

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

Evaluación de la actividad pro cicatrizante de compuestos naturales derivados de plantas
para su aplicación en heridas cutáneas

Omar Andrés Casadiego Manosalva

Trabajo de grado para optar el título de Doctor en Ciencias Biomédicas

Directora

Patricia Escobar

Doctora en Ciencias

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina, Departamento de Ciencias Básicas

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Bucaramanga

2026

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi directora, la doctora Patricia Escobar, por su orientación, confianza y acompañamiento durante el desarrollo de esta tesis. Su guía académica y científica fue fundamental para la construcción de este trabajo y para mi formación como investigador.

Agradezco a la Universidad Industrial de Santander, a la Facultad de Salud, a la Escuela de Medicina, al Departamento de Ciencias Básicas y al Doctorado en Ciencias Biomédicas por brindarme el espacio académico e institucional para mi formación doctoral. De manera especial, agradezco a la Universidad por el apoyo financiero otorgado mediante el crédito condonable de posgrado, el cual fue fundamental para mi permanencia, dedicación y culminación de este proceso formativo e investigativo.

Agradezco al Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, al Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM) y al Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas (CROM-MASS) por el apoyo técnico, científico y logístico brindado durante el desarrollo de esta investigación.

También expreso mi agradecimiento al Programa Bio-Reto XXI-15:50, al Programa Ecosistema Científico Colombia Científica, al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, al Ministerio de Educación Nacional, al Ministerio de Comercio, Industria y Turismo, a ICETEX y al Fondo Francisco José de Caldas, por el respaldo institucional y financiero asociado al desarrollo de los trabajos que hicieron parte de esta tesis.

Extiendo mi agradecimiento a las instituciones y grupos colaboradores, especialmente al Departamento de Patología de la Universidad Industrial de Santander, a la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, a la Facultad de

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

Ciencias Básicas y al Departamento de Química de la Universidad de Pamplona, y a la Universidad de Santander, por su colaboración académica y técnica.

Agradezco también a los profesores, investigadores, compañeros y personal técnico que contribuyeron al desarrollo de los ensayos experimentales, al procesamiento de muestras, al análisis de resultados y a la discusión crítica de este trabajo.

A mi familia, gracias por su apoyo, paciencia y comprensión durante este camino. De manera muy especial, agradezco a mi novia y compañera de vida, Jemima Rojas Hurtado, por su amor, compañía y apoyo incondicional en los momentos de esfuerzo, incertidumbre y satisfacción que hicieron parte de esta etapa. Su presencia fue una fuente constante de motivación y fortaleza.

Tabla de contenido

Introducción.....	22
1 Objetivos.....	27
1.1 Objetivo general	27
1.2 Objetivos específicos	27
2 Cuerpo del trabajo	29
2.1 Marco referencial: Cicatrización cutánea	29
2.2 Heridas crónicas	32
2.3 Manejo y tratamiento de las heridas crónicas	35
2.4 Potencial de los productos naturales derivados de plantas en la cicatrización.....	38
2.5 Blancos terapéuticos no celulares en cicatrización.....	43
2.5.1 TNF- α	43
2.5.2 MMP.....	45
2.5.3 COX-2.....	47
2.5.4 VEGF.....	49
2.5.5 IL-6.....	51
2.5.6 IL-1	53
2.5.7 GSK.....	55
2.5.8 FGF.....	56
2.5.9 EGF.....	58
2.6 Modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de evaluación de proceso de cicatrización	59
2.7 Herramientas <i>in silico</i> para la búsqueda de nuevos cicatrizantes	64

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

3 Implementación modelos in vitro e in vivo para evaluar citotoxicidad, proliferación, migración/cicatrización.....	68
3.1 Introducción	68
3.2 Materiales y métodos	73
3.2.1 Diseño experimental	73
3.2.2 Revisión no sistemática de controles positivos en evaluación in vivo	75
3.2.3 Reactivos y compuestos utilizados	76
3.2.4 Líneas celulares y cultivo	80
3.2.5 Implementación del ensayo de resazurina en células Vero y HaCaT	80
3.2.6 Ensayo de proliferación celular con cristal violeta en células Vero	82
3.2.7 Ensayo de migración por herida de scratch (rasguño)	83
3.2.8 Implementación de modelos in vivo.....	85
3.2.8.1 Animales consideraciones éticas.	85
3.2.8.2 Implementación de las lesiones excisionales en ratones BALB/c.....	86
3.2.8.3 Implementación del modelo excisional en ratones hiperglicémicos (HG).....	88
3.2.8.4 Tratamiento de ratones NG y HG tratados con Fitostimoline® (FS®) (control).	88
3.3 Resultados	90
3.3.1 Control de cicatrización.....	90
3.3.2 Implementación del ensayo de resazurina y evaluación de la citotoxicidad de 20 AEs ...	93
3.3.3 Implementación de ensayo con CV evaluación de la proliferación celular de 20 AEs.....	95
3.3.4 Comparación entre la citotoxicidad (CC ₅₀) en el ensayo con resazurina y la pérdida de viabilidad en el ensayo de proliferación con cristal violeta.	99
3.3.5 Implementación del ensayo scratch.....	99

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

3.3.6	Efecto proliferativo/migratoria de los AE-1-10 en ensayo de scratch.....	102
3.3.7	Efecto del tratamiento con FS®) en ratones NG e HG.....	107
3.3.7.1	Inducción de la hiperglicemia en los ratones.....	107
3.3.7.2	Efecto del tratamiento con FS® en ratones NG e HG.....	109
3.4	Discusión.....	113
3.5	Conclusión	119
4	Selección de compuestos derivados de plantas (CDP) con actividad pro cicatrizante mediante técnicas <i>in silico</i>	119
4.1	Introducción	119
4.2	Materiales y Métodos.....	121
3.2.1	Diseño experimental	121
4.2.2	Elección de los CDP	122
4.2.3	Blancos terapéuticos	126
4.2.4	Docking molecular de los 34 CDP y la alantoína.....	128
4.2.4.1	Número de identificación (ID) de los CDP estudiados.	128
4.2.4.2	Ligando co-cristalizado (CL) e interacción con la TT.....	130
4.2.4.3	Análisis de docking molecular.	131
4.2.5	Dinámica molecular (MD).....	131
4.2.6	Target fishing del eugenol.	133
4.3	Resultados	135
4.3.1	Docking molecular.....	135
4.3.2	Simulaciones de MD.....	137
4.3.3	Evaluación del eugenol	139

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

4.4	Discusión.....	148
4.5	Conclusiones	152
5	Evaluación de la actividad pro cicatrizante de los CDPs en modelos experimentales <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	154
5.1	Introducción	154
5.2	Materiales y métodos	160
5.2.1	CDP utilizados	160
5.2.2	Líneas celulares y cultivo	161
5.2.3	Ensayo de citotoxicidad colorimétrico con resazurina.....	161
5.2.4	Ensayo de migración por herida de scratch.....	161
5.2.5	Formulaciones tópicas utilizadas	162
5.2.6	Efecto pro-cicatrizante de las formulaciones	162
5.3	Análisis de resultados.....	163
5.4	Resultados	164
5.4.1	Potencia de los compuestos en células	164
5.4.2	Efecto proliferante /migratorio del BC en las células HaCaT	164
5.4.3	Efecto proliferante /migratorio del eugenol en las células Vero y HaCaT.....	166
5.4.4	Efecto del tratamiento de las formulaciones tópicas en el cierre de heridas de los ratones	168
5.5	Discusión.....	172
5.6	Conclusiones	176
6	Efecto pro cicatrizante del tratamiento con CDP tópicos a nivel tisular	177
6.1	Introducción	177

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

6.2	Diseño experimental	179
6.3	Materiales y métodos	179
6.3.1	Muestras y pruebas comerciales utilizadas	179
6.3.2	Análisis histológico (Fase 1).....	180
6.3.3	Determinación de proteínas tisulares e IL-6, IL-1 β , VEGF y TNF- α (Fase 2)	181
6.3.4	Análisis estadístico.....	181
6.4	Resultados	182
6.4.1	Análisis histológicos por patología digital.....	182
6.4.1.1	B-cariofileno.....	182
6.4.1.2	Óxido de cariofileno.....	184
6.4.1.3	Eugenol.	189
6.4.1.4	Alantoína.....	190
6.4.1.5	Fitostimoline®.....	192
6.4.2	Niveles de citocinas en las lesiones excisionales de ratones BALB/c	195
6.5	Discusión.....	198
6.6	Conclusión	202
7	Conclusiones generales.....	202
8	Perspectivas.....	204
	Referencias bibliográficas.....	205
	Apéndice.....	229

Lista de tablas

Tabla 1 Algunos productos naturales con actividad cicatrizante.	41
Tabla 2 Aceites esenciales estudiados.	77
Tabla 3 Variables evaluadas en la implementación de prueba de viabilidad con resazurina.	81
Tabla 4 Variables evaluadas en la implementación de prueba de viabilidad con cristal violeta.	82
Tabla 5 Grupos experimentales ratones NG e HG tratados con FT® y controles.	89
Tabla 6 Controles positivos en cicatrización.	90
Tabla 7 Comparativa de la pérdida de viabilidad vs la citotoxicidad mediante cristal violeta y resazurina.	99
Tabla 8 Estructura 2D y peso molecular de CDP empleados en este Estudio.	123
Tabla 9 Listados de blancos terapéuticos evaluados por docking molecular.	127
Tabla 10 CDP utilizados en estudios de cribado.	128
Tabla 11 Objetivos terapéuticos utilizados en el cribado.	130
Tabla 12 Objetivos terapéuticos utilizados en el cribado (MD)	132
Tabla 13 Objetivos terapéuticos utilizados en el cribado.	133
Tabla 14 Valores de energía libre de unión para cada complejo ligando-receptor (media \pm DE).	137
Tabla 15 Compilación de resultados del acoplamiento molecular y las simulaciones de dinámica molecular para eugenol con las proteínas seleccionadas.	140
Tabla 16 Compuestos seleccionados para continuar su evaluación en el capítulo 2.	153
Tabla 17 Distribución experimental y tratamientos aplicados en los grupos experimentales.	163

Tabla 18 Parámetros histológicos en lesiones teñidas.	231
---	-----

Lista de figuras

Figura 1 Representación esquemática de las etapas de cicatrización cutánea.....	29
Figura 2 Representación de los componentes celulares que hacen parte de la fase inflamatoria y de la fase proliferativa/migratoria del proceso de cicatrización.....	31
Figura 3 Representación gráfica y descriptiva de diferentes tipos de heridas crónicas y cicatrices patológicas.....	34
Figura 4 Modelo TIME para el manejo de heridas.....	36
Figura 5 Modelos <i>in vivo</i> de cicatrización de heridas: sistemas unicelulares, multicelulares y cultivo de órganos.....	61
Figura 6 Modelos de lesión cutánea en ratones para el estudio de la cicatrización de heridas.....	63
Figura 7 Interacción ligando-receptor y análisis de estabilidad del complejo molecular.....	65
Figura 8 Acción de la STZ sobre las células β pancreáticas en modelos experimentales.....	70
Figura 9 Representación esquemática del modelo experimental para evaluar el efecto de la estreptozotocina (STZ) en la inducción de diabetes en ratones.....	72
Figura 10 Implementación de los ensayos realizados <i>in vivo</i> (Fase 1).....	73
Figura 11 Validación de las pruebas utilizando AE <i>in vivo</i> (Fase 2).....	74
Figura 12 Implementación de los modelos <i>in vivo</i> (Fase 3).....	75
Figura 13 Procedimiento para la medición de heridas en modelo animal.....	86
Figura 14 Porcentaje de reducción de resazurina bajo diferentes condiciones experimentales.....	94
Figura 15 Mapa de calor de la potencia (CC ₅₀) de los AE en células Vero.....	95
Figura 16 Mapa de calor de las absorbancias (570 nm) a diferentes concentraciones de células, de CV y tiempos de incubación.....	96

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

Figura 17 Efecto de los aceites esenciales sobre la viabilidad celular evaluada mediante ensayo de cristal violeta en células Vero.	97
Figura 18 Porcentaje de cierre de herida en ensayo scratch a 24 h (A) y 48 h (B).....	101
Figura 19 Microfotografías capturadas del ensayo scratch en células incubadas con medio de cultivo suplementado con SFBIC al 2,5%.....	102
Figura 20 Porcentaje de cierre de lesiones en el ensayo de scratch con células Vero-tratadas con los AE- 1-10 por 24 horas.	103
Figura 21 Microfotografías del ensayo de proliferación/migración por scratch en células Vero-tratadas con los AE. Sin teñir (tiempo 0) y teñidas con Giemsa.	104
Figura 22 Determinación de los niveles de glicemia en los días 1, 8, 15 y 22 en ratones BALB/c NG e HG tratados con STZ.	108
Figura 23 Seguimiento fotográfico de las lesiones en los distintos grupos experimentales.	110
Figura 24 Monitoreo del área de las lesiones (mm ²) en los días 1, 5 y 10 en los diferentes grupos experimentales de ratones BALB/c normoglucémicos e hiperglucémicos, tanto tratados como no tratados con FT®.....	111
Figura 25 Cicatrización in vivo en los diferentes grupos experimentales	112
Figura 26 Diseño experimental del capítulo 1	122
Figura 27 Niveles de interacción entre CDP y objetivos TT relacionados con la cicatrización de heridas.....	136
Figura 28 Comportamiento de la desviación cuadrática media (RMSD) de los compuestos seleccionados durante las simulaciones de dinámica molecular (100 ns).	139

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

Figura 29 Interacciones moleculares entre el eugenol y la enzima COX-2 en el sitio activo.....	141
Figura 30 Interacciones moleculares entre eugenol y la metaloproteinasas MMP-3.....	142
Figura 31 Interacciones 2D entre eugenol y las proteínas MMP-9, VEGFR1 y TNF- α	143
Figura 32 Análisis de RMSD de los complejos proteína–eugenol durante las simulaciones de dinámica molecular (100 ns).....	144
Figura 33 Interacciones de eugenol con los sitios activos de MMP-9 y VEGFR1 durante la dinámica molecular.....	146
Figura 34 Reordenamiento conformacional y estabilización de eugenol en el sitio activo de TNF- α	147
Figura 35 Etapas del desarrollo de medicamentos a partir de productos naturales.....	158
Figura 36 Diseño experimental.....	160
Figura 37 Resultados de citotoxicidad en células epiteliales Vero y queratinocitos HaCaT del eugenol.....	164
Figura 38 Microfotografía de las áreas de rasguño inducidas por alantoína, óxido de cariofileno y β -cariofileno en células HaCaT a las 24 y 48 horas.....	165
Figura 39 Porcentaje de cierre del área de rasguño inducido por Bcoxide, BC y alantoína (control positivo) en células HaCaT a las 24 y 48 horas.....	166
Figura 40 Efecto del tratamiento con eugenol en la migración células; ensayo de scratch.....	167
Figura 41 Efecto de 50 μ g/mL de eugenol en la migración celular a las 24 y 48 horas.....	168
Figura 42 Imágenes de lesiones cutáneas excisionales en ratones BALB/c seguidos los días 1, 5 y 10 para cada grupo experimental.....	169

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

Figura 43 Cierre de heridas inducido por el tratamiento tópico con CPD y controles en heridas excisionales de ratones BALB/c.....	170
Figura 44 Imágenes de las lesiones en los ratones BALB/c antes (día 0) y después del tratamiento con eugenol al 0,3% y Fitostimoline® y vehículo.....	171
Figura 45 Cierre de heridas inducido por el tratamiento tópico con eugenol y controles en heridas excisionales de ratones BALB/c.....	172
Figura 46 Efecto pro cicatrizante del tratamiento con CDP tópicos a nivel tisular	179
Figura 47 Imágenes histológicas teñidas para grupos experimentales tratados con BC.	182
Figura 48 Imágenes histológicas teñidas para grupos experimentales tratados con BCoxido.	184
Figura 49 Análisis de imágenes microscópicas de biopsias al final del tratamiento con trans β -cariofileno (BC), oxido de cariofileno(BOxido) y controles.....	187
Figura 50 Porcentaje de píxeles azules en tejidos teñidos con tricrómico de Masson tratados con BC y BCoxido	188
Figura 51 Imágenes histológicas teñidas para grupos experimentales tratados con Eugenol.....	189
Figura 52 Imágenes histológicas teñidas para grupos experimentales tratados con Alantoína.	190
Figura 53 Imágenes histológicas teñidas para grupos experimentales tratados con Fitostimoline®.	192
Figura 54 Análisis de imágenes microscópicas de biopsias al final del tratamiento con eugenol y controles.....	193

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

Figura 55 Porcentaje de píxeles azules en tejidos teñidos con tricrómico de Masson tratados con BC y BCoxido	194
Figura 56 Porcentaje de píxeles azules en tejidos teñidos con tricrómico de Masson tratados con eugenol.....	195
Figura 57 Niveles de citoquinas tisulares en tejidos de lesión.....	197
Figura 58 Microfotografías de tejido de cicatrización cutánea de ratones tras el uso de diversas técnicas de tinción histológica.	230
Figura 59 Evaluación de los niveles de citocinas en los lisados de tejidos de ratones heridos.	233

Lista de apéndices

Apéndice A. Resultados de la evaluación histológica y de los homogenizados de tejidos en ratones hiperglucémicos.	229
---	-----

Lista de abreviaturas**A**

AA: Ácido aristolóquico

AE: Aceites esenciales

Akt: Proteína quinasa B

B

BALB/c: Cepa de ratón de laboratorio

BC: β -cariofileno

BCoxido: Óxido de β -cariofileno

C

CDP: Compuestos derivados de plantas

CL: Ligando co-cristalizado

COX-2: Ciclooxigenasa-2

CV: Cristal violeta

CAT: Catalasa

CC50: Concentración citotóxica media

D

DMSO: Dimetilsulfóxido

DE: Desviación estándar

E

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

F

FAK: Quinasa de adhesión focal

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

FS®/FT: Fitostimulina®

G

GPx1: Glutación peroxidasa 1

GSK-3 β : Quinasa-3 β de la síntesis de glucógeno

H

HaCaT: Línea celular de queratinocitos humanos

H&E: Hematoxilina y eosina

HG: Hiperglucémico

I

IGF-R1: Receptor 1 del factor de crecimiento similar a la insulina

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

J

JNK: Quinasa N-terminal de c-Jun

M

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

MEC: Matriz extracelular

MD: Dinámica molecular

MMP: Metaloproteinasas de matriz

MT: Tricrómico de Masson

MTT: Ensayo de viabilidad celular basado en MTT

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

N

NG: Normoglucémico

NS: No significativo

P

PBS: Solución salina tamponada con fosfatos

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinasa

R

RMSD: Desviación cuadrática media de las raíces

ROS: Especies reactivas de oxígeno

S

SFBIC: Suero fetal bovino

SD: Desviación estándar

SOD2: Superóxido dismutasa 2

STZ: Estreptozotocina

T

TB: Azul de toluidina

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TIMPs: Inhibidores tisulares de metaloproteinasas

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

V

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

Vero: Línea celular epitelial de riñón de mono verde africano

Resumen

Título: Evaluación de la actividad pro cicatrizante de compuestos naturales derivados de plantas para su aplicación en heridas cutáneas.¹

Autor: Omar Andrés Casadiego Manosalva²

Palabras clave: Cicatrización de heridas, compuestos derivados de plantas, β -cariofileno, eugenol, citotoxicidad, cribado *in silico*, histopatología, inflamación, modelo murino.

Introducción: La cicatrización cutánea puede verse comprometida por condiciones metabólicas como la diabetes, lo que ha impulsado la búsqueda de alternativas terapéuticas más eficaces. Entre ellas, los compuestos derivados de plantas (CDP) destacan por sus propiedades biológicas y bajo perfil toxicológico. **Objetivo:** Evaluar el potencial procicatrizante de CDP seleccionados mediante estrategias computacionales, celulares y animales, orientadas al desarrollo de formulaciones tópicas para heridas cutáneas. **Metodología:** Se cribaron 34 CDP frente a 10 blancos terapéuticos relevantes mediante docking y dinámica molecular, seleccionando β -cariofileno y eugenol por su afinidad con COX-2, TNF- α , MMPs y VEGFR1. Luego, se evaluaron *in vitro* en células Vero y HaCaT mediante ensayos de viabilidad (resazurina y cristal violeta), proliferación y migración (scratch assay). Los compuestos se formularon en vehículo Koliphor y se aplicaron en modelos murinos normoglucémicos e hiperglucémicos con heridas excisionales bilaterales. Se analizaron cierre macroscópico, histología (H&E, tricómico de Masson y azul de toluidina) y niveles de IL-6, IL-1 β , TNF- α y VEGF por ELISA. **Resultados:** β -cariofileno no mostró citotoxicidad en Vero ni HaCaT hasta 100 μ M y estimuló significativamente la proliferación y migración de queratinocitos. Eugenol presentó citotoxicidad moderada a concentraciones elevadas, aunque en dosis seguras también promovió migración. En el modelo murino, ambos compuestos aceleraron el cierre de heridas frente al control, con mayor efecto para β -cariofileno. Histológicamente, se observó reepitelización más avanzada, mayor depósito de colágeno y reducción del infiltrado inflamatorio y de mastocitos. β -cariofileno disminuyó significativamente IL-6, IL-1 β y TNF- α , mientras VEGF permaneció elevado en fases tardías, favoreciendo la angiogénesis. **Conclusión:** β -cariofileno, óxido de cariofileno y eugenol demostraron efectos procicatrizantes en modelos celulares y animales, al modular proliferación, inflamación, angiogénesis y remodelación tisular. Su eficacia y seguridad respaldan su potencial en formulaciones tópicas, especialmente en contextos metabólicamente comprometidos como la diabetes, como estrategia terapéutica complementaria para mejorar la reparación de heridas crónicas.

¹ Tesis doctoral

² Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Directora: Patricia Escobar Ph.D.

Abstract

Title: Evaluation of the pro-wound-healing activity of plant-derived natural compounds for their application in cutaneous wounds.³

Author: Omar Andrés Casadiego Manosalva⁴

Keywords: Wound healing, plant-derived compounds, β -caryophyllene, eugenol, cytotoxicity, *in silico* screening, histopathology, inflammation, murine model

Introduction: Cutaneous wound healing can be compromised by metabolic conditions such as diabetes, which has encouraged the search for more effective therapeutic alternatives. Among them, plant-derived compounds (PDCs) have gained relevance because of their biological properties and low toxicological profile. **Objective:** To evaluate the pro-healing potential of selected PDCs through computational, cellular and animal strategies, aimed at developing topical formulations for cutaneous wounds. **Methodology:** Thirty-four PDCs were screened against 10 relevant therapeutic targets using molecular docking and molecular dynamics, selecting β -caryophyllene and eugenol for their affinity with COX-2, TNF- α , MMPs and VEGFR1. Subsequently, they were evaluated *in vitro* in Vero and HaCaT cells using viability assays (resazurin and crystal violet), proliferation and migration assays (scratch assay). The compounds were formulated in Koliphor vehicle and applied in normoglycemic and hyperglycemic murine models with bilateral excisional wounds. Macroscopic closure, histology (H&E, Masson's trichrome and toluidine blue) and IL-6, IL-1 β , TNF- α and VEGF levels were analyzed by ELISA. **Results:** β -caryophyllene showed no cytotoxicity in Vero or HaCaT cells up to 100 μ M and significantly stimulated keratinocyte proliferation and migration. Eugenol showed moderate cytotoxicity at high concentrations, although safe doses also promoted migration. In the murine model, both compounds accelerated wound closure compared with the control, with a stronger effect for β -caryophyllene. Histologically, more advanced re-epithelialization, increased collagen deposition, and reduced inflammatory infiltrate and mast cell numbers were observed. β -caryophyllene significantly decreased IL-6, IL-1 β and TNF- α , whereas VEGF remained elevated in late phases, supporting angiogenesis. **Conclusion:** β -caryophyllene, caryophyllene oxide and eugenol demonstrated pro-healing effects in cellular and animal models by modulating proliferation, inflammation, angiogenesis and tissue remodeling. Their efficacy and safety support their potential use in topical formulations, especially in metabolically compromised contexts such as diabetes, as complementary therapeutic strategies to improve chronic wound repair, and reduce the burden associated with delayed tissue healing.

3 Doctoral Thesis

4 Faculty of Health. School of Medicine. Director: Patricia Escobar Ph.D.

Introducción

La cicatrización de heridas cutáneas es un proceso biológico complejo, esencial para restablecer la continuidad anatómica y funcional de la piel (Guo & Dipietro, 2010; Martin & Nunan, 2015). En condiciones fisiológicas normales este proceso involucra tres fases principales y superpuestas: inflamación, proliferación, y remodelación. Cada fase conlleva eventos celulares y moleculares estrechamente coordinados, en los cuales intervienen factores de crecimiento, citoquinas y enzimas proteolíticas (Guo & Dipietro, 2010).

La mayoría de las heridas se cierran adecuadamente bajo condiciones normales, no obstante, diversos factores locales y sistémicos pueden entorpecer o retardar este proceso (Chang & Nguyen, 2001; Nussbaum et al., 2018). La infección, la hipoxia crónica, la hiperglucemia, las deficiencias nutricionales y enfermedades de base como diabetes mellitus (DM) promueven la formación de heridas crónicas. Dichas heridas se caracterizan por un estado inflamatorio persistente, sobreexpresión de algunas metaloproteinasas (MMPs) y disminución de factores de crecimiento y de la re-epitelización. Se conoce por ejemplo que en la DM la hiperglucemia favorece la glicación de proteínas y lípidos, aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Asimismo, disminuye la angiogénesis al afectar la expresión de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), e inhibe la migración y proliferación de queratinocitos y fibroblastos. Este microambiente adverso conduce a la cronicidad de las úlceras diabéticas, que resultan difíciles de curar y conllevan un gran impacto socioeconómico y clínico (M. Chang & Nguyen, 2001; Nussbaum et al., 2018).

La prevalencia creciente de heridas crónicas, particularmente las asociadas a la DM enfermedad metabólica con una prevalencia estimada entre el 4% y el 8% en Colombia, constituye un importante desafío para los sistemas de salud (Aschner, 2010). Esto ocurre no solo por su

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

impacto clínico y económico, sino también por la limitada eficacia de los tratamientos actuales, que se centran en el desbridamiento, el control de la infección y el uso de apósitos tradicionales. El desbridamiento, que implica la eliminación de tejido necrótico, es esencial para preparar el lecho de la herida y reducir la carga bacteriana; sin embargo, su efectividad puede verse limitada por factores como el dolor asociado al procedimiento y la posibilidad de dañar tejido sano. Estos tratamientos muchas veces resultan costosos, prolongados y dificultan la adherencia de los pacientes (Chang & Nguyen, 2001; Frykberg & Banks, 2015). Pese al desarrollo de novedosas alternativas terapéuticas tales como apósitos avanzados, terapias basadas en factores de crecimiento y modalidades físicas (como la oxigenoterapia hiperbárica), la compleja red de interacciones celulares, moleculares y sistémicas implicadas en la cicatrización sigue representando un reto para los científicos y para la industria farmacéutica (Pereira & Bártolo, 2016; Yamakawa & Hayashida, 2019).

Los productos naturales, especialmente los de origen vegetal, han sido utilizados durante siglos por la medicina tradicional como pro-cicatrizantes (Biswas & Mukherjee, 2003). Varias plantas han demostrado su eficacia en procesos de cicatrización debido a sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antiinflamatorias. *Aloe vera*, (Budovsky et al., 2015), *Centella asiática* y *Curcuma longa*. (Arribas-López et al., 2022; Biswas & Mukherjee, 2003). Los aceites esenciales (AE), extractos oleosos obtenidos de diversas partes de las plantas, han mostrado propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas, además de su capacidad para modular rutas moleculares clave de la cicatrización (Atanasov et al., 2015; Koyama et al., 2019). Los AE a su vez están compuesto por una mezcla de metabolitos secundarios volátiles, llamados en esta tesis como compuestos derivados de plantas o CDP, principalmente terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos), fenilpropanoides y otros compuestos aromáticos, que poseen

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

actividades biológicas importantes, tales como propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes y cicatrizantes (Dhifi et al., 2016; Lin et al., 2017).

Con el fin de identificar CDP con actividad biológica, los modelos computacionales como el acoplamiento molecular (docking), dinámica molecular (MD), farmacología de redes permiten predecir las interacciones de los CDP con sus posibles blancos terapéuticos, es este caso, aquellos implicados en el proceso de cicatrización, ofreciendo así una estrategia integral que facilita la selección racional de metabolitos vegetales con potencial pro-cicatrizante. Esta estrategia también optimiza su caracterización biológica, perfil toxicológico y biodisponibilidad antes de avanzar hacia las fases preclínicas y clínicas (Atanasov, 2021; Mustafa et al., 2023). Posteriormente se realizan ensayos en el laboratorio utilizando modelos experimentales que permiten evaluar la potencia de estos compuestos seleccionados frente al patógeno o su efecto sobre células tumorales, así como su capacidad como agentes pro cicatrizantes, en el contexto de nuestro estudio, donde se evalúan parámetros clave como la citotoxicidad, proliferación y migración celular. Posteriormente, estos hallazgos son validados en modelos animales para confirmar su efecto promotor en la cicatrización. Este enfoque multidisciplinario permite establecer una base sólida para la investigación traslacional, facilitando la transición de los descubrimientos preclínicos hacia aplicaciones clínicas seguras y eficaces.

El presente documento se encuentra organizado en un marco referencial y cuatro capítulos distribuidos como sigue: Una implementación inicial de modelos *in vitro* e *in vivo* donde se evaluaron condiciones como la concentración de células, la concentración del indicador de viabilidad y el tiempo de incubación para los ensayos de citotoxicidad (resazurina) y proliferación (cristal violeta). Continuando con los ensayos *in vivo*, en este mismo capítulo se implementó el ensayo de proliferación/migración celular, esta vez evaluando diferentes concentraciones celulares

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

y concentraciones de suero fetal bovino (SFBIC). In vivo, en este primer capítulo se implementaron las heridas excisionales a nivel dorsal en ratones BALB/c, para posteriormente emplearse la estreptozotocina (STZ) con el fin de generar roedores hiperglucémicos, midiéndose los niveles de glucosa, comparándose entre dos esquemas de inducción (una dosis alta vs varias dosis menores). Finalmente se realizó una revisión no sistemática de la literatura científica, empleándose la alantoína como control positivo *in vivo*. In vivo el control positivo fue la Fitostimoline® (FT), evaluada tanto en modelos normoglicémicos como hiperglucémicos. Aceites esenciales (AE) de plantas colombianas fueron caracterizados en los modelos *in vivo* implementados. Debido a la incapacidad para realizar cribados computacionales de los AE, se decidió continuar con CDP seleccionadas para el capítulo 2.

En el segundo capítulo se procedió con el cribado *in silico* de CDP vs blancos terapéuticos identificados y que hacen parte fundamental de los procesos de cicatrización cutánea. La selección inicial se realizó empleando *docking* molecular, para posteriormente realizarse dinámica moléculas (MD) con los mejores candidatos. Para el eugenol se empleó una estrategia de *target fishing* que permitió caracterizar la interacción del CDP con el sitio activo de los blancos terapéuticos.

El tercer capítulo se enfocó en la evaluación *in vitro* e *in vivo* de los CDP seleccionados en el capítulo dos en los cuales se determinó la citotoxicidad y la capacidad de inducción de proliferación/migración en células HaCaT y la capacidad cicatrizante en el modelo excisional normoglicémico, cuantificándose la progresión de las lesiones a través del tiempo.

Finalmente, en el capítulo cuatro, todas las lesiones producto de las lesiones *in vivo* tratadas y no tratadas fueron utilizadas para evaluar la cicatrización a nivel microscópico mediante el empleo de tinciones histológicas. Los homogenizados de estas lesiones fueron usados para cuantificar los niveles de citoquinas y factores de crecimiento.

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

La pregunta que se quiere responder en la presente propuesta de investigación es: ¿Pueden los compuestos naturales derivados de plantas colombianas con actividad cicatrizante *in vitro* promover la cicatrización de heridas cutáneas al ser aplicados *in vivo*, en una formulación tópica? La hipótesis planteada fue: La aplicación de una formulación tópica conteniendo compuestos naturales derivados de plantas colombianas seleccionados como cicatrizantes *in vitro*, promueve la cicatrización de heridas cutáneas en un modelo *in vivo*.

El desarrollo de mi tesis permitió la identificación de mecanismos de acción pro cicatrizante del BC y el eugenol, como la proliferación celular, actividad antiinflamatoria y deposición de colágeno, empleando una evaluación completa que involucra herramientas computacionales (*in silico*), celulares (*in vivo*) y en roedores (*in vivo*), así como la caracterización de las lesiones *ex vivo* (Histología y ELISA). Los hallazgos producto de este trabajo contribuyen a la búsqueda de nuevas terapias en la cicatrización, proponiendo la evaluación futura de las interacciones que se puedan producir entre CDP con actividad biológica en heridas cutáneas.

1 Objetivos

Los objetivos de esta investigación se formularon con el propósito de orientar de manera integral la evaluación de compuestos naturales derivados de plantas colombianas como posibles agentes procicatrizantes. Para ello, se planteó una aproximación experimental y computacional que permitió abordar el proceso de cicatrización desde diferentes niveles de análisis, incluyendo la selección *in silico* de compuestos con potencial actividad biológica, la evaluación de su efecto sobre modelos celulares de citotoxicidad, proliferación y migración, la validación de su actividad en modelos animales de heridas cutáneas y la caracterización tisular y molecular de las lesiones tratadas.

1.1 Objetivo general

El objetivo general de la presente investigación fue determinar el efecto pro cicatrizante de compuestos naturales derivados de plantas colombianas para su aplicación en formulaciones tópicas en heridas cutáneas.

1.2 Objetivos específicos

- Establecer los modelos de evaluación de la citotoxicidad, proliferación, migración, y cicatrización *in vivo* y en el modelo de ratones BALB/c normoglicémicos y hiperglicémicos;
- Seleccionar los CDPs con potencial cicatrizante mediante técnicas *in silico*, evaluando su interacción con blancos terapéuticos involucrados en la cicatrización;
- Evaluar el potencial pro-cicatrizante de los CDP *in vitro* e *in vivo* en modelos de heridas cutánea

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

- Caracterizar el efecto pro cicatrizante en lesiones excisionales tratadas y no tratadas mediante análisis histológicos y determinación de mediadores inflamatorios y angiogénicos.

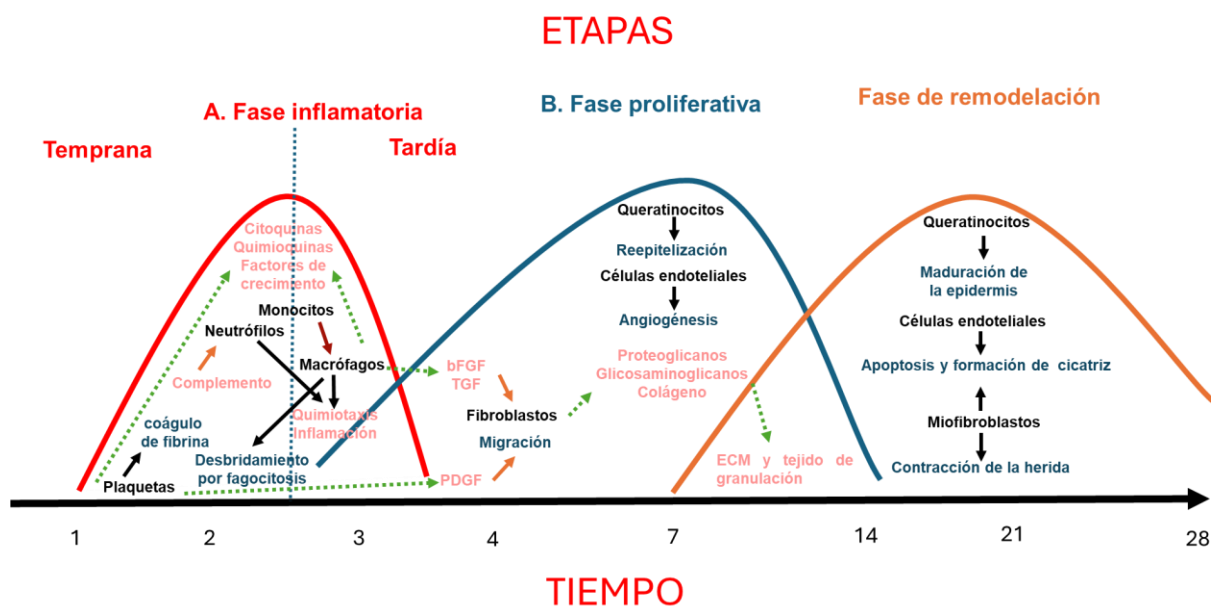
2 Cuerpo del trabajo

2.1 Marco referencial: Cicatrización cutánea

La cicatrización de heridas es un proceso dinámico y escalonado cuyo objetivo principal es recuperar la continuidad anatómica y funcionalidad de la piel tras un daño tisular (Broughton et al., 2006; Guo & Dipietro, 2010). Esta serie de eventos se inicia inmediatamente después de la lesión y se desarrolla, de modo aproximado, a lo largo de tres grandes fases: inflamación, proliferación y remodelación (Martin & Nunan, 2015). La secuencia temporal y los mecanismos moleculares específicos de cada etapa pueden superponerse, siendo fundamental la interacción de células residentes, células inmunitarias, factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular (MEC) para conseguir una reparación óptima del tejido (Figura 1).

Figura 1

Representación esquemática de las etapas de cicatrización cutánea.



Nota. A. Activación de neutrófilos, monocitos y macrófagos, liberación de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, quimiotaxis, desbridamiento por fagocitos y activación

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

del complemento. B. Reepitelización, angiogénesis y síntesis de matriz extracelular. C. Contracción de la herida, apoptosis, formación de cicatriz y maduración de la matriz extracelular (ECM). PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas, bFGF: Factor de crecimiento fibroblástico básico, TGF: Factor de crecimiento transformante.

La fase inflamatoria empieza de manera casi instantánea con la formación de un coágulo de fibrina, que sella los vasos sanguíneos dañados y proporciona un andamiaje inicial para la migración celular. Dentro del coágulo, las plaquetas liberan mediadores como TGF- β , PDGF, FGF y EGF, que estimulan la quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos. Los neutrófilos se encargan de la eliminación de patógenos y residuos celulares durante las primeras 24-48 horas, mientras que los macrófagos toman un papel predominante tras ese periodo, secretando citoquinas (TNF- α , IL-6, IL-1 β) y especies reactivas de oxígeno (ROS) que continúan limpiando la herida y orquestan la transición hacia fases posteriores (Qing, 2017). El balance de la respuesta inflamatoria es crítico, pues una inflamación excesivamente prolongada puede derivar en lesiones crónicas o en la formación de cicatrices hipertróficas (Guo & Dipietro, 2010).

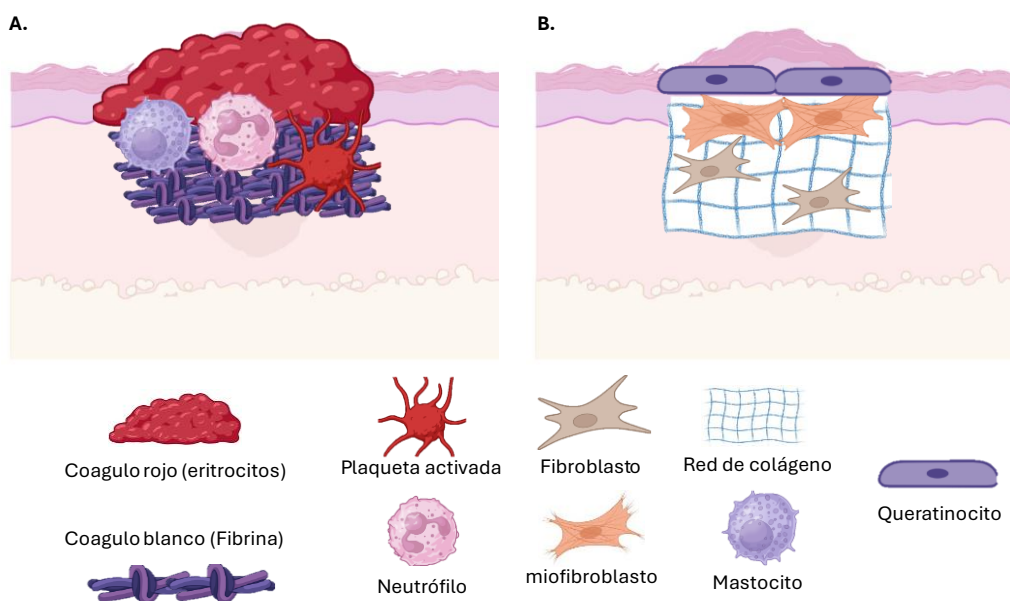
La fase proliferativa se inicia cuando disminuye la intensidad de la respuesta inflamatoria (Qing, 2017). Durante esta etapa, destacan tres procesos interrelacionados: la formación de tejido de granulación, la angiogénesis y la reepitelización. El tejido de granulación está compuesto por fibroblastos, células endoteliales y células inflamatorias incrustadas en una MEC provisional rica en fibronectina y colágeno de tipo III (Qing, 2017). Los fibroblastos migran al lecho de la herida atraídos por factores de crecimiento como PDGF y TGF- β , proliferan y comienzan a sintetizar colágeno, proteoglicanos y otras proteínas estructurales (Guo & Dipietro, 2010) (Figura 2b). Paralelamente, la angiogénesis ocurre gracias a la liberación de VEGF, FGF y angiopoyetinas, generando nuevos vasos que aportan oxígeno y nutrientes (Demidova-Rice et al., 2012; Ferrara et

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

al., 2003). La reepitelización, por su parte, implica la migración de queratinocitos desde los bordes de la herida y desde restos de anejos cutáneos, lo cual se ve facilitado por la acción de las metaloproteinasas de matriz (MMP) al remodelar la MEC (Qing, 2017).

Figura 2

Representación de los componentes celulares que hacen parte de la fase inflamatoria y de la fase proliferativa/migratoria del proceso de cicatrización.



Nota. A. Formación del coágulo rojo y blanco y activación de plaquetas, neutrófilos y mastocitos.

B. Actividad de los fibroblastos, miofibroblastos y queratinocitos en la síntesis de la red de colágeno y en la reepitelización de la herida.

La fase de remodelación comienza cuando el tejido de granulación ha llenado el defecto y se prolonga durante semanas, meses o incluso años (Qing, 2017). En esta etapa, el colágeno tipo III propio de fases tempranas cede espacio al colágeno tipo I, más resistente y organizado, que va aumentando la fuerza tensil de la cicatriz (Krishnaswamy et al., 2017; Summer et al., 2024). Los miofibroblastos, que derivan de fibroblastos estimulados por TGF- β y otros factores, participan

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

activamente en la contracción de los bordes de la herida (Singer & Clark, 1999). La remodelación de la MEC depende de un equilibrio regulado entre síntesis y degradación, en el que intervienen distintas MMP (MMP-1, MMP-2, MMP-9, entre otras) y sus inhibidores tisulares (TIMPs), evitándose así tanto la degradación excesiva de la matriz como su excesivo acúmulo (Krishnaswamy et al., 2017).

2.2 Heridas crónicas

Las heridas crónicas son aquellas que no presentan signos de cicatrización tras un periodo superior a tres meses. Se caracterizan por un estancamiento en la fase inflamatoria, un microambiente hostil con sobreproducción de ROS y un desequilibrio proteolítico que entorpece la formación de tejido de granulación (Frykberg & Banks, 2015). A estas alteraciones se suman la hiperactividad de MMPs y la inadecuada actividad de sus inhibidores TIMPs, lo que conduce a una degradación excesiva de MEC y de factores de crecimiento esenciales para la proliferación celular (Krishnaswamy et al., 2017). Como consecuencia, el tejido lesionado queda atrapado en una fase inflamatoria prolongada. Entre las heridas crónicas más frecuentes se encuentran las asociadas a diabetes, a alteraciones venosas o arteriales y a úlceras por presión (Jones et al., 2018). En el caso de la diabetes, la hiperglucemia persistente impulsa la formación de productos finales de glicación avanzada, moléculas que promueven el daño vascular, reducen la angiogénesis y prolongan la inflamación al potenciar la liberación de citoquinas proinflamatorias (MacLeod & Mansbridge, 2016).

Además, la neuropatía diabética interfiere con la percepción del dolor y retrasa el diagnóstico de lesiones, favoreciendo infecciones recurrentes e incrementando el riesgo de complicaciones graves (Dinh & Veves, 2005). Algunos ejemplos como las úlceras venosas en las piernas (VLU), las úlceras arteriales, las úlceras del pie diabético, las úlceras por presión y sus

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

características se muestran en la Figura 3. En términos de cicatrización anómala, las cicatrices hipertróficas y los queloides representan formas patológicas de reparación, donde las primeras suelen limitarse al área de la lesión original y regresan espontáneamente, mientras que los queloides, asociado a una predisposición genética, se extienden más allá de los márgenes del daño y presentan crecimiento constante (Dinh & Veves, 2005) (Figura 3). Las alteraciones moleculares en los tejidos de las heridas crónicas incluyen concentraciones elevadas de TNF- α , IL-1 β e IL-6, así como una activación sostenida de neutrófilos y macrófagos que liberan ROS, mediadores proinflamatorios y enzimas degradativas (Dinh & Veves, 2005). Esta persistencia inflamatoria promueve un entorno cada vez más dañino para células clave del proceso de reparación, como fibroblastos y queratinocitos, que ven limitadas sus capacidades de migración y proliferación.

Otro elemento determinante es la formación de biofilms bacterianos en la superficie de la herida, donde las bacterias, protegidas por una matriz extracelular propia, resisten la acción de antibióticos y de la inmunidad local, perpetuando la inflamación y retardando la cicatrización (Zhao et al., 2013).

Figura 3

Representación gráfica y descriptiva de diferentes tipos de heridas crónicas y cicatrices patológicas.

<p>Úlcera venosa</p> <ul style="list-style-type: none"> -Común en la vejez -Resultado de hipertensión venosa crónica -Inflamación persistente -Depósitos de hemosiderina -Lipodermatosclerosis 		<p>Úlcera arterial</p> <ul style="list-style-type: none"> -Suministro de sangre reducido -Isquemia y necrosis -Poco exudado -Piel atrofiada -Común en diabetes -Dolorosa
<p>Úlcera de pie diabético</p> <ul style="list-style-type: none"> -Común en diabetes -Hiperglicemia -Micro / macroangiopatía -Neuropatía -Infección -Deformidad en el miembro 		<p>Úlcera de presión</p> <ul style="list-style-type: none"> - Área de tejido necrótico - Causada por compresión prolongada del tejido suave -Isquemia local, húmeda -Asociado a la vejez y a comorbilidades
<p>Cicatrización hipertrófica</p> <ul style="list-style-type: none"> -Crecimiento rápido -Regresión en menos de 6 meses -Miofibroblastos αSMA⁺ -Fibras de colágeno paralelas a la superficie de la piel -Vasos sanguíneos orientados verticalmente 		<p>Queloides</p> <ul style="list-style-type: none"> - Crecimiento constante - Sin regresión espontánea - Se extiende más allá de los márgenes del tejido dañado - Predisposición genética - Haces de colágeno gruesos y desordenados

Nota. Cada cuadro detalla las características clínicas y fisiopatológicas principales de cada tipo de lesión. Adaptado de (Eming et al., 2014).

Al mismo tiempo, la senescencia o disfunción de fibroblastos y la alteración en la polarización de macrófagos (bloqueando la transición de un fenotipo M1 proinflamatorio a un fenotipo M2 reparador) se asocian a la incapacidad de las heridas crónicas para avanzar hacia la reepitelización y la remodelación (Krzyszczuk et al., 2018). Factores sistémicos, como la

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

desnutrición, la insuficiencia arterial o venosa y el mal control metabólico, agravan este cuadro al reducir el suministro de oxígeno y nutrientes, lo que restringe aún más la capacidad de regeneración tisular (Frykberg & Banks, 2015).

