

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE HERIDAS CRÓNICAS

REFERENCIA A UNA SOLICITUD RELACIONADA

[001] Esta solicitud invoca el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 62/292.384, presentada el 8 de febrero, 2016, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

[002] La invención descrita se relaciona con los campos de la biología celular y molecular, agentes terapéuticos y métodos de uso terapéuticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Anatomía y fisiología de la piel

[003] La piel es el órgano más grande del cuerpo que consiste en varias capas y cumple un rol importante en la homeostasis biológica (Figura 1). Su reapproximación sobre la superficie de la herida ha sido por mucho tiempo un signo primario de la finalización de una porción significativa de la cicatrización de la herida. Este cierre del defecto restablece la función protectora de la piel, que incluye proveer protección contra bacterias, toxinas y fuerzas mecánicas, así como proveer la barrera para retener los fluidos corporales esenciales. La epidermis, que está compuesta por varias capas que comienzan con el estrato córneo, es la capa más externa de la piel. La capa de piel más interna es la dermis profunda. La piel cumple múltiples funciones, que incluyen la regulación térmica, la función metabólica (metabolismo de la vitamina D) y las funciones inmunológicas (Véase, por ejemplo, McLafferty E et al., *Nursing Standard* 27(3): 35-42; Evans N D et al., *Journal of the Mechanical Behavior of*

Biomedical Materials, volumen 28, diciembre de 2013, 397-409; *Wound Care: A Collaborative Practice Manual*, 3ª edición, editado por Carrie Sussman y Barbara M. Batesensen, Copyright © 2007, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore MD y Filadelfia PA).

Epidermis

[004] La epidermis se puede considerar como la zona de amortiguación o contención del cuerpo contra el medio ambiente. Proporciona protección contra traumatismos, excluye toxinas y organismos microbianos, y provee una membrana semipermeable, manteniendo los fluidos corporales vitales dentro de la envoltura protectora. Tradicionalmente, la epidermis se ha dividido en varias capas, de los cuales dos representan las más significativas desde un punto de vista fisiológico. La capa de células basales, o capa germinal, es importante porque es la fuente primaria de células regeneradoras. En el proceso de cicatrización de heridas, esta es el área donde tiene lugar la mitosis en la mayoría de los casos. La epidermis superior, que incluye las capas del estrato y granulado, es el otro área de formación de la función de barrera epidérmica normal (Véase, por ejemplo, McLafferty E et al., *Nursing Standard* 27(3): 35-42; Evans N D et al., *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, volumen 28, diciembre de 2013, 397-409; *Wound Care: A Collaborative Practice Manual*, 3ª edición, editado por Carrie Sussman y Barbara M. Batesensen, Copyright © 2007, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore MD y Filadelfia PA).

[005] Cuando se lesiona la epidermis, el cuerpo está sujeto a una invasión por agentes externos y a pérdida de fluidos corporales. Las heridas epidérmicas cicatrizan primariamente mediante la migración de células. Las

agrupaciones de las células epidérmicas migran hacia el área dañada y cubren el defecto. Estas células son fagocíticas y limpian la superficie de desechos y coágulos plasmáticos. Las células de reparación se originan de fuentes locales que son primariamente las apéndices dérmicos y de áreas de piel intactas adyacentes. La cicatrización se produce rápidamente, y la piel es regenerada y queda sin cicatrices. Las ampollas son ejemplos de heridas epidérmicas. Pueden ser pequeñas vesículas o bulas más grandes (ampollas más grandes que 1 cm de diámetro) (Véase, por ejemplo, McLafferty E et al., *Nursing Standard* 27(3): 35-42; Evans N D et al., *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, volumen 28, diciembre de 2013, 397-409; *Wound Care: A Collaborative Practice Manual*, 3ª edición, editado por Carrie Sussman y Barbara M. Batesensen, Copyright © 2007, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore MD y Filadelfia PA).

El estrato córneo y el manto ácido

[006] El estrato córneo es una estructura avascular, de múltiples capas, que funciona como una barrera contra el medio ambiente e impide la pérdida transepidérmica de agua. El pH normal de superficie de la piel es de entre 4 y 6,5 en personas sanas; varía de acuerdo con el área de piel del cuerpo. Este pH bajo forma un manto ácido que mejora la función de barrera de la piel. Estudios recientes han mostrado que hay actividad enzimática involucrada en la formación de un manto ácido en el estrato córneo. Juntos, el manto ácido y el estrato córneo hacen que la piel sea menos permeable al agua y otros compuestos polares y protegen indirectamente a la piel contra la invasión por microorganismos. El daño del estrato córneo aumenta el pH de la piel y, por ende, la susceptibilidad de la piel a infecciones bacterianas en la piel (Véase,

por ejemplo, McLafferty E et al., *Nursing Standard* 27(3): 35-42; Evans N D et al., *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, volumen 28, diciembre de 2013, 397-409; *Wound Care: A Collaborative Practice Manual*, 3ª edición, editado por Carrie Sussman y Barbara M. Batesensen, Copyright © 2007, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore MD y Filadelfia PA).

Otras capas de la epidermis

[007] Otras capas de la epidermis debajo del estrato córneo incluyen el estrato lúcido, estrato granuloso, estrato germinativo y estrato basal. Cada uno contiene células vivas que cumplen funciones especializadas (Figura 2). Por ejemplo, la melanina, que es producida por melanocitos presentes en la epidermis, es responsable del color de la piel. Hay células de Langerhans involucradas en el procesamiento inmunológico (Véase, por ejemplo, McLafferty E et al., *Nursing Standard* 27(3): 35-42; Evans N D et al., *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, volumen 28, diciembre de 2013, 397-409; *Wound Care: A Collaborative Practice Manual*, 3ª edición, editado por Carrie Sussman y Barbara M. Batesensen, Copyright © 2007, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore MD y Filadelfia PA).

Apéndices dérmicos

[008] Los apéndices dérmicos, que incluyen folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas, uñas de las manos y uñas de los pies, se originan en la epidermis y sobresalen dentro de la dermis (Figura 1). Los folículos pilosos y las glándulas sebáceas y sudoríparas aportan células epiteliales para una rápida reepitelialización de heridas que no atraviesan la dermis (denominadas heridas de espesor parcial). Las glándulas sebáceas son responsables de las secreciones que lubrican la piel, manteniéndola suave y flexible. Son más

numerosas en la cara y dispersas en la palma de las manos y las plantas de los pies. Las secreciones de las glándulas sudoríparas controlan el pH de piel para prevenir infecciones dérmicas. Las glándulas sudoríparas, los vasos sanguíneos dérmicos y los músculos pequeños en la piel (responsables de la piel de gallina) controlan la temperatura sobre la superficie del cuerpo. Las terminales nerviosas en la piel incluyen receptores de dolor, tacto, calor y frío. La pérdida de estas terminales nerviosas aumenta el riesgo de degradación de la piel por disminución de la tolerancia del tejido a fuerzas externas (Véase, por ejemplo, McLafferty E et al., *Nursing Standard* 27(3): 35-42; Evans N D et al., *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, volumen 28, diciembre de 2013, 397-409; *Wound Care: A Collaborative Practice Manual*, 3ª edición, editado por Carrie Sussman y Barbara M. Batesensen, Copyright © 2007, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore MD y Filadelfia PA).

[009] La membrana basal separa así como conecta la epidermis y la dermis. Cuando las células epidérmicas en la membrana basal divide, una célula permanece y la otra migra a través de la capa granulosa al estrato córneo de la superficie. En la superficie, la célula muere y forma queratina. La queratina seca sobre la superficie se denomina escama. La hiperqueratosis (capas de queratina engrosadas) a menudo se observa sobre los talones e indica una pérdida de las funciones de las glándulas sebáceas y las glándulas sudoríparas si el paciente es diabético. La membrana basal se atrofia con la edad; la separación entre la membrana basal y la dermis es una de las causas de desgarros de la piel en las personas de edad avanzada (Véase, por ejemplo, McLafferty E et al., *Nursing Standard* 27(3): 35-42; Evans N D et al., *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, volumen 28,

diciembre de 2013, 397-409; *Wound Care: A Collaborative Practice Manual*, 3ª edición, editado por Carrie Sussman y Barbara M. Batesensen, Copyright © 2007, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore MD y Filadelfia PA).

Dermis

[0010] La dermis, o piel verdadera, es una estructura vascular que brinda soporte y nutre a la epidermis. Además, hay terminales nerviosas sensoriales en la dermis que transmiten señales con respecto al dolor, presión, calor y frío. La dermis se divide en dos capas: la dermis superficial consiste en la matriz extracelular (colágeno, elastina y sustancias fundamentales) y contiene vasos sanguíneos, linfáticos, células epiteliales, tejido conectivo, músculo, grasas y tejido nervioso. El suministro vascular de la dermis es responsable de la nutrición de la epidermis y la regulación de la temperatura corporal. Los fibroblastos son responsables de la producción de los componentes de colágeno y elastina de la piel que le otorga su elasticidad. La fibronectina y el ácido hialurónico son secretados por los fibroblastos (Véase, por ejemplo, McLafferty E et al., *Nursing Standard* 27(3): 35-42; Evans N D et al., *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, volumen 28, diciembre de 2013, 397-409; *Wound Care: A Collaborative Practice Manual*, 3ª edición, editado por Carrie Sussman y Barbara M. Batesensen, Copyright © 2007, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore MD y Filadelfia PA).

[0011] La dermis profunda se ubica sobre la grasa subcutánea; contiene grandes redes de vasos sanguíneos y fibras de colágeno para proporcionar resistencia a la tensión. También consiste en tejido conectivo fibroelástico, que es amarillo y está compuesto fundamentalmente de colágeno. También hay fibroblastos en esta capa de tejido. Una dermis bien vascularizada resiste la

presión por períodos de tiempo más prolongados que el tejido o músculo subcutáneo. El colágeno presente en la piel le otorga a la piel su resistencia (Véase, por ejemplo, McLafferty E et al., *Nursing Standard* 27(3): 35-42; Evans N D et al., *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, volumen 28, diciembre de 2013, 397-409; *Wound Care: A Collaborative Practice Manual*, 3ª edición, editado por Carrie Sussman y Barbara M. Batesensen, Copyright © 2007, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore MD y Filadelfia PA).

[0012] Las heridas dérmicas, por ejemplo, grietas o pústulas, involucran la epidermis, la membrana basal y la dermis. Típicamente, las lesiones dérmicas cicatrizan rápidamente. Las grietas en la dermis pueden exudar suero, sangre o pus, y conducen a la formación de coágulos o costras. Las pústulas son vesículas llenas de pus que a menudo representan un folículo piloso infectado (Véase, por ejemplo, McLafferty E et al., *Nursing Standard* 27(3): 35-42; Evans N D et al., *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, volumen 28, diciembre de 2013, 397-409; *Wound Care: A Collaborative Practice Manual*, 3ª edición, editado por Carrie Sussman y Barbara M. Batesensen, Copyright © 2007, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore MD y Filadelfia PA).

2. Heridas y tipos de heridas

[0013] Una herida es el resultado del daño o ruptura de la estructura anatómica y función normales (Robson MC et al., *Curr Probl Surg* 2001; 38: 72-140; Velnar T et al., *The Journal of Internacional Medical Research* 2009; 37: 1528-1542). Puede variar en un rango desde una simple ruptura de la integridad epitelial de la piel hasta el tejido subcutáneo, más profundo, con daño de otras estructuras tales como tendones, músculos, vasos, nervios,

órganos parenquimáticos y aún hueso (Alonso JE et al., *Surg Clin North Am* 1996; 76: 879-903). Independientemente de la causa y la forma, las heridas dañan y producen ruptura del entorno local del tejido.

[0014] Las heridas se clasifican de acuerdo con diversos criterios (Robson MC et al., *Curr Probl Surg* 2001; 38: 72-140; Velnar T et al., *The Journal of Internacional Medical Research* 2009; 37: 1528-1542). Entre ellos, el tiempo cumple un rol importante en el manejo de lesiones y la reparación de heridas. Por lo tanto, las heridas se pueden clasificar clínicamente como agudas o crónicas basado en el marco de tiempo de la cicatrización (Velnar T et al., *The Journal of Internacional Medical Research* 2009; 37: 1528-1542; Robson MC et al., *Curr Probl Surg* 2001; 38: 72-140; Velnar T et al., *The Journal of Internacional Medical Research* 2009; 37: 1528-1542; Lazurus GS et al., *Arch Dermatol* 1994; 130: 489-493).

3. Heridas agudas

[0015] Las heridas que se reparan a sí mismas y que avanzan normalmente siguiendo una vía de cicatrización en tiempo y forma, con restablecimiento tanto funcional como anatómica como resultado final, se clasifican como heridas agudas. Típicamente, la cicatrización de las heridas agudas demora un rango de 5-10 días o en el transcurso de 30 días. Las heridas agudas pueden aparecer, por ejemplo, como resultado de una pérdida de tejido traumática o como resultado de un procedimiento quirúrgico.

[0016] Las heridas agudas son un problema de salud común, con 11 millones de personas afectadas y aproximadamente 300.000 personas hospitalizadas todos los años en los EEUU (Singer AJ y Dagum AB, *N Engl J Med*, 4 de septiembre, 2008; 359(10): 1037-46; Hostetler SG et al., *Wounds*

2006; 18: 340-351). La cicatrización de las heridas agudas es un proceso bien organizado que conduce a una reparación de tejido predecible, donde las plaquetas, queratinocitos, células de vigilancia inmunológica, células microvasculares y fibroblastos cumplen roles clave en el restablecimiento de la integridad del tejido (Singer AJ y Clark RA *N Engl J Med*, 2 de septiembre, 1999; 341(10): 738-746; Falanga V *Lancet*, 12 de noviembre, 2005; 366(9498): 1736-43).

4. Heridas crónicas

[0017] Las heridas crónicas son heridas que no progresan por las etapas normales de cicatrización y no se reparan de una manera ordenada y en tiempo (Robson MC et al., *Curr Probl Surg* 2001; 38:72-140; Szycher M y Lee SJ, *J Biomater Appl* 1992; 7: 142-213; Velnar T et al., *The Journal of Internacional Medical Research* 2009; 37: 1528-1542). El proceso de cicatrización es incompleto y alterado por diversos factores que prolongan una o más etapas en las fases de hemostasis, inflamación, proliferación o remodelación. Estos factores incluyen infección, hipoxia tisular, necrosis, exudado y niveles excesivos de citoquinas inflamatorias (Vanwijck R, *Bull Mem Acad R Med Belg* 2001; 115: 175-184).

[0018] Con una cantidad estimada de adultos mayores de 65 años o más en los EEUU que casi se duplicará (de 35 millones a 53 millones de personas) para el 2030, y el riesgo estimado de desarrollar diabetes para los niños nacidos en el 2000 tan alto como un 35%, los riesgos anticipados de heridas crónicas no cicatrizantes por diabetes y asociadas con la edad continúan aumentando dramáticamente. Los costos anuales por el cuidado de heridas crónicas ahora excede \$1 mil millones en los EEUU solamente y representa

~2% de los recursos financieros totales de EEUU (Gosain A y DiPetro LA, *World J Surg*, marzo de 2004; 28(3): 321-326; Narayan KM et al., *JAMA*, 8 de octubre, 2003; 290(4): 1884-90; Ramsey SD et al., *Diabets Care*, marzo de 1999; 22(3): 382-387; Bitsch M et al., *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2005; 39(3): 162-169).

[0019] Las heridas crónicas se pueden clasificar como úlceras vasculares (por ejemplo, úlceras venosas y arteriales), úlceras por presión y úlceras diabéticas. Algunas características comunes compartidas por cada una de ellas incluyen una fase inflamatoria prolongada o excesiva, infecciones persistentes, formación de biopelículas microbianas resistentes a fármacos y la incapacidad de las células dérmicas y/o epidérmicas para responder a los estímulos de reparación (Eming SA et al., *J Invest Dermatol*, marzo de 2007; 127(3): 514-525; Edwards R y Harding KG; *Curr Opin Infect Dis*, abril de 2004; 17(2): 91-96; Wolcott RD et al., *J Wound Care*, agosto de 2008; 17(8): 333-341). Además, estos fenómenos fisiopatológicos dan como resultado que estas heridas no cicatrizan. Sin embargo, las patologías subyacentes se desvían en diferentes tipos de heridas crónicas.

Úlceras venosas

[0020] Las úlceras venosas presentan cambios patológicos profundos que surgen como consecuencia a una incompetencia valvular venosa en las venas profundas y superficiales, lo cual a su vez conduce a un reflujo de sangre constante que da como resultado un aumento en la presión venosa. Los cambios inducidos por la presión en la permeabilidad de las paredes de los vasos sanguíneos conducen a pérdida de fibrina y otros componentes del plasma hacia el espacio perivascular. La acumulación de fibrina tiene efectos

negativos sobre la cicatrización de heridas. La fibrina disminuye la síntesis de colágeno, conduce a la formación de bocamangas [*cuffs*] pericapilarmente que crean una barrera para la función normal del vaso, y atrapa los factores de crecimiento derivados de la sangre (Pardes JB et al., *J Cell Physiol*, enero de 1995; 162(1): 9-14; Higley HR et al., *Br J Dermatol*, enero de 1995; 132(1): 79-85; Walker DJ, *Orthop Nurs*, septiembre-octubre de 1999; 18(5): 65-74, 95).

Úlceras arteriales

[0021] Las úlceras arteriales son menos comunes que las heridas crónicas venosas. Son el resultado de la insuficiencia arterial causada por aterosclerosis o embolia que puede conducir al estrechamiento de la luz arterial y a isquemia, lo cual impide la cicatrización a tiempo de lesiones traumáticas menores (Bonham PA, *AACN Clin Issues*, noviembre de 2003; 14(4): 442-456). A diferencia de las úlceras venosas, que generalmente surgen entre la rodilla y el tobillo, las heridas arteriales de las piernas pueden estar presentes en cualquier punto distal de la perfusión arterial tal como la punta de un dedo del pie. Se estima que las úlceras arteriales afectan alrededor de 100.000 norteamericanos por año (Sieggreen MY y Kline RA, *Nurse Pract*, septiembre de 2004; 29(9): 46-52). A diferencia de las úlceras venosas que a menudo se pueden mejorar con una compresión terapéutica, las heridas crónicas ligadas a una insuficiencia arterial solamente se pueden tratar con éxito después del restablecimiento de la función arterial mediante una revascularización (Bonham PA, *AACN Clin Issues*, noviembre de 2003; 14(4): 442-456). Las opciones actuales para una revascularización de los miembros son bastante limitadas e incluyen cirugía reconstructiva (angioplastia) o intervenciones farmacéuticas. Dado que la falla de una revascularización de la herida casi inevitablemente

conduce a la amputación del miembro en los que sufren de una úlcera arterial, se están investigando nuevas técnicas para restablecer el suministro de sangre al lecho de la herida (Grey JE et al., *BMJ*, 11 de febrero de 2006; 332(7537): 347-350).

Úlceras por presión

[0022] Las úlceras por presión se desarrollan como resultado de una presión y fuerza de empuje prolongadas persistentes aplicadas a la piel y el tejido muscular subyacente, lo cual conduce a una disminución en la tensión de oxígeno, lesión por isquemia-reperusión y necrosis tisular (Demidova-Rice TN et al., *Adv Skin Wound Care*, julio de 2012; 25(7): 304-314). Las úlceras por presión son comunes en los pacientes con movilidad comprometida y una menor percepción sensorial (neuropatías) y están exacerbadas en los individuos con las insuficiencias arteriales y venosas que se describieron precedentemente (Defloor T, *J Clin Nurs*, marzo de 1999; 8(2): 206-16).

Úlceras diabéticas

[0023] Las complicaciones del envejecimiento y la diabetes pueden conducir y exacerbar las patologías vasculares relacionadas con insuficiencias arteriales y venosas y el empeoramiento de las úlceras por presión. Otras anomalías que conducen al desarrollo de heridas crónicas en pacientes diabéticos (es decir, úlceras diabéticas) incluyen neuropatías (a menudo ligadas a deterioros vasculares), deficiencias en el metabolismo muscular y numerosas patologías microvasculares a menudo causadas por una hiperglucemia (Falanga V, *Lancet*, 12 de noviembre, 2005; 366(9498): 1736-43). Las patologías macroscópicas observadas en las heridas crónicas, en particular diabéticas, a menudo están ligadas a anomalías fenotípicas

celulares, incluyendo un bajo potencial mitogénico/motogénico y la incapacidad para responder a las señales ambientales (Demidova-Rice TN et al., *Adv Skin Wound Care*, julio de 2012; 25(7): 304-314).

Caracterización de las heridas crónicas

[0024] Aún cuando todas las heridas que se describieron pueden tener diferentes orígenes, cada herida se caracteriza por un lecho de herida inflamado crónicamente y la falla de cicatrizar o curar (Demidova-Rice TN et al., *Adv Skin Wound Care*, julio de 2012; 25(7): 304-314). Un reclutamiento excesivo de células inflamatorias por el lecho de la herida a menudo desencadenado por una infección y la extravasación de células es facilitada por una expresión desproporcionada de la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM1) y la molécula de adhesión de células intersticiales 1 (ICAM1) por las células endoteliales residentes. Las células inflamatorias acumuladas en el interior de la herida crónica produce varias especies de oxígeno reactivo (ROS) que dañan los elementos estructurales de la matriz extracelular (ECM) y las membranas celulares y conducen a una senescencia celular prematura (Ben-Porath I y Weinberg RA, *Int J Biochem Cell Biol*, mayo de 2005; 37(5): 861-976). Además de estos efectos negativos directos, las ROS junto con las citoquinas proinflamatorias inducen la producción de serina proteinasas y metaloproteinases de la matriz (MMP) que degradan e inactivan los componentes de la ECM y los factores de crecimiento necesarios para la función normal de las células (Eming SA et al., *J Invest Dermatol*, marzo de 2007; 127(3): 514-525). La inactivación de los inhibidores de proteinasa por degradación proteolítica aumenta este proceso. Aunque la producción de los factores de crecimiento a menudo aumenta en las heridas crónicas versus

agudas, su cantidad y biodisponibilidad disminuyen significativamente (Mast BA y Schultz GS, *Wound Repair Regen*, octubre de 1996; 4(4): 411-420; Lauer G et al., *J Invest Dermatol*, julio de 2000; 115(1): 12-18).

5. Fases de una cicatrización de heridas normal (aguda)

[0025] La cicatrización de heridas es un proceso dinámico, interactivo, que involucra mediadores solubles, células sanguíneas, matriz extracelular y células parenquimáticas. El proceso de reparación de heridas se puede dividir en cuatro (4) fases que se superponen temporal y espacialmente: (1) una fase de coagulación; (2) una fase inflamatoria, (3) una fase proliferativa y (4) una fase de remodelación.

Fase de coagulación

[0026] Inmediatamente después de la lesión, las plaquetas se adhieren a los vasos sanguíneos dañados, inician una reacción de liberación y comienza una reacción hemostática, que da lugar a la cascada de coagulación sanguínea que previene un sangrado excesivo y provee una protección provisoria al área lesionada. Las plaquetas sanguíneas liberan más de una docena de factores de crecimiento, citoquinas y otros agentes de supervivencia o inductores de la apoptosis (Weyrich AS y Zimmerman GA, *Trends Immunol*, septiembre de 2004; 25(9): 489-495). Los componentes clave de la reacción de liberación de plaquetas incluyen el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y los factores de crecimiento transformantes A1 y 2 (TGF-A1 y TGF-2), que atraen a las células inflamatorias, tales como leucocitos, neutrófilos y macrófagos (Singer AF y Clark RA, *N Engl J Med*, 2 de septiembre de 1999; 341(10): 738-746).

Fase inflamatoria

[0027] La fase inflamatoria es desencadenada por el daño capilar, lo cual conduce a la formación de un coágulo sanguíneo/matriz provisoria compuesto por fibrina y fibronectina. Esta matriz provisoria llena el defecto del tejido y permite el influjo de células efectoras. Las plaquetas presentes en el coágulo libera múltiples citoquinas que participan en el reclutamiento de células inflamatorias (tales como neutrófilos, monocitos y macrófagos, entre otros), fibroblastos y células endoteliales (EC).

Fase proliferativa

[0028] La fase inflamatoria es seguida por una fase proliferativa, en la cual una angiogénesis activa crea nuevos capilares, que permitirán el suministro de nutrientes en el sitio de la herida, en especial para sustentar la proliferación de fibroblastos. Los fibroblastos presentes en el tejido de granulación se activan y adquieren un fenotipo tipo célula de musculatura lisa, posteriormente denominados miofibroblastos. Los miofibroblastos sintetizan y depositan los componentes de la matriz extracelular (ECM) que reemplazarán a la matriz provisoria. También tienen propiedades contráctiles mediados por la actina de músculo liso α organizada en haces de microfilamentos o fibras de estrés. La diferenciación miofibroblástica de las células fibroblásticas comienza con la aparición de los protomiofibroblastos, cuyas fibras de estrés solamente contienen las actinas citoplasmáticas β y γ . Los protomiofibroblastos pueden evolucionar en miofibroblastos diferenciados cuyas fibras de estrés contienen la actina de músculo liso α .

Fase de remodelación

[0029] La fase final de la cicatrización involucra una remodelación gradual del tejido de granulación y una reepitelialización. Este proceso de

remodelación está mediado mayormente por enzimas proteolíticas, en especial metaloproteinasas de la matriz (MMP) y sus inhibidores (TIMP, inhibidores tisulares de metaloproteinasas). Durante la reepitelialización, el colágeno Tipo III, el componente principal del tejido de granulación, es reemplazado gradualmente por el colágeno tipo I, el principal componente estructural de la dermis. También reaparece la elastina, que aporta elasticidad a la piel y está ausente en el tejido de granulación. La densidad celular se normaliza mediante la apoptosis de las células vasculares y los miofibroblastos (resolución).

5.1. Inflamación

[0030] La lesión tisular causa la ruptura de vasos sanguíneos y extravasación de los constituyentes de la sangre. Un coágulo sanguíneo restablece la hemostasis y provee una matriz extracelular provisoria para la migración celular. Las plaquetas no solo facilita la formación de un tapón hemostático sino que también secretan varios mediadores de la cicatrización de heridas, tal como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, que atrae y activa los macrófagos y fibroblastos (Heldin, C. y Westermark B., en: Clark R., ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*, 2ª Ed. Nueva York, Plenum Press, páginas 249-273, (1996)). Sin embargo, se ha sugerido que, en la ausencia de hemorragia, las plaquetas no son esenciales para la cicatrización de heridas; hay numerosos mediadores vasoactivos y factores quimiotácticos que son generados por las vías de coagulación y complementos activados y por células parenquimáticas lesionadas o activadas que se demostró que reclutaban leucocitos inflamatorios en el sitio de la lesión (*Id.*).

[0031] Los neutrófilos infiltrantes limpian la el área lesionada de partículas extrañas y bacterias y luego son extrudidos con la costra (un tejido

muerto que se caerá (desprenderá) de la piel sana o es fagocitada por macrófagos). En respuesta a quimioattractores específicos, tales como fragmentos de proteínas de la matriz extracelular, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), y la proteína de quimioatracción de monocitos 1 (MCP-1), los monocitos también se infiltran en el sitio de la herida y se convierten en macrófagos activados que liberan factores de crecimiento (tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor de crecimiento del endotelio vascular), que inician la formación del tejido de granulación. Los macrófagos se unen a proteínas específicas de la matriz extracelular por sus receptores de integrina, una acción que estimula la fagocitosis de microorganismos y fragmentos de la matriz extracelular por los macrófagos (Brown, E. *Phagocytosis, Bioessays*, 17: 109-117 (1995)). Hay estudios que han informado que la adherencia a la matriz extracelular también estimula la metamorfosis de monocitos en macrófagos inflamatorios o reparadores. Estos macrófagos cumplen un rol importante en la transición entre la inflamación y la reparación (Riches, D., en Clark R., Ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*, 2ª Ed. Nueva York, Plenum Press, páginas 95-141). Por ejemplo, la adherencia induce que los monocitos y macrófagos expresen el factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), una citoquina necesaria para la supervivencia de monocitos y macrófagos; el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), una potente citoquina inflamatoria; y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un potente agente de quimioatracción y mitógeno para fibroblastos. Otras citoquinas que se ha demostrado que son expresadas por monocitos y macrófagos incluyen el factor de crecimiento transformante (TGF- α), la interleuquina 1 (IL-1), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y

el factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-I) (Rappolee, D. et al., *Science*, 241, páginas 708-712 (1988)). Se ha sugerido que los factores de crecimiento derivados de monocitos y macrófagos son necesarios para el inicio y la propagación de la formación de tejido nuevo en heridas, porque los animales agotados en macrófago presentan una reparación de heridas defectuosa (Leibovich, S. y Ross, R., *Am J Pathol*, 78, páginas 1-100 (1975)).

