad antibacteriana. (Song y cols., 2014).

En definitiva, este biomaterial satisface los requisitos de la medicina regenerativa: es acelular para reducir la respuesta inmune y se reabsorbe progresivamente para conferir resistencia mecánica al tejido regenerado (Balland y cols., 2016).

### 1.5.3 FACTORES DE CRECIMIENTO Y ANGIOGÉNESIS DE LA MAVU

Hay dos enfoques respecto al uso de factores de crecimiento en los biomateriales. El primer enfoque se relaciona con sus características endógenas, cuyo origen en cuestión son los factores de crecimiento que permanecen incluso después del protocolo de descelularización. El segundo se relaciona con la incorporación de factores de crecimiento exógenos en forma de proteínas o células de genes modificados que expresan factores de crecimiento. El uso de factores de crecimiento es discutible, debido al hecho que no se puede concluir exactamente si son distribuidos uniformemente en la estructura de la MAVU y si la dosis es la adecuada. Además, así como la estructura de la MAVU puede ser modificada, la actividad de algunos factores de crecimiento endógenos puede ser bloqueada por los protocolos de descelularización (cambios físicos como: la baja temperatura y procesos de liofilización y / o tratamientos químicos y enzimáticos). Algunos de los factores incorporados en la MAVU son: el factor de crecimiento de

fibroblastos básico (bFGF), el HGF, el PDGF, el factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento similar al factor crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB - EGF) y VEGF. Los resultados confirmaron que la liberación sostenida se preservó de la siguiente manera: bFGF> HGF> PDGF. Se da lugar al aumento de la neovascularización y del contenido de músculos lisos, especialmente en los primeros períodos después del injerto de la MAVU. Este hecho confirma que los factores de crecimiento incorporados en la estructura de la MAVU representan una mejora en su funcionalidad (Pokrywczynska y cols., 2015).

Respecto a la angiogénesis, los tejidos de espesor superior a 0,8 mm requieren una vascularización en orden de suministro de todos los componentes celulares con oxígeno y nutrientes. La generación temprana y rápida de una red vascular es imprescindible para mantener la viabilidad de los tejidos y la supervivencia a largo plazo. Una de las estrategias para abordar esta cuestión es el uso de factores de crecimiento angiogénicos incorporados en la MAVU. Para el éxito de la aplicación de factores de crecimiento angiogénicos exógenos se requiere un sistema de administración efectivo, de lo contrario, la actividad de estas proteínas no persistirá *in vivo* (Song y cols., 2014). Se demostró que la MAVU funciona como una plataforma para la liberación sostenida de bFGF aplicado exógenamente, un factor de crecimiento que promueve la angiogénesis y la proliferación de las células mesenquimales (Kanematsu y cols., 2003). Los factores de crecimiento angiogénicos tales como el VEGF y el NGF mejoran la regeneración del músculo liso y la vascularización de la MAVU. Dichos factores exhibieron un patrón de liberación sostenida de acuerdo con la biodegradación de la MAVU después de la implantación, promoviendo la proliferación celular del parénquima del huésped, la migración y la angiogénesis del tejido (Zhou y cols., 2013).

## 1.6 ORABASE®

Orabase® es una de las bases bioadhesivas más eficaces que se ha utilizado para el alivio del dolor en la estomatitis aftosa oral (Labib y Aldawsari, 2015; Bascones Martínez y cols., 2005). Forma una película protectora sobre la lesión con reparaciones en periodos de 15 y 21 días. Se utiliza como vehículo adhesivo protector usado

especialmente para aplicar tópicamente los principios activos prescritos en la mucosa oral; se adhiere a dicha mucosa por periodos de tiempo que varían de 15 minutos a 2 horas, dependiendo del grado de movilidad de los tejidos orales, de la acción salivar, etc. Además de una acción protectora (en ocasiones se aplica sólo) de la mucosa oral, permite una liberación lenta del principio activo con un mayor tiempo de contacto sobre la lesión y una menor dosis total a aplicar (Kovalik y cols., 2014). Su pH neutro probablemente asegura su aplicabilidad y biocompatibilidad en la cavidad oral con una mínima irritación posible. Además, el aumento general de la viscosidad del mucoadhesivo preparado ayudará a su bioretención en la cavidad oral (Labib y Aldawsari, 2015).

Orabase® se trata de un excipiente adhesivo comercializado, cuya composición se corresponde con una mezcla de carboximetilcelulosa sódica, pectina, gelatina en polvo soluble y plastibase® (Plastibase® es una mezcla de parafina líquida y polietileno en distintas proporciones. Se obtiene por fusión a elevadas temperaturas y un rápido enfriamiento posterior (Colegio de farmacéuticos de Madrid, 2007).

Las fórmulas con orabase pueden contener uno o varios principios activos de los siguientes ejemplos de grupos terapéuticos: antibiótico (Gentamicina), antifúngico (Nistatina y Ketoconazol), antivírico (Aciclovir), corticoide (Triamcinolona acetónido y propionato de clobetasol), anestésico local (Lidocaína), retinoides (Tretinoína (ac. trans-retinóico) y Isotretinoína (ac. 13-cis-retinóico)), antimitótico (5-Fluoruracilo), etc.

Orabase puede emplearse sólo, buscando únicamente la propiedad protectora, aunque es más frecuente la presencia de diversos principios activos que van liberándose paulatinamente durante el tiempo de aplicación. La incorporación de estas sustancias se realiza generalmente mezclándolas en un mortero con un poco de vaselina u otra grasa líquida y añadiendo posteriormente la orabase. Nunca debe usarse el agua ni ningún excipiente hidromiscible porque favorece la disolución en la saliva. Además, para los principios activos que necesiten antioxidantes (retinoides, ketoconazol, etc.) el más conveniente para la mucosa oral es la vitamina E (en forma líquida) al 0,5%.

Todas las fórmulas con orabase (a excepción de las que incorporan urea) se elaboran de igual manera (Colegio de farmacéuticos de Sevilla, 2007):

1. Se ponen los principios activos prescritos en un mortero (en caso de llevar retinóico, por su labilidad, se incorpora en el último momento posible).
2. En un vaso de precipitado poner la orabase (mezclada con la vitamina E si la fórmula requiere antioxidante).
3. Añadir al mortero un poco de orabase para hacer pasta homogénea y luego incorporar poco a poco el resto de excipiente trabajando hasta su total homogeneización.

Algunos ejemplos de combinación de fórmulas con orabase que contienen principios activos se han estudiado. Karasneh y cols; 2016 presentó un protocolo modificado para pacientes con lesiones de osteonecrosis de la mandíbula relacionada con la medicación, usando minociclina en orabase. Se presentan resultados favorables en términos de control del dolor, infección y menos dependencia en el cuidado en el hogar. En otro estudio se ha demostrado la eficacia del acetinado de fluocinolona en orabase, en el tratamiento del liquen plano oral, con una mejoría clínica sin efectos secundarios graves (Youngnak Piboonratanakit y cols., 2009). Y también, la aplicación de ketoconazol tópico al 2% en pomada de orabase puede emplearse para el tratamiento de la estomatitis producida por dentaduras postizas, comparable con el comprimido de ketoconazol (Khozeimeh y cols., 2010).

La forma farmacéutica de este excipiente es una pasta que se administra tópicamente. Para una correcta administración se debe aplicar preferentemente al acostarse, así se facilita la acción del producto durante la noche. En caso de más de una aplicación diaria (2 ó 3) es preferible que se haga después de las comidas. Al intentar extender suavemente (sin frotar) puede producir la sensación de formación de gránulos, de arenisca y de pérdida de continuidad. Tras la aplicación correcta aparece una película suave y resbaladiza.

La incidencia de efectos adversos aumenta cuando se aplica en zonas extensas. Pueden aparecer efectos locales como dermatosis, quemazón cutánea, prurito, sequedad y atrofia de la piel (Colegio de farmacéuticos de Madrid, 2007). Sin embargo, orabase no es tóxica, ni daña el tejido con el que está en contacto (Kovalik y cols., 2014).

## I.7 EXTRACTO DE CENTELLA ASIÁTICA (ECA)

### I.7.1 DESCRIPCIÓN

Centella asiática (CA) es una enredadera herbácea perenne perteneciente a la familia *Apiaceae* (*Umbelliferae*) que se encuentra en toda la India (Figura 7). Crece en zonas pantanosas, en lugares húmedos hasta una altitud de 1.800 m. Se encuentra en la mayoría de los países tropicales y subtropicales, incluyendo partes de la India, Pakistán, Sri Lanka, Madagascar y Sudáfrica y el Sur del Pacífico y Europa del Este. Cerca de 20 especies relacionadas con CA crecen en la mayoría de las partes del trópico o áreas pantropicales húmedas como los arrozales, y también en las elevaciones rocosas superiores. Es una planta insípida e inodora que se desarrolla alrededor del agua, de aproximadamente 20 cm de altura. Tiene pequeñas hojas verdes en forma de abanico con flores rosadas o blancas y llevan un fruto óvalo pequeño liso.

**Figura 7:** Planta de Centella asiática (Gohil y cols., 2010).



Toda la planta se utiliza para fines medicinales (Alonso, 2009; Gohil y cols., 2010; Tassanawat y cols., 2013; Ermertcan y cols., 2008; Sharma y Sharma, 2002; Kim y cols., 2011). Sus usos tradicionales dependen de la región geográfica. Es ampliamente utilizada como un purificador de la sangre, así como para tratar la presión arterial alta, mejorar la memoria y promover la longevidad (Gohil y cols., 2010). Tienen múltiples aplicaciones terapéuticas especialmente en neuroprotección (la administración oral de un extracto estandarizado de CA, es decir el ECa233, demostró efectos neurológicos positivos (Wanakhachorkrai y cols., 2013; Anukunwithaya y cols., 2017; Gray y cols.,

2017)) y en cicatrización de heridas (Kwon y cols., 2014); así como agente terapéutico en los distintos procesos de la cicatrización de heridas, tales como la coagulación, inflamación, migración celular y proliferación, e interviene en la formación y en la remodelación de cicatrices (Tassanawat y cols., 2013). Tiene utilidad como: antioxidante, anti-microbiana, anti-fertilidad (Kim y cols., 2011), agente contra el cáncer (Tassanawat y cols., 2013; Naidoo y cols., 2017), leucorrea, enfermedades renales, uretritis, aterosclerosis, función cardio-protectora (Ermertcan y cols., 2008; Sharma y Sharma, 2002), potencial para ser utilizada como regulador de lípidos (Zhao y cols., 2014) y con actividad hipoglucémica (Kabir y cols., 2014). También se afirma que es útil en el tratamiento del asma, tuberculosis, lepra, úlcera gástrica, queloides (Ermertcan y cols., 2008; Sharma y Sharma, 2002) y psoriasis (Kwon y cols., 2014). Debido a su capacidad para estimular la síntesis de colágeno se ha utilizado en cosméticos para el cuidado de la piel, restaurando la firmeza, la elasticidad y mejorando la apariencia de la piel (Sawatdee y cols., 2016). Además, en un estudio se obtienen colorantes verdes naturales para las comidas a partir de hojas de CA, a través de métodos físicos y químicos (Ngamwonglumlert y cols., 2017). Sin embargo, el denominador común de uso tradicional en todos los países es el tratamiento de afecciones cutáneas (Tabla 3).

La OMS indica el uso de preparados con CA en heridas, quemaduras y enfermedades ulcerosas de la piel, así como para la prevención de queloides y cicatrices hipertróficas. Además, cita para esta planta 68 nombres vernáculos y tres sinónimos: *Centella coriácea* Nannfd., *Hydrocotyle asiatica* L., *Hydrocotyle lunata* Lam. y *Trisanthus cochinchinensis* Lour. En India se le llama *gotu kola*; en Reino Unido, *Indian pennywort*; en Francia, *Hydrocotyle* y en algunas regiones de habla hispana «oreja de ratón», aunque esta denominación puede inducir a error, ya que también se conocen como oreja de ratón otras especies vegetales como la *Salvinia auriculata* (Alonso, 2009).

**Tabla 3.** Indicaciones en función del nivel de afectación del tejido cutáneo (Alonso, 2009).

ACCIÓN CICATRIZANTE Y REGENERADORA DEL TEJIDO CUTÁNEO	ACCIÓN REPARADORA Y RENOVADORA DE LA PIEL
Heridas	Agresiones/irritaciones
Quemaduras	Quemaduras solares
Úlceras	Peelings químicos/láser
Heridas posquirúrgicas	Tatuajes/Posdepilación/afeitado

### 1.7.2 RECUERDO HISTÓRICO

La medicina tradicional hindú (Ayurveda) utiliza esta planta con el nombre de *brahmi* desde hace más de 3.000 años (Alonso, 2009) y se encuentra ya descrita en un histórico texto indio llamado "*Sushruta Samhita*" (Gohil y cols., 2010).

A CA se la llamó «hierba del tigre» porque, según la leyenda, el famoso tigre de Bengala cura sus heridas revolcándose sobre esta planta y lamiéndolas con la saliva impregnada de su jugo. La evidencia científica de su uso tradicional contra la lepra fue notificada por primera vez por el Dr. Boileau en 1852. Este médico, que residía y trabajaba en la India, había contraído hacía algunos años una forma de lepra y decidió experimentar en sí mismo con CA. El resultado fue su recuperación. Esta experiencia fue publicada y a partir de este momento, entre 1853 y 1855, se realizaron diversos estudios en India, Francia y España, algunos de los cuales fueron publicados en revistas de prestigio de la época (Lépine MJ. Pharm Jour. 1953 y 1954. Christy, New Comercial Plants, 1885, p. 58). La planta fue incluida en la Materia Médica India, aunque aún no se conocía su composición química ni cuáles eran los principios activos a los que cabía atribuir su actividad. En 1884, se registró por primera vez en el Códex Francés. En 1944 Boiteau, aisló el asiaticósido y entre 1947 y 1949 se realizaron importantes estudios farmacológicos. Entre 1953 y 1961 J. Polonsky estudió y publicó la estructura del asiaticósido. En 1958 Ratsimamanga y Boely demostraron su acción venotónica. En 1969 H. Pinhas publica la estructura del madecasósido y en 2003 se aísla e identifica el terminolósido (Laboratoires Roche Nicholas, Division Serdex, Saint Ouen, Francia).

Actualmente, la CA se haya inscrita en las principales farmacopeas, incluyendo la Real farmacopea Española (RFE) (Alonso, 2009).

### I.7.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PRINCIPIOS ACTIVOS

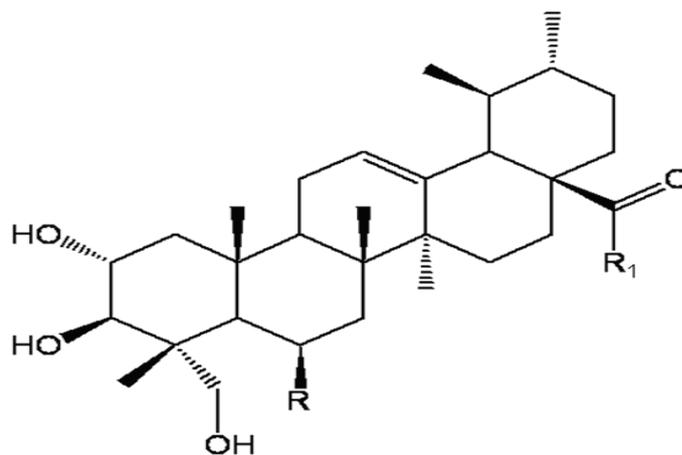
La CA crece de forma silvestre y para desarrollar su máximo potencial en moléculas químicas activas necesita de un cierto estrés ambiental, que determina que tenga un contenido significativo de triterpenos y sintetice diversas sustancias que utilizará como defensas naturales para protegerse de parásitos, hongos, etc. Esta variación en su composición química influirá en sus propiedades terapéuticas, que pueden variar dependiendo de la zona geográfica donde se desarrolle (Alonso, 2009).

Han sido investigados diferentes extractos de CA (Tabla 4). Los constituyentes más importantes aislados en CA son principalmente saponinas triterpenoides pentacíclicas de tipo ursano y oleanano (hasta 8%), también conocidas como centelloides. Entre los diversos productos químicos, los más importantes debido a su actividad dermatológica y farmacológica (Ratz-Lyko y cols., 2016) son asiaticósido (AS), madecassósido (MA), ácido asiático y ácido madecásico (Figura 5) (Bylka y cols., 2014; An y cols., 2012; Somboonwong y cols., 2012; Shukla y cols., 1999; Ratz-Lyko y cols., 2016). Se determina que la composición del contenido de los triterpenos pentacíclicos en los extractos de CA varía según el lugar de cultivo y los períodos de cosecha (Puttarak y Panichayupakarnat, 2012).

A diferencia de otros extractos estandarizados de CA, el ECa233 es un extracto natural de CA que se prepara para contener al menos el 80% de madecassósido y asiaticósido, los principales componentes fitoquímicos naturales de esta planta. En un estudio en ratas se demostró que ECa233 contiene madecassósido en un 53,1% y asiaticósido en un 32,3% (Anukunwithaya y cols., 2017).

**Tabla 4.** Extractos investigados de CA (Bylka y cols., 2014).

EXTRACTO	COMPOSICIÓN DEL EXTRACTO
TECA	A.asiático (30%), a.madecásico (29-30%), AS (40%).
TTFCA	A.asiático (30%), a.madecásico (30%), AS (40%).
TTFC	A.asiático y á.madecásico (60%), AS (40%).
CATFF	Indefinido.
ETCA	Indefinido.

**Figura 8.** Estructura química de los principales compuestos activos de triterpenos de tipo ursano de Centella asiática (Sawatdee y cols., 2016).

**Asiatic Acid** : R = H, R<sub>1</sub> = OH  
**Madecassic Acid** : R = OH, R<sub>1</sub> = OH  
**Asiaticoside** : R = H, R<sub>1</sub> = O-Glu(6-1)-Glu(4-1)-Rham  
**Madecassoside** : R = OH, R<sub>1</sub> = O-Glu(6-1)-Glu(4-1)-Rham

El extracto TECA podría inactivar los macrófagos en la piel, lo que conduce a una menor inflamación de la piel y respuestas atópicas (Park y cols., 2017).

CA también contiene otros componentes, incluyendo:

- Otras saponinas: centelósido, brahmósido, brahminósido y las centellosaponinas B, C y D.
- Flavonoides: kampferol, quercetina, 3-glucosil-quercetina, 3-glucosil-kampferol.
- Ácidos grasos: linoleico, lignocérico, linolénico, oléico, palmítico, elaídico y esteárico.