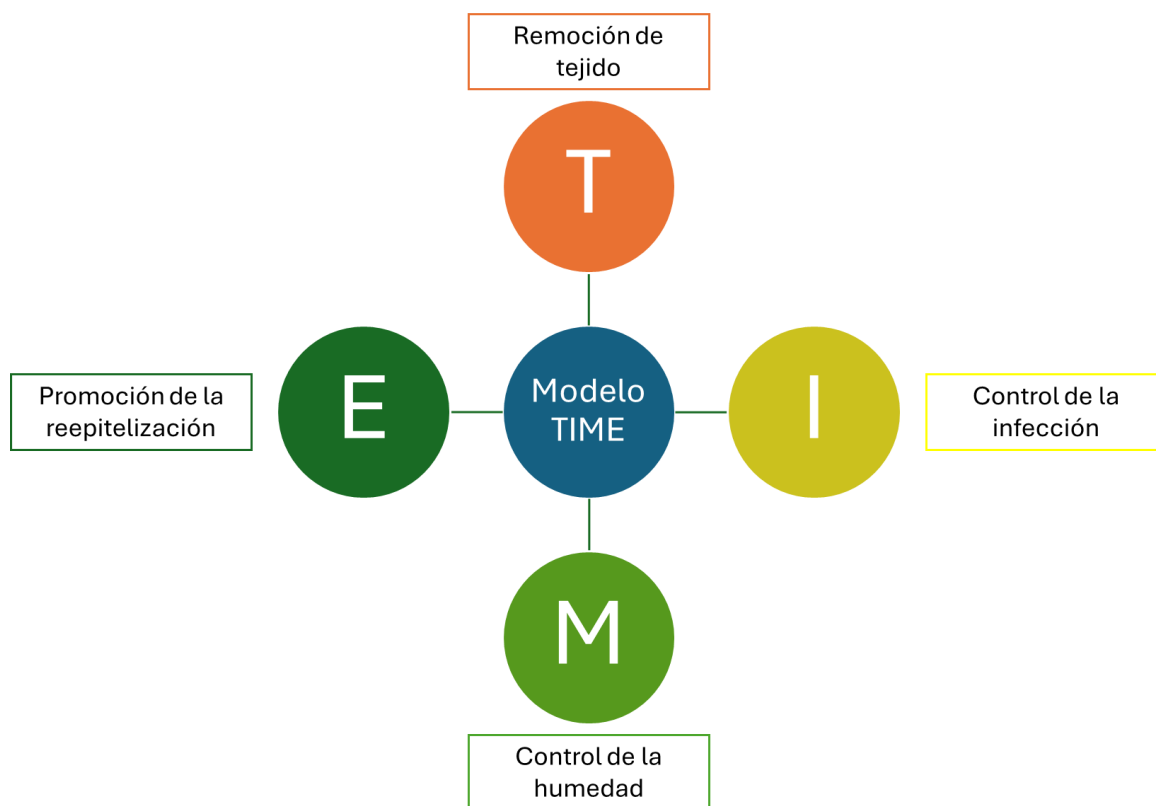
En conjunto, las heridas crónicas representan un desafío significativo para los pacientes y los sistemas de salud, debido a su elevada morbilidad, a los costos prolongados de tratamiento y a la posibilidad de derivar en complicaciones graves. La comprensión detallada de los procesos inflamatorios, moleculares y celulares que subyacen a la cronicidad de estas lesiones permite desarrollar intervenciones dirigidas a interrumpir los ciclos patológicos y a favorecer la regeneración. Aun así, la heterogeneidad de estas heridas, influida por factores locales, sistémicos y microbiológicos, subraya la necesidad de enfoques multidisciplinarios, terapias personalizadas y una constante innovación en técnicas de bioingeniería, para así optimizar la cicatrización y mejorar la calidad de vida de los pacientes (Nunan et al., 2014; Worsley et al., 2023).

2.3 Manejo y tratamiento de las heridas crónicas

El manejo de las heridas incluye tanto a la enfermedad de base como la herida. Los principios básicos de manejo se describen en el acrónimo TIME (Figura 4), donde la “T” identifica la remoción del tejido no viable mediante el desbridamiento quirúrgico o enzimático, la “I”, indica el tratamiento de la infección o la inflamación con el uso de antibióticos/formulaciones o antiinflamatorios, la “M” el control de la humedad mediante el uso de apósitos y la “E” para la promoción de la reepitelización y la formación de tejido granular mediante el uso de apósitos solos o en combinación con sustancias que promuevan dichos procesos (Halim et al., 2012).

Figura 4

Modelo TIME para el manejo de heridas.



El desbridamiento (quirúrgico o enzimática) se realiza con el fin de remover el tejido muerto permitiendo la proliferación y migración de las células epiteliales que van a restaurar el tejido. En condiciones normales existen enzimas endógenas con capacidad de degradar la fibrina. Exógenamente se utilizan diferentes tipos de apósitos elaborados con materiales capaces de: ocluir la herida protegiéndola contra infecciones, mantener la humedad necesaria para que el proceso de cicatrización se realice, generar un ambiente bajo en oxígeno para que se activen las vías de rescate de hipoxia del factor inducible por hipoxia 1 y favorecer la presencia y actividad de proteasas en el exudado que permitan la degradación autolítica del tejido necrótico (Ziello et al., 2007). En heridas secas está indicado el empleo de hidrogeles, mientras que para heridas exudativas se recomienda el uso de apósitos de alginato. El uso de productos basados en colágeno se reserva

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

para heridas de difícil curación o crónicas, funcionando como quimioatrayente y andamio para la proliferación/migración celular, y disminuyendo la presencia de ROS y proteasas (Chattopadhyay & Raines, 2014). Se encuentran diferentes tipos de apósitos: hidrocoloides, hidrogeles, hidropolímeros, hidro-fibras, espumas, apósitos para el control de la infección, apósitos para el control de las MMPs, películas no adherentes, apósitos de colágeno, alginatos, pieles sintéticas a base de queratinocitos (Dermagraft® y Apligraf®) u otros apósitos de fibrina y de heparina (Dhivya et al., 2015).

Para contrarrestar los niveles bajos de algunos factores de crecimiento en el fluido de las heridas crónicas, diversos factores han sido utilizados. El PDGF por ejemplo ha sido aprobado por la FDA para su aplicación en úlceras de pie diabético, y factores como el FGF, VEGF, EGF en formulaciones han mostrado resultados prometedores (Yamakawa & Hayashida, 2019). Sin embargo, la reversión hacia un correcto proceso de cicatrización es multifactorial y requiere de un equilibrio entre diferentes citoquinas y factores de crecimiento. Varias de sus limitaciones radican en su costo, efectividad dependiente del tipo de ulcera (úlceras ricas en proteasas) y la necesidad de un vehículo que permita su liberación sostenida para evitar su degradación.

Dos terapias físicas muy utilizadas son la terapia de presión negativa y la aplicación de oxígeno hiperbárico. La primera se encarga de mantener un ambiente húmedo, mejorando el suministro de sangre al tejido, reduciendo el edema, removiendo el exudado y promoviendo la angiogénesis y la formación de tejido granular (Panayi et al., 2017). La aplicación de un ambiente rico en oxígeno en una cámara hiperbárica permite que el oxígeno se disuelva en la sangre y llegue a los tejidos del cuerpo, promoviendo la curación y la regeneración, sin embargo, este sistema no es portable y requiere la hospitalización del paciente (Frykberg & Banks, 2015). Ambas terapias

presentan eventos adversos que limitan su uso continuado en heridas crónicas que comúnmente requieren de extensos tiempos de tratamiento (Tevanov et al., 2016).

2.4 Potencial de los productos naturales derivados de plantas en la cicatrización

Las limitaciones inherentes a la terapia convencional para el tratamiento de heridas han estimulado un interés creciente en el aprovechamiento de productos naturales, particularmente extractos de plantas empleadas tradicionalmente en la medicina etnobotánica y cuyas propiedades han sido validadas en múltiples contextos experimentales y clínicos (Atanasov et al., 2015; Pereira & Bártolo, 2016). Estos extractos vegetales, caracterizados por su compleja mezcla de metabolitos secundarios, han demostrado una notable capacidad para modular procesos fundamentales en el proceso de cicatrización, el control de la carga microbiana y la restauración del equilibrio redox tisular. Así, la evidencia disponible apunta a que extractos como el acuoso de *Triticum vulgare* (Fitostimoline®) ejercen un efecto dual al estimular la proliferación de fibroblastos y queratinocitos y al reducir de manera significativa la infiltración inflamatoria, favoreciendo con ello la formación de un tejido de granulación estable y organizado (Farinella et al., 1986; Tito et al., 2020). Por su parte, el empleo tópico de *Aloe vera* constituye una práctica ancestral respaldada por datos preclínicos y clínicos, ya que su composición, rica en acemananos, flavonoides, aminoácidos, vitaminas y minerales, facilita la migración y proliferación celular, promueve la síntesis de colágeno y contribuye a regular la liberación de citoquinas inflamatorias, lográndose, en consecuencia, tasas de curación elevadas en úlceras por presión y un cierre acelerado de heridas experimentales (Jensen et al., 2015; Oryan, Naeini, Nikahval, et al., 2010). Asimismo, los extractos etanólicos de *Calendula officinalis*, planta de amplia tradición en la medicina popular, han mostrado un perfil antiinflamatorio, antioxidante y procicatrizante, atribuible a su contenido en triterpenos, flavonoides y carotenoides, que se traduce en una mayor angiogénesis y una

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

proliferación eficiente de fibroblastos, acortando así los tiempos de reepitelización y mejorando la calidad del tejido reparado (Dinda et al., 2015; Parente et al., 2011). Por otro lado, el desbridamiento en heridas crónicas o necróticas representa un reto abordado mediante la aplicación de enzimas vegetales como la papaína y la bromelina, extraídas de *Carica papaya* y *Ananas comosus*, respectivamente, cuyas propiedades proteolíticas, antiinflamatorias y antimicrobianas han permitido su integración en matrices innovadoras de liberación controlada, potenciando su eficacia y reduciendo los eventos adversos (Anuar et al., 2008; Golezar, 2016).

Dentro de este amplio espectro de productos, los AE son particularmente relevantes debido a su perfil antimicrobiano y antiinflamatorio, resultado de su composición multifásica en monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos fenólicos que actúan de manera sinérgica sobre distintas dianas moleculares (Manfredi, 2007; Shaaban et al., 2012). Así, el eugenol, componente mayoritario del AE de clavo (*Syzygium aromaticum*) ha sido identificado como un potente antioxidante, con efectos directos en la inhibición del crecimiento microbiano y la modulación de metaloproteinasas de matriz y citoquinas, lo que favorece la preservación de la arquitectura tisular y la formación de un tejido de granulación organizado (Dashti et al., 2024; Murakami et al., 2003). De manera similar, AE extraídos de *Mentha piperita*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* y *Lavandula angustifolia* han mostrado eficacia frente a patógeno Gram positivos y negativos, contribuyendo a reducir la incidencia de infecciones asociadas a heridas y optimizando el microambiente reparativo (Seow et al., 2014; Solórzano & Miranda, 2012). Adicionalmente, se ha documentado que ciertos componentes fenólicos presentes en los AE pueden potenciar la acción de antibióticos convencionales o revertir mecanismos de resistencia antimicrobiana, hecho de particular relevancia en el contexto de la medicina contemporánea (Chan et al., 2011; Fujita et al., 2005).

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

Por último, el enfoque actual sobre los CDPs se centra en el aislamiento y caracterización de moléculas bioactivas individuales: flavonoides, terpenoides, compuestos fenólicos y alcaloides, cuyos efectos reguladores sobre la inflamación, el estrés oxidativo, la proliferación celular y la maduración de la matriz extracelular han sido demostrados en diferentes modelos experimentales. La curcumina, extraída de *Curcuma longa*, representa un ejemplo por su capacidad de ejercer simultáneamente efectos antioxidantes, inmunomoduladores y anticoagulantes, incidiendo de manera positiva en la angiogénesis y la formación de colágeno; en modelos de quemaduras y heridas excisionales; su aplicación ha conducido a una reducción significativa de la inflamación y a un aumento en la expresión de factores de crecimiento como TGF- β y bFGF, acelerando el proceso de cierre (Jardim et al., 2015; Kulac et al., 2013; Mahmood et al., 2015). Otros flavonoides, como la quercetina, la isorhamnetina y el kaempferol, han evidenciado una influencia en la maduración y organización de la matriz extracelular, repercutiendo favorablemente en la calidad estructural del tejido neogénico (Upadhyay et al., 2011). Asimismo, los alcaloides aportan mecanismos complementarios: la nicotina, en dosis bajas, estimula la angiogénesis a través de la modulación de receptores de acetilcolina y el aumento del calcio intracelular, mientras que la taspina, aislada del género *Aconitum*, incrementa la secreción de TGF- β 1 y EGF, impulsando la proliferación fibroblástica (Brown et al., 2016; Y. Dong et al., 2005). La piperina y la berberina, derivados de *Piper nigrum* y *Rhizoma coptidis*, ejercen efectos antimicrobianos mediante la alteración de la división bacteriana y la inhibición de la ARN polimerasa, reforzando así la protección del tejido en regeneración (Khan et al., 2006; Yi et al., 2007).

Pese a los avances y a la abundante evidencia experimental, la implementación extensiva de estos recursos naturales en la práctica clínica contemporánea aún enfrenta desafíos relevantes relacionados con la variabilidad en la concentración de principios activos, producto de factores

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

genéticos, edafoclimáticos y de procesamiento, y la ausencia de protocolos estandarizados para la extracción y formulación, lo que puede derivar en resultados inconsistentes (Lin et al., 2017; Pereira & Bártolo, 2016). En consecuencia, se hace imprescindible el desarrollo de ensayos clínicos controlados que validen la eficacia y seguridad de los fito-compuestos y sus formulaciones, permitiendo así consolidar su uso como coadyuvantes o alternativas terapéuticas frente a los tratamientos tradicionales (Tito et al., 2020). En este sentido, la medicina integrativa, que conjuga la terapia convencional con el uso racional de extractos, aceites esenciales y compuestos derivados de plantas con propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas, representa una estrategia prometedora y sostenible para la gestión integral de heridas agudas y crónicas (Firdous & Sautya, 2018). En la Tabla 1 se resumen algunos ejemplos de productos derivados de plantas con evidencia preclínica y clínica sobre la cicatrización.

Tabla 1

Algunos productos naturales con actividad cicatrizante.

Producto	Modelo	Tratamiento	Resultado	Referencia
Extracto de <i>Ageratina pichinchensis</i>	Úlcera venosa crónica	Extracto sobre la úlcera una vez a la semana/10 meses	Disminución del 89% desaparición 8 meses	(Romero-Cerecero et al., 2017)
Curcumina (<i>Curcuma longa</i>)	Quemaduras de segundo grado en ratas Wista	Aplicación tópica de 200 µl de curcumina al 100 mg/kg, una vez al día durante 12 días	Incremento significativo en la deposición de colágeno, angiogénesis, formación de tejido de granulación y reepitelización. Reducción de la inflamación.	(Kulac et al., 2013)
Ácido grandiflorénico	Ensayo de migración <i>in vivo</i>	2,5 -0,625 µg/mL/48 horas	100% de migración fibroblastos 2,5 y 72% (1,25 µg/mL)	(Balekar et al., 2012)

ESTUDIO INTEGRAL DE COMPUESTOS NATURALES

Producto	Modelo	Tratamiento	Resultado	Referencia
Extracto acuoso de <i>Triticum vulgare</i> (Fitostimoline®)	Heridas cutáneas y ensayos <i>in vivo</i> en fibroblastos y queratinocitos	Aplicación de extracto al 3% y 15% en cultivos celulares	Incremento de la migración celular, síntesis de fibronectina, polimerización de actina, expresión de HAS2 y actividad enzimática de β -glucocerebrosidasa; restauración de la barrera epidérmica.	(Tito et al., 2020)
AE de <i>Lippia sidoides</i>	Heridas de excisión	Ungüentos 6 y 12% una vez al día hasta el cierre	Cierre del 94% Incremento de COX-2	(Medeiros et al., 2023)
Extracto de hojas de <i>Piper betle</i>	Quemaduras y heridas de excisión	50 mg del extracto una vez al día hasta cierre	Cierre 80% al día 6 y 94% día 15. Peroxidación lipídica disminuida	(Lien et al., 2015)
<i>Heliotropium indicum</i>	Simulación de interacción molecular con proteínas de cicatrización	Docking molecular con fitoquímicos (eugenol, borneol, campesterol, entre otros) y proteínas implicadas en la cicatrización	Identificación de afinidades de unión elevadas entre compuestos como campesterol y proteínas relacionadas con la remodelación de tejidos, reducción de inflamación y cicatrización eficiente.	(Nagavalli et al., 2023)
Eugenol	Heridas excisionales	Gel de eugenol y betaciclodextrina dos veces al día por 15 días	Cierre de 92,5% disminución de TNF- α , IL-6 y MMP-9 e incremento de VEGF	(Li et al., 2019)
<i>Aloe vera</i> (<i>Aloe barbadensis</i> Miller)	Heridas cutáneas experimentales en ratas	Aplicación tópica de 1.5 mL de extracto acuoso una vez al día durante 5 días	Aceleración de la contracción de la herida desde el día 15, mejora en la alineación del tejido, menor infiltración de células inflamatorias y aumento significativo de propiedades biomecánicas en el día 20	(Oryan, Naeini, B., et al., 2010)
Timol	Heridas excisionales	Nanofibras de timol por 14 días	Cierre de 92,4%	(Karami et al., 2013)

2.5 Blancos terapéuticos no celulares en cicatrización

Se definen como blanco terapéutico en cicatrización a un componente específico del proceso, ya sea una célula, molécula o mecanismo, que desempeña un papel clave en cada fase y que puede ser modulado para optimizar la curación de heridas (Wilkinson & Hardman, 2023). A continuación, se definen varios blancos terapéuticos no celulares implicados en la cicatrización cutánea:

2.5.1 *TNF- α*

El factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$) ejerce funciones en cada una de las fases del proceso de cicatrización tanto en situaciones fisiológicas como patológicas (Grellner et al., 2000; Wallace & Stacey, 1998). Normalmente se libera en las primeras fases de la inflamación por macrófagos, neutrófilos y queratinocitos y contribuye a la respuesta defensiva mediante la atracción y activación de células inmunitarias (Ashcroft et al., 2012; Y. H. Yen et al., 2018). Estimula la proliferación de fibroblastos y queratinocitos, regula la actividad de MMPs y promueve la angiogénesis, facilitando la formación del tejido de granulación y la reepitelización (Jang et al., 2021; Xu et al., 2013). Cuando se mantiene elevado de manera prolongada, se convierte en un factor perjudicial para la reparación tisular. El aumento de $TNF-\alpha$ en heridas crónicas y en condiciones como la DM, perpetúa la inflamación y genera un entorno hostil que inhibe la proliferación y migración de las células (Huang et al., 2019); En modelos murinos la sobreproducción de $TNF-\alpha$ induce la polarización de macrófagos hacia el fenotipo M1, que secreta citocinas y quimiocinas proinflamatorias, retrasando la curación de la herida. Adicionalmente el $TNF-\alpha$ activa vías pro-apoptóticas, como la mediada por factor de transcripción Forkhead, y reduce la viabilidad de fibroblastos y células endoteliales afectando la síntesis de colágeno y la angiogénesis. Igualmente, un exceso de $TNF-\alpha$ interfiere en la activación y balance de las MMPs

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

y TIMPs, lo que dificulta la migración de queratinocitos y favorece la degradación excesiva de la MEC (Han et al., 2001; Huang et al., 2019).

El TNF- α también puede oponerse a la acción del TGF- β 1 al suprimir la fosforilación de Homólogo de Madres contra la Decapentapleja, miembro de la familia SMAD3, disminuyendo la formación de actina del musculo liso alfa y la contracción de la herida (Goldberg et al., 2007). En la diabetes, los AGE interactúan con el receptor RAGE, incrementando la producción de TNF- α (Dong et al., 2016; Xu et al., 2013). Dada la relevancia de esta citocina en la perpetuación de estados inflamatorios crónicos, diversos trabajos han evaluado el TNF- α como un blanco terapéutico. En modelos murinos diabéticos, la neutralización de TNF- α con anticuerpos monoclonales o la administración de antagonistas como Etanercept (receptor de TNF fusionada con una IgG1) logró mejorar la cicatrización, disminuir la actividad de NF- κ B y reducir la infiltración excesiva de macrófagos M1 (Huang et al., 2019).

La neutralización del TNF- α , disminuyó la apoptosis de fibroblastos, aumentó el depósito de colágeno y restauró parcialmente la migración celular en heridas cutáneas y en úlceras orales (Ashcroft et al., 2012). También se ha investigado la acción de compuestos con efectos moduladores indirectos sobre TNF- α , como la curcumina, que promueve niveles altos de esta citocina en la fase inflamatoria temprana y reduce su expresión en etapas tardías, mejorando así el cierre de la herida (Y. H. Yen et al., 2018). En ratones con deficiencia de TNF- α se ha observado una formación excesiva de tejido de granulación y retraso en la re-epitelización, lo que sugiere que el TNF- α , en condiciones normales y temporales, cumple un papel esencial y homeostático, siendo que su supresión total prolongada puede conducir a alteraciones en la vía TGF- β /Smad, con retrasos en los procesos de cicatrización (Shinozaki et al., 2009). Así, parece evidente que el TNF- α mantiene un rol dual: es indispensable en la fase inflamatoria inicial de la cicatrización, pero su

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

sobreexpresión persistente contribuye a la inflamación crónica y a la cicatrización deficiente (Goldberg et al., 2007; Xu et al., 2013). Ante esta complejidad, la inhibición selectiva y ajustada en el tiempo surge como una estrategia promisoriosa. Diversos modelos y estudios preliminares respaldan el empleo de anticuerpos monoclonales, moléculas inhibidoras transcripcionales y moduladores indirectos como herramientas para regular la producción o acción de TNF- α en heridas crónicas, especialmente en el contexto de la DM (M.-W. Dong et al., 2016; Holstad & Sandler, 2001).

2.5.2 MMP

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son enzimas dependientes de zinc que participan en la degradación y remodelación de la MEC durante la cicatrización de heridas. Su función es esencial para la migración celular, la formación de tejido de granulación y la reorganización del colágeno. No obstante, el desequilibrio de su actividad, debido a una sobreexpresión o a un bajo control por parte los TIMP, puede ocasionar retrasos en la reparación tisular o degradación excesiva de la MEC (Mohan et al., 2002; J. H. Yen et al., 2022). Las MMPs promueven la migración de queratinocitos y fibroblastos al degradar componentes de la membrana basal y el colágeno desnaturalizado. Su sobreexpresión sostenida impide la correcta reepitelización y la formación estable de nuevos vasos sanguíneos (Han et al., 2001; J. H. Yen et al., 2022). En el proceso de cicatrización cutánea, se han identificado MMPs clave como la MMP-2 y la MMP-9. Se ha demostrado que la MMP-9 regula tanto la inflamación como la disponibilidad de citocinas y factores de crecimiento, pudiendo en ciertos casos prolongar la fase inflamatoria e impactar negativamente la integridad del epitelio (Mohan et al., 2002). Algunas intervenciones, como la aplicación de naringina, han demostrado la capacidad de modular estos procesos, ya que incrementan la expresión de MMP-2, MMP-9 y MMP-14 en etapas tempranas, al tiempo que

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

regulan la actividad de TIMP-2 y promueven vías pro-angiogénicas como la de VEGF, dando como resultado un mejor cierre de la herida (Yen et al., 2022).

En heridas crónicas, como las úlceras venosas, una elevada expresión de MMP-1 y 2 se relaciona con un aumento en la degradación del colágeno y otros componentes de la MEC, retrasando la formación de tejido de granulación y la epitelización. Cuando los niveles descienden, tras algunas semanas de tratamiento, la tasa de cierre de la herida aumenta de forma significativa, con niveles de MMPs en equilibrio (Bergant Suhodolčan et al., 2021). La MMP-13 también participa en la remodelación y la vascularización del tejido, contribuye al crecimiento del tejido de granulación y a la organización de los miofibroblastos, por lo que una deficiencia o un exceso de esta enzima conlleva alteraciones en la angiogénesis y la contracción de la herida (Toriseva et al., 2012). Elevada expresión de colagenasas (MMP-1) y gelatinasas (MMP-2) también se ha relacionado con el daño cutáneo inducido por radiación ultravioleta (UV), relacionándose con la degradación acelerada de la MEC, el foto-envejecimiento y alteraciones de la integridad dérmica. Los flavonoides y vitaminas antioxidantes ayudan a reducir la sobreexpresión de MMP-1 y MMP-2, pudiendo restaurar el balance MMP/TIMP y salvaguardar la calidad de la MEC (Hantke et al., 2002). Por otra parte, el TNF- α regula la activación de pro-MMP-2 a través de la vía NF- κ B y MT1-MMP, generando un efecto en la degradación de la MEC (Han et al., 2001).

La modulación selectiva de las MMP es un objetivo terapéutico relevante. En el caso de heridas inflamatorias, el uso controlado de inhibidores de MMP-9 o MMP-1 puede limitar la degradación excesiva de colágeno e impulsar la cicatrización (Ågren et al., 2015). Se ha observado que la curcumina regula temporalmente la MMP-9, donde una elevación inicial favorece el “despeje” de la zona lesionada y un descenso en etapas posteriores evita el daño en la MEC y facilita el depósito de colágeno (Yen et al., 2018). El anticuerpo monoclonal Adalimumab,

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

utilizado en condiciones inflamatorias crónicas como la hidradenitis supurativa, ha demostrado inhibir rutas que conducen a la producción de MMPs proinflamatorias, al mismo tiempo que promueve la expresión de MMP-13 y TIMP-2, cruciales para la remodelación y el cierre de la herida (Cao et al., 2021). Considerando el papel fundamental de las MMPs en la fisiología de la cicatrización, existe un interés creciente en el desarrollo de inhibidores selectivos, así como en la manipulación de vías alostéricas y exosíticas para evitar la inhibición indiscriminada de múltiples MMPs. Las terapias de tercera y cuarta generación, basadas en la inhibición alostérica o la unión a dominios específicos, podrían lograr una acción más precisa, minimizando los efectos adversos observados con inhibidores de amplio espectro (Li et al., 2020). Además, la inhibición de MMPs en la herida mediante apósitos inteligentes capaces de secuestrar estas enzimas en el exudado, o la liberación controlada de compuestos anti-MMP, se vislumbran como opciones prometedoras para heridas de difícil cicatrización (Caley et al., 2015; Krishnaswamy et al., 2017). No obstante, una inhibición total de la actividad proteolítica no es deseable, puesto que las MMP también resultan indispensables para la reepitelización, la angiogénesis y la remodelación final del tejido (Chen & Parks, 2009; Gill & Parks, 2008).

2.5.3 COX-2

La ciclooxigenasa-2 (COX-2) es una enzima clave en la síntesis de prostanoïdes durante la respuesta inflamatoria y ha sido relacionada con diferentes etapas de la cicatrización de heridas, en particular cuando existe un componente inflamatorio exacerbado. No obstante, la evidencia sobre su relevancia terapéutica en la cicatrización muestra resultados heterogéneos. En el caso de las úlceras venosas crónicas, su expresión inicial no se correlacionó con la mejoría o la velocidad de cierre de la herida, indicando un papel limitado en la predicción de la evolución clínica (Bergant Suhodolčan et al., 2021). Sin embargo, en otros modelos de úlceras y lesiones se ha visto que la

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

inhibición selectiva de COX-2 puede modificar de manera sustancial la respuesta inflamatoria y, con ello, la calidad de la reparación tisular. En úlceras por presión inducidas experimentalmente, la administración de celecoxib (un inhibidor selectivo de COX-2) redujo la inflamación crónica, el daño oxidativo y la expresión de óxido nítrico sintasa inducible y COX-2, facilitando así la reepitelización, la contracción de la herida y la formación de tejido dérmico organizado (Romana-Souza et al., 2016). De manera similar, en el tracto gastrointestinal, la inhibición de COX-2 impacta la cicatrización de úlceras, aunque no siempre de forma beneficiosa: si bien disminuye la producción de prostanoïdes proinflamatorios, también puede perjudicar la formación de nuevos vasos y la síntesis de prostaglandinas necesarias para la mucosa gástrica (Barnett et al., 2000; Harsch et al., 2003). Esto hace evidente la complejidad de su participación, pues la COX-1 y la COX-2 tienen roles compartidos y, a la vez, diferenciados en la protección y reparación de tejidos, con implicaciones clínicas importantes a la hora de utilizar inhibidores selectivos.

Varios estudios en modelos cutáneos apuntan a que la inhibición de COX-2 no retrasa la cicatrización de heridas excisionales: en ratones SKH-1, los inhibidores selectivos no alteraron de manera significativa la reepitelización, la angiogénesis ni la resistencia tensil de las heridas, sugiriendo la presencia de vías alternas que compensan la falta de prostaglandinas derivadas de COX-2 (Blomme et al., 2003). Alternativamente, en estados patológicos como la diabetes, la reducción de la actividad COX-2 podría ser contraproducente, pues en algunos casos disminuye aún más la síntesis de prostaglandina E2 y compromete la irrigación sanguínea en la zona lesionada, afectando la reparación (Harsch et al., 2003). Además, existe interés en compuestos naturales con actividad moduladora de COX-2. Por ejemplo, la genisteína y otros polifenoles pueden reducir la expresión de COX-2 y otros mediadores inflamatorios (TNF- α , IL-1 β , iNOS) en contextos de hiperglucemia, mejorando la cicatrización a través de la protección antioxidante y la

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

activación de vías celulares como Nrf2 (Eo et al., 2016). También se han descrito aceites marinos, como el obtenido del pez Peters' elephant-nose, con ácidos grasos poliinsaturados capaces de inhibir selectivamente COX-2 y disminuir la reacción inflamatoria en el sitio de la herida, favoreciendo la reepitelización y la deposición de colágeno (Alsenani et al., 2021). Aunque COX-2 se presenta como un actor relevante en la respuesta inflamatoria y el microentorno de las lesiones cutáneas y de la mucosa, su contribución exacta a la cicatrización depende del tipo de tejido, del contexto de la lesión (aguda, crónica o asociada a comorbilidades) y de las vías compensatorias que regulan la reparación. Si bien la inhibición selectiva de COX-2 puede mejorar procesos inflamatorios excesivos (por ejemplo, en úlceras por presión o lesiones con inflamación prolongada), no siempre se traduce en una cicatrización óptima en situaciones donde las prostaglandinas derivadas de COX-2 resultan esenciales para la formación de nuevos vasos, el reclutamiento celular adecuado y la síntesis de matriz extracelular.

2.5.4 VEGF

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores (principalmente VEGFR-1/FLT-1, VEGFR-2/KDR y VEGFR-3) desempeñan un papel central en la angiogénesis durante la reparación tisular. En el proceso de cicatrización, la neovascularización se torna esencial para aportar oxígeno y nutrientes al tejido en regeneración; de ahí la relevancia de regular positivamente la producción de VEGF y de activar las vías de señalización vinculadas a sus receptores. La internalización de VEGF y sus receptores resulta clave para la recuperación endotelial. Se ha observado que la endocitosis de VEGFR-2 (KDR) mediada por VEGF es indispensable para la recuperación de la monocapa endotelial después de un daño mecánico. Bloquear receptores como VEGFR-1 (FLT-1) puede interferir en este proceso y retrasar la cicatrización (S. C. R. Santos et al., 2007). Por otro lado, la señalización de VEGFR-1, aunque

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

presenta menor actividad de tirosina quinasa que VEGFR-2, facilita la angiogénesis y la linfangiogénesis al reclutar macrófagos y otras células derivadas de médula ósea que secretan VEGF-C y EGF. Esta cooperación regula tanto la formación de vasos sanguíneos como la proliferación epitelial en situaciones donde se requiere restaurar tejidos lesionados (Murakami et al., 2008; Sato et al., 2014). La vía VEGF/VEGFR es un blanco terapéutico de amplio interés. En el contexto oncológico, se han utilizado inhibidores de VEGF o VEGFR para bloquear la angiogénesis tumoral, mientras que en patologías isquémicas o heridas crónicas en piel se tiende a potenciar su acción para mejorar la perfusión y la regeneración. La modulación pro-angiogénica se ilustra en la aplicación de fenitoína tópica, que incrementa la expresión de VEGF y TGF- β y acelera el cierre de heridas. Asimismo, PDRN (poli-desoxirribonucleótido) favorece la cicatrización en un entorno hiperglucémico al aumentar los niveles de VEGF, reduciendo la inflamación y estimulando la síntesis de colágeno (Yun et al., 2023). De igual forma, la normalización de la glucemia restaura la expresión y estabilidad de VEGFR-2, revirtiendo la degradación asociada a la hiperglucemia y facilitando la angiogénesis (Dokun et al., 2014). El desequilibrio metabólico en la DM repercute muy negativamente en la producción de VEGF, prolongando estados inflamatorios y reduciendo el aporte sanguíneo al lecho de la herida, como se ha evidenciado en úlceras gástricas y en heridas cutáneas con cicatrización deficiente (Harsch et al., 2003).

Diversos agentes de origen natural, como el aceite de semillas de moringa o la combinación de extracto de *Teucrium polium* y *Aloe vera* han demostrado incrementar la síntesis local de VEGF, mejorar la deposición de colágeno y atenuar la respuesta inflamatoria, produciendo resultados superiores en el cierre de heridas, en especial en hiperglicemia. Dichos efectos se han asociado con un aumento significativo de TGF- β 1 y una reducción de citocinas proinflamatorias

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

(Gharaboghaz et al., 2020; Shady et al., 2022). La naringina, un compuesto fenólico, incrementa la expresión de VEGF-A-C y de sus receptores (como VEGFR-3), promoviendo la angiogénesis y la migración celular en modelos experimentales de cicatrización cutánea. Este efecto queda demostrado por el bloqueo del VEGF con bevacizumab, el cual elimina la mejora en la migración y cierre de heridas mediadas por naringina. Paralelamente, la mayor densidad vascular y la remodelación de la MEC contribuyen a un cierre acelerado de la lesión (Yen et al., 2022). Dicho mecanismo coincide con hallazgos similares en la cicatrización de fracturas osteoporóticas, donde la naringina, a través de la vía VEGF/VEGFR-2, acelera la formación de vasos y el callo óseo (Song et al., 2017).

2.5.5 IL-6

La interleucina-6 (IL-6) es una citocina pleiotrópica con importantes funciones en la respuesta inflamatoria y la remodelación tisular (Johnson et al., 2020). La IL-6 se libera rápidamente en el sitio de la lesión, favoreciendo el reclutamiento neutrófilos y macrófagos y la liberación de una cascada de mediadores proinflamatorios. En modelos murinos la ausencia de IL-6 induce una disminución en la infiltración de células inmunitarias, retraso en el cierre y formación de tejido de granulación (Grellner et al., 2000). La acción de IL-6 es crucial para equilibrar la producción de citocinas y quimiocinas en la fase inflamatoria y coordinar la transición hacia la fase proliferativa. Tejidos humanos revelan un incremento significativo de IL-6 en heridas vitales, en comparación con piel intacta o heridas post mortem, reforzando su papel como marcador temprano de inflamación y activación tisular (Lin et al., 2003). Durante la fase proliferativa, la IL-6 contribuye a la activación de la vía de señalización JAK/STAT3, la cual es esencial para la proliferación y migración de fibroblastos y queratinocitos (Gallucci et al., 2000). Los fibroblastos generan colágeno, fibronectina y otras proteínas estructurales de la MEC, mientras que los

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

queratinocitos reepitelizan la superficie dañada. La activación de STAT3 favorece la síntesis de MMPs, facilitando una remodelación equilibrada de la MEC y un crecimiento ordenado de las células epiteliales (Lee et al., 2019).

La IL-6 estimula la diferenciación de fibroblastos hacia miofibroblastos, células que contraen la herida y ayudan a reducir el área lesionada (Grellner et al., 2000; Johnson et al., 2020). Sin embargo, una sobreexpresión o persistencia excesiva de IL-6 en etapas posteriores puede desencadenar un estado inflamatorio crónico, impulsando la formación de cicatrices hipertróficas o queloides (Johnson et al., 2020). Por otro lado, la deficiencia de IL-6, como ocurre en ratones knockout para esta citocina, conduce a una cicatrización defectuosa con retraso significativo en la reepitelización, menor neovascularización y una síntesis reducida de colágeno (Gallucci et al., 2004). En la DM, los niveles elevados de IL-6, junto con otras citoquinas proinflamatorias, perpetúan la fase inflamatoria en heridas, dificultando el avance hacia la fase proliferativa y la remodelación (Lee et al., 2019). Esto se relaciona con la desregulación de vías intracelulares, la inhibición del fenotipo de macrófagos reparadores M2 y la disfunción en la actividad de fibroblastos y queratinocitos. Así, pacientes con diabetes u obesidad a menudo presentan mayor susceptibilidad a heridas crónicas y una regeneración tisular lenta y deficiente (Bermudez et al., 2011).

Un aspecto interesante de IL-6 es su mecanismo de acción indirecto en la migración de queratinocitos. Esta citoquina, aplicada directamente a cultivos de queratinocitos, no induce migración celular de manera significativa. Sin embargo, cuando los fibroblastos se trataban con IL-6, éstos secretaban factores solubles que promueven la migración de queratinocitos *in vivo* (Gallucci et al., 2004). Este mecanismo celular, mediado en parte por STAT3, sugiere que IL-6 regula la liberación de moléculas pro-migratorias por parte de los fibroblastos, impulsando un

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

efecto indirecto en la reepitelización de la herida. En el plano terapéutico, la modulación de IL-6 constituye una estrategia potencial para mejorar la cicatrización en distintas patologías. El uso de anticuerpos monoclonales contra el receptor de IL-6 (tocilizumab) o el bloqueo de su señalización aguas abajo se ha evaluado en enfermedades fibróticas y autoinmunes, con resultados prometedores (Johnson et al., 2020).

2.5.6 *IL-1*

La interleucina-1 (IL-1) es una citocina proinflamatoria que desempeña un papel esencial en la regulación de la respuesta inmune y la reparación tisular tras una lesión cutánea (Hu et al., 2010). Existen dos isoformas principales, IL-1 α e IL-1 β , así como un antagonista natural conocido como IL-1Ra. Estas moléculas actúan de manera coordinada para orquestar la fase inflamatoria de la cicatrización de heridas y, posteriormente, influir en el proceso de proliferación y remodelación del tejido dañado (Macleod et al., 2021). En condiciones fisiológicas, la señalización de IL-1 contribuye a la liberación de quimiocinas y factores de crecimiento que dirigen la infiltración de neutrófilos y macrófagos al sitio de la herida durante las primeras 48 horas (Hu et al., 2010; Mauviel et al., 1991). Estos leucocitos participan en la eliminación de restos celulares y patógenos, evitando la infección y preparando el lecho de la herida para fases posteriores. La IL-1 promueve la activación de queratinocitos y fibroblastos, lo cual resulta en la síntesis de mediadores proinflamatorios, MMPs y proteínas de la MEC (Grellner et al., 2000; Tan et al., 2021). Sin embargo, un exceso sostenido de IL-1 puede prolongar la fase inflamatoria y retrasar la transición a la fase proliferativa. Estudios forenses en tejido humano confirman que los niveles de IL-1 β se incrementan de forma significativa en heridas vitales, lo que refuerza la idea de que IL-1 es un indicador temprano de la respuesta inflamatoria (Grellner et al., 2000). Si bien esta actividad es

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

beneficiosa al comienzo, su persistencia puede derivar en inflamación crónica o en la formación de cicatrices hipertróficas y queloides (Macleod et al., 2021; Tan et al., 2021).

En DM, la desregulación de IL-1 juega un papel destacado en el retardo de la cicatrización. Investigaciones en modelos murinos y en heridas crónicas de pacientes diabéticos muestran que la sobreproducción de IL-1 β , asociada a una menor expresión de IL-1Ra, perpetúa el microambiente inflamatorio y reduce la proliferación de células fundamentales para la reparación (Okizaki et al., 2016; Yan et al., 2016). En córneas de ratones diabéticos, la administración tópica de IL-1Ra rescató en gran medida la capacidad de reepitelización, disminuyendo la apoptosis y restaurando la señalización necesaria para la regeneración del epitelio (Yan et al., 2016). En otro modelo, el bloqueo de IL-1 β disminuye la producción de mediadores proinflamatorios y modula la polarización de macrófagos hacia un fenotipo reparador (M2) (Jetten et al., 2014). Esta estrategia se ha aplicado con éxito en modelos diabéticos y de otras etiologías, reduciendo la fibrosis excesiva y acelerando la cicatrización. Aun así, los resultados sugieren que se requiere un manejo temporal de la inhibición de IL-1, pues su presencia inicial es crucial para el reclutamiento celular y la defensa antimicrobiana (Macleod et al., 2021; Tan et al., 2021). La administración de un IL-1Ra modificado permitió controlar la inflamación y, simultáneamente, mejorar la formación de nuevo tejido de granulación y la migración de fibroblastos (Tan et al., 2021). Es importante destacar la regulación autocrina de IL-1 en fibroblastos y queratinocitos. La producción de IL-1 β puede inducirse mediante IL-1 α y TNF- α a través de rutas intracelulares dependientes de proteína quinasa C (PKC) y adenilato ciclasa, sugiriendo un refinado control retroalimentado entre distintas citoquinas durante el cierre de la herida. Este mecanismo, unido a la influencia de la microbiota local y factores sistémicos (como la hiperglucemia), subraya la complejidad del rol de IL-1 en la cicatrización (Mauviel et al., 1991).

2.5.7 GSK

La glicógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) es una quinasa serina/treonina multifuncional que participa en la regulación de vías celulares críticas para la cicatrización de heridas, como la Wnt/ β -catenina, vía de señalización Hedgehog o la ruta PI3K/AKT (Doble & Woodgett, 2003). Su inhibición en momentos clave del proceso reparativo promueve la acumulación de β -catenina y potencia la expresión de genes asociados con la proliferación y migración de células epiteliales y mesenquimales. Esta actividad coordina la formación de nuevo tejido de granulación, la angiogénesis y el remodelado de la matriz extracelular (Kapoor et al., 2008; Paramesha et al., 2015). Por el contrario, la hiperactividad de GSK-3 puede frenar la proliferación celular, intensificar la apoptosis y prolongar la fase inflamatoria, afectando negativamente la calidad y la velocidad de la reparación tisular (Jere et al., 2019).

Estudios preclínicos han demostrado que la inactivación de GSK-3 β (mediante fármacos inhibidores o mutantes génicos) estimula la producción de colágeno, acelera la epitelización y, en algunos casos, incrementa la fibrosis a través de mediadores como la endotelina-1 (ET-1) (Kapoor et al., 2008; Paramesha et al., 2015). GSK-3 β también actúa como un regulador en la transición desde un estado de inflamación controlada hacia la formación excesiva de cicatrices. Compuestos naturales, por ejemplo, taraxerol, lupeol, o extractos vegetales de *Naravelia zeylanica*, *Entada pursaetha* o *Convolvulus arvensis* y moléculas sintéticas como dehidroabietilamina, entre otras muestran una afinidad significativa por el sitio activo de GSK-3 β , actuando como posibles promotores de la cicatrización (Doble & Woodgett, 2003; Kapoor et al., 2008; Paramesha et al., 2015). Los ensayos *in silico* y los estudios *in vivo* subrayan que la inhibición de GSK-3 β modula vías fundamentales (como Wnt/ β -catenina y NF- κ B), reduce la apoptosis excesiva y potencia la proliferación celular, al tiempo que mejora la deposición de colágeno y la formación de nuevos

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

vasos sanguíneos (Harish et al., 2008; Saleem et al., 2022). El control selectivo de GSK-3 es esencial, pues la inhibición prolongada puede conllevar efectos adversos, como la transformación neoplásica o una fibrosis exacerbada. Por ello, se han propuesto enfoques terapéuticos basados en la administración temporal y localizada de inhibidores de GSK-3 β o en la combinación con agentes antifibróticos (bloqueadores de endotelina-1) (Kapoor et al., 2008; Paramesha et al., 2015).

2.5.8 FGF

El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) es una familia de proteínas con un papel clave en la proliferación celular, la angiogénesis y la remodelación tisular, todos ellos procesos esenciales para la cicatrización de heridas. Entre los miembros de esta familia, el FGF-2 (también conocido como bFGF) ha recibido especial atención por su capacidad para estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos, promover la migración y proliferación de fibroblastos y queratinocitos, y favorecer la síntesis de la matriz extracelular (Kitamura et al., 2011; Sahni et al., 2006). Estudios experimentales sugieren que la aplicación de FGF-2, ya sea tópica o sistémica, acelera los procesos regenerativos y mejora la calidad del tejido cicatrizado (Koike et al., 2020; Latifi-Pupovci et al., 2015; Seyed Ahmadi et al., 2019). El FGF-2 tiene la capacidad de unirse a la fibrina o al fibrinógeno, potenciando su efecto angiogénico. Esta interacción protege a FGF-2 de la degradación proteolítica, facilitando su localización en zonas lesionadas y estimulando la proliferación y migración de células endoteliales (Sahni et al., 2006). Al evaluar la liberación sostenida del FGF-2 impregnado en microesferas de gelatina para mejorar la supervivencia del tejido en amputaciones digitales, los autores encuentran que, si bien no hubo una diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control, sí se advirtió una mejor supervivencia tisular en los pacientes tratados, lo que podría atribuirse a la capacidad de estas microesferas para contrarrestar la vida media sumamente corta del FGF-2 en su forma libre (Kusuhara et al., 2011).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

La evaluación del FGF-2 en un ensayo clínico multicéntrico en la regeneración periodontal de pacientes con periodontitis avanzada, mostró que, tras 36 semanas, los pacientes que recibieron FGF-2 mostraron un relleno óseo alveolar significativamente superior (alrededor del 50% en promedio) con respecto a los grupos control. Se propuso que FGF-2 estimula la proliferación de células progenitoras mesenquimales del ligamento periodontal, fomenta la angiogénesis y promueve la formación de cementoblastos, logrando así una regeneración estructural y funcional más efectiva de los tejidos (Kitamura et al., 2011). El FGF-2 también está implicado en la transición epitelio-mesenquimal de los queratinocitos durante la cicatrización. En ensayos con ratones, la aplicación de FGF-2 redujo el tiempo de cierre de las heridas de manera significativa (7,8 versus 9,8 días en el control) y promovió un cambio fenotípico en los queratinocitos que facilitó su migración y proliferación (Koike et al., 2020). En células mesenquimales estromales derivadas de medula ósea, la adición de FGF-2 mejora de forma significativa la capacidad de migración y proliferación de las células. Según el estudio, dichas células respondieron con mayor eficacia al estímulo de FGF-2 a partir de la segunda y cuarta pasada de cultivo, reflejando una posible adaptación fenotípica o aumento de la sensibilidad a factores exógenos. Esto contrasta con las CD271-MSCs, un subtipo de MSCs con una secreción más robusta de factores autocrinos, las cuales no mostraron la misma dependencia de FGF-2 para su activación migratoria (Latifi-Pupovci et al., 2015).

Finalmente, tratamiento con AE de canela en heridas infectadas mostró un aumento de la expresión génica de FGF-2, aumento de la proliferación, la angiogénesis y del depósito de colágeno (Seyed Ahmadi et al., 2019).

2.5.9 EGF

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) desempeña un papel esencial en la cicatrización de heridas al regular la proliferación, la migración y la diferenciación celular, así como la supervivencia de poblaciones celulares clave para la reparación tisular (Hardwicke et al., 2008; Shin et al., 2023). Tras su unión con el receptor EGFR (ErbB1), se activan varias rutas de señalización intracelular, entre ellas PI3K/AKT y ERK/MAPK, que impulsan la proliferación de fibroblastos y queratinocitos, promueven la formación de nuevo tejido de granulación y facilitan la angiogénesis (Hong et al., 2006; Laato et al., 1989). En el contexto de heridas crónicas o agudas, estudios clínicos y preclínicos han evidenciado que la aplicación de EGF, en presentaciones tópicas, sistémicas o intra-lesionales, acelera el cierre de la herida, disminuye la formación de cicatrices patológicas y potencia la re-epitelización al reducir el estrés oxidativo y la inflamación local (Shin et al., 2023; Wei et al., 2021). En diversos ensayos clínicos controlados, el EGF recombinante humano (rhEGF) ha demostrado eficacia en la cicatrización de úlceras diabéticas del pie, quemaduras y úlceras por presión. En un estudio multicéntrico, doble ciego y aleatorizado, se observó que la tasa de curación completa de úlceras diabéticas era significativamente mayor (73,2%) en el grupo que recibió spray con 0,005% de rhEGF, frente al 50,6% del grupo placebo (Park et al., 2018). Además, en investigaciones centradas en quemaduras, la aplicación de EGF redujo el tiempo de epitelización, mejoró la apariencia de la cicatriz y aumentó su vascularidad (Shin et al., 2023). Uno de los principales obstáculos de la terapia con EGF radica en su vida media corta y la degradación que sufre por enzimas presentes en la herida. Para contrarrestar esta limitación, se ha propuesto su formulación en nanopartículas, microesferas de alginato-ácido hialurónico o andamios electrohilados que liberan EGF de manera sostenida (Ali et al., 2023; Berlanga-Acosta et al., 2024). Dichos sistemas aumentan la biodisponibilidad del factor de

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

crecimiento y protegen su estructura, lo que da como resultado un efecto reparador más intenso y duradero. De igual forma, la infiltración intralesional de EGF en heridas crónicas, especialmente en pacientes con pie diabético, ha mostrado resultados muy prometedores, ya que permite superar las barreras de difusión y degradación que dificultan la administración tópica (Shin et al., 2023).