[0032] La cicatrización de heridas es un proceso biológico complejo que está regulado por numerosos factores de crecimiento, citoquinas y quimoquinas. La proteína quinasa activada por MAPK 2 (MK2) es un importante regulador de la expresión de citoquinas y quimoquinas, que puede reclutar células inmunomoduladoras locales y de la circulación en los sitios de las heridas. Un estudio reciente con queratinocitos cultivados ha mostrado que el agotamiento de MK2 mediante el uso de ARN de interferencia pequeño deteriora severamente la capacidad de los queratinocitos para producir varias citoquinas, que incluyen el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleuquina 8 (IL-8) (Johansen et al., *J Immunol*, 176: 1431-1438, 2006). De manera similar, estudios in vivo han mostrado que los niveles de expresión de varias citoquinas y quimoquinas, tales como la interleuquina 6 (IL-6), quimoquina regulada por activación, expresada y secretada por linfocitos T normales (RANTES), el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y la interleuquina 1 beta (IL-1 β), están reducidos significativamente en las heridas de ratones noqueados en MK2. Estos datos sugieren que la señalización de MK2 representa una vía bioquímica importante que controla la capacidad de las células inmunomoduladoras infiltrantes en heridas para producir citoquinas y quimoquinas.

5.2. Epitelialización

[0033] La reepitelialización de heridas comienza dentro de horas después de la lesión. Las células epidérmicas de los apéndices de la piel, tales como folículos pilosos, eliminan rápidamente la sangre coagulada y el estroma dañado del espacio de la herida. Al mismo tiempo, las células sufren una alteración fenotípica que incluye la retracción de tonofilamentos intracelulares (Paladini, R. et al., *J. Cell Biol*, 132, páginas 381-397 (1996)); la disolución de la mayoría de los desmosomas intercelulares, que proporcionan las conexiones físicas entre las células; y la formación de filamentos de actina citoplasmáticos periféricos, que permiten el movimiento y la migración de las células (Goliger, J. y Paul, D. *Mol Biol Cell*, 6, páginas 1491-1501 (1995); Gabbiani, G. et al., *J Cell Biol*, 76, páginas 561-568 (1978)). Además, las células epidérmicas y dérmicas ya no se adhieren entre sí, debido a la disolución de los enlaces hemidesmosómicos entre la epidermis y la membrana basal, lo cual permite el movimiento lateral de las células epidérmicas. La expresión de receptores de integrina sobre las células epidérmicas les permite interactuar con una variedad de proteínas de la matriz extracelular (por ejemplo, fibronectina y vitronectina) que están dispersas con el colágeno tipo I del estroma en el margen de la herida y entretejidas con el coágulo de fibrina en el espacio de la herida (Clark, R., *J Invest Dermatol*, 94, supl, páginas 128S-134S (1990)). Las células epidérmicas migradoras disecan la herida, separando la costra desecada del tejido viable. La vía de disección parece estar determinada por el ordenamiento de las integrinas que las células epidérmicas migradoras expresan sobre sus membranas celulares.

[0034] La degradación de la matriz extracelular, que es necesaria si las

células epidérmicas deben migrar entre la dermis colagenosa y la costra de fibrina, depende de la producción de colagenasa por las células epidérmicas (Pilcher, B. et al., *J Cell Biol*, 137, páginas 1445-1457 (1997)), así como la activación de plasmina por el activador de plasminógeno producido por las células epidérmicas (Bugge, T. et al., *Cell*, 87, 709-719 (1996)). El activador de plasminógeno también activa a la colagenasa (metaloproteinasa de la matriz-1) (Mignatti, P. et al., *Proteinases and Tissue Remodeling*; en Clark, R. Ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*, 2ª Ed. Nueva York, Plenum Press, 427-474 (1996)) y facilita la degradación del colágeno y las proteínas de la matriz extracelular.

[0035] Uno a dos días después de la lesión, las células epidérmicas que se encuentran en el margen de la herida comienzan a proliferar a continuación de las células activamente migradoras. Los estímulos para la migración y proliferación de las células epidérmicas durante la reepitelialización aún no se han determinado, si bien se han sugerido varias posibilidades. La ausencia de células vecinas en el margen de la herida (el efecto de “borde libre”) puede señalar tanto la migración como la proliferación de las células epidérmicas. La liberación local de factores de crecimiento y la mayor expresión de receptores de factores de crecimiento también puede estimular estos procesos. Los principales competidores incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante α (TGF- α) y el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) (Nanney, L. y King, L. *Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor- α* ; en Clark, R. Ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*, 2ª Ed. Nueva York, Plenum Press, páginas 171-194 (1996); Werner, S. et al., *Science*, 266, páginas 819--822 (1994);

Abraham, J. y Klagsburn, M. *Modulation of Wound Repair by Members of the Fibroblast Growth Factor family*; en Clark, R. Ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*, 2ª Ed. Nueva York, Plenum Press, páginas 195-248 (1996)). A medida que avanza la reepitelialización, reaparecen las proteínas de la membrana basal en una secuencia muy ordenada desde el margen de la herida hacia dentro, de una manera tipo cremallera (Clark R. et al., *J. Invest Dermatol*, 79, páginas 264-269 (1982)). Las células epidérmicas se revierten a su fenotipo normal, nuevamente fijándose firmemente a la membrana basal restablecida y la dermis subyacente.

5.3. Formación del tejido de granulación

[0036] El estroma nuevo, a menudo denominado tejido de granulación, comienza a invadir el espacio de la herida aproximadamente cuatro días después de la lesión. Numerosos capilares nuevos le otorgan al estroma su aspecto granuloso. Los macrófagos, fibroblastos y vasos sanguíneos se mueven hacia el espacio de la herida al mismo tiempo (Hunt, T. ed. *Healing and Wound Infection: Theory and Surgical Practice*; Nueva York, Appleton-Century-Crofts (1980)). Los macrófagos proporcionan una fuente continua de factores de crecimiento que son necesarios para estimular la fibroplasia y la angiogénesis; los fibroblastos producen la nueva matriz extracelular necesaria para sustentar el crecimiento celular hacia el interior; y los vasos sanguíneos llevan el oxígeno y los nutrientes necesarios para sustentar el metabolismo celular.

[0037] Se mostró que los factores de crecimiento, en especial el factor de crecimiento derivado de plaquetas 4 (PDGF-4) y el factor de crecimiento transformante β -1 (TGF- β 1) (Roberts, A. y Sporn, M, *Transforming Growth*

Factor-1, en Clark, R. ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*, 2ª Ed. Nueva York, Plenum Press, páginas 275-308 (1996)) junto con las moléculas de la matriz extracelular (Gray, A. et al., *J Cell Sci*, 104, páginas 409-413 (1993); Xu, J. y Clark, R., *J Cell Biol*, 132, páginas 239-149 (1996)), estimulan la proliferación de los fibroblastos del tejido alrededor de la herida, expresan los receptores de integrina apropiados y migran hacia el espacio de la herida. Se informó que el factor de crecimiento derivado de plaquetas acelera la cicatrización de llagas crónicas por presión (Robson, M. et al., *Lancet*, 339, páginas 23-25 (1992) y de las úlceras diabéticas (Steed, D., *J Vasc Surg*, 21, páginas 71-78 (1995)). En algunos otros casos, el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) fue eficaz en el tratamiento de las llagas crónicas por presión (Robson, M. et al., *Ann Surg*, 216, páginas 401-406 (1992).

[0038] Las moléculas estructurales de la matriz extracelular recién formada, denominada matriz provisoria (Clark, R. et al., *J. Invest Dermatol*, 79, páginas 264-269, 1982), contribuyen en la formación del tejido de granulación al proporcionar un andamiaje o conducto para la migración celular. Estas moléculas incluyen fibrina, fibronectina y ácido hialurónico (Greiling, D. y Clark R., *J. Cell Sci*, 110, páginas 861-870 (1997)). Se ha sugerido que la aparición de fibronectina y los receptores apropiados de integrina que se unen a fibronectina, fibrina o ambas sobre los fibroblastos fuera el paso limitante de la velocidad de formación del tejido de granulación. Aunque los fibroblastos son responsables de la síntesis, deposición y remodelación de la matriz extracelular, la propia matriz extracelular puede tener un efecto positivo o negativo sobre la capacidad de los fibroblastos para realizar estas tareas y para interactuar en general con su entorno (Xu, J. y Clark, R., *J Cell Sci*, 132,

páginas 239-249 (1996); Clark, R. et al., *J Cell Sci*, 108, páginas 1251-1261).

[0039] El movimiento de las células dentro de un coágulo sanguíneo de fibrina entrecruzada o en una matriz extracelular fuertemente entretejida requiere un sistema proteolítico activo que puede clivar una vía para la migración celular. Se ha sugerido una variedad de enzimas derivadas de fibroblastos, además de la plasmina derivada de suero, como candidatos potenciales para esta tarea, incluyendo un activador de plasminógeno, colagenasas, gelatinasa A y estromelisina (Mignatti, P. et al., *Proteinases and Tissue Remodeling*; en Clark, R. Ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*, 2ª Ed. Nueva York, Plenum Press, 427-474 (1996); Vaalamo, M. et al., *J Invest Dermatol*, 109, páginas 96-101 (1997)). Después de migrar a las heridas, los fibroblastos comienzan la síntesis de la matriz extracelular. La matriz extracelular provisoria es reemplazada gradualmente por una matriz colagenosa, quizás como respuesta a la señalización del factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (Clark, R. et al., *J Cell Sci*, 108, páginas 1251-1261 (1995); Welch, M. et al., *J. Cell Biol*, 110, páginas 133-145 (1990))

[0040] Una vez que se depositó una abundante matriz de colágeno en la herida, los fibroblastos dejan de producir colágeno, y el tejido de granulación rico en fibroblastos es reemplazado por una cicatriz relativamente acelular. Las células en la herida sufren una apoptosis desencadenada por señales desconocidas. Se informó que la desregulación de estos procesos tienen lugar en los trastornos fibróticos, tal como la formación de queloides, cicatrices hipertróficas, morfea y escleroderma.

5.4. Neovascularización

[0041] La formación de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización)

es necesaria para sostener el tejido de granulación recién formado. La angiogénesis es un proceso complejo que se basa en la matriz extracelular en el lecho de la herida, así como la migración y la estimulación mitogénica de las células endoteliales.(Madri, J. et al., *Angiogenesis* en Clark, R. Ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*, 2ª Ed. Nueva York, Plenum Press, páginas 355-371 (1996)). La neovascularización difiere de la angiogénesis en que la angiogénesis se caracteriza principalmente por la protrusión y el crecimiento de brotes capilares y brotes de vasos sanguíneos preexistentes, en tanto la neovascularización se caracteriza por la proliferación de vasos sanguíneos en el tejido que normalmente no contiene vasos sanguíneos o proliferación de un tipo diferente de vaso sanguíneo que normalmente no se encuentra en un tejido en particular. La inducción de la angiogénesis fue atribuida inicialmente a un factor de crecimiento de fibroblastos ácido o básico. Posteriormente, se ha encontrado que muchas otras moléculas tienen actividad angiogénica, incluyendo el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), angiogenina, angiotropina, angiopoyetina 1 y tromboespondina (Folkman, J. y D'Amore, P, *Cell*, 87, páginas 1153-1155 (1996)).

[0042] Se sugirió que una baja tensión de oxígeno y ácido láctico elevado también estimulaban la angiogénesis. Estas moléculas inducen angiogénesis mediante estimulación de la producción del factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) por macrófagos y células endoteliales. Por ejemplo, se informó que las células epidérmicas activadas de la herida secretan grandes cantidades del

factor de crecimiento de células del endotelio vascular (VEGF) (Brown, L. et al., *J Exp Med*, 176, 1375-1379 (1992)).

[0043] Se propuso que el factor de crecimiento de fibroblastos básico preparaba el escenario para la angiogénesis durante los primeros tres días de reparación de heridas, en tanto el factor de crecimiento de células del endotelio vascular es crítico para la angiogénesis durante la formación del tejido de granulación en los días 4 a 7 (Nissen, N. et al., *Am J Pathol*, 152, 1445-1552 (1998)).

[0044] Además de los factores de la angiogénesis, se demostró que la matriz extracelular apropiada y los receptores endoteliales para la matriz provisoria son necesarios para la angiogénesis. La proliferación de las células endoteliales microvasculares adyacentes a las heridas y dentro de las mismas depositan transitoriamente cantidades aumentadas de fibronectina dentro de la pared del vaso (Clark, R. et al., *J. Exp Med*, 156, 646-651 (1982)). Dado que la angiogénesis requiere la expresión de receptores de fibronectina funcionales por células endoteliales (Brooks, P. et al., *Science*, 264, 569-571 (1994)), se sugirió que la fibronectina perivascular actúa como un conducto para el movimiento de las células endoteliales hacia el interior de la herida. Además, también se mostró que la expresión y la actividad de proteasas eran necesarias para la angiogénesis (Pintucci, G. et al., *Semin Thromb Hemost*, 22, 517-524 (1996)).

[0045] Se ha propuesto la siguiente serie de eventos que conducen a la angiogénesis. La lesión causa destrucción de tejido e hipoxia. Los factores de la angiogénesis, tal como el factor de crecimiento de fibroblastos ácido y básico (FGF), son liberados inmediatamente de los macrófagos después de la ruptura

celular, y la producción del factor de crecimiento de células del endotelio vascular por las células epidérmicas es estimulada mediante hipoxia. Las enzimas proteolíticas liberadas en el tejido conectivo degradan las proteínas de la matriz extracelular. Los fragmentos de estas proteínas reclutan monocitos de sangre periférica hacia el sitio de la lesión, donde se convierten en macrófagos activados y liberan factores de la angiogénesis. Algunos factores de la angiogénesis de macrófagos, como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), estimulan las células endoteliales para que liberen al activador del plasminógeno y la procologenasa. El activador del plasminógeno convierte el plasminógeno en plasmina y procologenasa en colagenasa activa y, conjuntamente, estas dos proteasas digieren las membranas basales. La fragmentación de la membrana basal permite a las células endoteliales estimuladas por factores de la angiogénesis migrar y formar nuevos vasos sanguíneos en el sitio lesionado. Una vez que la herida se llena con nuevo tejido de granulación, cesa la angiogénesis y muchos de los nuevos vasos sanguíneos se desintegran como resultado de una apoptosis (Ilan, N. et al., *J Cell Sci*, 111, 3621-3631 (1998)). Se ha sugerido que esta muerte celular programada está regulada por una variedad de moléculas de matriz, tales como las tromboespondinas 1 y 2, y los factores antiangiogénicos, tales como angiostatina, endostatina y angiopoyetina 2 (Folkman, J., *Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview*, EXS, 79, 1-8, (1997)).

5.5. Contracción de las heridas y reorganización de la matriz extracelular

[0046] La contracción de la herida comprende una interacción compleja y orquestada de células, matriz extracelular y citoquinas. Durante la segunda

semana de cicatrización, los fibroblastos asumen un fenotipo de miofibroblastos caracterizado por grandes haces de microfilamentos que contienen actina dispuestos a lo largo de la cara citoplasmática (Welch, M. et al., *J Cell Biol*, 110, 133-145 (1990); Desmouliere, A. y Gabbiani, G. *The role of the myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases*; en Clark, R. Ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*, 2ª Ed. Nueva York, Plenum Press, páginas 391-423 (1996)). La aparición de los miofibroblastos corresponde al comienzo de la compactación del tejido conectivo y la contracción de la herida. Se sugirió que esta contracción requiere estimulación por el factor de crecimiento transformante (TGF) $\beta 1$ o $\beta 2$ y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la unión de fibroblastos a la matriz de colágeno a través de receptores de integrina y entrecruzamientos entre haces individuales de colágeno. (Montesano, R. y Orci, *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 4894-4897 (1988); Clark, R. et al., *J Clin Invest*, 84, 1036-1040 (1989); Schiro, J. et al., *Cell*, 67, 403-410 (1991); Woodley, D. et al., *J Invest Dermatol*, 97, 580-585 (1991)).

[0047] La remodelación del colágeno durante la transición del tejido de granulación a la cicatriz depende de la síntesis y el catabolismo continuo del colágeno a una velocidad baja. La degradación del colágeno en la herida está controlada por varias enzimas proteolíticas, denominadas metaloproteinasas de la matriz (MMP), que son secretadas por macrófagos, células epidérmicas y células endoteliales, así como por fibroblastos (Mignatti, P. et al., *Proteinases and Tissue Remodeling*; en Clark, R. Ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*, 2ª Ed. Nueva York, Plenum Press, 427-474 (1996)). Se ha sugerido que varias fases de la reparación de heridas se basan en distintas

combinaciones de metaloproteinasas de matriz e inhibidores tisulares de metaloproteinasas (Madlener, M. et al, *Exp Cell Res*, 242, 201-210 (1998)).

[0048] Las heridas aumentan solo aproximadamente un 20 por ciento de su resistencia final en las primeras tres semanas, durante las cuales el colágeno fibrilar se ha acumulado con relativa rapidez y se ha remodelado mediante la contracción de la herida. De allí en más, la velocidad a la que las heridas ganan resistencia a la tracción es lenta, lo que refleja una velocidad mucho más lenta de acumulación de colágeno y remodelación de colágeno con la formación de haces de colágeno más grandes y un aumento en la cantidad de entrecruzamientos intermoleculares. No obstante, se sugirió que las heridas nunca logran la misma resistencia a la ruptura (la tensión a la que se rompe la piel) que la piel no lesionada y que, a la fuerza máxima, una cicatriz es solo un 70 por ciento más fuerte que la piel normal (Levenson, S. et al., *Ann Surg*, 161. 293-308 (1965)).

6. Cicatrización de las heridas crónicas

[0049] A diferencia de las heridas agudas, que generalmente cicatrizan sin intervenciones significativas, todos los tipos de heridas crónicas representan desafíos importantes para los pacientes y los encargados del cuidado. Ahora se entiende que la incapacidad de la herida crónica para cicatrizar es causada por anomalías celulares y moleculares que tienen lugar dentro del lecho de la herida (Demidova-Rice TN et al., *Adv Skin Wound Care*, julio de 2012; 25 (7): 304-314). Sin embargo, el diagnóstico adecuado de la etiología de la herida, la selección del tratamiento efectivo y la prevención de la recurrencia de la herida siguen siendo un problema para quienes padecen heridas crónicas y los profesionales de la salud (Bonham PA, *AACN Clin*

Issues, noviembre de 2003; 14 (4): 442-456).

6.1 Anomalías fenotípicas en las células de heridas crónicas

[0050] Las anomalías fenotípicas de las células derivadas de la epidermis y la dermis que residen en las heridas crónicas incluyen una menor densidad de receptores de factores de crecimiento y un menor potencial mitogénico lo cual les impide responder apropiadamente a las señales del entorno. Por ejemplo, los fibroblastos, aislados de pacientes con diabetes crónica, heridas crónicas no diabéticas o pacientes con insuficiencia venosa, presentan una menor respuesta mitogénica al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-AB), al factor de crecimiento tipo insulina (IGF), al factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y al factor de crecimiento epidérmico (EGF) aplicados por separado o en combinación; probablemente debido a una disminución de la densidad de receptores (Demidova-Rice TN et al., *Adv Skin Wound Care*; julio de 2012; 25(7): 304-314; Loot MA et al., *Eur J Cell Biol*, marzo de 2002; 81(3): 153-160; Seidman C et al., *Ann Vasc Surg*; 2003; 17: 239-244; Vasquez R et al., *Vasc Endovascular Surg*, jul-ago de 2004; 38(4): 355-360). Además, los fibroblastos aislados de ratones diabéticos deficientes en receptores de leptina, y de pacientes con insuficiencia venosa crónica, tienen una motilidad reducida en comparación con los fibroblastos normales (Raffetto JD et al., *J Vasc Surg*, junio de 2001; 33(6): 1233-1241; Lerman OZ et al., *Am J Pathol*, enero de 2003; 162(1): 303-312). Estas anomalías celulares impiden la formación de tejido de granulación y la deposición de ECM, lo cual conduce a la formación de heridas que no cicatrizan.

[0051] También se ha informado que los queratinocitos derivados de úlceras crónicas poseen un fenotipo "asociado a heridas crónicas" (Usui ML et

al., *J Histochem Cytochem*, julio de 2008; 56(7): 687-696). Con la sobreexpresión del marcador de proliferación Ki67, estas células aumentan la expresión de varios genes asociados al ciclo celular, tales como la quinasa 1 dependiente de ciclina (CDK1) y la ciclina B1, lo cual sugiere un estado hiperproliferativo (Stojadinovic O et al., *J Cell Mol Med*, diciembre de 2008; 12(6B): 2675-2690). Sin embargo, estos queratinocitos derivados de heridas crónicas presentan un potencial migratorio deteriorado. Los mecanismos de este deterioro no se comprenden por completo, pero se han relacionado con una producción disminuida de laminina 332 (antes conocida como laminina 5), que es un componente importante de la ECM epitelial y un sustrato para la migración de queratinocitos inducida por lesiones (Usui ML et al., *J Histochem Cytochem*, julio de 2008; 56(7): 687-696). Estas células poseen una activación aumentada de la vía A-catenina/c-myc y no expresan los marcadores de diferenciación, en particular la queratina 10 y la queratina 2 (Stojadinovic O et al., *Am J Pathol*, julio de 2005; 167(1): 59-69). Finalmente, la expresión de varios genes que codifican una variedad de factores de crecimiento está aumentada o disminuida. Por ejemplo, la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), epirregulina y del factor de crecimiento transformante A2 (TGF-A2) está disminuida, en tanto está aumentada la expresión de los genes que codifican el PDGF y el factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (Stojadinovic O et al., *J Cell Mol Med*, diciembre de 2008; 12(6B): 2675-2690).

6.2. Las alteraciones en el microentorno del ECM contribuyen en mantener una herida crónica

[0052] El microentorno del lecho de la herida crónica se denota

mediante una matriz. La información sobre las diferencias en la composición química de la ECM observada en las heridas agudas y crónicas es escasa y controvertida (Demidova-Rice TN et al., *Adv Skin Wound Care*, julio de 2012; 25(7): 304-314). Sin embargo, se sabe que la deposición de varios componentes de la matriz es diferente en las heridas crónicas en comparación con las heridas agudas. Por ejemplo, las heridas crónicas se caracterizan por la expresión prolongada o insuficiente de fibronectina, sulfato de condroitina y tenascina, lo que da lugar a una proliferación y migración celulares deterioradas (Loots MA et al., *J Invest Dermatol*, noviembre de 1998; 111(5): 850-857; Agren MS et al., *J Invest Dermatol*, abril de 1999; 112(4): 463-469). Recientemente, se encontró que una producción reducida de la laminina 332, un componente de la membrana basal que sirve como sustrato haptotáctico para la motilidad de los queratinocitos después de la lesión (es decir, una migración inducida por las proteínas de la ECM cuando se une al sustrato), es una de las razones de una reepitelización y cicatrización deterioradas de las heridas (Usui ML et al., *J Histochem Cytochem*, julio de 2008; 56(7): 687-696). Los cambios en la ECM, incluida la modificación de postraduccion de los componentes estructurales clave, también pueden afectar negativamente las respuestas celulares a la lesión. Por ejemplo, a menudo se observa glicación de la matriz en los pacientes diabéticos y es probable que sea responsable o esté relacionada con la senescencia celular prematura, apoptosis, inhibición de la proliferación celular, la migración y la formación de brotes angiogénicos (Kuo PC et al., *In vitro Cell Dev Biol Anim*, noviembre-diciembre de 2007; 43(10): 338-343). La glicación aumenta la inestabilidad de la matriz e interrumpe el ensamblaje y las interacciones de la matriz entre el colágeno y sus miembros

de unión, incluidos los heparán sulfato proteoglicanos (Reigle KL et al., *J Cell Biochem*, 1 de agosto de 2008; 104(5): 1684-1698; Liao H et al., *Biomaterials*, marzo de 2009; 30(9): 1689-1696). También se ha demostrado que la glucosa elevada estimula la producción de MMP por fibroblastos, macrófagos y células endoteliales, contribuyendo de esa manera a un ciclo de degradación de la matriz perjudicial para la supervivencia celular y la cicatrización de heridas (Death AK et al., *Atherosclerosis*, junio de 2003; 168(2): 263-269). La inestabilidad de la matriz que resulta de la glicación y un entrecruzamiento intermolecular insuficiente en condiciones hipóxicas y una degradación excesiva de la matriz por MMP también son perjudiciales para el proceso de cicatrización (Dalton SJ et al., *J Invest Dermatol*, abril de 2007; 127(4): 958-968). La inestabilidad de la matriz impide las interacciones normales de célula-matriz necesarias para la supervivencia y la función de las células y, en última instancia, la reparación de la lesión.

6.3 Biopelículas y lechos de heridas crónicas

La infección es un factor extrínseco que causa una demora en la cicatrización de la herida y contribuye a la cronicidad de la herida, morbilidad y mortalidad (Bader MS, *Am Fam Physician*, 1 de julio de 2008; 78(1): 71-79). Los recuentos bacterianos elevados de más de 10^5 bacterias viables o cualquier cantidad de estreptococos hemolíticos del grupo A se consideran perjudiciales. Las bacterias vivas (y las toxinas bacterianas producidas posteriormente) inducen respuestas inflamatorias excesivas y daño tisular que puede conducir a abscesos, celulitis, osteomielitis o pérdida de las extremidades (en pacientes diabéticos) (Edwards R y Harding KG, *Curr Opin Infect Dis*, abril de 2004; 17(2): 91-96; Ovington L, *Ostomy Wound Manage*,

julio de 2003; 49(7A Supl): 8-12). Además, las células inflamatorias reclutadas producen numerosas proteasas (por ejemplo, MMP), que degradan la ECM y los factores de crecimiento presentes en el lecho de la herida (Demidova-Rice TN et al., *Adv Skin Wound Care*, julio de 2012; 25(7): 304-314). Las bacterias que colonizan las heridas crónicas a menudo forman comunidades polimicrobianas llamadas biopelículas (James GA et al., *Wound Repair Regen*, enero-febrero de 2008; 16(1): 37-44). Estas estructuras complejas están compuestas por células microbianas embebidas en una matriz de polímeros secretada. La matriz polimérica proporciona un entorno óptimo para la supervivencia de las células bacterianas, permitiendo el escape de la bacteria de la vigilancia/defensa inmunológica del huésped y la resistencia al tratamiento con antibióticos (Martin JM et al., *J Invest Dermatol*, enero de 2010; 130(1): 38-48). Aunque las biopelículas son frecuentes en las heridas crónicas y retardan significativamente la reepitelización en modelos animales, aún no está claro la manera en que demoran la cicatrización (Falanga V. *Wound healing and its impairment in the diabetic foot. Lancet*. 2005; 366: 1736–43; James GA, Swogger E, Wolcott R, et al., *Biofilms in chronic wounds; Wound Repair Regen*; 2008; 16(1): 37–44; Schierle Clark F., De la Garza Mauricio, Mustoe Thomas A., Galiano Robert D. *Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model; Wound Repair Regen*; 2009; 17: 354–9). El aumento de la supervivencia bacteriana y la mayor producción de factores de virulencia son explicaciones probables. No obstante, es posible que los componentes extracelulares de la biopelícula posean o muestren un fenotipo tóxico para la funcionalidad de la célula huésped y, por lo tanto, impidan la cicatrización. Se ha demostrado que

el impedimento de la formación de la biopelícula por el péptido inhibidor ARNIII revierte los retardos en la cicatrización de heridas inducidas por las biopelículas bacterianas (Schierle Clark F., De la Garza Mauricio, Mustoe Thomas A., Galiano Robert D. *Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model; Wound Repair Regen*; 2009; 17: 354–9; Cirioni O, Ghiselli R, Minardi D, et al., *RNAIII-inhibiting peptide affects biofilm formation in a rat model of staphylococcal ureteral stent infection; Antimicrob Agents Chemother*; 2007; 51: 4518–20).

7. Cuidado de las heridas crónicas

[0053] El tratamiento exitoso de una herida crónica requiere una comprensión detallada de los componentes moleculares y celulares presentes en el lecho de la herida. Actualmente, las heridas crónicas (y agudas) de diferentes etiologías se tratan usando un abordaje de múltiples pasos basado en el conocimiento contemporáneo de la cicatrización de heridas y conocido con el acrónimo TIME: los tejidos no viables (T) dentro y alrededor de una herida se eliminan mediante desbridamiento quirúrgico o agentes de desbridación, tal como la colagenasa bacteriana; la infección y la inflamación (I) se minimizan con antibióticos y preparaciones antiinflamatorias; el desequilibrio de humedad (M) se corrige, en general, con apósitos cuidadosamente seleccionados; y la epitelialización (E) y la formación de tejido de granulación se promueven mediante la aplicación de terapias específicas, tales como factores de crecimiento (Demidova-Rice T N et al., *Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care; Adv Skin Wound Care*; julio de 2012; 25(7): 304-314; Tomic-Canic M, Ayello EA,

Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H. *Using gene transcription patterns (bar coding scans) to guide wound debridement and healing; Adv Skin Wound Care; 2008; 21: 487–92).*.