Además, contiene abundantes taninos (20-25%), aceite esencial (0,1%, con betacariofileno, transbetafarneseno y germacreno D), fitosteroles (campesterol, sitoesterol, estigmaesterol), mucílagos, resina, aminoácidos libres (alanina, serina, aminobutirato, aspartato, glutamato, lisina y treonina), un alcaloide (hidrocotilina) y un principio amargo (vallerina) (Alonso, 2009; Ratz-Lyko y cols., 2016).

Entre los componentes principales de *C. asiática*, AS y MA poseen diversas actividades biológicas incluyendo: la curación de heridas, la protección contra el infarto, propiedades antiinflamatorias, antidepresivas, antireumatóides y efectos artríticos (Tassanawat y cols., 2013). AS se ha identificado como el principal responsable de la curación de heridas (Ermertcan y cols., 2008). Promueve la reparación de los tejidos mediante el aumento de las tasas de migración y fijación inicial de las células de la piel (Lee y cols., 2012). Promueve la proliferación de fibroblastos y la síntesis de matriz extracelular en la cicatrización de heridas (Yao y cols., 2015). Estimula la célula de malpighi, activa la epidermis y la queratinización (Nema y cols., 2013). También tiene un efecto antiproliferativo sobre fibroblastos hipertróficos, queloides y queratinocitos (Lee y cols., 2012). Y, además se ha observado que aumenta los niveles de antioxidantes, la producción de ARNm de procolágeno tipo I y III (Yao y cols., 2015) y la angiogénesis (Ruszymah y cols., 2012). El efecto de MA en la cicatrización de heridas puede implicar varios mecanismos: actividad antioxidante, síntesis de colágeno y angiogénesis. Estos efectos del AS y MA en la cicatrización de heridas están asociados con la reducción de la

activación de los macrófagos y la producción de IL-1 (Park y cols., 2017). El ácido asiático posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y neuroprotectoras (Yao y cols., 2015), y es un compuesto eficaz que puede usarse como agente terapéutico para reducir las afecciones fibróticas (Adtani y cols., 2017). En definitiva, se ha demostrado que el ácido asiático y el ácido madecásico poseen una mayor actividad anti-inflamatoria que AS, mientras que AS y MA poseen una buena cicatrización de heridas (Puttarak y Panichayupakaranat, 2012).

#### 1.7.4 ACCIONES FARMACOLÓGICAS

Según la Monografía de la OMS, la actividad farmacológica de la CA (Tabla 5) puede deberse a la acción sinérgica de varios de sus componentes, especialmente los compuestos triterpénicos (Alonso, 2009).

CA presenta una multiplicidad de acciones asociadas a seis mecanismos importantes (Chaushu y cols., 2015):

1. Edema y control de filtración capilar.
2. Fuerte poder antioxidante, eficaz sobre varias formas de estrés oxidativo asociado a la inflamación o infecciones.
3. Acción antiinflamatoria.
4. Modulación de la producción de colágeno evitando cicatrices más lentas o más rápidas, hipertróficas y queloides.
5. Acción moduladora de los factores de crecimiento locales.
6. Modulación de la angiogénesis.

Las acciones más estudiadas de la CA son la cicatrizante, regeneradora, reparadora y renovadora sobre la piel y las mucosas, así como la venotónica (Alonso, 2009).

#### **Acción cicatrizante**

Los mecanismos cruciales que implican el proceso de curación de la herida son: angiogénesis, formación de colágeno, epitelización y contracción de la herida. Existen varios factores que promueven la cicatrización de heridas que incluyen factores físicos, químicos y también farmacológicos (Paucharoen, 2010).

Atendiendo a los principales componentes de la piel, tenemos el colágeno tipo I y III, que están relacionados con el envejecimiento de la piel. De hecho, CA puede promover un aumento de la fibronectina y la síntesis de colágeno de un 20-35% en fibroblastos de piel. Además, CA juega un papel importante en el proceso de anti-oxidación mediante la reducción de la actividad de especies de oxígeno reactivo (EOR), y, por lo tanto, evita que el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induzca senescencia (proceso de envejecimiento celular en que las células pierden la propiedad de proliferación continua por división y, que se observa en todas las eucariotas (Kim y cols., 2011)) en fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDFs) (An y cols., 2012).

Extractos de CA y, en particular, sus principales triterpenos y ésteres glucosídicos mostraron su eficacia en el tratamiento de cicatrices hipertróficas y queloides, y disminuyeron la fibrosis en las heridas. El mecanismo de acción parece ser doble; por un lado, aumentan la síntesis de colágeno y de ácidos mucopolisacarídicos y, por otro, inhiben la fase inflamatoria de cicatrices hipertróficas y queloides.

Se ha propuesto que el AS interfiere en la formación de cicatrices por el aumento de la actividad de miofibroblastos y colágeno inmaduro. También se ha demostrado su capacidad inmunomoduladora e inhibidora del proceso inflamatorio que puede provocar hipertrofia en cicatrices. Además, AS ha mostrado producir una aceleración en la curación postquirúrgica de heridas superficiales y úlceras y, en general, de los procesos cicatriciales. *In vitro*, activa las células de Malpighi en epidermis porcina (Alonso, 2009).

De forma que la migración, la adhesión y la proliferación son vitales en la reparación de heridas, AS aumenta las tasas de migración y la fijación inicial de las células de la piel, promueve la proliferación de fibroblastos, y apoyan su uso como un promotor de la cicatrización y como un componente bioactivo de piel artificial (Lee y cols., 2012).

La aplicación tópica de AS promovió la cicatrización de heridas en ratas y aumentó significativamente la resistencia a la tracción en la piel recién formada (Alonso, 2009). De forma que, los hidrogeles epiteliales recién generados son capaces de absorber y retener exudados dentro del gel y proporcionar un entorno que estimula y regula las actividades celulares y nutricionales durante el proceso de cicatrización (Lee y cols., 2011). Además, se ha demostrado que una crema de ECA al 1% acelera el proceso de cicatrización de heridas. En caso de úlceras crónicas mejora la cicatrización en anchura,

longitud y profundidad después de 7,14 y 21 días del uso del producto (Somboonwong y cols., 2012).

### **Acción antifúngica y antiulcerosa**

Las geninas han mostrado acción antifúngica (contra el *Pityrosporum ovale* de la caspa), antibacteriana (contra el *Propionibacterium acnes* del acné y otras bacterias patógenas) y antifermentativa, lo que permite su aplicación sobre la piel agredida.

Así mismo, se ha observado que los ECA tratan eficazmente las úlceras gástricas y duodenales inducidas por el estrés. La administración oral de un ECA a ratas produjo una reducción de dosis dependiente en el estrés inducido por úlceras gástricas, y su efecto antiulceroso era similar al de la famotidina. El mecanismo de acción parece estar asociado con una actividad de la CA sobre el sistema nervioso (Alonso, 2009).

### **Acción analgésica y antiinflamatoria**

En la actualidad, también se han evaluado los efectos de CA sobre el dolor y la inflamación en modelos de roedores. Al estudiar la actividad analgésica de la CA acuosa (10, 30, 100 y 300 mg / kg) usando retorcimiento inducido por ácido acético y el método de la placa caliente en ratones, mientras que la actividad antiinflamatoria se estudió por la prostaglandina E2, usando el edema inducido en las patas de ratas. La CA acuosa reveló una actividad analgésica significativa con modelos similares a la aspirina, pero menos potente que la morfina y, la actividad antiinflamatoria era comparable al ácido mefenámico. Estos resultados sugieren que los extractos acuosos de CA poseen actividades analgésicas y antiinflamatorias que justifican el uso tradicional de esta planta en el tratamiento de condiciones inflamatorias o reumatismo (Gohil y cols., 2010). Además, CA podría inactivar los macrófagos en la piel, lo que conduce a una menor inflamación y respuestas atópicas de la piel (Jin y cols., 2015; Alonso, 2009; Park y cols., 2017).

### **Acción venotónica**

La acción venotónica de extractos titulados de CA ha sido demostrada en distintos ensayos clínico-farmacológicos. En diferentes pruebas a doble ciego contra placebo, en pacientes con insuficiencia venosa crónica y en úlceras tróficas venosas de miembros inferiores. Éstas han mostrado un efecto terapéutico positivo, evidenciándose una

mejoría en las reacciones ecematosas periféricas que suelen acompañar estas lesiones; mejoría del estasis venoso y mayor formación y proliferación del tejido de granulación, lo que determina una epitelización más rápida.

Así mismo, la fracción triterpénica ha mostrado su eficacia en alteraciones de la microcirculación, síndrome posflebítico y prevención de edemas. Su mecanismo de acción en estos casos está determinado por una mayor síntesis de colágeno, fibronectina y proteoglicanos. La abundancia de colágeno en el organismo explica el amplio rango terapéutico de las sustancias activas de la CA (Alonso, 2009).

Tabla 5. CA: Acciones farmacológicas y usos derivados (Alonso, 2009).

ACCIONES	USOS DERIVADOS
<p>-Normalización de la homeostasis</p> <p>-Modulación de la inflamación</p> <p>-Reducción de la reactividad celular en el medio proinflamatorio</p>	<p><b><u>Terapéuticos:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procesos cicatrizales</li> <li>• Coadyudante tratamiento psoriasis</li> </ul> <p><b><u>Cosméticos:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Suavizante</li> <li>• Calmante</li> <li>• Antienvjecimiento (cronológico o inducido)</li> <li>• Preservación de la humedad</li> <li>• Prevención de los efectos de polución</li> </ul>
<p>-Estímulo síntesis de colágeno (colágenos I y II en particular)</p>	<p><b><u>Terapéuticos:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cicatrización de heridas, quemaduras, ulceraciones</li> </ul> <p><b><u>Cosméticos:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reparador, restructurante, hidratante</li> <li>• Antienvjecimiento, antiarrugas, reafirmante, antiestrías</li> </ul>
<p>-Bactericida (sobre gérmenes grampositivos principalmente)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pytosporum ovale</li> <li>• Propionilbacteriumacnes</li> </ul>	<p><b><u>Terapéuticos:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Heridas, quemaduras, ulceraciones</li> <li>• Caspa</li> <li>• Acné</li> <li>• Infecciones ginecológicas</li> </ul> <p><b><u>Terapéuticos:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Insuficiencia venosa, piernas cansadas</li> </ul>
<p>-Venotónica (circulación y microcirculación)</p>	<p><b><u>Cosméticos:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ayuda a la reducción de la celulitis</li> </ul>

## **II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

---

## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### II.1 JUSTIFICACIÓN

En la práctica clínica odontológica, uno de los retos más grandes es la reposición de tejidos que se han perdido por lesiones o patologías. Cuando se produce una pérdida de sustancia, que afecta tanto al epitelio como al tejido conectivo subyacente, se origina en la mucosa oral una lesión elemental conocida como úlcera oral (Bruce y Rogers, 2003). Estas úlceras orales pueden ser originadas por traumatismos, factores químicos (quemaduras por ácidos o alcalinos), factores físicos (electricidad e irradiaciones), factores térmicos (quemaduras por calor o congelaciones), factores inmunológicos, déficits nutricionales, úlceras recurrentes, inflamación y otros procesos patológicos que pueden requerir de la cirugía para la extirpación de lesiones congénitas o patológicas (Wagner y cols., 2013; Lee y cols., 2017). En general, las úlceras orales cursan con dolor como principal característica, con una intensidad que puede ser de dolor leve a severo; además, una vez que se forma una úlcera va a estar sujeta a un proceso continuo de irritación debido a la acción de la saliva y la microflora oral (Chavan y cols., 2012). Esto favorece que una lesión inflamatoria aguda se cronifique (Hapa y cols., 2011).

En general, el objetivo del tratamiento de estas úlceras orales está dirigido a la reducción y desaparición de los síntomas, así como a la restitución del tejido epitelial y conectivo perdido (De Carvalho y cols., 2015). En la actualidad, existen diferentes protocolos con el uso de fármacos tópicos y sistémicos para acelerar el proceso de curación de la herida y aliviar los síntomas; siendo los corticoides uno de los fármacos más prescritos por los clínicos debido a su eficacia como potente antiinflamatorio (Levin y Maibach, 2002). Sin embargo, las posibles complicaciones sistémicas del uso de corticoides y la complejidad del proceso de reparación tisular durante la curación de heridas, donde intervienen multitud de factores como la inflamación, proliferación y remodelación tisular con interacciones de diferentes líneas celulares, proteínas de matriz extracelular, y sus receptores están involucrados en la curación de heridas, y son mediados por citoquinas y factores de crecimiento (Camacho-Alonso y López-Jornet, 2007; Lopez Jornet y cols., 2011); han hecho que en los últimos años se haya extendido

el uso de otros tratamientos tópicos para la cicatrización de heridas en la mucosa oral, tales como el uso de hierbas medicinales.

El ECA es una hierba medicinal tradicional que ha demostrado ejercer efectos farmacológicos sobre la curación de las heridas (Yao y cols., 2017). La CA (Linn.) Urban., sunonym *Hydrocotyle asiatica* (Linn.), también conocida como Goua Kola, Tiger Grass o Indian pennywort, es una enredadera herbácea perteneciente a la familia Apiaceae (Umbelliferae) que crece en regiones tropicales de Asia, Oceanía, África y América. En la medicina tradicional asiática, la CA ha sido utilizada durante cientos de años como antipirético, diurético, reumático, en epilepsia, histeria, ansiedad, en el tratamiento de la insuficiencia venosa y muchas otras enfermedades (Gohil y cols., 2010); en la actualidad, la medicina tradicional también utiliza el ECA fundamentalmente como antimicrobiano, antioxidante y anticancerígeno (Jayashree y cols., 2003; Babu y cols., 1995) y con un amplio uso en dermatología, en varios procesos de curación de heridas (Maquart y cols., 1999; An y cols., 2012). Estos efectos farmacológicos se deben a la composición química y los principios activos hallados en diversos ECAs, los más importantes son saponinas triterpenoides pentacíclicas, conocidas principalmente como centelloides: asiaticósido, madecasosido (brahminósido), ácido asiático y ácido madecásico (ácido bráhmico) (Bylka y cols., 2014). Aunque también podemos encontrar (en concentraciones que dependen del lugar del cultivo y de los períodos de cosecha) (Puttarak y cols., 2012): flavonoides (kampferol, 3-glucosil-quercetina, quercetina, 3-glucosil-quercetina), ácidos grasos (linoleico, lignocérico, oléicom palmítico, elaídico y esteárico), taninos, aceites esenciales (betacariofileno, transbetafarneseno y germacreno D), fitosteroles (campestarol, sitoesterol y estifmaesterol), aminoácidos libres y alcoholoides como la hidrocotilina (Ratz-Lyko y cols., 2016). En relación a su aplicación en dermatología como regenerador tisular en la curación de heridas, el asiaticósido y madecasosido han mostrado producir una aceleración en la curación postquirúrgica de heridas superficiales y úlceras y, en general, de los procesos cicatriciales, ya que parece que activan las células de Malpighi de la epidermis, inhiben el proceso inflamatorio y bioestimulan la formación de colágeno (Jung y cols., 2013; Paolino y cols., 2012). Además de las saponinas triterpenoides pentacíclicas, los fitosteroles han demostrado su eficacia en el tratamiento de cicatrices hipertróficas y

queloides disminuyendo la fibrosis en las heridas. Parece que su mecanismo de acción es doble, por un lado, aumentan la síntesis de colágeno, de la matriz extracelular y de ácidos mucopolisacáridicos y, por otro, inhiben la fase inflamatoria de cicatrices hipertróficas y queloides (Kim y cols., 2010; Lee y cols., 2012; Nema y cols., 2013). Además, estos principios activos de los ECAs han mostrado en la curación de heridas que reducen el estrés oxidativo observándose una disminución de los niveles de malondialdehído (MDA), actúan en la producción de ARNm de procolágeno tipo I y III y aumentan la angiogénesis (Ruszymah y cols., 2012; Bahramsoltani y cols., 2014; Yaho y cols., 2017). Sin embargo, aunque el efecto regenerativo del ECA ha sido probado en la curación de heridas de otras mucosas como la digestiva (Zheng y cols., 2016), su acción sobre las heridas de la mucosa oral permanece desconocida actualmente.

En los últimos años, la reposición de tejidos orales ha dado lugar a la ingeniería tisular en la que aplicando los principios de ciencias de ingeniería y biología se consiguen desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan y mejoren la función tisular (Eweida y Marei, 2015). Existen dos pilares básicos sobre los que se sustenta la ingeniería tisular: por un lado, el uso de andamiajes o *scaffolds* biocompatibles, encargados de proporcionar el medio adecuado para el desarrollo y diferenciación celular, y por otro, el cultivo de poblaciones celulares aisladas, determinadas por el tipo de tejido a regenerar (Badylak, 2004). Sin embargo, la aplicación exclusiva (sin el aporte del cultivo celular) de *scaffolds* biocompatibles, que facilitan la presencia de una unidad estructural que permite a los elementos biológicos acelerar el proceso de regeneración (Bashutki y Wang, 2009), está siendo cada vez más utilizada en cirugía. Deben ser biocompatibles, no-tóxicas, tener características mecánicas apropiadas y ser capaces de degradarse gradualmente para ser reemplazadas por tejido regenerado (Albina y Reichner, 2003; Sen, 2009). Los *scaffolds* biológicos obtenidos de matriz extracelular (aloinjertos y xenoinjertos) han sido empleados de manera satisfactoria en estudios preclínicos con animales y en aplicaciones clínicas en humanos para la reconstrucción de una gran variedad de tejidos (Badylak, 2004; Kochupura y cols., 2005; Ota y cols., 2007). Aunque el mecanismo responsable de la respuesta remodeladora de estos *scaffolds* obtenidos de matriz extracelular no se conoce claramente, parece que intervienen diferentes procesos de reclutamiento de células pluripotenciales y diferenciadas (Valentin y cols.,

2010) y potencian la angiogénesis (Li y cols., 2004) del nuevo tejido. En concreto la MAVU es un excelente *scaffolds* en ingeniería tisular debido a diversas propiedades: su carácter acelular evita cualquier tipo de respuesta inmunitaria de rechazo del injerto por parte del organismo receptor, tiene una adecuada estabilidad dimensional, elevada resistencia mecánica y presencia de diversas moléculas como proteínas de adhesión celular, factores de crecimiento y enzimas (Parekh y cols., 2009; Rosario y cols., 2008; Zhu y cols., 2011; Machingal y cols., 2011).