En un contexto de inmunosupresión o uso de corticosteroides, el EGF puede actuar como un mediador que compensa la inhibición de la síntesis de colágeno y de la proliferación celular. Estudios donde se empleó metilprednisolona para suprimir la cicatrización revelaron que la administración de EGF, incluso a bajas concentraciones (1–10 ng/mL), recupera parcialmente los niveles de mRNA de colágeno tipo I y fibronectina. De este modo, el EGF mitigó los efectos adversos de los esteroides al promover la proliferación de fibroblastos y la formación de tejido de granulación (Wei et al., 2021). Los avances en nanotecnología y en ingeniería de tejidos han abierto nuevas posibilidades para la administración dirigida de EGF. La inmovilización de EGF en andamios nanofibrosos de PCL/gelatina o su inclusión en sistemas basados en alginato-ácido hialurónico ha demostrado potenciar la proliferación y migración de fibroblastos y queratinocitos, favoreciendo la formación de una nueva capa epidérmica y la síntesis de colágeno (Ali et al., 2023; Berlanga-Acosta et al., 2024). Estos hallazgos respaldan que la combinación de EGF con biomateriales capaces de sostener su actividad y liberarlo de forma controlada puede mejorar la cicatrización en lesiones crónicas.

2.6 Modelos *in vitro* e *in vivo* de evaluación de proceso de cicatrización

La caracterización experimental de compuestos con potencial pro-cicatrizante requiere la integración escalonada que inicia con modelos *in vivo* y culmina en la validación funcional en organismos completos, integrando así el espectro desde la investigación básica hasta la traslacional. Los sistemas *in vivo*, basados principalmente en cultivos de fibroblastos y

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

queratinocitos, constituyen la primera línea de evaluación para descartar compuestos que puedan inducir daño muerte celular, empleando metodologías que incluyen ensayos de exclusión de colorantes (como azul de tripán, eosina, rojo Congo y azul de metileno), pruebas colorimétricas (MTT, LDH, NRU, cristal violeta), fluorométricas (azul de Alamar, resazurina) y luminométricas (ATP). Estos ensayos permiten expresar la citotoxicidad, comúnmente como CC_{50} , y así determinar rangos seguros de concentración para estudios subsecuentes (Akbari et al., 2022; Houghton et al., 2005; Adan et al., 2016; Gould & Templin, 2023). Los sobrenadantes de los cultivos pueden ser analizados para la cuantificación de factores de crecimiento, citoquinas y componentes de la matriz extracelular mediante ELISA o ensayos multiplex, proporcionando información preliminar sobre el perfil inmunomodulador y regenerativo de los compuestos estudiados (Ahmad, 2022).

La evaluación de la migración y proliferación celular, procesos fundamentales en la reparación tisular, se realiza mediante modelos 2D, como el modelo de Scratch (Figura 5). En este modelo se genera una discontinuidad en la monocapa celular y se monitorea la migración de los bordes hacia el centro de la herida utilizando microscopía de lapso de tiempo, medición de impedancia o análisis de imagen automatizado, lo que permite una cuantificación precisa y reproducible (Ahmad, 2022; Jonkman et al., 2014; Stamm et al., 2016). Métodos alternativos, como las cámaras de Boyden, los pozos Transwell y los dispositivos microfluídicos (μ -Migration assay), complementan el abordaje tradicional al proporcionar datos detallados sobre velocidad, direccionalidad y patrones migratorios en respuesta a estímulos específicos (Ahmad, 2022; Jonkman et al., 2014).

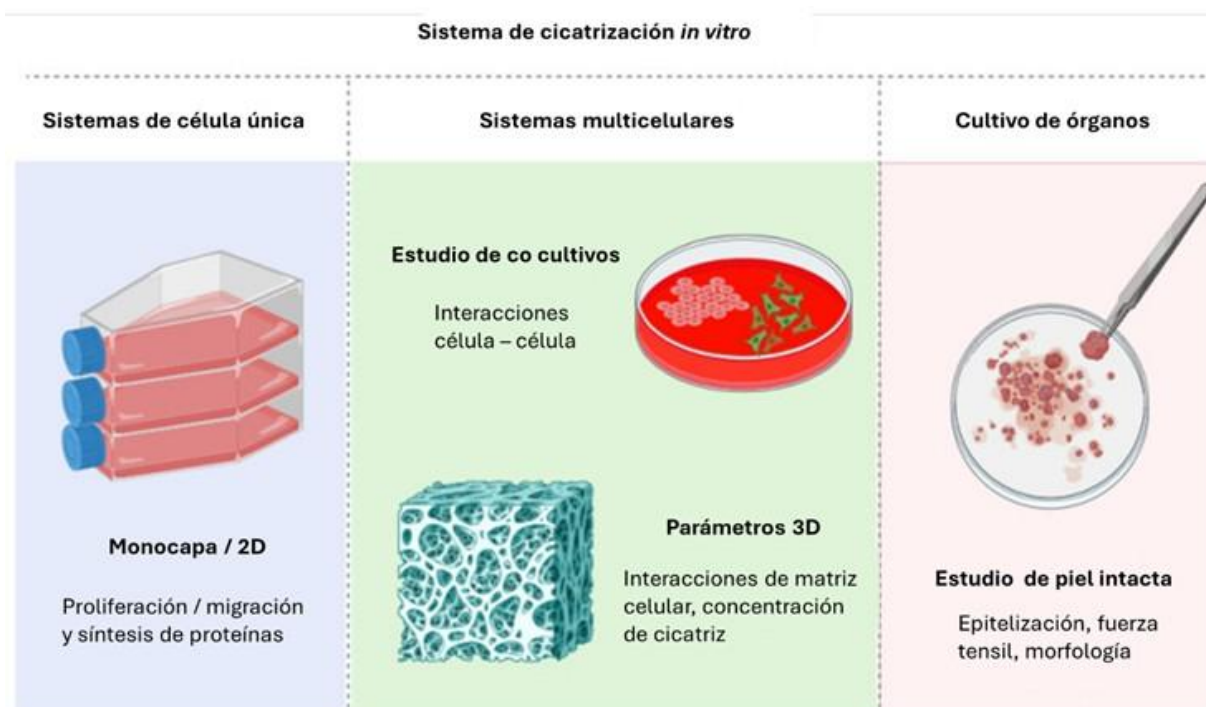
Los modelos tridimensionales (3D) han significado un avance sustancial, al permitir la recreación de microambientes tisulares complejos e interacciones celulares más representativas de la fisiología cutánea. El empleo de hidrogeles, matrices bio-miméticas y sistemas de co-cultivo

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

multicelular facilita la interacción entre fibroblastos, queratinocitos, macrófagos y células endoteliales, formando estructuras semejantes a la piel humana. Ejemplos de ello son los modelos comerciales como Hyalograft 3D, Apligraf y TissueTech Autograft System. Además, tecnologías como el bioprinting y el análisis automatizado de imágenes mediante plataformas como ImageJ y MATLAB han permitido personalizar las condiciones experimentales y mejorar la precisión en la cuantificación de los parámetros de cierre de herida (Ahmad, 2022; Sarian et al., 2023) (Figura 5).

Figura 5

Modelos in vivo de cicatrización de heridas: sistemas unicelulares, multicelulares y cultivo de órganos.



Nota. Adaptado de (Sarian et al., 2023)

En la transición hacia la investigación preclínica, los modelos animales continúan siendo esenciales para el estudio integral de la cicatrización y la validación de agentes terapéuticos bajo condiciones fisiológicas y patológicas. Entre los más empleados destacan los modelos murinos,

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

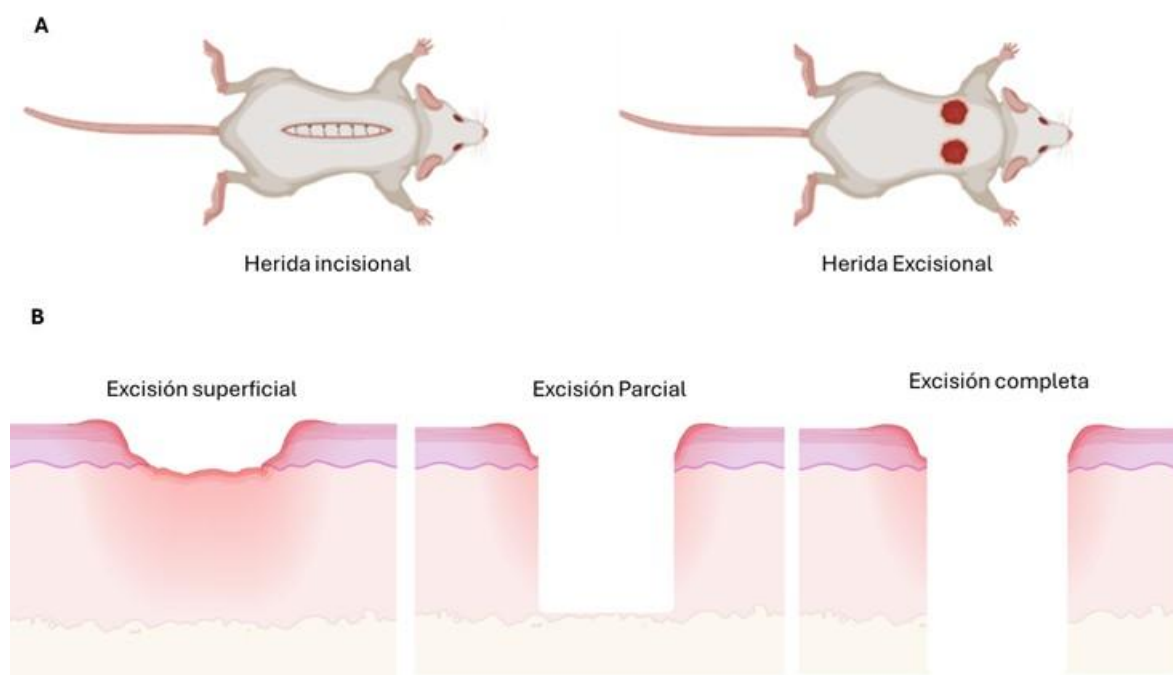
por su bajo costo y posibilidad de manipulación genética, las ratas, que permiten experimentar con heridas de mayor tamaño, los conejos, apreciados por la similitud estructural de su piel con la humana, los cerdos, cuyo grosor y composición cutánea se asemejan estrechamente a los humanos, y los peces cebras, que aportan ventajas únicas para el análisis de la angiogénesis y la regeneración (Sami et al., 2019; Masson-Meyers et al., 2020; Sarian et al., 2023).

Los modelos excisionales e incisionales en ratones representan herramientas experimentales útiles en el estudio de los mecanismos de reparación cutánea y la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas en la cicatrización de heridas (Figura 6). El modelo excisional consiste en la creación de una herida de espesor total mediante la remoción circular o rectangular de un segmento definido de piel en la región dorsal del animal, lo que permite analizar procesos como la migración de queratinocitos, la formación de tejido de granulación, la síntesis de matriz extracelular y la angiogénesis (Chen et al., 2015; Galiano et al., 2004). Por otro lado, el modelo incisional implica la realización de una incisión lineal controlada en la piel, generalmente en la región dorsal o ventral, que posteriormente se sutura, este modelo permite evaluar la reparación tisular en lesiones con bordes cercanos, siendo útil en la medición de la resistencia tensil de las lesiones (Ozay et al., 2018; Sami et al., 2019) (Figura 6).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 6

Modelos de lesión cutánea en ratones para el estudio de la cicatrización de heridas.



Nota. Ilustración representativa de modelos experimentales de heridas en ratones. A. Representación esquemática de la localización de incisiones quirúrgicas en el abdomen y heridas por excisión en la espalda de los ratones. B. Tipos de heridas generadas: excisión superficial y excisión parcial, que muestran diferentes profundidades de daño en la epidermis y la dermis.

El diseño experimental puede requerir la inducción de hiperglucemia mediante agentes como la estreptozotocina (STZ) (Abordado en profundidad en el capítulo 1) o aloxano en roedores, así como la utilización de modelos genéticos, permitiendo analizar en detalle el impacto de la alteración metabólica sobre la inflamación, la formación de tejido de granulación, la angiogénesis y la síntesis de colágeno, junto con el papel del estrés oxidativo en la reparación tisular (Shafiee et al., 2018; Kant et al., 2024; Saeed & Martins-Green, 2024; Singh et al., 2024). La valoración de la cicatrización se realiza a través de análisis macroscópicos (medición fotográfica del área de la

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

herida y cuantificación digital con ImageJ), estudios histológicos (tinciones con Hematoxilina-Eosina y tricrómica de Masson) e inmunohistoquímica (CD31, VEGF, TGF- β), complementados con análisis bioquímicos como la medición de actividad de mieloperoxidasa, hidroxiprolina y malondialdehído, lo que proporciona un abordaje integral y multidimensional (Masson-Meyers et al., 2020; Summer et al., 2024 Rehring et al., 2021).

2.7 Herramientas *in silico* para la búsqueda de nuevos cicatrizantes

El docking molecular y la dinámica molecular (MD) computacional (Figura 7), son métodos fundamentales en la investigación *in silico* aplicada al descubrimiento de moléculas bioactivas (Forid et al., 2024; Mamun et al., 2024). Estas herramientas permiten explorar y predecir las interacciones de metabolitos vegetales, u otro tipo de compuestos, con proteínas clave involucradas en la inflamación, proliferación celular o remodelación de la matriz extracelular, etapas centrales en el proceso de cicatrización (Nagavalli et al., 2023; Sachdeo et al., 2024). El docking molecular busca determinar la orientación y afinidad de un ligando (por ejemplo, un fito-compuesto) al unirse a una proteína blanco (Chen, 2015). Se recurre a algoritmos que muestrean diversas conformaciones y poses del ligando, evaluando la compatibilidad estérica y energética en el sitio activo de la proteína (Huang & Zou, 2010). Dichos algoritmos suelen operar bajo la asunción inicial de que la proteína permanece relativamente rígida, mientras el ligando se deforma al interactuar con el sitio de unión. Se han propuesto enfoques avanzados que admiten flexibilidad proteica (Morris et al., 2009).

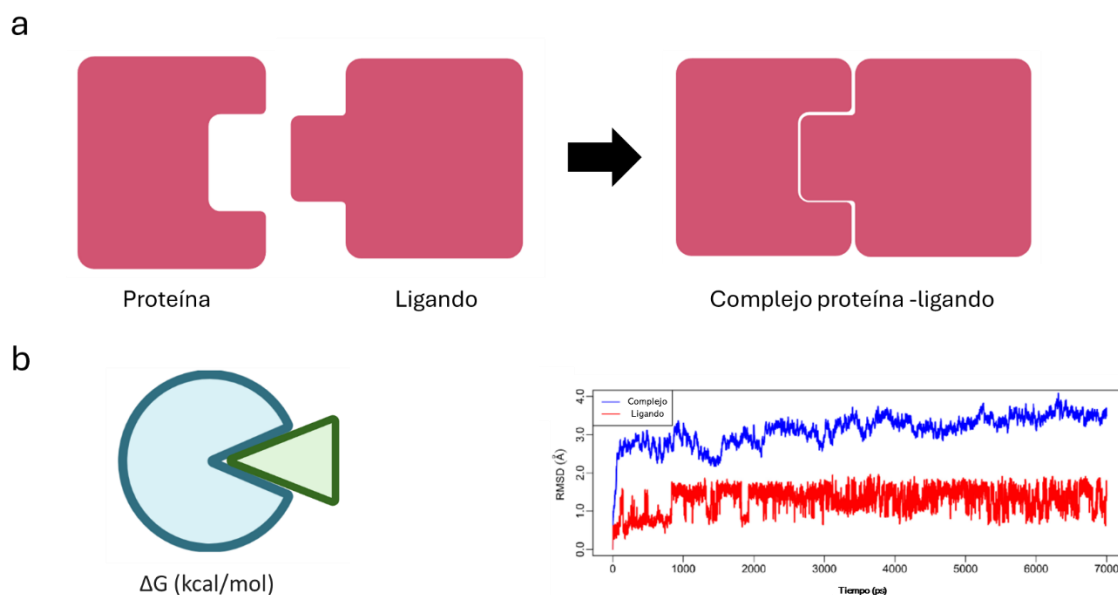
Para cuantificar la probabilidad de unión, la técnica depende de funciones de puntuación (scoring functions) que estiman la energía libre de interacción basándose en modelos empíricos, mecánico-cuánticos simplificados o campos de fuerza clásicos (Pinzi & Rastelli, 2019). Estas funciones presentan limitaciones al no incluir con precisión el efecto del solvente o la flexibilidad

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

dinámica del blanco, lo que puede llevar a resultados inconsistentes (Chen, 2015; Santos et al., 2019).

Figura 7

Interacción ligando-receptor y análisis de estabilidad del complejo molecular.



Nota. A. Representación ilustrativa del docking molecular en la formación del complejo proteína ligando. B. A la izquierda se representa la energía de unión entre el ligando (triángulo) y su sitio activo (figura azul) y a la derecha un diagrama donde se muestra la evaluación de la interacción (RMSD, Å).

Para refinar y complementar los resultados del docking, las simulaciones de MD proporcionan un marco más realista al considerar explícitamente la flexibilidad de la proteína y las fluctuaciones conformacionales del ligando en el solvente (Shoaib et al., 2023). Dichas simulaciones resuelven en cada paso de tiempo (en femto a picosegundos) las ecuaciones de movimiento de Newton para cada átomo del sistema (Karplus & McCammon, 2002). Se obtienen trayectorias que describen la evolución temporal de la posición y la velocidad de cada partícula.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Este acercamiento permite identificar estados intermedios o transitorios de la unión ligando-proteína, así como sitios de unión crípticos, inobservables en métodos estáticos (Durrant & McCammon, 2011; Mortier et al., 2015).

En el flujo de trabajo habitual, el docking se emplea como un tamiz virtual preliminar para filtrar grandes bibliotecas de compuestos, generando poses iniciales que luego pueden someterse a simulaciones de MD y a métodos de cálculo de energía libre, como MM/PBSA o MM/GBSA, para estimar con mayor precisión la afinidad de unión (Alonso et al., 2006; Santos et al., 2019). Se analizan parámetros como el desplazamiento cuadrático medio (RMSD), las fluctuaciones de raíz media (RMSF), la persistencia de puentes de hidrógeno y los contactos hidrofóbicos, con el fin de discernir si la interacción predicha es estable o transitoria (L. H. S. Santos et al., 2019). Paralelamente, se puede recurrir a metodologías avanzadas de energía libre para afinar la cuantificación de la afinidad de unión, siempre que el sistema sea lo suficientemente pequeño o se disponga de los recursos computacionales adecuados (Durrant & McCammon, 2011). Este enfoque de “dockeo y posterior dinámica” resulta particularmente útil en proyectos donde se investiga la inhibición de blancos proteicos involucrados en la cicatrización, como TNF- α , MMP-2 y MMP-8, o receptores de factores de crecimiento (Nagavalli et al., 2023; Sachdeo et al., 2024).

La aproximación por MD no está exenta de desafíos, como el elevado costo computacional y la precisión finita de los campos de fuerza (Parrinello & Rahman, 1980; Karplus & McCammon, 2002). Las escalas de tiempo requeridas a menudo superan el rango de microsegundos que puede alcanzarse con hardware estándar (Morris et al., 2009; Buch et al., 2011). Aun así, la disponibilidad de software altamente optimizado (por ejemplo, GROMACS, AMBER o CHARMM) y el advenimiento de potentes tarjetas gráficas (GPUs) han permitido expandir la accesibilidad de estas

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

simulaciones a la mayoría de los laboratorios de biología computacional y química medicinal (Pinzi & Rastelli, 2019; Mortier et al., 2015).

En la práctica, las metodologías computacionales también se integran con algoritmos de farmacología de redes para correlacionar resultados de docking y MD con información sobre vías de señalización implicadas en la cicatrización (Sachdeo et al., 2024). De igual modo, la predicción ADMET (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) constituye un paso inicial para filtrar compuestos que podrían presentar problemas de biodisponibilidad o toxicidad (Forid et al., 2024; Mandell & Beverley, 2017). Una vez superada la etapa *in silico*, los candidatos más prometedores se someten a validaciones *in vivo* (por ejemplo, ensayos de proliferación y migración celular) y, posteriormente, a modelos *in vivo* para corroborar su eficacia y seguridad (G. Broughton et al., 2006; Jones et al., 2018). Este esquema permite una optimización focalizada de los recursos experimentales y una menor dependencia inicial de la experimentación animal, cumpliendo con los lineamientos de reducir, refinar y reemplazar (3Rs) en la investigación biomédica. A pesar de las limitaciones, el docking molecular y MD se han consolidado como pilares en el diseño computacional de compuestos con potencial cicatrizante. La robustez de estas metodologías radica en su capacidad de explorar interacciones a escalas atómicas y en su flexibilidad para combinarse con otros enfoques, como la simulación multi-escala o la inteligencia artificial, abriendo perspectivas cada vez más amplias para la búsqueda y optimización de moléculas bioactivas (Durrant & McCammon, 2011; Mortier et al., 2015).

3 Implementación modelos in vitro e in vivo para evaluar citotoxicidad, proliferación, migración/cicatrización

3.1 Introducción

Con el fin de construir un esquema de evaluación de compuestos con actividad pro cicatrizante, en este capítulo se describió la implementación de una plataforma metodológica que abarca desde la selección inicial de compuestos a través de ensayos de citotoxicidad y proliferación, hasta la validación funcional en modelos murinos, tanto en condiciones fisiológicas como en contextos patológicos de hiperglicemia. En primer lugar, el ensayo de citotoxicidad con resazurina fue empleado como método de cribado primario, dada su sensibilidad y capacidad para cuantificar el metabolismo celular a través de la reducción enzimática de resazurina a resorufina. La intensidad de la señal obtenida guarda relación directa con la viabilidad celular, permitiendo calcular la concentración citotóxica $_{50}$ (CC $_{50}$) y clasificar el perfil de toxicidad (Bopp & Lettieri, 2008; O'Brien et al., 2000). Esta técnica, ampliamente estandarizada en la literatura, ofrece ventajas como la posibilidad de realizar lecturas repetidas y el bajo costo relativo, lo que la convierte en una herramienta fundamental para el tamizaje de extractos, fracciones y moléculas purificadas (Czekanska, 2011; Zhang et al., 2004). Complementariamente, el ensayo de proliferación con cristal violeta se utilizó para estimar cuantitativamente la biomasa celular tras el tratamiento, aprovechando la afinidad de este colorante por proteínas y ácidos nucleicos de células adheridas. La cuantificación espectrofotométrica de la tinción proporciona un índice de proliferación neta y viabilidad, resultando útil para identificar compuestos que modulan la capacidad de división celular en líneas epiteliales y fibroblásticas (Feoktistova et al., 2016).

El ensayo de migración/proliferación tipo *scratch* se incorporó para analizar la capacidad de proliferación / migración y cierre de heridas en monocapas celulares, fenómeno esencial para

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

la reparación tisular. Este método consiste en la generación controlada de una “herida” artificial mediante raspado o insertos especializados, seguida del monitoreo digital automatizado del cierre del área libre de células a intervalos definidos (Ab Rahman et al., 2014; Balko et al., 2023; Dewor et al., 2007). La cuantificación de la migración y la proliferación celular fue realizada utilizando plataformas de análisis de imagen como ImageJ, lo que permitió diferenciar entre efectos netamente migratorios y aquellos derivados de proliferación, ajustando parámetros como la concentración de suero fetal bovino para separar ambas contribuciones (Cardona et al., 2017).

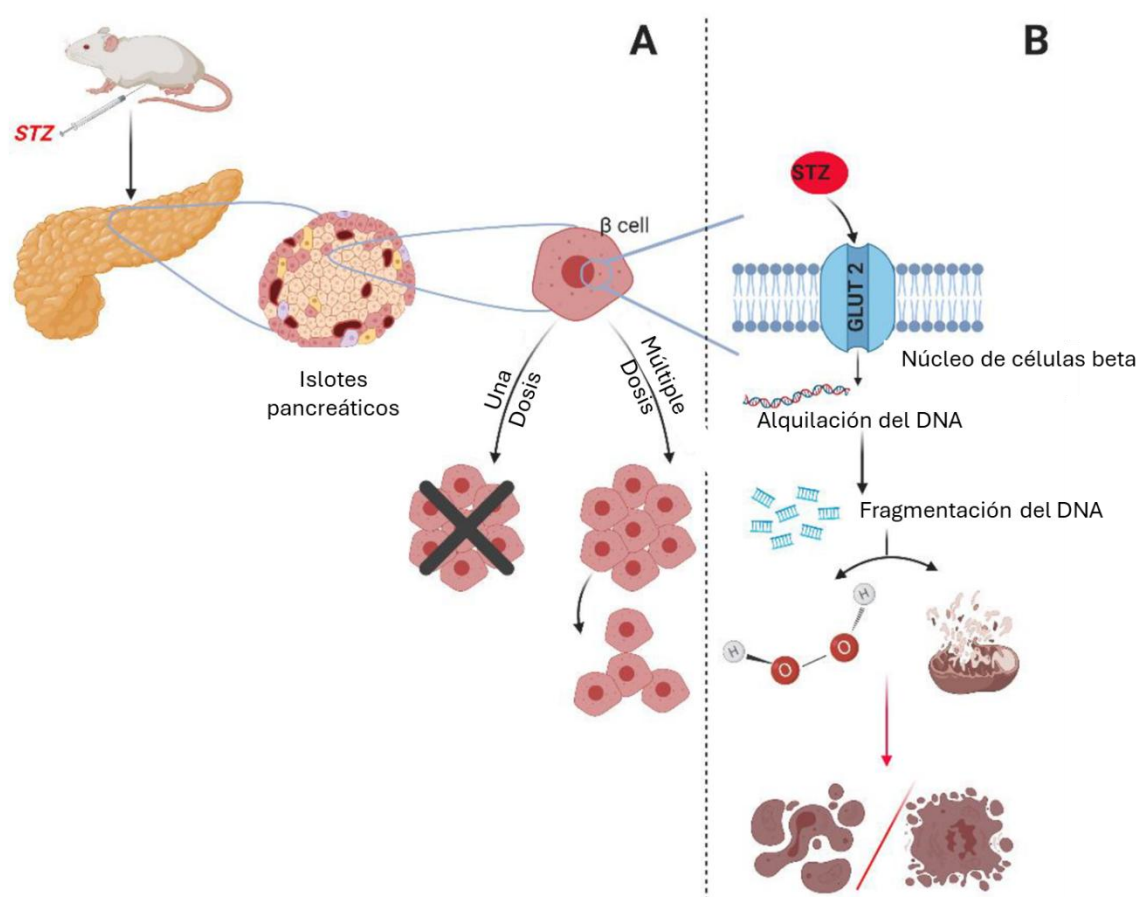
Para los ensayos *un vivo*, se incluyó la creación de heridas excisionales de espesor total bajo anestesia controlada, el registro fotográfico secuencial y la cuantificación digital de la tasa de cierre. Este abordaje integral permitió no solo medir parámetros macroscópicos, sino también correlacionar los hallazgos con los cambios tisulares a nivel microscópico (L. Chen et al., 2015; Galiano et al., 2004). Dentro de este diseño experimental, se incorporó un modelo patológico basado en la inducción de hiperglucemia experimental mediante estreptozotocina (STZ). La STZ ha sido consolidada como el agente de referencia para la inducción experimental de diabetes en modelos animales, permitiendo así el análisis de la fisiopatología y las complicaciones propias de la hiperglicemia, entre las que destaca la alteración profunda de la cicatrización cutánea. Su alta afinidad por las células β -pancreáticas, facilitada por la presencia de GLUT2, determina un ingreso selectivo que culmina en daños irreparables en el ADN vía alquilación, conduciendo a la necrosis o apoptosis de las células β y al desarrollo de hiperglucemia sostenida (Andrade et al., 2017; Ghasemi et al., 2014; Kolb-Bachofen et al., 1988) (Figura 8). La HG crónica inducida por STZ genera un entorno tisular caracterizado por una respuesta inflamatoria sostenida, elevación de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6), aumento del estrés oxidativo y reducción de las defensas antioxidantes, factores que deterioran la matriz extracelular e interfieren con la actividad

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

reparadora de fibroblastos y queratinocitos (Lenzen, 2008; Samuel et al., 2014). Adicionalmente, se observa compromiso de la angiogénesis, acumulación de productos de glicación avanzada (AEG) y alteraciones en vías de señalización como Notch, elementos que en conjunto explican el retardo cicatricial y la aparición de complicaciones mayores (Huang et al., 2019; Huang et al., 2019).

Figura 8

Acción de la STZ sobre las células β pancreáticas en modelos experimentales.



Nota. A. Mecanismo de daño a las células β -pancreáticas con dosis únicas o múltiples de STZ. B.

Mecanismo de acción de la STZ en el núcleo de las células β . Adaptado de Wszola et al., 2021.

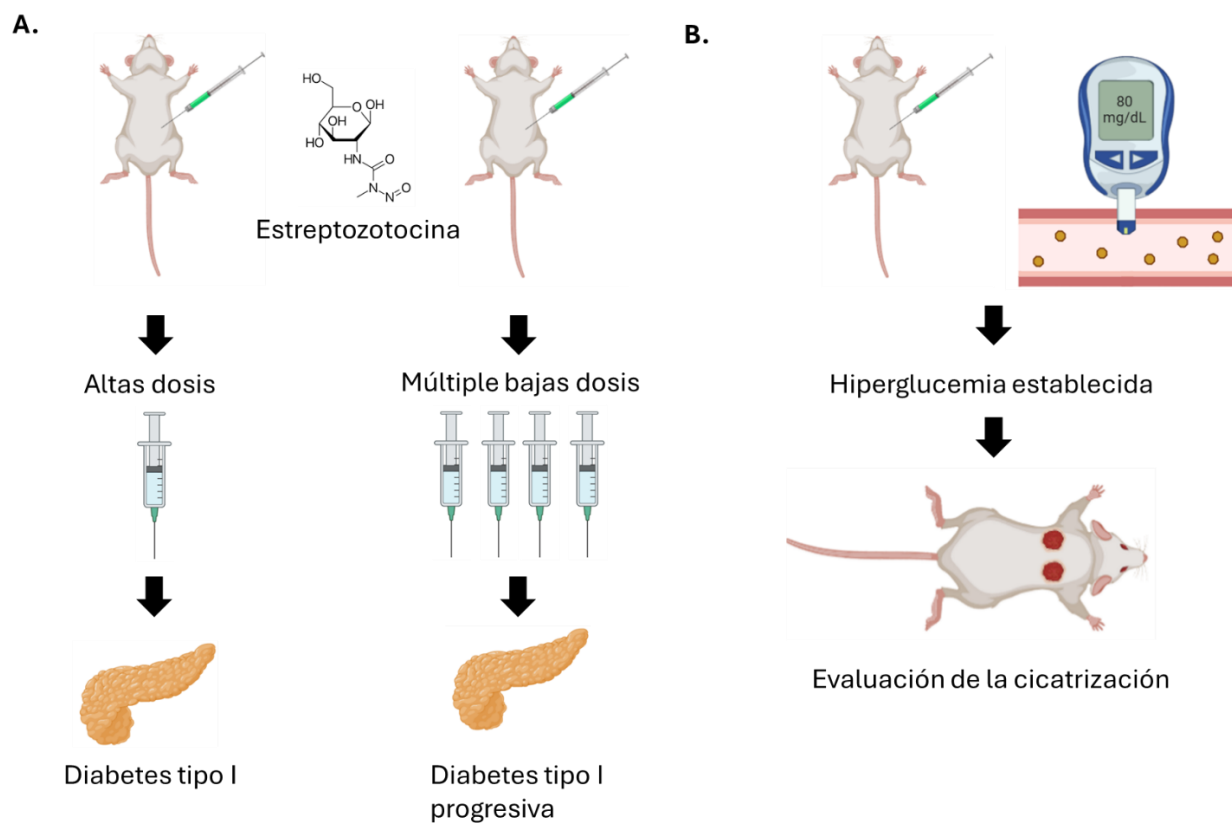
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

La relevancia del modelo STZ radica en su utilidad para evaluar nuevas estrategias terapéuticas en condiciones metabólicas adversas, validando el efecto de agentes antioxidantes, pro-angiogénicos o antimicrobianos en la reparación tisular (Lin et al., 2012; Shafiee et al., 2018). Para inducir DM tipo 1 (DM-1), se emplean comúnmente dosis únicas elevadas de STZ (generalmente entre 120-200 mg/kg en ratas o 150 mg/kg en ratones), las cuales provocan una destrucción masiva y rápida de las células β -pancreáticas, generando un cuadro de hiperglicemia severa y sostenida asociado con deficiencia absoluta de insulina (Furman, 2015; Samuel et al., 2014). Alternativamente, la administración de dosis múltiples bajas de STZ (por ejemplo, 40-60 mg/kg durante cinco días consecutivos) produce una destrucción progresiva con participación autoinmune en la destrucción β -celular (Shafiee et al., 2018) (Figura 9). Si bien la STZ es el agente más empleado, existen modelos genéticos complementarios, como los ratones db/db, ob/ob y Akita que permiten explorar diversas facetas del síndrome metabólico y su impacto sobre la cicatrización, lo que enriquece la validez traslacional de los hallazgos experimentales (Patel et al., 2019; Saeed & Martins-Green, 2024).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 9

Representación esquemática del modelo experimental para evaluar el efecto de la estreptozotocina (STZ) en la inducción de diabetes en ratones.



Nota. A. administración intraperitoneal de las dosis de STZ; B. evaluación niveles de glucosa sérica y evaluación en el modelo excisional de heridas.

El objetivo del presente capítulo 1 fue implementar los modelos de evaluación de la citotoxicidad, proliferación, migración, y cicatrización *in vivo* y en el modelo de ratones BALB/c normoglicémicos (NG) y hiperglicémicos (HG). Igualmente se hizo una revisión no sistemática para escoger los controles positivos y para su validación se evaluaron 20 AE obtenidos en plantas colombianas.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

3.2 Materiales y métodos



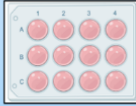

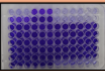
3.2.1 *Diseño experimental*

El diseño experimental se dividió en tres fases como siguen.

Fase 1. Implementación de los ensayos realizados *in vivo*. Se optimizaron los ensayos de citotoxicidad, proliferación y migración en las líneas celulares Vero y HaCaT (Figura 10).

Figura 10

Implementación de los ensayos realizados in vivo (Fase 1).

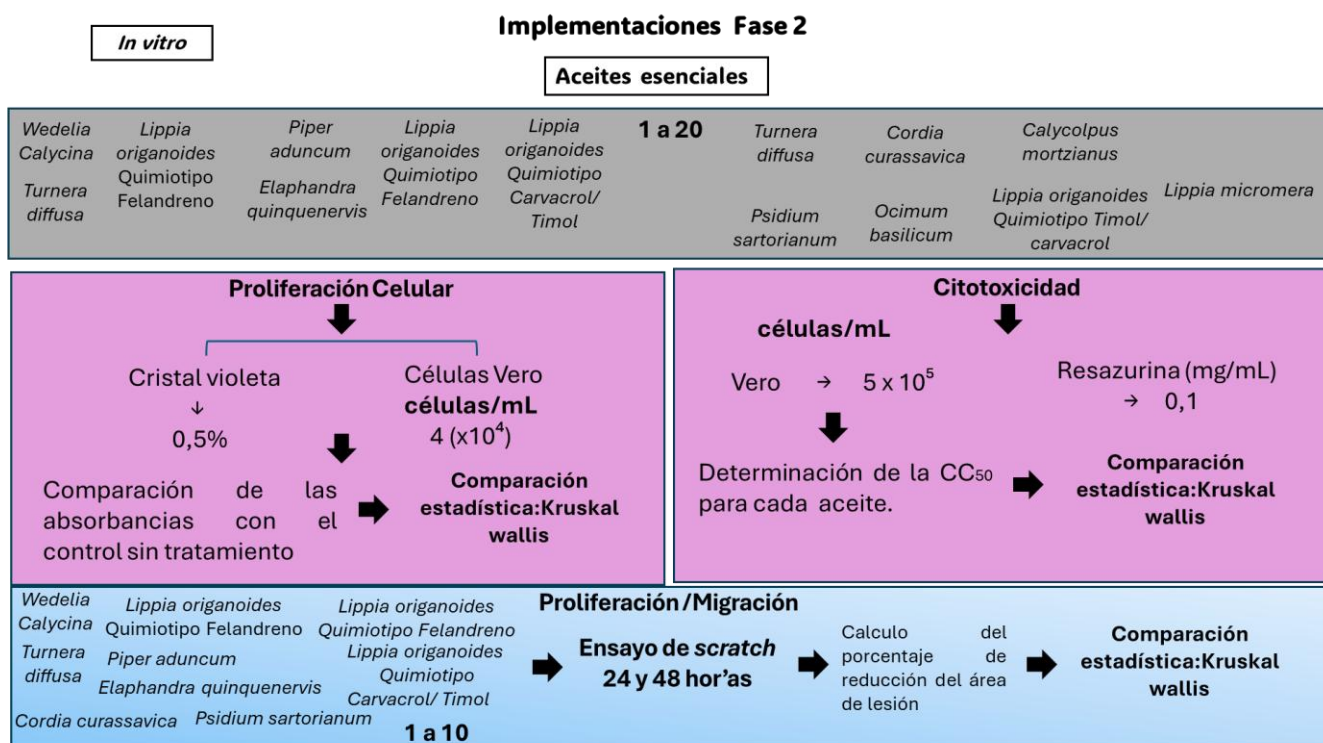
<i>In vitro</i>		Implementaciones Fase 1		
Citotoxicidad	Proliferación	Proliferación/Migración	Variables de prueba	
Vero → 2×10^5  5×10^5 7×10^5 HaCat → 2×10^5  5×10^5 7×10^5	Células Vero ↓ 1 2 3 4 5 6 ($\times 10^4$)	Vero y HaCaT ↓  1×10^5 2×10^5 3×10^5	Concentración de células (células/mL)	
Resazurina (mg/mL) → 0,05  0,1 0,2	Cristal violeta ↓ 0,25% 0,5% 1,0% 	Concentración del indicador de viabilidad	Concentración de SFBic (% v/v) → 0 2,5 5 10	
→ 2 4 6	→ 2 4 6	24	Tiempo de incubación (h)	
% de reducción	Absorbancia	Reducción de área de lesión	Variable de salida	

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Fase 2. Validación de las pruebas utilizando AE *in vivo* (Figura 11).

Figura 11

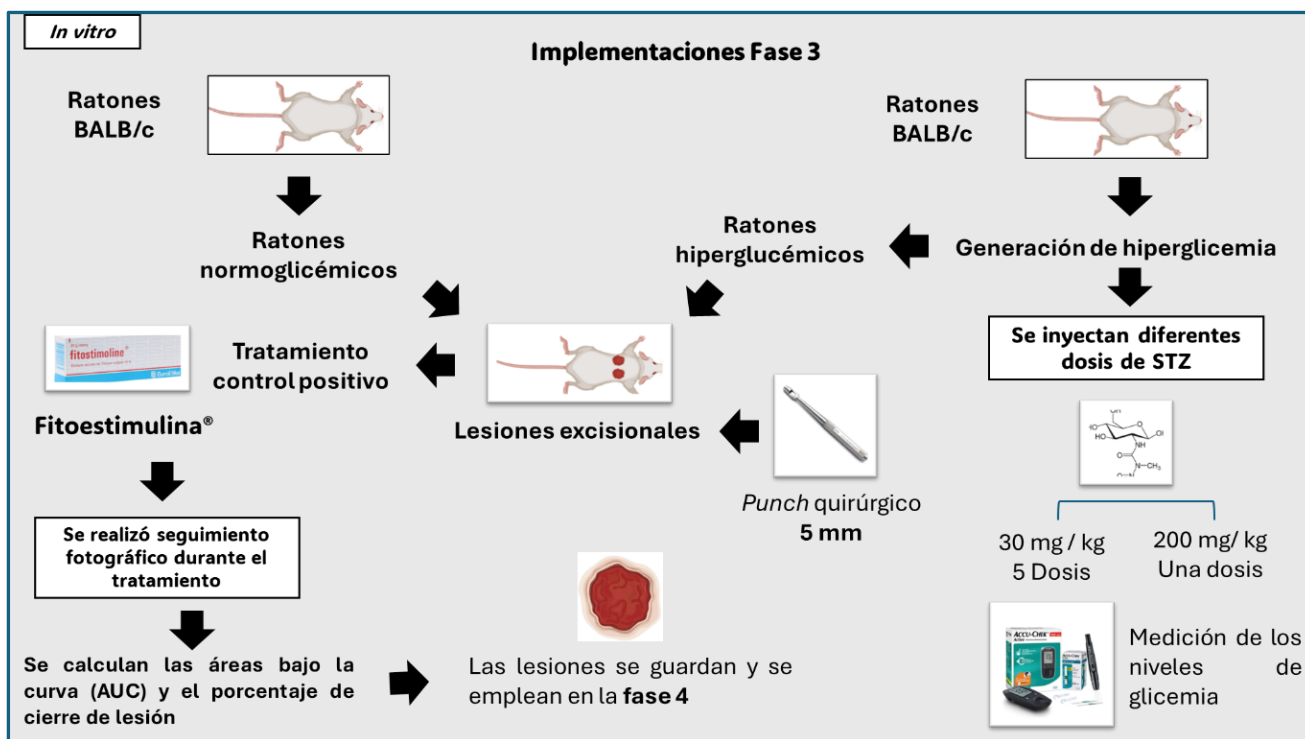
Validación de las pruebas utilizando AE *in vivo* (Fase 2).



Fase 3: Implementación de los modelos *in vivo*. Se estableció el modelo excisional de cicatrización en ratones BALB/c y se optimizó el modelo en ratones hiperglicémicos (HG) (Figura 12).

Figura 12

Implementación de los modelos *in vivo* (Fase 3).



3.2.2 Revisión no sistemática de controles positivos en evaluación *in vivo*

Se realizó con el objetivo de identificar y seleccionar compuestos utilizados como controles positivos en modelos experimentales de cicatrización de heridas. Se consultaron artículos originales, revisiones y capítulos de libro publicados hasta 2024, utilizando las bases de datos PubMed, ScienceDirect y Google Scholar. Los términos de búsqueda incluyeron combinaciones de las palabras clave “wound healing”, “positive control”, “cicatrización”, “*in vivo*”, “in vivo”, “growth factor”, “reference compound”, así como los nombres de compuestos de interés previamente reportados (por ejemplo, alantoína, ácido clorogénico, quercetina, curcumina, acemanano, PDGF, EGF y TGF- β). Se tuvo en cuenta su frecuencia de uso, el tipo de evidencia experimental (*in vitro* e *in vivo*), la disponibilidad comercial y el respaldo de estudios previos de

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

eficacia cicatrizante. Los resultados se muestran en la Tabla 6, destacando los modelos empleados, metodología, principales hallazgos y referencias bibliográficas.

3.2.3 Reactivos y compuestos utilizados

La rezasurina, el cristal violeta, la estreptozotocina (STZ), el metanol al 95%, la alantoína, el citrato de sodio y el ácido cítrico se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). El suero fetal de bovino (SFBIC) fue adquirido de Gibco® (Grand Island, NY, USA). La FS®, xilazina al 2% y ketamina se obtuvieron de EuroEtika (Colombia), Erma (Colombia) y Chemiesa (Chile), respectivamente.