[0054]El uso de la estrategia TIME no siempre es suficiente, ya que quedan algunas heridas que no responden a las terapias actuales. Por ende, los métodos refinados que permitirán una terapia personalizada representan opciones interesantes. Para tal fin, se ha propuesto una tecnología de diagnóstico de heridas denominada "codificación de barras" de la herida (Tomic-Canic M, Ayello EA, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H. *Using gene transcription patterns (bar coding scans) to guide wound debridement and healing; Adv Skin Wound Care; 2008; 21: 487–92).* El diagnóstico mediante "codificación de barras" utiliza muestras de los fluidos de heridas crónicas y/o la recolección de biopsias de tejidos que permiten identificar marcadores de cronicidad de heridas, tales como factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento, metaloproteinasas de la matriz (MMP), miembros de la vía de la A-catenina/c-myc y marcadores de diferenciación de queratinocitos. La codificación de barras de la herida se puede usar tanto para guiar el desbridamiento de la herida como para los regímenes de tratamiento. Los niveles necesarios de eliminación de tejido muerto se pueden determinar, por ejemplo, por la presencia de células A-catenina/c-myc positivas que, aunque pueden proliferar, no pueden migrar o diferenciarse y, por lo tanto, se deben eliminar (Demidova-Rice T N et al., *Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care; Adv Skin Wound Care; julio de 2012; 25(7): 304-314).*

[0055] Además, las estrategias de tratamiento se pueden ajustar basado en las necesidades de los pacientes individuales o los resultados de la codificación de barras. Por ejemplo, si las células que residen dentro de una herida expresan niveles bajos de factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento y niveles altos de MMP determinados mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, se pueden administrar factores de crecimiento o células "modificadas" derivadas del paciente para ayudar a restablecer el microentorno de la herida a un fenotipo de cicatrización.

7.1 Preparación del lecho de la herida

[0056] El término preparación del lecho de la herida se refiere al manejo de la herida para acelerar la cicatrización endógena o para facilitar la eficacia de las terapias de heridas avanzadas y adjuntas. La preparación del lecho de la herida comprende procesos que cambian el medio bioquímico, celular y molecular de una herida crónica que no cicatriza, a una herida aguda cicatrizante. En la Tabla 1 se enumeran ejemplos de procesos de preparación de lechos de heridas.

Tabla 1. Procesos de preparación de lechos de heridas

Desig nación	Descripción
A	Eliminación del edema de la herida y del tejido circundante que es secundario a una inflamación crónica
B	Disminución de la carga bacteriana
C	Disminución de la carga fúngica
D	Disminución del tejido necrótico y piel vieja
E	Aumento de la formación de tejido de granulación sano (el tejido

	de granulación está compuesto por formación de colágeno nuevo y crecimiento de vasos sanguíneos nuevos)
F	Disminución de la hipergranulación que es secundaria a un mayor contenido de agua y bacterias
G	Hidratación del lecho de la herida
H	Absorción por drenaje del lecho de la herida
I	Logro de un equilibrio de humedad sobre el lecho de la herida mediante un equilibrio entre la hidratación y la absorbancia
J	Mejora de la contracción y cierre de la herida mediante la promoción de colágeno sano y crecimiento de vasos sanguíneos y epitelialización
K	Disminución del dolor de la herida

Manejo de la necrosis tisular

[0057] El tejido necrótico no viable que recubre la base de la herida dificulta una evaluación de la profundidad y la condición de la herida. Además, la presencia del tejido necrótico es un nido para el crecimiento bacteriano y sirve como una barrera física que puede dificultar los signos de una infección local de la herida. Las colonias bacterianas en el tejido necrótico pueden producir metaloproteinasas perjudiciales que afectan negativamente a los componentes de la matriz extracelular durante el proceso de cicatrización. Las bacterias también pueden competir por los escasos recursos locales (por ejemplo, oxígeno, nutrición y bloques de construcción) que son necesarios para la cicatrización de las heridas (Halim AS et al., *Wound bed preparation from a clinical perspective; Indian J Plast Surg*; mayo-agosto de 2012; 45(2): 193-202).

[0058] El manejo tisular es el proceso de eliminación de tejido necrótico

o desvitalizado, bacterias y células que impiden que el proceso de cicatrización para reducir la contaminación de la herida y la destrucción del tejido. El objetivo es restablecer una base de herida viable con una matriz extracelular funcional. Las heridas crónicas se convierten en heridas agudas con la eliminación de la carga necrótica de las células senescentes, la matriz extracelular, las enzimas inflamatorias y las biopelículas que contienen colonias bacterianas (Panuncialman J, Falanga V. *The science of wound bed preparation; Clin Plast Surg*; 2007; 34: 621–32).

[0059] Las opciones para el desbridamiento incluyen métodos quirúrgicos, mecánicos, autolíticos, enzimáticos y biológicos. El método quirúrgico es el medio más rápido y permite una evaluación precisa de la severidad y la extensión de la herida. Es de particular importancia en las infecciones que amenazan la vida o las extremidades con escaras necróticas o gangrena. El desbridamiento quirúrgico también está indicado para heridas con costras extensas o adherentes, en las que se requiere una eliminación rápida del tejido necrótico. Sin embargo, no es selectivo porque al mismo tiempo se puede extirpar el tejido normal sano (Panuncialman J, Falanga V. *The science of wound bed preparation; Clin Plast Surg*; 2007; 34: 621–32). El desbridamiento quirúrgico puede estar limitado por la tendencia a la hemorragia y la tolerancia al dolor del paciente y la disponibilidad de experiencia quirúrgica.

[0060] La hidrocirugía de Versajet representa un avance técnico en el desbridamiento quirúrgico que utiliza una hidrodisección tangencial. La energía del haz salino del Versajet escinde tangencialmente la superficie de la herida con un daño mínimo en el tejido sano circundante. Es tan eficaz en la eliminación de bacterias como los sistemas de lavado por impulsos de alta

potencia (Granick MS, Tenenhaus M, Knox KR, Ulm JP; *Comparison of wound irrigation and tangential hydrodissection in bacterial clearance of contaminated wounds: Results of a randomized, controlled clinical study*; *Ostomy Wound Manage*; 2007; 53: 64–6). Mejora los resultados del tratamiento al disminuir la cantidad de cirugías necesarias para la preparación del lecho de la herida quirúrgica de las heridas agudas y crónicas. Se ha observado que Versajet es una técnica factible, simple y segura que acelera el desbridamiento quirúrgico de las quemaduras y agrega más precisión en la escisión de heridas por quemaduras (Granick M, Boykin J, Gamelli R, Schultz G, Tenenhaus M. *Toward a common language: surgical wound bed preparation and debridement*; *Wound Repair Regen*; 2006; 14()(Supl 1): S1–10; Gravante G, Delogu D, Esposito G, Montone A. *Versajet hydrosurgery versus classic costraectomy for burn debridement: A prospective randomized trial*; *J Burn Care Res*; 2007; 28: 720–4).

[0061] El desbridamiento mecánico comprende métodos tales como el vendaje húmedo a seco y la irrigación a presión. El vendaje húmedo a seco se realiza dejando la gasa húmeda en contacto directo con las superficies de la herida y retirándola cuando está seca, junto con cualquier tejido de costra adherido. Causa un dolor excesivo así como hemorragia y elimina el nuevo epitelio de cicatrización cuando se cambia el vendaje. La irrigación a presión es la irrigación forzada de salina con una jeringa a través de cánulas para eliminar los tejidos necróticos que están sueltos y superficiales. Esta técnica no se debe usar cuando la solución se puede acumular y quedar atrapada en espacios muertos (Sibbald RG, Goodman L, Woo KY, Krasner DL, Smart H, Tariq G, et al., *Special considerations in wound bed preparation 2011: An update(c)* *Adv*

Skin Wound Care; 2011; 24: 415–36).

[0062] La solución de la Universidad de Edimburgo de cal (EUSOL), usada tradicionalmente para el desbridamiento de heridas, es un agente blanqueador y antiséptico económico que contiene hipocloruro de calcio y ácido bórico. La solución se desarrolló alrededor de la Primera Guerra Mundial para el tratamiento del pie de trinchera (Patton MA; *Eusol: The continuing controversy. BMJ.* 1992; 304: 1636). EUSOL se administra en general como un vendaje húmedo a seco de tres a cuatro veces al día para el desbridamiento químico de una herida con costra. Aunque ha sido objeto de controversia en las últimas dos a tres décadas debido a su toxicidad tisular y la cicatrización retardada de la herida de granulación limpia, todavía cumple un rol en el desbridamiento de heridas si se administra adecuadamente.

[0063] El desbridamiento autolítico emplea la capacidad inherente del cuerpo para digerir y eliminar el tejido necrótico. Se aplica un vendaje que retiene humedad a la herida para proporcionar un ambiente húmedo de cicatrización de heridas que permite licuar el tejido necrótico mediante enzimas endógenas o células fagocíticas. La aplicación de un hidrogel que está cubierto con una película de poliuretano es un ejemplo del vendaje utilizado para este tipo de desbridamiento. Este método es relativamente fácil de realizar, requiere habilidades técnicas limitadas e implica un dolor mínimo. Sin embargo, lleva mucho tiempo y conlleva el riesgo de una infección invasiva y maceración del borde de la herida. El desbridamiento autolítico está indicado en las heridas con una carga necrótica mínima, las heridas que requieren un desbridamiento más agresivo que necesitan anestesia o en pacientes que no pueden tolerar el dolor (Knox KR, Datiashvili RO, Granick MS. *Surgical wound bed preparation of*

chronic and acute wounds; Clin Plast Surg; 2007; 34: 633–41).

[0064] El desbridamiento enzimático emplea enzimas manufacturadas, tales como colagenasa y papaína-urea, como agentes desbridantes para disolver el tejido necrótico. La papaína es una enzima de amplio espectro que es de utilidad para el desbridamiento voluminoso, en tanto la colagenasa es más suave para las células viables. El desbridamiento enzimático es adecuado para pacientes no quirúrgicos y se puede combinar eficazmente con la cicatrización de heridas húmeda. El desbridamiento enzimático es costoso y cumple un rol limitado en el tratamiento de heridas crónicas seleccionadas (Halim AS et al., *Wound bed preparation from a clinical perspective; Indian J Plast Surg*; mayo-agosto 2012; 45(2): 193-202).

[0065] En el desbridamiento biológico (también conocido como terapia de desbridamiento de gusanos o MDT), las larvas de mariposa verde (*Lucila serricata*) digieren el tejido necrótico y secretan enzimas bactericidas. Estas larvas tienen la capacidad para desbridar lechos de heridas, proporcionar actividad antimicrobiana y también estimular la cicatrización de heridas (Marineau ML et al., *Maggot Debridement Therapy in the Treatment of Complex Diabetic Wounds; Hawaii Med J.* 2011; 70(6): 121-124). La MDT es eficaz para las heridas infectadas con *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y/o estreptococo beta hemolítico. Se considera que el desbridamiento biológico es un método de desbridamiento secundario después del desbridamiento quirúrgico o para pacientes que no están en condiciones de un desbridamiento quirúrgico. La sensación incómoda generada por este tratamiento lo vuelve impopular (Halim AS et al., *Wound bed preparation from a clinical perspective; Indian J Plast Surg*; mayo-agosto de 2012; 45(2): 193-202).

Restablecimiento del equilibrio bacteriano

[0066] Los lechos de heridas crónicas a menudo están colonizados por varias especies de bacterias u organismos fúngicos debido a la apertura prolongada de la herida, un pobre flujo sanguíneo y el proceso de enfermedad subyacente. El equilibrio bacteriano se logra controlando la carga bacteriana en términos de su densidad y patogenicidad (Panuncialman J, Falanga V. *The science of wound bed preparation*; *Clin Plast Surg*; 2007; 34: 621–32). La presencia de bacterias en los lechos de las heridas varía en un rango desde contaminación, colonización y colonización crítica hasta una infección invasiva. La colonización crítica es la presencia de microorganismos replicantes que están comenzando a causar daños en el tejido local. Es el punto en el que las defensas del huésped no pueden mantener el equilibrio de los organismos en la colonización. Se observa clínicamente por signos tales como un cambio en el color del lecho de la herida, tejido de granulación friable y no saludable, olor anormal, aumento del exudado seroso y dolor en el sitio de la herida. La identificación de la colonización crítica es importante porque es el nivel en el cual la cicatrización comienza a demorarse, aún antes de la aparición de una infección invasiva (Halim AS et al., *Wound bed preparation from a clinical perspective*; *Indian J Plast Surg*; mayo-agosto de 2012; 45(2): 193-202).

[0067] Los niveles bacterianos de 10^6 o más por gramo de tejido en general se consideran como una infección debido a que estos niveles afectan adversamente la cicatrización de heridas. La presencia de microorganismos replicantes en la herida causa lesiones al huésped debido a la liberación de toxinas, un metabolismo competitivo e inflamación. En las heridas agudas y subagudas, la infección se reconoce clínicamente como signos locales de

enrojecimiento progresivo, calor de la piel que rodea a la herida, edema, aumento del dolor y sensibilidad, un olor fétido y drenaje aumentado o purulento. Los signos sistémicos incluyen fiebre, taquicardia y aún cambios en el estado mental en los casos de sepsis. El paciente también puede presentar un aumento en el recuento de glóbulos blancos. Sin embargo, es menos probable que las heridas crónicas de más de 3 meses presenten inflamación y síntomas de constitución (Gardner SE, Frantz RA, Doebbeling BN; *The validity of the clinical signs and symptoms used to identify localized chronic wound infection; Wound Repair Regen*; 2001; 9: 178–86). La infección de heridas crónicas se reconoce por el aumento del tamaño de la úlcera, el aumento de la producción del exudado y el tejido de granulación no saludable friable (Halim AS et al., *Wound bed preparation from a clinical perspective; Indian J Plast Surg*; mayo-agosto 2012; 45(2): 193-202).

[0068] Dado que las heridas crónicas a menudo son colonizadas por bacterias, la obtención e interpretación de datos de laboratorio se debe realizar de manera correlativa con los hallazgos clínicos. Aunque una biopsia de tejido sería más ideal, también es útil un hisopado de la herida profunda realizado apropiadamente. Además de un recuento bacteriano cuantitativo, la presencia de cuatro o más organismos en el lecho de la herida puede predecir una cicatrización tardía de la herida, en especial porque algunos organismos presentan sinergia (Trengeve NJ, Stacey MC, McGeachie DF, Mata S. *Qualitative bacteriology and leg ulcer healing; J Wound Care*; 1996; 5: 277–80).

[0069] La herida colonizada críticamente se debe tratar con vendajes antimicrobianos tópicos. Los vendajes de plata de liberación sostenida se han vuelto populares debido a su eficacia, baja resistencia y acciones

antimicrobianas de amplio espectro, en especial cuando resulta preocupante una infección por *Pseudomonas* o MRSA. La herida se debe limpiar con soluciones antisépticas tópicas de baja toxicidad (por ejemplo, solución salina normal o de clorhexidina), en lugar de soluciones citotóxicas tales como povidona iodada. Los antisépticos tópicos ofrecen las ventajas de un amplio espectro de cobertura bacteriana y administración a concentraciones altas directamente en el lecho de la herida. El desbridamiento de la herida es un adjunto importante, ya que reduce directamente la carga bacteriana, inclusive las biopelículas. Las biopelículas son colonias bacterianas rodeadas por un recubrimiento protector de polisacáridos, más resistentes a la acción de los antimicrobianos. La liberación periódica de bacterias móviles de estas colonias puede dar como resultado una infección. Los antibióticos sistémicos solo están indicados en la presencia de una infección invasiva o sepsis de la herida. Los factores sistémicos del huésped que causan la inmunosupresión también se deben tener en cuenta (por ejemplo, en el control de la diabetes mellitus). Otros factores que tienen consecuencias clínicas en la preparación del lecho de la herida incluyen una exposición ósea complicada con una osteomielitis subyacente. Esto puede requerir un tratamiento antibiótico sistémico y quirúrgico prolongado, como desbridamiento y cobertura adecuada de los tejidos blandos (Halim AS et al., *Wound bed preparation from a clinical perspective*; *Indian J Plast Surg*; mayo-agosto de 2012; 45(2): 193-202).

Logro del equilibrio de humedad

[0070] Un entorno de herida húmeda acelera la reepitelización de la herida sin aumentar el índice de infección. Estos principios constituyen partes fundamentales del equilibrio de humedad en la preparación del lecho de la

herida (Falanga V. *Wound Bed Preparation in Practice; EWMA Position Document; London: Medical Education Partnership Ltd; 2004. Wound bed preparation: Science applied to practice*; páginas 2–5). El logro del equilibrio de la humedad comprende la creación y el mantenimiento de un lecho de la herida tibio y húmedo y la estimulación de los componentes en la humedad que tienen un impacto positivo sobre la cicatrización de las heridas, tales como los factores de crecimiento. Se necesita una cantidad apropiada de humedad para lograr los efectos óptimos de los factores de crecimiento y las citoquinas y para el crecimiento de las células en proliferación, tales como queratinocitos, células endoteliales y fibroblastos. Por un lado, los fluidos excesivos en la herida contienen metaloproteinasas de la matriz y serina proteasas que pueden degradar o perjudicar los materiales esenciales de la matriz extracelular. Una humedad excesiva también puede conducir a la maceración de los bordes de la herida. Por otro lado, una humedad inadecuada puede inhibir las actividades celulares y promover la formación de costras (Sibbald RG, Goodman L, Woo KY, Krasner DL, Smart H, Tariq G, et al., *Special considerations in wound bed preparation 2011: An update(c) Adv Skin Wound Care*; 2011; 24: 415–36). Por lo tanto, el equilibrio de la humedad es un proceso delicado para mantener un entorno de cicatrización húmedo que sea óptimo para la cicatrización. Este requisito ha llevado al desarrollo de un amplio conjunto de vendajes que retienen la humedad que promueven la curación húmeda de las heridas, que comprenden desde vendajes oclusivos, semiocclusivos, absorbentes e hidratantes.

[0071] Los exudados se pueden manejar directamente mediante el uso de numerosos materiales de vendaje, dependiendo del estado de humedad del

lecho de la herida. Por ejemplo, en una herida altamente exudativa, es apropiado un vendaje absorbente tal como una espuma, mientras que en una costra de herida seca, un vendaje oclusivo o semioclusivo tal como un hidrocoloide es adecuado para lograr el equilibrio de humedad apropiado (Halim AS et al., *Wound bed preparation from a clinical perspective; Indian J Plast Surg*; mayo-agosto de 2012; 45(2): 193-202). El uso de compresión y elevación de las extremidades para eliminar el fluido del sitio de la herida se debe aplicar en las úlceras venosas o en heridas con edema circundante. El equilibrio de la humedad se puede lograr indirectamente, a través de una terapia sistémica que reduce el edema (tal como en la insuficiencia cardíaca) o el uso de medicamentos para reducir la respuesta inflamatoria en determinadas enfermedades (Attinger CE, Janis JE, Steinberg J, Schwartz J, Al-Attar A, Couch K. *Clinical approach to wounds: Debridement and wound bed preparation including the use of dressings and wound-healing adjuvants; Plast Reconstr Surg*; 2006; 117: 72 S–109).

[0072] Los vendajes biológicos (por ejemplo, aloinjertos de piel, injertos de piel autóloga) también pueden ayudar a manejar las heridas crónicas. Estos vendajes forman una barrera mecánica contra las pérdidas de líquidos, proteínas y electrolitos. Por lo tanto, estos vendajes previenen la desecación del tejido y la invasión microbiana. Se puede usar un aloinjerto de piel como una prueba antes del injerto de piel autólogo (Mat Saad AZ, Khoo TL, Dorai AA, Halim AS; *The versatility of a glycerol-preserved skin allograft as an adjunctive treatment to free flap reconstruction; Indian J Plast Surg*; 2009; 42: 94–9; Mat Saad AZ, Halim AS, Khoo TL; *The use of glycerol-preserved skin allograft in conjunction with reconstructive and flap surgery: Seven years of experience; J*

Reconstr Microsurg; 2011; 27: 103–8).

[0073] La terapia de heridas con presión negativa (por ejemplo, vendaje de espuma) se puede usar para manejar una herida que exuda mucho. La terapia de herida con presión negativa también puede reducir el edema, lo que contribuye a una mejor perfusión tisular. También cumple un papel importante en la preparación del lecho de la herida al reducir el tamaño y la complejidad de las heridas. La herida se contrae inmediatamente (macrodeformación) una vez que se aplica la presión negativa. Este tipo de terapia tiene efectos de microdeformación debido al estiramiento de pequeñas ampollas de tejido en el vendaje de espuma. Estos efectos mecánicos cambian el citoesqueleto, lo que da como resultado cascadas de efectos biológicos, que incluyen la estimulación de la angiogénesis, la reducción de las cargas bacterianas y la formación de tejido de granulación (Borgquist O, Gustafsson L, Ingemansson R, Malmsjo M. *Micro- and macromechanical effects on the wound bed of negative pressure wound therapy using gauze and foam*; *Ann Plast Surg*; 2010; 64: 789–93). Esta terapia también se puede usar como una herramienta para el desbridamiento mecánico y autolítico de heridas, ya que el tejido necrótico que se adhiere al vendaje de espuma se elimina durante los cambios del mismo y el lecho húmedo de la herida permite la acción autolítica de las proteinasas endógenas presentes en el ambiente húmedo.

Avance epitelial

[0074] El avance del borde de la herida en términos de migración de células epidérmicas/queratinocitos y la contracción de la herida es uno de los indicadores clave de una herida de cicatrización. Si se observa una detención de estos procesos, los médicos deben considerar los elementos que se

describieron antes (T.I.M.E.), incluso la disfunción celular y los desequilibrios bioquímicos, como posibles razones para el fracaso de la cicatrización de heridas. Por ejemplo, los queratinocitos no pueden proliferar y migrar sobre tejido necrótico, biopelículas, tejido de hipergranulación, costra fibrinosa, presencia de callosidades o bordes hiperqueratósicos. Estos entornos adversos se deben eliminar mediante un desbridamiento adecuado. Se debe lograr un control de la infección así como de una inflamación excesiva para reducir el nivel de proteasas hasta un nivel normal, manteniendo así el delicado equilibrio bioquímico necesario para la replicación de las células epiteliales. Un nivel óptimo de humedad de la herida promoverá la epitelialización como lo evidencia el avance del borde de la herida. A nivel microscópico, la senescencia celular se puede presentar en el borde de las heridas crónicas que necesitan intervención para lograr la cicatrización (Halim AS et al., *Wound bed preparation from a clinical perspective; Indian J Plast Surg*; mayo-agosto de 2012; 45(2): 193-202).

Corrección de la disfunción celular y restablecimiento del equilibrio bioquímico

[0075] Otros componentes de la preparación del lecho de la herida, en especial cuando se trata de heridas crónicas no cicatrizantes, son la corrección de la disfunción celular y la restauración del equilibrio bioquímico. Se cree que las heridas crónicas están atrapadas en una fase inflamatoria prolongada, que resulta de una variedad de factores, que incluyen una disfunción y desregulación celulares causadas por la expresión anormal de moléculas de la matriz extracelular y factores de crecimiento. En las heridas crónicas, el proceso de cicatrización no se ha podido realizar de manera ordenada y a

tiempo para producir una integridad anatómica y funcional, y estas heridas crónicas se caracterizan por una remodelación defectuosa de la matriz extracelular, inflamación prolongada y falta de reepitelización (Mustoe TA, O'Shaughnessy K, Kloeters O. *Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: A unifying hypothesis*; *J Plast Reconstr Surg*; 2006; 117: 35–41; Hasan A, Murata H, Falabella A, Ochoa S, Zhou L, Badiava E, et al., *Dermal fibroblasts from venous ulcers are unresponsive to action of transforming growth factor-beta I*. *J Dermatol Sci*; 1997; 16: 59–66; Agren MS, Steenfors HH, Dabelsteen S, Hansen JB, Dabelsteen E. *Proliferation and mitogenic response to PDGF-BB of fibroblasts isolated from chronic leg ulcers is ulcer-dependent*; *J Invest Dermatol*; 1999; 112: 463–9; Cook H, Davies KJ, Harding KG, Thomas DW; *Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP-1, TIMP-2 and MMP-2 activity*; *J Invest Dermatol*; 2000; 115: 225–33). Por el contrario, el proceso normal de cicatrización de heridas comprende interacciones complejas entre componentes celulares, moléculas de la matriz extracelular y mediadores/enzimas bioquímicos, tales como factores de crecimiento, citoquinas y proteasas. Estos procesos celulares y bioquímicos ordenados se pierden en la herida crónica no cicatrizante. Estos procesos están estrechamente regulados, y el trastorno en uno afectará a otro. La expresión de moléculas de la matriz extracelular, tales como fibronectina y trombospondina, sigue un curso temporal definido. Sin embargo, parecen estar sobreexpresados en la herida crónica, que se cree que es el resultado de la disfunción y la desregulación celulares (Falanga V, Grinnell F, Gilchrist B, Maddox YT, Moshell A. *Workshop on the pathogenesis of chronic wounds*; *J Invest Dermatol*; 1994;

102: 125–7).

[0076] El contenido bioquímico de los exudados de la herida crónica es diferente de los exudados de una herida aguda. El equilibrio de las citoquinas inflamatorias, los factores de crecimiento, las enzimas y sus inhibidores se ve alterado, retardando o aún bloqueando completamente la proliferación de las células, tales como las células endoteliales, los fibroblastos y los queratinocitos. Estos efectos pueden prevenir el progreso de la cicatrización de heridas (Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Ayello EA, Dowsett C, Harding K, et al., *Wound bed preparation: A systematic approach to wound management; Wound Repair Regen*; 2003; 11(Supl 1): S1–28).

[0077] En circunstancias normales, los niveles de dos citoquinas proinflamatorias, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleuquina-1 (IL-1), alcanzan un máximo después de unos pocos días y vuelven a niveles muy bajos en ausencia de infección. Sin embargo, estas citoquinas son persistentemente elevadas en las heridas no cicatrizantes. Cuando la herida crónica muestra signos de cicatrización, las concentraciones de citoquinas inflamatorias disminuyen a valores cercanos a las de las heridas de cicatrización aguda, lo que indica una estrecha correlación entre los niveles bajos de citoquinas inflamatorias y el progreso de la cicatrización de heridas (Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Ayello EA, Dowsett C, Harding K, et al., *Wound bed preparation: A systematic approach to wound management; Wound Repair Regen*; 2003; 11(Supl 1): S1–28).

[0078] Se cree que los fibroblastos cumplen un rol fundamental en la orquestación de las interacciones celulares y bioquímicas en la cicatrización de heridas normal. Los fibroblastos sintetizan fibras de colágeno para proporcionar

resistencia a la herida de cicatrización y, más importante aún, producen fibronectina, tromboespondina, integrinas y vitronectina para formar una lámina basal. Estas moléculas también son componentes de la matriz extracelular, que proporciona un andamiaje y un molde para la migración de células endoteliales y queratinocitos, para la angiogénesis y para la epitelialización. Los fibroblastos también cumplen una función en la modulación de los niveles de las moléculas de la matriz extracelular mediante la mediación de la expresión de citoquinas y proteasas, tales como metaloproteinasas y elastasas de la matriz. En la herida crónica, los niveles de fibronectina son bajos debido a una degradación rápida por proteasas cuyos niveles son más altos que en las heridas agudas y debido a la ausencia o el nivel bajo del inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP) (Halim AS et al., *Wound bed preparation from a clinical perspective; Indian J Plast Surg*; mayo-agosto de 2012; 45(2): 193-202).

[0079] Los fibroblastos aislados de las heridas crónicas también presentan disfunciones celulares, tales como la incapacidad de responder a los factores de crecimiento (por ejemplo, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)- β y el factor de crecimiento transformante (TGF)- β). Varios estudios han demostrado que los fibroblastos derivados de una variedad de lechos de heridas en las heridas crónicas representan un fenotipo prematuro, senescente o no diferenciado que responde de manera ineficiente a mensajes estimulantes normales (Mustoe TA, O'Shaughnessy K, Kloeters O. *Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: A unifying hypothesis; J Plast Reconstr Surg*; 2006; 117: 35–41; Stanley AC, Park HY, Phillips TJ, Russakovsky V, Menzoian JO; *Reduced growth of dermal fibroblasts from chronic venous ulcers can be stimulated with growth factors; J Vasc Surg*; 1997;

26: 994–9; Henderson EA; *The potential effect of fibroblast senescence on wound healing and the chronic wound environment*; *J Wound Care*; 2006; 15: 315–8; Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF; *Impaired wound healing*; *Clin Dermatol*; 2007; 25: 19–25).

[0080] Las heridas crónicas diabéticas aumentan la actividad de los fibroblastos, leucocitos y macrófagos al crear una deficiencia local de glucosa y aumentar la cantidad de subproductos de ácido láctico no deseados, que son perjudiciales para el entorno de la herida (Simonsen L, Holstein P, Larsen K, Bulow J. *Glucose metabolism in chronic diabetic foot ulcers measured in vivo using microdialysis*; *Clin Physiol*; 1998; 18: 355–9; Stolle LB, Riegels-Nielsen P. *The metabolism of the diabetic foot; In vivo investigation with microdialysis*; *Acta Orthop Scand*; 2004; 75: 106–8). Los macrófagos aislados de las heridas de ratones diabéticos mostraron un deterioro significativo en la eferocitosis (es decir, el proceso de eliminación o depuración de las células apoptóticas por los fagocitos). Se asoció una eferocitosis deteriorada con una carga significativamente mayor de células apoptóticas en el tejido de la herida, así como una mayor expresión de citoquinas proinflamatorias y una menor expresión de citoquinas antiinflamatorias (Khanna S, Biswas S, Shang Y, Collard E, Azad A, Kauh C, et al., *Macrophage Dysfunction Impairs Resolution of Inflammation in the Wounds of Diabetic Mice*; *PLoS ONE*; 2010; 5: e9539).