Sin embargo, en la actualidad el posible efecto reparador de heridas en la mucosa oral mediante la aplicación tópica de MAVU o ECA permanece desconocido. En este sentido, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la aplicación tópica de la MAVU y ECA en la curación de heridas en lenguas de ratas, realizadas con un bisturí en un estudio in vivo en un modelo experimental en ratas.

## II.2 OBJETIVOS

El **objetivo general** fue el estudio de los efectos de la aplicación tópica de MAVU y ECA en la regeneración de heridas en lengua de rata.

El objetivo general puede ser desglosado en una serie de objetivos específicos que nos permitan sistematizar y responder a los diferentes aspectos que plantea nuestro estudio.

### Objetivos específicos

1. Estudiar el aumento o descenso del peso postoperatorio a los 2, 7, 14 y 21 días como medida indirecta del dolor intraoral en ratas Sprague-Dawley a las que se les provocó una herida en la mucosa del dorso lingual, que fue tratada diariamente de forma tópica con: nada (grupo control), ECA, MAVU + orabase u orabase.
2. Valorar mediante el análisis macroscópico morfogénico del porcentaje de mucosa del dorso lingual ocupada por la herida a los 2, 7, 14 y 21 días de provocar una herida en la mucosa del dorso lingual de ratas Sprague-Dawley y tratarla diariamente de forma tópica con: nada (grupo control), ECA, MAVU + orabase u orabase.

3. Analizar los niveles mucosos de los biomarcadores de estrés oxidativo MPO y MDA a los 2, 7, 14 y 21 días de provocar una herida en la mucosa del dorso lingual de ratas Sprague-Dawley y tratarla diariamente de forma tópica con: nada (grupo control), ECA, MAVU + orabase u orabase.
4. Determinar histológicamente el proceso de regeneración de las heridas mediante el grado de reepitelización e inflamación a los 2, 7, 14 y 21 días de provocar una herida en la mucosa del dorso lingual de ratas Sprague-Dawley y tratarla diariamente de forma tópica con: nada (grupo control), ECA, MAVU + orabase u orabase.
5. Estudiar mediante el análisis inmunohistoquímico de CD31, la vascularización mucosa a los 2, 7, 14 y 21 días de provocar una herida en la mucosa del dorso lingual de ratas Sprague-Dawley y tratarla diariamente de forma tópica con: nada (grupo control), ECA, MAVU + orabase u orabase.

### **III. METODOLOGÍA**

---

### III. METODOLOGÍA

#### III.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Las ratas utilizadas en este estudio fueron suministradas por el Servicio de Experimentación Animal (REGA ES300305440012) (Unidad de Apoyo a la Investigación) en la Universidad de Murcia (España). El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité ético de experimentación animal de la Universidad de Murcia (España) y la autoridad competente (A13160505) (Anexo 1), y siguió las Directrices de la Unión Europea para la experimentación animal (EU/ 63/2010).

Un total de 64 ratas macho Sprague-Dawley, con un peso entre 248 y 252 g (peso medio de 250 g), se incluyeron en este estudio prospectivo aleatorizado, que tuvo lugar entre noviembre de 2016 y mayo de 2017. Las ratas se alojaron en jaulas ventiladas individualmente con 12 / 12 horas de ciclos luz/oscuridad, comida y agua ad libitum. Las ratas se aclimataron durante 1 semana antes del inicio del estudio.

#### III.2 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO PARA PROVOCAR LA HERIDA

En condiciones asépticas, los animales se anestesiaron con una mezcla de 50% de ketamina y 50% de xilazina administrada por inyección intraperitoneal a una dosis de 0,1 ml/100 g de peso corporal. Se administró analgesia mediante administración subcutánea de buprenorfina 0,05 mg/kg antes del procedimiento de la herida. Se realizaron úlceras traumáticas de 4 mm de diámetro en el dorso de la lengua (en la línea media en el tercio medio del lado dorsal de la lengua) usando un bisturí circular (punzón de biopsia) (Laboratorios Stiefel, Madrid, España), para asegurarse de que todas las heridas fueran del mismo tamaño.

Finalmente, los bordes de la herida se aproximaron mesial y distalmente con 2 puntos simples de sutura con polipropileno 4/0 (Propilorc; Lorca Marín, Murcia, España). Siguiendo a Carew y cols., (Carew y cols., 1998) elegimos polipropileno porque minimiza la reacción del tejido a cuerpos extraños durante la cicatrización (Lin y cols., 2001; Camacho Alonso y cols., 2005).

### III.3 GRUPOS EXPERIMENTALES

La aleatorización se realizó usando un servicio online ([www.randomization.com](http://www.randomization.com)). Los animales fueron aleatorizados en cuatro grupos (n=16 por grupo) (Figura 9). Debido a la similitud entre los productos tópicos aplicados (color, consistencia y viscosidad), los tratamientos en los grupos 2, 3 y 4 fueron aplicados por un mismo investigador cegado.

**Figura 9.** Descripción de la muestra de estudio.



- **Grupo 1 (control):** sin tratamiento, solo control diario.

Los animales de los Grupos 2-4 recibieron aplicaciones tópicas diarias de los productos, usando un hisopo para cubrir completamente la herida con uno de los tres tratamientos estudiados, a intervalos de 8 h durante todo el período experimental. Durante las aplicaciones tópicas, los animales fueron anestesiados bajo la inhalación de isoflurano (Figura 10).

**Figura 10.** Sedación mediante inhalación de isofluorano.



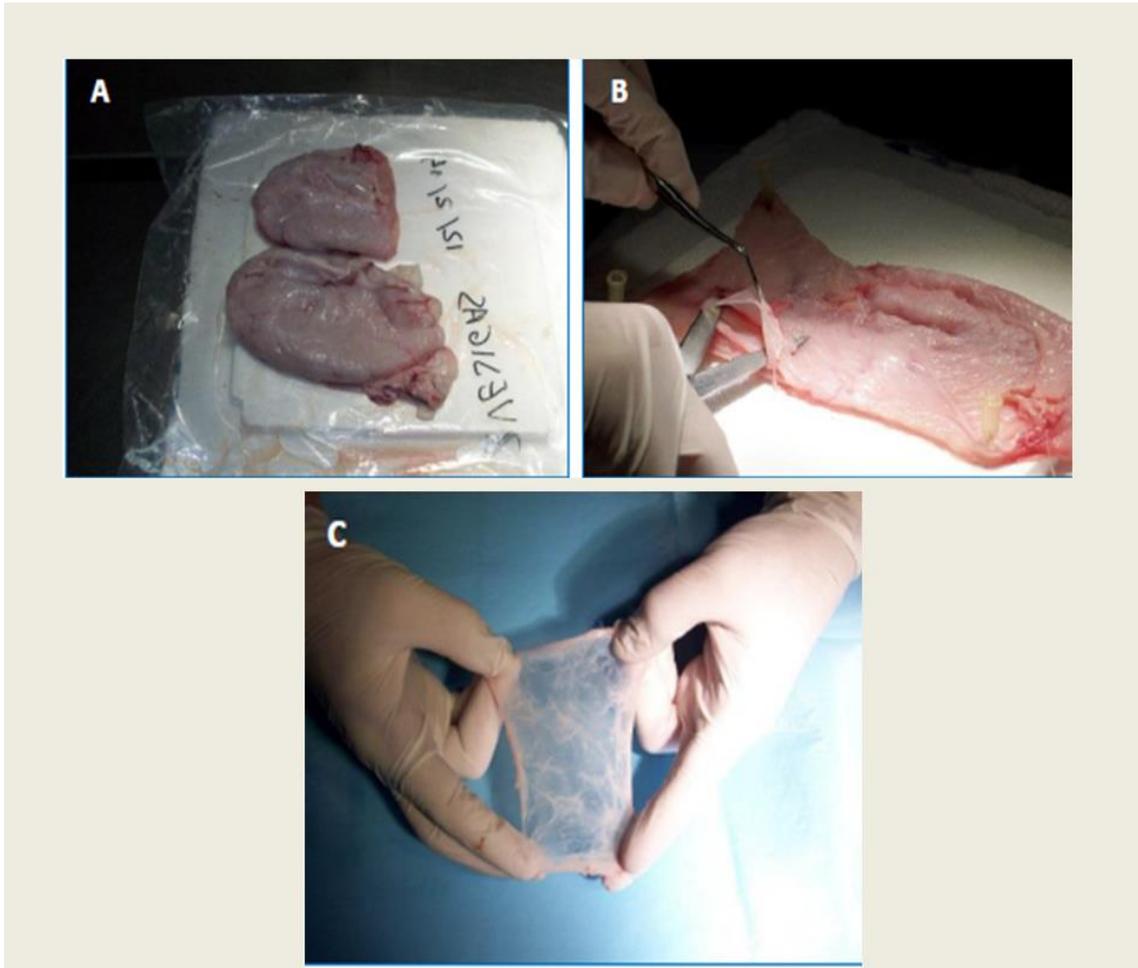
- **Grupos 2** (ECA): tratamiento tópico (tres aplicaciones tópicas) con ECA 1% (10 mg ECA/ 1g gel) (Blastoestimulina<sup>®</sup>, Almirall S.A., Barcelona, España).
- **Grupo 3** (MAVU mezclado con orabase): tratamiento tópico (tres aplicaciones tópicas) con MAVU 1% y 1% del vehículo (orabase) (10 mg MAVU/ 1g gel).
- **Grupo 4** (orabase): tratamiento tópico (tres aplicaciones tópicas) con vehículo (orabase).

Cuatro ratas de cada grupo fueron sacrificadas en una cámara de CO<sub>2</sub> en los días 2, 7, 14 y 21.

#### III.4 PREPARACIÓN DE LA MAVU

Los andamiajes o scffolds de MAVU fueron preparados a partir de la vejiga urinaria porcina de un cerdo macho de 140 kg de peso, como se ha descrito previamente en la literatura científica (Machingal y cols., 2011; Moon du y cols., 2008) (Figura 11).

**Figura 11.** A. Vejigas urinarias de cerdo tras ser descongeladas. B. Separación de las capas serosa (adventicia) y muscular mediante la disección roma del tejido. C. Obtención de una fina membrana constituida por la lámina propia de la vejiga disecada.



La vejiga se lavó y recortó para obtener la lámina propia y se sumergió en tripsina al 0,05% (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España) durante 1 h a una temperatura de 37° C. Posteriormente, fue transferida a medio de cultivo DMEM (Sigma Aldrich® Química S.A., Madrid, España) suplementado con 1000 µg/mL de Penicilina, 100 µg/mL de Estreptomicina, 500 µg/mL de Gentamicina y 2,5 µg/mL de Anfotericina además de FBS (suero bovino fetal) al 10% de concentración (Sigma Aldrich® Química S.A., Madrid,

España) en volumen, durante el transporte al servicio de cultivo de tejidos (Figuras 12 y 13).

**Figura 12.** Lámina propia en medio DMEM.

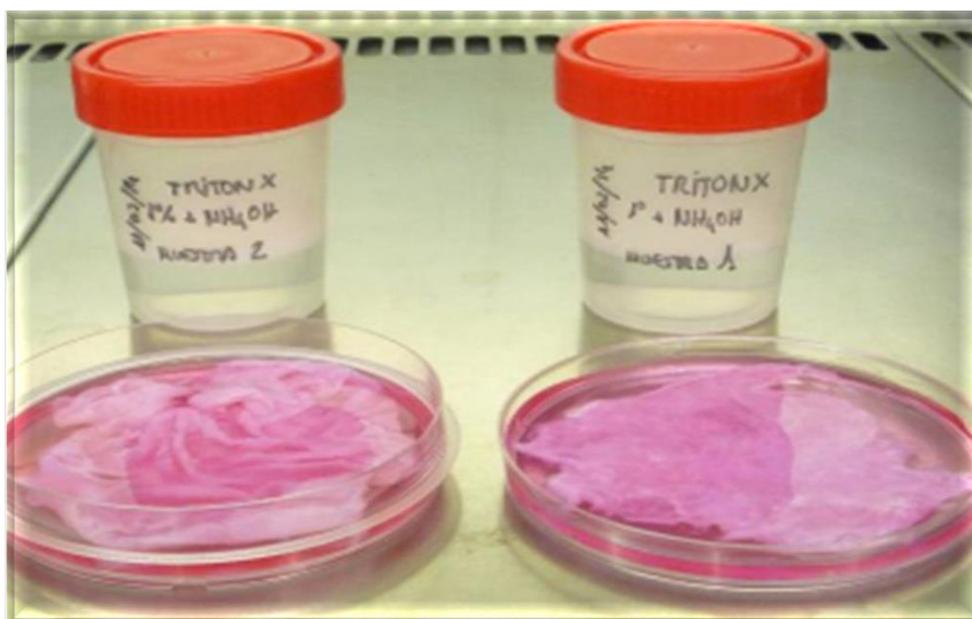


**Figura 13.** Detalle de la lámina propia de la vejiga urinaria porcina.



Las muestras se colocaron en recipientes individuales y fueron sometidas a un proceso de descelularización. En primer lugar, se realizó la digestión enzimática de la lámina propia incorporando una solución de Tripsina y EDTA al 0,05% (HyClone™ Laboratories Inc, Utah, Estados Unidos) en una incubadora de agitación a 37°C durante 1 hora. Ambas muestras fueron entonces transferidas a una solución DMEM suplementada con FBS al 10% (Sigma Aldrich® Química S.A., Madrid, España) y se incubaron en condiciones de oscuridad a 4°C durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, se llevó a cabo la humectación y saponificación de la vejiga mediante su inmersión en otra solución, esta vez Triton X-100 al 1% (Sigma Aldrich® Química S.A., Madrid, España) con hidróxido de amonio al 0,1% (Fisher Scientific S.L., Madrid, España) en agua desionizada estéril y se dejó actuar a 4°C de temperatura durante otros 4 días (Figura 14). Finalmente, las muestras de lámina propia de vejiga fueron lavadas de forma abundante con agua desionizada estéril y conservadas en el frigorífico a 4°C durante 3 días (Figura 15).

**Figura 14.** Muestras a las que se realiza un proceso de humectación y saponificación mediante Triton X-100 y  $\text{NH}_4\text{OH}$  durante 4 días a 4°C de temperatura.



**Figura 15.** Detalle de la MAVU obtenida tras completar el proceso de descelularización. La fina matriz fue conservada en el frigorífico en agua desionizada estéril a 4º C durante 3 días.



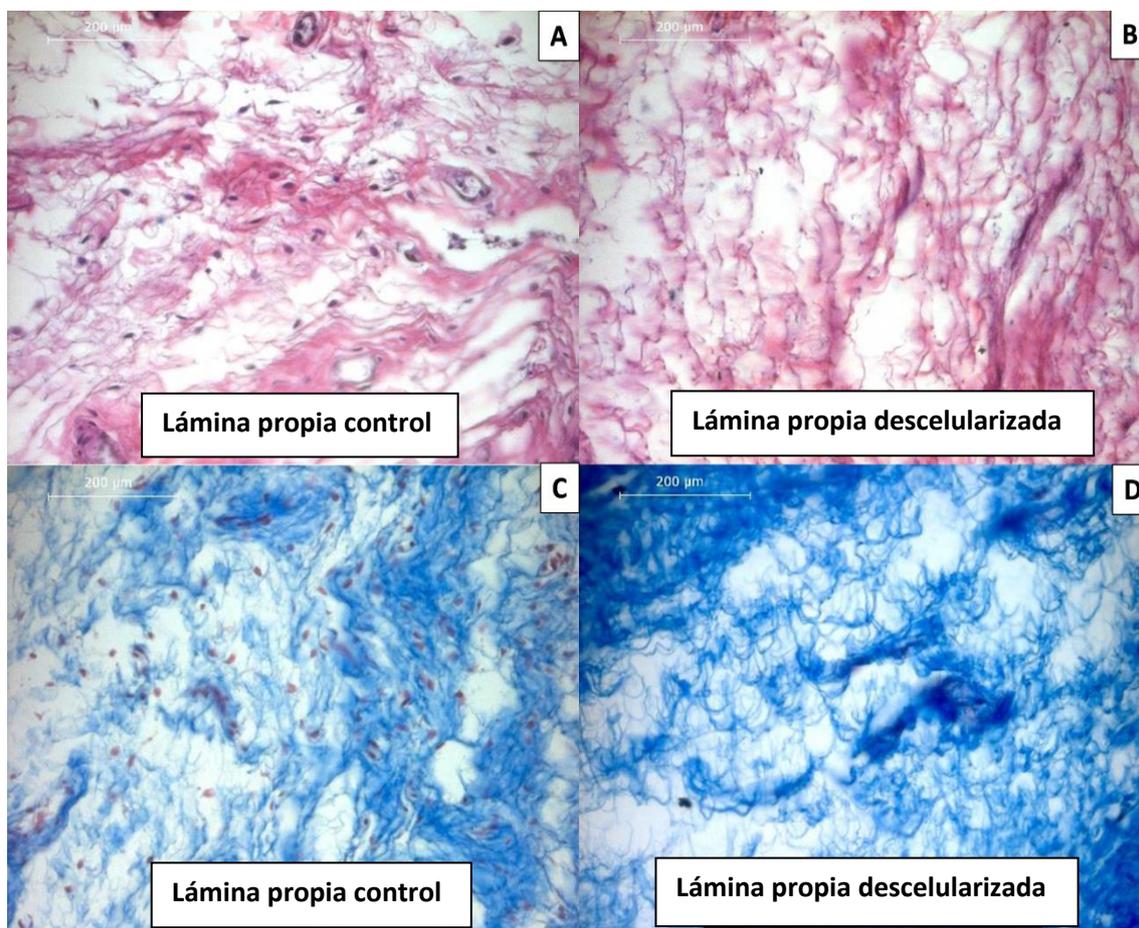
Para confirmar la ausencia de elementos celulares y la preservación de componentes estructurales, una porción de lámina propia no fue sometida al proceso de descelularidad y se utilizó como control. Ambas fueron sometidas a una evaluación histológica con:

- a. hematoxilina y eosina y tinción con tricrómico de Masson (Figuras 16A, 16B, 16C y 16D).
  