Se utilizaron 20 AE (Tabla 2), los cuales fueron entregados por el Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas (CROM MASS, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander) en el marco del programa 57419, Bio-Reto XXI-15:50: Desarrollo de bioproductos para los sectores salud, agropecuario y cosmético, como resultado del estudio de la biodiversidad colombiana. Las plantas fueron recolectadas de diferentes sitios del territorio colombiano (Stashenko & René Martínez, 2020). La extracción del AE se realizó mediante hidrodestilación asistida por microondas, utilizando un equipo Clevenger adaptado a un sistema de microondas (Morteza-Semnani et al., 2022). Los principales metabolitos secundarios fueron identificados y cuantificados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) (Stashenko & René Martínez, 2020). Las soluciones stock de los AE (p/p) fueron preparadas pesando entre 1–3 mg de cada AE y agregando después 300 mg de DMSO. Estas fueron almacenadas en frascos oscuros tapados herméticamente a temperatura de 25°C. Las soluciones de trabajo fueron preparadas en el medio de cultivo empleado en la línea celular en la que se iba a realizar la evaluación.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Tabla 2*Aceites esenciales estudiados.*

Código	Planta	Metabolitos secundarios volátiles principales (> 2%)
AE-1	<i>Wedelia Calycina</i>	α -Pineno (24,9%), sabineno (4,6%), β -pineno (14,8%), α -felandreno (6,3%), p-cimeno (4,5%), limoneno (2,4%), β -felandreno (10,1%), α -copaeno (2,6%), β -cariofileno (3,1%), germacreno D (13,1%)
AE-2	<i>Turnera diffusa</i>	p-Cimeno (3,0%), β -elemeno (4,0%), β -cariofileno (4,0%), aristoloqueno (17,9%), β -selineno (5,2%), premnaspirodiéno (3,7%), valenceno (7,4%), α -selineno (2,4%), óxido de cariofileno (3,2%), guaíol (3,5%), germacra-4,5,10-trien-1 α -ol (3,5%), deshidrofukinona (25,4%)
AE-3	<i>Lippia origanoides</i> Quimiotipo Felandreno	α -Pineno (2,0%), canfeno (2,5%), α -felandreno (9,3%), p-cimeno (8,7%), limoneno (4,4%), β -felandreno (3,1%), 1,8-cineol (6,5%), β -cariofileno (18,6%), α -humuleno (10,2%), germacreno D (2,2%), δ -cadineno (2,0%), óxido de cariofileno (3,8%)
AE-4	<i>Calycolpus moritzianus</i>	α -Pineno (5,1%), limoneno (17,6%), 1,8-cineol (19,1%), linalool (1,3%), α -copaeno (3,2%), β -cariofileno (6,3%), viridifloreño (2,7%), selina-3,7(11)-diéno (2,8%), trans-nerolidol (3,5%), viridiflorol (5,7%), trans-geranil-linalool (4,0%)
AE-5	<i>Piper aduncum</i>	α -Pineno (4,6), α -felandreno (4,4), p-cimero (3,0), limoneno (6,0), 1,8-cineol (3,6), piperitona (14,8), α -copaeno (2,9), β -cariofileno (7,4), 9-epi- β -cariofileno (1,1), δ -cadineno (5,5), óxido de cariofileno (3,8), viridiflorol (5,8)
AE-6	<i>Elaphandra quinquenervis</i>	α -Pineno (7,1), sabineno (10,1), β -pineno (21,7), Δ^3 -careno (2,5), limoneno (4,7), β -felandreno (1,0), α -copaeno (1,7), β -cububeno (3,7), β -cariofileno (5,3), α -humuleno (2,7), germacreno D

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Código	Planta	Metabolitos secundarios volátiles principales (> 2%)
		(21,6), valenceno (2,7), espatulenol (1,4), óxido de cariofileno (1,9)
AE-7	<i>Hyptis dilatata</i>	α -Pinenol (10,8), canfeno (1,8), β -pineno (1,1), Δ^3 -careno (15,9), limoneno (2,5), alcanfor (16,4), α -gurjuneno (4,8), β -cariofileno (20,7), allo-aromadendreno (1,5), palustrol (8,9), óxido de cariofileno (1,1), ledol (3,5)
AE-8	<i>Lippia organoides</i> Quimiotipo Carvacrol/ Timol	β -Mirceno (2,5), p-cimeno (14,4), 1,8-cineol (1,3), γ -terpineno (5,4), timol (7,8), carvacrol (36,0), acetato de carvacrilo (2,0), β -cariofileno (4,4)
AE-9	<i>L. organoides</i> Quimiotipo Felandreno	α -Felandreno (7,1), p-cimeno (12,6), limoneno (2,1), 1,8-Cineol (13,0), γ -terpineno (2,4), timol (14,0), β -cariofileno (15,1), α -humuleno (8,1), óxido de cariofileno (2,5), β -eudesmol (2,6)
AE-10	<i>Lippia organoides</i> Quimiotipo Timol	α -Pinenol (1,7), β -mirceno (1,3), α -felandreno (7,1), p-cimeno (12,6), limoneno (3,5), β -felandreno (4,1), 1,8-cineol (8,9), γ -terpineno (2,4), timol (14,0), β -cariofileno (15,1), α -humuleno (8,1), óxido de cariofileno (2,5), α -eudesmol (2,6)
AE-11	<i>Turnera diffusa</i>	γ -Terpineno (1,6), p-cimeno (3,6), β -elemeno (5,0), β -cariofileno (4,8), 6,9-guaiadieno (1,5), 4,5-di-epi-aristolecheno (21,0), β -selineno (5,7), valenceno (4,0), α -selineno (2,7), óxido de cariofileno (3,1)
AE-12	<i>Psidium sartorianum</i>	α -Pinenol (1,4), β -pineno (2,4), p-cimeno (2,5), 1,8-cineol (3,4), γ -terpineno (1,3), β -cariofileno (6,9), β -selineno (1,7), valenceno (1,0), α -selineno (1,3), óxido de cariofileno (11,2), γ -eudesmol (2,8), α -muurolol (2,2), intermedeol (2,3)
AE-13	<i>Psidium sartorianum</i>	α -Pinenol (1,4), β -pineno (2,4), p-cimeno (2,5), 1,8-cineol (3,4), γ -terpineno (1,3), β -cariofileno (6,9), β -selineno (1,7), valenceno

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Código	Planta	Metabolitos secundarios volátiles principales (> 2%)
		(1,0), α -selineno (1,3), óxido de cariofileno (11,2), γ -eudesmol (2,8), α -muurolol (2,2), intermedeol (2,3)
AE-14	<i>Cordia curassavica</i>	α -Pineno (9,4), β -pineno (4,1), β -mirceno (1,0), α -copaeno (7,0), β -bourboneno (1,1), β -elemeno (2,8), β -cariofileno (19,2), α -humuleno (2,7), germacreno D (12,3), viridifloreno (2,4), biciclogermacreno (3,9), trans- β -guaiano (11,8), δ -cadineno (2,8)
AE-15	<i>Ocimum basilicum</i>	1,8-Cineol (8,1), linalol (42,7), estragol (18,6), β -cariofileno (0,5), α -humuleno (2,5), germacreno D (4,9), biciclogermacreno (2,2), γ -cadineno (3,7), epi- γ -cadinol (4,4)
AE-16	<i>Calycolpus mortzianus</i>	α -Pineno (3,6), limoneno (15,1), 1,8-cineol (15,8), linalol (1,1), α -terpineol (1,4), α -copaeno (3,0), β -cariofileno (6,3), α -humuleno (1,2), β -selineno (5,9), α -selineno (2,1), trans-nerolidol (4,1), viridiflorol (7,2)
AE-17	<i>Turnera diffusa</i>	p-Cimeno (6,1), β -elemeno (2,1), β -cariofileno (3,0), 6,9-guaiadieno (1,0), 4,5-di-epi-aristolecheno (21,4), β -selineno (5,9), valenceno (5,4), α -selineno (2,5), óxido de cariofileno (3,0)
AE-18	<i>Lippia organoides</i> Quimiotipo Timol/ carvacrol	β -Mirceno (5,2), α -terpineno (2,8), p-cimeno (19,1), γ -terpineno (9,1), metil timil éter (1,8), timol (49,2), carvacrol (2,6), acetato de timilo (0,5), β -cariofileno (1,7), α -humuleno (1,0)
AE-19	<i>Lippia organoides</i> Quimiotipo Timol/Carvacrol	β -Mirceno (2,1), p-cimeno (10,7), γ -terpineno (2,0), Éter metílico de timol (1,0), Timol (72,3), Carvacrol (4,4)

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Código	Planta	Metabolitos secundarios volátiles principales (> 2%)
AE-20	<i>Lippia micromera</i>	α -Tujeno (1,3), β -mirceno (2,0), p-cimeno (27,0), 1,8-cineol (5,2), γ -terpineno (5,5), metil timil éter (26,5), timol (0,5), carvacrol (18,0), acetato de timilo (5,8), β -cariofileno (1,0), α -humuleno (1,0), óxido de cariofileno (1,8)

Nota. AE empleados en el estudio, detallando su código, la planta de origen y los principales metabolitos secundarios volátiles con una concentración superior al 2%.

3.2.4 Líneas celulares y cultivo

Se utilizaron: la línea celular de queratinocitos humanos (HaCaT, CVCL_0038) la cual fue gentilmente donada por Sandra Leal, PhD, de la Universidad de Santander y las células epiteliales de riñón de mono verde (Vero, ATCC® CCL-81™) adquiridas comercialmente. Las células se cultivaron en medio de cultivo DMEM y RPMI-1640, respectivamente, suplementados con SFBIC e inactivado al calor a 56°C durante 30 minutos, a 37°C y 5% de CO₂. Las células se mantuvieron en cultivo mediante pases seriados. Cuando alcanzaban aproximadamente un 80–90 % de confluencia, se procedía al subcultivo cada 2–3 días. Para ello, después de lavar las células solución salina tamponada con fosfatos (PBS) pH 7,2 se agregaba tripsina-EDTA al 0,25 % por 2–5 minutos. Las células desprendidas se centrifugaban y se pasaban a una caja nueva con medio de cultivo.

3.2.5 Implementación del ensayo de resazurina en células Vero y HaCaT

Se evaluaron diferentes concentraciones de células, del indicador de viabilidad (resazurina) y tiempos de incubación (Tabla 3). La resazurina es un compuesto de color azul y no fluorescente, pero cuando es reducida por las enzimas mitocondriales de las células vivas se convierte en resofurina, que es de color rosa. Este cambio es cuantificado espectrofotométricamente, discriminando entre células viables (convierten la resazurina), y células dañadas o muertas (no la reducen) (O'Brien et al., 2000). Se emplearon pozos control sin células y de medio de cultivo sin

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

aplicación de resazurina. Se consideraron las variables que generaban un porcentaje de reducción de la resazurina igual o superior al 60%.

Tabla 3

Variables evaluadas en la implementación de prueba de viabilidad con resazurina.

Células/mL x 10 ⁵		Concentración de resazurina (mg/mL)			Tiempo de incubación con resazurina (horas)		
Vero	HaCaT	0,05	0,1	0,2	2,0	4,0	6,0
2	2						
5	5						
7	7						

Las células Vero (5×10^4 células/mL) fueron sembradas en placas de 96 pozos. Después de 24 horas, las células fueron tratadas con concentraciones seriadas 1:3 en el rango de 4,7–300 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los AE (Tabla 2) por 72 horas. Después del tratamiento, se añadieron 20 μL de resazurina (0,1 mg/mL) por pozo y cuatro horas después, se midió la absorbancia espectrofotométricamente utilizando un lector de placas Synergy H1 (Bio-Tek, Vermont, USA) a 570 y 600 nm. Los porcentajes de citotoxicidad se calcularon como sigue:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = \frac{100 * (\text{absorbancia células no tratadas} - \text{absorbancia células tratadas})}{\text{absorbancia de células tratadas}}$$

Las CC_{50} definida como la concentración de compuesto que reduce la viabilidad celular en un 50% respecto al control no tratado, se determinaron mediante regresión sigmoideal utilizando el software Mxlfite™ (ID Business Solution/UK) para cada tipo celular. Los experimentos se realizaron con tres replicas biológicas y tres replicas técnicas ($n = 9$). Se expresaron como la media de $CC_{50} \pm$ desviación estándar (DE). Los criterios para establecer el grado de toxicidad de los compuestos fueron: valores de CC_{50} menores a 75 $\mu\text{g/mL}$: compuestos tóxicos; CC_{50} entre 75 y 200 $\mu\text{g/mL}$: compuestos parcialmente tóxicos; CC_{50} superior a 200 $\mu\text{g/mL}$: no tóxicos (Riss et al., 2004).

3.2.6 *Ensayo de proliferación celular con cristal violeta en células Vero*

Las variables evaluadas se observan en la Tabla 4. La capacidad proliferante (aumento del número de células viables o de células adheridas a la superficie de la placa respecto al control) se cuantificó mediante ensayo de viabilidad con cristal violeta (CV) el cual se une inespecíficamente a componentes celulares presentes en las células adheridas como proteínas y ácidos nucleicos. La técnica estima indirectamente la biomasa celular total, reflejando el efecto proliferante del compuesto evaluado. Se incluyeron pozos control sin tratamiento y pozos control sin células. Se seleccionó como óptima la combinación que, sin alcanzar valores máximos de absorbancia, ofrecía las condiciones para identificar efectos proliferantes en las células Vero (Feoktistova et al., 2016).

Tabla 4

Variables evaluadas en la implementación de prueba de viabilidad con cristal violeta.

Células Vero /mL x 10 ⁴	Cristal violeta (%, p/v)			Tiempos de incubación con cristal violeta (horas)		
1						
2						
3	0,25	0,5	1,0	10	20	30
4						
5						
6						

Las células Vero (5 x 10⁴ células/mL) fueron sembradas en placas de 96 pozos. Después de 24 horas, las células fueron tratadas con concentraciones seriadas 1:3 de los 20 AE (4,7–300 µg/mL), con alantoína (0,14–100 µg/mL) o sin compuesto (control) a 37°C con 5% de CO₂. Se dejaron controles sin células. Después de 72 horas, se retiró el medio de cultivo y los pozos se lavaron dos veces con PBS pH 7,4 para eliminar las células no adherentes (no viables) mediante inversión. Se adicionaron 50 µL de CV al 0,5% y se dejaron las placas en agitación orbital (Baltalab

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Modelo SHO-1D, Argentina) a 20 oscilaciones/minuto por 20 minutos. El CV se removió por inversión, se realizaron dos lavados con PBS pH 7,4 y la placa se dejó secar durante 24 horas. Posterior al secado, se adicionaron 200 μ L de metanol por 20 minutos (en agitación). Las placas fueron leídas espectrofotométricamente a longitud de onda de 570 nm en un lector de placas Synergy H1. Se compararon la absorbancia de las células tratadas versus las no tratadas. Los resultados se expresaron como media \pm DE de la absorbancia obtenida en cada condición experimental. Se consideró como proliferación aquel compuesto que mostró valores de absorbancia significativamente mayores respecto al control. Los experimentos se realizaron con tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas ($n = 9$) para cada condición. La proliferación se definió como la capacidad del compuesto para aumentar el crecimiento celular de manera estadísticamente significativa al compararse con el control sin tratamiento (tres pozos sin tratamiento), utilizando la prueba de Kruskal-Wallis para el análisis estadístico.

3.2.7 Ensayo de migración por herida de scratch (rasguño)

Para determinar la concentración celular que garantice una monocapa uniforme y reproducible con porcentajes de cierre superiores al control sin tratamiento y una concentración de SFBIC que permita la viabilidad de las células, sin influir en los fenómenos de proliferación y migración celular, diferentes concentraciones de células Vero ($1-3 \times 10^5$ células/mL) y de SFBIC (0-10%) fueron utilizadas.

Una vez fijadas las condiciones, las células Vero (2×10^5 células/mL) en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 1,5% de SFBIC se dejaron a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar el 80% de confluencia. Se realizó un scratch a través de la superficie celular utilizando una punta de micropipeta de 100 μ L. Las células fueron lavadas dos veces con PBS pH 7,4 y tratadas con 10 AE en dos concentraciones (dependiendo del AE) entre 1,23 y 33,3 μ g/mL por 24 horas. Las

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

células fueron fijadas con metanol 100% durante un minuto y coloreadas con Giemsa al 5% durante 15 minutos. Para el registro fotográfico de los campos microscópicos, se utilizó un adaptador para microscopio AmScope (Modelo CA-NIKS, Irvine, CA, EE. UU.) para acoplar la cámara digital (Nikon, Modelo D5500, Tokio, Japón) al microscopio óptico invertido Olympus (Modelo IX83, Tokio, Japón). Se realizó una marca sobre la mitad del pozo con un lápiz de punta de diamante, con el fin de indicar el inicio de la zona para el registro fotográfico. Se tomaron 6 campos microscópicos a un aumento de 400x. Las fotografías a las 0 horas se tomaron en fresco, mientras que para las 24 en células coloreadas. El software ImageJ, version 1.53 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU), se utilizó para calcular el área total en píxeles y el área abierta sin células (*scratch*) a partir de las fotografías obtenidas. Los resultados se expresaron como porcentaje de área de *scratch* y porcentaje de cierre de la herida respecto al tiempo 0, calculados a partir del análisis digital de las imágenes obtenidas en cada tiempo experimental. El porcentaje del área del *scratch* (0, 24 y 48 horas) se determinó usando la fórmula:

$$\% \text{ del área del } \textit{scratch} = \frac{\text{área del rasguño} \times 100}{\text{área total}}$$

El porcentaje de cierre del área del *scratch* como (Liang et al., 2007)

$$\% \text{ de cierre del } \textit{scratch} = \% \text{ del área del rasguño (0 horas)} - \% \text{ del área del rasguño (24 o 48 horas)}$$

Los valores de cada tratamiento se compararon con los del control sin tratamiento mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples cuando fue necesario. Se realizaron tres réplicas biológicas y dos réplicas técnicas por condición $n = 6$. Se consideró positivo (efecto pro-migratorio o proliferativo) aquel compuesto o concentración que produjera un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de cierre del área del *scratch* respecto al control sin tratamiento ($p < 0,05$).

3.2.8 Implementación de modelos in vivo

3.2.8.1 Animales consideraciones éticas. Se utilizaron ratones BALB/c los cuales fueron suministrados por el Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS) en Bogotá. Los animales fueron alojados en cajas individuales estériles con presión negativa, bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, a una temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de $55 \pm 5\%$. Se les proporcionó acceso ad libitum a agua y pellets de alimento para ratones. Se cumplieron con los principios éticos propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en los Principios Internacionales para la Investigación Biomédica con Animales, donde se destaca el principio de las "Tres R" (reemplazo, reducción y refinamiento), (Asociación Médica Mundial, 2024; National Research Council (US) Institute for Laboratory Animal Research., 2024). En Colombia, la ley 84 de 1989 y la Resolución 8430 de 1993 establecen que queda prohibido todo acto que implique maltrato o crueldad hacia los animales y regula el uso de animales en investigación científica, indicando que se deben adoptar medidas adecuadas para garantizar su bienestar y reducir al máximo posible el dolor, estrés o incomodidad. La Declaración de Helsinki establece en su artículo 21 que los estudios con personas deben estar respaldados por experimentos previos adecuados en animales, realizados con respeto a su bienestar y minimizando su sufrimiento. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CENCI), Acta No. 4110 del 6 de marzo de 2020.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

3.2.8.2 Implementación de las lesiones excisionales en ratones BALB/c. Se utilizaron ratones BALB/c normoglicémicos (NG) machos de 6 a 8 semanas de edad. Los ratones fueron rasurados en la piel distal con una rasuradora mecánica, 24 horas previas a la realización de las lesiones. Los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina (80/10 mg/kg), administrándose en un volumen de 150 μ L por vía intraperitoneal. Cuando la sedación fue verificada se procedió a la creación de dos heridas excisionales en ambos lados de la línea media dorsal utilizando un punch quirúrgico (BR Surgical, LLC) de 5 mm de diámetro. Los roedores fueron monitorizados hasta su recuperación, observándose los signos de dolor, ingesta de agua y alimento; así como su movilidad. La asignación a cada grupo experimental se llevó de manera aleatoria, mediante el aplicativo web Research Randomizer.

Se realizó seguimiento fotográfico con cámara digital (Nikon), previa aplicación de un rectángulo adhesivo de 1cm de alto por 2 cm de largo como guía (Figura 13).

Figura 13

Procedimiento para la medición de heridas en modelo animal.



Las áreas de lesiones (mm^2) se obtuvieron para las lesiones izquierda y derecha utilizando el software ImageJ (NIH). Las mediciones de la herida de la izquierda y de la derecha fueron

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

promediadas, procediéndose al cálculo del porcentaje de cierre de lesión usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de cierre de la herida} = \frac{\text{área inicial de la herida} - \text{área final de la herida}}{\text{área inicial de la herida}} \times 100$$

Adicionalmente, se graficó la evolución del tamaño de lesión en el tiempo de evaluación, determinándose el área bajo la curva (AUC, mm² / días) de la gráfica con el fin de realizar una cuantificación global de la progresión de la lesión, y facilitar las comparaciones estadísticas. El AUC fue calculado utilizando GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Software, Dotmatics, Estados Unidos, 2018) para Windows (Rhea & Dunnwald, 2020).

Los ratones fueron sacrificados mediante aplicación intraperitoneal de xilacina/ketamina seguido de dislocación cervical (Tung, 2009). Se tomaron biopsias de las lesiones, una parte fue dejada en formalina al 10%, preparada en PBS pH 7,2, durante al menos 24 horas, para el estudio histológico, y otras fueron almacenadas en seco bajo congelación a -70°C. para la cuantificación de citoquinas y factores de crecimiento.

3.2.8.3 Implementación del modelo excisional en ratones hiperglicémicos (HG). Se utilizaron ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad. El modelo de ratones HG fue inducido con una o varias dosis de STZ. Las formulaciones de STZ se prepararon inmediatamente antes de su aplicación en un buffer de citrato al 0,1 M, pH 4,5 y se aplicaron por vía intraperitoneal. Los niveles de glucosa en sangre fueron monitoreadas utilizando tiras reactivas en un glucómetro Contour XT de Bayer (Renania del Norte-Westfalia, Alemania). Se realizaron dos grupos experimentales: uno tratados con una dosis única de 200 mg STZ/kg peso de ratón (grupo STZ-1) y otro con dosis diarias de 30 mg/kg peso de ratón por cinco días (grupo STZ-2). Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena de la cola, y los niveles de glicemia se midieron antes de la administración de STZ, semanalmente. Los niveles de glucosa superiores a 250 mg/dL, mantenidos durante dos semanas, se clasificaron como HG (Shafiee et al., 2018). Durante el proceso, los niveles de glicemia de los roedores tratados con ambas dosis, y sin tratar, fueron graficados y analizados para los días 1, 8, 15 y 22.

3.2.8.4 Tratamiento de ratones NG y HG tratados con Fitostimoline® (FS®) (control).

El tamaño de la muestra se calculó previamente mediante una prueba piloto con tres ratones utilizando el software G*Power versión 3.1.9 (Universität Düsseldorf), estableciendo un poder estadístico del 80% y un nivel de significancia alfa de 0,05. Con un $n = 7$ para cada grupo experimental, la FT® se evaluó en ratones NG e HG (STZT 1 y 2) (Tabla 5). Como controles grupos de ratones NG e HG permanecieron sin tratamiento. El seguimiento se realizó durante los 10 días de tratamiento.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Tabla 5

Grupos experimentales ratones NG e HG tratados con FT® y controles.

	<i>n</i>	Código	STZ	Fitostimoline®
1	7	STZ-1	200 mg/kg x 1 día	Sin tratamiento
2	7	STZT-1	200 mg/kg x 1 día	2 veces al día durante 10 días
3	7	STZ-2	30 mg/kg x 5 días	Sin tratamiento
4	7	STZT-2	30 mg/kg x 5 días	2 veces al día durante 10 días
5	7	NG	Sin tratamiento	Sin tratamiento
6	7	NGT	Sin tratamiento	2 veces al día durante 10 días

Nota. STZ: Estreptozotocina; NG: Ratones NG sin tratamiento; NGT: Ratones NG con FS®; STZ-1: Dosis única de estreptozotocina (200 mg/kg); STZ-2: Dosis repetida de estreptozotocina (30 mg/kg x 5 días); STZT-1 y STZT-2: Grupos tratados con FS® dos veces al día durante 10 días tras la administración de STZ.

Para evaluar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se emplearon análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías como pruebas paramétricas, mientras que la prueba de Kruskal-Wallis se utilizó como prueba no paramétrica. Se aplicaron comparaciones múltiples de Dunnett y Dunn. Se consideraron los siguientes niveles de significancia estadística: $p < 0,05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***)). Los gráficos y los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism.

3.3 Resultados

3.3.1 Control de cicatrización

La Tabla 6 resume la información encontrada en la búsqueda realizada. El control positivo utilizado en el estudio se seleccionó con base en criterios de disponibilidad, costo y respaldo científico. Se eligió la alantoína debido a su fácil acceso comercial y bajo costo en comparación con otros fármacos de referencia, además le encontrado en la revisión (Araújo et al., 2010; Valle et al., 2020).

Tabla 6

Controles positivos en cicatrización.

Factor	Modelo /metodología	Hallazgos	Referencia
TGF- β	Modelos animales (cerdo Duroc y conejos): inducción de heridas cutáneas y aplicación de TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, anticuerpos neutralizantes o inhibidores; análisis mediante histología e inmunohistoquímica.	TGF- β 1 y TGF- β 2 se correlacionaron con fibrosis. TGF- β 3 indujo una regeneración de tipo fetal con menor cicatriz.	(Penn et al., 2012)
PDGF	Cultivos de fibroblastos y en modelos murinos; aplicación de PDGF exógeno; uso de animales con alteraciones genéticas en los receptores PDGFR- α / β ; ensayos de proliferación, migración (cámara de Boyden) y análisis bioquímicos (inmunoprecipitación, Western blot).	PDGF fue esencial para la formación de tejido de granulación, la angiogénesis y la supervivencia celular, a través de vías PI3K, MAPK, Ras y Akt.	(Heldin & Westermark, 1999)
EGF	Cultivos de queratinocitos y fibroblastos y en heridas cutáneas de modelos murinos y úlceras humanas; velocidad	EGF reduce el tiempo de cicatrización, activa las vías como PI3K/Akt y STAT3, e	(Bodnar, 2013)

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Factor	Modelo /metodología	Hallazgos	Referencia
	de cierre, re-epitelización y calidad del tejido; análisis por Western blot e inmunohistoquímica.	incrementa la proliferación y migración de queratinocitos.	
Alantoína	Araujo: 60 ratas Wistar con heridas de ~1 cm ² . Grupos: sin tratamiento, vehículo y 5% de alantoína, con mediciones planimétricas y análisis histológico (infiltrado inflamatorio, colágeno). Valle: ratas Wistar con heridas de 2 cm, aplicando películas de pectina con alantoína.	Reducción temprana y significativa del área de la herida, mejor organización de la MEC, y mejoras en la retención de humedad y velocidad de contracción de la lesión.	(Araújo et al., 2010; Valle et al., 2020)
Acemanan (<i>Aloe vera</i>)	Ratones BALB/c con heridas excisionales; diferentes dosis de acemanano; cierre de la herida y análisis histológico (re-epitelización y colágeno); uso de inhibidores específicos de la vía AKT/mTOR (rapamicina, AKT inhibidor VIII) para determinar el mecanismo.	Promovió la proliferación de fibroblastos y aumentó de la síntesis de proteínas, activación de mTOR y p70S6K, favoreciendo el cierre y regeneración de la herida.	(Hu et al., 2015)
Curcumina	Sidhu: ratas albinas suizas y cobayos con heridas excisionales; tiempo de cierre, organización del colágeno (tinción Masson) y expresión de TGF- β 1 y fibronectina (RT-PCR, hibridación in situ). Grandjean-Laquerriere: queratinocitos humanos irradiados con UVB; EMSA y ELISA para medir factores de transcripción y citocinas.	La curcumina redujo en aproximadamente un 35% el tiempo de cicatrización y aumentó la densidad de miofibroblastos; además, bloqueó la activación de NF- κ B, disminuyendo la expresión de citocinas	(Grandjean-Laquerriere et al., 2002; Sidhu et al., 1998)

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Factor	Modelo /metodología	Hallazgos	Referencia
Ácido clorogénico	Ratas Wistar con heridas de 0,4 cm ² ; pomada al 1%, control con sulfadiazina de plata; área del área de la herida/día; histología (para colágeno IV) e inmunohistoquímica (para TGF-β1 y TNF-α).	proinflamatorias y atenuando el daño por radiación. Se comprobó que el ácido clorogénico acorta el tiempo de cicatrización de manera similar a la sulfadiazina, estimulando el depósito de colágeno y aumentando las defensas antioxidantes en el tejido de granulación.	(Chen et al., 2013)
Quercetina	Ratones C57Bl/6J con heridas excisionales y cultivos de fibroblastos L929; evaluación de integrinas (αV y β1) mediante citometría de flujo; <i>scratch assay</i>	Mejóro la calidad de la cicatrización, redujo la fibrosis, moduló la expresión de integrinas, favoreció la migración celular y la reparación tisular.	(Doersch & Newell-Rogers, 2017)
Ácido gálico	Queratinocitos HaCaT y fibroblastos (MEF, HF21) NG e HG, ensayos de migración en placas con mitomicina C; análisis de fosforilación de FAK, JNK y Erk por Western blot.	Facilito la cicatrización <i>in vivo</i> , mejoró el perfil antioxidante (SOD2, CAT, GPx1) en condiciones de HG (sugerido para el tratamiento en diabéticos)	(Yang et al., 2016)

Nota. TGF-β = factor de crecimiento transformante beta; PDGF = factor de crecimiento derivado de plaquetas; EGF = factor de crecimiento epidérmico; PI3K = fosfatidilinositol 3-cinasa; MAPK = proteína quinasa activada por mitógenos; Akt = proteína quinasa B; STAT3 = transductor de señal y activador de la transcripción 3; FAK = quinasa de adhesión focal; JNK = quinasa N-

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

terminal de c-Jun; Erk = quinasa regulada por señales extracelulares; SOD2 = superóxido dismutasa 2; CAT = catalasa; GPx1 = glutatión peroxidasa 1

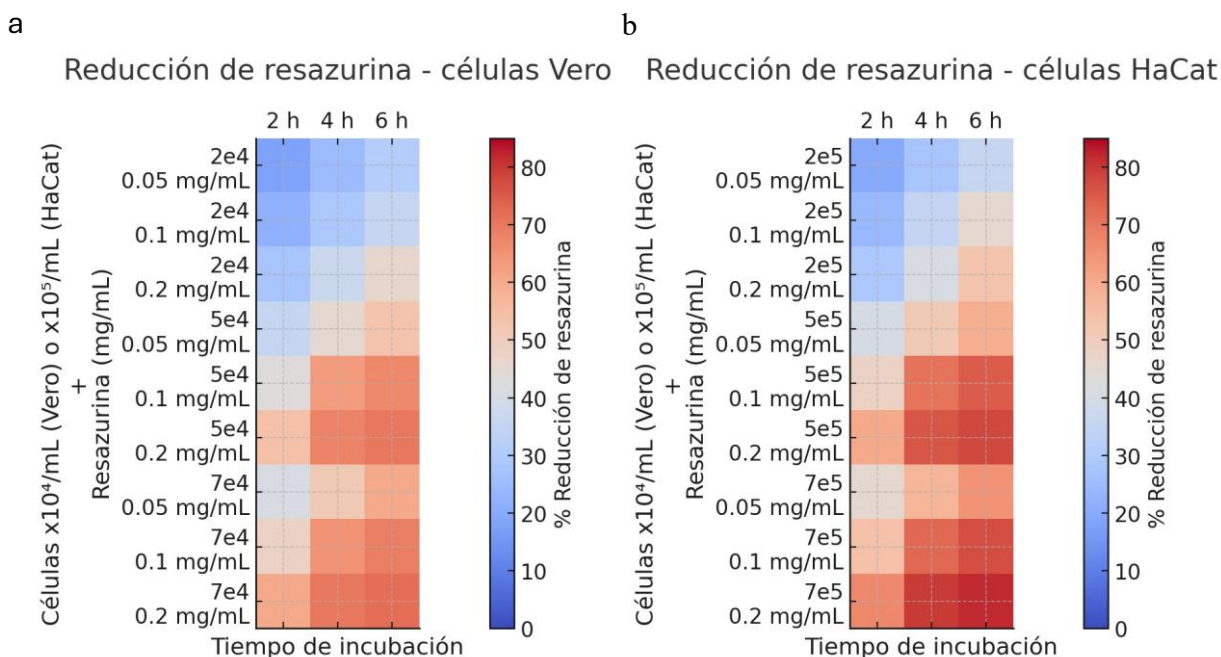
3.3.2 Implementación del ensayo de resazurina y evaluación de la citotoxicidad de 20 AEs

Se realizó un mapa de calor con las tres variables estudiadas en las dos líneas celulares (Figura 14). El porcentaje de reducción de la resazurina se incrementó (rojo-naranja) proporcionalmente con el aumento del número de células, concentración de resazurina y tiempo de incubación, en ambas líneas celulares. En células Vero, la condición óptima identificada correspondió a 5×10^4 células/mL, 0,1 mg/mL de resazurina y 4 horas de incubación, con un porcentaje de reducción del 63%. En células HaCaT, la combinación óptima fue 5×10^5 células/mL, 0,1 mg/mL de resazurina y 4 horas de incubación, alcanzando un 71% de reducción. En ambos casos, se seleccionaron las condiciones más bajas que superaron el umbral del 60% de reducción, permitiendo optimizar el uso de reactivos y células sin afectar la sensibilidad del ensayo.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 14

Porcentaje de reducción de resazurina bajo diferentes condiciones experimentales

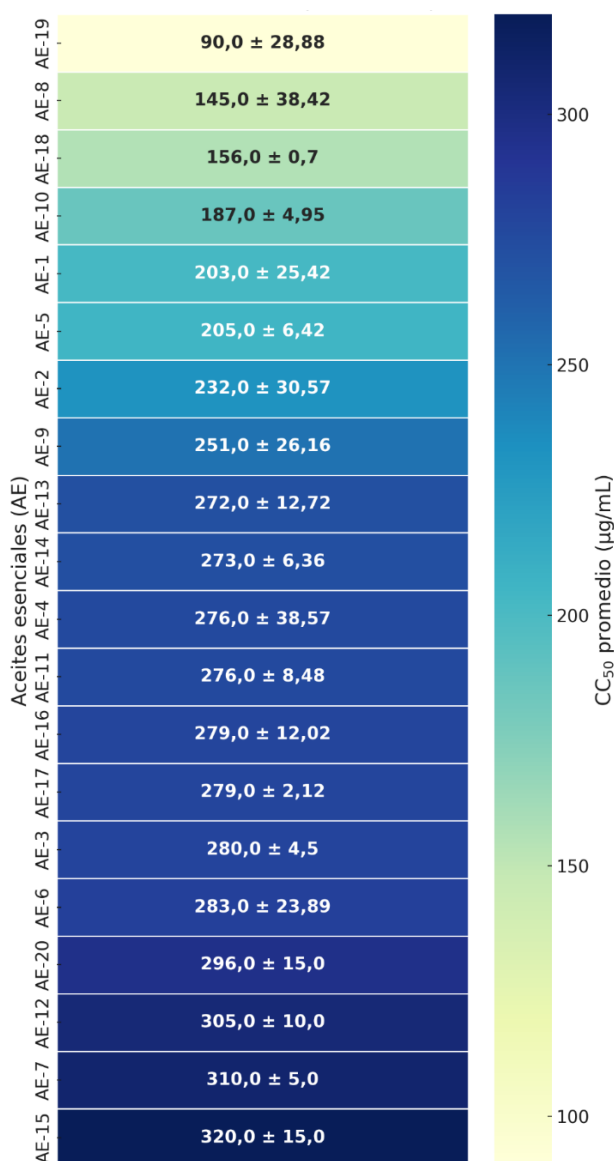


Nota. (a) El mapa de calor muestra el porcentaje de reducción de resazurina en células Vero (A) y HaCaT (B), incubadas con distintas concentraciones de resazurina (0,05–0,2 mg/mL) y densidades celulares (2×10^4 a 2×10^5 células/mL) durante 2, 4 y 6 horas.

La potencia de los 20 AE (efecto citotóxico, en CC_{50}) fue evaluada en células epiteliales Vero. Los AE 1-7, 9,11, 12-17 y 20 presentaron valores de CC_{50} superiores a 200 $\mu\text{g/mL}$ (no citotóxicos), los AE 8, 10, 18 y 19 valores de CC_{50} entre 90 y 187 $\mu\text{g/mL}$ (parcialmente citotóxicos). Ningún AE evaluado presentó un valor de CC_{50} inferior a 75 $\mu\text{g/mL}$, es decir ninguno se clasificó como tóxico. En el mapa de calor (Figura 15) muestra que el AE-19 fue el que más potencia presentó en las células Vero.

Figura 15

Mapa de calor de la potencia (CC_{50}) de los AE en células Vero.



Nota. Los AE se organizaron de mayor a menor CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)

3.3.3 Implementación de ensayo con CV evaluación de la proliferación celular de 20 AEs

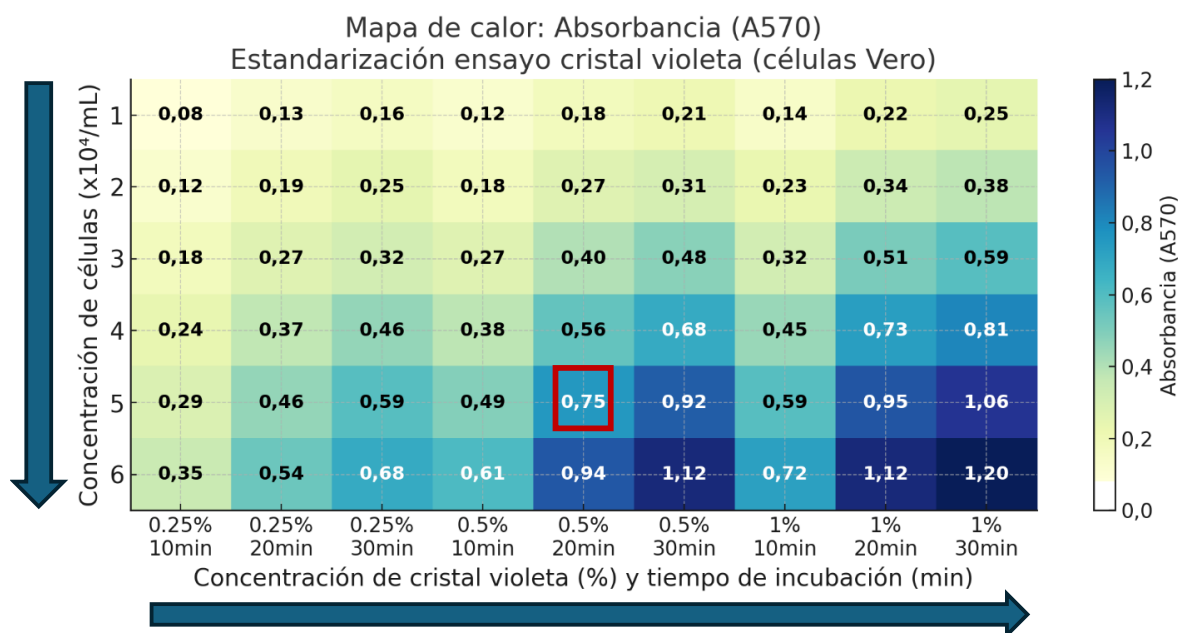
Las absorbancias para cada parámetro medidos a 570 nm aumentan progresivamente tanto con el incremento de la densidad celular ($1-6 \times 10^6$) como con mayores concentraciones de cristal violeta (%) y tiempos de incubación (Figura 16). Los valores máximos se encontraron a 6×10^4

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

células/mL, 1% de CV y 30 minutos de incubación. Se seleccionaron como condiciones óptimas una concentración de 5×10^4 células/mL, una concentración de cristal violeta al 0,5% y un tiempo de incubación de 20 minutos.

Figura 16

Mapa de calor de las absorbancias (570 nm) a diferentes concentraciones de células, de CV y tiempos de incubación



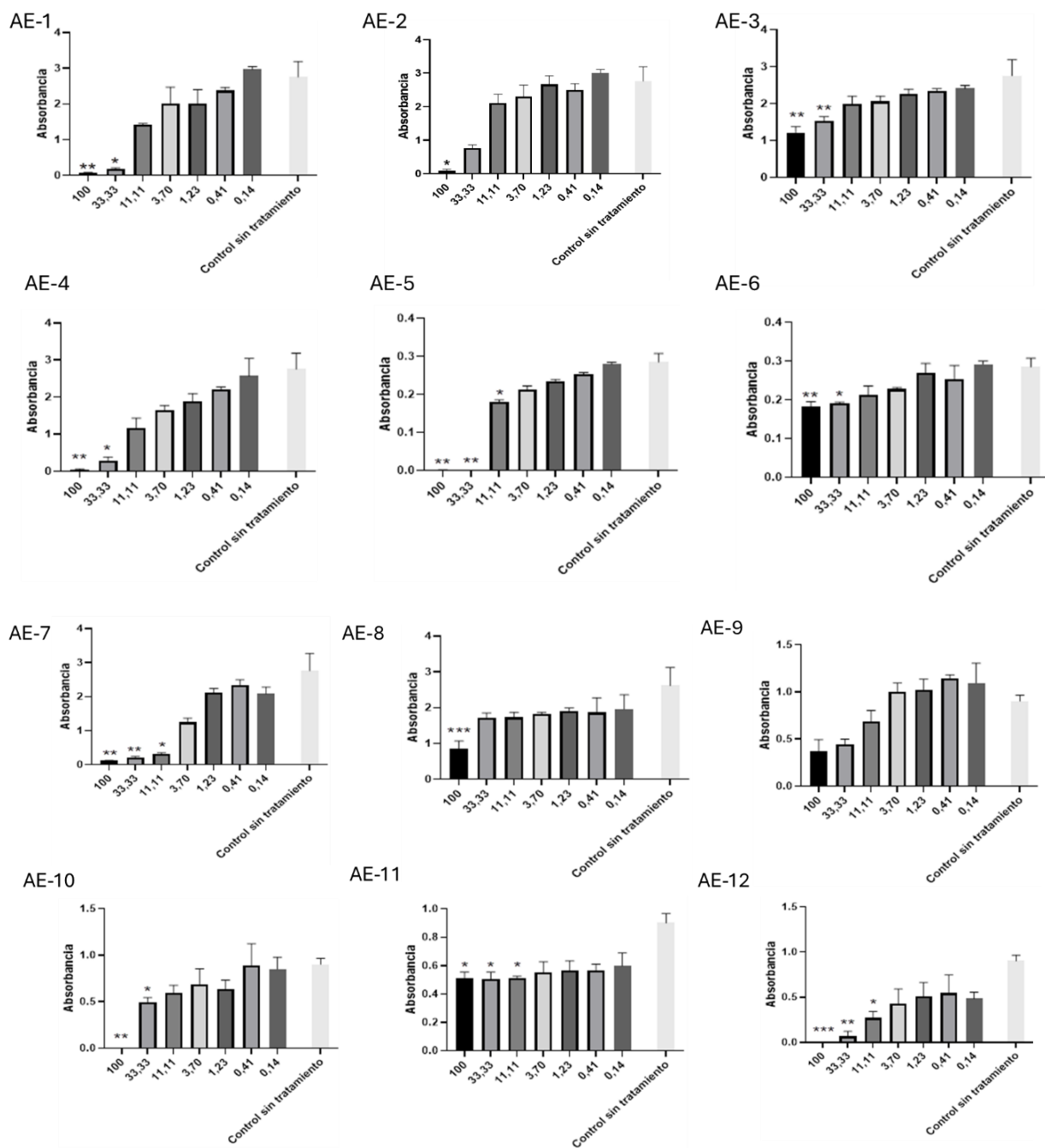
Nota. La matriz muestra los valores de absorbancia obtenidos para diferentes combinaciones de concentración celular ($1-6 \times 10^4$ células/mL), concentración de cristal violeta (0,25%, 0,5% y 1%) y tiempos de incubación (10, 20 y 30 minutos).

Ninguno de los 20 AE, ni la alantoína, presentaron un promedio de absorbancia superior al control sin tratamiento. No se observaron diferencias estadísticamente significativas indicativas de efecto proliferante para ningún AE (Figura 17).

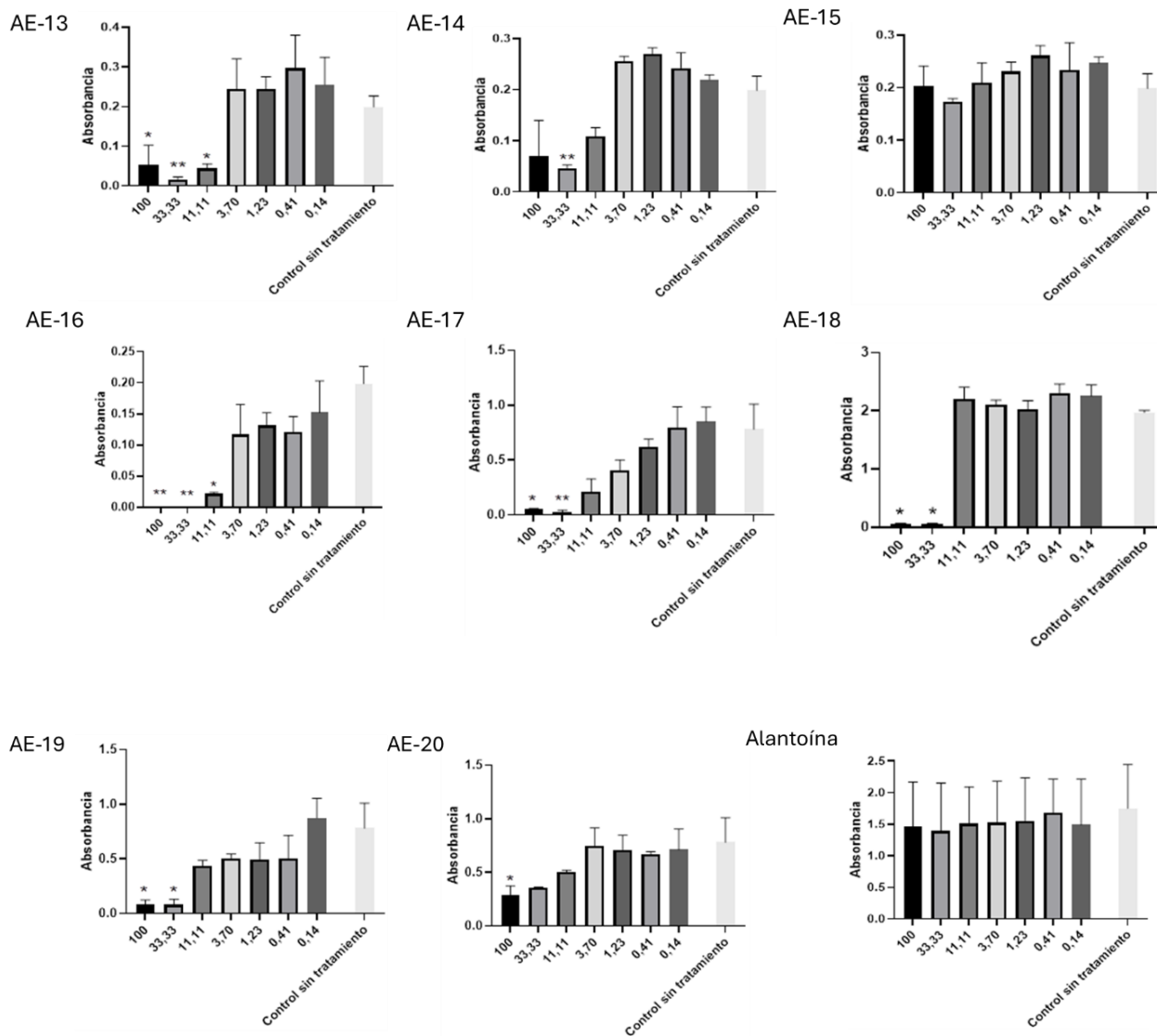
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 17

Efecto de los aceites esenciales sobre la viabilidad celular evaluada mediante ensayo de cristal violeta en células Vero.



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE



Nota. Los valores corresponden a la media \pm DE de la absorbancia medida a 570 nm después del tratamiento de células Vero por 72 horas con diferentes concentraciones de AE y sin AE (control sin tratamiento comparación con el control sin tratamiento). Se realizaron tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas por condición experimental.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

3.3.4 Comparación entre la citotoxicidad (CC_{50}) en el ensayo con resazurina y la pérdida de viabilidad en el ensayo de proliferación con cristal violeta.

En la Tabla 7 se presenta una comparativa entre la pérdida de viabilidad obtenida para el CV y la clasificación de la citotoxicidad obtenida en el ensayo de resazurina. En el ensayo de resazurina se identificaron 4 AE como “parcialmente citotóxicos” (8, 10, 18 y 19). En el ensayo de proliferación celular, los aceites 9 y 15 fueron los únicos de los 20 AE evaluados que no mostraron pérdida de viabilidad en comparación con el control sin tratamiento.

Tabla 7

Comparativa de la pérdida de viabilidad vs la citotoxicidad mediante cristal violeta y resazurina

AE	Perdida de viabilidad-CV ($\mu\text{g/mL}$)	Nivel de citotoxicidad (Resazurina)	AE	Perdida de viabilidad-CV ($\mu\text{g/mL}$)	Nivel de citotoxicidad
1	100, 33,3	No tóxico	11	100, 33,33, 11, 11	No tóxico
2	100	No tóxico	12	100, 33,33, 11, 11	No tóxico
3	100, 33,33	No tóxico	13	100, 33,33, 11, 11	No tóxico
4	100, 33,33	No tóxico	14	33,33	No tóxico
5	100, 33,33, 11, 11	No tóxico	15	Ninguna	No tóxico
6	100, 33,33	No tóxico	16	100, 33,33, 11, 11	No tóxico
7	100, 33,33, 11, 11	No tóxico	17	100, 33,33	No tóxico
8	100	P. tóxico	18	100, 33,33	P. tóxica
9	Ninguna	No tóxico	19	100, 33,33	P. tóxico
10	100	P. tóxico	20	100	No tóxico

Nota. P: parcialmente tóxico. CV: cristal violeta.