[0081] Liu et al. han demostrado que hay una angiogénesis local deteriorada en las úlceras crónicas del pie diabético debido a la presencia inadecuada de células progenitoras endoteliales. Sin embargo, esta deficiencia se puede corregir mediante el uso de la terapia de oxígeno hiperbárico, que mejora la movilización de las células progenitoras endoteliales de la circulación

a la herida y funciona de manera sinérgica con la administración del factor derivado de células estromáticas exógenas (SDF)-1 α (Liu ZJ, Velazquez OC; *Hyperoxia, Endothelial progenitor cell mobilization, and diabetic wound healing; Antioxid Redox Signal*; 2008; 10: 1869–82). La falla de una angiogénesis insuficiente afecta la migración celular y el soporte de la síntesis de colágeno necesaria para la formación del tejido de granulación maduro y la subsiguiente reepitelización (Brem H, Stojadinovic O, Diegelmann RF, Entero H, Lee B, Pastar I. *Molecular markers in patients with chronic wounds to guide surgical debridement; Mol Med*. 2007; 13: 30–9).

[0082] De manera similar a otros parámetros, para corregir las anomalías celulares y bioquímicas, se deberán eliminar o tratar los factores causales. Estos problemas, por ejemplo, comprende un control glucémico en la diabetes, redistribución de la presión en una úlcera por presión, revascularización en la insuficiencia arterial y el tratamiento por compresión en la ulceración venosa (Sibbald RG, Goodman L, Woo KY, Krasner DL, Smart H, Tariq G, et al., *Special considerations in wound bed preparation 2011: An update(c) Adv Skin Wound Care*; 2011; 24: 415–36).

[0083] Una de las maneras clásicas para manejar las heridas crónicas comprende convertir la herida en una herida aguda mediante la eliminación de los bordes de la herida con cirugía. En múltiples estudios que emplean biopsias y análisis bioquímicos se ha encontrado que la disfunción celular y las anomalías químicas se encuentran en esta región de la herida (Mustoe TA, O'Shaughnessy K, Kloeters O. *Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: A unifying hypothesis; J Plast Reconstr Surg*; 2006; 117: 35–41; Stanley AC, Park HY, Phillips TJ, Russakovsky V, Menzoian JO;

Reduced growth of dermal fibroblasts from chronic venous ulcers can be stimulated with growth factors; J Vasc Surg; 1997; 26: 994–9; Henderson EA; The potential effect of fibroblast senescence on wound healing and the chronic wound environment; J Wound Care; 2006; 15: 315–8; Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF; Impaired wound healing; Clin Dermatol; 2007; 25: 19–25; Jude EB, Blakytyn R, Bulmer J, Boulton AJ, Ferguson MW; Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers; Diabet Med. 2002; 19: 440–7; Blakytyn R, Jude EB, Martin Gibson J, Boulton AJ, Ferguson MW; Lack of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the basal keratinocyte layer of diabetic skin and diabetic foot ulcers; J Pathol; 2000; 190: 589–94). El desequilibrio bioquímico generalmente se puede manejar mediante el control de los exudados por medio de diferentes materiales de vendajes (por ejemplo, una terapia de herida por presión negativa).

[0084] Sin embargo, aún con una preparación adecuada del lecho de la herida, hay heridas que permanecen refractarias al tratamiento o demoran en progresar. Esto puede ser consecuencia de un trastorno celular y bioquímico persistente debido a las actividades inapropiadas de las enzimas proteolíticas, citoquinas y factores de crecimiento producidos dentro de la herida, lo cual conduce a una inflamación prolongada, una angiogénesis deficiente, degradación de la matriz extracelular y falla de la proliferación y migración celulares (Herrick SE, Sloan P, McGurk M, Freak L, McCollum CN, Ferguson MW; *Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers; Am J Pathol; 1992; 141: 1085–95*). Las terapias avanzadas que buscan revertir estas anomalías

incluyen construcciones cutáneas modificadas, factores de crecimiento derivado de plaquetas, factores de crecimiento de queratinocitos, factores estimulantes de colonias de granulocitos y macrófagos, ácido hialurónico esterificado, matriz moduladora de proteasas e inmunoglobulina (Fivenson D, Scherschun L. *Clinical and economic impact of Apligraf for the treatment of non-healing venous leg ulcers*; *Int J Dermatol*; 2003; 42: 960–5; Da Costa RM, Ribeiro Jesus FM, Aniceto C, Mendes M. *Randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of granulocytemacrophage colony stimulating factor in patients with chronic venous leg ulcers*; *Wound Repair Regen*; 1999; 7: 17–25; Robson MC, Phillips TJ, Falanga V, Odenheimer DJ, Parish LC, Jensen JL, et al., *Randomised trial of topically applied Repifermin (recombinant human keratinocyte growth factor-2) to accelerate wound healing in venous ulcers*; *Wound Repair Regen*; 2001; 9: 347–52; Colletta V, Dioguardi D, Di Lonardo A, Maggio G, Torasso F. *A trial to assess the efficacy and tolerability of Hyalofill-F in non-healing venous leg ulcers*; *J Wound Care*; 2003; 12: 357–60; Sibbald RG, Torrance G, Hux M, Attard C, Milkovich N. *Cost-effectiveness of becaplermin for non-healing neuropathic diabetic foot ulcers*; *Ostomy Wound Manage*; 2003; 49: 76–84; Vevas A, Sheehan P, Pham HT; *A randomised controlled trial of Promogran (a collagen/oxidized regenerated cellulose dressing) vs standard treatment in the management of diabetic foot ulcer*; *Arch Surg*; 2002; 137: 822–7; Felts AG, Grainger DW, Slunt JB; *Locally delivered antibodies combined with systemic antibiotics confer synergistic protection against antibiotic-resistant burn wound infection*; *J Trauma*; 2000; 49: 873–8).

Estos tratamientos en general producen/reemplazan a los factores de crecimiento, estimulan la angiogénesis, modulan las células inflamatorias,

promueven la proliferación celular y controlan una actividad excesiva de proteasas. Sin embargo, dichos tratamientos son costosos y no están disponibles para muchos médicos y profesionales de la salud.

8. Tratamiento de heridas crónicas no cicatrizantes

8.1 Agentes adyuvantes

[0085] Hay una amplia variedad de adyuvantes disponibles comercialmente que se comercializan para facilitar el tratamiento de las heridas crónicas. Desafortunadamente, los ensayos controlados aleatorios continúan quedando atrás con respecto a la promoción y la aplicación. Se han documentado un estado funcional mejorado, el índice tobillo/brazo (ABI) y la calidad de vida con el uso de cilostazol en el tratamiento de úlceras arteriales (Hiatt WR; *Pharmacologic therapy for peripheral arterial disease and claudication*; *J Vas Surg*; 2002; 36: 1283–91). La pentoxifilina y la aplicación de vendajes artificiales de piel de dos capas, ambas utilizadas junto con vendajes elásticos de gran compresión y de múltiples capa para el tratamiento de úlceras venosas, han sido validados al igual que la aplicación de factores de crecimiento derivados de plaquetas para úlceras neuropáticas y las terapias de úlceras por presión (Jull AB, Waters J, Arroll B. *Pentoxifylline for treating venous leg ulcers*; *Cochrane Database Syst Rev*. 2002; 1: CD001733; Miell JM, Wieman J, Steed DL, Perry BH, Sampson AR, Schwab BH; *Efficacy and safety of becaplemin (recombinant human platelet-derived, growth factor-BB) in patients with non-healing, lower extremity diabetic ulcers: a combined analysis of four randomized studies*; *Wound Rep Reg*; 1999; 7: 335–46; *Wound Healing Society; Guidelines for the best care of chronic wounds*; *Wound Repair Regen*; 2006; 14: 647–710). Recientes preocupaciones con respecto a la malignidad

observada con el uso de Regranex® (becplermina) han generado una preocupación específica con respecto a su uso (Werdin F. Eplasty. 2009; 9: e19). La estimulación eléctrica, el ultrasonido, láser de baja energía, la estimulación de la médula espinal y la aplicación de oxigenoterapia hiperbárica son terapias prometedoras según estudios teóricos, racionales y preclínicos que sugieren su uso (*Wound Healing Society; Guidelines for the best care of chronic wounds; Wound Repair Regen*; 2006; 14: 647–710). En la actualidad, faltan ensayos controlados aleatorios de la calidad sobre su eficacia en el cuidado de las heridas crónicas. Existe algún apoyo para la terapia de heridas por presión negativa como un complemento para la cicatrización de heridas desafiantes (*Wound Healing Society; Guidelines for the best care of chronic wounds; Wound Repair Regen*; 2006; 14: 647–710). Estadísticamente, no se ha demostrado que la terapia con láser y la fototerapia mejoren la cicatrización de las úlceras (*Wound Healing Society; Guidelines for the best care of chronic wounds; Wound Repair Regen*; 2006; 14: 647–710).

[0086] Se ha aplicado miel (o preparaciones de azúcar concentradas) a las heridas para ayudar a prevenir la infección y posiblemente para acelerar la cicatrización. Se cree que la miel funciona principalmente a través de su alto contenido de azúcar porque mata a los microorganismos directamente. Sin embargo, los estudios no han demostrado un beneficio claro con respecto al uso de preparaciones de miel o azúcar concentrado en el tratamiento de heridas crónicas no cicatrizantes. En un estudio de Robson et al. se descubrió que la miel antibacteriana (es decir, Medihoney®) no mejoró significativamente la cicatrización de heridas en 105 pacientes que padecían úlceras de pierna (Robson V et al., *J. Adv Nurs*; 2009; 65: 565-575). Por el contrario, Jull et al.

mostraron que la miel tópica mejoró el tiempo de curación en comparación con la gasa salina y la sulfadiazina de plata en 2 ensayos de 140 pacientes con úlceras o quemaduras en la piel (Jull A B et al., *Cochrane Database Syst Rev.* 28 de febrero de 2013; 2: CD005083). Además, Debure y colegas informaron un caso de un hombre de 64 años que estaba siendo tratado con azúcar granulada para una cavidad de neumonectomía infectada (Debure A et al., *Lancet*; 1987; 1(8540): 1034-1035). El paciente desarrolló una hiponatremia severa e insuficiencia renal aguda con un espacio osmolar y niveles elevados de sacarosa en orina y sangre (Debure A et al., *Lancet*; 1987; 1(8540): 1034-1035). Después de retirar el azúcar de la cavidad infectada, el paciente reanudó el flujo de orina, y se concluyó un diagnóstico de nefrosis osmótica inducida por sacarosa (Debure A et al., *Lancet*; 1987; 1(8540): 1034-1035).

8.2 Tecnologías de tratamiento emergentes

[0087] Las tecnologías emergentes presentan nuevos abordajes para el cuidado futuro de heridas. En un futuro cercano, se administrarán directamente terapias génicas, que permitirán que genes o mensajeros derivados de genes que son importantes para la cicatrización, en una herida en puntos de tiempo dirigidos (Hirsch T, Spielmann M, Velandar P, et al., *Insulin-like growth factor-1 gene therapy and cell transplantation in diabetic wounds*; *J Gene Med.* 2008; 10(11): 1247–52). La piel y equivalentes compuestos de células madre embrionarias y la aplicación de células madre derivadas de la médula ósea parecen ofrecer otras opciones posibles (Stoff A, Rivera AA, Sanjib Banerjee N, et al., *Promotion of incisional wound repair by human mesenchymal stem cell transplantation*; *Exp Dermatol*; 2008). Estos desarrollos futuros dependerán en gran medida del apoyo público y profesional para investigaciones futuras.

[0088] Desafortunadamente, una de las principales barreras para un cuidado eficaz de heridas continúa siendo la falta de interés, entusiasmo y conocimiento que muestran muchos médicos y profesionales generales de la salud por este tema (Werdin F. *Eplasty*. 2009; 9: e19). Por lo tanto, existe la necesidad de un compuesto de cicatrización de heridas efectivo en cuanto al costo y fácilmente disponible que sea seguro para usar en todo tipo de heridas crónicas no cicatrizantes.

[0089] La invención descrita provee composiciones farmacéuticas que comprenden azúcar granulado e hidrogel que son eficaces para tratar heridas crónicas no cicatrizantes y para promover y acelerar la cicatrización de heridas.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0090] De acuerdo con un aspecto, la invención descrita provee un método de tratamiento de una herida crónica no cicatrizante en un sujeto, en donde dicho método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende azúcar granulado y un biomaterial de hidrogel, en donde la composición farmacéutica es eficaz para aumentar el porcentaje promedio de cierre de heridas en comparación con un control.

[0091] De acuerdo con otro aspecto, la invención descrita provee un método de tratamiento de una herida crónica no cicatrizante en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende azúcar granulado y un biomaterial de hidrogel, en donde la composición farmacéutica es eficaz para matar microorganismos en dicha herida crónica no cicatrizante; o para acelerar la cicatrización de heridas en la herida crónica no cicatrizante; o para aumentar la síntesis de colágeno y la neovascularización en dicha herida crónica no cicatrizante; o para eliminar:

fibrina; piel vieja; y biopelícula en la herida crónica no cicatrizante; o para aumentar el tejido de granulación en la herida crónica no cicatrizante; o para acelerar la epitelialización en la herida crónica no cicatrizante; o para drenar la herida crónica no cicatrizante; o para alejar el fluido inflamatorio de la herida crónica no cicatrizante; o para controlar una infección del lecho de herida en la herida crónica no cicatrizante; o para lograr la preparación del lecho de herida en la herida crónica no cicatrizante.

[0092] De acuerdo con una forma de realización, el porcentaje promedio de cierre de heridas varía en un rango entre aproximadamente 50% y aproximadamente 100% en comparación con el control. De acuerdo con otra forma de realización, el porcentaje promedio de cierre de heridas por lo menos 50% mayor que el control. De acuerdo con otra forma de realización, el porcentaje promedio de cierre de heridas por lo menos 95% mayor que el control. De acuerdo con otra forma de realización, el porcentaje promedio de cierre de heridas por lo menos 99% mayor que el control.

[0093] De acuerdo con una forma de realización, el control es un biomaterial de hidrogel. De acuerdo con otra forma de realización, el biomaterial de hidrogel comprende agua purificada, glicerol, hidroxietilcelulosa, lactato de sodio y alantoína. De acuerdo con otra forma de realización, el agua purificada comprende aproximadamente 70% del biomaterial de hidrogel y el glicerol comprende aproximadamente 30% del biomaterial de hidrogel.

[0094] De acuerdo con una forma de realización, la composición farmacéutica comprende partes iguales (1:1 v/v) de azúcar granulado y biomaterial de hidrogel. De acuerdo con otra forma de realización, la composición farmacéutica se administra por vía tópica. De acuerdo con otra

forma de realización, la composición farmacéutica está recubierta sobre por lo menos una superficie de un vendaje. De acuerdo con otra forma de realización, el vendaje comprende un vendaje oclusivo y una almohadilla no adherente (Telfa™).

[0095] De acuerdo con una forma de realización, el porcentaje promedio de cierre de heridas es el porcentaje promedio de cambio en el área de la herida, el porcentaje promedio de cambio en el volumen de la herida o una combinación de los mismos. De acuerdo con otra forma de realización, el porcentaje promedio de cambio en el área de la herida, el porcentaje promedio de cambio en el volumen de la herida o la combinación de los mismos está determinado por un sistema de cámara tridimensional.

[0096] De acuerdo con una forma de realización, la composición farmacéutica además comprende por lo menos un agente terapéutico adicional. De acuerdo con otra forma de realización, dicho por lo menos un agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en un agente antiinflamatorio, un agente analgésico, un agente antiinfeccioso, un factor de crecimiento y una combinación de los mismos. De acuerdo con otra forma de realización, el agente antiinfeccioso es un agente antibiótico. De acuerdo con otra forma de realización, el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y un factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

[0097] De acuerdo con una forma de realización, la composición farmacéutica se administra en combinación con una terapia adjunta. De acuerdo con otra forma de realización, la terapia adjunta se selecciona del

grupo que consiste en oxígeno hiperbárico (HBO), terapia génica, terapia con células madre, piel biomodificada, un equivalente de piel, un sustituto de piel, un injerto de piel y una combinación de los mismos.

[0098] De acuerdo con una forma de realización, la herida crónica no cicatrizante se selecciona del grupo que consiste en una herida diabética, una herida venosa, una herida quirúrgica, una herida por cáncer, una úlcera por presión, una úlcera arterial y una combinación de las mismas.

[0099] De acuerdo con una forma de realización, la composición farmacéutica es eficaz para disminuir: edemas de heridas y tejidos; tejidos necróticos; y el dolor en la herida crónica no cicatrizante.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[00100] El archivo de la patente o solicitud contiene por lo menos una figura realizada en colores. Las copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con una o más figuras en color serán provistas por la Oficina ante su requerimiento y pago de las tasas necesarias.

[00101] En la Figura 1 se muestra un diagrama que representa la anatomía de la piel (tomada del Stedman's Medical Dictionary, 27° Ed., Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (2000), en 1647).

[00102] En la Figura 2 se muestra un diagrama que representa las capas de la epidermis.

[00103] En la Figura 3 se muestra un gráfico de barras que representa el porcentaje de cambio del área de la herida.

[00104] En la Figura 4 se muestra un gráfico lineal de la tendencia del porcentaje de cerrado de la herida.

[00105] En la Figura 5 se muestran gráficos de cajas para

comparar la reducción del área de las heridas del lado izquierdo y del lado derecho de los animales del Grupo 1 (azúcar granulada + gel para heridas; n=12), del Grupo 2 (gel para heridas solamente; n=12) y del Grupo 3 (azúcar granulada + gel para heridas + betadine; n=12) durante un seguimiento de 11 días con 3 ratones sacrificados en cada grupo en los Días 3, 6, y 9 después de la producción de la herida, antes de la evaluación al final del estudio en el Día 11. Para el Día 2, las heridas tratadas con azúcar granulada + gel para heridas (Grupo 1) consiguieron una reducción más rápida del área en comparación con las heridas de los otros dos grupos. Esta tendencia persistió hasta el Día 7, cuando las heridas tratadas solamente con gel para heridas consiguieron una reducción del área que no fue significativamente diferente del Grupo 1 pero significativamente mayor que las del Grupo 3 (Día 1: $P=1,000$; Día 2 $P=0,0284$; Día 3: $P=0,0343$; Día 4: $P=0,0653$; Día 5: $P=0,0035$; Día 6: $P=0,0147$; Día 7: $P=0,0804$; Día 8: $P=0,9004$; Día 9: $P=0,7756$; Día 10: $P=0,0290$; Día 11: $P=0,1720$).

[00106] En la Figura 6 se muestra un diagrama en cascada de la reducción del área en las heridas del lado izquierdo y del lado derecho en el Día 3. Las heridas del lado izquierdo y del lado derecho 1 - 24 son de los animales del Grupo 1 (azúcar granulada + gel para heridas; n=12) en el Día 3; las heridas del lado izquierdo y del lado derecho 25 - 48 son de los animales del Grupo 2 (gel para heridas solamente; n=12) en el Día 3; las heridas del lado izquierdo y del lado derecho 49 - 72 son de los animales del Grupo 3 (azúcar granulada + gel para heridas + betadine; n=12) en el Día 3. La reducción del área (cambio en comparación con el nivel basal) en las heridas en el Grupo 1 fue mayor que la informada en las heridas del Grupo 2. Se observó una leve

reducción positiva del área en el Grupo 3.

[00107] En la Figura 7 se muestra un diagrama en cascada de la reducción del área en las heridas del lado izquierdo y del lado derecho en el Día 6. Las heridas del lado izquierdo y del lado derecho 1 - 18 son de los animales del Grupo 1 (azúcar granulada + gel para heridas; n=9) en el Día 6; las heridas del lado izquierdo y del lado derecho 19 - 36 son de los animales del Grupo 2 (gel para heridas solamente; n=9) en el Día 6; las heridas del lado izquierdo y del lado derecho 37 - 54 son de los animales del Grupo 3 (azúcar granulada + gel para heridas + betadine; n=9) en el Día 6. La reducción del área (cambio en comparación con el nivel basal) en las heridas del Grupo 1 fue mayor que la informada en las heridas del Grupo 2. Se observó una leve reducción positiva del área en el Grupo 3.

[00108] En la Figura 8 se muestra un diagrama en cascada de la reducción del área en las heridas del lado izquierdo y del lado derecho en el Día 9. Las heridas del lado izquierdo y del lado derecho 1 - 12 son de los animales del Grupo 1 (azúcar granulada + gel para heridas; n=6) en el Día 9; Las heridas del lado izquierdo y del lado derecho 13 - 24 son de los animales del Grupo 2 (gel para heridas solamente; n=6) en el Día 9; heridas del lado izquierdo y del lado derecho 25 - 36 son de los animales del Grupo 3 (azúcar granulada + gel para heridas + betadine; n=6) en el Día 9. 6/12 heridas del Grupo 1 consiguieron un 90% de reducción del área para el Día 9; 4/12 heridas del Grupo 2 consiguieron por lo menos 90% de reducción del área para el Día 9 y 4/12 heridas del Grupo 3 consiguieron un 90% de reducción del área.

[00109] En la Figura 9 se muestra un diagrama en cascada de la reducción del área en las heridas del lado izquierdo y del lado derecho en el

Día 11. Las heridas del lado izquierdo y del lado derecho 1 - 6 son de los animales del Grupo 1 (azúcar granulada + gel para heridas; n=3) en el Día 11; las heridas del lado izquierdo y del lado derecho 7 - 12 son de los animales del Grupo 2 (gel para heridas solamente; n=3) en el Día 11; las heridas del lado izquierdo y del lado derecho 13 - 18 son de los animales del Grupo 3 (azúcar granulada + gel para heridas + betadine; n=3) en el Día 11. 5/6 heridas del Grupo 1 cicatrizaron para el Día 11, con un 100% de reducción del área; 4/6 heridas del Grupo 2 consiguieron un 100% de reducción del área para el Día 11. 3/6 heridas del Grupo 3 consiguieron un 100% de reducción del área para el Día 11, con 2 de las heridas con menos de 70% de reducción del área.

[00110] En la Figura 10 se muestra un gráfico del porcentaje de heridas con epitelialización a lo largo del tiempo (Día 1 al Día 6) para los animales del Grupo 1 (azúcar granulada + gel para heridas), del Grupo 2 (gel para heridas solamente) y del Grupo 3 (azúcar granulada + gel para heridas + betadine).

[00111] En la Figura 11 se muestran gráficos de cajas para la reducción del área (%) en las heridas del lado izquierdo y del lado derecho de los animales del Grupo 1 (azúcar granulada + gel para heridas; n=9); del Grupo 2 (gel para heridas solamente; n=9); y del Grupo 3 (azúcar granulada + gel para heridas + betadine; n=9) en el Día 6. La reducción del área fue significativamente diferente entre los tres grupos (valor P de Wilcoxon=0,0147).

[00112] En la Figura 12 se muestra un gráfico del porcentaje de heridas cicatrizadas durante el periodo de observación de 11 días. En el gráfico se muestra que el número absoluto de heridas cicatrizadas fue mayor en el grupo tratado con azúcar y gel para heridas (Grupo 1) en comparación con

todos los otros grupos.

[00113] En la Figura 13 se muestran gráficos de cajas para la reducción del área (%) en las heridas del lado izquierdo y del lado derecho de los animales del Grupo 1 (azúcar granulada + gel para heridas; n=9); del Grupo 2 (gel para heridas solamente; n=9); y del Grupo 3 (azúcar granulada + gel para heridas + betadine; n=9) en el Día 2.

[00114] En la Figura 14 se muestran gráficos de cajas para la reducción del área (%) en las heridas del lado izquierdo y del lado derecho de los animales del Grupo 1 (azúcar granulada + gel para heridas; n=9); del Grupo 2 (gel para heridas solamente; n=9); y del Grupo 3 (azúcar granulada + gel para heridas + betadine; n=9) en el Día 3.

[00115] En la Figura 15 se muestran gráficos de cajas para la reducción del área (%) en las heridas del lado izquierdo y del lado derecho de los animales del Grupo 1 (azúcar granulada + gel para heridas; n=9); del Grupo 2 (gel para heridas solamente; n=9); y del Grupo 3 (azúcar granulada + gel para heridas + betadine; n=9) en el Día 9.

[00116] En la Figura 16 se muestran gráficos de cajas para la reducción del área (%) en las heridas del lado izquierdo y del lado derecho de los animales del Grupo 1 (azúcar granulada + gel para heridas; n=9); del Grupo 2 (gel para heridas solamente; n=9); y del Grupo 3 (azúcar granulada + gel para heridas + betadine; n=9) en el Día 11.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Glosario

[00117] El término “abrasión”, según se usa en la presente, se refiere al raspado o frotamiento de una superficie corporal mediante fricción.

[00118] El término "administrar", según se usa en la presente, significa dar o aplicar. El término "administración", según se usa en la presente, incluye una administración *in vivo*, así como una administración directamente en el tejido *ex vivo*. En general, la administración puede ser tópica, en formulaciones de unidades de dosificación que contienen transportadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales, según se desee, o puede ser local por medios tales como, pero en un sentido no taxativo, inyección, implantes, injertos o parenteral.

[00119] El término "alantoína", según se usa en la presente, se refiere a un compuesto químico (5-ureidohidantoína), $C_4H_6N_4O_3$, que se produce como una sustancia blanca cristizable presente en muchas plantas y en los fluidos alantoico y amniótico y la orina fetal de primates. También está presente en la orina de mamíferos distintos de primates como un producto del metabolismo de la purina y se puede producir mediante síntesis por oxidación de ácido úrico.

[00120] Según se usa en la presente, el término "anticuerpo" incluye, a modo de ejemplo, anticuerpos tanto naturales como no naturales. Específicamente, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, y fragmentos de los mismos. Además, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos quiméricos y anticuerpos totalmente sintéticos, y fragmentos de los mismos.

[00121] Los anticuerpos son proteínas séricas cuyas moléculas poseen áreas pequeñas de su superficie que son complementarias a pequeñas agrupaciones químicas en sus blancos. Estas regiones complementarias

(denominadas sitios de combinación de anticuerpos o sitios de unión a antígenos) de las cuales hay por lo menos dos por molécula de anticuerpo, y en algunos tipos de moléculas de anticuerpo diez, ocho o en algunas especies hasta 12, pueden reaccionar con su región complementaria correspondiente en el antígeno (el determinante antigénico o epitope) para unir varias moléculas de antígenos multivalentes para formar una red.

[00122] La unidad estructural básica de una molécula de anticuerpo completa consiste en cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas livianas (L) idénticas (cada una de las cuales contiene aproximadamente 220 aminoácidos) y dos cadenas pesadas (H) idénticas (cada una de las cuales en general contiene aproximadamente 440 aminoácidos). Las dos cadenas pesadas y las dos cadenas livianas se mantienen juntas por una combinación de enlaces no covalentes y covalentes (disulfuro). La molécula está compuesta por dos mitades idénticas, cada una de las cuales con un sitio de unión al antígeno idéntico compuesto por la región N-terminal de una cadena liviana y la región N-terminal de una cadena pesada. Ambas cadenas livianas y pesadas habitualmente cooperan para formar la superficie de unión al antígeno.

[00123] Los anticuerpos human muestran dos tipos de cadenas livianas, κ y λ ; las moléculas individuales de inmunoglobulina generalmente son solo una o la otra. En el suero normal, se ha encontrado que un 60% de las moléculas tienen determinantes κ y un 30% λ . Se ha encontrado que muchas otras especies presentan dos tipos de cadenas livianas, pero sus proporciones varían. Por ejemplo, en ratón y rata, las cadenas λ comprenden solo un pequeño porcentaje del total; en perros y gatos, las cadenas κ son muy pocas; los caballos no parecen tener ninguna cadena κ ; los conejos pueden tener

entre 5 y 40% de λ , dependiendo de la cepa y del alotipo del locus b; y las cadenas livianas de pollo son más homólogas a λ que a κ .

[00124] En mamíferos, hay cinco clases de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, cada uno con su propia clase de cadena pesada α (para IgA), δ (para IgD), ϵ (para IgE), γ (para IgG) y μ (para IgM). Además, hay cuatro subclases de inmunoglobulinas IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) que comprenden las cadenas pesadas γ_1 , γ_2 , γ_3 y γ_4 , respectivamente. En su forma secretada, la IgM es un pentámero compuesto por cinco unidades de cuatro cadenas, lo que da un total de 10 sitios de unión al antígeno. Cada pentámero contiene una copia de una cadena J, que se inserta de manera covalente entre dos regiones de cola adyacentes.