- b. DAPI (Dihidrocloruro de 4'6-diamino-2-fenilindol, D952) (Sigma-Aldrich Chemistry,S.A., Madrid, Spain), usando un microscopio de fluorescencia Leica® DMRB (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipado con filtro de banda DAPI (conjunto de filtro de excitación de longitud de onda BP 340-380,

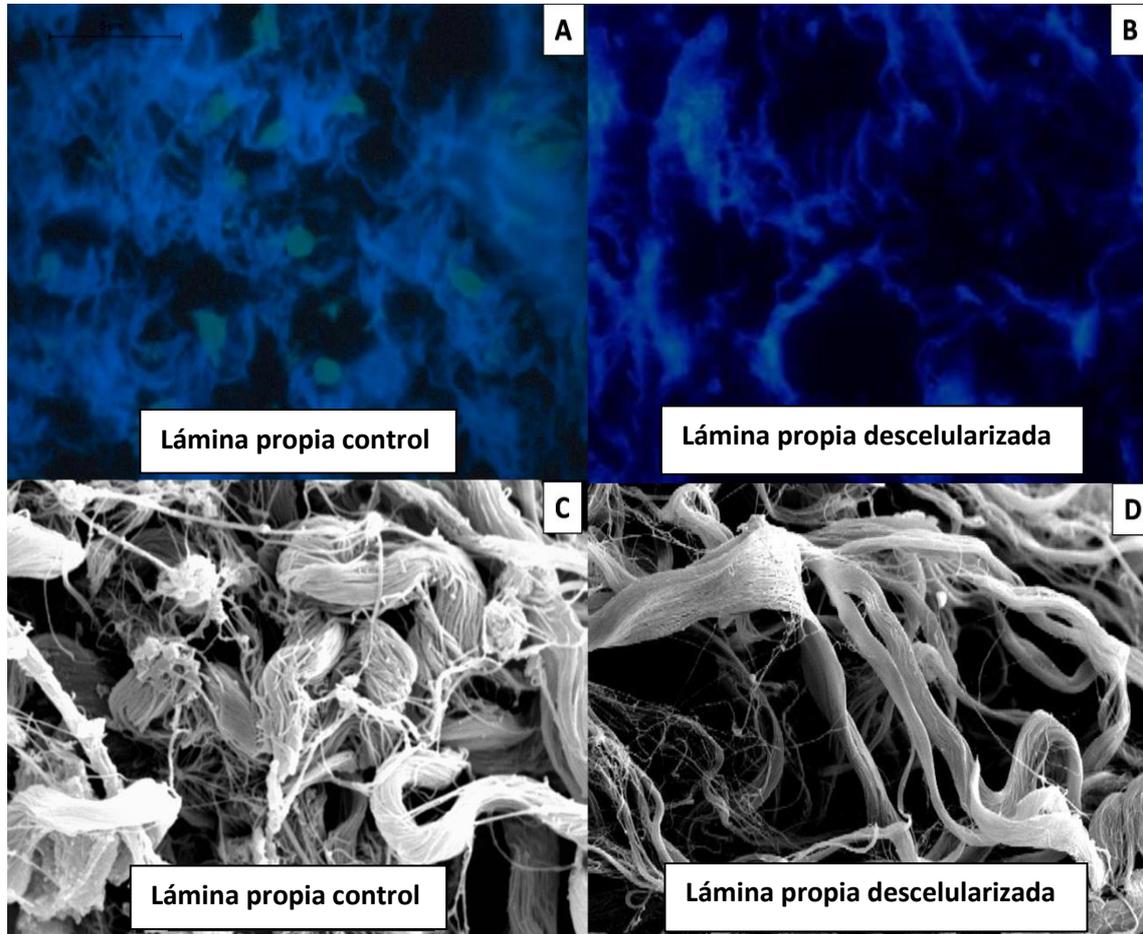
filtro dicroico RKP 400 y filtro de emisión LP 425) (Figuras 17A y 17B).

c. una porción de ambas muestras se sometió a preparación metalográfica y se analizó por microscopía electrónica de barrido (SEM) (Oxford Instrument INCA 300 EDX System, Abingdon, Oxfordshire, Reino Unido) (Figuras 17C y 17D).

**Figure 16.** Comparación de ausencia de elementos celulares entre control de lámina propia y lámina propia descelularizada. **A y B:** imágenes de hematoxilina y eosina a 400X. **C y D:** imágenes tricrómico de Masson a 400X.



**Figure 17.** Comparación de la ausencia de elementos celulares entre el control de la lámina propia y la lámina propia descelularizada. **A y B:** imágenes DAPI a 1000X. **C y D:** imágenes SEM a 3500X (C) y 1500X (D).



Después, la lámina propia descelularizada fue desecada utilizando un Rotavapor (Büchi, Flawil, Suiza) y una vez seca se mantuvo a 140° C en un baño de aceite al vacío durante 90 minutos. Finalmente, se trató con un sistema de fresado equipado con un rotor y una rejilla de 200  $\mu\text{m}$  (Pulverisette 14, Fritsch, Idar-Oberstein, Alemania) (García Fernández y cols., 2016). La MAVU en polvo fue esterilizada por óxido de etileno y mezclada con orabase, que es un compuesto inerte utilizado como vehículo en la preparación de los otros geles. Este gel estaba compuesto por carbopol 934P (2%), p-metil hidroxibenzoato (0,1%), etanol 98% (0,6%), propilenglicol (1%), trietanolamina

(1%) y agua purificada. Carbopol 934P es un polímero con propiedades mucoadhesivas. Actúa como un adjunto en los sistemas de administración de fármacos bioadhesivos y es seguro para usar en la mucosa oral (Nakanishi y cols., 1998). Funcionalmente, el gel de orabase contiene un mucoadhesivo y agente gelificante (carbopol 934P), apreservante (p-metilhidroxibenzoato), un humectante (propilenglicol), un solubilizante (etanol 98%) y agua purificada como vehículo. Además, se añadió gradualmente trietanolamina, una base débil, para ajustar el pH de este gel orabase a 6.5 (Souza Filho y cols., 2017).

### III.5 AUMENTO O DESCENSO DEL PESO POSTOPERATORIO

El dolor intraoral se evaluó indirectamente midiendo el aumento o descenso del peso postoperatorio (Camacho-Alonso y cols., 2005; Schaap y cols., 2012). El peso se evaluó el día 0 y el día de la eutanasia (Figura 18).

**Figura 18.** Peso de los animales.

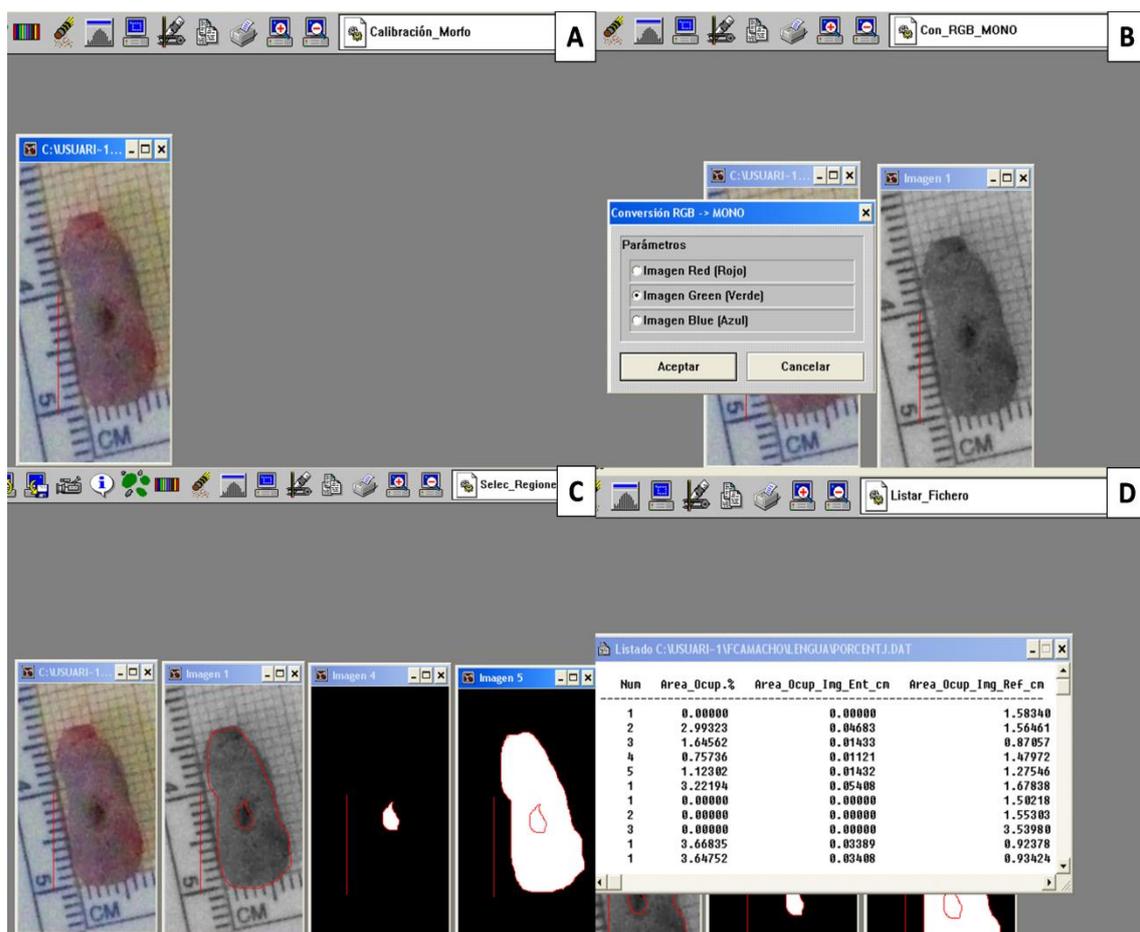


### III.6 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO MACROSCÓPICO DE LA REPARACIÓN DE HERIDAS

Tras el sacrificio de los animales, las lenguas fueron seccionadas justo por delante de la papila circunvalada y se procedió al análisis morfométrico macroscópico de la reparación de heridas. Las fotografías se obtuvieron con una cámara digital de 6,1 megapíxeles (Canon® EOS 70D, Canon®, Tokio, Japón) acoplada a un trípode y equipada con macro lentes de 100 mm con una distancia focal mínima. Las muestras fueron

posicionadas paralelas a la superficie de un posicionador (para mantener la misma distancia foco-muestra en todas las lenguas) que permitía un máximo contacto con la cara ventral lingual; lo que facilitó realizar todas las fotografías perpendiculares a la cara dorsal lingual. Para validar las conversiones de medición, se fotografió una regla milimétrica junto con todos los especímenes. El estudio macroscópico de la regeneración tisular en las imágenes digitalizadas se realizó con el software de histomorfometría MIP-4® (Digital Image, Barcelona, Sapin) midiendo el porcentaje de la mucosa dorso-lingual total que continuaba ocupada por la herida (Camacho-Alonso y cols., 2017) (Figura 19).

**Figura 19.** Análisis morfométrico macroscópico de la reparación de heridas mediante la cuantificación del porcentaje de lengua ocupada por la herida. **A:** Calibración. **B:** Conversión a monocromático. **C:** Selección binaria de regiones. **D:** Medición del porcentaje de área ocupada por la herida respecto al total del área de la lengua.



### III.7 NIVELES DE MPO

Antes de que las muestras fueran fijadas en formalina al 10%, para su posterior estudio histológico e inmunohistoquímico, se obtuvieron dos muestras de tejido perilesional para el análisis de los niveles de MPO y MDA, que fueron incluidas en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

El grado de acumulación de neutrófilos en las muestras se cuantificó por medio de la actividad MPO. Las muestras de lengua se procesaron utilizando la técnica descrita por Souza y cols., (Souza y cols., 2003). Una de las dos muestras se homogeneizó en dos volúmenes de solución tampón para congelar (0,1 mol/L de NaCl, 20 mmol/L NaPO<sub>4</sub>, 15 mmol/L NaEDTA) a pH 4.7 y centrifugado a 0.8 g por 15 minutos. A continuación, los sedimentos se sometieron a lisis hipotónica (900  $\mu\text{l}$  de solución de NaCl al 0,2% durante 30 segundos y luego se añadió un volumen equivalente que contenía un 1,6% de NaCl y un 5% de glucosa). Después de la centrifugación en el segundo tiempo, los sedimentos se resuspendieron en 50 mmol / l de tampón NaPO<sub>4</sub> a pH 5,4, que contiene bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 0,5%, y se volvieron a homogeneizar y centrifugar a 9,3 g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . La actividad de la MPO en los sedimentos resuspendidos se cuantificó por espectrofotometría para detectar cambios en la absorbancia a 450 nm usando una solución de tetrametilbenzidina (1,6 mmol / l) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mmol / l). Los resultados se informaron como nmol de MPO por gramo de tejido.

### III.8 NIVELES DE MDA

La peroxidación lipídica se cuantificó midiendo la producción de MDA en reacción con el ácido tiobarbitúrico, utilizando la segunda muestra de lengua (Araujo y cols., 2013). Las muestras de tejido se homogeneizaron (0,25 ml de tejido de lengua al 10% preparado en 0,15 mol/L KCL) y se añadieron a una solución de ácido tiobarbitúrico (1,5 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 1% y 500  $\mu\text{l}$  de ácido tiobarbitúrico al 0,6% en solución acuosa), colocando la muestra en un baño de agua y calentando a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos. Después, se añadieron 2 ml de n-butanol PA y las muestras se homogeneizaron y luego

se centrifugaron a 40.816 g durante 15 minutos a 4° C. La absorbancia de la capa de butanol se midió a 520 nm (A1) y 535 nm (A2). La concentración de MDA se calculó como la diferencia entre A2 y A1 y los valores se expresaron en nmol de MDA / g de tejido gingival.

### III.9 REEPITELIZACIÓN

Las muestras se incluyeron en parafina y se seccionaron en cortes de 3 µm en un plano perpendicular a la incisión, se tiñeron con hematoxilina y eosina, y se examinaron con aumentos de 20X, 40X y 100X. Todas las muestras fueron estudiadas por el mismo patólogo cegado. Para medir el grado de reepitelialización, fueron usados los criterios establecidos por Sinha y Gallagher (Sinha y Gallaguer, 2003):

- Grado 0: reepitelización en el borde de la herida.
- Grado 1: reepitelización cubriendo menos de la mitad de la herida.
- Grado 2: reepitelización cubriendo más de la mitad de la herida.
- Grado 3: reepitelización cubriendo la herida completa con espesor irregular.
- Grado 4: reepitelización cubriendo la herida completa con espesor normal.

### III.10 INFLAMACIÓN

El grado histológico de la inflamación se evaluó conforme a un sistema de clasificación gradual en función de la resolución del proceso inflamatorio (Camacho-Alonso y cols., 2009):

- Grado 1: inflamación aguda (se forma una membrana piogénica).
- Grado 2: predominio de inflamación aguda difusa (predominio del tejido de granulación).
- Grado 3: predominio de inflamación crónica (fibroblastos que comienzan a proliferar).
- Grado 4: resolución y cicatrización (reducción o desaparición de la inflamación crónica, aunque pueden persistir células redondas ocasionales).

### III.11 IMMUNOHISTOQUÍMICA

Para la tinción inmunohistoquímica, las muestras se seccionaron en cortes de 3  $\mu\text{m}$  de espesor y se colocaron en portaobjetos silanizados. Los portaobjetos fueron desparafinizados en xileno e hidratados en grados descendentes de etanol.

Para CD31, la actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó usando peróxido de hidrógeno al 3% en dos baños de 15 minutos. La solución de antígeno retroviral fue realizada durante 8 h en una solución tampón citratato, calentándola a 90° C en un baño de agua. Los portaobjetos se incubaron en RT durante 2 horas con anti-CD31 monoclonal (Agilent-Dako, Glostrup, Dinamarca). El sistema de detección usado fue el kit Envision Flex (Agilent-Dako, Glostrup, Dinamarca) usando un procesador DAKO Omnis™ (Agilent-Dako, Glostrup, Dinamarca). Las secciones fueron entonces incubadas con una solución con cromogen 3,3'-Diaminobenzidina (Agilent-Dako, Glostrup, Dinamarca) y hematoxilina de Mayer (Agilent-Dako, Glostrup, Dinamarca). Los controles positivos se realizaron con intestino de ratón, y los controles negativos fueron realizados por supresión del anticuerpo primario. Los vasos sanguíneos de cada sección fueron definidos como una imagen circular u ovoide en las paredes endoteliales y el espacio luminal.

Usando un microscopio (Axio scope; Zeiss, Zurich, Suiza) conectado a una cámara Aiocam MRc5 (Axio scope; Zeiss, Zurich, Suiza) fue generado un histograma de intensidad de pixel para medir el área células positivas y se expresó en porcentaje de área.

### III.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico SPSS versión 20.0 (SPSS® Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Se realizó un estudio descriptivo de cada variable. Aplicamos la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de homogeneidad de varianza de Levene, y los datos mostraron una distribución no normal, por lo que la estadística inferencial se realizó mediante test no paramétricos. Para el análisis de las variables cuantitativas utilizamos el test de Kruskal-Wallis y Dunn. La significación estadística fue aceptada para  $p \leq 0,05$ .

## **IV. RESULTADOS**

---

## IV. RESULTADOS

### IV.1 AUMENTO O DESCENSO DEL PESO POSTOPERATORIO

El orden de mayor a menor aumento de peso tras la cirugía fue MAVU>ECA>orabase>control en todos los días estudiados, con diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre MAVU con el resto de grupos, en los días 7, 14 y 21. A los 2 días después, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos ( $p > 0,05$ ). En el día 7, los animales cuyas heridas fueron tratadas con ECA mostraron un mayor aumento de peso que los grupos tratados con orabase y el grupo control, con diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,021$  al comparar ECA con ambos grupos) (Tabla 6).