3.3.5 Implementación del ensayo scratch

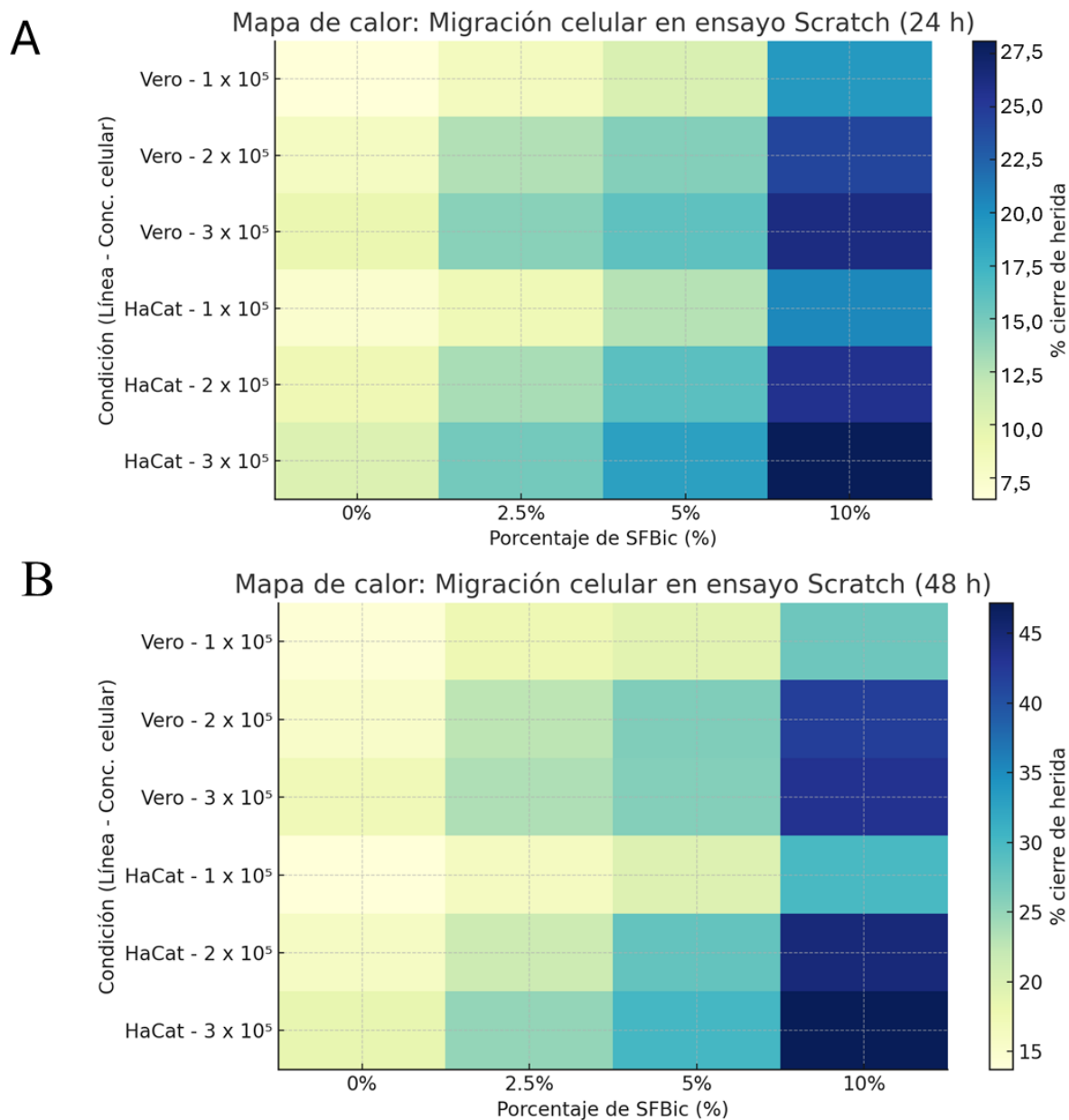
La incubación de las células con SFBic al 10% promovieron significativamente el cierre de la herida en ambas líneas celulares, alcanzando porcentajes superiores al 40% para las

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

concentraciones de 2×10^5 y 3×10^5 células/mL. En contraste, los controles sin suero (0 % SFBic) mostraron los valores más bajos de migración (~15 % en ambas líneas). La condición intermedia (2,5 % SFBic), especialmente con 2×10^5 células/mL, alcanzó un cierre moderado (21–23 %) sin estimular proliferación, por lo que se adoptó como condición óptima para evaluar migración independiente de efectos proliferativos (Figura 18). Se muestra un ejemplo de imágenes capturadas en el proceso de implementación con medio de cultivo suplementados con SFBic al 2,5% (Figura 19).

Figura 18

Porcentaje de cierre de herida en ensayo scratch a 24 h (A) y 48 h (B).

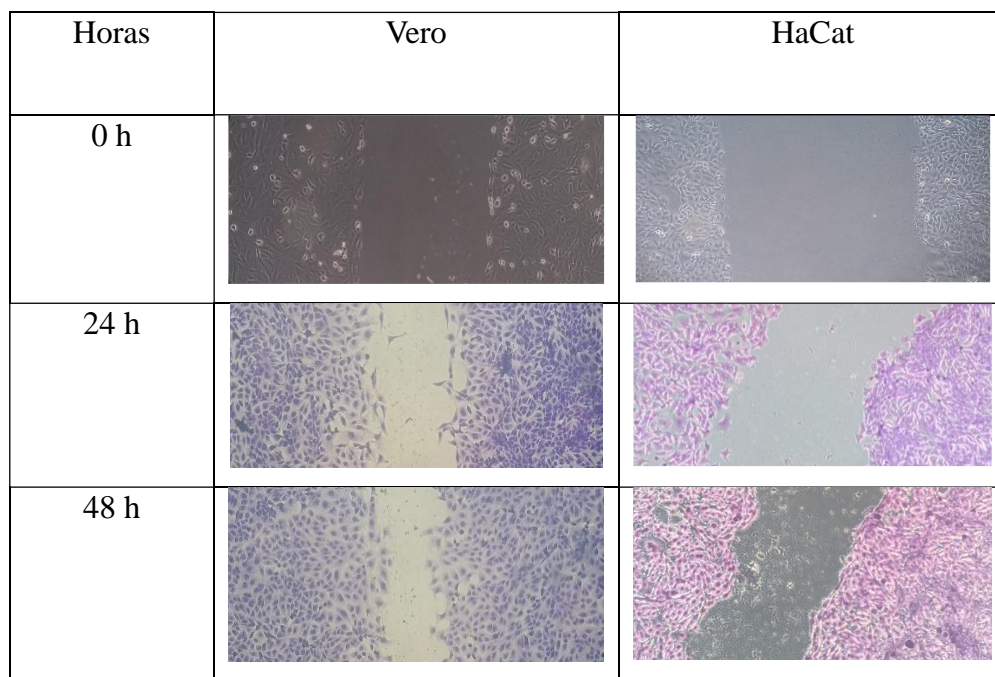


Nota. Mapas de calor correspondientes al porcentaje de cierre de herida en el ensayo de migración celular tipo *scratch* para células Vero y HaCaT bajo diferentes condiciones de concentración celular y porcentaje de SFBic. (A) Porcentajes obtenidos a las 24 horas de incubación. (B) Porcentajes obtenidos a las 48 horas.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 19

Microfotografías capturadas del ensayo scratch en células incubadas con medio de cultivo suplementado con SFBIC al 2,5%



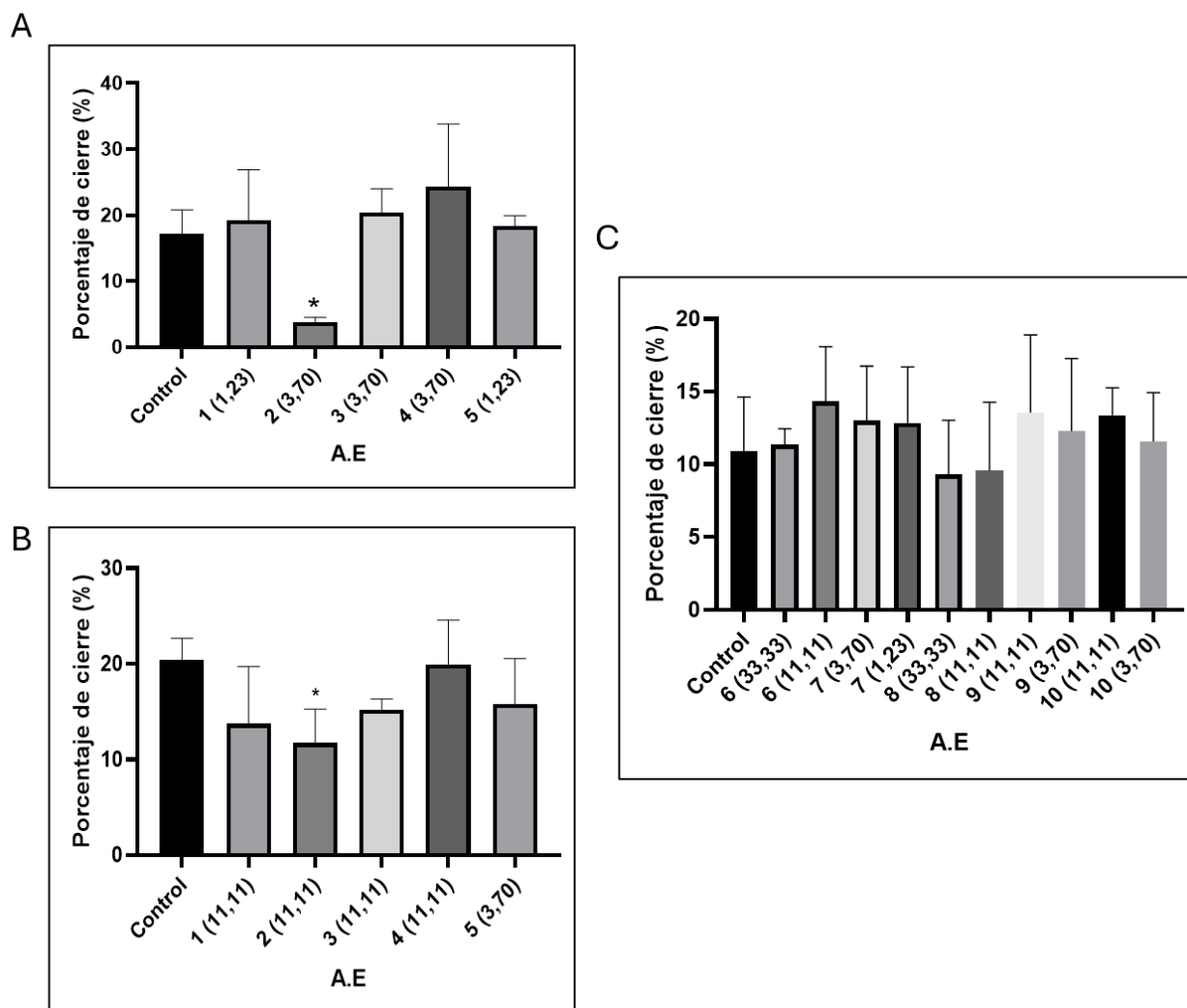
3.3.6 Efecto proliferativo/migratoria de los AE-1-10 en ensayo de scratch

Ninguno de los 10 AE evaluados mostró un efecto proliferante/migratorio sobre la línea celular Vero. Se observó un efecto negativo del AE-2 (2,70 y 11,11 $\mu\text{g/mL}$) sobre la proliferación / migración celular al compararse con el control sin tratamiento ($p < 0,05$) (Figura 20 y Figura 21).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 20

Porcentaje de cierre de lesiones en el ensayo de scratch con células Vero-tratadas con los AE- 1-10 por 24 horas.



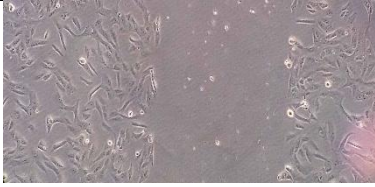
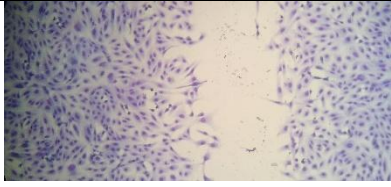
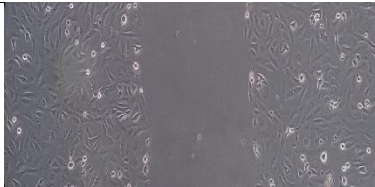
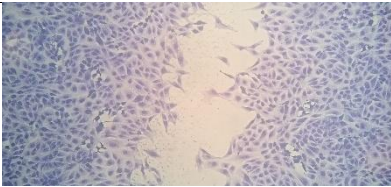

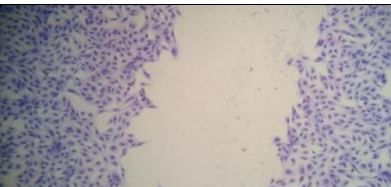
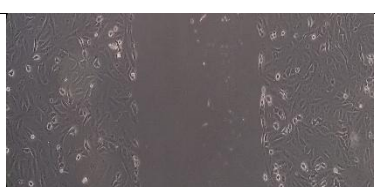
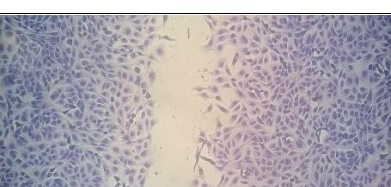

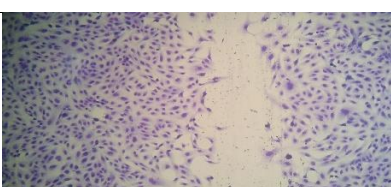

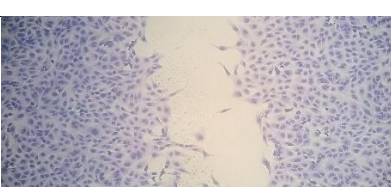
Nota. (A) Porcentaje de cierre para los AE 1 a 5 evaluados a 1,23 µg/mL (AE 1 y 5) y 3,70 µg/mL (AE 2, 3 y 4). (B) Porcentaje de cierre para los AE 1 a 4 evaluados a 11,11 µg/mL y 5 a 3,70 µg/mL. (C) Porcentaje de cierre para AE-6 (3,70 y 11,11 µg/mL), AE-7 (3,70 y 11,11 µg/mL), AE-8 (3,33 y 33,33 µg/mL), AE-9 (3,70 y 11,11 µg/mL) y AE-10 (3,70 y 11,11 µg/mL), Las barras representan

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE


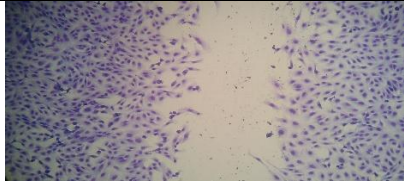
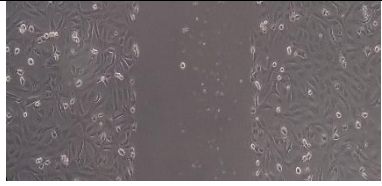
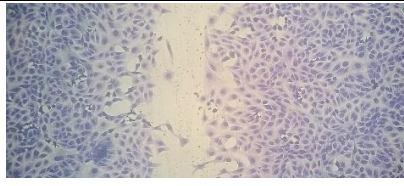

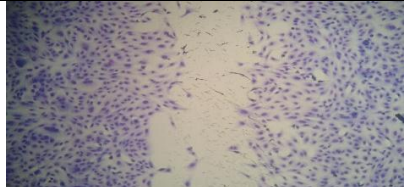
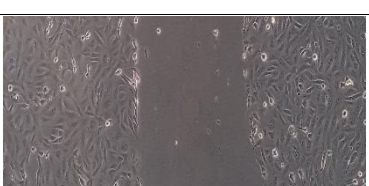
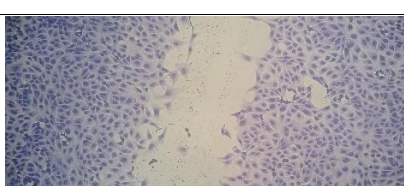
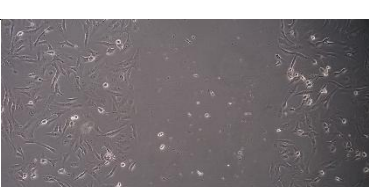
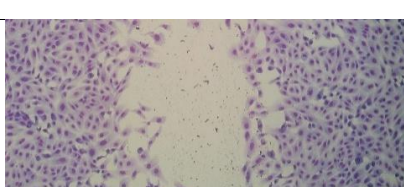
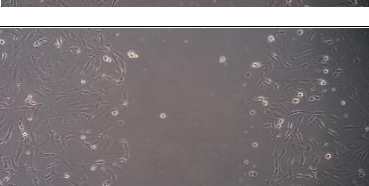
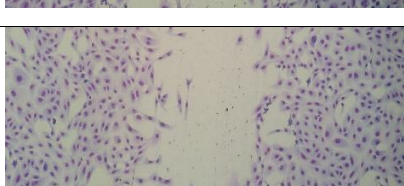
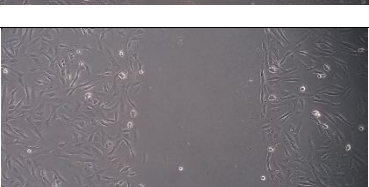
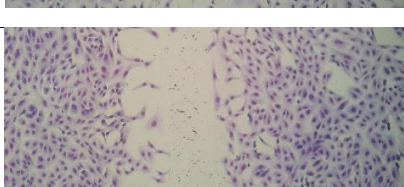
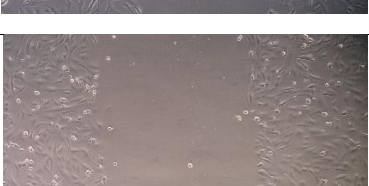
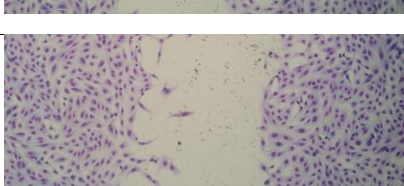
la media \pm DE de seis réplicas ($n = 6$). El asterisco (*) indica diferencia estadísticamente significativa frente al control sin tratamiento ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis y Dunn).

Figura 21

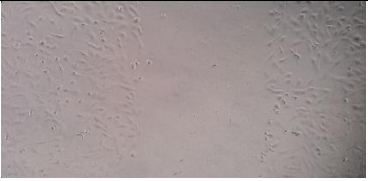
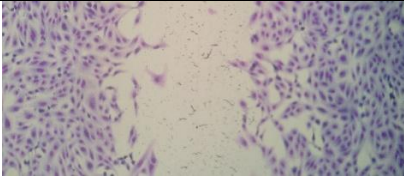
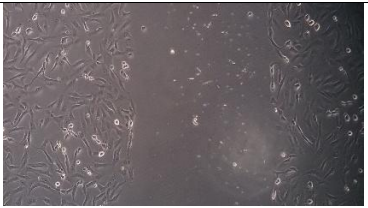
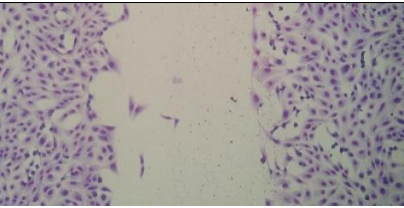
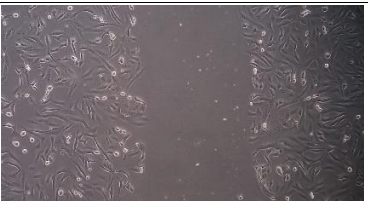
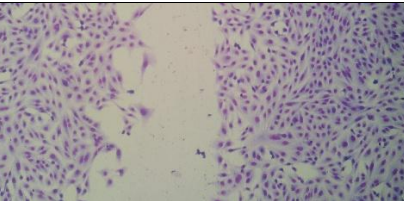
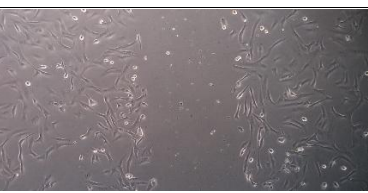
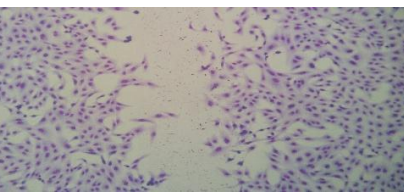
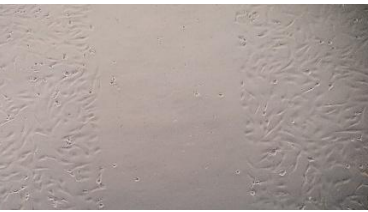
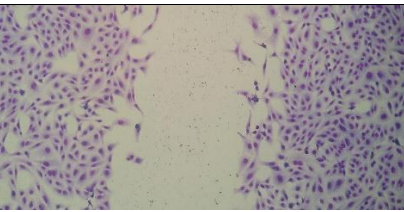

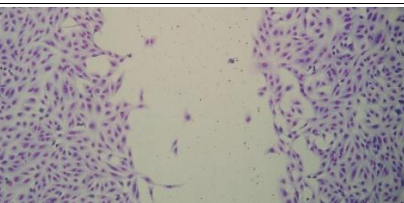

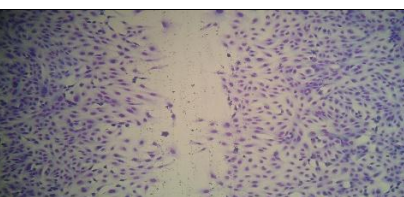
Microfotografías del ensayo de proliferación/migración por scratch en células Vero-tratadas con los AE. Sin teñir (tiempo 0) y teñidas con Giemsa.

AE	Hora 0	24 horas	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
1			1,23
			11,11
2			3,70
			11,11
3			3,70
			11,11

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

4			3,70
			11,11
5			1,23
			3,70
6			11,11
			33,33
7			1,23
			3,70

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

8			11,11
			33,33
9			3,70
			11,11
10			3,70
			11,11
Control			N.A

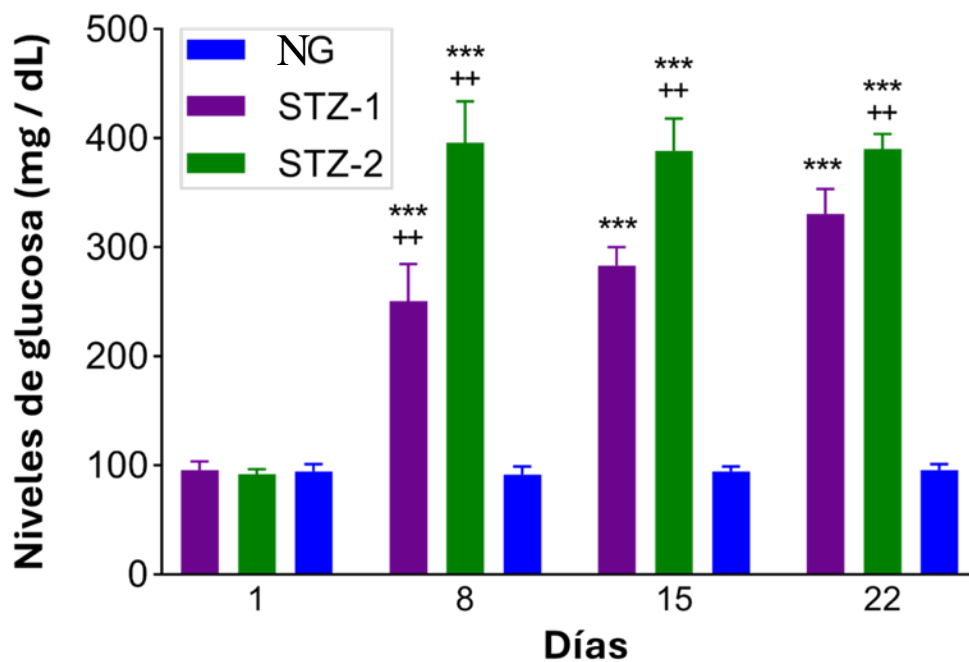
Nota. Las células Vero, después de 24 de tratamiento con dos diferentes concentraciones del AE fueron coloreadas con Giemsa. EL control utilizado fue no tratado. Las dos columnas muestran las microfotografías (40x) el día 0 y después de 24 h del tratamiento. NA: no aplica.

3.3.7 Efecto del tratamiento con FS®) en ratones NG e HG

3.3.7.1 Inducción de la hiperglicemia en los ratones. Los niveles de glucosa en sangre en ratones BALB/c fueron monitoreados durante 22 días después del tratamiento con STZ (Figura 22). El grupo control mantuvo niveles de glucosa estables alrededor de $94,02 \pm 1,46$ mg/dL a lo largo del estudio. Los grupos tratados con las dosis STZ-1 y STZ-2 mostraron diferencias significativas en los niveles glucémicos en los días 8, 15 y 22 en comparación con el grupo no tratado ($p < 0,001$). Además, los niveles de glucosa en el grupo de dosis STZ-2 (dosis múltiple) fueron significativamente más altos que en el grupo STZ-1 (una dosis) ($p < 0,01$). Se detectaron valores glucémicos elevados 8 días después del tratamiento con STZ. En el grupo de dosis STZ-1, se observaron aumentos similares en los días 8, 15 y 22 después del tratamiento (4,3, 4,2 y 4,2 veces más altos que los niveles basales). En contraste, las inyecciones múltiples de dosis bajas de STZ indujeron un estado de hiperglucemia retardado, pero progresivamente creciente (2,6, 3,0 y 3,5 veces más altos que los valores basales). Decidimos utilizar todos los grupos inducidos por STZ después de 15 días de tratamiento con STZ.

Figura 22

Determinación de los niveles de glicemia en los días 1, 8, 15 y 22 en ratones BALB/c NG e HG tratados con STZ.



Nota. STZ: Estreptozotocina, STZ-1: 200 mg/kg x 1 día, STZ-2: 30 mg/kg x 5 días, NG: No STZ.

Se realizó como prueba estadística la comparación de Kruskal-Wallis con prueba post hoc de Bonferroni. Comparación estadística con el grupo control: +; comparación estadística entre grupos tratados. Los niveles de significancia estadística fueron $p < 0,05$ (*, +), $p < 0,01$ (**,++) y $p < 0,001$ (***,+++).

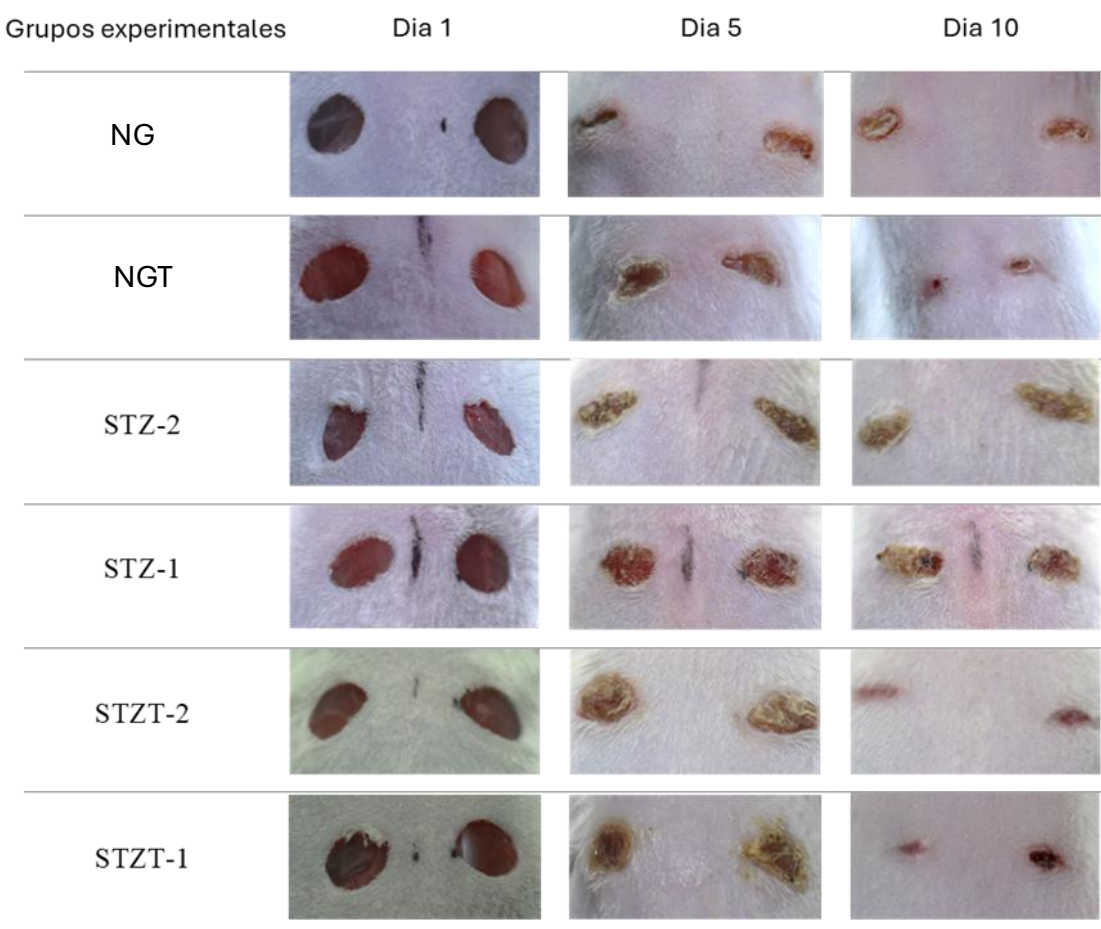
3.3.7.2 Efecto del tratamiento con FS® en ratones NG e HG. Basado en el monitoreo del área de la herida en los días 1, 3, 5, 8 y 10 (Figura 23 y Figura 24), se calcularon los porcentajes de cierre de la herida para los días 3, 5, 8 y 10 (Figura 25 a-c). Después del tratamiento con FT®, todos los grupos tratados (HG y NG) mostraron un aumento en el porcentaje de cierre de la herida en comparación con sus controles no tratados con FT® ($p < 0,05$, Figura 25 a, b, c). Específicamente, para los grupos HG tratados con FT® (STZT-1, STZT-2) en los días 3, 5, 8 y 10, el área de cierre de la herida fue del 43,09%, 51,78%, 65,09% y 84,14% para el grupo STZT-1, y del 43,12%, 51,78%, 42,09% y 84,14% para el grupo STZT-2 (Figura 26 b, c). Para el grupo NG tratado con FT® (NGT), el porcentaje de cierre de la herida fue del 50,45%, 69,84%, 82,12% y 82,37%, mostrando diferencias estadísticas con el control no tratado NG (NG) en el día 5 ($p < 0,001$, Figura 26 a). Los ratones HG no tratados con FT® (grupos STZ-1 y STZ-2) mostraron valores de cierre de herida estadísticamente más bajos que los ratones NG no tratados en los días 5, 8 y 10 ($p < 0,01$).

En consecuencia, el AUC ($\text{mm}^2 \times \text{días}$) en los grupos tratados con FT® (NGT, STZT-1 y STZT-2) mostró valores más bajos en comparación con sus respectivos grupos no tratados (NG, STZ-1 y STZ-2): $74,24 \pm 8,92$ vs $48,41 \pm 7,47$; $85,67 \pm 4,73$ vs $69,07 \pm 7,72$; y $90,92 \pm 9,60$ vs $73,36 \pm 6,63$, respectivamente ($p < 0,05$). Los valores del AUC para los ratones NG no tratados (NG) fueron estadísticamente más bajos que los de los ratones HG ($p < 0,05$), lo que indica un mayor cierre de herida en los ratones NG en comparación con los hiperglucémicos.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 23

Seguimiento fotográfico de las lesiones en los distintos grupos experimentales.

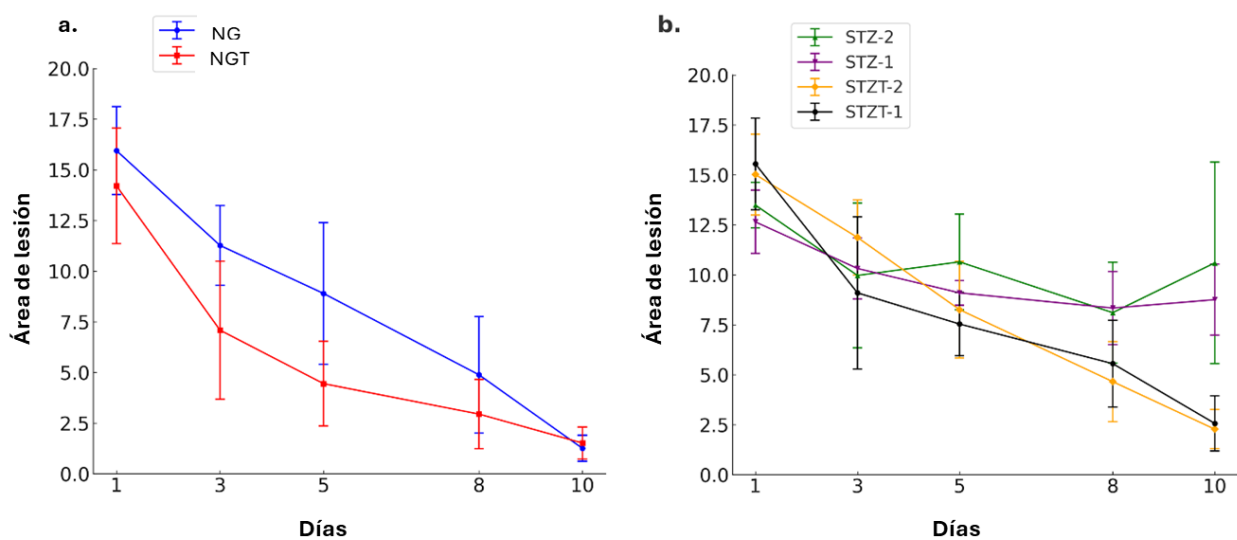


Nota. Fotografías muestran la progresión de las lesiones en los días 1, 5 y 10. Los grupos experimentales fueron: NG (sin tratamiento), NGT (tratados con FS®), STZ-1 (inducidos con una dosis de STZ), STZ-2 (inducidos con múltiples dosis de STZ), STZT-1 (una dosis de STZ y tratados con FS®) y STZT-2 (múltiples dosis de STZ y tratados con FS®).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 24

Monitoreo del área de las lesiones (mm²) en los días 1, 5 y 10 en los diferentes grupos experimentales de ratones BALB/c normoglucémicos e hiperglucémicos, tanto tratados como no tratados con FT®.

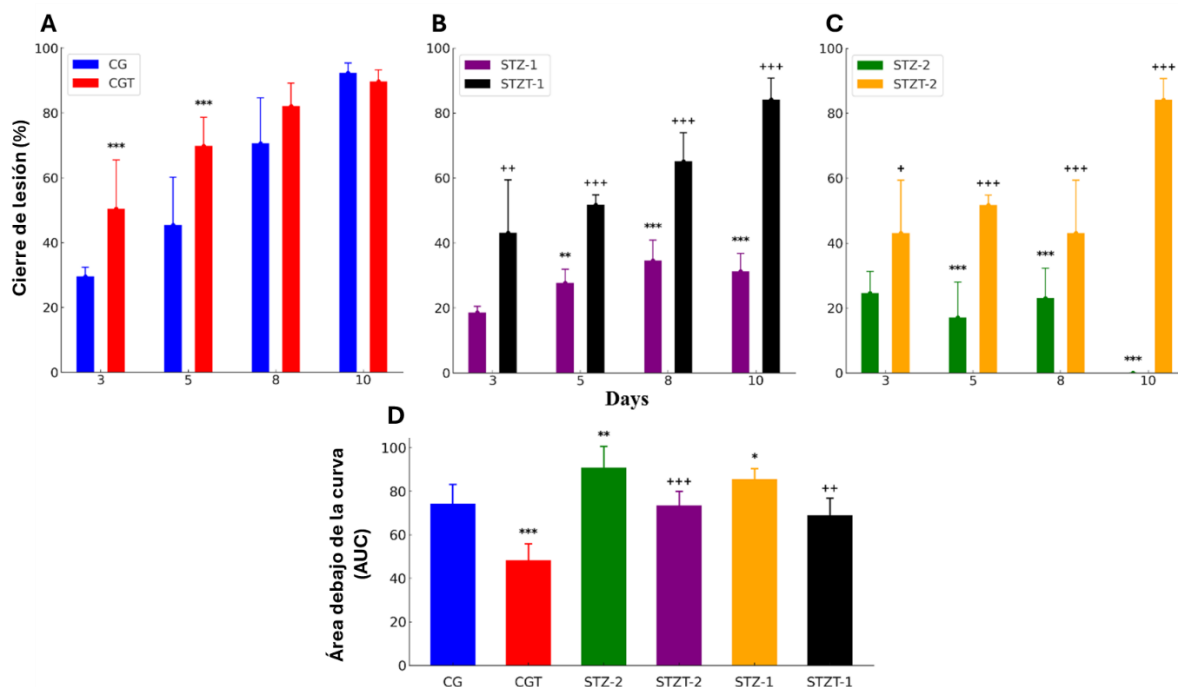


Nota. Los grupos experimentales fueron: NG (sin tratamiento), NGT (tratados con FS®), STZ-1 (inducidos con una dosis de STZ), STZ-2 (inducidos con múltiples dosis de STZ), STZT-1 (una dosis de STZ y tratados con FS®) y STZT-2 (múltiples dosis de STZ y tratados con FS®).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 25

Cicatrización in vivo en los diferentes grupos experimentales



Nota. Reducción porcentual en el área de la lesión en los días 3, 5, 8 y 10 (a-c) y áreas bajo la curva (AUC) de la progresión de la lesión durante los diez días (d). NG (sin tratamiento), NGT (tratados con FS®), STZ-1 (inducidos con una dosis de STZ), STZ-2 (inducidos con múltiples dosis de STZ), STZT-1 (una dosis de STZ y tratados con FS®) y STZT-2 (múltiples dosis de STZ y tratados con FS®). El análisis estadístico se realizó utilizando un Kruskal-Wallis con la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Los niveles de significancia para la comparación con el grupo NG fueron $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***); las comparaciones entre STZ-1 vs. STZT-1 y STZ-2 vs. STZT-2 fueron: $p < 0,05$ (+), $p < 0,01$ (++) y $p < 0,001$ (+++).

3.4 Discusión

Para responder a las necesidades planteadas por el objetivo del presente capítulo, se inició con una revisión no bibliográfica de posibles controles positivos para la evaluación de la cicatrización *in vivo*. Aunque factores de crecimiento como el TGF- β (perfil antifibrotico), PDGF (granulación y angiogenesis) y EGF (reepitelización) se postulan como candidatos interesantes, su coste elevado limita su idoneidad para la tesis planteada (Badran & Nabili, 2018; Penn et al., 2012; K. Xu & Yu, 2011). En su lugar, se opta por la alantoína como control positivo *in vivo*, apoyándose en la evidencia preclínica consistente de reducción temprana del área lesional y mejora histológica de matriz extracelular (Araújo et al., 2010; Valle et al., 2020). Con respecto al modelo *in vivo*, se seleccionó la FT® por su capacidad de promoción de la migración/proliferación, estímulo de MEC (fibronectina/ácido hialurónico), polimerización de actina y restauración de barrera epidérmica en condiciones fisiológicas y diabéticas (Gölgeli Bedir & Yanmaz, 2023; Sanguigno et al., 2015; Tito et al., 2020)

Para la evaluación de la viabilidad celular *in vivo* se implementaron los ensayos de reducción metabólica de la resazurina y el cristal violeta como indicador colorimétrico de las células adheridas (Feoktistova et al., 2016; Hamid et al., 2004). En ambos casos se modificaron variables como la concentración celular, y la concentración del indicador de viabilidad, optimizándose para su posterior uso en la evaluación de AE. A pesar de que ambas técnicas fueron sencillas, rápidas y económicas de ejecutar, el protocolo implementado con cristal violeta implica la realización de lavados para la eliminación del colorante (Feoktistova et al., 2016). Este resulta un paso crítico, pues las células adheridas pueden ser eliminadas, generando variabilidad y estimaciones erróneas de la biomasa celular.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

En la literatura, el ensayo de *scratch* se ha consolidado como una herramienta fundamental para el estudio de la proliferación y migración celular *in vivo* (Balko et al., 2023; Liang et al., 2007). Su implementación requirió la evaluación de variables como la concentración celular y el porcentaje de SFBic empleado durante el procedimiento. Durante este procedimiento se pudo verificar la influencia del SFBic sobre la proliferación celular, estando ambas variables directamente relacionadas. Por tal razón, empleamos en los ensayos una concentración de 2,5% para la evaluación de los compuestos y el control sin tratamiento, y el SFBic al 10% como control de la proliferación celular y del cierre de los *scratch*. Este ensayo resulta esencial para complementarse con las pruebas de citotoxicidad, pues no solo permite la determinación de la proliferación / migración, también permite la verificación de la citotoxicidad, como se evidencio con el aumento del área de lesión en algunos AE (discutido más adelante).

La evaluación del potencial proliferativo de los AE en células Vero no evidencio incrementos significativos frente a controles sin tratamiento. Por el contrario, se observó actividad anti-proliferativa, la cual ha sido identificada en la literatura. Por ejemplo, Bass et al., 2024 reportan que el AE de mānuka disminuye de forma dosis-dependiente la proliferación de fibroblastos CUA-4 y de células HT-1080 (-94 % y -55 % a 500 µg/mL); el control con vehículo no produjo descensos significativos; en paralelo, la viabilidad por MTT también se redujo (-25 % y -56 % a 500 µg/mL); además, el tratamiento indujo apoptosis (clivaje de PARP) y activó la vía de JNK. Por su parte, Velandia et al., 2018 evalúan la actividad de 15 aceites esenciales de 11 especies de plantas colombianas mediante MTT para cuantificar la actividad anti proliferativa en las líneas tumorales, empleando líneas no tumorales HEK293 y Vero para el cálculo del índice de selectividad. En este estudio los autores encuentran que AE como el de *Protium heptaphyllum*,

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Lippia graveolens y *Swinglea glutinosa* presentaron los menores índices de selectividad (1,0 a 2,9), indicando actividad anti-proliferante de los aceites en líneas celulares no tumorales.

La capacidad anti-proliferante de algunos AE también se presentó como citotoxicidad en el ensayo de resazurina. Al igual que lo encontrado en el ensayo de cristal violeta, la citotoxicidad parcial de los AE reportada en este trabajo ya ha sido indicativa en otros AE en la literatura. En términos químicos, patrones con cinamaldehído (*Cinnamomum spp.*) mostraron citotoxicidad asociada a estrés oxidativo y apoptosis; mentol/mentona (*Mentha spp.*) redujeron proliferación a $\geq 50 \mu\text{g/mL}$; timol/carvacrol (*Origanum/Lippia spp.*) exhibieron efectos antiproliferativos vía MAPK y PI3K/Akt; mientras que 1,8-cineol (*Eucalyptus globulus*) actuó principalmente como antiinflamatorio sin inducir proliferación en células no tumorales (S.-T. Chang et al., 2001; Kwon et al., 1998; Sampaio et al., 2021).

De manera similar, algunos AE mostraron una reducción de la capacidad proliferativa/migratoria en la línea celular Vero, aumentando el área lesionada en comparación con el control no tratado. Este efecto puede explicarse a la actividad anti-proliferante previamente descrita tanto en nuestro trabajo como en la literatura. Estos efectos, así como la composición compleja de los AE, la cual imposibilita su evaluación mediante técnicas *in silico*, se prefiere continuar en los siguientes capítulos con la evaluación de CDP, los cuales componen los AE.

La fase *in vivo* comenzó con la implementación de las lesiones excisionales en ratones sedados mediante inyección intraperitoneal de un coctel de Xilacina / ketamina. Los roedores se recuperaron satisfactoriamente del procedimiento, realizándose periódicamente el seguimiento de las lesiones mediante la metodología planteada de toma fotográfica y cálculo de lesión. Dado que la diabetes mellitus es una condición patológica que afecta considerablemente la cicatrización, se

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

decidió establecer un modelo *in vivo* de herida excisional bajo condiciones hiperglucémicas mediante la inducción experimental de HG con STZ.

Ambos esquemas de inducción de hiperglicemia llevaron a niveles de glucosa superiores al control sin STZ para el día 8, siendo estadísticamente superiores para los ratones tratados con múltiples dosis de STZ. Esto concuerda con lo registrado en la literatura, donde dependiendo del protocolo de administración, se pueden reproducir distintos tipos de diabetes: dosis únicas elevadas inducen una destrucción rápida y extensa de células β (modelo análogo a diabetes tipo 1), mientras que dosis múltiples y bajas generan una pérdida gradual de la función pancreática (modelo similar a etapas tempranas de diabetes tipo 2) (Baribault, 2016; Ghasemi et al., 2014). la condición hiperglucémica retrasa significativamente el proceso cicatricial, afectando negativamente múltiples aspectos críticos para la reparación tisular, como la función de fibroblastos y queratinocitos, la angiogénesis y la respuesta inflamatoria. Esto prolonga la fase inflamatoria y reduce la calidad del tejido regenerado (Bhardwaj, 2013; Kant et al., 2024; Morretta et al., 2022).

Con respecto al tratamiento con FT®, este redujo las AUC tanto en roedores HG como en roedores NG, alcanzando diferencias estadísticamente significativas desde el tercer día de tratamiento en el porcentaje de reducción del área de lesión. El empleo de este control positivo en modelos experimentales de cicatrización se fundamenta en su eficacia demostrada tanto en condiciones fisiológicas como en situaciones patológicas. Diferentes estudios han reportado que este extracto promueve la migración y proliferación celular, estimula la síntesis de componentes esenciales de la matriz extracelular (como fibronectina y ácido hialurónico), favorece la polimerización de actina y la regeneración de la barrera epidérmica, acelerando así el cierre de heridas y la reparación cutánea (Sanguigno et al., 2015; Tito et al., 2020). En modelos animales, el extracto ha mostrado un efecto reparador significativo tanto en lesiones cutáneas por excisión

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

como por escarificación, reduciendo el área de la herida y mejorando parámetros histológicos clave (Sanguigno et al., 2015). Además, su eficacia ha sido validada en modelos de cicatrización en ratas diabéticas, donde el tratamiento con *Triticum vulgare* aceleró la reducción del área lesionada, incrementó la expresión de VEGF y mejoró la calidad histopatológica del tejido en comparación con los controles (Gölgeli Bedir & Yanmaz, 2023).

En el **anexo 1** se realiza el análisis histológico y de citoquinas de los modelos NG e HG. En modelos murinos diabéticos, el tratamiento con extracto de *Triticum vulgare* (Fitostimoline®) mostró mejoras significativas en la cicatrización, en comparación con animales diabéticos no tratados. Se observó una reducción marcada del infiltrado inflamatorio y del número de mastocitos activados, elementos típicos de la inflamación crónica exacerbada en condiciones hiperglucémicas (Dong et al., 2020), junto con una reducción notable en los niveles tisulares de IL-6, IL-1 β y TNF- α (Gölgeli Bedir & Yanmaz, 2023; Sanguigno et al., 2018). El tratamiento también estimuló la deposición y organización del colágeno y la reepitelización, restaurando el estrato córneo y acelerando la cicatrización. Estos resultados coinciden con estudios previos sobre la capacidad del extracto de *Triticum vulgare* para modular la inflamación y estimular la proliferación fibroblástica y angiogénesis mediante la inducción temprana de VEGF (Tito et al., 2020).

Los mastocitos desempeñan un papel central en la respuesta inflamatoria de heridas, especialmente bajo condiciones diabéticas. En algunos modelos de T1DM, la acumulación de mastocitos puede ser perjudicial, mientras que en otros la depleción de mastocitos resulta esencial en la patogenia (Shi & Shi, 2012). En humanos, los mastocitos migran rápidamente a sitios de lesión, liberando mediadores pro-reparativos y regresando luego a niveles basales. Así, la reducción de mastocitos tras el tratamiento con FT® es un hallazgo positivo.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Modelos experimentales muestran que la piel de ratones diabéticos suele tener mayor grosor del estrato córneo, disminución de queratinocitos, mayor infiltrado inflamatorio y una acumulación de macrófagos y neutrófilos, junto con un aumento en óxido nítrico y peróxidos lipídicos (Okano et al., 2016; Y. Huang et al., 2018). El extracto de TVE fue capaz de reducir la infiltración inflamatoria y modular marcadores oxidativos e inflamatorios como NO, IL-6, TNF- α y prostaglandina E2 (Antonucci et al., 2018; Sanguigno et al., 2015).

La síntesis y organización de colágeno en la piel diabética suele estar alterada, produciéndose un desequilibrio en los tipos de colágeno y una resistencia reducida en las heridas (Bermudez et al., 2011). La inflamación crónica, persistente en las úlceras diabéticas, se caracteriza por la elevación de IL-1, IL-6, TNF- α y varias quimiocinas (Ridiandries et al., 2018; Worsley et al., 2023). La disminución de IL-6 e IL-1 observada con FT® es relevante, ya que la desregulación de estas citocinas está implicada en complicaciones diabéticas (Bradshaw et al., 2009; Lee et al., 2019). IL-1 y IL-6 participan en el reclutamiento de células inflamatorias y en la regulación de procesos reparativos; sin embargo, sus niveles elevados y sostenidos, como ocurre en la diabetes, contribuyen a la cronicidad y dificultad de cierre de las heridas (Macleod et al., 2021).

Respecto a la angiogénesis, se observa un patrón bifásico en la expresión de VEGF-A en la diabetes, con un aumento inicial seguido de disminución posterior, lo que puede deberse a la pérdida de células productoras (Nakagawa et al., 2009). La señalización del receptor tipo 1 de VEGF puede prevenir el retraso en la cicatrización al modular la producción de IL-1 β por macrófagos reclutados (Okizaki et al., 2016).

Niveles elevados de TNF- α en el grupo diabético reflejan un estado inflamatorio persistente, asociado con inflamación crónica y acumulación de macrófagos, posiblemente debido a la activación de la vía Notch inducida por hiperglucemia (Y. Huang et al., 2018). La supresión

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

de TNF- α ha demostrado reducir inflamación y daño tisular en complicaciones diabéticas (Tsuchida et al., 1999), resaltando la compleja interacción entre angiogénesis y resolución inflamatoria en este contexto.