[00125] Las cinco clases de inmunoglobulina difieren de otras proteínas séricas por cuanto muestran un amplio rango de movilidad electroforética y no son homogéneas. Esta heterogeneidad – que las moléculas de IgG individuales, por ejemplo, difieren entre sí en cuanto a su carga neta – es una propiedad intrínseca de las inmunoglobulinas.

[00126] El principio de complementariedad, que a menudo se compara con el ajuste de una llave en una cerradura, comprende fuerzas de unión relativamente débiles (enlaces hidrofóbicos y de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones iónicas), que solamente pueden actuar con eficacia cuando las dos moléculas que reaccionan se pueden acercar mucho entre sí y, de hecho, tan de cerca que los átomos o los grupos de átomos constituyentes sobresalientes de una molécula se pueden ajustar dentro de depresiones o huecos complementarios en la otra. Las interacciones de antígeno-anticuerpo muestran un alto grado de especificidad, lo cual se

manifiesta en muchos niveles. Al nivel molecular, la especificidad significa que los sitios de combinación de los anticuerpos con un antígeno tienen una complementariedad que no es para nada similar a los determinantes antigénicos de un antígeno no relacionado. Siempre que los determinantes antigénicos de dos antígenos diferentes tengan alguna similitud estructural, puede haber cierto grado de ajuste de un determinante en el sitio de combinación de algunos anticuerpos con el otro, y que este fenómeno da lugar a reacciones cruzadas. Las reacciones cruzadas son de gran importancia para la comprensión de la complementariedad o especificidad de las reacciones de antígeno-anticuerpo. La especificidad o complementariedad inmunológica permite la detección de pequeñas cantidades de impurezas/contaminaciones entre antígenos.

[00127] Se pueden generar anticuerpos monoclonales (mAb) mediante fusión de células de bazo de ratón de un donante inmunizado con una línea celular de mieloma de ratón para producir clones de hibridomas de ratón establecidos que crecen en un medio selectivo. Una célula de hibridoma es una célula híbrida immortalizada que es el resultado de la fusión *in vitro* de una célula B secretora de anticuerpos con una célula de mieloma. La inmunización *in vitro*, que se refiere a la activación primaria de células B específicas del antígeno en cultivo, es otro medio bien establecido para producir anticuerpos monoclonales de ratón.

[00128] También se pueden amplificar diversas bibliotecas de genes de las cadenas variables pesada (VH) y liviana (Vk y Vλ) de una inmunoglobulina a partir de linfocitos de sangre periférica mediante amplificación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los genes

que codifican cadenas polipeptídicas simples en donde los dominios variables de las cadenas pesada y liviana están unidos mediante un espaciador polipeptídico (Fv de cadena simple o scFv) se pueden preparar combinando aleatoriamente genes V de las cadenas pesada y liviana usando PCR. Luego se puede clonar una biblioteca combinatoria para la presentación sobre la superficie del bacteriófago filamentoso por fusión a una proteína de cobertura menor en la punta del fago.

[00129] La técnica de selección guiada se basa en el entremezclado de genes V de una inmunoglobulina humana con genes V de una inmunoglobulina de roedor. El método comprende (i) entremezclar un repertorio de cadenas livianas λ humanas con el dominio de la región variable de la cadena pesada (VH) de un anticuerpo monoclonal de ratón reactivo con un antígeno de interés; (ii) seleccionar Fab medio humanos de ese antígeno; (iii) usar los genes de la cadena liviana λ seleccionados como "dominios de anclaje" para una biblioteca de cadenas pesadas humanas en una segunda entremezcla para aislar fragmentos Fab clonados que tienen los genes de la cadena liviana humana; (v) transfectar las células de mieloma de ratón mediante electroporación con vectores de expresión de células de mamífero que contienen los genes; y (vi) expresar los genes V del Fab reactivo con el antígeno como una molécula completa λ del anticuerpo IgG1, en el mieloma de ratón.

[00130] El término "agente antibiótico", según se usa en la presente, se refiere a cualquiera de un grupo de sustancias químicas que tienen la capacidad para inhibir el crecimiento, o destruir, bacterias y otros microorganismos, usado fundamentalmente en el tratamiento de enfermedades

infecciosas. Los ejemplos de agentes antibióticos incluyen, pero en un sentido no taxativo, penicilina G; meticilina; nafcilina; oxacilina; cloxacilina; dicloxacilina; ampicilina; amoxicilina; ticarcilina; carbenicilina; mezlocilina; azlocilina; piperacilina; imipenem; aztreonam; cefalotina; cefaclor; cefoxitina; cefuroxime; cefonicid; cefmetazol; cefotetán; cefprozil; loracarbef; cefetamet; cefoperazona; cefotaxime; ceftizoxime; ceftriaxona; ceftazidime; cefepime; cefixime; cefpodoxime; cefsulodina; fleroxacin; ácido nalidíxico; norfloxacin; ciprofloxacina; ofloxacina; enoxacin; lomefloxacina; cinoxacin; doxiciclina; minociclina; tetraciclina; amikacina; gentamicina; kanamicina; netilmicina; tobramicina; estreptomycin; azitromycin; claritromycin; eritromycin; estolato de eritromycin; etilsuccinato de eritromycin; glucoheptonato de eritromycin; lactobionato de eritromycin; estearato de eritromycin; vancomycin; teicoplanina; cloranfenicol; clindamicina; trimetoprim; sulfametoxazol; nitrofurantoína; rifampin; mupirocin; metronidazol; cefalexina; roxitromycin; co-amoxiclavuanato; combinaciones de piperacilina y tazobactam; y sus diversas sales, ácidos, bases y otros derivados. Los agentes antibióticos antibacterianos incluyen, pero en un sentido no taxativo, penicilinas, cefalosporinas, carbacefemas, cefamicinas, carbapenemas, monobactamas, aminoglicósidos, glucopéptidos, quinolonas, tetraciclinas, macrólidos y fluoroquinolonas.

[00131] El término “agente antifúngico” como se usa en la presente designa a cualquiera de un grupo de sustancias químicas que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento o de destruir los hongos. Los agentes antifúngicos incluyen a título enunciativo no taxativo a Anfotericina B, Candicidina, Dermostatina, Filipina, Fungicromina, Hachimicina, Hamicina,

Lucensomicina, Mepartricina, Natamicina, Nistatina, Pecilocina, Perimicina, Azaserina, Griseofulvina, Oligomicinas, Neomicina, Pirrolnitrina, Sicanina, Tubercidina, Viridina, Butenafina, Naftifina, Terbinafina, Bifonazol, Butoconazol, Clordantoina, Clormidazol, Cloconazol, Clotrimazol, Econazol, Enilconazol, Fenticonazol, Flutrimazol, Isoconazol, Ketoconazol, Lanoconazol, Miconazol, Omoconazol, Oxiconazol, Sertaconazol, Sulconazol, Tioconazol, Tolciclato, Tolindato, Tolnaftato, Fluconazole, Itraconazol, Saperconazol, Terconazol, Acrisorcina, Amorolfina, Biphenamina, Bromosalicilcloranilida, Buclosamida, Propionato de Calcio, Clorfenesina, Ciclopirox, Cloxiquina, Coparafinato, Diamtazol, Exalamida, Flucitosina, Haletazol, Hexetidina, Loflucarban, Nifuratel, Ioduro de Potasio, Ácido Propiónico, Piritiona, Salicilanilida, Propionato de Sodio, Sulbentina, Tenonitrozol, Triacetina, Ujotion, Ácido Undecilénico, y Propionato de Zinc.

[00132] El término “agente antiinfeccioso” como se usa en la presente se refiere a un agente que es capaz de inhibir la dispersión de un agente infeccioso tal como un microorganismo infeccioso, por ejemplo, una bacteria, un virus, un nematodo, un parásito, etc. Los ejemplos de agentes antiinfecciosos pueden incluir un agente antibiótico, un agente antifúngico, un agente antiviral, un agente antiprotozoarios, etc.

[00133] El término “agente antiinflamatorio” como se usa en la presente se refiere a un agente que reduce la inflamación. El término “agente antiinflamatorio esteroideo”, como se usa en la presente, se refiere a cualquiera de uno de los numerosos compuestos que contienen un sistema de 4 anillos y 17 carbonos e incluye a los esteroides, diversas hormonas (como los esteroides anabólicos), y glicósidos. El término “agentes antiinflamatorios no esteroideos”

se refiere a un gran grupo de agentes que son similares a la aspirina en su mecanismo de acción, que incluyen al ibuprofeno (Advil)®, naproxeno sódico (Aleve)®, y acetaminofeno (Tylenol)®.

[00134] El término "biodegradable", como se usa en la presente, se refiere a un material que se degradará en forma activa o en forma pasiva en el transcurso del tiempo mediante procesos químicos simples, mediante la acción de enzimas corporales o mediante otros mecanismos similares de actividad biológica.

[00135] El término "biomimético" como se usa en la presente se refiere a materiales, sustancias, dispositivos, procesos, o sistemas que imitan o "simulan" materiales naturales elaborados por organismos vivos.

[00136] El término "quemadura" como se usa en la presente se refiere a un daño a los tejidos causado por el contacto con calor, llama, químicos, electricidad, o radiación. Las quemaduras de primer grado muestran enrojecimiento; las quemaduras de segundo grado muestran vesicación (una zona ampollada); las quemaduras de tercer grado muestran necrosis (muerte celular) a lo largo de toda la piel. Las quemaduras de primer y segundo grado son quemaduras que abarcan solo un espesor parcial, las de tercer grado son quemaduras que cubren todo el espesor.

[00137] El término "vehículo" como se usa en la presente describe un material que no produce una irritación significativa a un organismo y que no impide la actividad biológica y las propiedades del péptido de la composición de la presente invención. Los vehículos deben ser de una pureza lo suficientemente alta y de una toxicidad lo suficientemente baja para que sean adecuados para su administración a un mamífero que bajo tratamiento. El

vehículo puede ser inerte, o el mismo puede poseer beneficios farmacéuticos. Los términos "excipiente", "vehículo", o "transportador" se usan como sinónimos para referirse a materiales transportadores adecuados para la formulación y la administración de las composiciones farmacéuticamente aceptables que se describen en la presente. Los vehículos y los transportadores útiles en la presente incluyen a cualquiera de los materiales conocidos en el arte que son no tóxicos y que no interaccionan con otros componentes.

[00138] El término "agente de coagulación" como se usa en la presente se refiere a un agente que promueve la coagulación de la sangre. Los ejemplos de agentes de coagulación incluyen a título enunciativo no taxativo a trombina, protrombina, fibrinógeno, etc.

[00139] El término "componente" como se usa en la presente se refiere a una parte, elemento o ingrediente constituyente.

[00140] El término "condición", como se usa en la presente, se refiere a una variedad de estados de la salud que incluyen a trastornos o enfermedades producidas por cualquier mecanismo, trastorno o daño subyacente y la promoción de tejidos y órganos sanos.

[00141] El término "contacto" y todas sus formas gramaticales como se usan en la presente se refieren a un estado o condición de contacto o de proximidad inmediata o local.

[00142] El término "citoquina" como se usa en la presente se refiere a sustancias proteicas pequeñas solubles secretadas por las células que tienen una variedad de efectos sobre otras células. Las citoquinas median muchas funciones fisiológicas importantes incluyendo el crecimiento, el

desarrollo, la cicatrización, y la respuesta inmunológica. Las mismas actúan mediante la unión a receptores específicos de célula que se localizan en la membrana celular, lo que permite que comience una cascada de transducción de señales diferentes en la célula, lo que eventualmente conducirá a cambios bioquímicos y fenotípicos en las células blanco. En general, las citoquinas actúan en forma local, pero, para usar la terminología de las hormonas, puede tener efectos autocrinos, paracrinos o incluso endocrinos. Las mismas incluyen citoquinas de tipo I, que abarcan muchas de las interleuquinas, así como también muchos factores de crecimiento hematopoyéticos; citoquinas de tipo II, incluyendo los interferones y la interleuquina-10; moléculas relacionadas con el factor de necrosis tumoral ("TNF"), incluyendo a TNF- α y linfoxina; miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, incluyendo la interleuquina 1 ("IL-1"); y las quimoquinas, una familia de moléculas que pueden tener un rol crítico en una amplia variedad de funciones inmunológicas e inflamatorias. La misma citoquina puede tener efectos diferentes en una célula dependiendo del estado de la célula; las citoquinas inflamatorias pueden ser producidas virtualmente por todas las células nucleadas, por ejemplo, las células endo/epiteliales y los macrófagos. Las citoquinas con frecuencia regulan la expresión de otras citoquinas e inician las cascadas dependientes de las mismas.

[00143] El término "células inmunomoduladoras" como se usa en la presente se refiere a una o más células que son capaces de aumentar o disminuir las respuestas inmunológicas mediante la expresión de quimoquinas, citoquinas y otros mediadores de las respuestas inmunológicas.

[00144] El término "citoquinas inflamatorias" o "mediadores inflamatorios" como se usa en la presente se refiere a los mediadores

moleculares del proceso inflamatorio, que pueden modular mediante un efecto pro o antiinflamatorio. Estas moléculas solubles, difusibles actúan tanto en forma local en el sitio del daño tisular y la infección, así como también en sitios más distantes. Algunos mediadores inflamatorios se activan mediante el proceso inflamatorio, mientras que otros se sintetizan y/o se liberan a partir de fuentes celulares en respuesta a la inflamación aguda o a través de otros mediadores inflamatorios solubles. Los ejemplos de mediadores inflamatorios de la respuesta inflamatoria incluyen, a título enunciativo no taxativo a proteasas plasmáticas, complemento, quininas, proteínas de coagulación y fibrinolíticas, mediadores lipídicos, prostaglandinas, leucotrienos, factor activador de plaquetas (PAF), péptidos y aminas, incluyendo, a título enunciativo no taxativo, a histamina, serotonina, y neuropéptidos, citoquinas proinflamatorias, incluyendo, a título enunciativo no taxativo, a interleuquina-1-beta ($IL-1\beta$), interleuquina-4 ($IL-4$), interleuquina-6 ($IL-6$), interleuquina-8 ($IL-8$), factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$), interferón gamma ($IF-\gamma$), e interleuquina-12 ($IL-12$).

[00145] Entre los mediadores proinflamatorios, se sabe que la $IL-1$, la $IL-6$, y el $TNF-\alpha$ activan a los hepatocitos en una respuesta de fase aguda para sintetizar proteínas de fase aguda que activan al complemento. El complemento es un sistema de proteínas plasmáticas que interaccionan con los patógenos para marcarlos con el objetivo de destruirlos mediante las células fagocíticas. Las proteínas del complemento pueden activarse directamente a través de los patógenos o en forma indirecta mediante anticuerpos unidos al patógeno, conduciendo a una cascada de reacciones que ocurren sobre la superficie de los patógenos y que generan componentes

activos con diversas funciones efectoras. La IL-1, la IL-6, y el TNF- α también activan al endotelio de la médula ósea para movilizar a los neutrófilos, y funcionan como pirógenos endógenos, elevando la temperatura corporal, lo cual ayuda a eliminar las infecciones del cuerpo. Un efecto importante de las citoquinas es el de actuar sobre el hipotálamo, alterando la regulación de la temperatura corporal, y sobre las células de músculo y de tejido adiposo, estimulando el catabolismo de las células de músculo y de tejido adiposo para elevar la temperatura corporal. A temperaturas elevadas, disminuye la replicación de las bacterias y los virus, mientras que el sistema inmunológico adaptativo funciona en forma más eficaz.

[00146] El término “interleuquina (IL)” como se usa en la presente se refiere a una citoquina secretada por los leucocitos y que actúa sobre los mismos. Las interleuquinas regulan el crecimiento, la diferenciación, y la movilidad celular, y estimulan las respuestas inmunológicas, tales como inflamación. Los ejemplos de interleuquinas incluyen a interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-1 β (IL-1 β), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-8 (IL-8), e interleuquina-12 (IL-12).

[00147] El término “Factor de Necrosis Tumoral” o “TNF” como se usa en la presente se refiere a una citoquina elaborada por las células blancas sanguíneas en respuesta a un antígeno o una infección, que induce una necrosis (muerte) de las células tumorales y que posee un amplio rango de acciones proinflamatorias. El factor de necrosis tumoral también es una citoquina multifuncional con efectos sobre el metabolismo lipídico, la coagulación, la resistencia a la insulina, y la función de las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos.

[00148] El término “enfermedad” o “trastorno”, como se usa en la presente, se refiere a un deterioro de la salud o una condición de funcionamiento anormal.

[00149] Los términos “dosis” y “dosificación” se usan como sinónimos para referirse a la cantidad de un fármaco u otro remedio a ser tomado o aplicado todo al mismo tiempo o en cantidades parciales dentro de un periodo de tiempo dado.

[00150] El término “fármaco” como se usa en la presente se refiere a un agente terapéutico o cualquier sustancia usada en la prevención, el diagnóstico, el alivio, el tratamiento, o la cura de una enfermedad.

[00151] El término “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para lograr un efecto biológico deseado.

[00152] El término “herida por escisión” como se usa en la presente se refiere a una herida que es el resultado de una eliminación quirúrgica o el corte de un tejido. El término “herida por escisión” incluye, a título enunciativo no taxativo, desgarros, abrasiones, cortes, pinchazos, o laceraciones en la capa epitelial de la piel que se pueden extender hacia la capa dérmica e incluso hacia la grasa subcutánea y aún más allá.

[00153] El término “matriz extracelular” como se usa en la presente se refiere a un material derivado de tejido o biosintético que es capaz de sostener el crecimiento de una célula o cultivo de células.

[00154] El término “deposición de matriz extracelular” como se usa en la presente se refiere a la secreción de elementos fibrosos (por ejemplo, colágeno, elastina, y reticulina), proteínas de conexión (por ejemplo, fibronectina, laminina), y moléculas de relleno de espacios (por ejemplo,

glicosaminoglicanos) por parte de las células.

[00155] El término “formulación” como se usa en la presente se refiere a una mezcla preparada de acuerdo a una fórmula, receta o procedimiento.

[00156] El término “granulación” como se usa en la presente se refiere a un proceso mediante el cual se forman prominencias pequeñas rojas similares a granos sobre una superficie plana durante el proceso de curación.

[00157] El término “inflamación granulomatosa” como se usa en la presente se refiere a una reacción inflamatoria que se caracteriza por una predominancia de macrófagos regulares a epitelioides con o sin células gigantes multinucleadas y tejido conectivo.

[00158] El término "hidrofílico" como se usa en la presente se refiere a un material o sustancia que tiene una afinidad por sustancias polares, tales como el agua. El término "lipofílico" como se usa en la presente se refiere a la acción de preferir o poseer una afinidad por un entorno no polar en comparación con un entorno polar o acuoso.

[00159] El término “herida con alta tensión” como se usa en la presente se refiere a una herida que ocurre en áreas de una articulación, o cercanas a las misma, incluyendo las áreas de los codos o las rodillas, o cercanas a las mismas. Otras áreas para una “herida con alta tensión” incluyen el pecho medio esternal y la herida posterior a una cesárea.

[00160] El término “valor de IC₅₀” como se usa en la presente se refiere a la concentración de un inhibidor que es necesaria para inhibir el 50% de un proceso biológico dado o del componente de un proceso (o sea, una enzima, célula, o receptor celular).

[00161] El término “en estrecha proximidad” como se usa en la presente se refiere a una distancia muy corta.

[00162] El término “herida por incisión” como se usa en la presente se refiere a una herida hecha mediante un corte definido, tal como con un instrumento filoso.

[00163] El término “inflamación” como se usa en la presente se refiere al proceso fisiológico mediante el cual los tejidos vascularizados responden ante el daño. Véase, por ejemplo, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, 4° Ed., William E. Paul, ed. Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia (1999) en las páginas 1051-1053, que se incorpora a la presente a modo de referencia. Durante el proceso inflamatorio, los mediadores inflamatorios solubles de la respuesta inflamatoria trabajan junto con los componentes celulares de una forma sistémica en un intento por contener y eliminar los agentes que causan el distrés físico. El término “mediadores inflamatorios” como se usa en la presente se refiere a los mediadores moleculares del proceso inflamatorio. Estas moléculas solubles difusibles actúan tanto en forma local en el sitio del daño tisular y la infección, como así también en sitios más distantes. Algunos mediadores inflamatorios se activan mediante el proceso inflamatorio, mientras que otros se sintetizan y/o se liberan a partir de las fuentes celulares en respuesta a la inflamación aguda o mediante otros mediadores inflamatorios solubles. Los ejemplos de mediadores inflamatorios de respuesta inflamatoria incluyen, a título enunciativo no taxativo, a proteasas plasmáticas, complemento, quininas, proteínas de coagulación y fibrinolíticas, mediadores lipídicos, prostaglandinas, leucotrienos, factor activador de plaquetas (PAF), péptidos y aminos, incluyendo, a título enunciativo no taxativo, a histamina,

serotonina, y neuropéptidos, citoquinas proinflamatorias, incluyendo, a título enunciativo no taxativo, a interleuquina-1, interleuquina-4, interleuquina-6, interleuquina-8, factor de necrosis tumoral (TNF), interferón-gamma, e interleuquina 12.

[00164] Los términos “inhibir”, “inhibe” o “inhibición” se usan en la presente para referirse a la reducción de la cantidad o la velocidad de un proceso, la detención total del proceso, o a la disminución, limitación, o bloqueo de la acción o la función del mismo. La inhibición puede incluir una reducción o una disminución de la cantidad, la velocidad, la función de la acción, o el proceso de una sustancia en por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%. Los términos “inhibir adicionalmente”, “inhibe adicionalmente” o “inhibición adicional” se usan en la presente para referirse a la reducción de la cantidad o velocidad de un segundo proceso, la detención completa del segundo proceso, o a la disminución, la limitación, o el bloqueo de la acción o la función del mismo, además de la reducción de la cantidad o de velocidad de un primer proceso, la detención completa del primer proceso, o la disminución, la limitación, o el bloqueo de la acción o la función del mismo. El término “perfil inhibitorio” como se usa en la presente se refiere al patrón característico de reducción de la cantidad o la velocidad, o la disminución, el bloqueo o la limitación de la acción de más de una proteína o enzima. Los términos “inhibir sustancialmente”, “inhibe sustancialmente”, “inhibió

sustancialmente”, o “inhibición sustancial” se usan aquí para referirse a la inhibición de la actividad quinasa en por lo menos 65%, en por lo menos 70%, en por lo menos 75%, en por lo menos 80%, en por lo menos 85%, en por lo menos 90%, en por lo menos 95%, en por lo menos 98% o en por lo menos 99%.

[00165] El término "daño," como se usa en la presente, se refiere al estropeo o perjuicio a una estructura o función del cuerpo causado por un agente o fuerza externa, que puede ser física o química.

[00166] El término “laceración” como se usa en la presente se refiere a una herida desgarrada e irregular o una herida por corte accidental.

[00167] El término “manifestación” como se usa en la presente se refiere a la exhibición o la presentación de signos o síntomas característicos de una enfermedad. Por lo tanto, el término “manifestación de la piel” como se usa en la presente se refiere a la exhibición o la presentación de signos o síntomas característicos de una enfermedad de la piel.

[00168] El término “vendaje mecanoactivo” como se usa en la presente se refiere a una cobertura médica o quirúrgica para una herida que se configura para fijarse en forma removible a una superficie de la piel cercana a una herida con el objetivo de aplicar una tensión a la herida.

[00169] El término “modular” como se usa en la presente significa regular, alterar, adaptar o ajustar a una cierta medida o proporción.

[00170] El término “neovascularización” como se usa en la presente se refiere a la neoformación de vasos sanguíneos con el resultado de que se mejora el suministro de oxígeno y nutrientes. De forma similar, el término “angiogénesis” se refiere al proceso de vascularización que involucra el

desarrollo de nuevos vasos sanguíneos capilares.

[00171] El término "vehículo farmacéuticamente aceptable " como se usa en la presente se refiere a uno o más rellenos, diluyentes o sustancias encapsulantes sólidas o líquidas compatibles, que es/son adecuadas para su administración a un humano u otro animal vertebrado. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de ser mezclados de una forma tal que no exista una interacción que impida sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

[00172] El término "sal farmacéuticamente aceptable" designa a aquellas sales que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuadas para usar en contacto con los tejidos de los humanos y animales inferiores sin toxicidad, irritación ni respuesta alérgica exageradas, y similares, y que son acordes con una proporción razonable de beneficio/riesgo. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero las sales farmacéuticamente no aceptables pueden usarse convenientemente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Dichas sales incluyen, a título enunciativo no taxativo a aquellas preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-tolueno sulfónico, tartárico, cítrico, metano sulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico, y benceno sulfónico. También, dichas sales se pueden preparar como sales de metales alcalinos o de metales alcalino térreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo de los ácidos carboxílicos. Mediante el término "sal farmacéuticamente aceptable" se designa a aquellas sales que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuadas para usar en contacto con los tejidos de humanos y

animales inferiores sin toxicidad, irritación ni respuesta alérgica exageradas, y similares, y que son acordes con una proporción razonable de beneficio/riesgo. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en el arte. Por ejemplo, P. H. Stahl, y col. describen sales farmacéuticamente aceptables en detalle en el "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" (Wiley VCH, Zúrich, Suiza: 2002). Las sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos que se describen en la presente invención o por separado mediante la reacción de una función de base libre con un ácido orgánico adecuado. Las sales de adición ácida representativas incluyen, a título enunciativo no taxativo a sales de acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, camforato, camforsulfonato, digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, iodhidrato, 2-hidroxietansulfonato(isetionato), lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, fosfato, glutamato, bicarbonato, p-toluenosulfonato y undecanoato. También, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferiores tales como cloruros, bromuros e ioduros de metilo, etilo, propilo, y butilo; sulfatos de dialquilo tales como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo; haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros e ioduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo; haluros de arilalquilo tales como bromuros de bencilo y fenetilo y otros. De esa manera se obtienen productos solubles o dispersables en agua o en aceite. Los ejemplos de ácidos que se pueden emplear para formar sales de adición ácida

farmacéuticamente aceptables incluyen a ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico y ácidos orgánicos tales como ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico y ácido cítrico. Las sales de adición básica se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos que se describen en la invención mediante la reacción de una unidad que contiene ácido carboxílico con una base adecuada tal como el hidróxido, el carbonato o el bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable o con amoníaco o una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, a título enunciativo no taxativo, a cationes basados en metales alcalinos o metales alcalino térreos tales como las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares, y cationes no tóxicos cuaternarios de amonio y amina que incluyen a amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina y similares. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición básica incluyen a etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, piperazina y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables también se pueden obtener usando procedimientos estándares bien conocidos en el arte, por ejemplo mediante la reacción de un compuesto lo suficientemente básico, tal como una amina, con un ácido adecuado para dar un anión fisiológicamente aceptable. También se pueden elaborar sales de ácidos carboxílicos de metales alcalinos (por ejemplo, de sodio, potasio o litio) o metales alcalino térreos (por ejemplo de calcio o magnesio).

[00173] El término "composición farmacéutica" como se usa en la presente se refiere a una composición (que designa a un producto que contiene

todos los ingredientes activos e inactivos) que se emplea para prevenir, reducir la intensidad, curar o tratar de alguna manera una condición o enfermedad objetivo.

[00174] El término "prevenir" como se usa en la presente se refiere a contener, obstaculizar o evitar que suceda, ocurra o que surja un evento, acto o acción.

[00175] El término "punción" como se usa en la presente se refiere a una herida en la que la abertura es relativamente pequeña en comparación con la profundidad, producida por un objeto puntiagudo angosto.

[00176] Los términos "reduce" o "reducir" o "redujo" o "para reducir" como se usan en la presente se refieren a una disminución, una mengua, una atenuación o supresión del grado, la intensidad, extensión, tamaño, cantidad, densidad o número. Por ejemplo, los términos "reduce" o "reducir" o "reducido" o "para reducir" como se usan en la presente se refieren a una disminución, una mengua, una atenuación o una supresión del grado, intensidad, extensión, tamaño, cantidad, densidad o número para un trastorno en los individuos que tienen el riesgo de desarrollar el trastorno.

[00177] El término "reepitelialización" como se usa en la presente se refiere a la formación de nuevo epitelio sobre una superficie desnuda (por ejemplo, una herida).

[00178] El término "liberación" y sus diferentes formas gramaticales, se refiere a la disolución de un componente farmacológico activo y la difusión de las especies disueltas o solubilizadas mediante una combinación de los siguientes procesos: (1) hidratación de una matriz, (2) difusión de una solución dentro de una matriz; (3) disolución del fármaco; y (4)

difusión del fármaco disuelto hacia afuera de la matriz.

[00179] El término “remodelar” como se usa en la presente se refiere al reemplazo y/o la desvascularización del tejido de granulación.

[00180] El término “andamiaje” como se usa en la presente se refiere a una sustancia o estructura usada para aumentar o promover el crecimiento de las células y/o la formación de un tejido. Un andamiaje típicamente es una estructura porosa tridimensional que provee un soporte para el crecimiento celular.

[00181] El término “similar” se usa como sinónimo de los términos análogo, comparable, o parecido, y significa que algo tiene rasgos o características en común.