**Tabla 6.** Comparación del peso postoperatorio entre los grupos de estudio (Kruskal-Wallis and Dunn test).

Grupos de estudio	Día 2 (n=4) Mediana (rango)	Día 7 (n=4) Mediana (rango)	Día 14 (n=4) Mediana (rango)	Día 21 (n=4) Mediana (rango)
Control	0.00 (-4.00-2.00)	2.00 (0.00-5.00) <sup>#,§</sup>	22.50 (18.00-30.00) <sup>§</sup>	80.50 (78.00-83.00) <sup>§</sup>
Centella asiática	0.50 (-1.00-4.00)	8.00 (6.00-11.00) <sup>*,§,†</sup>	34.00 (26.00-50.00) <sup>§</sup>	82.00 (80.00-90.00) <sup>§</sup>
MAVU + Orabase	3.00 (0.00-6.00)	13.00 (10.00-20.00) <sup>*,#,†</sup>	59.00 (45.00-75.00) <sup>*,#,†</sup>	102.00 (95.00-110.00) <sup>*,#,†</sup>
Orabase	0.00 (-3.00-2.00)	3.50 (2.00-5.00) <sup>#,§</sup>	27.00 (22.00-40.00) <sup>§</sup>	82.00 (79.00-87.00) <sup>§</sup>

\* Diferencias significativas en comparación con el grupo Control; # Diferencias significativas en comparación con el grupo Centella asiática; § Diferencias significativas en comparación con el grupo MAVU+ Orabase; † Diferencias significativas en comparación con el grupo Orabase

### IV.2 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO MACROSCÓPICO DE LA REPARACIÓN DE HERIDAS

El porcentaje de mucosa del dorso lingual ocupado por la herida fue de menor a mayor en los grupos MAVU<ECA<orabase<control en todos los días estudiados, con

diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre MAVU con el resto de grupos en los días 2, 7, 14 y 21. En el día 7, los animales cuyas heridas fueron tratadas con ECA mostraron un menor porcentaje de lengua ocupado por la herida que los grupos tratados con orabase y el grupo control, con diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.021$  al comparar ECA con ambos grupos) (Tabla 7).

**Tabla 7.** Comparación del porcentaje de mucosa lingual ocupada por la herida entre los grupos de estudio (Kruskal-Wallis and Dunn test).

Grupos de estudio	Día 2 (n=4) Mediana (rango)	Día 7 (n=4) Mediana (rango)	Día 14 (n=4) Mediana (rango)	Día 21 (n=4) Mediana (rango)
Control	16.60 (15.66-18.14) <sup>§</sup>	11.26 (9.93-12.55) <sup>#,§</sup>	6.99 (6.21-7.33) <sup>§</sup>	2.28 (1.58-3.01) <sup>§</sup>
Centella asiática	15.51 (15.33-17.04) <sup>§</sup>	7.21 (7.16-9.16) <sup>*,§,†</sup>	6.11 (5.95-6.82) <sup>§</sup>	1.61 (0.00-2.02) <sup>§</sup>
MAVU + Orabase	12.01 (9.54-14.33) <sup>*,#,†</sup>	5.23 (4.36-6.43) <sup>*,#,†</sup>	2.71 (2.24-4.42) <sup>*,#,†</sup>	0.00 (0.00-0.00) <sup>*,#,†</sup>
Orabase	16.21 (15.20-18.00) <sup>§</sup>	10.91 (9.54-12.17) <sup>#,§</sup>	6.48 (6.00-7.11) <sup>§</sup>	2.05 (1.08-3.31) <sup>§</sup>

**\* Diferencias significativas en comparación con el grupo Control; # Diferencias significativas en comparación con el grupo Centella asiática; § Diferencias significativas en comparación con el grupo MAVU+ Orabase; † Diferencias significativas en comparación con el grupo Orabase**

### IV.3 NIVELES DE MPO

El orden de menor a mayor actividad de MPO apareció en los grupos MAVU<ECA<orabase<control en todos los días estudiados, con diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre MAVU con el resto de grupos, en los días 7, 14 y 21. En el día 7, los animales cuyas heridas fueron tratadas con ECA presentaron menor actividad de MPO que los grupos tratados con orabase y el grupo control, con diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.043$  and  $p=0.021$ , respectivamente) (Tabla 8).

IV. 4 NIVELES DE MDA

El orden de menor a mayor de los niveles de MDA se observó en los grupos MAVU<ECA<orabase<control en todos los días estudiados, con diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre MAVU con el resto de grupos, en los días 2, 7, 14 y 21. A los 7 días de la cirugía, las heridas tratadas con ECA presentaron menor MDA que los grupos tratados con orabase y el grupo control, con diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.043$  and  $p=0.021$ , respectivamente) (Tabla 8).

**Tabla 8.** Comparación de la actividad de MPO y MDA entre los grupos de estudio (Kruskal-Wallis and Dunn test).

Grupos de estudio (actividad MPO)	Día 2 (n=4) Mediana (rango)	Día 7 (n=4) Mediana (rango)	Día 14 (n=4) Mediana (rango)	Día 21 (n=4) Mediana (rango)
Control	105.61 (85.41-120.72) <sup>§</sup>	85.31 (80.14-100.42) <sup>#,§</sup>	50.35 (45.38-75.59) <sup>§</sup>	25.43 (20.57-30.76) <sup>§</sup>
Centella asiatica	98.16 (78.58-109.75)	64.29 (58.64-79.68) <sup>*,§,†</sup>	40.43 (35.61-65.72) <sup>§</sup>	20.65 (17.61-23.66) <sup>§</sup>
MAVU + Orabase	80.74 (60.63-100.89) <sup>*,†</sup>	50.63 (43.52-60.65) <sup>*,#,†</sup>	21.41 (19.62-37.97) <sup>*,#,†</sup>	10.56 (9.68-15.27) <sup>*,#,†</sup>
Orabase	102.98 (80.87-115.26) <sup>§</sup>	80.51 (75.99-95.13) <sup>#,§</sup>	45.45 (40.52-70.14) <sup>§</sup>	22.46 (18.82-27.28) <sup>§</sup>

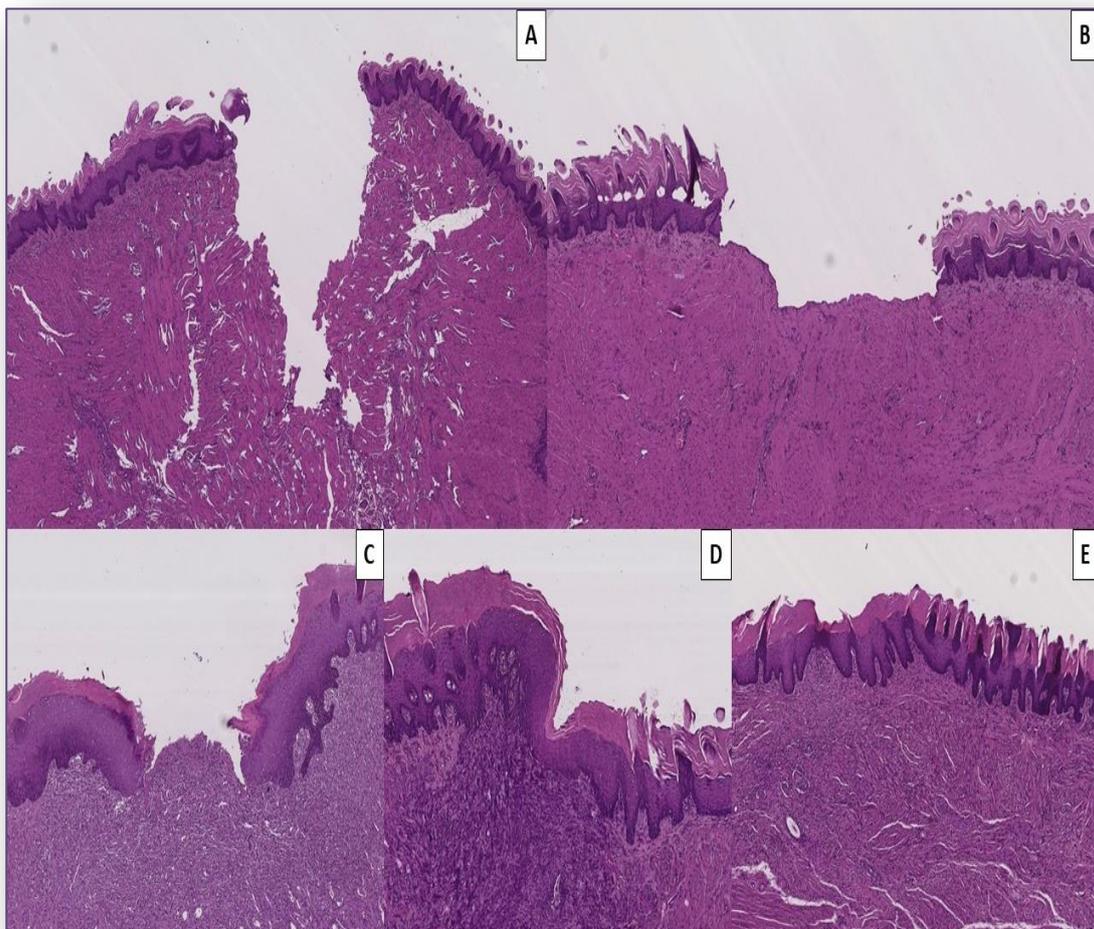
Grupos de estudio (actividad MPO)	Día 2 (n=4) Mediana (rango)	Día 7 (n=4) Mediana (rango)	Día 14 (n=4) Mediana (rango)	Día 21 (n=4) Mediana (rango)
Control	160.37 (157.34-168.44) <sup>§</sup>	135.26 (131.21-140.31) <sup>#,§</sup>	95.22 (93.21-108.26) <sup>§</sup>	54.33 (52.38-55.47) <sup>§</sup>
Centella asiatica	155.59 (151.98-161.48) <sup>§</sup>	121.35 (118.29-128.43) <sup>*,§,†</sup>	88.39 (87.38-98.48) <sup>§</sup>	52.31 (50.09-54.04) <sup>§</sup>
MAVU + Orabase	123.39 (117.26-129.64) <sup>*,#,†</sup>	98.36 (93.29-101.39) <sup>*,#,†</sup>	62.35 (60.31-67.38) <sup>*,#,†</sup>	20.32 (19.36-25.42) <sup>*,#,†</sup>
Orabase	157.33 (152.29-162.31) <sup>§</sup>	132.27 (128.11-135.29) <sup>#,§</sup>	90.19 (87.18-103.21) <sup>§</sup>	53.31 (50.16-54.15) <sup>§</sup>

\* Diferencias significativas en comparación con el grupo Control; # Diferencias significativas en comparación con el grupo Centella asiática; § Diferencias significativas en comparación con el grupo MAVU+ Orabase; † Diferencias significativas en comparación con el grupo Orabase

#### IV.5 REEPITELIZACIÓN

En el estudio histológico, el orden de mayor a menor grado de reepitelización se observó en los grupos MAVU>ECA>orabase>control en todos los días estudiados, con diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre MAVU con el resto de los grupos en los días 2 y 7. Aunque en las heridas en las que aplicamos la ECA mostraron una mayor grado de reepitelización que los grupos tratados con orabase y control en los días 7 y 14, no existían diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (Tabla 9) (Figura 20).

**Figura 20.** Grado de reepitelización (40X). **A:** Grado 0 (grupo control, día 2). **B:** Grado 1 (grupo orabase, día 7). **C:** Grado 2 (grupo ECA, día 7). **D:** Grado 3 (grupo MAVU, día 7). **E:** Grado 4 (grupo MAVU, día 14).



#### IV.6 INFLAMACIÓN

En el estudio histológico, el orden de mayor a menor resolución del proceso inflamatorio se observó en los grupos MAVU>ECA>orabase>control en todos los días estudiados, con diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre MAVU con el resto de los grupos en los días 2 y 7. Aunque en las heridas en las que aplicamos la ECA mostraron un mayor grado de resolución del proceso inflamatorio que los grupos tratados con orabase y control en el día 14, no existían diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (Tabla 9).

**Tabla 9:** Comparación del grado de reepitelización e inflamación entre los grupos de estudio (Kruskal-Wallis and Dunn test).

Grupos de estudio (actividad MPO)	Día 2 (n=4) Mediana (rango)	Día 7 (n=4) Mediana (rango)	Día 14 (n=4) Mediana (rango)	Día 21 (n=4) Mediana (rango)
Control	0.00 (0.00-1.00) <sup>§</sup>	1.50 (1.00-2.00) <sup>§</sup>	3.00 (3.00-4.00) <sup>§</sup>	4.00 (3.00-4.00)
Centella asiática	0.00 (0.00-1.00) <sup>§</sup>	2.00 (1.00-2.00) <sup>§</sup>	3.50 (3.00-4.00)	4.00 (3.00-4.00)
MAVU + Orabase	1.50 (1.00-2.00) <sup>*,#,†</sup>	3.00 (2.00-3.00) <sup>*,#,†</sup>	4.00 (4.00-4.00) <sup>*,†</sup>	4.00 (4.00-4.00)
Orabase	0.00 (0.00-1.00) <sup>§</sup>	1.50 (1.00-2.00) <sup>§</sup>	3.00 (3.00-4.00) <sup>§</sup>	4.00 (3.00-4.00)

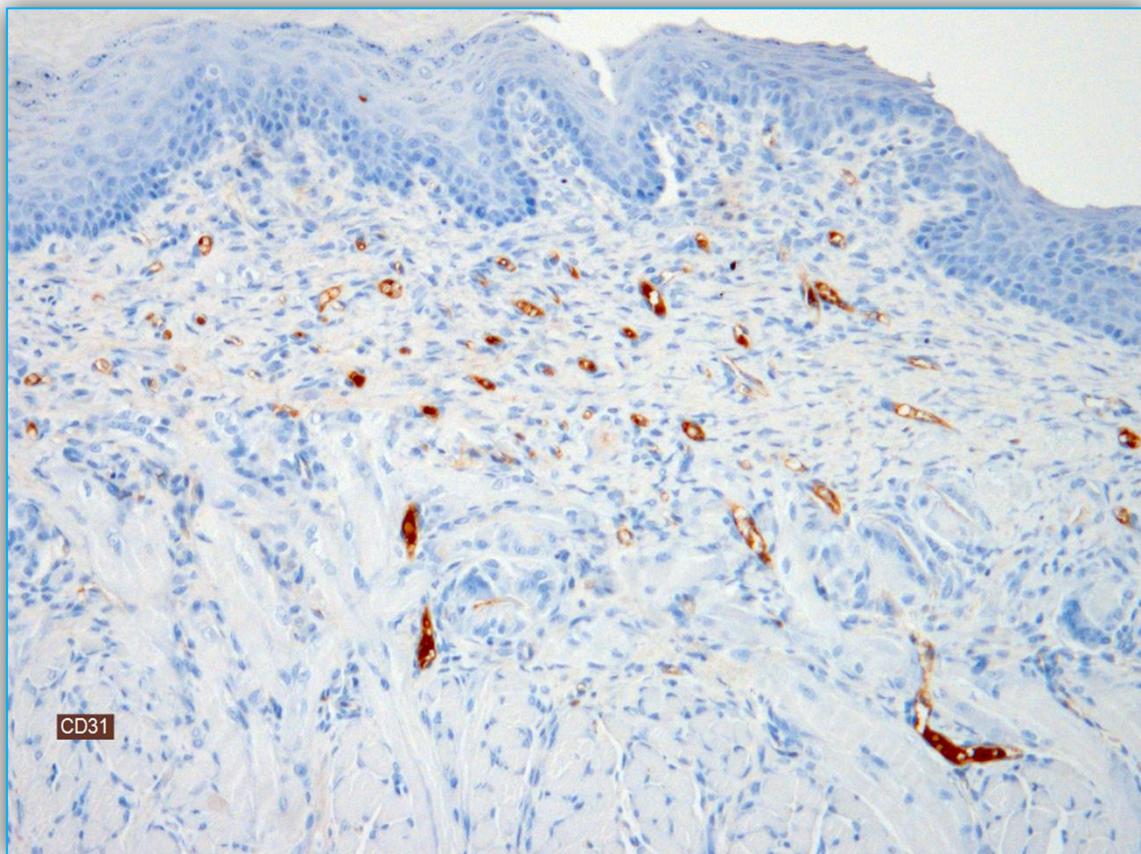
Grupos de estudio (actividad MPO)	Día 2 (n=4) Mediana (rango)	Día 7 (n=4) Mediana (rango)	Día 14 (n=4) Mediana (rango)	Día 21 (n=4) Mediana (rango)
Control	1.00 (1.00-2.00) <sup>§</sup>	2.00 (2.00-3.00) <sup>§</sup>	3.00 (3.00-4.00) <sup>§</sup>	4.00 (3.00-4.00)
Centella asiática	1.00 (1.00-2.00) <sup>§</sup>	2.00 (2.00-3.00) <sup>§</sup>	3.50 (3.00-4.00)	4.00 (3.00-4.00)
AUBM + Orabase	2.00 (2.00-2.00) <sup>*,#,†</sup>	3.00 (3.00-3.00) <sup>*,#,†</sup>	4.00 (4.00-4.00) <sup>*,†</sup>	4.00 (4.00-4.00)
Orabase	1.00 (1.00-2.00) <sup>§</sup>	2.00 (2.00-3.00) <sup>§</sup>	3.00 (3.00-4.00) <sup>§</sup>	4.00 (3.00-4.00)

**\* Diferencias significativas en comparación con el grupo Control; # Diferencias significativas en comparación con el grupo Centella asiática; § Diferencias significativas en comparación con el grupo MAVU+ Orabase; † Diferencias significativas en comparación con el grupo Orabase**

#### IV.7 INMUNOHISTOQUÍMICA

En el estudio inmunohistoquímico, el orden de mayor a menor CD31 + se observó en los grupos MAVU>ECA>orabase>control en todos los días estudiados, con diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre MAVU con el resto de los grupos en los días 2 y 7 (Figura 21).

**Figura 21.** Tinción inmunohistoquímica de CD31 en el grupo MAVU, día 7 (40X).



## V. DISCUSIÓN

---

## V. DISCUSIÓN

La mucosa oral es una estructura bien adaptada para proteger los tejidos subyacentes contra daños mecánicos e inhibe la entrada de microorganismos. Sin embargo, esta barrera protectora puede ser alterada cuando aparece una herida. La herida oral puede causar dolor e incomodidad, dejando al paciente con una función masticatoria dolorosa y en última instancia una nutrición comprometida y una menor calidad de vida (Deyhimi y cols., 2016).

La reposición de tejido blando oral que se ha perdido por lesiones o patologías comienza inmediatamente después de producirse su pérdida, con el propósito biológico de restaurar la integridad del tejido afectado. Dicha reparación ocurre en cuatro fases superpuestas en el tiempo: hemostasis, fase inflamatoria, fase proliferativa y remodelamiento (o formación de cicatriz) (Abou Neel y cols., 2013). El tratamiento de estas heridas con fármacos tópicos facilita la aceleración de estas fases de cicatrización, reduciendo en el tiempo el área de mucosa ulcerada y, por lo tanto, disminuyendo la sintomatología del paciente y mejorando su calidad de vida (de Freitas Cuba y cols., 2016).