A pesar de las ventajas que presenta el modelo de ratones HG sobre el modelo de roedores NG, el deterioro en la calidad de vida de los roedores y los pasos adicionales en la inducción y medición de los niveles de glicemia, se decide continuar las evaluaciones de los CDP en roedores NG.

3.5 Conclusión

- Las implementaciones realizadas permitieron identificar el efecto de las variables evaluadas, permitiendo establecer condiciones óptimas para la evaluación de CDP en cicatrización.
- El ensayo de viabilidad celular con cristal violeta puede presentar variabilidad en sus resultados debido al requerimiento de lavados en el protocolo implementado.
- La FT® presentó actividad cicatrizante tanto en modelos NG como en el modelo HG, resultando un control positivo robusto para apoyar la evaluación de los CDP *in vivo*
- A pesar de las ventajas que presenta el modelo HG, el modelo NG permitió evidenciar el efecto cicatrizante de la FT®, siendo el modelo seleccionado para la evaluación de los CDP

4 Selección de compuestos derivados de plantas (CDP) con actividad pro cicatrizante mediante técnicas *in silico*

4.1 Introducción

Las técnicas de evaluación *in silico*, permiten caracterizar la interacción de moléculas de interés con blancos terapéuticos implicados en los procesos de fisiopatológicos estudiados (Akbari et al., 2022a, 2022b; S. Adnaik et al., 2020). Con respecto a la cicatrización, las herramientas

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

computacionales como el *docking* molecular (acoplamiento molecular) y la dinámica molecular (MD) computacional han permitido estudiar y seleccionar compuestos que interactúan con proteínas asociadas en una o varias fases del proceso de reparación tisular (Akbari et al., 2022a, 2022b; S. Adnaik et al., 2020; Saleem et al., 2022; Singh et al., 2014). Mientras que, en el *docking* molecular identifica la interacción más estable, en la DM la simulación caracteriza la interacción durante un periodo de tiempo (10 a 100 ns) (Morris et al., 2009; Van Der Spoel et al., 2005).

Diversos estudios han empleado herramientas *in silico* para evaluar los CDP en el contexto de la cicatrización cutánea. Por ejemplo, se ha investigado el potencial de CDP obtenidos de *Cinnamomum zeylanicum* en heridas diabéticas, analizando su interacción con las metaloproteinasas MMP-8 y MMP-9 mediante acoplamiento molecular, donde sus principales compuestos mostraron afinidades de unión relevantes y posible inhibición de estas enzimas (Akter et al., 2025). La validación *in vivo* confirmó un efecto positivo sobre la contracción de la herida y la síntesis de colágeno, reflejado en un aumento del contenido de hidroxiprolina. También se han evaluado el potencial de CDP del extracto de *Marantodes pumilum*, seleccionando tres metabolitos: naringina, eicosano y octacosano, con propiedades antioxidantes y capacidad de modular dianas asociadas a la cicatrización. El análisis por *docking* reveló que la naringina estableció múltiples interacciones por puentes de hidrógeno con colagenasas tipo I, II y III, mientras que los hidrocarburos de cadena larga, eicosano y octacosano, mostraron afinidades mediadas principalmente por interacciones hidrofóbicas (Balachandran et al., 2023). Estos compuestos además favorecieron la migración de fibroblastos y la reepitelización tanto *in vivo* como *in vivo* en un modelo de herida excisional en ratas diabéticas, respaldando su capacidad para modular enzimas clave como MMP-9, MMP-13 y gelatinasa B (Balachandran et al., 2023).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Por otro lado, el *target fishing* es una estrategia computacional utilizada para predecir interacciones ligando-proteína, facilitando la identificación de posibles dianas terapéuticas y la caracterización de mecanismos de acción de moléculas bioactivas (Morris et al., 2009; Nagavalli et al., 2023). Existen dos enfoques principales en *target fishing in silico*: uno basado en ligandos, que utiliza la similitud estructural para predecir interacciones con proteínas diana (*TargetHunter*), y otro basado en receptores, que emplea acoplamiento molecular inverso (*reverse docking*) para explorar interacciones potenciales entre la molécula de interés y múltiples proteínas (Lapillo et al., 2019).

El objetivo del presente trabajo fue seleccionar CDP con potencial cicatrizante mediante técnicas *in silico*, evaluando su interacción con blancos terapéuticos involucrados en la cicatrización.

4.2 Materiales y Métodos

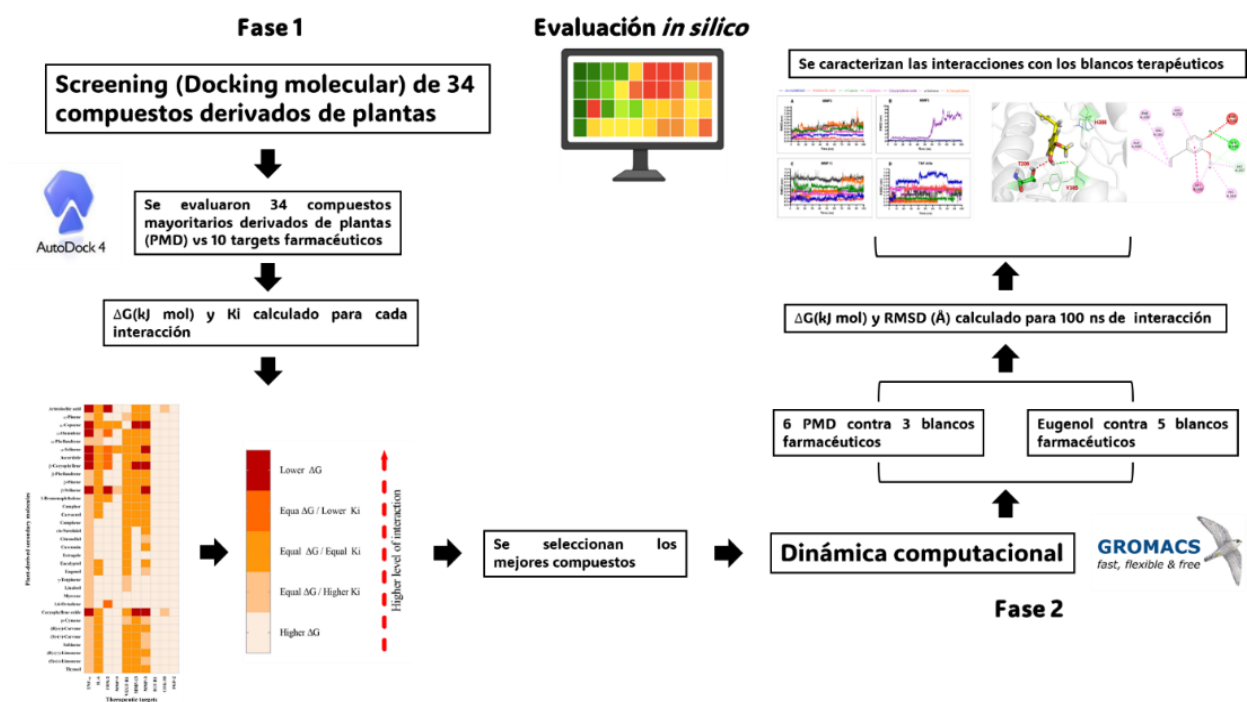
3.2.1 *Diseño experimental*

EL presente capítulo se desarrolló en dos fases. La Fase I consistió en un screening de 34 CDP, y la alantoína, contra 10 blancos terapéuticos (*target* terapéuticas, TT) asociados a la cicatrización cutánea por *docking* molecular. En la fase 2, seis CDPs se caracterizaron utilizando dinámica molecular (MD) mediante simulaciones de interacción con tres blancos terapéuticos. Adicionalmente, el CDP eugenol fue evaluado contra cinco blancos terapéuticos por *target fishing*.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 26

Diseño experimental del capítulo 1



4.2.2 Elección de los CDP

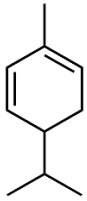
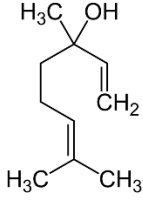
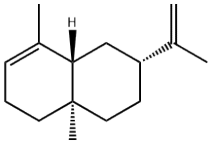

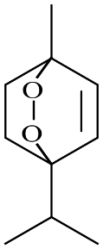

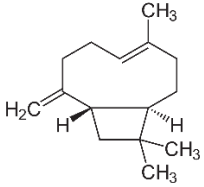
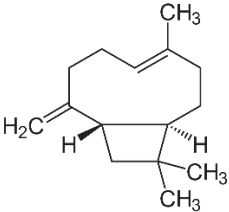
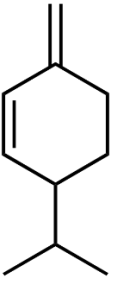
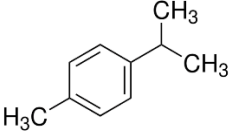
Se escogieron 34 CDP (Tabla 8 y Tabla 10). Estos fueron seleccionados en función de la disponibilidad de su estructura en Drug Bank y PubChem. La mayoría de los CDP representan metabolitos derivados de AE de plantas aromáticas colombianas (Blanco Tirado et al., 1995; Stashenko et al., 2004, 2010). La estructura 2D y algunas características de los CDP estudiadas se muestran en la Tabla 9. Adicionalmente se muestra la estructura de la alantoína utilizada como control de positivo según evidencia de la literatura (Araújo et al., 2010; Madrazo-Jiménez et al., 2016).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

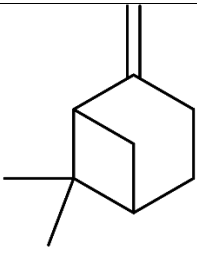
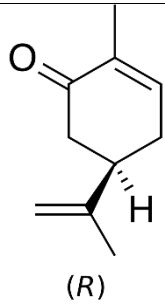
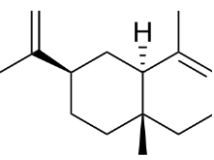
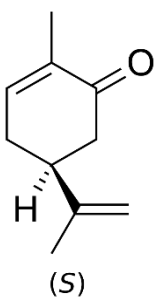
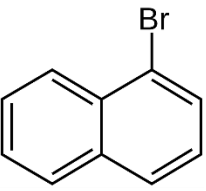
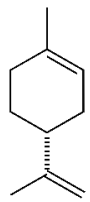
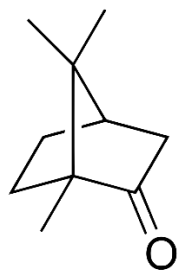
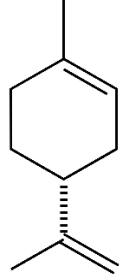
Tabla 8*Estructura 2D y peso molecular de CDP empleados en este Estudio.*

N	Estructura/ PM g/mol	Estructura 2D	N	Estructura/ PM g/mol	Estructura 2D
1	Alantoína 158,12		19	Curcumina 368.4	
2	Ácido aristolóquico 341,27		20	Estragol 148.20	
3	α -Pinoeno 136.23		21	Eucaliptol 154.25	
4	α -Copaeno 204.35		22	Eugenol 164.20	
5	α -Humuleno 04.35		23	γ -Terpineno 136.23	

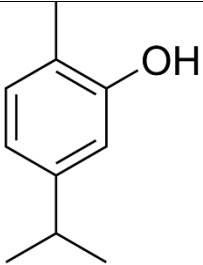
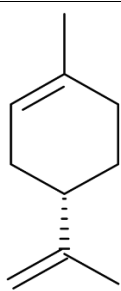
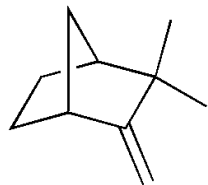
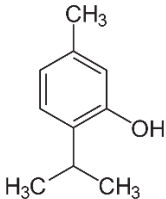
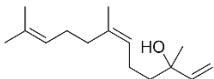
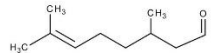
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

N	Estructura/ PM g/mol	Estructura 2D	N	Estructura/ PM g/mol	Estructura 2D
6	α -Felandreno 136.23		24	Linalool 154.25	
7	α -Selinene 204.35		25	Myrceno 136.23	
8	Ascaridol 168.23		26	1,6- Octadieno 110.20	
9	β -cariofileno 204.35		27	Oxido de cariofileno 220.35	
10	β -Felandreno 136.23		28	ρ -Cymeno 134.22	

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

N	Estructura/ PM g/mol	Estructura 2D	N	Estructura/ PM g/mol	Estructura 2D
11	β -Pinoeno 136.23		29	R- (-)- Carvona 150.22	
12	β -Selineno 204.35		30	(S)- (+)- Carvona 150.22	
13	1-Bromonftaleno 207.07		31	R-Limoneno 136.23	
14	Alcanfor 152.23		32	S-Limoneno 136.23	

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

N	Estructura/ PM g/mol	Estructura 2D	N	Estructura/ PM g/mol	Estructura 2D
15	Carvacrol 150.22		33	Sabineno 495.6	
16	Canfeno 136.23		34	Timol 150.22	
17	cis-Nerolidol 222.37				
18	Citronela				

Nota. Estructuras obtenidas de la base de datos PubChem.

4.2.3 Blancos terapéuticos

Teniendo en cuenta su rol en el proceso de cicatrización se eligieron diez targets de cicatrización cutánea (TT). Su elección también se basó en criterios específicos, como la disponibilidad de estructuras cristalinas de alta calidad en el Protein Data Bank (PDB) y la presencia de estructuras co-cristalizadas inhibitoras. En la Tabla 9 se listan los blancos terapéuticos con sus características estructurales y funcionales.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Tabla 9*Listados de blancos terapéuticos evaluados por docking molecular.*

N	Blanco terapéutico (TT)	Características
1	Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)	185 aminoácidos, PM: 17 kDa; proinflamatoria; secretada por monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, células NK y PMN.
2	Interleucina-6 (IL-6)	184 aminoácidos, PM: 22 a 27 kDa; proinflamatoria, secretada por monocitos, macrófagos, linfocitos, fibroblastos, células endoteliales, entre otras.
3	Ciclooxigenasa-2 (COX-2)	604 aminoácidos, PM: 68 kDa. Convierte el ácido araquidónico en prostaglandinas, mediadoras clave en la inflamación y el dolor.
4	Factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2)	155 a 288 aminoácidos (isoformas), PM: 18-34 kDa; promueve la angiogénesis, proliferación celular y reparación de tejidos.
5	Quinasa-3 β de la síntesis de glucógeno (GSK-3 β)	420 aminoácidos, PM: 46 kDa; regula múltiples procesos celulares, incluyendo la señalización Wnt y la homeostasis de la glucosa.
6	Receptor 1 del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-R1)	1367 aminoácidos, PM: 155 kDa; receptor tirosina quinasa; activas vías de señalización como PI3K/AKT y MAPK, crucial para crecimiento y supervivencia celular.
7	Metaloproteinasas de matriz (MMP-3)	477 aminoácidos, PM: 45-57 kDa; degrada componentes de la matriz extracelular como colágeno y proteoglicanos; involucrada en remodelación tisular y enfermedades.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

N	Blanco terapéutico (TT)	Características
8	MMP-9	707 aminoácidos, PM: 92 kDa; degrada colágeno tipo IV; participa en procesos inflamatorios, angiogénesis y metástasis.
9	MMP-13	471 aminoácidos, PM: 54-60 kDa; degrada colágeno tipo II; importante en remodelación ósea, artritis y cáncer.
10	Receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-R1)	1338 aminoácidos, PM: 180 kDa; receptor tirosina quinasa; regula la angiogénesis y permeabilidad vascular, esencial para el desarrollo y regeneración de tejidos.

4.2.4 Docking molecular de los 34 CDP y la alantoína

4.2.4.1 Número de identificación (ID) de los CDP estudiados. En la Tabla 11 se muestra la lista de los CDP utilizados con su respectivo ID. El número de ID correspondió al código de acceso a la respectiva base de datos (Drug Bank o PubChem).

Tabla 10

CDP utilizados en estudios de cribado.

	ID ^a	MDP	ND	ID	MDP
2	2236	Ácido aristoloquico	19	11672 ^b	Curcumina
3	15573 ^b	α -Pino	20	8815	Estragol
4	70678558	α -Copaeno	21	2758	Eucaliptol
5	5281520	α -Humuleno	22	09086 ^b	Eugenol
6	7460	α -Felandreno	23	7461b	γ -Terpineno
7	10856614	α -Selinene	24	6549	Linalool
8	10545	Ascaridole	25	31253	Myrceno

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

9	5281515	Trans- β -Cariofileno	26	5362817	1,6-Octadieno
10	11142	β -Felandreno	27	71742210	Oxido de cariofileno
11	14896	β -Pinoeno	28	7463	ρ -Cymeno
12	442393	β -Selineno	29	439570	(C)- (-)-Carvona
13	7001	1-Bromonftaleno	30	16724	(S)- (+)-Carvona
14	01744b	Alcanfor	31	440917	R-Limoneno
15	10364	Carvacrol	32	439250	S-Limoneno
16	6616	Canfeno	33	18818	Sabineno
17	5320128	cis-Nerolidol	34	02513 ^b	Timol
18	7794	Citronela	1	204	Alantoína

Nota. a identificación. b Estructura obtenida de Drug Bank. Las demás fueron obtenidas de la base de datos PubChem.

4.2.4.2 Ligando co-cristalizado (CL) e interacción con la TT. Para obtener las estructuras de los ligandos-CL de cada TT, la estructura de la proteína objetivo fue procesada utilizando el software BIOVIA Discovery Studio Visualizer, versión 4.5 (Dassault Systèmes). El software Avogadro® (versión 1.2.0) se utilizó para realizar los cálculos del campo de fuerza mecánica (MMFF94) de los CDPs y los CL, mientras que AutoDock Tools (versión 1.5.6) se empleó para la preparación de los TT. La preparación de las proteínas involucró la adición de cargas atómicas unificadas de Kollman, parámetros de solvatación e hidrógenos polares al receptor. Las estructuras del sitio activo de los CL se seleccionaron para el acoplamiento, y el tamaño de la caja de la rejilla y la posición del centro de la rejilla se determinaron utilizando las coordenadas específicas en la Tabla 12.

Tabla 11

Objetivos terapéuticos utilizados en el cribado.

N	ID PDB ^a	Blanco terapéutico	Coordenadas (x, y, z)
	Ligando		
1	2AZ5	Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)	-19.259, 74.79, 34.032
2	1ALU	Interleucina-6 (IL-6)	-3.934, -18.113, 3.394
3	5IKQ	Ciclooxigenasa-2 (COX-2)	22.222, 52.346, 18.018
4	4OEE	Factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2)	-11.744, -6.027, -3.03
5	1Q5K	Quinasa-3 β de la síntesis de glucógeno (GSK-3 β)	23.992, 22.827, 8.884
6	2ZM3	Receptor 1 del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-R1)	37.061, 79.097, 58.051
7	2D1O	Metaloproteinasas de matriz (MMP-3)	28.762, 6.733, 14.320
8	1GKC	MMP-9	48.145, 64.140, 42.896

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

N	ID PDB ^a	Blanco terapéutico	Coordenadas (x, y, z)
		Ligando	
9	2PJT	MMP-13	9.323, 27.639, 141.777
10	3HNG	Receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-R1)	4.729, 17.729, 33.352

Nota. Como ejemplo, 2AZ5 es el DOI de la estructura cristalina del TNF- α con un inhibidor de molécula pequeña. Esta estructura fue resuelta por cristalografía de rayos X. El tamaño de la cuadrícula (x, y, z) fue de 40 x 40 x 40, excepto para IL-6, que fue de 50 x 50 x 50. A Identificación, Banco de Datos de Proteínas (PDB).

4.2.4.3 Análisis de docking molecular. Se utilizó el software Autodock 4.2 (Morris et al., 2009). Como parámetro de salida del mecanismo de búsqueda local, se empleó un algoritmo genético con un tamaño de población de 150 y un algoritmo Lamarckiano. Los archivos obtenidos estaban en formato. dlz, los cuales se usaron para calcular la ΔG , kcal/mol y la K_i , μM . Estos se clasificaron en las siguientes categorías basadas en los resultados del análisis estadístico (prueba de Kruskal-Wallis) de las energías de acoplamiento y las constantes de inhibición para cada grupo de interacciones: menor ΔG (mayor nivel de interacción con las TT), igual ΔG e igual K_i , igual ΔG y menor K_i , y mayor ΔG (menor nivel de interacción con las TT). Aquellos compuestos con el mayor número de interacciones con menor ΔG fueron seleccionados para evaluaciones posteriores *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

4.2.5 Dinámica molecular (MD)

Se realizó en los CDP: ácido aristolóquico, α -copaeno, α -selineno, β -cariofileno, β -selineno y oxido de cariofileno. La simulación de MD se realizó utilizando GROMACS 2018.2, instalado en el servidor NMRbox (Maciejewski et al., 2017). La conformación con menor ΔG de

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

cada complejo seleccionado se consideró como la conformación inicial para los estudios de MD. Los parámetros y topologías moleculares para los ligandos fueron generados utilizando el programa de química cuántica semiempírica SQM de la interfaz AnteChamber Python Parser (ACPYPE) (Sousa Da Silva & Vranken, 2012). Los complejos se describieron utilizando el campo de fuerza Amber99-ILDN de todos los átomos. El complejo proteína-ligando fue solvatado con agua en todos los lados utilizando un modelo de tres puntos para el agua (TIP3P) y una solución de 0.15 M de NaCl. La minimización de energía se llevó a cabo utilizando el algoritmo de descenso más pronunciado. El sistema fue equilibrado mediante un ensamble de temperatura-volumen constante y un ensamble de temperatura-presión constante con el termostato de Berendsen y el barostato de Parrinello-Rahman, respectivamente. Se realizó una simulación de MD de 100 ns en el complejo proteína-ligando. Durante toda la simulación de MD, se analizó el desvío cuadrático medio de las raíces (RMSD, por sus siglas en inglés), y el cálculo de ΔG del complejo se basó en el área superficial molecular de Poisson-Boltzmann mecánica molecular (gmx_MMPBSA) (Parrinello & Rahman, 1980). Los blancos terapéuticos evaluados se presentan en la Tabla 13.

Tabla 12

Objetivos terapéuticos utilizados en el cribado (MD)

N	ID PDB ^a	Blanco terapéutico	Coordenadas (x, y, z)
		Ligando	
1	2AZ5	Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)	-19.259, 74.79, 34.032
2	2D1O	Metaloproteinasas de matriz (MMP-3)	28.762, 6.733, 14.320
3	2PJT	MMP-13	9.323, 27.639, 141.777

Nota. A Identificación, Banco de Datos de Proteínas (Protein Data Bank).

4.2.6 *Target fishing del eugenol.*

Para identificar posibles proteínas diana con las que interactúa el eugenol, se llevó a cabo un enfoque de target fishing utilizando diversas proteínas involucradas en procesos inflamatorios. Específicamente, se seleccionaron COX-2, MMP-3, MMP-9, TNF- α y VEGFR1 para su análisis. Para este propósito, las estructuras proteicas se obtuvieron del PDB y se sometieron a un proceso de optimización geométrica utilizando el campo de fuerza NOVA disponible en la suite YASARA (Krieger & Vriend, 2014). Las estructuras del sitio activo de los CL se seleccionaron para el acoplamiento, y el tamaño de la caja de la rejilla y la posición del centro de la rejilla se determinaron utilizando las coordenadas especificadas en la Tabla 13.

Tabla 13

Objetivos terapéuticos utilizados en el cribado.

N.	ID PDB ^a	Blanco terapéutico	Coordenadas (x, y, z)
	Ligando		
1	2AZ5	Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)	-19.259, 74.79, 34.032
2	5IKQ	Ciclooxigenasa-2 (COX-2)	22.222, 52.346, 18.018
3	2D1O	Metaloproteinasas de matriz (MMP-3)	28.762, 6.733, 14.320
4	1GKC	MMP-9	48.145, 64.140, 42.896
5	3HNG	Receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-R1)	4.729, 17.729, 33.352

Nota. A Identificación, Banco de Datos de Proteínas (Protein Data Bank).

Para los estudios de *docking* molecular, el eugenol fue construido utilizando el programa ChemSketch, y su estructura tridimensional fue optimizada utilizando Chimera 1.14, usando el método AM1-BCC para asignar cargas. Luego, la interfaz gráfica MGLTools 1.5.6 fue utilizada

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

para fusionar hidrógenos no polares y asignar cargas atómicas de Gasteiger a cada átomo en ambas, la proteína optimizada y el eugenol. Las dimensiones del mapa de la malla se seleccionaron como $25 \times 25 \times 25$ Å para cada proteína. La caja de malla fue centrada en x: -33.3, y: -51.4 y z: -27.2 para COX-2; x: 32.8, y: 7.1 y z: 10.4 para MMP-3; x: 21.8, y: -16.1 y z: 17.7 para MMP-9; x: 56.8, y: -9.0 y z: -7.3 para TNF- α ; y x: 5.9, y: 20.0 y z: 32.4 para VEGFR1. Finalmente, una búsqueda conformacional del ligando fue realizada con exhaustiveness = 8, y un rango de energía = 8, usando el programa AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010) instalado en el servidor NMRBox (Maciejewski et al., 2017). Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo utilizando GROMACS 2018.2 (Van Der Spoel et al., 2005) en el servidor NMRBox (Maciejewski et al., 2017), centrándose en los complejos proteína-eugenol con los puntajes de afinidad más altos. Las topologías moleculares de los ligandos seleccionados se generaron con el programa de química cuántica semiempírica SQM, implementado en ACPYPE (Fogh et al., 2005; Rieping et al., 2007; Sousa Da Silva & Vranken, 2012; J. Wang et al., 2004, 2006). Se realizaron simulaciones de dinámica molecular con todos los átomos utilizando el campo de fuerza Amber99-ILDN (Best & Hummer, 2009; Hornak et al., 2006; Lindorff-Larsen et al., 2010) en combinación con el modelo de agua TIP3P (Jorgensen et al., 1998). Los complejos proteína-ligando se solvaron en una caja cúbica llena de agua, manteniendo una distancia mínima de 1.0 nm entre el complejo y los bordes de la caja. Además, se introdujeron aleatoriamente iones Na⁺ y Cl⁻ para neutralizar el sistema y alcanzar una fuerza iónica final de 0.15 M. La minimización de energía de cada sistema se realizó utilizando el algoritmo de descenso más pronunciado. Posteriormente, la equilibración se llevó a cabo utilizando el termostato de Berendsen (Berendsen et al., 1998) y el baróstato de Parrinello-Rahman (Parrinello & Rahman, 1980) hasta alcanzar una temperatura estable de 300 K y una presión de 1 bar. Finalmente, se ejecutaron 100 ns de simulaciones de dinámica molecular. Se

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

monitorearon el RMSD y el número de enlaces de hidrógeno a lo largo de toda la simulación de dinámica molecular para evaluar la estabilidad de los complejos. Además, la energía libre de unión de los complejos proteína-ligando se calculó utilizando el enfoque *Molecular Mechanics/Generalized-Born Surface Area* (MM/GBSA) con gmx_MMPBSA (Valdés-Tresanco et al., 2021)) durante los últimos 30 ns de la simulación.

4.3 Resultados

4.3.1 Docking molecular

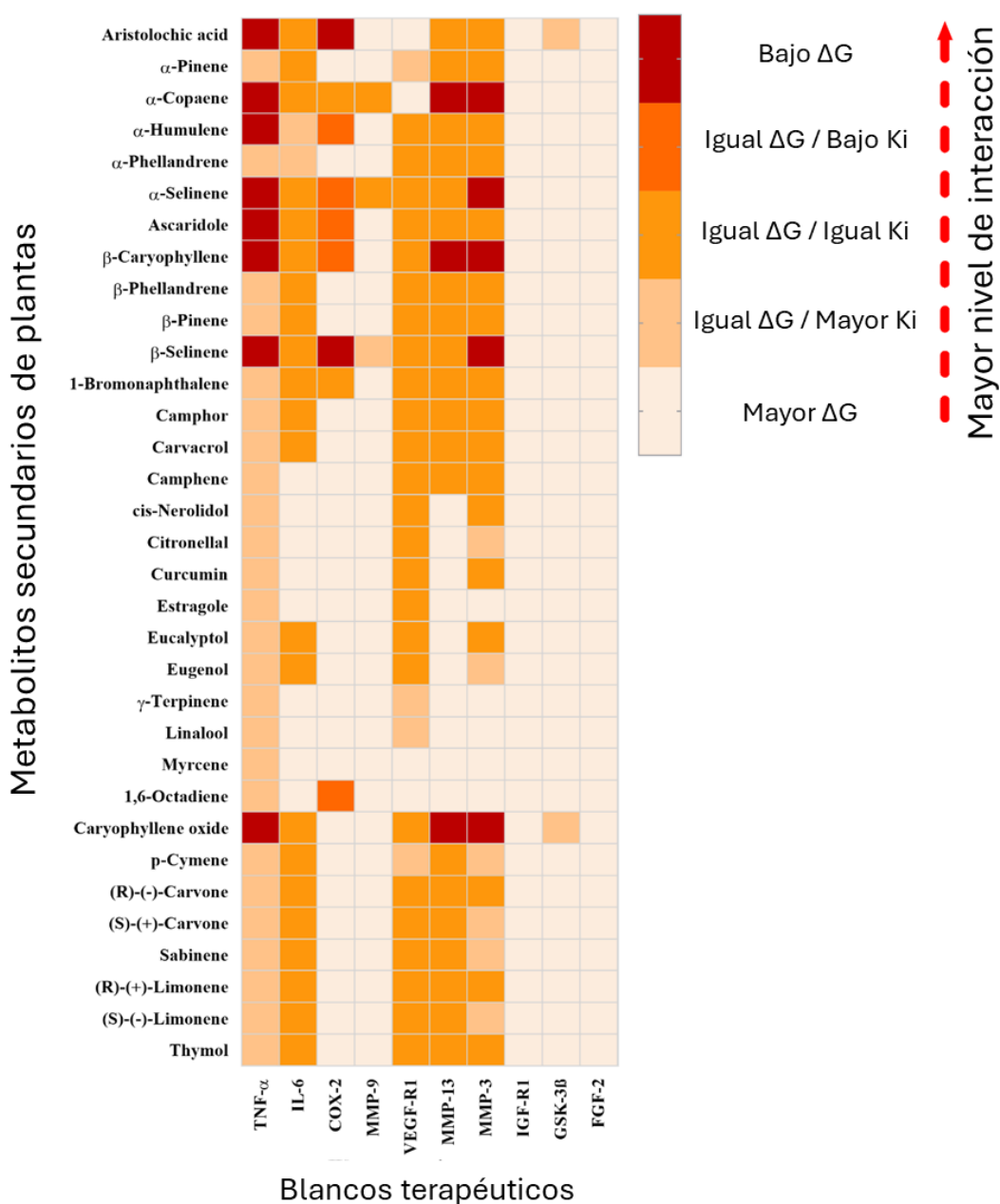
Después de comparar los valores de ΔG obtenidos mediante acoplamiento molecular entre los moduladores derivados de plantas CDPs y los CL para cada TT, se identificaron siete CDPs con las interacciones más favorables (ΔG más bajas), como se muestra en la Figura 27. Estos compuestos fueron: ácido aristolóquico (AA), que presentó afinidad con TNF- α y COX-2; α -copaeno, con afinidad hacia TNF- α , MMP-13 y MMP-3; α -humuleno, con interacción hacia TNF- α ; α -selineno, con afinidad por TNF- α y MMP-3; ascaridol, con afinidad por TNF- α ; β -cariofileno (BC), con afinidad hacia TNF- α , MMP-13 y MMP-3; β -selineno, con interacción hacia TNF- α , MMP-13 y MMP-3; y óxido de cariofileno, que mostró afinidad con TNF- α , COX-2, MMP-13 y MMP-3.

Entre las TT evaluadas, TNF- α , MMP-3 y MMP-13 presentaron las interacciones ΔG más bajas con ocho, cinco y tres CDPs, respectivamente, lo que indica una alta afinidad de estos compuestos por dichas dianas. En contraste, las TT IGF-R1, FGF-2, GSK-3 β , MMP-9 y COX-2 mostraron interacciones ΔG más altas con 34, 34, 32, 31 y 25 CDPs, respectivamente, sugiriendo una menor afinidad en general. Sin embargo, ningún CDP igualó la afinidad de los CL por IGF-R1 o FGF-2, lo cual se evidenció en todos los compuestos analizados (Figura 27). Por su parte, solo el AA y el óxido de cariofileno mostraron valores ΔG similares a los CL frente a GSK-3 β .

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 27

Niveles de interacción entre CDP y objetivos TT relacionados con la cicatrización de heridas.



Nota. Basados en los valores de interacción mostrados por el ligando co-cristalizado y su respectivo TT, los valores de interacción más altos a más bajos mostrados por cada interacción

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

CDP-TT se representaron en el mapa de calor, con colores oscuros (valores altos) a claros (valores bajos). IL: interleucina, COX: ciclooxigenasa, MMP: metaloproteinasas de matriz, IGF-R: receptor del factor de crecimiento similar a la insulina, GSK: sintasa de glucógeno, FGF: factor de crecimiento de fibroblastos.

4.3.2 Simulaciones de MD

Durante las simulaciones de dinámica molecular, observamos que los CDPs **AA**, **α -copaeno**, **α -selineno**, **β -cariofileno**, **β -selineno**, **óxido de cariofileno** interactuaron con MMP-3, MMP-13 y TNF- α , excepto el óxido de cariofileno, que no interactuó con MMP-3 (Tabla 14). Fue interesante notar que AA mostró interacciones más fuertes con MMP-3 y MMP-13 en comparación con el ligando natural. Sin embargo, la interacción TNF- α -CL no fue superada por ninguno de los CDPs.

Tabla 14

Valores de energía libre de unión para cada complejo ligando-receptor (media \pm DE).

N	Ligando	MMP-3	MMP-13	TNF- α
1	Ligando co cristalizado	-51,755 \pm 4,118	-29,563 \pm 3,255	-48,432 \pm 3,139
2	Ácido aristoloquico	-57,820 \pm 5,573*	-56,075 \pm 5,712*	-25,796 \pm 2,176*
4	α -Copaeno	-17,447 \pm 1,967*	-21,081 \pm 2,193*	-26,874 \pm 2,083*
5	α -Selineno	-28,741 \pm 2,063*	-20,222 \pm 4,226*	-19,417 \pm 1,808*
6	β -Cariofileno	-17,432 \pm 2,554*	-23,419 \pm 2,948*	-26,386 \pm 1,686*
7	β -Selineno	-17,107 \pm 2,168*	-24,646 \pm 2,489*	-24,303 \pm 2,188*
8	Óxido de cariofileno	Sin interacción	-27,980 \pm 1,989*	-25,709 \pm 2,216*

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

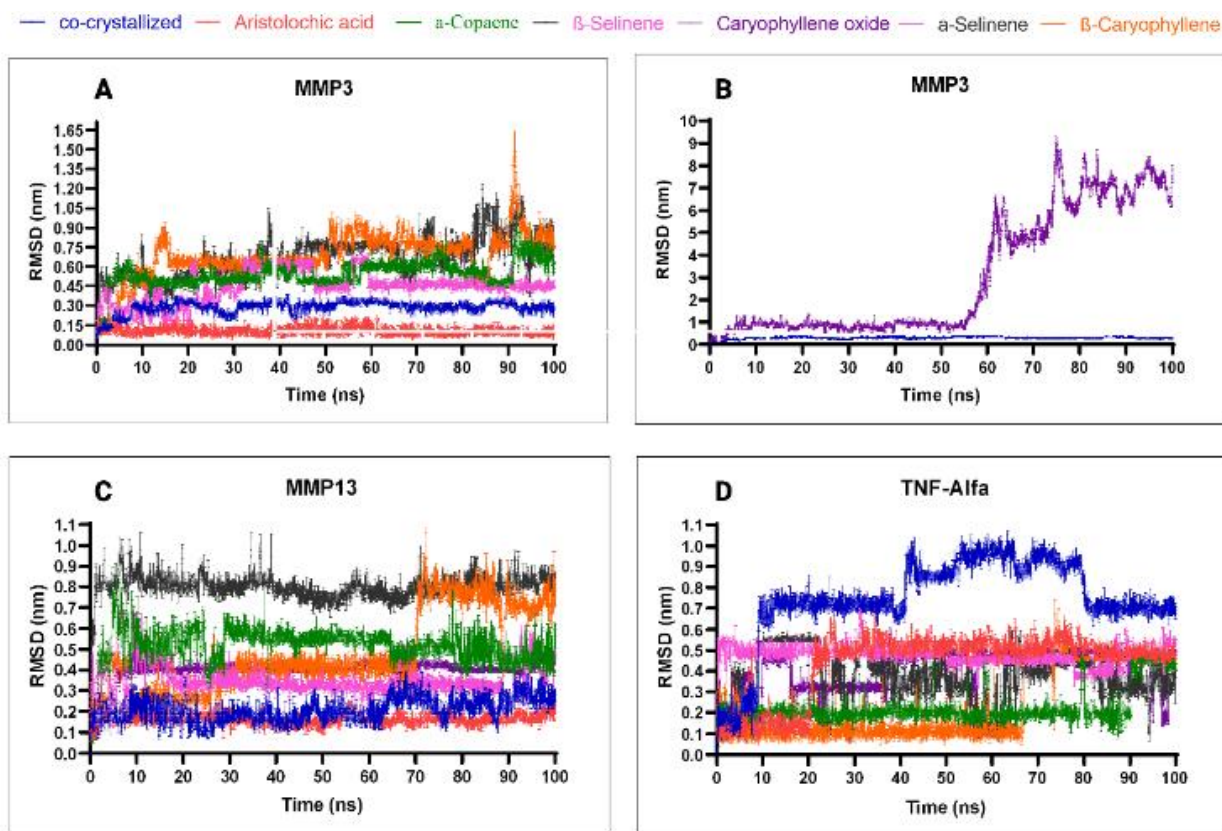
Nota. Basado en la dinámica de MMP-3, MMP-13 y TNF- α con sus respectivos ligandos co-cristalizados y CDPs. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación estadística, seguida de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples entre el ligando co-cristalizado y los demás CDPs para cada TT. *: $p < 0,05$

En el bolsillo de MMP-3, AA y α -selineno mostraron un comportamiento positivo similar al de CL. En contraste, α -copaeno, BC y β -selineno mostraron fluctuaciones continuas, y óxido de cariofileno salió del bolsillo después de 50 ns (Figura 28A-28B). Para MMP-13, AA y óxido de cariofileno presentaron conformaciones estables hacia el final de la simulación (Figura 28C). α -copaeno, BC y β -selineno también demostraron conformaciones relativamente estables, aunque con fluctuaciones menores, mientras que α -selineno mostró fluctuaciones inestables durante los últimos 10 nanosegundos de la simulación.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 28

Comportamiento de la desviación cuadrática media (RMSD) de los compuestos seleccionados durante las simulaciones de dinámica molecular (100 ns).



Nota. Bolsillo de MMP-3, (b.) Bolsillo de MMP-3, el óxido de cariofileno se desplazó después de 50 ns, (c.) Bolsillo de MMP-13 y (d.) Bolsillo de TNF- α . MMP = metaloproteínasa de matriz.

4.3.3 Evaluación del eugenol

En la Tabla 15 se presentan los resultados de las dinámicas moleculares del eugenol (*docking score*) y de la energía libre de unión correspondientes a los estudios de *docking* molecular y MD, respectivamente.

Tabla 15

Compilación de resultados del acoplamiento molecular y las simulaciones de dinámica molecular para eugenol con las proteínas seleccionadas.

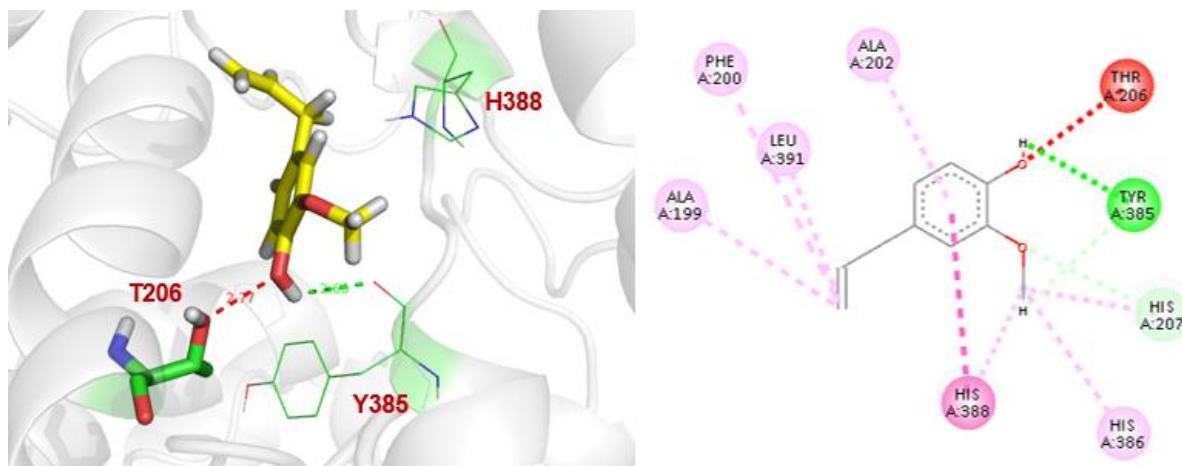
Proteína	<i>Docking</i> molecular	Simulación de dinámica molecular	
	Puntaje kcal/mol	Energía libre de unión kcal/mol	Desviación estándar
COX-2*	-6,3	N.C	N.C
MMP-3	-6,3	-20,38	2,70
MMP-9	-6,8	-24,69	2,39
TNF- α	-7,0	-23,51	2,10
VEGFR1	-6,4	-24,81	1,89

Nota. Debido al comportamiento de COX-2 en las simulaciones de dinámica molecular, no se calculó la energía libre de unión (NC).

Para COX-2 no se obtuvieron valores de energía libre de unión debido a su comportamiento durante la dinámica. En las Figuras 29, 30 y 31 se observan las interacciones entre el eugenol y los residuos del blanco para COX-2, MMP-3 y MMP-9, VEGFR1 y TNF- α , respectivamente. En la Figura 29, se observan un enlace de hidrógeno con Y385 (2,60 Å) y una interacción π - π apilada con H388. No obstante, se evidencia también una interacción desfavorable con T206, atribuida a una distancia de 2,77 Å entre oxígenos ricos en electrones que actúan como aceptores de enlace de hidrógeno.

Figura 29

Interacciones moleculares entre el eugenol y la enzima COX-2 en el sitio activo.



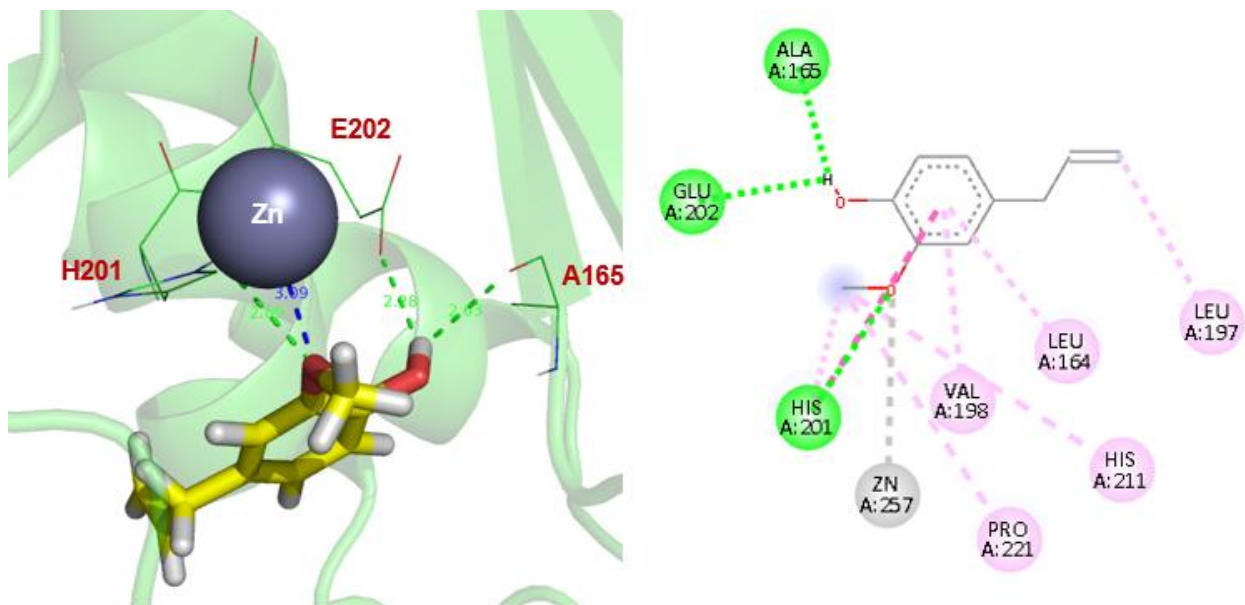
Nota. Representación tridimensional (izquierda) y esquema bidimensional (derecha) de las principales interacciones entre eugenol y residuos del sitio activo de COX-2.

Por otro lado, la proteína MMP-3 (Figura 30) exhibe un patrón de interacción favorable con el eugenol, caracterizado por una red de interacciones estabilizadoras dentro del sitio activo. Específicamente, se forman tres enlaces de hidrógeno con los residuos A165 (2.63 Å), H201 (2.89 Å) y E202 (2.28 Å), siendo este último clave para la estabilización del ligando. Además, el residuo H201 establece una interacción π - π apilada con el anillo aromático del eugenol, adoptando una conformación en la que su grupo metoxi se encuentra a 3.09 Å del ion Zn^{2+} en el sitio activo.

Se observan tres enlaces de hidrógeno con los residuos A165 (2,63 Å), H201 (2,89 Å) y E202 (2,28 Å), siendo este último crucial para la estabilización del ligando. Además, el residuo H201 participa en una interacción π - π apilada con el anillo aromático del eugenol. El grupo metoxi del eugenol se posiciona a 3.09 Å del ion Zn^{2+} , lo cual sugiere una posible interacción metal-oxígeno, que podría influir en la dinámica del sitio catalítico y en la modulación de la actividad enzimática.

Figura 30

Interacciones moleculares entre eugenol y la metaloproteinasa MMP-3.



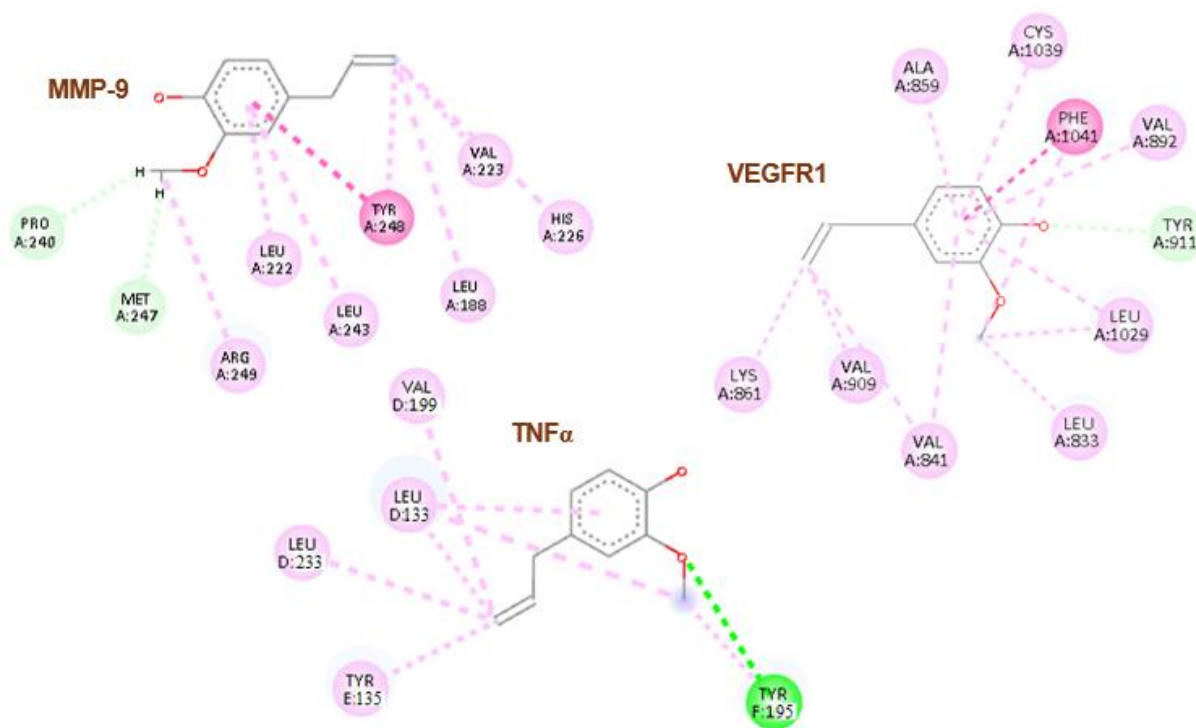
Nota. Representación tridimensional (izquierda) y bidimensional (derecha) de las interacciones estabilizadoras entre eugenol y el sitio activo de MMP-3

Para MMP-9 y VEGFR1 (Figura 31), la interacción más relevante es una interacción π - π apilada entre el grupo aromático del eugenol y los residuos Tyr248 en MMP-9 y Phe1041 en VEGFR1. Por su parte, en TNF- α se observa un enlace de hidrógeno entre el oxígeno del grupo metoxi del eugenol y el residuo Tyr195. En MMP-9 y VEGFR1, se observa una interacción π - π apilada entre el anillo aromático del eugenol y los residuos Tyr248 y Phe1041, respectivamente, que contribuyen a la estabilización del complejo ligando-receptor. En TNF- α , destaca un enlace de hidrógeno entre el oxígeno del grupo metoxi del eugenol y el residuo Tyr195.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 31

Interacciones 2D entre eugenol y las proteínas MMP-9, VEGFR1 y TNF- α .