[00182] Los términos “sujeto” o “individuo” o “paciente” se usan como sinónimos para referirse a un miembro de una especie animal de origen mamífero, incluyendo a título enunciativo no taxativo, a un ratón, una rata, un gato, una cabra, oveja, caballo, hámster, hurón, ornitorrinco, cerdo, un perro, un conejillo de las indias, un conejo y un primate, tal como, por ejemplo, un mono, simio, o humano.

[00183] La frase “sujeto en necesidad de dicho tratamiento” se usa para referirse a un paciente que ha sufrido o que ha de sufrir una herida que puede resultar en cicatrización cutánea a menos que el contexto y el uso de la frase indique otra cosa.

[00184] El término “sustancialmente puro”, como se usa en la presente, se refiere a una condición de un agente terapéutico tal que el mismo se ha separado sustancialmente de las sustancias con las que puede estar asociado en los sistemas vivos o durante su síntesis. De acuerdo a algunas

formas de realización, un agente terapéutico sustancialmente puro está por lo menos 70% puro, por lo menos 75% puro, por lo menos 80% puro, por lo menos 85% puro, por lo menos 90% puro, por lo menos 95% puro, por lo menos 96% puro, por lo menos 97% puro, por lo menos 98% puro, o por lo menos 99% puro.

[00185] El término “susceptible” como se usa en la presente se refiere a un miembro de una población en riesgo.

[00186] El término "síntoma" como se usa en la presente se refiere a un fenómeno que surge y que acompaña a una enfermedad o trastorno particular y que sirve como una indicación del mismo.

[00187] El término “síndrome,” como se usa en la presente, se refiere a un patrón de síntomas indicativos de alguna enfermedad o condición.

[00188] El término “unidad” como se usa en la presente se refiere a un grupo funcional de una molécula. El término “unidad de direccionamiento” como se usa en la presente se refiere a un grupo funcional unido a una molécula que direcciona la molécula hacia un blanco, tipo de célula o tejido específico.

[00189] El término "agente terapéutico" como se usa en la presente se refiere a un fármaco, molécula, ácido nucleico, proteína, composición u otra sustancia que provee un efecto terapéutico. El término "activo" como se usa en la presente se refiere al ingrediente, componente o constituyente de las composiciones de la presente invención que son responsables del efecto terapéutico pretendido. Los términos "agente terapéutico" y "agente activo" se usan como sinónimos. El término "componente terapéutico" como se usa en la presente se refiere a una dosificación terapéuticamente eficaz (o sea, dosis y

frecuencia de administración) que elimina, reduce o previene la progresión de una manifestación de enfermedad particular en un porcentaje de individuos de una población. Un ejemplo de un componente terapéutico comúnmente usado es la ED_{50} que describe la dosis de una dosificación particular que es terapéuticamente eficaz para una manifestación de enfermedad particular en el 50% de una población.

[00190] Los términos "cantidad terapéutica", "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad eficaz" de uno o más agentes activos representan a una cantidad que es suficiente para proveer el beneficio pretendido del tratamiento. Una cantidad eficaz de los agentes activos que se puede emplear está en el rango en general entre 0,1 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Sin embargo, los niveles de dosificación se basan en una variedad de factores, incluyendo el tipo de daño, la edad, el peso, el sexo, la condición médica del paciente, la severidad de la condición, la ruta de administración y el agente activo particular empleado. Por lo tanto el régimen de dosificación puede variar ampliamente, pero de rutina puede ser determinado por un cirujano usando métodos estándares.

[00191] El término "efecto terapéutico" como se usa en la presente se refiere a una consecuencia del tratamiento, cuyos resultados se juzgan como deseables y beneficiosos. Un efecto terapéutico puede incluir, directamente o indirectamente, la detención, la reducción o la eliminación de una manifestación de una enfermedad. Un efecto terapéutico también puede incluir, directamente o indirectamente, la detención, la reducción o la eliminación de la progresión de una manifestación de una enfermedad.

[00192] El término "tóxico" como se usa en la presente se refiere a

la administración de una composición en el punto de aplicación, o inmediatamente por debajo del mismo. La frase "aplicar tópicamente" describe la aplicación sobre una o más superficies incluyendo las superficies epiteliales. La aplicación tópica también puede involucrar el uso de administración transdérmica tal como con parches transdérmicos o dispositivos de iontoforesis que se preparan de acuerdo a técnicas y procedimientos bien conocidos en el arte. Los términos "sistema de administración transdérmico", "parche transdérmico" o "parche" se refieren a un sistema adhesivo que se coloca en la piel para administrar una dosis de uno o más fármacos liberados en el transcurso del tiempo mediante su pasaje desde la forma de dosificación a través de la piel para estar disponibles para su distribución mediante la circulación sistémica. Los parches transdérmicos son una tecnología bien conocida que se usa para administrar una amplia variedad de fármacos, incluyendo, a título enunciativo no taxativo, a escopolamina para cinetosis, nitroglicerina para el tratamiento de angina pectoris, clonidina para la hipertensión, estradiol para indicaciones postmenopáusicas, y nicotina para dejar de fumar. Los parches adecuados para usar en la presente invención incluyen, a título enunciativo no taxativo, a (1) el parche matriz; (2) el parche reservorio; (3) el parche adhesivo que contiene fármaco laminado; y (4) el parche adhesivo que contiene fármaco monolítico; TRANSDERMAL AND TOPICAL DRUG DELIVERY SYSTEMS, pp. 249-297 (Tapash K. Ghosh y col. eds., 1997), incorporada a la presente a modo de referencia en su totalidad. Estos parches en general están comercialmente disponibles.

[00193] El término "herida traumática" como se usa en la presente se refiere a una herida que es el resultado de un daño.

[00194] El término “tratar” o “tratamiento” incluye anular, inhibir sustancialmente, enlentecer o revertir la progresión de una enfermedad, condición, trastorno o daño, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una enfermedad, condición, trastorno o daño, prevenir sustancialmente la aparición de los síntomas clínicos o estéticos de una enfermedad, condición, trastorno o daño, y proteger contra síntomas molestos o fastidiosos. El término "tratar" o "tratamiento" como se usa en la presente además se refiere a cumplir con uno o más de los siguientes: (a) reducir la severidad de la enfermedad, la condición, el trastorno o el daño; (b) limitar el desarrollo de los síntomas característicos de la enfermedad, la condición, el trastorno o el daño que se está tratando; (c) limitar el empeoramiento de los síntomas característicos de la enfermedad, la condición, el trastorno o el daño que se está tratando; (d) limitar la recurrencia de la enfermedad, la condición, el trastorno o el daño en los pacientes que han tenido previamente la enfermedad, la condición, el trastorno o el daño; y (e) limitar la recurrencia de los síntomas en los pacientes que previamente fueron sintomáticos para la enfermedad, la condición, el trastorno o el daño.

[00195] El término “úlceras” como se usa en la presente se refiere a una lesión de la piel que se caracteriza por la formación de pus y necrosis (muerte del tejido circundante) usualmente como resultado de una inflamación o isquemia.

[00196] El término “herida” como se usa en la presente se refiere a la ruptura de la continuidad normal de las estructuras producida por una fuerza física (por ejemplo, mecánica), un medio biológico o químico. El término “herida” incluye, a título enunciativo no taxativo, a heridas por incisión, heridas

por escisión, heridas traumáticas, laceraciones, pinchazos, cortes, y similares. El término “tamaño de la herida” como se usa en la presente se refiere a una medida física de la interrupción de la continuidad normal de las estructuras producida por una fuerza física (por ejemplo, mecánica), un medio biológico o químico.

[00197] El término “herida de espesor total” como se usa en la presente se refiere a la destrucción del tejido que se extiende a través de la segunda capa de la piel (dermis) involucrando al tejido subcutáneo que está debajo y posiblemente al músculo y al hueso; el tejido puede aparecer de color blanco nevado, gris o marrón, con una textura firme tipo cuero.

[00198] El término “herida de espesor parcial” como se usa en la presente se refiere a la destrucción del tejido a través de la primera capa de la piel (epidermis), extendiéndose dentro de la dermis, pero no a través de la misma.

[00199] El término “vitamina” como se usa en la presente, se refiere a cualquiera de las diferentes sustancias orgánicas esenciales en cantidades mínimas para la nutrición de la mayor parte de los animales, y que actúan especialmente como coenzimas y precursores de coenzimas en la regulación de los procesos metabólicos. Los ejemplos no limitantes de vitaminas que se pueden usar en el contexto de la presente invención incluyen a la vitamina A y sus análogos y derivados: retinol, retinal, retinil palmitato, ácido retinoico, tretinoina, iso-tretinoina (conocidos colectivamente como retinoides), vitamina E (tocoferol y sus derivados), vitamina C (ácido L-ascórbico y sus ésteres y otros derivados), vitamina B₃ (niacinamida y sus derivados), alfa hidroxí ácidos (tales como ácido glicólico, ácido láctico, ácido

tartárico, ácido málico, ácido cítrico, etc.) y beta hidroxí ácidos (tales como ácido salicílico y similares).

[00200] El término “cerrado de la herida” como se usa en la presente se refiere a la cicatrización de una herida de manera que los bordes de la herida se vuelven a unir para formar una barrera continua.

[00201] El término “cicatrizaciones” como se usa en la presente se refiere a un proceso regenerativo con la inducción de un programa temporal y espacial de cicatrización, incluyendo, a título enunciativo no taxativo, a los procesos de inflamación, granulación, neovascularización, migración de fibroblastos, células endoteliales y epiteliales, deposición de matriz extracelular, reepitelialización, y remodelación.

Composiciones

[00202] De acuerdo a una forma de realización, la presente invención provee una composición farmacéutica que comprende partes iguales (1:1 v/v) de azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel.

[00203] El término “hidrogel” se refiere a un material polimérico dilatado con agua que da como resultado una estructura sólida, semisólida, pseudoplástica o plástica que contiene un componente acuoso necesario para producir una masa gelatinosa o similar a gelatina. En general, los hidrogeles comprenden una variedad de polímeros, incluyendo polímeros hidrofílicos, ácido acrílico, acrilamida y 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA). Los hidrogeles proveen equilibrio de humedad a un lecho de una herida mediante el balance de la hidratación con la absorción del exceso de fluido. Los ejemplos de hidrogeles incluyen, a título enunciativo no taxativo, a hidrogeles sintéticos, sensibles a estímulos, basados en polipéptidos, híbridos y basados en ADN.

[00204] Los hidrogeles sintéticos se pueden producir, por ejemplo, mediante la polimerización controlada de radicales, tales como la polimerización de radicales por transferencia atómica (ATRP), la polimerización por transferencia de fragmentación-adición reversible (RAFT), y la polimerización mediada por nitróxido; y por entrecruzamiento de cadenas. El entrecruzamiento de cadenas emplea agentes de entrecruzamiento deslizantes. Mediante el entrecruzamiento químico de dos moléculas de ciclodextrina, cada una enhebrada sobre una cadena diferente de polietilenglicol (PEG) (protegidas en los extremos con un grupo voluminoso, tal como adamantano), se produce un agente de entrecruzamiento deslizante de anillo doble. Estos agentes se caracterizan por un alto grado de dilatación en agua y una alta proporción de estiramiento sin fractura.

[00205] Los ejemplos no limitantes de hidrogeles sintéticos incluyen a los hidrogeles de redes dobles (DN) y nanocompuestos (rellenos con arcilla). Las redes dobles (DN) son un subgrupo de redes interpenetrantes (IPN) formadas por dos redes hidrofílicas, una altamente entrecruzada y la otra levemente entrecruzada. Por ejemplo, una DN compuesta por dos redes hidrofílicas mecánicamente débiles, poli(ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico) y poliacrilamida, provee un hidrogel con propiedades mecánicas que demuestran tanto dureza como resistencia.

[00206] Los hidrogeles nanocompuestos (rellenos con arcilla) son híbridos orgánicos-inorgánicos basados en *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm) con hectorita, $[\text{Mg}_{5,34}\text{Li}_{0,66}\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4]\text{Na}_{0,66}$, como entrecruzante multifuncional. Las plaquetas de arcilla exfoliada se dispersan de manera uniforme en un medio acuoso que contiene el monómero de NIPAAm; las cadenas de

poliNIPAAm se injertan sobre la superficie de la arcilla mediante uno o dos extremos.

[00207] Los hidrogeles sensibles a los estímulos sufren cambios continuos o discontinuos de dilatación que están mediados por estímulos externos tales como los cambios de pH, temperatura, fuerza iónica, tipo de solvente, campos eléctricos y magnéticos, luz, y la presencia de especies quelantes. La mayoría de los hidrogeles que responden a los estímulos se crean usando métodos convencionales (tradicionales) de síntesis de un número relativamente pequeño de polímeros sintéticos, en especial derivados de (met)acrilato y sus copolímeros. Los hidrogeles sensibles a los estímulos también pueden estar basados en polipéptidos. Estos incluyen, a título enunciativo no taxativo, a hidrogeles formados a partir de segmentos en bloque de copolipéptidos recombinantes de proteínas estructurales naturales tales como la elastina y la seda, bloques con repeticiones en tándem similares a seda y similares a elastina, y copolímeros recombinantes de tribloques de una secuencia polipeptídica al azar flanqueada por dos bloques de bobina enrollada. Los segmentos peptídicos y/o proteicos se han usado para introducir capacidad de degradación, transición de fase inducida por temperatura, y sensibilidad a la presencia de moléculas biológicamente activas dentro de la estructura del hidrogel. Los polímeros sintéticos solubles en agua se han entrecruzado con moléculas biológicas, tales como oligopéptidos, oligodesoxirribonucleótidos, oligómeros estereoespecíficos de ácido D,L-láctico, mediante la unión antígeno y anticuerpo, o mediante proteínas nativas intactas.

[00208] Los hidrogeles se pueden autoensamblar a partir de

copolímeros de bloques e injertados inducidos por interacciones hidrofóbicas, por ejemplo de bloques de A en copolímeros de tribloques de ABA que contienen un bloque hidrofílico de B protegido con bloques (cortos) hidrofóbicos de A. El diseño de copolímeros formadores de hidrogeles usando motivos de reconocimiento que se hallan en la naturaleza, tales como bobinas enrolladas, aumenta el potencial de formación de estructuras tridimensionales definidas en forma precisa. La bobina enrollada, un súper enrollamiento formado por dos o más hebras de hélices α , es un ejemplo de un hidrogel autoensamblado a partir de copolímeros de bloques e injertados. La secuencia primaria de una bobina enrollada típica está compuesta por repeticiones de 7 residuos, designadas como heptads. Los residuos de aminoácido en una heptad se designan convencionalmente como “a, b, c, d, e, f, g”. Los residuos hidrofóbicos de las posiciones “a” y “d” forman un núcleo hidrofóbico entre las hélices, proporcionando una interfaz de estabilización entre las hélices. Los residuos cargados de las posiciones “e” y “g” forman interacciones electrostáticas que contribuyen a la estabilidad de la bobina enrollada y mediante la asociación específica entre las hélices.

[00209] Los copolímeros de bloques de ABA, en donde el bloque A es un péptido que forma una bobina enrollada y el bloque B es una bobina al azar, también se autoensamblan formando hidrogeles. El autoensamblaje ocurre como un equilibrio entre la oligomerización de los extremos helicoidales y la dilatación del segmento central de polielectrolito soluble en agua. Se pueden conseguir sensibilidades a la temperatura y/o al pH mediante la manipulación de la secuencia de aminoácidos de los dominios de bobina enrollada. Modificaciones menores en su estructura tienen un fuerte impacto

sobre la sensibilidad de los hidrogeles autoensamblados a los estímulos. Por ejemplo, se puede manipular la estabilidad térmica de las proteínas que contienen bobinas enrolladas de una forma predecible mediante la sustitución de los aminoácidos del dominio de bobina enrollada.

[00210] Los hidrogeles híbridos son sistemas de hidrogel que poseen componentes de por lo menos dos clases distintas de moléculas, por ejemplo, polímeros sintéticos y macromoléculas biológicas, interconectadas ya sea en forma covalente o bien no covalente. En comparación con los polímeros sintéticos, las proteínas y los módulos proteicos tienen estructuras bien definidas y homogéneas, propiedades mecánicas consistentes, y transiciones cooperativas de plegado/desplegado. El dominio peptídico puede imponer un nivel de control sobre la formación de la estructura a nivel nanométrico; la parte sintética puede contribuir a la biocompatibilidad del material híbrido.

[00211] La síntesis de hidrogeles híbridos puede implicar, por ejemplo, la unión no covalente de motivos proteicos de bobina enrollada genéticamente modificados con un esqueleto de copolímero de N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA) hidrofílica sintética. El entrecruzamiento físico se establece por autoensamblaje de los dominios de bobina enrollada. Un colapso del hidrogel inducido por temperatura corresponde a la transición estructural de los dominios de bobina enrollada de una hélice alargada a un estado desplegado. Los hidrogeles que se forman mediante entrecruzamiento de precursores de copolímero de HPMA con módulos de bobina enrollada sufren grandes transiciones volumétricas (una disminución de la dilatación de hasta 10 veces) a la temperatura de fusión de los módulos de bobina enrollada.

[00212] Los copolímeros de injerto también se autoensamblan a

hidrogeles híbridos. Este sistema de hidrogel híbrido se basa en copolímeros de HPMA que consisten en un esqueleto polimérico hidrofílico y un par de injertos peptídicos cargados en forma opuesta. Dos péptidos diferentes de pentaheptad crean un motivo de dimerización y sirven como entrecruzadores físicos.

[00213] El autoensamblaje de los hidrogeles también puede estar mediado por el reconocimiento de ADN. Se han usado secuencias de ADN como motivos de bioreconocimiento en el diseño de biomateriales. Por ejemplo, el bioreconocimiento de oligonucleótidos complementarios injertados en un esqueleto polimérico hidrofílico media el autoensamblaje de copolímeros injertados a hidrogeles. En otro diseño, los hidrogeles se pueden sintetizar por copolimerización de acrilamida con ADNhs (de hebra simple) modificados con 5',3'-diaminoalquilo dimetacrililado como agentes de entrecruzamiento. Se pueden usar motivos de ADN para ensamblar nanopartículas a materiales macroscópicos, y dendrímeros a hidrogeles. Se puede usar un proceso catalizado por enzima para mediar la formación del hidrogel. Por ejemplo, se hibridizan moléculas ramificadas de ADN que contienen extremos cohesivos complementarios con secuencias palindrómicas, seguido por una ligación catalizada con T4 ADN ligasa. El ADN también puede imponer cambios en la estructura supramolecular de los copolímeros híbridos. Por ejemplo, un copolímero de dibloques, ADNhs-*b*-óxido de polipropileno, forma micelas esféricas en soluciones acuosas. Usando un reconocimiento molecular mediado por moldes de ADN largos, estas micelas se pueden transformar a varillas anfifílicas.

[00214] De acuerdo a una forma de realización, el hidrogel

comprende agua purificada, glicerol, hidroxil etil celulosa, lactato de sodio y gel de aloe vera. De acuerdo a algunas formas de realización, el hidrogel comprende agua purificada, glicerol, hidroxil etil celulosa, lactato de sodio y alantoína. Los usos de la alantoína incluyen, a título enunciativo no taxativo, su papel como protector de la piel, como anti irritante, para incrementar el contenido de agua de la matriz extracelular, para promover la replicación celular, para promover las cicatrizaciones, para promover la cicatrización y para promover la curación de quemaduras. De acuerdo a algunas formas de realización, el agua purificada es aproximadamente el 70% del hidrogel. De acuerdo a algunas formas de realización, el glicerol es aproximadamente el 30% del hidrogel.

[00215] De acuerdo a una forma de realización, la composición farmacéutica se puede administrar por vía tópica. Las formas tópicas de la composición farmacéutica pueden incluir, a título enunciativo no taxativo, a lociones, ungüentos, pomadas, geles, polvos en pasta y cremas. La composición farmacéutica se puede aplicar por vertido, por goteo, o por rociado, si es un líquido; por frotado, si es un ungüento, una loción, una crema, un gel, o similares; por espolvoreo, si es un polvo; por rociado, si es una composición líquida o en aerosol; o mediante cualquier otro medio apropiado. La administración tópica en general provee un efecto local más que un efecto sistémico.

[00216] De acuerdo a otra forma de realización, la administración es por medio de un vendaje que comprende la composición farmacéutica. De acuerdo a otra forma de realización, se impregna por lo menos una superficie del vendaje con la composición farmacéutica. De acuerdo a otra forma de

realización, se recubre por lo menos una superficie del vendaje con la composición farmacéutica. De acuerdo a otra forma de realización, el vendaje se selecciona del grupo que consiste en un vendaje con gasa, un vendaje de tul, un vendaje de alginato, un vendaje de poliuretano, un vendaje de espuma de silicona, un vendaje con andamiaje de polímero sintético, un vendaje de almohadilla no adherente y una combinación de los mismos. De acuerdo a otra forma de realización, el vendaje es un vendaje oclusivo que se selecciona del grupo que consiste en un vendaje de película, un vendaje de película semipermeable, un vendaje de hidrogel, un vendaje de hidrocoloide, y una combinación de los mismos. De acuerdo a otra forma de realización, la administración es por medio de un sustituto dérmico, en donde la composición farmacéutica se embebe en un sustituto dérmico que provee un andamiaje tridimensional. De acuerdo a otra forma de realización, el sustituto dérmico se elabora a partir de un material biológico natural, un material biológico de construcción, o un material sintético. De acuerdo a otra forma de realización, el material biológico natural comprende piel cadavérica humana, piel cadavérica de porcino, o submucosa de intestino delgado de porcino. De acuerdo a otra forma de realización, el material biológico natural comprende una matriz. De acuerdo a otra forma de realización, el material biológico natural consiste esencialmente en una matriz que está suficientemente desprovista de remanentes celulares. De acuerdo a otra forma de realización, el material biológico de construcción comprende colágeno, glicosaminoglicano, fibronectina, ácido hialurónico, elastina, o una combinación de los mismos. De acuerdo a otra forma de realización, el material biológico de construcción es una bicapa de soporte no celular de regeneración dérmica o una capa

individual de soporte celular de regeneración dérmica. De acuerdo a otra forma de realización, el sustituto dérmico sintético comprende un hidrogel. De acuerdo a otra forma de realización, el sustituto dérmico sintético además comprende un péptido RGD con la secuencia de aminoácidos Arginina-Glicina-Aspartato.

[00217] Los vendajes con gasa se pueden adherir a la superficie de la herida y desorganizan el lecho de la herida cuando se quitan. Como resultado, los vendajes con gasa se usan en general en heridas menores o como vendajes secundarios.

[00218] Los vendajes de tul no se adhieren a las superficies de la herida. Los mismos son apropiados para usar en heridas planas superficiales, y son útiles en pacientes con piel sensible. Los ejemplos de vendajes de tul incluyen, a título enunciativo no taxativo, a Jelonet® y Paranet®.

[00219] Los vendajes de alginato están compuestos de alginato de calcio (un componente de las algas marinas). Cuando se pone en contacto con una herida, el calcio del vendaje se intercambia con el sodio del fluido de la herida y esto transforma al vendaje en un gel que mantiene la zona de la herida húmeda. Estos vendajes son buenos para heridas exudantes y ayudan al desbridamiento de las heridas con desprendimiento. En general, los vendajes de alginato no se usan sobre heridas con poca exudación ya que esto provocará sequedad y formación de costras. Los vendajes de alginato se cambian en forma diaria. Los ejemplos de vendajes de alginato incluyen, a título enunciativo no taxativo, a Kaltostat® y Sorbsan®.

[00220] Los vendajes de espuma de poliuretano o silicona se diseñan para absorber grandes cantidades de exudados. Los mismos

mantienen un entorno de herida húmedo pero no son tan útiles como los alginatos o los hidrocoloides para el desbridamiento. En general, no se usan sobre heridas con poca exudación debido a que esto ha de producir sequedad y formación de costras. Los ejemplos de vendajes de espuma de poliuretano o silicona incluyen, a título enunciativo no taxativo, a Allevyn® y Lyofoam®.

[00221] Los vendajes de colágeno en general se proveen en la forma de almohadillas, geles o partículas. Los mismos promueven el depósito del colágeno recién formado en el lecho de la herida, y absorben el exudado y proveen un entorno húmedo.

[00222] Los vendajes de almohadillas no adherentes son adecuados para usar en las heridas levemente exudantes, las heridas agudas y los desgarros de la piel. Los mismos proveen una protección de la herida para cualquier herida con exudado leve sin adherirse a la superficie de la herida. Los ejemplos de vendajes de almohadilla no adherentes incluyen, a título enunciativo no taxativo, a Telfa™ Pads y Telfa™ Island Dressing.

[00223] Otros vendajes adecuados incluyen a los vendajes oclusivos. El término “vendaje oclusivo” como se usa en la presente se refiere a un vendaje que evita la entrada de aire y bacterias a la herida o lesión y que retiene la humedad, el calor, los fluidos corporales y la medicación. Los vendajes tradicionales tales como las almohadillas de gasa y Telfa™ (almohadillas no adhesivas) promueven la desecación de la superficie de la herida y también se adhieren a la misma. Cuando se usan para tratar heridas graves (por ejemplo, úlceras), la remoción del vendaje quita el epitelio recién formado, produciendo sangrado y una prolongación del proceso de cicatrización. Debido a que la herida está seca y quebradiza, con frecuencia su

movimiento es doloroso y tiende a evitarse. A través de algunos estudios se ha demostrado que los vendajes oclusivos evitan la desecación y la formación de escaras mediante el atrapamiento de la humedad junto al lecho de la herida. De acuerdo a algunas de dichas formas de realización, los vendajes oclusivos son vendajes totalmente oclusivos. De acuerdo a algunas otras formas de realización, los vendajes oclusivos son vendajes semi permeables. Los ejemplos de vendajes oclusivos para el propósito de la invención incluyen, a título enunciativo no taxativo, a vendajes de película (vendajes totalmente oclusivos), vendajes de película semipermeables, vendajes de hidrogel, vendajes de hidrocoloide, o una combinación de los mismos.

[00224] Los vendajes de película y los vendajes de película semipermeables comprenden hojas de materiales que se pueden usar para cubrir las heridas. Dichos vendajes pueden comprender materiales estériles. Los materiales adecuados, a partir de los que se pueden elaborar dichas películas, incluyen a poliuretano y quitina. Los vendajes de película (o vendajes de película semipermeables) se pueden recubrir con adhesivos, tales como adhesivos acrílicos, con el objetivo de ayudar a su retención en los sitios en donde se requieren. Los vendajes de este tipo pueden ser transparentes, y por lo tanto permiten monitorear el progreso de las cicatrificaciones. Estos vendajes en general son adecuados para heridas superficiales con poco exudado. Los ejemplos de vendajes de película o de película semipermeable incluyen, a título enunciativo no taxativo, a OpSite® y Tegaderm®

[00225] Los vendajes de hidrogel están compuestos principalmente por agua en una red compleja de fibras que mantienen al gel polimérico intacto. El agua se libera para mantener la humedad de la herida. Estos vendajes se

pueden usar para lechos de herida necróticos o con tejido muerto para rehidratar y eliminar el tejido muerto. Los mismos no se usan para heridas con exudados moderados a abundantes. Los ejemplos de vendajes de hidrogel incluyen, a título enunciativo no taxativo, a Tegagel®, Intrasite®.

[00226] Los vendajes de hidrocoloides están compuestos por partículas hidrofílicas, tales como gelatina y pectina, conectadas con una matriz adhesiva hidrofóbica, y están cubiertos por una película externa o capa de espuma. Cuando se aplican los hidrocoloides a una herida, se absorbe todo el exudado en el área de contacto de la herida para formar un gel dilatado que rellena la herida y provee un gradiente de absorción controlado para el resto del vendaje. Esto crea un entorno cálido y húmedo que promueve el desbridamiento y la cicatrización. Dependiendo del vendaje de hidrocoloide que se elija, estos pueden ser adecuados para usar en heridas con exudado leve a abundante, heridas con desprendimiento o granulación. Los vendajes de este tipo están disponibles en muchas formas (almohadillas adhesivas o no adhesivas, pasta, polvo) pero más comúnmente como almohadillas autoadhesivas. Los ejemplos de vendajes de hidrocoloide incluyen, a título enunciativo no taxativo, a DuoDERM® y Tegasorb®.

[00227] Un vendaje para cicatrización adecuado para usar en una herida particular se puede seleccionar teniendo en cuenta el tipo de herida, el tamaño de la herida, y el progreso de la cicatrización de la herida.

[00228] De acuerdo a algunas formas de realización, el vendaje comprende una almohadilla oclusiva y una no adherente. Las almohadillas no adherentes incluyen, a título enunciativo no taxativo, a Telfa™ pads.