Los corticosteroides tópicos son algunos de los medicamentos más comunes utilizados en la patología oral para el tratamiento de lesiones que afectan la mucosa. En cuanto a los efectos adversos de la aplicación tópica de corticoides en patologías o lesiones orales se pueden dividir en dos: locales y sistémicos. Entre los efectos adversos locales del tratamiento con corticoides se encuentra la candidiasis oral, que aparece entre el 25% - 55% de los pacientes tratados tópicamente con corticoides durante periodos de tiempo prolongados y a concentraciones altas. Otros efectos adversos locales son ardor en la boca, hipogeusia, leucoplasia vellosa oral y reacciones de hipersensibilidad. Entre los efectos adversos sistémicos, la absorción sistémica del fármaco puede causar la inhibición del eje hipotalámico-pituitarioadrenal debutando con insuficiencia suprarrenal secundaria, cara de luna, hirsutismo y fragilidad capilar (Gonzalez, 2010).

En nuestro estudio, se han investigado por primera vez los efectos del ECA sobre la regeneración tisular de heridas en mucosa oral. Los resultados evidenciaron un mayor aumento de peso postquirúrgico en los animales (menor dolor oral), una mayor reparación histológica de la herida (mayor grado de reepitelización e inflamación), una mayor positividad de CD31 y menores niveles de MPO, MDA y positividad de CD68 que en los grupos orabase y control; a los 2, 7, 14 y 21 días de producir las heridas.

Resultados similares fueron obtenidos como conclusión de una revisión integrativa publicada por Bahramsoltani y cols., (Bahramsoltani y cols., 2014) en el año 2014 sobre un total de 65 artículos (62 estudios *in vitro* e *in vivo* sobre animales y 3 en humanos) donde se estudiaba la eficacia en la curación de heridas por quemaduras en piel mediante plantas medicinales (*Allium sativum*, *Aloe vera*, *Centella asiática* y *Hippophae rhamnoides*). En estos estudios, los fitoquímicos mostraron su actividad positiva en diferentes etapas del proceso de cicatrización de quemaduras, mediante diversos mecanismos que incluyen antimicrobianos, antiinflamatorios, antioxidantes, estimulación de la síntesis de colágeno, proliferación celular y efectos angiogénicos. La seguridad de las plantas con propiedades curativas debe ser evaluada de acuerdo con las pautas internacionales de seguridad, debido a la capacidad tóxica o alérgica de la gran variedad de sus fitoquímicos para las células dérmicas dañadas. Sin embargo, la mayoría de las plantas mencionadas fueron preparadas en una forma tópica que reduce el riesgo de toxicidad.

En este mismo año 2014, Bylka y cols., (Bylka y cols., 2014) en una revisión bibliográfica centrada específicamente en ECAs, concluyeron sobre un total de 31 estudios que los ECAs eran eficaces para el tratamiento de curación de heridas en piel, psoriasis y escleroderma. Además, se conoce que CA aplicada en las dosis recomendadas no es tóxica y los posibles efectos adversos son raros. Puede causar reacciones alérgicas y ardor, cuando se utiliza externamente. La administración oral de las dosis recomendadas de CA puede causar dispepsia, náusea y dolor de cabeza.

Uno de los mecanismos por el cual los ECAs son efectivos en diversos procesos dermatológicos de regeneración tisular es su acción en la síntesis de colágeno. Estudios previos independientes han demostrado que asiaticoside y madecassoside (saponinas triterpenoides pentacíclicas incluidas en ECA) podrían facilitar la cicatrización de la

herida posiblemente mediante la mejora de la síntesis de colágeno I (Kimura y cols., 2008; Liu y cols., 2008), II y III (Liu y cols., 2008). En este sentido, Lee y cols., (Lee y cols., 2012) en ensayos de proliferación celular en un estudio *in vitro*, observaron que el asiaticoside indujo un aumento en el número de fibroblastos dérmicos humanos normales; incluso se ha observado que el ECA proporciona un efecto protector de UVB al alterar la expresión de microARN en fibroblastos dérmicos humanos (An y cols., 2012). Además, en el estudio publicado por Kim y cols., (Kim y cols., 2011) en el año 2011, confirmaron que los ECAs son capaces de prevenir la senescencia inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fibroblastos dérmicos humanos, por lo que pueden regular el estrés inducido por la senescencia (proceso de envejecimiento en que las células pierden la propiedad de proliferación continua por división y que se observan en todas las eucariotas), previniendo la expresión de la replicación del ADN y la expresión génica relacionada con la mitosis.

Existen algunos estudios similares al nuestro para el estudio de la regeneración de heridas provocadas en piel de animales de experimentación. Aunque hay autores como Emertcan y cols., (Emertcan y cols., 2008) que al comparar la efectividad entre ECA y una pomada de colágeno en la regeneración tisular de heridas provocadas en la espalda de veintisiete ratas albinas Wistar hembra, con un bisturí circular estándar para una biopsia de 8 mm de diámetro mediante: análisis morfométrico macroscópico de la reparación de heridas, hematoxilina y eosina y tinciones de tricómico de Masson, y evaluación inmunohistoquímica para el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), sintasa inducible endotelial y óxido nítrico (eNOS e iNOS), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), laminina, fibronectina, colágeno I e interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ); observaron que la pomada de colágeno mejoraba significativamente la calidad de la curación de heridas, y la formación de cicatrices, y que era una opción de tratamiento más apropiada que ECA en etapas tempranas del proceso de curación de la herida (3, 5 y 8 días después de la cirugía). Sin embargo, otros autores en estudios *in vivo* en ratas macho Sprague-Dawley y ratones albinos suizos Swiss (Süntar y cols., 2011; Tumen y cols., 2011) han utilizado el ECA como el tratamiento gold standard con el que poder comparar nuevos aceites esenciales para la regeneración de heridas, provocadas con punch estándar para biopsia de perforación en la espalda de los animales, debido a los

seis mecanismos importantes, todos interconectados y modulados entre sí: a. edema y filtración capilar, b. un fuerte poder antioxidante, efectivo en varias formas de productos, c. una acción antiinflamatoria, d. una modulación de la producción de colágeno evitando cicatrices más lentas o cicatrices hipertróficas y queloides más rápidas, e. una modulación de factores de crecimiento locales, y f. una modulación de la angiogénesis (Belcaro y cols., 2011).

Sin embargo, una de las principales limitaciones del presente estudio es la imposibilidad de comparar nuestros resultados con otras investigaciones; ya que, aunque el efecto regenerador de heridas de los ECAs ha sido comprobado no solo *in vitro* e *in vivo* en animales de experimentación sino también en humanos (Kuo y cols., 2012; Paocharoen, 2010), sus efectos sobre la regeneración tisular de heridas en la mucosa oral es la primera vez que se investigan.

La mucosa oral se puede perder después de la resección de un tumor, un traumatismo, o una enfermedad crónica. Actualmente, la pérdida de la mucosa oral se trata frecuentemente con la propia la piel del paciente (autólogo) o injertos mucosos. Sin embargo, los tratamientos actuales tienen inconvenientes incluyendo la morbilidad y disponibilidad del sitio donante. Debido a ello, los cirujanos se enfrentan frecuentemente a la escasez de mucosa oral para la reconstrucción de la cavidad oral. Aunque los injertos de piel autóloga son generalmente tolerados en la cavidad oral, la mucosa oral difiere de la piel en muchos aspectos. La mucosa oral es principalmente no queratinizada y húmeda con saliva en todo momento. El uso de injertos de piel con frecuencia causa complicaciones como crecimiento indeseado del cabello y la queratinización excesiva en el sitio receptor orofaríngeo. Además, en la mucosa oral reconstruida, la morfología y los patrones de expresión de proteínas tales como las queratinas son similares a la de la mucosa oral nativa, pero el epitelio es típicamente más delgado.

La ingeniería de tejidos es un instrumento importante para la regeneración de la mucosa oral, potencialmente para minimizar la morbilidad del sitio donante y la superación de los problemas de disponibilidad de la zona donante limitada (Liu y cols., 2011). Actualmente, la ingeniería tisular incluye la utilización de andamios de origen natural como matrices extracelulares descelularizadas para la reconstrucción de la

mucosa oral, capaces de inducir respuestas inmunes terapéuticas o producir los cambios en el fenotipo inmunológico (Kelly y cols., 2017).

El uso de MAVU es una opción viable para la rehabilitación de los sitios donantes de tejido vascularizado, que incluye la piel (Melville y cols., 2017).

Finalmente, en nuestro estudio, también se han investigado por primera vez los efectos de la aplicación tópica de MAVU sobre la regeneración tisular de heridas en mucosa oral. Los resultados evidenciaron un mayor aumento de peso postquirúrgico en los animales (menor dolor oral), una mayor reparación histológica de la herida (mayor grado de reepitelización y resolución de la inflamación), una mayor positividad de CD31 y menores niveles de MPO, MDA que en los grupos ECA, orabase y control; a los 2, 7, 14 y 21 días de producir las heridas. Resultados similares fueron obtenidos como conclusión de un artículo de revisión publicado por Eweida y cols., (Eweida y Marei, 2015) en el año 2015, donde se estudiaba la eficacia de andamiajes o scaffolds de matriz extracelular (MEC) para la regeneración dérmica con o sin incorporación de células mediante diferentes andamiajes: matriz dérmica acelular (MDA), mucosa del intestino delgado (MIS), y MAVU. En los estudios recogidos en esta revisión bibliográfica, los scaffolds sin células mostraron ser eficaces para la regeneración tisular de heridas agudas y simples; sin embargo, en heridas difíciles de curar añadir células (keratinocitos, fibroblastos o células madre) en los scaffolds de MEC mejoraría su capacidad regenerativa.

Aunque existen diferentes scaffolds de MEC utilizados en la regeneración tisular, parece que las MECs porcinas muestran propiedades que hacen de ellas unas de las más recomendables. Anilkumar y cols., (Anilkumar y cols., 2014) en el año 2014 compararon la eficacia de tres diferentes MECs porcinas derivadas de vesícula biliar, yeyuno y vejiga urinaria; observando que las tres fueron eficaces en la regeneración de heridas dérmicas en conejos. Aunque además de la vesícula biliar, yeyuno y vejiga urinaria, se han obtenido MECs porcinas de otros órganos como pulmón, riñón, corazón e hígado (Nonaka y cols., 2014; Ning y cols., 2012); la presencia en la MAVU de colágeno I, colágeno IV, laminina, fibronectina, elastina, factores de crecimiento (VEGF and TGF- $\beta$ ), ácido hialurónico, proteoglicanos, proteínas de adhesión celular y glicosaminoglicanos (Voytik-Harbin y cols., 1997; Wolf y cols., 2012) hace que sea una de las más utilizadas en ingeniería tisular. En este sentido, la MAVU ha sido utilizada en la regeneración tisular

de músculo (Machingal y cols., 2011; Corona y cols., 2012; Aurora y cols., 2015), tejido fascial (Eberly y cols., 2011), meniscos (Brown y cols., 2011), membrana timpánica (Parekh y cols., 2009), cerebro (Wang y cols., 2013), uretra (el-Kassaby y cols., 2008), corazón (Remlinger y cols., 2013), en reparación de aneurisma endotelial (Callanan y cols., 2013), en cirugía pélvica (Liu y cols., 2012) e incluso en defectos de la vejiga (Zhu y cols., 2011). En todos estos tejidos donde se ha utilizado la MAVU para favorecer la regeneración, esta MEC porcina ha dado buen resultado debido a su carácter acelular y a sus propiedades regenerativas, lo que explicaría que en nuestro estudio haya sido el tratamiento tópico más efectivo en la regeneración de heridas en lengua.

Reconocemos que hay varias limitaciones inherentes a este estudio. Primero, los resultados no se pueden comparar con otras investigaciones porque es la primera vez que se investigan los efectos de la aplicación tópica de ECA y MAVU, sobre la regeneración tisular de heridas en mucosa oral. Además, son necesarios futuros estudios con ambos fármacos; tanto *in vivo* con animales de experimentación usando muestras de mayor tamaño, como en humanos.

## **VI. CONCLUSIONES**

---

## VI. CONCLUSIONES

1. El dolor intraoral, cuantificado indirectamente por el mayor aumento de peso postoperatorio en los animales de experimentación, fue menor al aplicar diariamente de forma tópica MAVU + orabase en heridas provocadas en mucosa del dorso lingual de ratas Sprague-Sawley, tanto a los 2, 7, 14 y 21 días.
2. El análisis macroscópico del porcentaje de mucosa lingual ocupada por la herida, a los 2, 7, 14 y 21 días de provocar una herida en el dorso lingual de ratas Sprague-Dwley, fue menor cuando usamos un tratamiento diario de forma tópica de MAVU+ orabase.
3. Los niveles mucosos de los biomarcadores de estrés oxidativo MPO y MDA, a los 2, 7, 14 y 21 días de provocar una herida en la mucosa del dorso lingual de ratas Sprague-Dawley, fueron menores al aplicar diariamente de forma tópica MAVU + orabase.
4. El estudio histológico de la regeneración de heridas (mayor grado de reepitelización y menor grado de inflamación), a los 2, 7, 14 y 21 días de provocar una heria en la mucosa del dorso lingual de ratas Sprague-Dawley, mostró una mayor regeneración en las tratadas diariamente de forma tópica con MAVU + orabase.
5. El estudio mediante análisis inmunohistoquímico de CD31, de la vascularización mucosa a los 2, 7, 14 y 21 días de provocar una herida en la mucosa del dorso lingual de ratas Sprague-Dawley, indicó una mayor vascularización al aplicardiariamente de forma tópica MAVU + orabase.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

---

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abou Neel EA, Bozec L, Knowles JC, Syed O, Mudera V, Day R, et al. Collagen—emerging collagen based therapies hit the patient. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65:429-456.
2. Abu Saleh WK, Al Jabbari O, Ramlawi B, Bruckner BA, Loebe M, Reardon MJ. Right Atrial Tumor Resection and Reconstruction with Use of an Acellular Porcine Bladder Membrane. *Text Heart Inst J* 2016; 43:175-7.
3. Adtani PN, Narasimhan M, Punnoose AM, Kambalachenu HR. Antifibrotic effect of *Centella asiática* linn and asiatic acid on arecoline-induced fibrosis in human buccal fibroblast. *J Investig Clin Dent* 2017; 8:1-9.
4. Agrawal V, Brown BN, Beattie AJ, Gilbert TW, Badylak SF. Evidence of innervation following extracellular matrix scaffold-mediated remodelling of muscular tissues. *J Tissue Eng Regen Med* 2009; 3:590-600.
5. Alonso MJ. *Centella asiática* una planta con historia e interesantes propiedades. *Of* 2009; 28:98-104.
6. Albina JE, Reichner JS. Oxygen and the regulation of gene expression in wounds. *Wound Repair Regen* 2003; 11:445-451.
7. An IS, An S, Kang SM, Choe TB, Lee SN, Jang HH, et al. Titrated extract of *Centella asiatica* provides a UVB protective effect by altering microRNA expression profiles in human dermal fibroblasts. *Int J Mol Med* 2012; 30:1194-202.
8. Anilkumar TV, Vineetha VP, Revi D, Muhamed J, Rajan A. Biomaterial properties of cholecyst-derived scaffold recovered by a non-detergent/enzymatic method. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2014; 102:1506-16.
9. Ansari S, Karram M. Two cases of female urethral reconstruction with acellular porcine urinary bladder matrix. *Int Urogynecol J* 2017; 28:1257-1260.
10. Anukunwithaya T, Tantisira MH, Tantisira B, Khemawoot P. Pharmacokinetics of a standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233 in rats. *Planta Med* 2017; 83:10-717.
11. Araújo AA, Souza TO, Moura LM, Brito GA, Aragão KS, Araújo LS. Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF- $\alpha$ , down-regulated COX-2, MMP-2, ;P-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. *J Clin Periodontol* 2013; 40:1104-1111.
12. Aurora A, Roe JL, Corona BT, Walters TJ. An acellular biologic scaffold does not regenerate appreciable de novo muscle tissue in rat models of volumetric muscle loss injury. *Biomaterials* 2015; 67:393-407.
13. Babu TD, Kuttan G, Padikkala J. Citotoxic and anti-tumour properties of certain taxa of Umbelliferae with special reference to *Centella asiatica* (L.) Urban. *J Ethnopharmacol* 1995; 48:53-57.

14. Badylak SF. Xenogenic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transp Immunol* 2004; 12:367-77.
15. Bahramsoltani R, Farzaei MH, Rahimi R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. *Arch Dermatol Res* 2014; 306:601-617.
16. Balland O, Poinard AS, Famose F, Goulle F, Isard PF, Mathieson I, et al. Use a porcine urinary bladder acellular matrix for corneal reconstruction in dogs and cats. *Vet Ophthalmol* 2016; 19:454-463.
17. Bascones-Martínez A, Figuero-Ruiz E, Esparza-Gómez GC. Úlceras orales. *Med Clin (Barc)* 2005; 125:590-7.
18. Bashutki JD, Wang HL. Periodontal and endodontic regeneration. *J Endod* 2009; 35:321-328.
19. Belcaro G, Maquart FX, Scoccianti M, Dugall M, Hosoi M, Cesarone MR, et al. TECA (Titrated Extract of Centella Asiatica): new microcirculatory, biomolecular, and vascular application in preventive and clinical medicine. A status paper. *Panminerva Med* 2011; 53:105-118.
20. Benavides J. Reparación de heridas cutáneas. *Rev Asoc Col Dermatol* 2008; 16: 29-35.
21. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 244-69.
22. Brown BN, Chung WL, Pavlick M, Reppas S, Ochs MW, Rusell AJ. Extracellular matrix as an inductive template for temporomandibular joint meniscus reconstruction: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 2011; 69:e488-505.
23. Bruce AJ, Rogers RS. Acute oral ulcers. 3rd . *Dermatol Clin* 2003; 21:1-15.
24. Bylka W, Znajdek-Awizen A, Studznska-Sroka E, Danczak-Pazdrowska A, Brzezinska M. Centella asiatica in dermatology: an overview. *Phytother Res* 2014; 28:1117-24.
25. Callanan A, Davis NF, McGloughlin TM, Walsh MT. Development of a rotational cell-seeding system for tubularized extracellular matrix (ECM) scaffolds in vascular surgery. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2013; 102:781-788.
26. Camacho-Alonso F. Tesis Doctoral. Estudio clínico-patológico de la cicatrización de heridas provocadas sobre la mucosa del dorso lingual de 186 ratas albinas. Murcia: Departamento de Dermatología, Estomatología y Radiología y Medicina Física, 2005.305.
27. Camacho-Alonso F, Davia-Peña RS, Vilaplana-Vivo C, Tudela-Mulero MR, Merino JJ, Martínez-Beneyto Y. Synergistic effect photodynamic therapy and alendronate on alveolar bone loss in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontal Res* 2017. doi:10.1111/jre.12515.