Nota. Representación bidimensional de las interacciones moleculares más relevantes entre eugenol y las proteínas MMP-9, VEGFR1 y TNF- α , obtenidas mediante estudios de acoplamiento molecular.

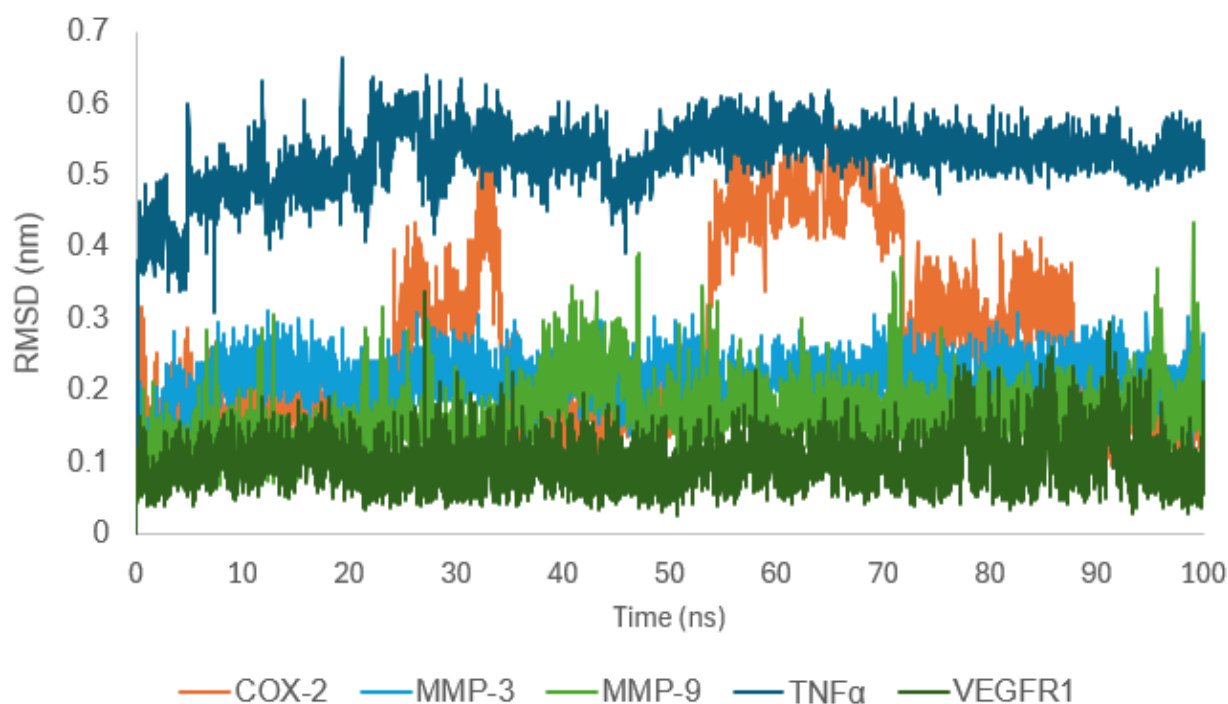
El análisis de RMSD (Figura 32) obtenido a partir de las simulaciones de dinámica molecular indica que el eugenol se mantiene bien estabilizado dentro de los sitios activos de MMP-3, MMP-9 y VEGFR1, presentando fluctuaciones mínimas a lo largo del periodo simulado. En contraste, TNF- α experimenta un reordenamiento conformacional inicial antes de alcanzar un estado de estabilidad. Por último, el análisis del complejo COX-2–eugenol revela que el ligando permanece inestable durante toda la simulación, con cambios conformacionales continuos. Como consecuencia, no se calculó la energía libre de unión para este complejo. Se observa que los

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

complejos MMP-3, MMP-9 y VEGFR1 mantienen una estabilidad conformacional alta, con fluctuaciones menores a 0.3 nm, indicando una interacción estable con el ligando. En cambio, TNF- α presenta un reordenamiento estructural inicial antes de estabilizarse, lo que sugiere un ajuste conformacional del eugenol dentro del sitio de unión.

Figura 32

Análisis de RMSD de los complejos proteína–eugenol durante las simulaciones de dinámica molecular (100 ns).



Nota. El gráfico muestra el comportamiento dinámico del eugenol en los sitios activos de COX-2, MMP-3, MMP-9, TNF- α y VEGFR1, evaluado mediante el desplazamiento cuadrático medio (RMSD) en función del tiempo.

En el caso de MMP-3 (Figura 33), se identificaron cuatro enlaces de hidrógeno con el esqueleto peptídico de los residuos L164 y A165. Es importante destacar que, a pesar de formar estos enlaces de hidrógeno y mantener una conformación estable durante toda la simulación, el

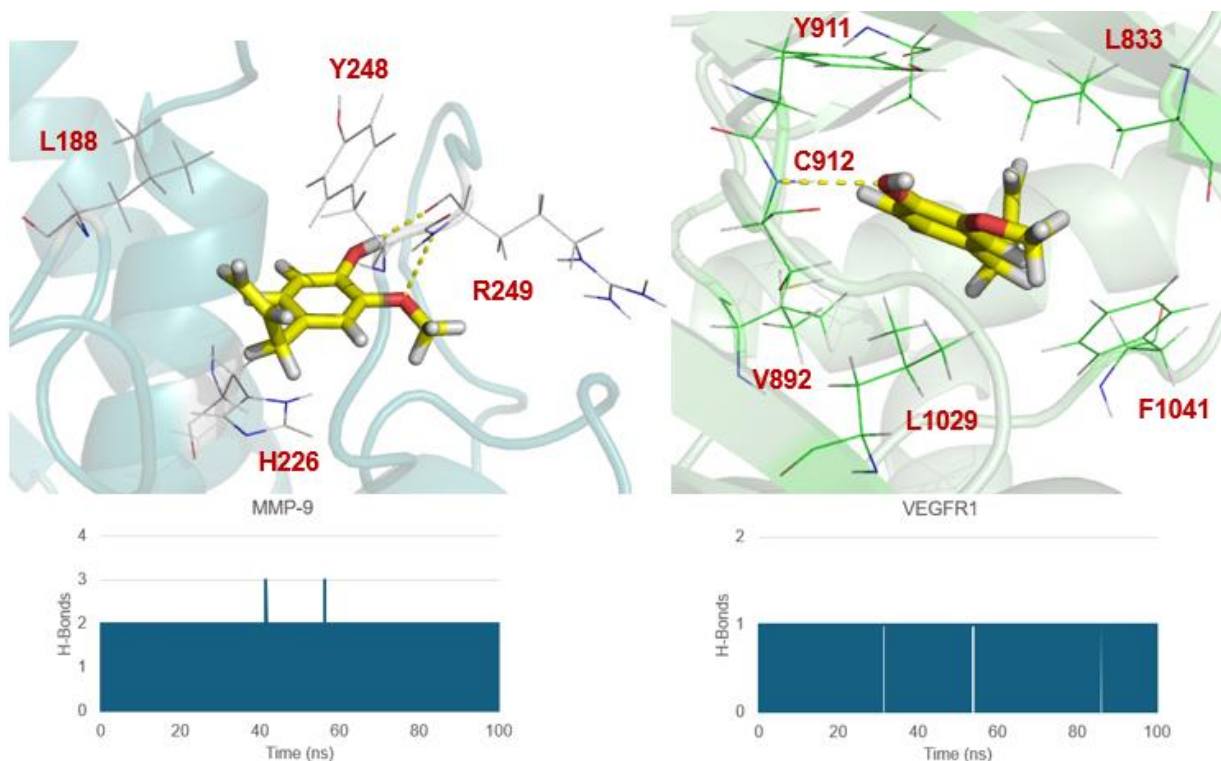
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

eugenol presentó una energía libre de unión de -20.38 kcal/mol, la más baja entre los valores calculados. El eugenol permaneció estable dentro del sitio activo, gracias a la presencia de interacciones de Van der Waals con los residuos L164, A165 y V198, que interactúan con su porción no polar. En la Figura 33 se observa la formación constante de entre 2 y 4 enlaces, principalmente con los residuos L164 y A165. Las interacciones de Van der Waals entre el grupo no polar del eugenol y los residuos L164, A165 y V198 favorecen su estabilidad dentro del sitio catalítico. A pesar de la pérdida de interacciones con los residuos E202 y H201, involucrados en la coordinación del ion Zn^{2+} , el complejo conserva una conformación estable gracias a estas interacciones hidrofóbicas, aunque con una energía libre de unión reducida (-20.38 kcal/mol). En el caso de MMP-9 y VEGFR1 (Figura 33), que presentaron los valores más favorables de energía libre de unión (-24.69 kcal/mol y -24.81 kcal/mol, respectivamente), se identificaron varios factores comunes que contribuyen a sus mecanismos de estabilización. En el sitio activo de MMP-9, el eugenol forma dos enlaces de hidrógeno con el esqueleto peptídico del residuo R249, mientras que en VEGFR1, se establece un único enlace de hidrógeno con el esqueleto del residuo C912. En MMP-9, eugenol forma dos enlaces de hidrógeno intermitentes con el esqueleto de R249 y se estabiliza mediante interacciones hidrofóbicas con L188 y Y248. En VEGFR1, se observa un enlace de hidrógeno sostenido con C912, junto con interacciones de Van der Waals con L833, V892, Y911, L1029 y F1041. Esta red de interacciones favorece una alta estabilidad conformacional, consistente con los bajos valores de energía libre de unión calculados: -24.69 kcal/mol para MMP-9 y -24.81 kcal/mol para VEGFR1.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 33

Interacciones de eugenol con los sitios activos de MMP-9 y VEGFR1 durante la dinámica molecular.



Nota. Las imágenes superiores muestran las interacciones clave entre eugenol y los residuos del sitio activo de MMP-9 (izquierda) y VEGFR1 (derecha), mientras que los gráficos inferiores representan la frecuencia de enlaces de hidrógeno formados a lo largo de 100 ns de simulación.

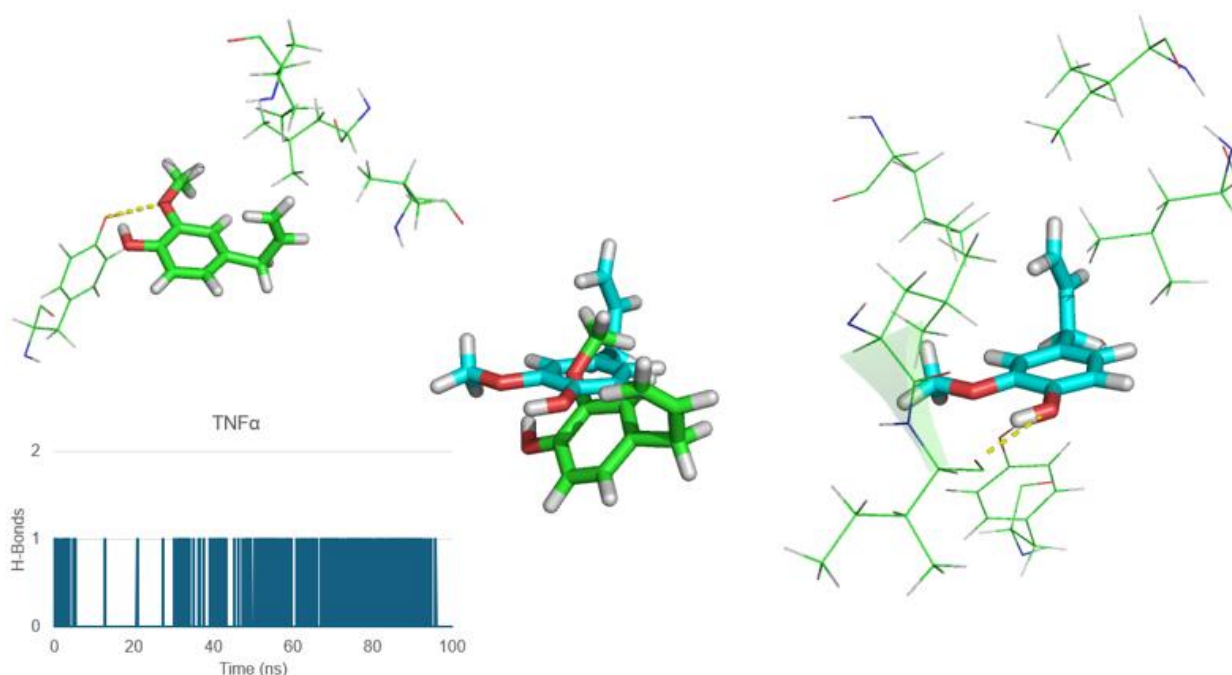
En el caso de TNF- α (Figura 34), se observó un cambio conformacional inicial en comparación con la orientación predicha por los estudios de acoplamiento molecular. Este reordenamiento estructural contribuyó a una mayor estabilidad del complejo, como lo evidencia la presencia sostenida del eugenol dentro del sitio de unión durante el resto de la simulación de dinámica molecular. Adicionalmente, la cadena alquilo del eugenol se posicionó cerca de residuos

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

hidrofóbicos como I133 e I231 que, debido a su similitud química, establecieron interacciones de Van der Waals favorables.

Figura 34

Reordenamiento conformacional y estabilización de eugenol en el sitio activo de TNF- α .



Nota. Visualización de las interacciones moleculares entre eugenol y TNF- α durante la simulación de dinámica molecular. A la izquierda, se muestra un enlace de hidrógeno transitorio con el residuo I134, cuya frecuencia a lo largo del tiempo se representa en el gráfico inferior. En el centro, se comparan las conformaciones iniciales (verde) y final (cian) del eugenol. A la derecha, se observa una interacción sostenida entre el hidrógeno ácido del residuo Y195 y el sistema aromático del eugenol.

4.4 Discusión

Los resultados obtenidos revelan un perfil prometedor para varios de los CDPs evaluados como potenciales agentes cicatrizantes multi-target. La ausencia de interacciones equiparables a los CL con IGF-R1 y FGF-2 es particularmente relevante, ya que estos receptores están directamente involucrados en procesos esenciales para la regeneración tisular, como la proliferación de queratinocitos, la angiogénesis, la migración de fibroblastos y la reepitelización (Kanekar et al., 2000; Sahni et al., 2006). En consecuencia, los CDPs no interferirían negativamente con dichas funciones, lo cual representa una ventaja en contextos terapéuticos donde se busca reducir la inflamación sin comprometer la reparación tisular.

En cambio, la identificación del AA y del óxido de cariofileno como compuestos con alta afinidad hacia GSK-3 β es de interés terapéutico, ya que la inhibición de esta quinasa ha demostrado favorecer la estabilidad de β -catenina y acelerar la cicatrización (Jere et al., 2019). Además, varios estudios preclínicos respaldan el efecto terapéutico de estos compuestos. El AA, por ejemplo, inhibe la fosfolipasa A2, lo que reduce la producción de prostaglandinas proinflamatorias (Rosenthal et al., 1989); además, extractos de *Aristolochia* spp. han demostrado promover la migración celular, la producción de colágeno, la liberación de óxido nítrico y la actividad antioxidante en ratas (Bolla et al., 2019; Shirwaikar et al., 2003). Por su parte, la oleorresina de *Copaifera paupera*, rica en α -copaeno y BC, ha mostrado reducir niveles de TNF- α e inducir la síntesis de IL-10, reepitelización y colágeno en ratones diabéticos. Otros aceites esenciales ricos en α -copaeno, β -selineno, α -selineno y Bcoxide, extraídos de especies como *Ageratum fastigiatum*, *Cinnamomum verum*, *Piper gaudichaudianum* y *Helichrysum italicum*, también han sido relacionados con efectos antiinflamatorios y beneficios en la cicatrización (Andjić et al., 2021; Seyed Ahmadi et al., 2019; Soares et al., 2022; Souza et al., 2019). Además,

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

formulaciones tópicas como la crema Acheflan®, que contiene α -humuleno, han inducido remodelación completa de la epidermis y aumento en la expresión de VEGF y MMP-9 (Perini et al., 2015). Finalmente, tanto el β -cariofileno como su óxido se destacan por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y pro-regenerativas, confirmadas en múltiples estudios (Fidy et al., 2016; Silva et al., 2019). A pesar de su uso tradicional como cicatrizante, la alantoína presentó baja afinidad hacia los objetivos evaluados, lo que sugiere un mecanismo menos específico. En conjunto, los datos obtenidos respaldan el valor de los MDPs seleccionados como candidatos para el desarrollo de terapias tópicas dirigidas a modular la inflamación sin comprometer la regeneración del tejido.

Es un hallazgo prometedor que pequeños CDMs puedan funcionar como inhibidores de MMP-3 o MMP-13. Las MMPs son enzimas producidas por diversas células, como fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y células inflamatorias. Su propósito principal es descomponer proteínas extracelulares y de la superficie celular, incluyendo citocinas, quimiocinas, proteínas de la matriz extracelular (MEC), receptores celulares y péptidos (Parks et al., 2004). Se ha observado un aumento en la actividad de las proteasas por MMPs y una disminución en sus inhibidores endógenos (TIMP-1 y TIMP-2) en heridas crónicas, en contraste con las heridas agudas (Lázaro-Martínez et al., 2016).

Los posibles efectos de nuestros compuestos candidatos como inhibidores de MMP-3 o MMP-13 aún no están del todo claros. Sin embargo, estudios sugieren que podrían reducir los niveles de MMP-2 y MMP-9 (Jo & Kim, 2022; Kishi et al., 2022; Liu et al., 2021). En cuanto a las interacciones de los CDPs con el bolsillo de TNF- α , AA y BC mostraron las interacciones más favorables, seguidos por α -copaeno y α -selineno, óxido de cariofileno y β -selineno exhibieron un comportamiento inconsistente. TNF- α es un regulador clave de las respuestas inflamatorias y se

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

considera un objetivo terapéutico para el tratamiento de heridas de cicatrización alterada (Ashcroft et al., 2012). Estos hallazgos sugieren que AA, BC, α -copaeno y α -selineno podrían ayudar potencialmente a regular la actividad de TNF- α en el tratamiento de heridas de cicatrización alterada.

El eugenol ha mostrado potencial antiinflamatorio a través de la modulación de mediadores clave como el TNF- α y las interleucinas IL-1 β , IL-4 e IL-6. Estos efectos están mediados por la inhibición de vías de señalización importantes como NF- κ B y MAPK (Deepak et al., 2015; Yeh et al., 2011). En modelos experimentales de inflamación pulmonar inducida por lipopolisacárido (LPS), el eugenol redujo significativamente el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos, disminuyó la expresión del TNF- α e inhibió la activación de NF- κ B, resultando en mejoras notables en la estructura y función pulmonar (Huang et al., 2015; Magalhães et al., 2010). Respecto a la interacción con MMP-9, el eugenol presenta afinidad moderada con energías de unión cercanas a -6 kcal/mol, inferiores a inhibidores sintéticos típicos (\leq -9 kcal/mol). El análisis de docking indicó que el eugenol se ubica en la subbolsa hidrofóbica S1' del sitio activo de MMP-9, estableciendo contactos hidrofóbicos importantes con residuos no polares como Leu188, Leu222, Leu243, Val223 y Met247, además de interacciones π con Tyr248 (Warsito et al., 2024). A diferencia de los inhibidores clásicos con grupos quelantes fuertes (como hidroximatos), el eugenol no posee un grupo capaz de quelar eficazmente al Zn²⁺ catalítico, limitando su potencia inhibitoria directa. Sin embargo, simulaciones de dinámica molecular confirmaron la estabilidad del complejo eugenol-MMP-9 con un RMSD de aproximadamente 0.2 nm durante 100 ns, manteniendo interacciones de puente de hidrógeno de manera intermitente. Esto coincide con datos experimentales donde el eugenol reduce tanto la actividad como la expresión de MMP-9 (Nam & Kim, 2013; Padhy et al., 2022), sugiriendo que podría actuar como inhibidor competitivo parcial

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

y mitigar la actividad proteolítica en procesos inflamatorios. En relación con el VEGFR1, el eugenol se une a su sitio activo a través del grupo hidroxilo fenólico, formando interacciones polares con Cys912 y contactos hidrofóbicos con residuos como Val892, Leu833, Leu1029 y Phe1041. Estas interacciones reflejan las típicas de un ligando en el sitio de unión de ATP, combinando un puente de hidrógeno en la bisagra y múltiples contactos hidrofóbicos (Meng, 2013). Comparativamente, inhibidores específicos como sorafenib establecen redes más extensas y robustas, incluyendo interacciones adicionales con residuos conservados en la quinasa. A pesar de ser menos potente, el eugenol logra ocupar parcialmente la cavidad del ATP, sugiriendo interferencia parcial en la autofosforilación del receptor. Estudios biológicos respaldan este hallazgo mostrando efectos antiangiogénicos, ya que el eugenol inhibe la fosforilación del VEGFR2, reduce la expresión de VEGF/VEGFR1 y limita la formación de vasos sanguíneos en modelos celulares e in vivo (Padhy et al., 2022; Su et al., 2024). Esta evidencia indica que el eugenol podría actuar como un inhibidor multitarget leve de la angiogénesis inflamatoria, representando un candidato interesante para modificaciones químicas orientadas a incrementar su actividad inhibitoria específica (Chaudhari et al., 2024). Finalmente, el eugenol presenta una interacción significativa con TNF- α . Los análisis de docking mostraron que se aloja en el bolsillo hidrófobo interfacial entre monómeros del trímero de TNF- α , solapándose con el sitio ocupado por el inhibidor SPD-304. En particular, establece un puente de hidrógeno clave con TyrF195, además de múltiples interacciones hidrofóbicas con residuos como Leu133, Leu233 y aminoácidos apolares adicionales en la interfaz (Moawadh, 2023). Durante simulaciones de dinámica molecular, esta unión resultó estable, con un RMSD promedio de 0.25 nm durante 100 ns. Este comportamiento es crucial, ya que la ocupación estable de la interfaz del TNF- α podría impedir la trimerización adecuada o su unión al receptor, disminuyendo efectivamente la señal inflamatoria.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Estas observaciones son respaldadas por estudios biológicos que indican la reducción en niveles de TNF- α y la inhibición de genes proinflamatorios dependientes del TNF- α en modelos experimentales (Kumar & Sharma, 2025; M. Wang et al., 2022). En particular, estudios *in vivo* han demostrado que el eugenol inhibe la invasión celular y la angiogénesis inducida por TNF- α en células sinoviales de artritis reumatoide, lo que subraya su potencial terapéutico mediante el bloqueo parcial de la interacción TNF- α -receptor o disminuyendo directamente su producción (M. Wang et al., 2022).

4.5 Conclusiones

- Se identificaron siete CDPs con interacciones favorables mediante docking molecular, destacando AA, α -copaeno, BC y óxido de cariofileno, con alta afinidad hacia TNF- α , MMP-3 y MMP-13.
- Las simulaciones de dinámica molecular confirmaron que AA mostró estabilidad superior al ligando co-cristalizado con MMP-3 y MMP-13, mientras que el BC presentó estabilidad moderada, aunque con fluctuaciones continuas, indicando interacciones favorables, pero menos robustas.
- El análisis del eugenol mostró estabilidad significativa y múltiples interacciones favorables con MMP-3, MMP-9 y VEGFR1, evidenciando su potencial como modulador multitarget de procesos inflamatorios y angiogénicos.
- La estabilidad observada en los complejos eugenol–MMP-9 y eugenol–VEGFR1, reflejada en bajos valores de energía libre de unión, respalda su potencial biológico y sugiere relevancia para futuros estudios experimentales.


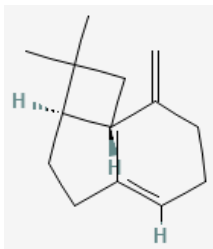
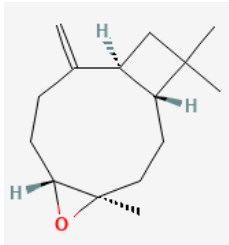
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

- Aunque BC no superó al ligando co-cristalizado, mantuvo estabilidad suficiente dentro de los sitios activos evaluados, destacando su relevancia biológica potencial para la modulación terapéutica de procesos implicados en la cicatrización.

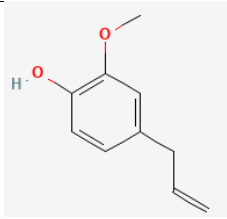
Después de la evaluación *in silico*, se seleccionaron para la siguiente fase de evaluación por su actividad, seguridad y disponibilidad los siguientes compuestos, relacionados en la Tabla 16.

Tabla 16

Compuestos seleccionados para continuar su evaluación en el capítulo 2.

Compuesto	Estructura 2D
Peso molecular (g/mol)	
Alantoína	
158,12	
β -cariofileno	
204.35	
Oxido de cariofileno	
220.35	

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Compuesto	Estructura 2D
Peso molecular (g/mol)	
Eugenol	
164.20	

5 Evaluación de la actividad pro cicatrizante de los CDPs en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*

5.1 Introducción

En la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas en heridas, los productos naturales muestran un interés creciente como alternativas o complementos a los tratamientos convencionales. Recientemente, el gel de extracto de *Aloe vera* como tratamiento eficaz en quemaduras y úlceras del pie diabético, acelerando la reepitelización, disminuyendo el dolor y tejido cicatricial (Irani et al., 2024; Shahzad & Ahmed, 2013). Extractos de *Calendula officinalis* acelera la cicatrización de heridas traumáticas agudas al estimular la producción de colágeno y angiogénesis local (Giostri et al., 2022; Givol et al., 2019). El extracto acuoso comercial de *Triticum vulgare*, la Fitostimulina® (FS® (utilizado en ratones NG y HG, Capítulo 2), en diversas formas farmacéuticas, reduce más rápidamente el área lesionada y de los síntomas en pacientes con quemaduras y úlceras por presión que los tratamientos convencionales (Della Pepa et al., 2023; Romanelli et al., 2015). Compuestos como los taninos y flavonoides extraídos de *Mimosa tenuiflora* (tepezcohuite) presentan propiedades antioxidantes, antimicrobianas y regenerativas, acelerando la curación y mejorando la calidad del tejido regenerado en pacientes con úlceras

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

venosas cónicas (Lammoglia-Ordiales et al., 2012; Rivera-Arce et al., 2007). Los compuestos de *Centella asiática*: asiaticósidos y madecassósidos, estimulan la síntesis de colágeno y formación de nuevos vasos sanguíneos, proponiéndose como una terapia en heridas agudas como crónicas (Arribas-López et al., 2022). Otro CDP importante es la alantoína (Ver capítulo 2), un compuesto aislado originalmente en *Symphytum officinale*, con propiedades epitelizantes que promueve la regeneración de la epidermis (Araújo et al., 2010) y utilizado en productos tópicos para tratar quemaduras menores, cortes y abrasiones (Juszczak et al., 2022).

El desarrollo de medicamentos a partir de compuestos naturales de origen vegetal constituye un proceso multidimensional que enlaza el conocimiento ancestral, la innovación tecnológica y la rigurosidad científica moderna. Históricamente, las plantas han representado una fuente esencial de recursos terapéuticos para la humanidad. Se estima que cerca del 50% de los fármacos aprobados en las últimas décadas tienen un origen directo o indirecto en productos naturales, y una parte significativa de los compuestos bioactivos empleados en la medicina moderna deriva de especies vegetales previamente utilizadas en la medicina tradicional (Atanasov et al., 2021; Callies, 2011). Sin embargo, el paso desde el uso empírico de remedios herbales hasta la aceptación de estos compuestos como medicamentos regulados requiere un proceso sistemático de investigación y validación que garantice su seguridad, eficacia y calidad. La mayoría de las plantas medicinales con potencial cicatrizante carecen de estudios farmacológicos y toxicológicos exhaustivos: se estima que del 35% de las especies utilizadas tradicionalmente para tratar heridas que han sido evaluadas experimentalmente. Apenas cinco plantas medicinales han progresado hasta ensayos clínicos formales (Salazar-Gómez & Alonso-Castro, 2022), empleando principalmente extractos tópicos como el hexano-acetato de etilo de partes aéreas de *Ageratina pichinchensis*,

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

etanólico del látex de *Croton lechleri*, etanólico de la corteza de *Mimosa tenuiflora* y acuoso de corteza de *Rhizophora mangle*.

El punto de partida en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos reside en el conocimiento etnofarmacológico, identificando especies y preparados empleados durante generaciones en los tratamientos (Andrade-Cetto & Heinrich, 2011a). Un ejemplo es la artemisinina, derivada de *Artemisia annua* y utilizada como base para tratamientos antimaláricos, ilustran cómo la combinación de la etnobotánica y la experimentación científica puede conducir a avances médicos de gran impacto global (Atanasov et al., 2021; Tu, 2016). Después de la identificación de especies candidatas, se inicia el aislamiento y la caracterización de los principios activos responsables de la actividad biológica. Esta etapa comprende la extracción, purificación y elucidación estructural de compuestos, empleando técnicas como la cromatografía, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (Newman & Cragg, 2020). La validación científica de estos CDPs como terapias pro-cicatrizantes requiere de evaluaciones fisicoquímicas y preclínicas rigurosas. Determinar las propiedades fisicoquímicas de los CDPs es fundamental, pues estas condicionan su comportamiento biológico, estabilidad, biodisponibilidad y formulación. Los CDPs seleccionados suelen agruparse en familias químicas con perfiles fisicoquímicos diferenciados, incluyendo las detalladas a continuación. Los monoterpenos ($C_{10}H_{16}$) como α -pineno, β -pineno, limoneno, mirceno y γ -terpineno, se caracterizan por su bajo PM molecular (136–154 g/mol), estructura hidrocarbonada y naturaleza marcadamente apolar. Son líquidos volátiles con solubilidad prácticamente nula en agua (Devi et al., 2024; Tropa et al., 2024). Los monoterpenos oxigenados, tales como linalool, eucaliptol (1,8-cineol), alcanfor y ascaridol, poseen funciones alcohol, éter, cetona o peróxido en sus estructuras, lo que les confiere una ligera polaridad con una solubilidad acuosa limitada, aunque generalmente superior a los no oxigenados

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

(Santana de Oliveira et al., 2023; Sharopov et al., 2012). Son afines a matrices lipídicas y orgánicas, manteniendo su utilidad en sistemas de liberación hidrofóbicos o como agentes de permeación. Los fenilpropanoides y compuestos fenólicos como el eugenol, timol, carvacrol y estragol, exhiben una estructura aromática con grupos funcionales hidroxilo o metoxi, con PM entre 148–164 g/mol, densidades mayores que el agua, como el eugenol (Ibarra-Berumen et al., 2023; Selmi et al., 2022). Los sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$), como β -cariofileno, α -humuleno, α -copaeno y selinenos, el aumento en la longitud de la cadena carbonada se traduce en mayores PM (204–222 g/mol), con una solubilidad acuosa prácticamente nula ($\log P > 5-6$), lo que les confiere una altísima afinidad por medios lipídicos (Masyita et al., 2022). Los polifenoles como la curcumina tienen un PM de 368 g/mol, estructura diarílica y elevado grado de conjugación, es prácticamente insoluble en agua y extremadamente lipofílica ($\log P > 3$) (Amalraj et al., 2017a). Por el contrario, compuestos como la alantoína (158 g/mol), cristalina y con grupos urea y carbonilo, es moderadamente soluble en agua, estable en condiciones neutras y de carácter anfótero, propiedades que la diferencian claramente del resto de moléculas hidrofóbicas aquí consideradas (Araújo et al., 2010).

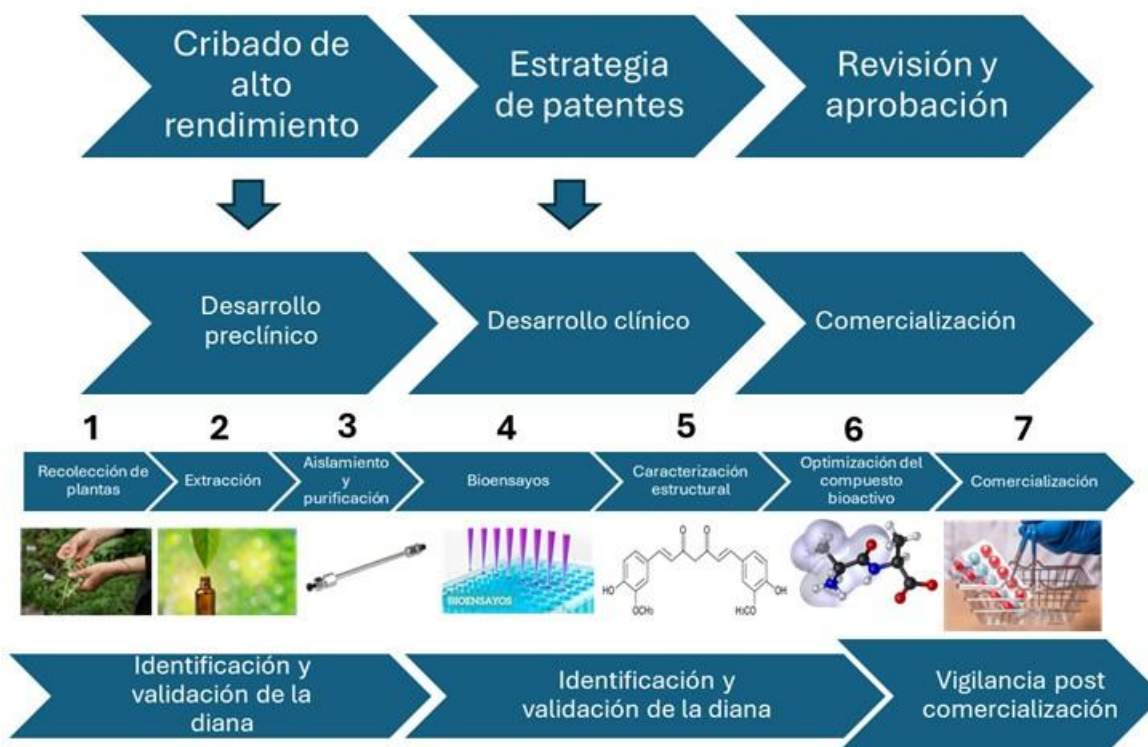
El aislamiento bio-dirigido, guiado por ensayos biológicos, permite focalizar los esfuerzos en aquellas fracciones o moléculas que presentan el mayor potencial terapéutico, facilitando la priorización de candidatos para estudios posteriores (Atanasov et al., 2021). Los compuestos seleccionados son sometidos a evaluaciones preclínicas rigurosas, que incluyen ensayos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* orientados a determinar su eficacia farmacológica (Capítulo 2 y 3), mecanismo de acción y perfil de toxicidad. toxicidad aguda, subcrónica y crónica, así como análisis farmacocinéticos para conocer la absorción, distribución, metabolismo y excreción del compuesto

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

(ADME), aspectos fundamentales para anticipar su comportamiento en el organismo y su viabilidad como medicamento (Newman & Cragg, 2020) (Figura 35).

Figura 35

Etapas del desarrollo de medicamentos a partir de productos naturales.



Nota. El esquema ilustra el flujo secuencial y multidisciplinario para la obtención y desarrollo de medicamentos derivados de plantas, integrando desde la recolección y extracción inicial hasta la optimización, comercialización y vigilancia postcomercialización. El proceso abarca etapas de identificación de dianas, bioensayos, caracterización estructural y aprobación regulatoria, reflejando el tránsito desde el descubrimiento hasta la aplicación clínica bajo estándares científicos y regulatorios internacionales.

Superada la fase preclínica, los candidatos con mejor perfil de seguridad y eficacia progresan a la evaluación clínica en humanos evaluándose primero (Fase I) en un número reducido

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

de voluntarios sanos para evaluar su seguridad, tolerabilidad y farmacocinética, seguido de la determinación de la eficacia preliminar y la seguridad en un grupo limitado de pacientes con la condición de interés (Fase II) y luego la realización de ensayos multicéntricos, controlados y a gran escala, (Farmacéuticos, 2016). Solo tras demostrar un balance beneficio-riesgo positivo, el fármaco puede ser aprobado por las autoridades regulatorias (como la FDA o EMA) para su uso clínico generalizado, pasando luego a la vigilancia post-comercialización en la Fase IV (Atanasov et al., 2021; Newman & Cragg, 2020). Un aspecto crítico en este proceso es la protección de la propiedad intelectual y el reconocimiento del conocimiento tradicional. (Newman & Cragg, 2020; Oldham et al., 2013).

Varios (la mayoría) de los compuestos permanecen en el desarrollo preclínico inclusive aquellos bastantes prometedores como: extractos o AE de *Lavandula angustifolia*, *Calendula officinalis*, *Matricaria chamomilla* y *Melaleuca alternifolia* o CDPs, como el eugenol, el carvacrol y los asiaticósidos (Bahadur & Fatima, 2024; Buriti et al., 2024). En ensayos clínicos, complementando a los descrito en la primera parte de la introducción está el AE de lavanda en heridas quirúrgicas (episiotomías) y el de caléndula en úlceras venosas crónicas (Givol et al., 2019; Nascimento et al., 2022). Asimismo, se han explorado combinaciones de extractos en apósitos, cremas y geles con resultados alentadores en la mejora de la calidad de la cicatrización, la prevención de infecciones y la disminución de complicaciones asociadas. No obstante, la traducción clínica de estos hallazgos (proceso de traducir los descubrimientos de la investigación básica sobre compuestos químicos o biológicos en aplicaciones clínicas para el tratamiento de heridas) requiere superar desafíos importantes, como la estandarización en la composición de los extractos, la determinación de dosis óptimas y regímenes de aplicación, y la evaluación sistemática de la seguridad y posibles efectos adversos, particularmente en poblaciones vulnerables.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

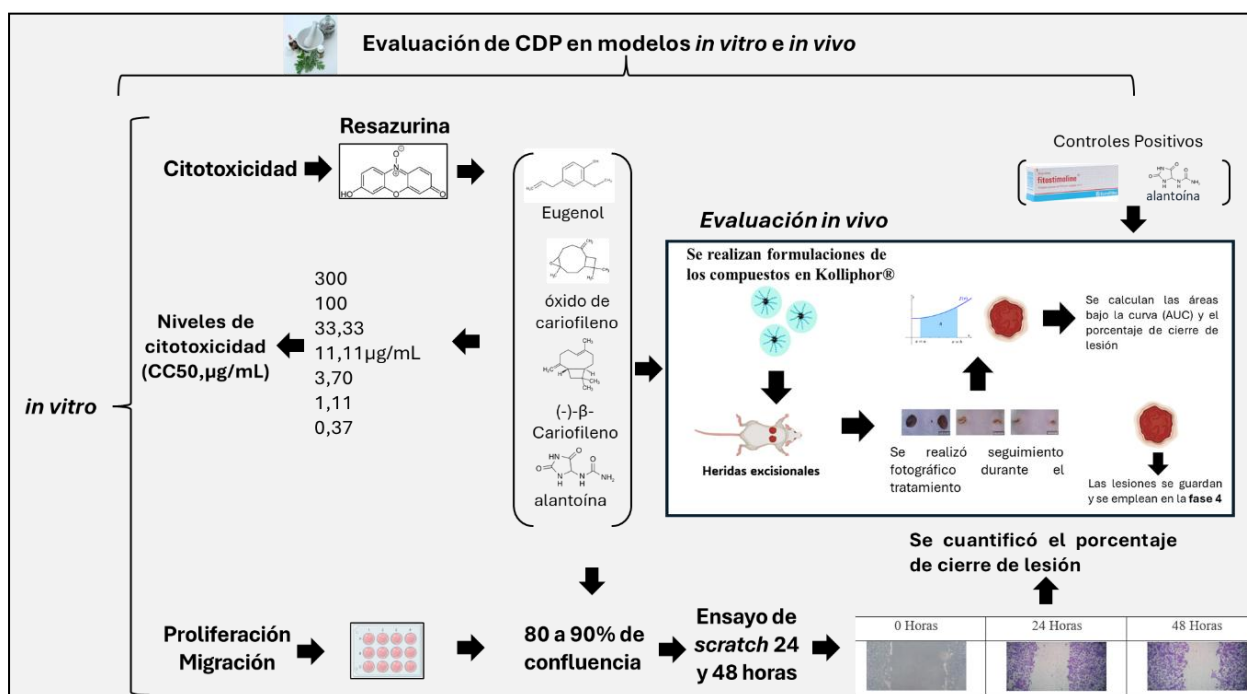
El objetivo del presente Capítulo 3 fue evaluar *in vitro* e *in vivo* la actividad cicatrizante de CDPs candidatos (seleccionados en el capítulo 2) utilizando los métodos implementados en este trabajo, y los compuestos candidatos a partir del estudio *in silico*, empleando como controles positivos la alantoína y la FT®

5.2 Materiales y métodos

Se evaluaron 3CDP y alantoína, *in vivo* y en ratones NG utilizando como control la FS® (Figura 36).

Figura 36

Diseño experimental



5.2.1 CDP utilizados

Los CDPs; eugenol, óxido de cariofileno (BCoxido) y trans-β-cariofileno (BC), al igual que la alantoína fueron obtenidos comercialmente de Sigma-Aldrich

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

5.2.2 Líneas celulares y cultivo

Se utilizaron queratinocitos humanos (HaCaT) y células epiteliales de riñón de mono verde (Vero). Las HaCaT se cultivaron en DMEM y las Vero en RPMI-1640, ambos medios suplementados con 10 % de SFBic.

5.2.3 Ensayo de citotoxicidad colorimétrico con resazurina

Las células Vero (5×10^4 células/mL) y HaCaT (5×10^5 células/mL) se trataron con concentraciones seriadas de CDP y alantoína (control positivo) (4,7–300 $\mu\text{g/mL}$) o con medio de cultivo como control, a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 72 h. Tras el tratamiento, se añadieron 20 μL de resazurina y, 4 h después, se midió la absorbancia a 570 y 600 nm. Los porcentajes de citotoxicidad y las CC₅₀ se calcularon como en el Capítulo 1. Se realizaron 3 réplicas biológicas y 3 réplicas técnicas por condición. El área bajo la curva (AUC) se obtuvo a partir de las curvas de viabilidad empleando GraphPad Prism.

5.2.4 Ensayo de migración por herida de scratch

Las células Vero y HaCaT se incubaron a una concentración de 2×10^5 células/mL hasta alcanzar aproximadamente un 80% de confluencia. Se realizó un rasguño en la superficie del cultivo utilizando la punta de una micropipeta de 100 μL . Posteriormente, las células se lavaron dos veces y se trataron con eugenol (50 $\mu\text{g/mL}$), BC/BCoxido (10 y 30 $\mu\text{g/mL}$) y alantoína (10 y 30 $\mu\text{g/mL}$) en medio de cultivo suplementado con 2,5% de SFBIC. Se tomaron campos fotográficos sin tinción (0 horas) y con tinción de Giemsa a las 24 y 48 horas, utilizando un microscopio invertido a 400 aumentos. El software ImageJ se empleó para calcular el área total en píxeles y el área abierta sin células (*scratch*) a partir de las fotografías obtenidas. El porcentaje del área del rasguño en los tiempos de 0, 24 y 48 horas se determinó mediante la siguiente fórmula: % de área del *scratch* = (área del *scratch* x 100) / (área total) (Liang et al., 2007).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

5.2.5 Formulaciones tópicas utilizadas

Se prepararon emulsiones de eugenol al 0,3%, alantoína al 0,5 y 1,0%, Bcoxido al 0,05, 0,1, 0,5 y 1%, β C al 0,05, 0,1, 0,5 y el vehículo (sin compuesto), en PBS (pH 7.4) y 20% Kolliphor®. Las formulaciones tipo emulsión fueron preparadas en Kolliphor® (% p/v). El compuesto pesado fue agregado al vehículo en tubos de vidrio de 15 mL, homogenizado suavemente con vortex (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, EE. UU.) para evitar la formación de burbujas. La estabilidad de las formulaciones se evaluó a temperatura ambiente durante 3 días, sin observarse separación de las fases. El pH de las formulaciones se determinó previa aplicación a los roedores con un pHmetro digital (SevenCompact S210, Mettler Toledo, Suiza). Para esto una alícuota de la formulación se sumergió directamente en el electrodo.

5.2.6 Efecto pro-cicatrizante de las formulaciones

Se utilizaron ratones BALB/c anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina (80/10 mg/kg, vía intraperitoneal). Tras verificar la sedación, se generaron dos lesiones excisionales con un punch quirúrgico (5 mm) en la piel dorsal. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 7 grupos experimentales (Tabla 17). La formulación se aplicó dos veces al día durante 10 días en cada lesión (100 μ L). Se monitoreó diariamente el comportamiento general, ingesta de alimento y agua, movilidad, peso corporal y signos de dolor o estrés, empleando collares isabelinos para evitar el lamido de las heridas. El seguimiento macroscópico se realizó mediante registro fotográfico digital, utilizando guías adhesivas para medir el cierre de las lesiones. Al finalizar el periodo experimental, los animales fueron anestesiados nuevamente con ketamina/xilacina y posteriormente sacrificados mediante dislocación cervical. Se recolectaron muestras de las lesiones: para análisis histológico, se fijaron en formalina al 10% preparada en PBS (pH 7,2); y para análisis bioquímicos se congelaron en seco a -70 °C.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Tabla 17*Distribución experimental y tratamientos aplicados en los grupos experimentales.*

<i>n</i>	Grupo experimental	% de compuesto	Tratamiento	
1	7	Sin tratamiento	N.A.	No se aplica
2	7	Vehículo	N.A.	2 veces al día durante 10 días sin compuesto
3	7	Alantoína	0,5	2 veces al día durante 10 días
4	7		1	
5	7		0,05	
6	7		0,1%	
7	7	Oxido de cariofileno	0,5%	2 veces al día durante 10 días
8	7		1%	
9	7		0,05	
10	7		0,1%	
11	7	Beta Cariofileno	0,5%	2 veces al día durante 10 días
12	7		1%	
13	7		Eugenol	
14	7	Fitoestimuline®	15%	2 veces al día durante 10 días

Nota. Los grupos experimentales ($n = 7$) fueron tratados tópicamente dos veces al día durante 10 días según la concentración indicada.