[00229] La administración tópica también puede involucrar el uso

de una administración transdérmica tal como mediante parches transdérmicos o dispositivos de iontoforesis que se preparan de acuerdo a técnicas y procedimientos bien conocidos en el arte. Los términos “sistema de administración transdérmico”, “parche transdérmico” o “parche” se refieren a un sistema adhesivo que se coloca sobre la piel para administrar una dosis de liberación en el tiempo de uno o más fármacos mediante su pasaje desde la forma de dosificación a través de la piel para estar disponibles para su distribución a través de la circulación sistémica. Los parches transdérmicos son una tecnología bien aceptada que se usa para administrar una amplia variedad de fármacos, incluyendo, a título enunciativo no taxativo, a escopolamina para cinetosis, nitroglicerina para el tratamiento de angina pectoris, clonidina para la hipertensión, estradiol para indicaciones postmenopáusicas, y nicotina para dejar de fumar. Los parches adecuados para usar en la presente invención incluyen, a título enunciativo no taxativo, a (1) el parche de matriz; (2) el parche reservorio; (3) el parche adhesivo que contienen fármaco multilaminado; y (4) el parche adhesivo que contiene fármaco monolítico; TRANSDERMAL AND TOPICAL DRUG DELIVERY SYSTEMS, pp. 249-297 (Tapash K. Ghosh y col. eds., 1997), incorporada a la presente a modo de referencia en su totalidad. Estos parches son bien conocidos en el arte y en general están comercialmente disponibles.

[00230] De acuerdo a una forma de realización, la composición farmacéutica de la presente invención comprende un vehículo. El vehículo pueden incluir, a título enunciativo no taxativo, un agente de liberación tal como un vehículo de liberación sostenida o de liberación retrasada. De acuerdo a dichas formas de realización, el vehículo puede ser cualquier material que sea

capaz de liberar en forma sostenida o retrasada la azúcar granulada y el hidrogel para proveer una administración del polipéptido más eficaz, por ejemplo, resultando en una dosificación del polipéptido menos frecuente y/o de menor proporción, mejorando la facilidad de manipulación y extendiendo o retrasando los efectos sobre las enfermedades, trastornos, condiciones, síndromes, y similares. Los ejemplos no limitantes de dichos vehículos incluyen a liposomas, microesponjas, microesferas, o microcápsulas de polímeros naturales y sintéticos, y similares. Los liposomas pueden estar formados por una variedad de fosfolípidos, incluyendo, a título enunciativo no taxativo, a colesterol, estearilaminas o fosfatidilcolinas.

Métodos para Tratar Heridas Crónicas No Cicatrizantes

[00231] De acuerdo a algunas formas de realización, la composición farmacéutica es eficaz para tratar heridas crónicas no cicatrizantes. Los ejemplos no limitantes de heridas crónicas no cicatrizantes incluyen heridas diabéticas, heridas venosas, heridas quirúrgicas, heridas de cáncer, úlceras por presión, úlceras arteriales y similares. Las heridas diabéticas incluyen, a título enunciativo no taxativo, a úlceras por pie diabético.

[00232] De acuerdo a algunas formas de realización, la presente invención provee un método para tratar una herida crónica no cicatrizante en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel, en donde la composición farmacéutica es eficaz para reducir la herida y el edema tisular en la herida crónica no cicatrizante.

[00233] De acuerdo a algunas formas de realización, la presente invención provee un método para tratar una herida crónica no cicatrizante en

un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel, en donde la composición farmacéutica es eficaz para reducir el tejido necrótico.

[00234] De acuerdo a algunas formas de realización, la presente invención provee un método para tratar una herida crónica no cicatrizante en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel, en donde la composición farmacéutica es eficaz para matar microorganismos en la herida crónica no cicatrizante. De acuerdo a algunas formas de realización, la composición farmacéutica es eficaz para matar microorganismos sin riesgo de una resistencia bacteriana.

[00235] De acuerdo a algunas formas de realización, la presente invención provee un método para tratar una herida crónica no cicatrizante en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel, en donde la composición farmacéutica es eficaz para acelerar la cicatrización en la herida crónica no cicatrizante.

[00236] De acuerdo a algunas formas de realización, la presente invención provee un método para tratar una herida crónica no cicatrizante en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel, en donde la composición farmacéutica es eficaz para incrementar la síntesis de colágeno y la neovascularización en la herida crónica no cicatrizante.

[00237] De acuerdo a algunas formas de realización, la presente invención provee un método para tratar una herida crónica no cicatrizante en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel, en donde la composición farmacéutica es eficaz para eliminar la fibrina, la suciedad y la biopelícula de la herida crónica no cicatrizante.

[00238] De acuerdo a algunas formas de realización, la presente invención provee un método para tratar una herida crónica no cicatrizante en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel, en donde la composición farmacéutica es eficaz para incrementar el tejido de granulación en la herida crónica no cicatrizante.

[00239] De acuerdo a algunas formas de realización, la presente invención provee un método para tratar una herida crónica no cicatrizante en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel, en donde la composición farmacéutica es eficaz para acelerar la epitelialización en la herida crónica no cicatrizante.

[00240] De acuerdo a algunas formas de realización, la presente invención provee un método para tratar una herida crónica no cicatrizante en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel, en donde la composición farmacéutica es eficaz para drenar la herida crónica no cicatrizante.

[00241] De acuerdo a algunas formas de realización, la presente

invención provee un método para tratar una herida crónica no cicatrizante en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel, en donde la composición farmacéutica es eficaz para llevar el fluido inflamatorio hacia afuera de la herida crónica no cicatrizante.

[00242] De acuerdo a algunas formas de realización, la presente invención provee un método para tratar una herida crónica no cicatrizante en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel, en donde la composición farmacéutica es eficaz para reducir el dolor en la herida crónica no cicatrizante.

[00243] Sin estar limitados por la teoría, las propiedades osmóticas de la azúcar granulada de las composiciones farmacéuticas son eficaces para eliminar el exceso de fluidos del tejido y de los cuerpos celulares de microorganismos. Esto reduce el edema de la herida y del tejido, y además deshidrata y mata a los microorganismos. Debido a que los microorganismos mueren a través de un medio físico en lugar de un medio químico, existe un menor riesgo de resistencia bacteriana a la composición farmacéutica. La propiedad osmótica de la azúcar granulada también es eficaz para drenar el fluido de la inflamación crónica con exceso de quimoquinas peligrosas y destructivas hacia afuera de la herida, evitando de esa forma la destrucción del tejido de granulación en cicatrización y permitiendo que las células de la herida formen un tejido de granulación saludable. La propiedad osmótica del azúcar también es eficaz para promover un desbridamiento suave y la eliminación de desechos y tejido necrótico e hipergranulación y para reducir el dolor de una

herida crónica no cicatrizante. La herida y el edema circundante son el resultado del aumento de la inflamación, las quimoquinas y la carga bacteriana que se observa en las heridas crónicas, y esta es la razón para el dolor asociado con las heridas crónicas. Mediante el drenaje del agua hacia afuera de la herida por osmosis, la azúcar granulada disminuye el edema y por lo tanto reduce el dolor inflamatorio relacionado con la herida.

[00244] De acuerdo a algunas formas de realización, la presente invención provee un método para tratar una herida crónica no cicatrizante en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel, en donde la composición farmacéutica es eficaz para controlar la infección del lecho de la herida en la herida crónica no cicatrizante.

[00245] La preparación de lecho de herida involucra procesos que cambian el entorno bioquímico, celular y molecular de una herida crónica no cicatrizante a una herida aguda con cicatrización. Como se muestra en la Tabla 2, la composición farmacéutica de la presente invención consigue el espectro completo de preparación de lechos de herida, en oposición a otros productos para la cicatrización de heridas.

Tabla 2. Procesos para la preparación de lecho de herida: la composición farmacéutica en comparación con otros productos comúnmente usados para el cuidado de las heridas.

	Designación de Procesos de Preparación de Lecho de Herida Enumerados en la Tabla 1											
Productos para el Cuidado de Heridas	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	

	Designación de Procesos de Preparación de Lecho de Herida Enumerados en la Tabla 1										
Productos para el Cuidado de Heridas	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Formulación Farmacéutica (azúcar granulada + biomaterial de hidrogel)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Biomaterial de hidrogel							x				
Crema a base de colagenasa (Santyl®)				x	x					x	
Vendajes y geles a base de miel	x	x	x		x	x	x	x	x	x	
Geles Iodosorb® y similares	x	x	x	x			x	x	x		
Silvadene®		x	x								
Crema/ungüento antibiótico	x					x					
Geles con factores de crecimiento (Regranex®)					x					x	
Vendaje de hidrocoloide											
Vendaje de hidrofibras						x		x			
Vendaje de espuma						x		x			
Vendaje basado en petróleo											
Vendajes biológicos con factores de crecimiento					x					x	

	Designación de Procesos de Preparación de Lecho de Herida Enumerados en la Tabla 1										
Productos para el Cuidado de Heridas	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Vendajes con colágeno					x					x	
Sustitutos de piel					x			x		x	

[00246] De acuerdo a algunas formas de realización, la presente invención provee un método para tratar una herida crónica no cicatrizante en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel, en donde la composición farmacéutica es eficaz para incrementar el porcentaje promedio de cerrado de la herida en comparación con un control.

[00247] De acuerdo a algunas formas de realización, el porcentaje promedio de cerrado de la herida está en el rango entre aproximadamente 50% y aproximadamente 100% mayor en comparación con un control. De acuerdo a algunas formas de realización, el porcentaje promedio de cerrado de la herida mediante la composición farmacéutica es aproximadamente 50% mayor en comparación con un control. De acuerdo a algunas formas de realización, el porcentaje promedio de cerrado de la herida mediante la composición farmacéutica es aproximadamente 60% mayor en comparación con un control. De acuerdo a algunas formas de realización, el porcentaje promedio de cerrado de la herida mediante la composición farmacéutica es aproximadamente 70% mayor en comparación con un control. De acuerdo a algunas formas de realización, el porcentaje promedio de cerrado de la herida mediante la

composición farmacéutica es aproximadamente 75% mayor en comparación con un control. De acuerdo a algunas formas de realización, el porcentaje promedio de cerrado de la herida mediante la composición farmacéutica es aproximadamente 80% mayor en comparación con un control. De acuerdo a algunas formas de realización, el porcentaje promedio de cerrado de la herida mediante la composición farmacéutica es aproximadamente 85% mayor en comparación con un control. De acuerdo a algunas formas de realización, el porcentaje promedio de cerrado de la herida mediante la composición farmacéutica es aproximadamente 90% mayor en comparación con un control. De acuerdo a algunas formas de realización, el porcentaje promedio de cerrado de la herida mediante la composición farmacéutica es aproximadamente 95% mayor en comparación con un control. De acuerdo a algunas formas de realización, el porcentaje promedio de cerrado de la herida mediante la composición farmacéutica es aproximadamente 99% mayor en comparación con un control. De acuerdo a algunas formas de realización, el porcentaje promedio de cerrado de la herida mediante la composición farmacéutica es aproximadamente 100% mayor en comparación con un control.

[00248] De acuerdo a algunas formas de realización, el porcentaje promedio de cerrado de la herida se puede medir como el cambio porcentual promedio del área de la herida. De acuerdo a algunas formas de realización, el porcentaje promedio de cerrado de la herida es el cambio porcentual promedio del volumen de la herida. De acuerdo a algunas formas de realización, el porcentaje promedio de cerrado de la herida es una combinación del cambio porcentual promedio del área de la herida y el cambio porcentual promedio del volumen de la herida.

[00249] De acuerdo a algunas formas de realización, el cerrado de la herida se puede medir como una disminución del área de la herida. De acuerdo a algunas formas de realización, el cerrado de la herida es una disminución del volumen de la herida. De acuerdo a algunas formas de realización, el cerrado de la herida es una combinación de una disminución del área de la herida y una disminución del volumen de la herida.

[00250] De acuerdo a algunas formas de realización, el porcentaje de cambio del área de la herida y/o el porcentaje de cambio del volumen de la herida se pueden determinar mediante el uso de un sistema de cámara de 3 dimensiones tal como el sistema ARANZ Silhouette Camera de ARANZ Medical. El sistema ARANZ Silhouette Camera es un sistema de medida en 3D, adquisición de imágenes y documentación que provee una medida precisa y una tendencia de la cicatrización junto con un soporte integral para el monitoreo de heridas. El sistema ARANZ Silhouette Camera está compuesto por tres partes principales – un dispositivo de adquisición de imágenes en el punto de interés, un programa de computación inteligente y una base de datos de información acerca de heridas. La cámara especializada captura la imagen de la herida. La cámara tiene configuraciones no ajustables por el usuario – la cámara tiene su propia fuente de luz; líneas de laser que posicionan la cámara para focalización y composición óptimas; y hay solamente una parte móvil – el botón para capturar la imagen de la herida. El programa de computación crea un modelo en 3D de la herida en base a los datos adquiridos por la cámara, obtiene las medidas a partir del modelo, y registra los datos estandarizados. La base de datos con información es una base de datos segura accesible por Internet que almacena y concentra la información obtenida a partir de la

cámara y el programa de computación. Las medidas obtenidas con el sistema ARANZ Silhouette Camera probablemente están dentro de aproximadamente 2% para el área, 1% para el perímetro, 5% para la profundidad promedio y 5% para el volumen (95% de intervalo de confianza). La variabilidad inter e intraevaluador es <1% para el área y el perímetro, y <2% para la profundidad promedio y el volumen. Esto indica que las medidas repetidas a lo largo del tiempo – incluso mediante diferentes usuarios – detectarán pequeñas diferencias a medida que la herida cambia de tamaño y dimensiones y las tendencias de cicatrización que se presentan serán estadísticamente significativas y clínicamente útiles.

[00251] De acuerdo a algunas formas de realización, el control es con un biomaterial de hidrogel.

[00252] De acuerdo a algunas formas de realización, la presente invención provee un método para tratar una herida crónica no cicatrizante en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel, en donde la composición farmacéutica es eficaz para cicatrizar la herida crónica no cicatrizante.

[00253] De acuerdo a algunas formas de realización, la composición farmacéutica es eficaz para cicatrizar aproximadamente el 50% de las heridas crónicas no cicatrizantes. De acuerdo a algunas formas de realización, la composición farmacéutica es eficaz para cicatrizar aproximadamente el 60% de las heridas crónicas no cicatrizantes. De acuerdo a algunas formas de realización, la composición farmacéutica es eficaz para cicatrizar aproximadamente el 70% de las heridas crónicas no cicatrizantes. De

acuerdo a algunas formas de realización, la composición farmacéutica es eficaz para cicatrizar aproximadamente el 75% de las heridas crónicas no cicatrizantes. De acuerdo a algunas formas de realización, la composición farmacéutica es eficaz para cicatrizar aproximadamente el 80% de las heridas crónicas no cicatrizantes. De acuerdo a algunas formas de realización, la composición farmacéutica es eficaz para cicatrizar aproximadamente el 90% de las heridas crónicas no cicatrizantes. De acuerdo a algunas formas de realización, la composición farmacéutica es eficaz para cicatrizar aproximadamente el 95% de las heridas crónicas no cicatrizantes. De acuerdo a algunas formas de realización, la composición farmacéutica es eficaz para cicatrizar aproximadamente el 99% de las heridas crónicas no cicatrizantes. De acuerdo a algunas formas de realización, la composición farmacéutica es eficaz para cicatrizar aproximadamente el 100% de las heridas crónicas no cicatrizantes.

Terapia de Combinación

[00254] De acuerdo a algunas formas de realización, la composición farmacéutica además comprende por lo menos un agente terapéutico adicional.

[00255] De acuerdo a algunas formas de realización, el agente terapéutico adicional es un agente antiinflamatorio.

[00256] De acuerdo a algunas formas de realización, el agente antiinflamatorio es un agente antiinflamatorio esteroideo. El término “agente antiinflamatorio esteroideo”, como se usa en la presente, se refiere a cualquiera de los numerosos compuestos que contienen un sistema de 4 anillos con 17 carbonos e incluye a los esteroides, diversas hormonas (como los esteroides

anabólicos), y glicósidos. Los ejemplos representativos de fármacos antiinflamatorios no esteroideos incluyen, a título enunciativo no taxativo, a corticosteroides tales como hidrocortisona, hidroxiltriamicinolona, alfa-metil dexametasona, dexametasona-fosfato, beclometasona dipropionatos, clobetasol valerato, desonide, desoximetasona, desoxicorticosterona acetato, dexametasona, diclorisona, diflucortolona valerato, fluadrenolona, flucolorolona acetona, flumetasona pivalato, fluosinolona acetona, fluocinonida, ésteres de butilo de flucortina, fluocortolona, flupredniden (fluprednilideno) acetato, flurandrenolona, halcinonida, hidrocortisona acetato, hidrocortisona butirato, metilprednisolona, triamicinolona acetona, cortisona, cortodoxona, flucetona, fludrocortisona, difluorona diacetato, fluradrenolona, fludrocortisona, difluorona diacetato, fluradrenolona acetona, medrisona, amcinafel, amcinafida, betametasona y completando con sus ésteres, clorprednisona, clorprednisona acetato, clocortelona, clescinolona, diclorisona, diflurprednato, flucoloronida, flunisolida, fluorometalona, fluperolona, fluprednisolona, hidrocortisona valerato, hidrocortisona ciclopentilpropionato, hidrocortamato, meprednisona, parametasona, prednisolona, prednisona, beclometasona dipropionato, triamicinolona, y mezclas de los mismos.

[00257] De acuerdo a algunas formas de realización, el agente antiinflamatorio es un agente antiinflamatorio no esteroideo. El término “agente antiinflamatorio no esteroideo” como se usa en la presente se refiere a un grupo grande de agentes que son similares a la aspirina en su acción, incluyendo, a título enunciativo no taxativo, a ibuprofeno (Advil®), naproxeno sodio (Aleve®), y acetaminofeno (Tylenol®). Otros ejemplos de agentes antiinflamatorios no esteroideos que se pueden usar en el contexto de la

presente invención incluyen, a título enunciativo no taxativo, oxicams, tales como piroxicam, isoxicam, tenoxicam, sudoxicam, y CP-14,304; disalcid, benorilato, trilisato, safaprin, solprin, diflunisal, y fendosal; derivados de ácido acético, tales como diclofenaco, fenclofenaco, indometacina, sulindac, tolmetina, isoxepac, furofenaco, tiopinac, zidometacina, acematacina, fentiazac, zomepirac, clindanac, oxepinac, felbinac, y quetorolac; fenamatos, tales como los ácidos mefenámico, meclofenámico, flufenámico, niflúmico, y tolfenámico; derivados de ácido propiónico, tales como benoxaprofeno, flurbiprofeno, quetoprofeno, fenoprofeno, fenbufeno, indopropfeno, pirprofeno, carprofeno, oxaprozina, pranoprofeno, mioprofeno, tioxaprofeno, suprofeno, alminoprofeno, y tiaprofenic; pirazoles, tales como fenilbutazona, oxiphenbutazona, feprazona, azapropazona, y trimetazona. También se pueden emplear mezclas de estos agentes antiinflamatorios no esteroideos, así como también las sales y ésteres dermatológicamente aceptables de estos agentes. Por ejemplo, el etofenamato, un derivado del ácido flufenámico, es particularmente útil para la aplicación tópica.

[00258] De acuerdo a otra forma de realización, el agente antiinflamatorio incluye, a título enunciativo no taxativo, Factor de Crecimiento Transformante - beta3 (TGF- β 3), un agente anti-Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α), o una combinación de los mismos.

[00259] De acuerdo a algunas formas de realización, el agente adicional es un agente analgésico. De acuerdo a algunas formas de realización, el agente analgésico alivia el dolor mediante la elevación del umbral de dolor sin alterar la conciencia u otras modalidades sensoriales. De acuerdo a algunas de dichas formas de realización, el agente analgésico es un

analgésico no opioide. Los "analgésicos no opioides" son sustancias naturales o sintéticas que reducen el dolor pero que no son analgésicos opioides. Los ejemplos de analgésicos no opioides incluyen, a título enunciativo no taxativo, a etodolac, indometacina, sulindac, tolmetina, nabumetona, piroxicam, acetaminofeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, quetoprofeno, naproxeno, naproxeno sodio, oxaprozina, aspirina, trisalicilato de colina y magnesio, diflunisal, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, y fenilbutazona. De acuerdo a algunas otras formas de realización, el analgésico es un analgésico opioide. Los "analgésicos opioides", "opioides", o "analgésicos narcóticos" son sustancias naturales o sintéticas que se unen a los receptores opioides en el sistema nervioso central, produciendo una acción agonista. Los ejemplos de analgésicos opioides incluyen, a título enunciativo no taxativo, a codeína, fentanilo, hidromorfona, levorfanol, meperidina, metadona, morfina, oxycodona, oximorfona, propoxifeno, buprenorfina, butorfanol, dezocina, nalbufina, y pentazocina.

[00260] De acuerdo a otra forma de realización, el agente adicional es un agente antiinfeccioso. De acuerdo a otra forma de realización, el agente antiinfeccioso es un agente antibiótico. El término "agente antibiótico" como se usa en la presente designa a cualquiera de un grupo de sustancias químicas que tienen la capacidad para inhibir el crecimiento, o para destruir a las bacterias, y otros microorganismos, usados principalmente en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Los ejemplos de agentes antibióticos incluyen, a título enunciativo no taxativo, a Penicilina G; Meticilina; Nafcilina; Oxacilina; Cloxacilina; Dicloxacilina; Ampicilina; Amoxicilina; Ticarcilina; Carbenicilina; Mezlocilina; Azlocilina; Piperacilina; Imipenem; Aztreonam; Cefalotina; Cefaclor;

Cefoxitina; Cefuroxima; Cefonicid; Cefmetazol; Cefotetan; Cefprozil; Loracarbef; Cefetamet; Cefoperazona; Cefotaxima; Ceftizoxima; Ceftriaxona; Ceftazidima; Cefepima; Cefixima; Cefpodoxima; Cefsulodin; Fleroxacina; Ácido Nalidíxico; Norfloxacina; Ciprofloxacina; Ofloxacina; Enoxacina; Lomefloxacina; Cinoxacina; Doxiciclina; Minociclina; Tetraciclina; Amikacina; Gentamicina; Kanamicina; Netilmicina; Tobramicina; Estreptomicina; Azitromicina; Claritromicina; Eritromicina; Eritromicina estolato; Eritromicina etil succinato; Eritromicina glucoheptonato; Eritromicina lactobionato; Eritromicina estearato; Vancomicina; Teicoplanina; Cloramfenicol; Clindamicina; Trimetoprima; Sulfametoxazol; Nitrofurantoin; Rifampina; Mupirocina; Metronidazol; Cefalexina; Roxitromicina; Co-amoxiclavuanato; combinaciones de Piperacilina y Tazobactam; y sus diversas sales, ácidos, bases, y otros derivados. Los agentes antibióticos antibacterianos incluyen, a título enunciativo no taxativo, a penicilinas, cefalosporinas, carbacefemos, cefamicinas, carbapenemos, monobactamos, aminoglicósidos, glicopéptidos, quinolonas, tetraciclinas, macrólidos, y fluoroquinolonas.

[00261] Otros ejemplos de por lo menos un agente terapéutico adicional incluyen, a título enunciativo no taxativo, a aceite de rosa mosqueta, vitamina E, 5-fluorouracilo, bleomicina, extracto de cebolla, pentoxifilina, prolil-4-hidroxilasa, verapamil, tacrolimus, tamoxifeno, tretinoína, colchicina, un antagonista de calcio, tranilist, zinc, un factor de crecimiento, y una combinación de los mismos. Los ejemplos de factores de crecimiento incluyen, a título enunciativo no taxativo, a factor de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).

Terapia Adyuvante

[00262] De acuerdo a algunas formas de realización, la composición farmacéutica se administra en combinación con una terapia adyuvante. Los ejemplos no limitantes de terapias adyuvantes incluyen, el oxígeno hiperbárico (HBO), la terapia génica, la terapia con células madre, las biomanipulaciones de la piel, los equivalentes de piel, los sustitutos de piel, los injertos de piel y similares. La piel biomanipulada, los equivalentes de piel y los sustitutos de piel se pueden obtener, por ejemplo, de tejido humano (autólogo o alogeneico), de tejido no humano (xenográfico), de materiales sintéticos y de materiales compuestos. Los ejemplos de injertos de piel incluyen, a título enunciativo no taxativo, a injertos de piel de espesor parcial e injertos de piel de espesor total. Los injertos de piel de espesor parcial se toman mediante el corte de las capas superiores (epidermis y un espesor variable de dermis) de la piel con un instrumento de corte grande llamado dermatoma. La pieza de piel extraída se aplica entonces a la herida. Este tipo de injertos de piel con frecuencia se toman de la pierna. Los injertos de piel de espesor completo se toman mediante el corte de todas las capas de la piel con un escalpelo (un injerto de Wolfe). Se hace de una forma similar a la escisión de piel. La pieza de piel se corta con la forma correcta, y luego se aplica a la herida. Este tipo de injerto de piel con frecuencia se toma del brazo, del cuello o desde detrás de la oreja.

[00263] A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que el comúnmente aceptado por las personas con experiencia en el arte al que pertenece esta invención. A pesar de que en la práctica o en la prueba de

la presente invención también se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los que se describen en la presente, ahora se describirán los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones que se mencionan en la presente se incorporan a la presente a modo de referencia para divulgar y describir los métodos y/o materiales en conexión con los que se citan las publicaciones.

[00264] Cuando se provee un rango de valores, ha de comprenderse que cada valor intermedio, hasta el décimo de unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa, entre el límite superior y el límite inferior del rango, y cualquier otro valor mencionado o intermedio en el rango mencionado, están abarcados por la invención. Los límites superior e inferior de estos rangos menores que se pueden incluir en forma independiente en los rangos más pequeños, están también abarcados por la invención, con excepción de cualquier límite específicamente excluido del mencionado rango. Cuando el rango mencionado incluye a uno o ambos de los límites, los rangos que excluyen a uno cualquiera de estos límites incluidos, también están incluidos en la invención.

[00265] Ha de notarse que, como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "uno/una", "y", y "el/la" incluyen a sus referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado.

[00266] Las publicaciones que se citan en la presente, cuyos contenidos se incorporan a la presente a modo de referencia, se proveen solamente por su divulgación previa a la fecha de presentación de la presente

solicitud. Nada de lo aquí mencionado debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder a dicha publicación en virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación provistas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, las que pueden requerir de su confirmación en forma independiente.

[00267] La presente invención se puede realizar en otras formas específicas sin alejarse del espíritu o atributos esenciales de la misma y, por consiguiente, en la indicación del alcance de la invención debe hacerse referencia a las reivindicaciones adjuntas más que a la memoria descriptiva previa.

EJEMPLOS

[00268] Los ejemplos siguientes se incluyen para proveer a las personas con experiencia en el arte de una divulgación y descripción completas de cómo realizar y usar la presente invención, y sin pretender limitar el alcance de aquello que los inventores consideran como su invención ni pretenden indicar que los experimentos siguientes son los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique de otra forma, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en masa, la temperatura está en grados Centígrados, y la presión es presión atmosférica, o una cercana a la misma.

Ejemplo 1. Estudio observacional clínico

[00269] Se recolectaron los datos a partir de un registro médico electrónico (EMR) específico del cuidado de heridas que permitió a los

inventores evaluar resultados reales de 41 heridas. Los inventores usaron los datos de la base de datos del EMR de heridas Intellicure, Inc. para llevar a cabo un análisis retrospectivo de heridas tratadas con azúcar granulada tópico. Intellicure, Inc. es un EMR específico de heridas que se usa ampliamente en los centros para heridas a lo largo de los EE.UU. Los registros de tratamiento incluyen la demografía de los pacientes, el tipo de herida, la ubicación, la etiología subyacente, la medida del área, características específicas de la herida, porcentaje de cerrado registrado en cada visita, etc. El EMR está diseñado para registrar en forma precisa el tamaño de la herida y sus características en cada visita y el porcentaje de cambio del área de la herida a lo largo del tiempo. El EMR también registra otros tratamientos y procedimientos o complicaciones o infecciones que puedan ocurrir, y registros de tratamientos. El uso del EMR para la captura de los datos sobre los resultados de la cicatrización tiene la ventaja de capturar el progreso de la cicatrización en tiempo real. Se analizaron los registros de tratamiento de las heridas entre octubre de 2013 y octubre de 2015. En estas heridas, se usó azúcar granulada como tratamiento tópico entre el 75 y el 100% del tiempo. La azúcar granulada se mezcló con un biomaterial de hidrogel (mezcla 1:1) en la mayoría de los casos con una pocas gotas de yoduro de povidona o en mezcla con antibiótico tópico o ungüento de petróleo (mezcla tópica de azúcar). Sin embargo, el principal ingrediente en todos los casos fue la azúcar granulada. La etiología de las heridas incluyó origen quirúrgico, diabético, venoso, por osteomielitis, traumático y por radiación. Estas heridas representan la mezcla típica de heridas que se ven en un centro hospitalario para heridas en pacientes externos. El análisis primario incluyó el tiempo hasta la cicatrización y

la seguridad de la mezcla de azúcar. Se incluyeron las heridas con entre 75 y 100% de cicatrización.