28. Camacho-Alonso F, López-Jornet P. Clinical-pathological study of the healing of wounds provoked on the dorso-lingual mucosa in 186 albino rats. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 136:119-24.
29. Camacho-Alonso F, López-Jornet P, Bermejo-Fenoll A. Effects of scalpel (with and without tissue adhesive) and cryosurgery on wound healing in rat tongues. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100:5e8-63.
30. Camacho-Alonso F, López-Jornet P, Jiménez-Torres MJ, Orduña-Domingo A. Wound healing with PRGF infiltration in CO(2) laser lesions of the tongue: an animal study. *Photomed Laser Surg* 2009; 27:487-91.
31. Campos A. Conceptual and methodological objectives in histological research. *Educ Med* 2004; 7:36-40.
32. Carew JF, Ward RF, LaBruna A, Torzilli PA, Schley WS. Effects of scalpel, electrosurgery, and CO<sub>2</sub> and KTP lasers on wound healing in rats tongues. *Laryngoscope* 1998; 108:373-380.
33. Caves JM, Cui W, Wen J, Kumar VA, Haller CA, Chaikop EL. Elastin-like protein matrix reinforced with collagen microfibers for soft tissue repair. *Biomaterials* 2011; 32:5371-9.
34. Chao JC, Lin KY, Chen SH, Fang CL, Tsao CW. Effect of oral epidermal growth factor on mucosal healing in rats with duodenal ulcer. *World J Gastroenterol* 2013; 9:2261-5.
35. Chaushu L, Weinreb M, Beitlitum I, Moses O, Neucovsky CE. Evaluation of a topical herbal patch for soft tissue wound healing: an animal study. *J Clin Periodontal* 2015; 42:288-93.
36. Chavan M, Jain H, Diwan N, Khedkar S, Shete A, Durkar S. Recurrent aphthous stomatitis: a review. *J Oral Pathol Med* 2012; 41:577-583.
37. Cheng HL, Loai Y, Beanmont M, Farhat WA. The acellular matrix (ACM) for bladder tissue engineering: A quantitative magnetic resonance imaging study. *Mang Reson Med* 2010; 64:341-8.
38. Cherry GW, Hughes M. Increased healing of the disrupted wound--a myth or simply enhanced angiogenesis following wounding? Personal discussions with Tom Hunt from the 1960s to the present. *Wound Repair and Regen* 2003; 11:401-4.
39. Cohen IK, Diegelman RF, Crossland MC. Wound care and wound healing. In: Schwartz SI, editor. *Principles of Surgery* (6th ed). New York: McGraw-Hill; 1994.
40. Colegio de farmacéuticos de Madrid (COFM). Procedimiento Normalizado de Fórmula no Tipificada: Propionato de Clobetasol en Orabase. Unidad de formulación magistral 2007; 1:1-3.
41. Colegio de farmacéuticos de Sevilla. 2007. <http://profesionales.farmaceticosdesevilla.es/opencms/export/sites/default/Proyecto/proyecto/RICOFS/FormulacionMagistral/PNLPE-ORABA-PA.pdf>.

42. Corona BT, Machingal MA, Criswell T, Vadhavkar M, Dannahower AC, Bergman C. Further development of a tissue engineered muscle repair construct in vitro for enhanced functional recovery following implantation in vivo in a murine model of muscle loss injury. *Tissue Eng Part A* 2012; 18:1213-1228.
43. Corona BT, Word CL, Baker HB, Walters TJ, Christ GJ. Implantation of in vitro tissue engineered muscle repair constructs and bladder acellular matrices partially restore in vivo skeletal muscle function in a rat model of volumetric muscle loss injury. *Tissue Eng Part A* 2014; 20:705-15.
44. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Reparación de los tejidos: regeneración celular y fibrosis. En: Robbins, editor. *Patología estructural y funcional* (6ª edición). Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2000.p.112-7.
45. Coulombe PA. Wound epithelation accelerating the pace of discovery. *J Invest Dermatol* 2003; 121:219-30.
46. Coutu DL, Mahfouz W, Loutochin O, Galipeau J, Corcos J. Tissue engineering of rat bladder using marrow-derived mesenchymal stem cells and bladder acellular matrix. *Plos One* 2014; 9:e111966.
47. De Carvalho FB, Andrade AS, Rasquin LC, de Castro IV, Cangussu MC, Pinheiro AL. Effect of laser ( $\lambda$  660 nm) and LED ( $\lambda$  630 nm) photobiomodulation on formocresol-induced oral ulcers: a clinical and histological study on rodents. *Lasers Med Sci* 2015; 30:389-396.
48. De Freitas Cuba L, Braga Filho A, Cherubini K, Salum FG, Figueireio MA. Topical aplicación of Aloe vera and vitamin E on induced ulcers on the tongue of rats subjected to radiation: clinical and histological evaluation. *Support Care Cancer* 2016; 24:2557-2564.
49. Deshpande KT, Liu S, McCracken JM, Jiang L, Gaw TE, Kaydo LN, et al. Moderate (2%,v/v) Ethanol Feeding Alters Hepatic Wound Healing after Acute Carbon Tetrachloride Exposure in Mice. *Biomolecules* 2016; 6:5.
50. Deyhimi P, Khademi H, Birang R, Akhoondzadeh M. Histological evaluation of wound healing process after photodynamic therapy of rat oral mucosal ulcer. *J Dent (Shiraz)* 2016; 17:43-8.
51. Eberli D, Atala A, Yoo JJ. One and four layer acellular bladder matrix for fascial tissue reconstruction. *J Mater Sci Mater Med* 2011; 22:741-51.
52. El Gazaerly H, Elbardisey DM, Eltokly HM, Teaama D. Effect of transforming growth factor Beta 1 on wound healing in induced diabetic rats. *Int J Health Sci* 2013; 7:160-72.
53. el-Kassaby A, Abou Shwareb T, Atala A. Randomized comparative study between buccal mucosal and acellular bladder matrix grafts in complex anterior urethral strictures. *J Urol* 2008; 179:1432-1436.
54. Ermertcan AT, Inan S, Ozturkcan S, Billac C, Cilaker S. Comparison of the effects of collagenase and extract of *Centella asiatica* in an experimental model of wound healing: an immunohistochemical and histopathological study. *Wound Rep Reg* 2008; 16:674–81.

55. Evans EW. Treating Scars on the oral mucosa. *Facial Plast Surg North Am* 2017; 25:89-97.
56. Eweida AM, Marei MK. Naturally occurring extracellular matrix scaffolds for dermal regeneration: Do they really need cells. *Biomed Res Int* 2015; 2015:839694.
57. Fabre C. Future's Technology: Tissue engineering and stem cells in reproductive medicine. *Med Clin Condes* 2010; 21:488-93.
58. Falke GF, Atala A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch Argent Pediatr* 2000; 98:103-15.
59. Felzani R. Cicatrización de los tejidos en cirugía bucal: Revisión de la literatura. *Acta Odontol Venez* 2005; 43:310-8.
60. Ferraris ME, Campos A. *Histología y Embriología bucodental*. 2<sup>th</sup> ed. Madrid. Ed.Panamericana; 2004: 419.
61. Freytes DO, Martin J, Velanker SS, Lee AS, Badylak SF. Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix. *Biomaterials* 2008; 29:1630-7.
62. Freytes DO, Stoner RM, Badylak SF. Uniaxial and biaxial properties of terminally sterilized porcine urinary bladder matrix scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; 84:408-14.
63. Garcia-Fernandez MJ, Mabary N, Chai F, Chai F, Cazaux F, Blanchemain N. New multifunctional pharmaceutical excipient in tablet formulation based on citric acid-cyclodextrin polymer. *Int J Pharm* 2016; 511:913-920.
64. Garlick JA, Taichman LB. Fate of human keratinocytes during reepithelization in a organotypic culture model. *Lab Invest* 1994; 70:916-24.
65. Gohil KJ, Patel JA, Gajjar AK. Pharmacological review on *Centella asiatica*: A potencial herba cure-all. *Indian J Pharm Sci* 2010; 72:546-56.
66. González-Moles MA. The use of topical corticoids in oral pathology. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010; 15:e827-31.
67. Gray NE, Zweig JA, Murchison C, Caruso M, Matthews DG, Kamamoto C, et al. *Centella asiatica* attenuates A $\beta$ -induced neurodegenerative spine loss and dendritic simplification. *Neurosci Lett* 2017; 646:24-29.
68. Guarín- Corredor C, Quiroga-Santamaria P, Landinez-Parra NS. Wound healing process of skin, endogenous fields related and chronic wounds. *Rev Fac Med* 2013; 61:441-8.
69. Hapa A, Aksoy B, Polat M, Aslan U, Atakan N. Does recurrent aphthous stomatitis affect quality of life? A prospective study with 128 patients evaluating different treatment modalities. *J Dermatolog Treat* 2011; 22:215-220.

70. Hendrikcs SJ, Sollars SI, Hill DL. Injury-induced functional plasticity in the peripheral gustatory system. *J Neurosci* 2002; 22:8607-13.
71. <http://enciende.cosce.org/boletin/index.asp?item=111>.
72. Hubbell JA. A new-for-old urinary bladder. *Nature* 1999; 398: 198-9.
73. Hupp JR. Wound repair. In: Hupp JR, Ellis E, Tucker MR. ed. *Contemporary Oral and Maxillofacial surgery*. 6<sup>th</sup> ed. Elsevier; 2014:43-52.
74. Jayashree G, Kurup Muraleedhara G, Sudarslal S, Jacob VB. Anti-oxidant activity of *Centella asiatica* on lymphoma-bearing mice. *Fitoterapia* 2003; 74:431-434.
75. Jin SG, Kim KS, Yousaf AM, Kim DW, Jang SW, Son MV, et al. Mechanical properties and in vivo healing evaluation of a novel *Centella asiatica*-loaded hydrocolloid wound dressing. *Int J Pharm* 2015; 490:240-7.
76. Jung E, Lee JA, Shin S, Roh KB, Kim JH, Park D. Madecassoside inhibits melanin synthesis by blocking ultraviolet-induced inflammation. *Molecules* 2013; 18:15724-15736.
77. Kabir AU, Samed MB, D'Costa NM, Akhter F, Ahmed A, Hannan JM. Anti-hyperglycemic activity of *Centella asiatica* is partly mediated by carbohydrase inhibition and glucose-fiber binding. *BMC Complement Altern Med* 2014; 14:31.
78. Kanematsu A, Yamamoto S, Noguchi T, Ozeki M, Tabata Y, Ogawa O. Bladder regeneration by bladder acellular matrix combined with sustained release of exogenous growth factor. *J Urol* 2003; 170: 1633-8.
79. Karasneh JA, Al-Eryani K, Clark GT, Sedghizadeh PP. Modified protocol including topical minocycline in orabase to manage medication-related osteonecrosis of the jaw cases. *J Oral Pathol Med* 2016; 45:718-20.
80. Kelly SH, Shores LS, Votaw NL, Collier JH. Biomaterial strategies for quering therapeutic immune responses. *Adv Drug Deliv Rev* 2017; S0169-409X: 30044-3.
81. Kern A, Liu K, Mansbridge J. Modification of fibroblast gamma-interferon responses by extracellular matrix. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 112-8.
82. Khozeimeh F, Shahtalebi MA, Noori M, Savabi O. Comparative evaluation of ketoconazole tablet and topical ketoconazole 2% in orabase in treatment of candida-infected denture stomatitis. *J Contemp Dent Pract* 2010; 11:17-24.
83. Kim J, Hadlock T, Cheney M, Varvares M, Marler J. Muscle tissue engineering for partial glossectomy defects. *Arch Facial Plast Surg* 2003; 5:403-7.
84. Kim OT, Kim SH, Ohyama K, Muranaka T, Choi YE, Lee HY, et al (2010) Upregulation of phytosterol and triterpene biosynthesis in *Centella asiatica* hairy roots overexpressed ginseng farnesyl diphosphate synthetase. *Plant Cell Rep* 29:403-411.

85. Kim YJ, Chan HJ, Nam KH, Yoon Y, Lee H, An S. Centella asiatica extracts modulate hydrogen peroxide-induced senescence in human dermal fibroblasts. *Exp Dermatol* 2011; 20:998–1003.
86. Kimmel H, Rahn M, Gilbert TW. The clinical effectiveness in wound healing with extracellular matrix derived from porcine urinary bladder matrix: a case series on severe chronic wounds. *J An Col Certif Wound Spec* 2010; 2: 55-9.
87. Kimura Y, Sumiyoshi M, Samukawa K, Satake N, Sakanaka M. Facilitating action of asiaticoside at low doses on burn wound repair and its mechanisms. *Eur J Pharmacol* 2008; 584:415-423.
88. Kispelyi B, Lohinai Z, Altdorfer K, Feher Z. Neuropeptide analysis of oral mucosa in diabetic rats. *Neuroimmunomodulation* 2014; 21:213-20.
89. Kochupura PV, Azeloglu EU, Kelly DJ, Doronin SV, Badylak SF, Krunkenkamp IB. Tissue-engineered myocardial patch derived from extracellular matrix provides regional mechanical function. *Circulation* 2005; 112:1144-149.
90. Kovalik AC, Bisetto P, Pochapski MT, Campagnoli EB, Pilatti GL, Santos FA. Effects of an orabase formulation with ethanolic extract of *Malva sylvestris* L. in oral wound healing in rats. *J Med Food* 2014; 17:618-24.
91. Kuo YS, Chien HF, Lu W. Plectranthusamboinicus and Centella asiatica Cream for the Treatment of Diabetic Foot Ulcers. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012:418679.
92. Kwon KJ, Bae S, Kim K, An IS, Ahn KJ, An S, et al. Asiaticoside, a component of Centella asiatica, inhibits melanogenesis in B16F10 mouse melanoma. *Mol Med Rep* 2014; 10:503-7.
93. Labib G, Aldawsari H. Innovation of natural essential oil-loaded Orabase for local treatment of oral candidiasis. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9:3349-59.
94. Laliberté F, Laliberté MF, Lécart S, Bousquet J, Klossec JM, Mounedji N. Clinical and pathologic methods to assess the long-term safety of nasal corticosteroids. French Triamcinolone Acetonide Study Group. *Allergy* 2000; 55:718-22.
95. Lee justil, Kim EH, Shin D, Roh JL. Accelerated oral wound healing using a pre-vascularized mucosal cell sheet. *Sci Rep* 2017; 6:10667.
96. Lee JH, Kim HL, Lee MH, You KE, Kwon BJ, Seo HJ, et al. Asiaticoside enhances normal human skin cell migration, attachment and growth in vitro wound healing model. *Phytomedicine* 2012; 19:1223-7.
97. Lee MS, Seo SR, Kim JC. A  $\beta$ -cyclodextrin, polyethyleneimine and silk fibroin hydrogel containing Centella asiatica extract and hydrocortisone acetate: releasing properties and in vivo efficacy for healing of pressure sores. *Clin Exp Derm* 2011; 37:762–71.

98. Levin C, Maibach HI. Topical corticosteroid-induced adrenocortical insufficiency: clinical implications. *Am J ClinDermatol* 2002; 3:141-7.
99. Li CY, Chen XH, Tao XA, Xia J, Cheng B. The development and inflammatory features of radiotherapy-induced glossitis in rats. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 16:348-53.
100. Li F, Li W, Johnson S, Ingram D, Yoder M, Badylak S. Low-molecular-weight peptides derived from extracellular matrix as chemoattractants for primary endothelial cells. *Endothelium* 2004; 11:199-206.
101. Li J, Wang W, Li J, Rexiati M, An H, Wang F, et al. The histocompatibility research of hair follicle stem cells with bladder acellular matrix. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95:e4979.
102. Lin KY, Farinholt HM, Reddy VR, Edlich RF, Rodeheaver GT. The scientific basis for selecting surgical sutures. *J Long Term Eff Med Implants* 2001; 11:29-40.
103. Liu J, Mao JJ, Chen L. Epithelial-mesenchymal interactions as a working concept for oral mucosa regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2011; 17:25-31.
104. Liu L, Deng L, Wang Y, Ge L, Chen Y, Liang Z. Porcine urinary bladder matrix-polypropylene mesh: a novel scaffold material reduces immunorejection in rat pelvic surgery. *Int Urogynecol J* 2012; 23:1271-8.
105. Liu M, Dai Y, Li Y, Lou Y, Huang F, Gong Z, Meng Q. Madecassoside isolated from *Centella asiatica* herbs facilitates burn wound healing in mice. *Planta Med* 2008; 74:809-815.
106. López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Gómez-García F, Molina-Miñano F, Cañas X, Serafín A, et al. Effects of potassium apigenin and verbena extract on the wound healing process of SKH-1 mouse skin. *Int Wound J* 2014; 11:489-95.
107. López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Jiménez-Torres MJ, Orduña-Domingo A, Gómez-García F. Topical curcumin for the healing of carbon dioxide laser skin wounds in mice. *Photomed Laser Surg* 2011; 29:809-814.
108. Luo JC, Shin VY, Liu ES, So WH, Ye YN, Chang FY, et al. Non-ulcerogenic dose of dexamethasone delays gastric ulcer healing in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307:692-8.
109. Machingal MA, Corona BT, Walters TJ, Kesireddy V, Koval CN, Dannhower A, et al. A tissue-engineered muscle repair construct for functional restoration of an irrecoverable muscle injury in a murine model. *Tissue Eng Part A* 2011; 17:2291-2303.
110. Mancuso LA, Lassaline M, Scherrer NM. Porcine urinary bladder extracellular matrix grafts (ACell Vet® Corneal Disc) for keratomalacia in 17 equids (2012-2013). *Vet Ophthalmol* 2016; 19:3-10.
111. Maquart FX, Chastang F, Simeon A, Birembaut P, Guillery P, Wegrowski Y. Triterpenes from *Centella asiatica* stimulate extracellular matrix accumulation in rat experimental wounds. *Eur J Dermatol* 1999; 9:289-96.