[00270] Antes del comienzo del tratamiento en el centro para heridas de los inventores, la mayoría de las heridas habían estado sin cicatrizar durante 1 y 3 meses, algunas heridas durante más de un año, y una herida durante 36 años. Los resultados de los inventores muestran que 37 heridas cicatrizaron al 100%, 3 heridas cicatrizaron al 99%, y una herida cicatrizó al 90% después de su tratamiento con la mezcla tópica de azúcar entre el 75 y el 100% del tiempo. Excepto para una úlcera por radiación, todas las úlceras cicatrizaron dentro de los 7 meses. La mayoría de las úlceras que cicatrizaron al 100%, lo hicieron dentro de los 1 a 3 meses. Las otras úlceras cicatrizaron entre los 5 y 7 meses. Las úlceras que cicatrizaron rápidamente o dentro del mes, fueron traumáticas o quirúrgicas, o tenían un manejo exitoso del edema de tejido. Las úlceras que tomaron más de 3 meses para cicatrizar tenían necrosis, osteomielitis o habían estado sin cicatrizar por más de un año previamente al inicio del tratamiento en el centro para heridas de los inventores.

[00271] Además del tratamiento con azúcar tópica con la composición farmacéutica descrita, 13 úlceras se sometieron a terapia adyuvante con oxígeno hiperbárico (HBO), 3 úlceras tuvieron sustitutos de piel como terapia adyuvante y una úlcera tuvo una combinación de HBO e injerto epidérmico como terapia adyuvante.

[00272] Se hicieron las siguientes observaciones en todos los casos: (i) no hubo alergias o efectos secundarios locales o sistémicos; (ii) no se observó infección sobre la herida después del inicio de la terapia con azúcar si

se desbridaba adecuadamente a la herida de tejido necrótico; (iii) fibrina y biopelículas resueltos sin ningún otro desbridamiento y el tejido de granulación creció y rellenó el área de la herida; y (iv) para las úlceras que tenían aplicación de sustitutos de piel, el tratamiento con azúcar preparó la úlcera con buena granulación y como resultado, los otros tratamientos adyuvantes, tales como los sustitutos de piel, fueron eficaces y epitelializaron rápidamente el lecho de la úlcera preparado mediante la presente composición farmacéutica.

[00273] En este estudio, todas las úlceras mostraron una mejora progresiva con un incremento del tejido de granulación y una epitelialización acelerada a lo largo del periodo de cicatrización. También se observó una disminución de tejido necrótico, olor, dolor, y drenaje. Ninguno de los pacientes desarrolló una nueva necrosis, infección, irritación de la piel, dolor, o desaceleración de la tasa de cicatrización. La seguridad del tratamiento se concluyó en base a la falta de efectos adversos locales o sistémicos observados e informados.

[00274] Los resultados de este estudio indican que una composición farmacéutica tópica que contiene azúcar granulada mezclada con un hidrogel para heridas, o antibiótico tópico se puede aplicar en forma segura a las heridas no cicatrizantes de cualquier etiología sin producir efectos secundarios nocivos. La composición farmacéutica mejoró, aumentó y aceleró todos los procesos de cicatrización incluyendo la eliminación de fibrina, suciedad y biopelículas de la herida, formando un nuevo tejido de granulación sano, el control de la infección de la herida, la contracción de la herida y la formación de cobertura de epitelio. En muchas de las heridas tratadas, la composición farmacéutica cicatrizó las heridas en forma progresiva y completa.

En los casos que requirieron terapias adyuvantes para las heridas, la composición farmacéutica aceleró la cicatrización e hizo a las terapias adyuvantes más eficaces mediante la mejora de todos los procesos de cicatrización.

[00275] Además del análisis retrospectivo, se llevaron a cabo dos estudios observacionales clínicos.

[00276] En el primer estudio clínico observacional, se usaron vendajes diarios con antibiótico/gel para heridas mezclado con azúcar granulada (1:1) como vendaje de contacto primario sobre las heridas no cicatrizantes que incluyeron heridas con etiología diabética, venosa, quirúrgica y cancerosa. Se inscribieron trece pacientes. De los trece pacientes inscriptos, 9 pacientes tuvieron una cicatrización completa; 3 pacientes se perdieron durante el seguimiento (con por lo menos 50% de cicatrización en el último seguimiento documentado); y 1 paciente cicatrizó al 90%. El tiempo hasta la cicatrización completa fue entre 1 y 3 meses en 7 pacientes, y de 12 meses en 2 pacientes. Con respecto a los 2 pacientes que cicatrizaron a los 12 meses, 1 paciente tenía una úlcera diabética gangrenosa y fue salvado por amputación por debajo de la rodilla, y 1 paciente tenía una herida de mama por cáncer de mama tratado con quimioterapia concurrente.

[00277] En el segundo estudio clínico observacional, se usó gel para heridas con azúcar granulada (1:1) como vendaje primario en ocho úlceras de pie diabético (DFU) no cicatrizantes como terapia adyuvante a la terapia estándar. De los ocho pacientes estudiados, 7 pacientes lograron el 100% de cicatrización mientras que 1 paciente se perdió durante el seguimiento. El tiempo para la cicatrización completa fue de entre 2 y 4 meses

en 3 pacientes y de entre 7 y 11 meses en cuatro pacientes. Ninguno de los pacientes requirió amputación o un desbridamiento mayor.

[00278] En base a estas observaciones, se llevaron a cabo los siguientes experimentos con animales con el objetivo de demostrar los efectos del azúcar en un modelo de herida en animal.

Ejemplo 2. Estudio *in vivo* en ratones

[00279] En este estudio, se usaron ratones hembra reproductoras retiradas Swiss Webster (i) para demostrar la diferencia de la tasa de cerrado de la herida entre las heridas tratadas con vendajes que comprenden una composición que contiene azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel versus un biomaterial de vendaje de hidrogel estándar de atención; (ii) para comparar y evaluar el desarrollo de la infección en las heridas que reciben vendajes que comprenden una composición que contiene azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel vs. vendaje control; y (iii) para determinar la diferencia de la tasa de progresión y la cuantificación de los elementos claves en la reparación de tejidos entre vendajes que comprenden una composición que contiene azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel y control. El análisis histológico se lleva a cabo 3, 6, 9 y 11 días después de la producción de la herida en base a los estudios previos en donde los implantes subcutáneos de matrigel suplementados con lactato en los ratones mostraron una respuesta inflamatoria para el día 3, tejido de granulación temprano para el día 9, y tejido de granulación maduro para el día 11 (Hunt T K y col., *Antioxid Redox Signal*, 2007. 9(8): 1115-1124; Berry D P y col., *Plast Reconstr Surg*, 1998. 102(1): 124-131; discusión 132-134).

[00280] Los ratones reproductores retirados Swiss Webster se

dividieron en los siguientes 5 grupos:

1. Grupo experimental 1 (n=3) con vendaje que comprende una composición que contiene azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel sobre las heridas para cada punto de tiempo. Un total de n=12 para este subgrupo;
2. Grupo experimental 2 (n=3) con vendaje que comprende una composición que contiene azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel y yodo sobre las heridas para cada punto de tiempo. Un total de n=12 para este subgrupo;
3. Grupo experimental 3 (n=3) con hisopado bacteriano de la herida recibiendo el vendaje que comprende una composición que contiene azúcar granulada y un biomaterial de hidrogel sobre las heridas para cada punto de tiempo. Un total de n=12 para este subgrupo;
4. Grupo control 1 (n=3) con hisopado bacteriano de la herida recibiendo el vendaje control sobre las heridas para cada punto de tiempo. Un total de n=12 para este subgrupo; y
5. Grupo control 2 (n=3) con vendaje control sobre las heridas para cada punto de tiempo. Un total de n=12 para este subgrupo.

[00281] Se prepararon los vendajes de azúcar mediante la cobertura de la composición de la presente invención con vendaje no adherente telfa (Covidien) fijado con película transparente y coban. La composición de la presente invención se compuso de una mezcla 1:1 v/v de azúcar granulada (azúcar de mesa) con un biomaterial de hidrogel. El biomaterial de hidrogel ("gel para heridas") estuvo comprendido por agua purificada al 70%, glicerol al 30 % e hidroxietil celulosa. También se agregó una pequeña cantidad de alantoína y lactato de sodio. El biomaterial de

hidrogel se preparó en una farmacia externa. Los vendajes de azúcar y yodo se prepararon mediante la cobertura de una mezcla de la composición de la presente invención y yodo con vendaje no adherente telfa fijado con película transparente y coban. La mezcla de azúcar y yodo se compuso mediante la mezcla de un biomaterial de hidrogel, azúcar granulada (azúcar de mesa) y yodo en una proporción 1:1:0,17 (14,7ml/14,7ml/2,5ml). El vendaje control fue biomaterial de hidrogel solo con vendaje no adherente telfa fijado con película transparente y coban.

[00282] Los ratones se alojaron en forma individual en jaulas estándares en una instalación de cuidado animal acreditada por la AAALAC. Los ratones tuvieron acceso libre al agua y al alimento. Se sacrificaron los ratones usando anestesia por inhalación. La analgesia post operación se hizo por inyección de Buprenorfina por vía subcutánea a 0,8 ml inmediatamente después de la operación y seis horas más tardes. Cualquier otro analgésico necesario se dio a demanda cada 12 horas. La necesidad se evaluó mediante el monitoreo del comportamiento ante el dolor que se definió como una disminución del consumo de alimento y bebida y/o por el cambio de la actividad. En caso de una respuesta severa que fuese peligrosa para los ratones, los mismos se sacrificaron. Los signos de dolor o distrés lo suficientemente severos para indicar la necesidad de una eutanasia incluyeron pérdida de peso > 10%, estado moribundo e incapacidad para comer o beber. El método para la eutanasia fue la asfixia con CO₂ seguida por dislocación cervical.

[00283] El procedimiento de creación de heridas y el análisis de las heridas se llevaron a cabo de una forma similar a la que se describe en el

estudio de Keylock y col. (Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. 294(1): R179-184). Se anestesiaron los animales usando un anestésico por inhalación mediante una máscara cónica bajo una campana de flujo laminar con isoflurano (Isoflo) en 100% de oxígeno a una tasa de flujo de entre 2 y 3 l/min en forma continua. Después de anestesiarnos, se afeitaron los animales y se trataron con tres pasadas alternadas de povidona – yodo y alcohol isopropílico. Se crearon dos heridas circulares de espesor completo sobre el área dorsal superior de cada animal usando un instrumento para biopsia por perforación descartable estéril de 3,5 mm. La piel quitada mediante la biopsia por perforación se fijó en formaldehído al 4% para histopatología. Se fotografiaron inmediatamente los animales para la evaluación del valor basal del área de la herida y luego se retornaron a su jaula después de la aplicación del vendaje apropiado de acuerdo a su grupo experimental. Después de la anestesia con isoflurano, los animales recobraron la conciencia en aproximadamente 3 a 5 minutos. Se monitorearon los animales hasta llegar a una recuperación completa del procedimiento. A partir de cada grupo, se sacrificó un subgrupo (n=3) de animales en el día 3, día 6, día 9, y día 11, después de la producción de la herida mediante asfixia rápida con CO₂ seguida por dislocación cervical, y se recolectaron el material de las heridas y el tejido circundante. Como cada animal tenía 2 heridas, se recolectó el material de una herida junto con su tejido circundante y se fijó en formaldehído al 4% para histopatología e inmunohistoquímica; el material de la segunda herida junto con el tejido circundante se recolectó y congeló para pruebas adicionales.

[00284] Se aplicó una suspensión salina de 0,1 ml conteniendo 10⁶ organismos/ml de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (ATCC 27853)

sobre las heridas y se frotó suavemente con una varilla de teflón estéril y se dejó secar. Se permitió que el sitio se seque, e inmediatamente después se cubrió con el vendaje apropiado. Para minimizar el riesgo de dispersión de la infección y contaminación, se mantuvieron los animales en micro jaulas individuales en una instalación para animales en cuarentena. Se utilizó un equipamiento protector personal (PPE) y se tomaron medidas generales de protección y de higiene de acuerdo a los estándares establecidos por los Centers for Disease Control and Prevention (CDC). La habitación que alojaba a los animales tenía restringida la entrada solo al personal relacionado con el estudio que utilizaba el PPE apropiado y seguía las medidas generales de protección e higiene según las guías de los CDC. De acuerdo al SDS para *P. aeruginosa*, después de usar el producto, se hizo una desinfección con lavandina (hipoclorito de sodio).

[00285] Se fotografió a los animales cada día después de la creación de las heridas. Cada animal tuvo 2 heridas que fueron fotografiadas. Se evaluó el área de la herida y se aplicó un nuevo vendaje. Se anestesiaron los animales con isoflurano administrado con oxígeno a una tasa de flujo de 2–3 l/min y se fotografiaron las heridas antes de la recuperación de la anestesia. La fotografía de las heridas y la evaluación del área de la herida se llevaron a cabo mediante una ARANZ (ARANZ Medical) Silhouette Camera que provee una medida precisa en 3-D y una evaluación del área de la herida. También se llevó a cabo una evaluación visual (o sea, a ojo desnudo) de las características de las heridas y se registró. El sistema ARANZ incluye un dispositivo para adquisición de imágenes que mide en forma precisa y consistente el área, la profundidad y el volumen de las heridas y el progreso de su cicatrización, y un

programa de computación que almacena y gestiona los datos de las heridas. El programa de computación calcula y almacena el porcentaje de cambio (disminución o incremento) de área/volumen de la herida con cada fotografía. La cámara ARANZ silhouette permite monitorear la actividad de evaluación de las heridas cada día comenzando desde el día de creación de la herida hasta el día del sacrificio.

[00286] La reacción clínica a la inoculación se calificó de acuerdo a la siguiente escala:

[00287] 0 = sin reacción

[00288] 1 = edema definido, eritema leve

[00289] 2 = edema intenso y eritema intenso

[00290] 3 = edema y eritema extendiéndose más allá de los bordes de la herida

4 = edema y eritema extendiéndose más allá de los bordes de las heridas con formación de pus

[00291] Los Grados 2, 3 y 4 se categorizaron como de desarrollo de infección (Leyden y col., Journal of the Society of Cosmetic Chemists, Vol. 31, No. 1, 19-28).

[00292] Para evaluar la carga bacteriana en los animales con contaminación bacteriana de las heridas, se determina la cuantificación de las bacterias por histopatología. Se cortaron las muestras en secciones y se tiñeron. Usando histopatología e inmunohistoquímica, se evalúa la tasa de síntesis de colágeno, la tasa de neovascularización, la respuesta inflamatoria a la herida, la organización del tejido, la tasa de epitelialización, y la cantidad de angiogénesis. Se usan muestras congeladas para el análisis bioquímico en una

etapa posterior en base a los resultados de histopatología, según necesidad.

[00293] Las heridas de los grupos 1 (Grupo experimental con azúcar y vendaje de hidrogel - grupo de azúcar), 2 (grupo experimental con vendaje de azúcar hidrogel y yodo – grupo azúcar/yodo) y 5 (grupo 5, grupo control con vendaje de hidrogel solamente –grupo control) se fotografiaron cada día con la cámara ARANZ y el programa de computación ARANZ calculó el porcentaje de cambio del área o del volumen de la herida. El día de la creación de la herida fue el día 1. Se registró el porcentaje de cambio del área para los días 2 a 11 después de la producción de la herida para todas las heridas (2 heridas por animal).

[00294] Se promediaron los porcentajes de cambio para todas las heridas para cada grupo y para cada día después de la producción de la herida para dar el porcentaje promedio de cerrado de herida. Un porcentaje de cerrado positivo reflejó una disminución del área de la herida y un porcentaje de cerrado negativo reflejó un incremento del área de la herida.

[00295] Los resultados de este estudio son los siguientes: (i) en los días 2,3,4,5,6 después de la producción de la herida, el porcentaje promedio de cerrado de la herida fue mayor en el grupo con vendaje de azúcar en comparación con los grupos control y con vendaje de azúcar/yodo; (ii) la diferencia más grande fue al día 6 después de la producción de la herida, cuando el porcentaje de cerrado en el grupo con vendaje de azúcar fue más de 50% mayor en comparación con los grupos control y con vendaje de azúcar/yodo; (iii) en los días 7, 8, 9 después de la producción de la herida, el porcentaje promedio de cerrado de herida fue similar entre el grupo con vendaje de azúcar y el grupo control, sin embargo el porcentaje promedio de

cerrado de herida tanto del grupo con vendaje de azúcar como del grupo control fue mayor que el grupo con vendaje de azúcar/yodo; (iv) en el día 10 después de la producción de la herida, la mayoría de las heridas en el con vendaje de azúcar cicatrizaron (promedio de cerrado de 95%) lo cual fue 1 día más temprano en comparación tanto con el grupo control (promedio de cerrado de 79%) como con el grupo con vendaje de azúcar /yodo (promedio de cerrado de 69%); (v) en el día final 11 luego de la creación de las heridas, las heridas en el grupo con vendaje de azúcar cicatrizaron al 99 por ciento; el grupo control cicatrizó el 96 por ciento y el grupo con vendaje de azúcar/yodo cicatrizó al 86 por ciento; y (vi) en forma global, el porcentaje promedio de cerrado de herida en el grupo con vendaje de azúcar/yodo fue menor que en el grupo con vendaje de azúcar y el grupo control con una diferencia más grande entre los grupos con vendaje de azúcar y con vendaje de azúcar/yodo, en comparación con la diferencia entre el grupo con vendaje de azúcar y el grupo control.

[00296] Las observaciones visuales (o sea, a ojo desnudo) de las heridas mostraron una epitelialización temprana en el grupo con vendaje de azúcar en el día 4-5 después de la producción de la herida en comparación con el grupo control y el grupo con vendaje de azúcar/yodo. También se observó que una vez que las heridas epitelializaron en el grupo con vendaje de azúcar, esta epitelialización fue progresiva y se mantuvo hasta el último día después de la producción de la herida. Por el contrario, la epitelialización en el grupo control y en el grupo con vendaje de azúcar/yodo no fue progresiva y presentó retrocesos en forma intermitente.

[00297] Ninguno de los animales mostró comportamiento de dolor, lo que hubiese requerido de una analgesia adicional en forma posterior al día

de creación de la herida. De forma similar, ningún animal desarrolló signos de estrés o de pérdida de peso. Todos los animales se sacrificaron en los puntos de tiempo de acuerdo al protocolo del estudio.

[00298] Los resultados de este estudio indican que las heridas cicatrizaron con una contracción desde los bordes de la herida así como también con epitelialización del lecho de la herida. La tasa de cerrado de la herida, o de contracción, entre el grupo con vendaje de azúcar, el grupo control y el grupo con vendaje de azúcar/yodo fue la mayor para el grupo con vendaje de azúcar. La observación visual (o sea, a ojo desnudo) de la epitelialización de la herida mostró una epitelialización temprana y progresiva en el grupo con vendaje de azúcar en comparación con el grupo control y el grupo con vendaje de azúcar/yodo.

[00299] En este estudio, se usaron ratones hembra reproductoras retiradas Swiss Webster para demostrar que el azúcar acelera la cicatrización en las heridas experimentales. Se dividió un total de 36 ratones equitativamente ($n=12$) en 3 grupos. Se hicieron dos heridas circulares de espesor completo por animal tratado diariamente con (i) azúcar granulada más gel para heridas (1:1) (Grupo 1); (ii) gel para heridas solamente (Grupo 2); y (iii) azúcar granulada más gel para heridas más yodo (1:1:0.17) y se sacrificó cada grupo en los días 3, 6, 9 y 11 para el análisis de los subgrupos. El protocolo para este experimento fue revisado y aprobado por el IACUUC Committee Hackensack University Medical Center, NJ

[00300] Se prepararon los vendajes de usando una mezcla de azúcar recubierta con una almohadilla de vendaje no adherente fijada con película transparente y un soporte elástico auto adherente. La mezcla de

azúcar se compuso de una mezcla 1:1 v/v de azúcar granulada (por ejemplo, azúcar de mesa) con gel para heridas comprendiendo agua purificada al 70%, glicerol al 30 % e hidroxietil celulosa. También se agregó una pequeña cantidad de alantoína y lactato de sodio. El gel para heridas se preparó en una farmacia externa para todo el experimento con una fecha de vencimiento de un mes. Para preparar la mezcla de azúcar, se agregó el azúcar al gel para heridas en cada día de colocación de vendaje. El vendaje de azúcar y yodo se preparó usando una mezcla de azúcar y yodo recubierta con una almohadilla de vendaje no adherente fijada con película transparente y una envoltura de soporte elástico auto adherente. La mezcla de azúcar y yodo se compuso de una mezcla gel para heridas, azúcar granulada (por ejemplo, azúcar de mesa) y yodo (povidona - yodo USP) en una proporción 1:1:0,17 (14,7ml/14,7ml/2,5ml). Para preparar la mezcla de azúcar y yodo, se agregaron la azúcar y el yodo al gel para heridas en cada día de colocación de vendaje. Los vendajes control se prepararon usando gel para heridas solo con una almohadilla de vendaje no adherente fijada con película transparente y una envoltura de soporte elástico auto adherente.

[00301] Se dividieron los ratones en 3 grupos como se detalla a continuación:

[00302] Grupo experimental 1: n=12 - con vendaje de azúcar sobre las heridas para cada punto de tiempo.

[00303] Grupo control 2: n=12 con vendaje control sobre las heridas para cada punto de tiempo.

[00304] Grupo experimental 3 n=12 con vendaje de azúcar y yodo sobre las heridas para cada punto de tiempo.

[00305] Los ratones se alojaron en forma individual en jaulas estándares en una instalación de cuidado animal acreditada por la AAALAC. Los ratones tuvieron acceso libre al agua y al alimento. Se sacrificaron los ratones usando anestesia por inhalación como se describió en el procedimiento de producción de heridas. La analgesia post operación se hizo por inyección de Buprenorfina por vía subcutánea a 0,08 ml inmediatamente después de la operación. Según el protocolo, se debía administrar analgesia adicional 6 horas después de la operación y subsiguientemente cada 12 horas de acuerdo a la necesidad. La necesidad se evaluó mediante el monitoreo del comportamiento ante el dolor que se definió como una disminución del consumo de alimento y bebida y/o un cambio de actividad. Según el protocolo, en caso de una respuesta severa peligrosa para los ratones, los ratones debían ser sacrificados. Los signos de dolor o distrés lo suficientemente severos como para indicar la necesidad de una eutanasia incluyen pérdida visible del peso, estado moribundo e incapacidad para beber o comer. El método para la eutanasia fue la asfixia por CO₂ seguida por dislocación cervical.

[00306] El procedimiento de creación de heridas y el análisis de las heridas se llevaron a cabo de una forma similar a la que se describe en el estudio de Keylock y col. (*Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. 294(1): p. R179-84). Se anestesiaron los animales usando una caja transparente cerrada con un flujo de entrada de isoflurano (Isoflo™) en oxígeno al 100% @ entre 3 y 4 l/min durante 2 a 4 minutos. Una vez que el animal dejó de moverse, se administró la anestesia a través de una máscara cónica bajo una campana de flujo laminar con isoflurano (Isoflo) en 100% de

oxígeno a una tasa de flujo de entre 2 y 3 l/min en forma continua. Después de anestesiarnos, se afeitaron los animales y se trataron con tres pasadas alternadas de povidona. Después de haber sido anestesiados, se afeitaron los animales y se trataron con pasadas alternadas de povidona – yodo y alcohol isopropílico. Se crearon dos heridas circulares de espesor completo sobre el área dorsal superior de cada animal usando un instrumento para biopsia por perforación descartable estéril de 3,5 mm. La piel quitada mediante la biopsia por perforación se fijó en formaldehído al 4% para histopatología. Se fotografiaron inmediatamente los animales para la evaluación del valor basal de área de la herida y luego se retornaron a su jaula después de la aplicación del vendaje apropiado de acuerdo a su grupo. Después de la anestesia con isoflurano, los animales recobraron la conciencia en aproximadamente 3-5 minutos. Se monitorearon los animales hasta llegar a una recuperación completa del procedimiento.

[00307] A partir de cada grupo, se sacrificó un subgrupo (n=3) de animales en el día 3, día 6, día 9, y día 11 después de la creación de la herida mediante asfixia rápida con CO₂, y se recolectaron el material de las heridas y el tejido circundante. Como cada animal tenía 2 heridas, el material de una herida recolectado junto con el tejido circundante se fijó en formaldehído al 4% para histopatología e inmunohistoquímica; el material de la segunda herida recolectado con el tejido circundante se congeló para análisis adicionales. En los días 3, 6, 9, 11 después de la producción de la herida se seleccionaron muestras para el análisis histológico. Esta línea de tiempo se basó en un estudio previo en donde los implantes subcutáneos de matrigel suplementados con lactato en los ratones mostraron una respuesta inflamatoria para el día 3,

tejido de granulación temprano para el día 9 y tejido de granulación maduro para el día 11 (Hunt, T.K., y col., *Aerobically derived lactate stimulates revascularization and tissue repair via redox mechanisms*. Antioxid Redox Signal, 2007. 9(8): p. 1115-24). Hubo una observación similar de Berry y col. (*Human wound contraction: collagen organization, fibroblasts, and myofibroblasts*. Plast Reconstr Surg, 1998. 102(1): p. 124-31; discusión 132-4) en biopsias de perforación de heridas que mostraron inflamación aguda para el día 3, granulación temprana para el día 6 y granulación madura para el día 11.

[00308] Se fotografiaron los animales cada día después de la creación de las heridas. Debido a que cada animal tenía 2 heridas, se fotografiaron ambas. Se evaluó el área de la herida y se aplicó un nuevo vendaje. Se anestesiaron los animales con isoflurano administrado con 100% de oxígeno a una tasa de flujo de 2 a 3 L/min y se fotografiaron las heridas antes de la recuperación de la anestesia. Se fotografió cada herida usando una ARANZ (Aranz Medical) Silhouette Camera que provee una medida precisa en 3-D del área de la herida. La fotografía de la herida se trazó en forma manual teniendo cuidado de definir precisamente el perímetro de la interfaz lecho de herida – piel. Los trazados fueron revisado por al menos un revisor independiente y, en caso de conflicto, se revisaron los trazados y se acordaron mediante dos revisores. En base a los trazados, el programa de computación calculó las medidas en 3-D del área de las heridas, y calculó y almacenó el porcentaje de cambio (disminución o incremento) del área/volumen de las heridas con cada herida fotografiada. La cámara ARANZ silhouette permitió monitorear la actividad de evaluación de las heridas de cada día comenzando desde el día de la creación de las heridas hasta el día del sacrificio.

[00309] También se llevó a cabo una evaluación visual (o sea, a ojo desnudo) de las características de las heridas y se registró en forma diaria para cada herida. Esta evaluación incluyó la evaluación del lecho de herida mediante las siguientes características: (i) granulación vs. necrosis/fibrina; (ii) drenaje de la herida; (iii) área alrededor de la herida; y (iv) cualquier otro hallazgo inusual. También se registraron la epitelialización y la cicatrización además de las otras características de la herida. Las observaciones visuales se registraron mediante por lo menos dos observadores.

[00310] Después de llevar a cabo una evaluación de las características de las heridas, no se observaron diferencias notables entre los tres grupos en la composición del lecho de herida, el drenaje de la herida y el área alrededor de la herida, con la excepción de la epitelialización. No se observaron signos inusuales que sugiriesen una necrosis o infección de las heridas. Las observaciones visuales de las heridas mostraron una epitelialización temprana e el grupo con azúcar en el día 4-5 después de la producción de la herida. En el Grupo 1, se vio una epitelialización temprana tan pronto como en el día 3, con un 50% de las heridas mostrando epitelialización en el Día 4. No se observó epitelialización en ninguna de las heridas del grupo 2 y del grupo 3 hasta el Día 5. Solo el 6% de las heridas mostraron epitelialización en el grupo 2 para el día 6, y 0% de las heridas mostraron epitelialización en el grupo 3. Un tercer observador independiente informó epitelialización en los tres grupos después de la revisión de las fotos de la cámara ARANZ. Estos resultados coincidieron con los resultados informados por la observación visual. En la observación visual también se halló que hubo más cicatrización de heridas en el grupo 1 en comparación con los grupos 2 y

3.

[00311] Ninguno de los animales mostró comportamiento de dolor que haya requerido una analgesia adicional posterior al día de la creación de las heridas, y ningún animal desarrolló signos de estrés o pérdida de peso. Todos los animales se sacrificaron en los puntos de tiempo de acuerdo al protocolo del estudio.

[00312] Los resultados de este estudio indican que las heridas cicatrizaron con una contracción desde los bordes de la herida así como también con una epitelialización del lecho de la herida. La tasa de cerrado de la herida o de la contracción entre los grupos con azúcar, control y con azúcar/yodo fue la mayor para el grupo con azúcar. La observación visual (o sea a ojo desnudo) de la epitelialización de las heridas mostró una epitelialización temprana en el grupo con azúcar en comparación con los grupos control y con azúcar/yodo.

EQUIVALENTES

[00313] Mientras que la presente invención se ha descrito en referencia a las formas de realización específicas de la misma, las personas con experiencia en el arte han de comprender que se pueden hacer diversos cambios y que se pueden hacer sustituciones por equivalentes sin alejarse del espíritu y alcance verdaderos de la invención. Además, se pueden hacer muchas modificaciones para adaptar una situación, material, composición del material, proceso, paso o pasos de proceso particulares, al espíritu y alcance objetivos de la presente invención. La totalidad de dichas modificaciones se consideran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas a la presente.