112. Melville JC, Bennetts NA, Tijerina L, Shum JW. The use of acellular urinary bladder matrix as coverage for fasciocutaneous free flap donor sites: an alternative to traditional grafting procedures. *J Oral Maxillofac Surg* 2017; S0278-2391:30312-9.
113. Milbourn D, Israelsson LA. Wound complications and stitch length. *Hernia* 2004; 8:39-41.
114. Moon du G, Christ G, Stitzel JD, Atala A, Yoo JJ. Cyclic mechanical preconditioning improves engineered muscle contraction. *Tissue Eng Part A* 2008; 14:473-482.
115. Morales-Navarro D. Tissue engineering as a pillar of regenerative medicine in dentistry. *Rev Cub Estomatol* 2014; 52:288-304.
116. Naidoo DB, Chuturgoon AA, Phulukdaree A, Guruprasad KP, Satyamoothy K, Sewra V. Centella asiática modulates cáncer cacheixa associated inflammatory cytokines and cell death in leukaemic THP-1 cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMC'S). *BMC Complement Altern Med* 2017; 17:377.
117. Nakanishi T, Kaiho F, Hayashi M. Improvement of drug release rate from carbopol 934P formulation. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1998; 46:171-173.
118. Nema NK, Maity N, Sarkar BK, Mukherjee PK. Matrix metalloproteinase, hyaluronidase and elastase inhibitory potential of standardized extract of Centella asiatica. *Pharm Biol* 2013; 51:1182-7.
119. Ngamwonglumlert L, Devahastin S, Chiewchan N. Molecular structure, stability and cytotoxicity of natural green colorants produced from Centella asiatica L. leaves treated by steaming and metal complexations. *Food Chem* 2017; 232:387-394.
120. Ning LJ, Zhang Y, Chen XH, Luo JC, Yang ZM, Qin TW. Preparation and characterization of decellularized tendon slices for tendon tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2012; 100:1448-1456.
121. Nonaka PN, Campillo N, Uriarte JJ, Garreta E, Melo E, de Oliveira LV. Effects of freezing/thawing on the mechanical properties of decellularized lungs. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102:413-419.
122. Oberpenning F, Meng J, Yoo J, Atala A. De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat Biotechnol* 1999; 17:149-5.
123. Orive G, Hernández RM, Garcón AR, Igartú M, Pedráz JL. Tissue engineering: Progress and challenges. *Vitae* 2003; 10: 46-51.
124. Ortonne JP, Löning T, Schmitt D, Thivolet J. Immunomorphological and ultrastructural aspects of Keratinocyte migration in epidermal wound healing. *Virchows Arch Pathol Anat Histol* 1981; 392:217-30.
125. Ota T, Gilbert TW, Badylak SF, Schwartzman D, Zenati MA. Electromechanical characterization of a tissue-engineered myocardial patch derived from extracellular matrix. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;133:979-985.

126. Paladini RD, Takahashi K, Bravo NS, Coulombe PA. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol* 1996; 132:381-97.
127. Paocharoen V. The efficacy and side effects of oral *Centella asiatica* extract for wound healing promotion in diabetic wound patients. *J Med Assoc Thai* 2010; 93:166-70.
128. Paolino D, Cosco D, Cilurzo F, Trapasso E, Morittu VM, Celia C (2012) Improved in vitro and in vivo collagen biosynthesis by asiaticoside-loaded ultradeformable vesicles. *J Control Release* 162:143-151.
129. Parekh A, Mantle B, Banks J, Swartz JD, Badylak SF, Dohar JE, et al. Repair of the tympanic membrane with urinary bladder matrix. *Laryngoscope* 2009; 119:1206-1213.
130. Parell GJ, Becker GD. Comparison of absorbable with nanoabsorbable sutures in closure of facial skin wounds. *Ach Facial Plast Surg* 2003; 5:488-90.
131. Parhat WA, Chen J, Sherman C, Cartwright L, Bahoric A, Yeger H. Impact of fibrin glue and urinary bladder cell spraying on the in-vivo acellular matrix cellularization: a porcine pilot study. *Can J Urol* 2006; 13:3000-8.
132. Park JH, Choi JY, Son DJ, Park EK, Song MJ, Hellström M, et al. Anti-inflammatory effect of titrated extract of *Centella asiatica* in phthalic anhydride-induced allergic dermatitis animal model. *Int J Mol Sci* 2017; 18:738.
133. Piva RM, Johann AC, Costa CK, Miguel OG, Rosa ER, de Azevedo-Alanis LR, et al. Bixin action in the healing process of rats mouth wounds. *Curr Pharm Biotechnol* 2013; 14:785-91.
134. Pokrywczynska M, Adamowicz J, Sharma AK, Drewa T. Human urinary bladder regeneration through tissue engineering – an analysis of 131 clinical cases. *Exp Biol Med (Maywood)* 2014; 239:264-71.
135. Pokrywczynska M, Gubauska I, Drewa G, Drewa T. Application of bladder acellular matrix in urinary bladder regeneration: the state of the art and future directions. *Biomed Res Int* 2015; 2015:613439.
136. Puttarak P, Panichayupakaranat P. Factors affecting the content of pentacyclic triterpenes in *Centella asiatica* raw materials. *Pharm Biol* 2012; 1508-12.
137. Qin R, Steel A, Fazel N. Oral mucosa biology and salivary biomarkers. *Clin Dermatol* 2017; 35:477-483.
138. Quinn J, Lowe L, Mertz M. The effect of a new tissue-adhesive wound dressing on the healing of traumatic abrasions. *Dermatology* 2000; 201:343-6.
139. Ratz-Lyko A, Arct J, Pytkowska K. Moisturizing and antiinflammatory properties of cosmetic formulations containing *Centella asiatica* extract. *Indian J Pharm Sci* 2016; 78:27-33.

140. Reginato Gde GS, Bolina Cde CS, Watanabe IS, Ciena AP. Three- Dimensional aspects of the lingual papillae and their connective tissue cores in the tongue of rats. A scarring electron microscope study. *ScientificWorldJournal* 2014; 2014:841879.
141. Remlinger NT, Gilbert TW, Yoshida M, Guest BN, Hashizume R, Weaver ML. Urinary bladder matrix promotes site appropriate tissue formation following right ventricle outflow tract repair. *Oragnogenesis* 2013; 9:149-160.
142. Rodgers KE, Roda N, Felix JE, Espinoza T, Maldonado S, diZerega G. Histological evaluation of the effects of angiotension peptides on wound repair in diabetic mice. *Exp Dermatol* 2003; 12:784-90.
143. Rosales-Ibáñez R, Ojeda-Gutiérrez F, Alvarado-Estrada KN. Tissue engineering in dentistry. *ADM* 2012; 69: 164-7.
144. Rosario DJ, Reilly GC, Ali Salah E, Glover M, Bullock AJ, Macneil S. Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract. *Regen Med* 2008; 3:145-56.
145. Ruszymah BH, Chowdhury SR, Manan NA, Fong OS, Adenan MI, Saim AB. Aqueous extract of *Centella asiatica* promotes corneal epithelium wound healing in vitro. *J Ethnopharmacol* 2012; 140:333–8.
146. Sáez MR. Morfología y función de la mucosa y submucosa de la cavidad bucal: proyección clínica. En: Bermejo Fenoll A, eds. *Medicina Bucal. Enfermedades mucocutáneas y de las glándulas salivales*. Madrid: Editorial Síntesis; 1998. p.177-83.
147. Sawatdee S, Choochuay K, Chanthorn W, Srichana T. Evaluation of the topical spray containing *Centella asiatica* extract and its efficacy on excision wounds in rats. *Acta Pharm* 2016; 66:233-44.
148. Schaap MW, Uilenreef JJ, Mitsogiannis MD, van'tKlooser JG, Arndt SS, Hellebrekers LJ. Optimizing the dosing interval of buprenorphine in a multimodal postoperative analgesic strategy in the rat: minimizing side-effects without affecting weight gain and food intake. *Lab Anim* 2012; 46:287-292.
149. Sen CK. Wound healing essentials: let there be oxygen. *Wound Repair Regen* 2009; 17:1-18.
150. Seo GY, Lim Y, Koh D, Hub JS, Hyun C, Kim YM, et al. TFM and glycerin act synergistically on keratinocytes and fibroblast to promote wound healing and anti-scarring activity. *Exp Mol Med* 2017; 49:e302.
151. Sepúlveda J. *Histología. Biología celular y tisular. Instructiva de laboratorio*. 6<sup>th</sup> ed. Ed. McGraw-Hill Medical; 2014:167.
152. Shah A, Amini-Nik S. The role of phytochemicals in the inflammatory phase of wound healing. *Int J Mol Sci* 2017; 18:E1068.

153. Sharma J, Sharma R. Radioprotection of Swiss albino mouse by *Centella asiatica* extract. *Phytother Res* 2002; 16:785–6.
154. Sheridan JF, Padgett DA, Avitsur R, Marucha PT. Experimental models of stress and wound healing. *World J Surg* 2004; 28:327-30.
155. Shukla A, Rasik AM, Jain GK, Shankar R, Kulshrestha DK, Dhawan BN. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *J Ethnopharmacol* 1999; 65:1–11.
156. Singer AJ, McClain SA. Development of a porcine excisional wound model. *Acad Emerg Med* 2003; 10:1029-33.
157. Sinha UK, Gallagher LA. Effects of steel scalpel, ultrasonic scalpel, CO2 laser, and monopolar and bipolar electrosurgery on wound healing in guinea pig oral mucosa. *Laryngoscope* 2003; 113:228-36.
158. Soley Bda S, Morais RL, Pesquero JB, Bader M, Otuki MF, Cabrini DA. Kinin receptors in skin wound healing, *J Dermatol Sci* 2016;82(2):95-105.
159. Somboonwong J, Kankaisre M, Tantisira B, Tantisiria MH. Wound healing activities of different extracts of *Centella asiatica* in incision and burn wound models: an experimental animal study. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12:103.
160. Song L, Murphy SV, Yang B, Xu Y, Zhang Y, Atala A. Bladder acellular matrix and its application in bladder augmentation. *Tissue Eng Part B Rev* 2014; 20:163-72.
161. Souza Filho MD, Medeiros JVR, Vasconcelos DFP, Silva DA, Leódido ACM, Fernandes HF, et al. Orabase formulation with cashew gum polysaccharide decreases inflammatory and bone loss hallmarks in experimental periodontitis. *Int Biol Macromol* 2017; S01441-8130(17)32377-2.
162. Souza MH, Toncon LE, Cunha FQ, Oliveira RB. Decreased gastric tone and delayed gastric emptying precede neutrophil infiltration and mucosal lesion formation in indomethacin-induced gastric damage in rats. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36:1383-1390.
163. Süntar I, Baldemir A, Coskum M, Keles H, Akkol EK. Wound healing acceleration effect of endemic *Ononis* species growing in Turkey. *J Ethnopharmacol* 2011; 135:63-70.
164. Soybir G, Topuzlu C, Odabas O, Dolay K, Bilir A, Köksoy F. The effects of melatonin on angiogenesis and wound healing. *Surg Today* 2003; 33:896-901.
165. Tassanawat P, Putalun W, Yusakul G, Sritularak B, Juengwatanatrakul T, Tanaka H. Production of polyclonal antibody against madecassoside and development of immunoassay methods for analysis of triterpene glycosides in *Centella asiatica*. *Phytochem Anal* 2013; 24:256-62.
166. Than UTT, Guanzon D, Leavesley D, Parker T. Association of extracellular membrane vesicles with cutaneous wound healing. *Int J Mol Sci* 2017; 18:956.

167. Tumen I, Akkol EK, Süntar I, Keles H. Wound repair and anti-inflammatory potential of essential oils from cones of Pinaceae: preclinical experimental research in animal models. *J Ethnopharmacol* 2011; 137:1215-1220.
168. Valentin JE, Turner NJ, Gilbert TW, Badylak SF. Functional skeletal muscle formation with a biologic scaffold. *Biomaterials* 2010; 31:7475-84.
169. Villalba-Herrera E. Inflamación I. *Rec Act Clin* 2014; 43:2261-5.
170. Voytik-Harbin SL, Brightam AO, Kraine MR, Waisner B, Badylak SF. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. *J Cell Biochem* 1997; 67:478-491.
171. Wagner VP, Meurer L, Martins MA, Danilevich CK, Magnusson AS, Marques MM, et al. Influence of different energy densities of laser phototherapy on oral wound healing. *J Biomed Opt* 2013; 18(12):128002-1.
172. Wanakhachorkrai O, Pongrakhananon V, Chunchacha P, Wanasuntronwong A, Vattanajum A, Tantisira B, et al. Neuritogenic effect of standardized extract of *Centella asiatica* ECa233 on human neuroblastoma cells. *BMC Complement Altern Med* 2013; 13:204.
173. Wang JY, Liou AK, Ren ZH, Zhang L, Brown BN, Cui XT, et al. Neurorestorative effect of urinary bladder matrix-mediated neural stem cell transplantation following traumatic brain injury in rats. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2013; 12:413-425.
174. Wang Q, Xiao DD, Yan H, Zhao Y, Fu S, Zhou J, et al. The morphological regeneration and functional restoration of bladder defects by a novel scaffold and adipose-derived stem cells in a rat augmentation model. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8:149.
175. Wolf MT, Daily KA, Brennan-Pierce EP, Johnson SA, Carruthers CA, D'Amore A. A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix. *Biomaterials* 2012; 33:7028-7038.
176. Xiong Q, Lin H, Hua X, Liu L, Sun P, Zhao Z, et al. A nanomedicine approach to effectively inhibit contracture during bladder acellular matrix allograft-induced bladder regeneration by sustained delivery of vascular endothelial growth factor. *Tissue Eng Part A* 2015; 21: 45-52.
177. Yadollah-Damavandi S, Chavoshi-Nejad M, Jangholi E, Nekonyian N, Hosseini S, Seifae A, et al. Topical *Hipericum perforatum* Improves Tissue Regeneration in Full-thickness Excisional Wounds in Diabetic Rats model. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015; 2015:245328.
178. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering: Part I. Traditional factors. *Tissue Eng* 2001; 7:679-89.
179. Yao CH, Yeh JY, Chen YS, Li MH, Huang CH. Wound-healing effect of electrospun gelatin nanofibres containing *Centella asiatica* extract in a rat model. *J Tissue Eng Regen Med* 2017; 11:905-15.

180. Youngnak-Piboonratanakit P, Dhanuthai K, Thongprasom K, Luckprom P, Sarideechaigul W, Luangjarmekon L, et al. Expression of IFN-gamma before and after treatment of oral liquen planus with 0,1% fluocilone acetone in orabase. *J Oral Pathol Med* 2009; 38:689-94.
181. Yücel EA, Oral O, Olgaç V, Oral CK. Effects of fibrin glue on wound healing in oral cavity. *J Dent* 2003; 31:569-75.
182. Zhang YM, Ruan J, Xiao R, Zhang O, Huang YS. Comparative study of 1,064 nm laser-induced skin burn and thermal skin burn. *Cell Biochem Biophys* 2013; 67:1005-14.
183. Zhao Y, Shu P, Zhang Y, Lin L, Zhou H, Xu Z, et al. Effect of *Centella asiatica* on oxidative stress and lipid metabolism in hyperlipidemic animal models. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014:154295.
184. Zhen Z, Jun D, Yang Z, Mingxi X, Ke Z, Ming Z, et al. Bladder acellular matrix grafts seeded with adipose-derived stem cells and incubated intraperitoneally promote the regeneration of bladder smooth muscle and nerve in a rat model of bladder augmentation. *Stem Cells Dev* 2016; 25:405-14.
185. Zheng HM, Choi MJ, Kim JM, Cha KH, Lee KW, Park YH, et al. *Centella asiatica* Leaf Extract Protects Against Indomethacin-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats. *J Med Food* 2016; 19:38-46.
186. Zhou L, Yang B, Sun C, Qiu X, Sun Z, Chen Y, et al. Coadministration of platelet-derived growth factor-BB and vascular endothelial growth factor with bladder acellular matrix enhances smooth muscle regeneration and vascularization for bladder augmentation in a rabbit model. *Tissue Eng Part A* 2013; 19:264-76.
187. Zhu WD, Xu YM, Feng C, Fu Q, Song LJ. Different bladder defects reconstructed with bladder acellular matrix grafts in a rabbit model. *Urologie A* 2011; 50:1420-1425.

## **VIII. ANEXOS**

---

Código CEEA: 147/2015

INFORME DE COMITÉ ÉTICO

**INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL**

## DATOS DEL CENTRO

Nombre: **CEEA Universidad de Murcia**Número de Registro del Centro: **REGA ES300305440012**

Título del procedimiento: *"Efectos de la aplicación tópica en spray de matriz acelular de vejiga urinaria porcina y extracto de centella asiática en regeneración de heridas en un modelo de cicatrización en rata"*

Responsable: D. Fabio Camacho Alonso  
Fondos Propios

Aspectos que han sido considerados para su evaluación:

- Capacitación del personal investigador
- Idoneidad del procedimiento en relación a los objetivos del estudio.
- Metodología empleada
- Posibilidad de conseguir conclusiones válidas con el menor nº posible de animales
- Consideraciones de métodos alternativos
- Idoneidad de las especies seleccionadas
- Supervisión, Criterios de Punto Final y Finalización del Procedimiento

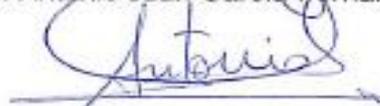
Una vez evaluado el procedimiento antes mencionado, atendiendo a los puntos indicados y de conformidad con lo acordado el día 14 de mayo de 2015<sup>1</sup>, el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia, **INFORMA FAVORABLEMENTE** sobre la realización de dicho procedimiento.

Murcia, 15 de mayo de 2015

D<sup>a</sup>. Carmen Lagares Martínez

Secretaria CEEA

D. Antonio Juan García Fernández



Presidente CEEA

<sup>1</sup> A los efectos de lo establecido en el art. 27.5 de la Ley 30/1992 de 26 de noviembre de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del P.A.C. (B.O.E. 27-11), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación

XV CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIRUGÍA BUCCAL  
II CONGRESO SECIB JOVEN • IV CONGRESO AVCIB • XV CONGRESO SELO

## CERTIFICADO DE COMUNICACIÓN ESCRITA

Certificamos que,

**María Torralba; José Lacal; Fabio Camacho**

---

Han presentado una **Comunicación Escrita** que lleva por título

**Efectos de la aplicación tópica en spray de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo y extracto de centella asiática en la regeneración de heridas en lengua de rata.**

en el **XV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Bucal** celebrado en **Valencia**, del **16 al 18 de noviembre de 2017**.

Para que así conste, a todos los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Valencia, a dieciocho de noviembre de dos mil diecisiete.



**SECIB**  
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIRUGÍA BUCCAL

  
**María Peltarocha Diago**  
Presidenta del Comité Organizador

  
**Eduard Vaimaseda Castellón**  
Presidente de la SECIB