5.3 Análisis de resultados

La prueba de Kolmogorov-Smirnov se utilizó para evaluar la normalidad de los datos. Se emplearon análisis de Kruskal-Wallis se utilizó como prueba no paramétrica. Se aplicaron comparaciones múltiples de Dunnett y Dunn. Se consideraron los siguientes niveles de significancia estadística: $p < 0,05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***)

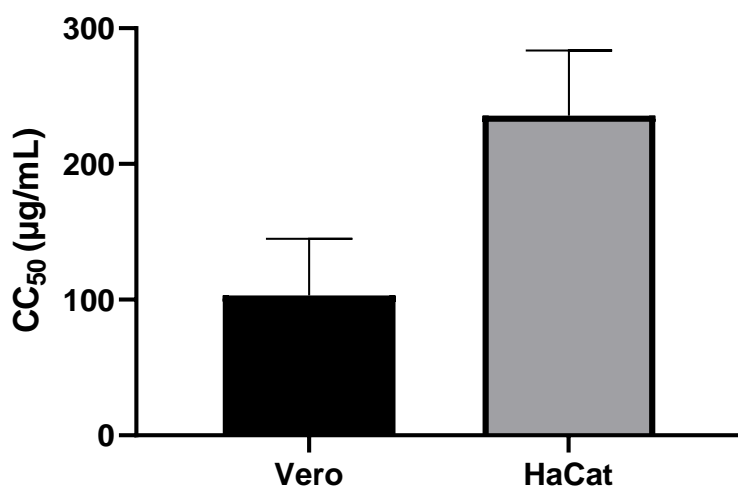
5.4 Resultados

5.4.1 Potencia de los compuestos en células

El tratamiento con la máxima concentración evaluada (300 $\mu\text{g/mL}$) con BC y BCoxido no mostró pérdida de viabilidad con respecto al control no tratado en la línea celular HaCaT. La citotoxicidad del eugenol se muestra en la Figura 37. Los valores de CC_{50} fueron de $103,2 \pm 41,66$ $\mu\text{g/mL}$ en las células epiteliales Vero y $235,54 \pm 48,19$ $\mu\text{g/mL}$ en los queratinocitos HaCaT, siendo la línea celular Vero más susceptible.

Figura 37

Resultados de citotoxicidad en células epiteliales Vero y queratinocitos HaCaT del eugenol.



5.4.2 Efecto proliferante /migratorio del BC en las células HaCaT

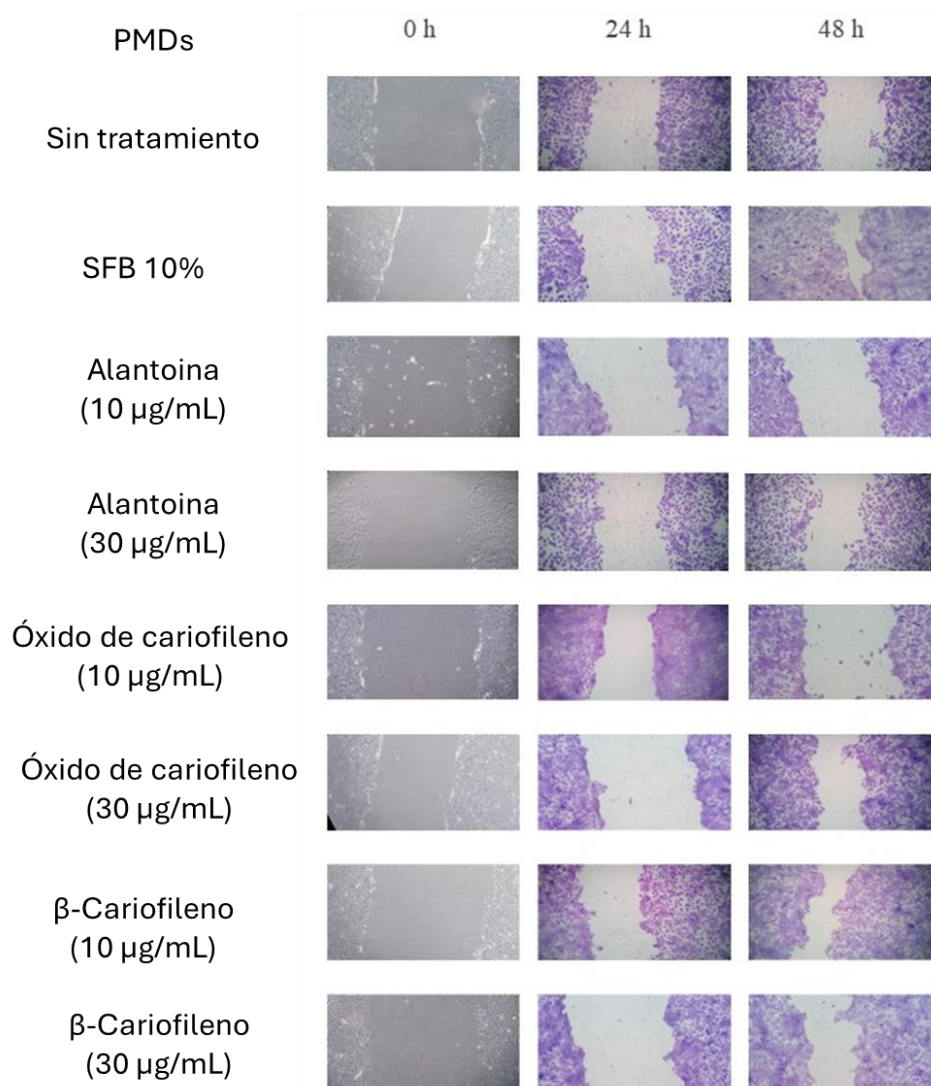
El tratamiento de las células con BC mostró un cierre estadísticamente superior al control sin tratamiento ($p < 0,05$) en ambas concentraciones evaluadas (10 y 30 $\mu\text{g/mL}$) a las 48 horas (Figura 38 y Figura 39). El medio de cultivo con SFBIC al 10% mostró un porcentaje de cierre en las células mayor que las otras muestras y controles a las 48 h ($p < 0,001$). La Alantoína y BCoxido

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

no mostraron porcentajes de cierre de lesión estadísticamente diferentes al control sin tratamiento en ninguna de sus concentraciones evaluadas.

Figura 38

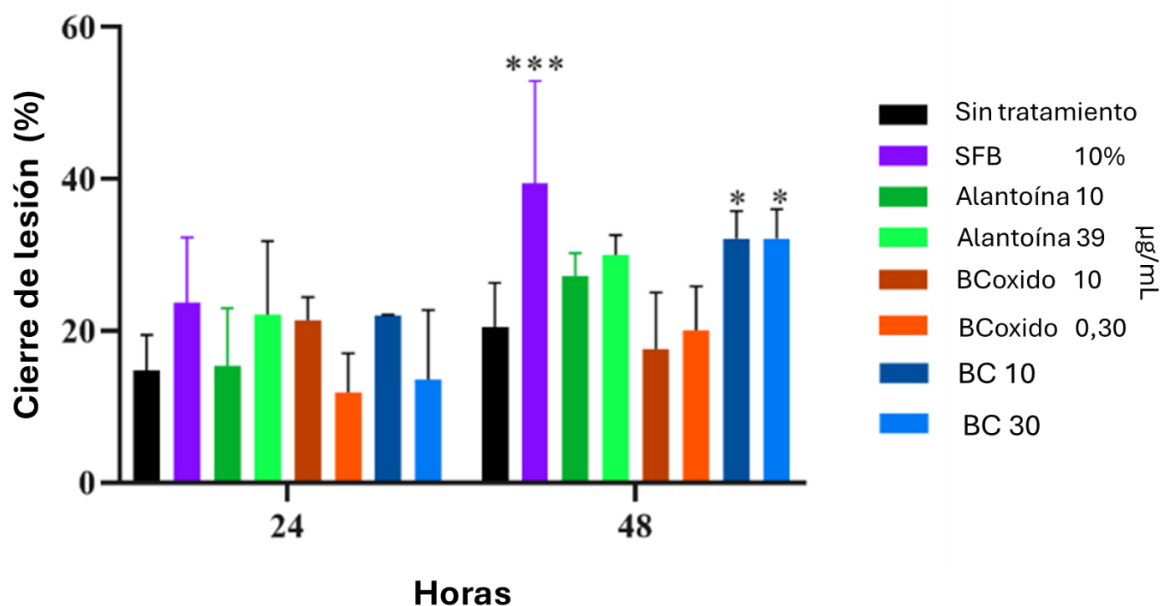
Microfotografía de las áreas de rasguño inducidas por alantoína, óxido de cariofileno y β -cariofileno en células HaCaT a las 24 y 48 horas.



Nota. En cada tiempo, se tomaron tres fotografías de diferentes campos microscópicos con un aumento de 400 \times por cada pocillo, con un total de tres pocillos por placa (tres réplicas técnicas). Además, los ensayos se realizaron por triplicado a las 24 h y 48 h (tres réplicas biológicas).

Figura 39

Porcentaje de cierre del área de rasguño inducido por Bcoxide, BC y alantoína (control positivo) en células HaCaT a las 24 y 48 horas.



Nota. SFBIC = suero fetal bovino, Bcoxido = óxido de cariofileno, BC = β -cariofileno. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación estadística, con la prueba de Dunn para comparaciones múltiples entre el grupo no tratado y los demás grupos experimentales. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

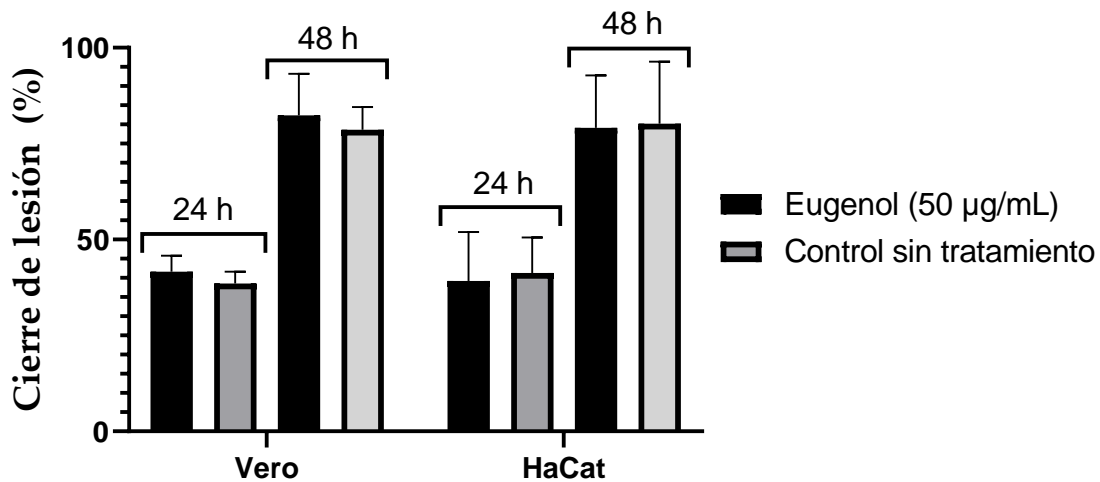
5.4.3 Efecto proliferante /migratorio del eugenol en las células Vero y HaCaT

El tratamiento con 50 $\mu\text{g/mL}$ de eugenol no mostró diferencias estadísticamente significativas con el control en ninguno de los puntos de tiempo, ni en ninguna de las líneas celulares utilizadas (Figura 40 y Figura 41).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 40

Efecto del tratamiento con eugenol en la migración células; ensayo de scratch.

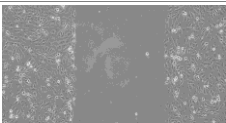
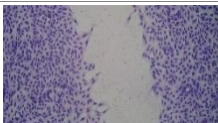
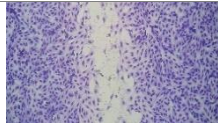
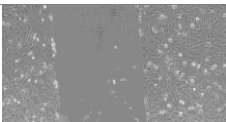
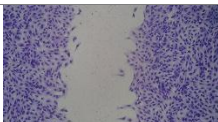
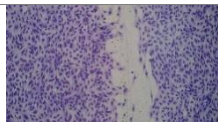

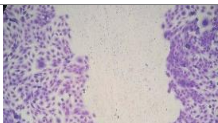


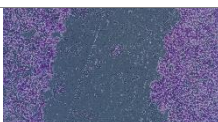
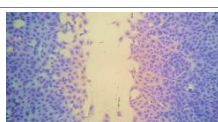


Nota. Ensayo de proliferación y migración celular en células Vero y HaCaT tratados con eugenol (50 µg/mL) a las 24 y 48 horas de exposición.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 41

Efecto de 50 µg/mL de eugenol en la migración celular a las 24 y 48 horas

<i>Línea</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>0 Horas</i>	<i>24 Horas</i>	<i>48 Horas</i>
Vero	<i>Control sin tratamiento</i>			
	<i>Eugenol 50 µg/mL</i>			
HaCaT	<i>Control sin tratamiento</i>			
	<i>Eugenol 0.3%</i>			

5.4.4 Efecto del tratamiento de las formulaciones tópicas en el cierre de heridas de los ratones

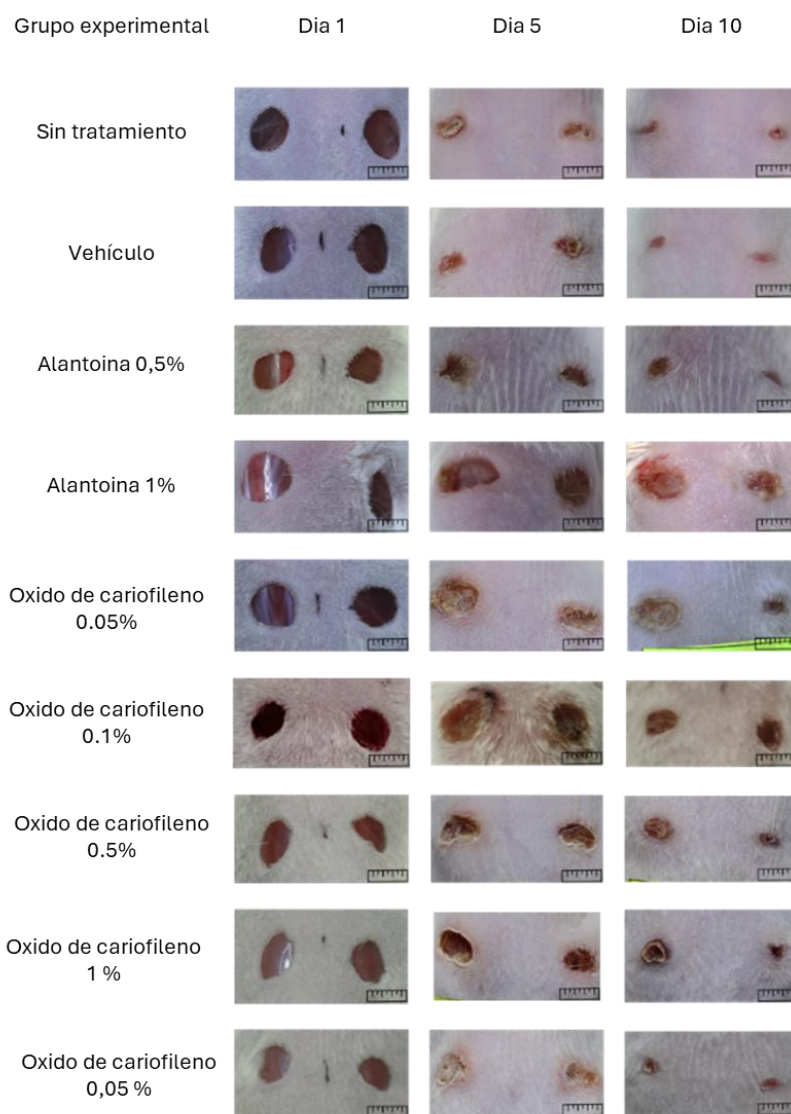
Las imágenes de las lesiones antes y después del tratamiento, de un ratón representativo para cada grupo experimental se muestran en la Figura 42. Calculando la AUC, se encontró que el tratamiento con Alantoína al 0,5% y 1%, BCoxido al 0,05 y 0,1 y con el BC al 0,5% presentaron un aumento en las AUC estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en comparación con el control sin tratamiento (Figura 43 A). Con respecto al porcentaje de cierre de lesión, la alantoína al 0,5 y 1%, BCoxido al 0,05, 0,1 y 0,5) y el BC al 0,1% indujeron menores porcentajes de cierre en comparación con el control no tratado para el día 3 de seguimiento (Figura 43 B). Para el día 5 y

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

8, el tratamiento con BCoído al 0,1% también generó el mismo efecto (Figura 43 B). Finalmente, el tratamiento con la FT® decantó en porcentajes de cierre de lesión estadísticamente superiores de al control no tratado.

Figura 42

Imágenes de lesiones cutáneas excisionales en ratones BALB/c seguidos los días 1, 5 y 10 para cada grupo experimental.

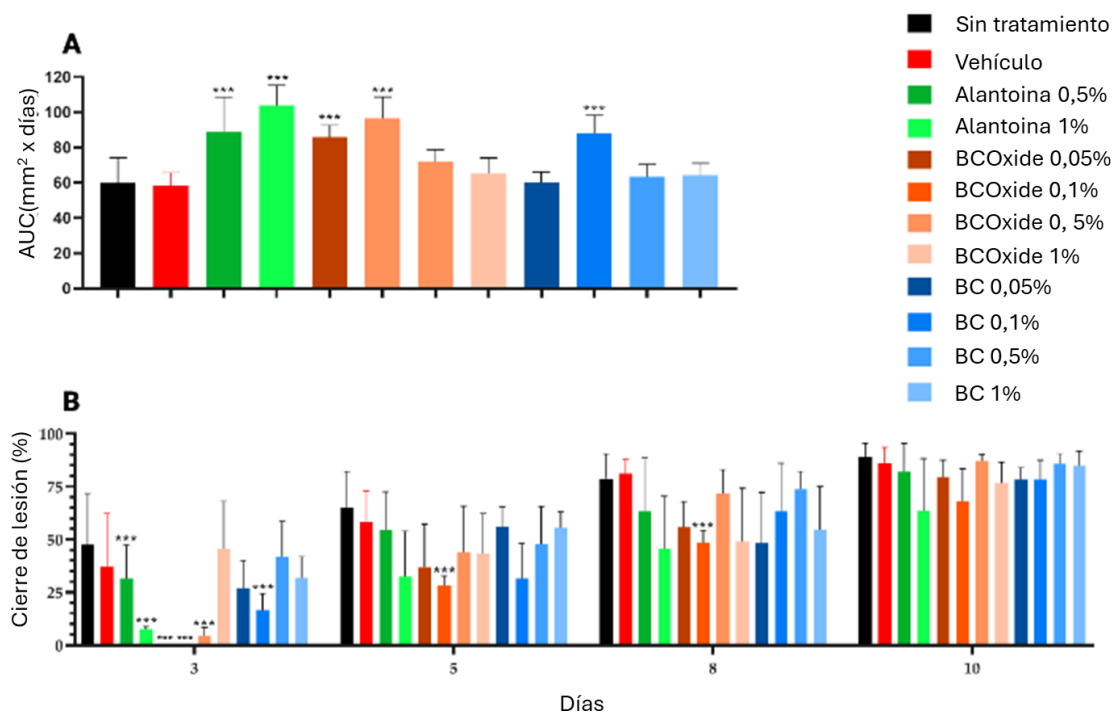


Nota. Tamaño de la regla: 0,5 cm.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 43

Cierre de heridas inducido por el tratamiento tópico con CPD y controles en heridas excisionales de ratones BALB/c.



Nota. (A.) Áreas bajo la curva (AUC). (B.) Porcentaje de cierre de la lesión a los 3, 5, 8 y 10 días de tratamiento. Alantoína (control positivo). Bcoxide = óxido de cariofileno, BC = β -cariofileno. Se utilizaron pruebas estadísticas de una vía (A.) y dos vías (B.) con la prueba de Dunnett para comparar los grupos no tratados con los demás grupos experimentales. *** = $p < 0,001$. $n = 7$.

Con relación al tratamiento con eugenol al 0,3%, fotografías de las lesiones excisionales al día 0, 3, 6 y 9 se muestran en la Figura 44. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las AUC calculadas antes y después de tratamiento con eugenol en comparación con el control sin tratamiento. (Figura 45).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 44

Imágenes de las lesiones en los ratones BALB/c antes (día 0) y después del tratamiento con eugenol al 0,3% y Fitostimoline® y vehículo.




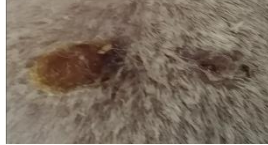












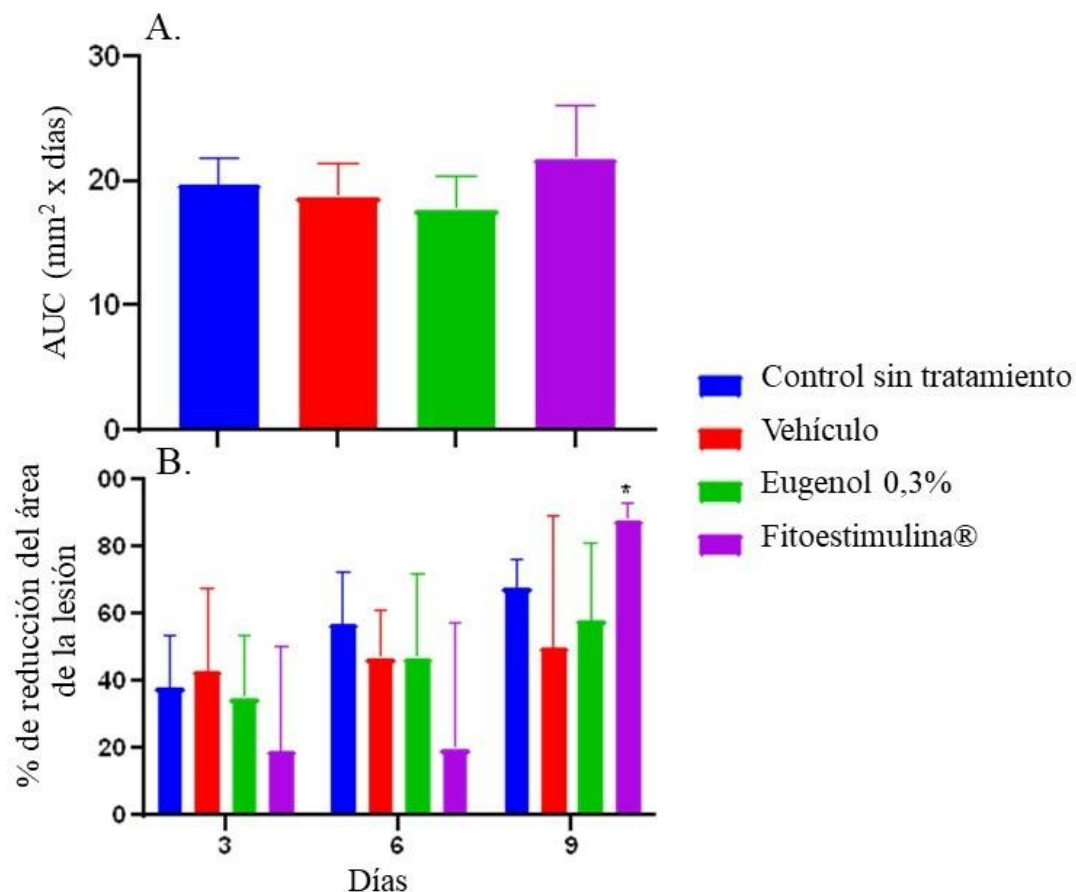
<i>Día 0</i>	<i>Día 3</i>	<i>Día 6</i>	<i>Día 9</i>
			
<i>Control sin tratamiento</i>			
			
<i>Eugenol 0.3%</i>			
			
<i>Fitoestimoline®</i>			
			
<i>Vehículo</i>			

Figura 45

Cierre de heridas inducido por el tratamiento tópico con eugenol y controles en heridas excisionales de ratones BALB/c.



Nota. (A.) Áreas bajo la curva (AUC). (B.) Porcentaje de cierre de la lesión a los 3, 6 y 9 días de tratamiento con eugenos y controles. Se emplearon 7 ratones por grupo experimental. Se utilizaron pruebas estadísticas de Kruskal-Wallis. * = $p < 0,05$. $n = 7$.

5.5 Discusión

El presente capítulo permitió la caracterización *in vitro* e *in vivo* seleccionados en el capítulo 2.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Con respecto a la citotoxicidad del BC y BCoxido ninguno de los dos resultó citotóxico en las líneas celulares evaluadas. (Picciolo et al., 2020) evaluaron el efecto citotóxico del β -cariofileno en fibroblastos gingivales humanos y células epiteliales orales humanas mediante el ensayo de viabilidad MTT. Los autores observaron que, tras 24 horas de exposición a β -cariofileno, la viabilidad celular se mantuvo al 100% en ambas líneas celulares, sin detectarse ningún efecto citotóxico atribuible al compuesto. Incluso bajo condiciones proinflamatorias inducidas por LPS, la viabilidad no se vio afectada por la presencia de β -cariofileno. Por su parte, Di Sotto et al., 2013 evaluaron la citotoxicidad y genotoxicidad del óxido de β -cariofileno en células humanas normales, utilizando linfocitos periféricos obtenidos de donantes sanos. Los resultados demostraron que el compuesto no produjo efectos citotóxicos ni genotóxicos significativos hasta una concentración de 22 $\mu\text{g/mL}$, manteniéndose los índices de viabilidad y proliferación celular comparables al control.

El eugenol fue parcialmente citotóxico en la línea celular HaCaT y no citotóxico en la línea celular Vero. Estudios previos muestran que la citotoxicidad del compuesto varía según la línea celular y la concentración utilizada (Babich et al., 1993; Ho et al., 2006). Babich et al. (1993) evaluaron la citotoxicidad del eugenol en diversas líneas celulares reportando valores de citotoxicidad media (NR50) de 42,69 $\mu\text{g/mL}$ en células HepG2 y 47,62 $\mu\text{g/mL}$ en fibroblastos humanos. Los autores sugieren que la toxicidad moderada observada para el eugenol depende en gran medida de los niveles intracelulares de glutatión, el principal antioxidante celular. Cuando las células presentan una menor capacidad antioxidante—por ejemplo, tras la depleción experimental de glutatión—, el eugenol se vuelve considerablemente más citotóxico (Babich et al., 1993). Ho et al. (2006) observaron que el eugenol exhibe citotoxicidad dependiente de la dosis en células osteoblásticas humanas U2OS, con un IC_{50} de 123 $\mu\text{g/mL}$ tras 24 horas de exposición. La

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

citotoxicidad se asoció con la depleción de glutatión intracelular, ya que la adición de N-acetil-L-cisteína (precursor de glutatión) protegió a las células del daño inducido por el eugenol. Por el contrario, otros antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa no ofrecieron protección, lo que sugiere que la toxicidad del eugenol está principalmente relacionada con la disminución de los niveles de glutatión y no con la producción de radicales libres de oxígeno (Ho et al., 2006).

Con relación a la proliferación/ migración celular, el presente trabajo demostró que el BC promovió estos efectos *in vivo*. Similar a nuestros resultados, Koyama et al., 2019 demostraron que el tratamiento con BC en cultivos de fibroblastos y queratinocitos primarios no solo mantiene la viabilidad celular, sino que además promueve la migración y proliferación, efectos que se traducen en una mejora significativa en la cicatrización de heridas *in vivo*. Estos hallazgos han sido replicados en otros estudios que confirman la ausencia de citotoxicidad notable de BC en células normales y la modulación positiva de vías implicadas en la regeneración tisular (Irrera et al., 2020). De manera consistente, diversos estudios han reportado que el BC induce una aceleración significativa en el cierre de heridas, alcanzando porcentajes superiores al 90 % en períodos tan cortos como 48 horas en fibroblastos L929 de ratón (Dahham et al., 2015). Este efecto promigratorio del BC se atribuye principalmente a sus propiedades antiinflamatorias, capaces de modular positivamente citocinas como IL-10 y reducir mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-1 β e IL-6, promoviendo así un microambiente favorable para la proliferación y migración celular (Gushiken et al., 2022; Parisotto-Peterle et al., 2020).

Los hallazgos *in vivo*, con respecto al potencial pro cicatrizante del BC, no se mantienen *in vivo*. El tratamiento con este compuesto, similar a lo ocurrido con la alantoína y el BCoxido, generan una disminución del porcentaje de cierre de lesión. Estos resultados se respaldan con la AUC producto del seguimiento, donde se evidencia un retraso en la cicatrización cutánea en el

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

modelo evaluado. Estos resultados contrastan con los obtenidos, por ejemplo, por de Gushiken et al. (2022), donde un emulgel al 1 % de BC aplicado dos veces por día sobre heridas excisionales de 3 cm produjo una contracción significativamente mayor desde el día 7 y superó el 90 % de cierre al día 14; este efecto se acompañó de la supresión de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ), el aumento de IL-10 y de la actividad de glutatión peroxidasa, así como de una epidermis más delgada, mayor deposición de colágeno y sobreexpresión de laminina- γ 2 y desmogleína-3, indicadores de reepitelización y remodelado tisular eficientes . Por su parte, Parisotto-Peterle et al., 2020 formularon un hidrogel con nanoemulsión que contenía BC (HN-BC, 10 % inicial), el cual aceleró el cierre inicial de la lesión (contracción significativa desde el día 2 y aproximadamente 80 % al día 12 frente a Dersani®) y disminuyó marcadamente los niveles de MPO, TNF- α e IL-1 en las primeras 48 h, manteniendo niveles bajos durante la fase proliferativa; además, redujo la peroxidación lipídica (TBARS), promovió angiogénesis temprana y organizó fibras de colágeno de forma comparable al control positivo . Estas mejoras funcionales se atribuyeron, al menos en parte, a la nanoemulsificación, que potenció la permeación cutánea del BC y otorgó alta bioadhesión al vehículo, favoreciendo su permanencia en el lecho de la herida.

Con respecto al eugenol, el tratamiento no tuvo ningún efecto sobre el cierre de la lesión, presentando AUC y porcentajes de cierres de lesión similares a los del control sin tratamiento. Contrariamente, Dashti et al. (2024) demostraron que la administración tópica de hidrogeles basados en eugenol encapsulado en fitosomas y quitosomas (HG-Phyt/Chit@Eu) aceleró significativamente la cicatrización de heridas excisionales infectadas, mostrando una notable reducción del área de la herida y un aumento en la contracción tisular, en comparación con el grupo control. Es posible que la encapsulación en sistemas nanoestructurados mejore la biodisponibilidad y liberación de los CDP, manteniendo una menor dosificación mantenida en el

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

tiempo, evitando los efectos negativos observados para algunos compuestos en el presente trabajo. Por ejemplo, Gushiken et al., 2022, construyen un emulgel al 1 % de BC que aumentó > 90 % de contracción de las lesiones al día 14, junto con supresión de las citoquinas pro inflamatorias IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ , incremento de IL-10 y mayor actividad de glutatión peroxidasa. Por su parte, Parisotto-Peterle et al., 2020 formularon un hidrogel con nanoemulsión que contenía BC (HN-BC, 10 % inicial), el cual aceleró el cierre inicial de la lesión (contracción significativa desde el día 2 y aproximadamente 80 % al día 12 frente a Dersani®) y disminuyó marcadamente los niveles de MPO, TNF- α e IL-1 en las primeras 48 h, manteniendo niveles bajos durante la fase proliferativa; además, redujo la peroxidación lipídica (TBARS), promovió angiogénesis temprana y organizó fibras de colágeno de forma comparable al control positivo.

Otra posible explicación para lo observado *in vivo* podría surgir del análisis de la regeneración fetal, donde la reparación cutánea se inicia con una baja fase inflamatoria, donde los niveles de IL-6 e IL-8 caen en pocas horas, limitando el reclutamiento leucocitario y favoreciendo un entorno antiinflamatorio (Larson et al., 2010). La capacidad antiinflamatoria reportada en la literatura para los CDP en general, incluyendo los empleados en el presente capítulo, podría afectar las primeras fases del proceso de cicatrización, retrasando el cierre de la lesión, pero mejorando el resultado y apariencia final. Por tal razón, es fundamental el análisis histológico y de ELISA, que llevamos a cabo en el capítulo 4.

5.6 Conclusiones

- El CDP β -cariofileno (BC) fue no citotóxico y mostró un efecto significativo en la promoción de la migración / proliferación celular.
- El tratamiento tópico con formulaciones de BC retrasó significativamente el cierre de heridas excisionales en ratones

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

- El eugenol fue parcialmente tóxico, no demostró actividad pro-migratoria ni proliferativa y utilizado tópicamente al 0,3 % no modificó la evolución de las heridas.
- El extracto acuoso comercial de *Triticum vulgare* (Fitostimulina®) fue el único tratamiento tópico evaluado que promovió un cierre de herida

6 Efecto pro cicatrizante del tratamiento con CDP tópicos a nivel tisular

6.1 Introducción

El presente capítulo está dividido en dos partes: el análisis histológico y la determinación de citoquinas y factores de crecimiento en lesiones obtenidas de los tratamientos del capítulo 3. Con respecto al análisis histológico, las lesiones fueron procesadas en el laboratorio de patología de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander hasta obtenerse los bloques parafinados. Las tinciones de hematoxilina y eosina (H&E), tricrómica de Masson (MT) y azul de touliudina (TB) se realizaron en el laboratorio hematológico del Hospital Infantil Federico Gómez, en Ciudad de México. En este mismo laboratorio se realizó la digitalización de las láminas coloreadas. La evaluación histológica convencional mediante tinción H-E permite observar la arquitectura general del tejido, reepitelización, infiltrado inflamatorio y formación de tejido de granulación. La tinción específica con TB permite identificar y cuantificar mastocitos, células implicadas en la modulación de la inflamación y la angiogénesis (Bíró et al., 2009). Por otra parte, la coloración con MT posibilita la evaluación cuantitativa del depósito y organización de fibras colágenas, indicador clave en la calidad del tejido cicatrizal formado (Gushiken et al., 2022; Shubham Kumar et al., 2015).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

En los homogenizados de tejido se midieron parámetros inflamatorios y factores angiogénicos fundamentales en la cicatrización como IL-6, IL-1 β , TNF- α y VEGF utilizando el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Tal como lo describe Raziyeva et al. (2021), el proceso de cicatrización cutánea depende de una fina regulación inmunológica, donde citocinas como IL-6, IL-1 β , TNF- α y factores como VEGF actúan como mediadores clave a lo largo de las distintas fases del proceso reparativo. En heridas agudas, estos mediadores son esenciales para iniciar la respuesta inflamatoria, promover el reclutamiento de células inmunes y facilitar la angiogénesis y proliferación celular necesarias para la reparación tisular. En este contexto, la inmunomodulación de los CDP sobre las lesiones podría mejorar la calidad del tejido reparado. El control del microambiente inmunológico en el lecho de la herida no solo depende de la liberación de factores solubles, sino que también involucra la participación de diferentes tipos celulares, como la inducción de un fenotipo reparador de macrófagos (M2) o la disminución en el reclutamiento de células inmunológicas, lo cual contribuiría al efecto antioxidante de los CDP y a la mejora del resultado final del proceso de cicatrización (Cao et al., 2024).

Los controles positivos empleados incluyeron la alantoína, conocida por su acción regeneradora (Araújo et al., 2010; Han & Ceilley, 2017) y el extracto de *Triticum vulgare*, el cual ha mostrado eficacia en acelerar la migración celular, estimular la angiogénesis y promover un rápido y organizado depósito de colágeno, contribuyendo a un cierre eficiente de heridas complejas (Della Pepa et al., 2023).

En este contexto, el objetivo del presente capítulo fue evaluar el efecto pro cicatrizante de los CDP en las lesiones excisionales, integrando análisis histológicos convencionales y cuantitativos, así como la determinación de mediadores inflamatorios y angiogénicos mediante técnicas de ELISA en lesiones homogenizadas.

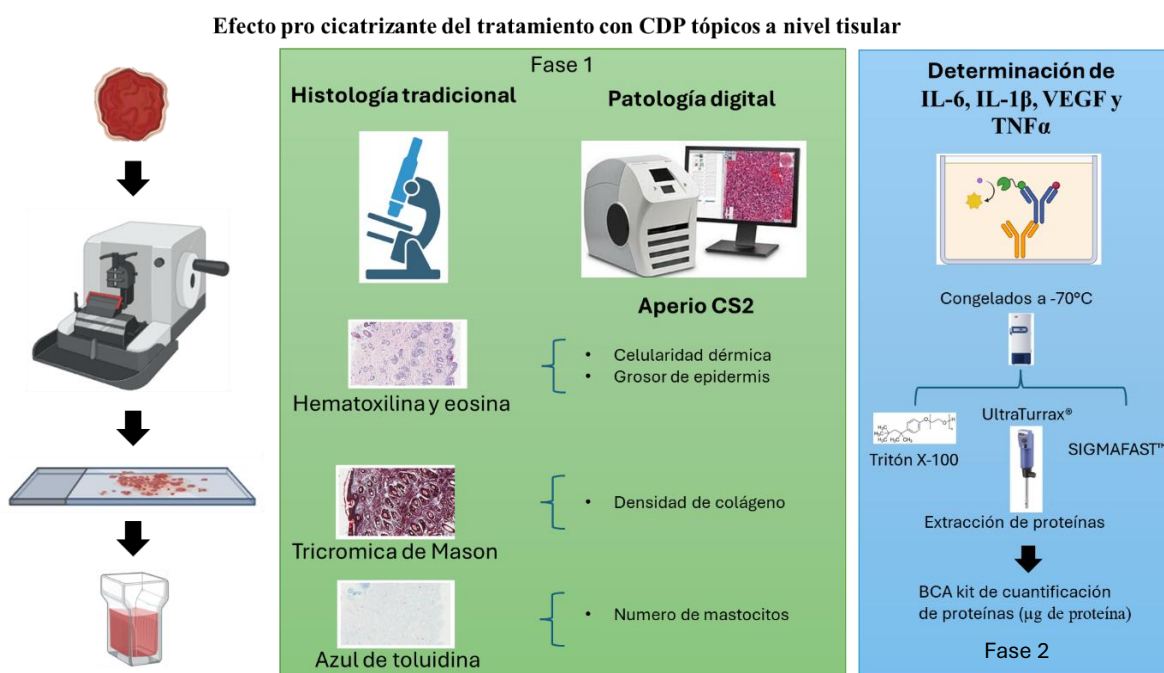
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

6.2 Diseño experimental

El diseño experimental se dividió en dos fases: Inicialmente se realizó el análisis histológico de las lesiones mediante técnicas de patología digital cuantificando el infiltrado celular, el grosor de la epidermis, dermis y la densidad del colágeno (Fase 1). Alternativamente, se determinaron los niveles de IL-6, IL-1 β , VEGF y TNF- α en homogenizados de lesión mediante ELISA (Fase 2) (Figura 46).

Figura 46

Efecto pro cicatrizante del tratamiento con CDP tópicos a nivel tisular



6.3 Materiales y métodos

6.3.1 Muestras y pruebas comerciales utilizadas

Muestras obtenidas de capítulo 3. El kit de cuantificación de proteínas BCA fue adquirido de BIO BASIC (NY, USA). Los kits comerciales de ELISA (IL-6, IL-1 β , TNF- α y VEGF) fueron

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

adquiridos de R&D Systems Promega (Madison, WI, USA). El formaldehído fue adquirido de Inquimicol (Colombia), el tritón X-100 y SIGMAFASTX-100™ de Sigma-Aldrich.

6.3.2 *Análisis histológico (Fase 1)*

Después del período de tratamiento de 10 días, los ratones fueron sacrificados, obteniéndose biopsias de las heridas y de piel normal (Ver capítulo 3). Estas muestras fueron fijadas en formalina al 10% durante al menos 24 horas, luego incluidas en parafina y cortadas en secciones de 5 μm de grosor. Se realizaron tinciones con H-E, TB y MT para el análisis histológico y morfométrico según la metodología descrita previamente (Casadiego et al., 2023). Brevemente, las secciones fueron desparafinizadas e hidratadas mediante pasajes en xilol y alcoholes de concentración decreciente. Posteriormente, se sometieron a las tinciones específicas: para hematoxilina-eosina (H&E), las láminas se tiñeron primero con hematoxilina durante 5 minutos y luego con eosina durante 2 minutos; para azul de toluidina (TB), las secciones se incubaron con una solución acuosa de azul de toluidina al 0,1% durante 3 minutos; y para tricrómico de Masson (MT), se siguió el protocolo estándar de tinción utilizando hematoxilina férrica, fucsina ácida y azul de anilina. Finalmente, todas las láminas fueron deshidratadas, aclaradas y montadas para su análisis microscópico.

Los tejidos teñidos fueron digitalizados utilizando el Aperio ScanScope-CS2 (Leica Biosystems, Deer Park, EE. UU.) con un aumento de 40x, generando archivos digitales en formato. svx, que fueron analizados mediante el software Aperio ImageScope versión 12.1 (Leica Biosystems). La tinción H-E permitió evaluar el infiltrado inflamatorio y cuantificar la celularidad dérmica, expresada como número de células/campo microscópico y medir el grosor de la epidermis (excluyendo el estrato córneo) y del estrato córneo (SC), ambos en micrómetros (μm). La tinción TB identificó y cuantificó los mastocitos, presentando los resultados como número de

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

células/campo microscópico a 40x. Finalmente, en los tejidos teñidos con MT se analizó la densidad del colágeno mediante el cálculo del porcentaje de píxeles azules, empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de píxeles azules} = \frac{\text{Número de píxeles azules}}{\text{Número total de píxeles}} \times 100$$

6.3.3 Determinación de proteínas tisulares e IL-6, IL-1 β , VEGF y TNF- α (Fase 2)

Las muestras de las heridas fueron homogeneizadas en PBS (pH 7.0) que contenía 0,2% de Tritón X-100 e inhibidores de proteasas utilizando un UltraTurrax® (IKA). Los desechos tisulares se eliminaron mediante centrifugación a 10,000 g durante 20 minutos. La concentración total de proteínas se determinó mediante el ensayo de proteínas BCA y niveles tisulares de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 β , TNF- α) y del VEGF se cuantificaron utilizando por ELISA, siguiendo estrictamente las recomendaciones del fabricante. Los resultados se expresaron como pg/ μ g de proteína.

6.3.4 Análisis estadístico

Los gráficos y los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows (Dotmatics, San Diego, California, EE. UU.). La prueba de Kolmogorov-Smirnov se utilizó para evaluar la normalidad de los datos. Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis como prueba no paramétrica. Se aplicaron comparaciones múltiples de Dunn. Se consideraron los siguientes niveles de significancia estadística: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), and $p < 0,001$ (***)

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

6.4 Resultados**6.4.1 Análisis histológicos por patología digital**

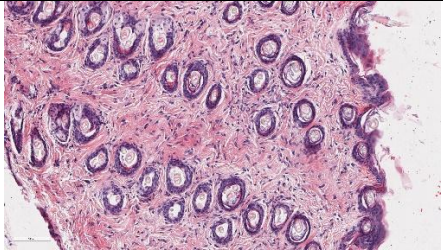
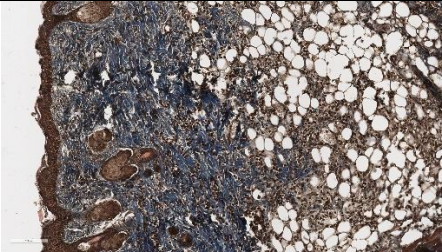
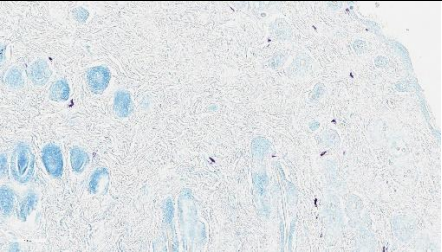
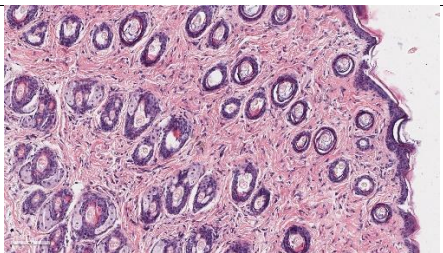
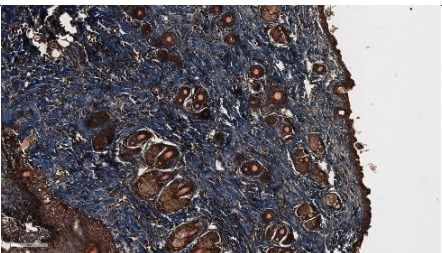
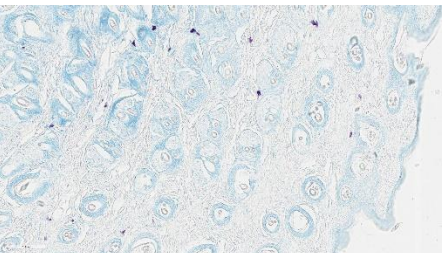
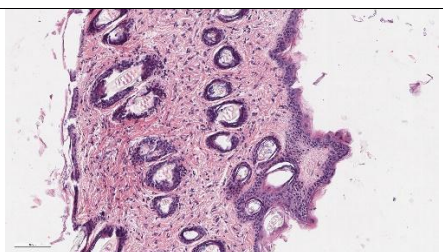
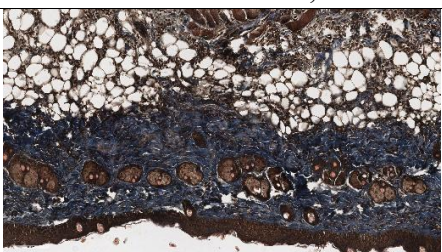
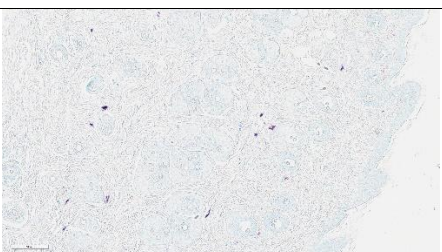
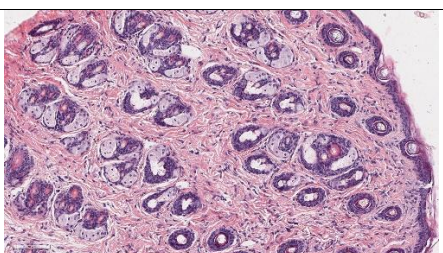
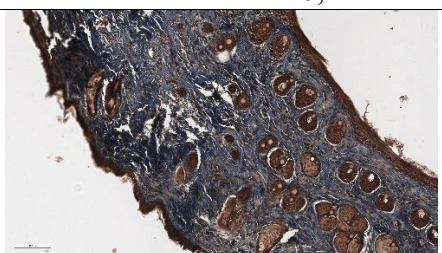
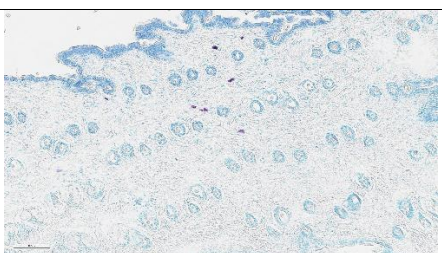
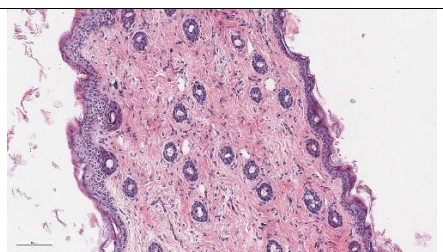
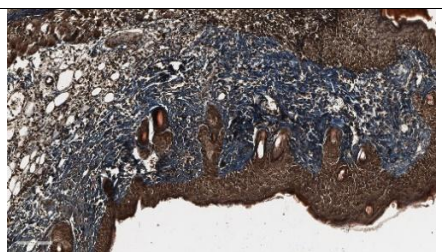
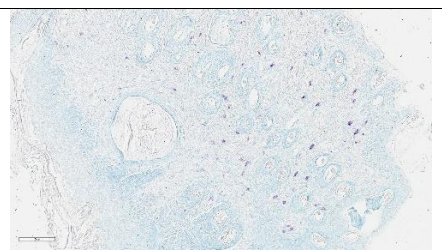
6.4.1.1 B-cariofileno. En la Figura 47 se observan las tinciones histológicas realizadas para las biopsias de las lesiones tratadas con diferentes concentraciones de BC. Concentraciones de 0,05%, 0,1%, 0,5% y 1% produjeron una disminución estadísticamente significativa en el número de mastocitos por campo microscópico en comparación con el control sin tratamiento ($p < 0,05$) (Figura 49 A). Además, las biopsias tratadas con BC al 0,05%, 0,5% y 1% mostraron una reducción significativa en el número de células infiltrantes en la dermis ($p < 0,05$) (Figura 49 B). No se observaron cambios significativos en el espesor de la epidermis, excluyendo el estrato córneo (Figura 49 C); sin embargo, el tratamiento con BC al 0,05% y 0,1% evidenció una disminución significativa en el espesor del estrato córneo en comparación con el control ($p < 0,05$) (Figura 49D). En cuanto a la densidad de fibras de colágeno, los grupos tratados con BC al 0,5% y 0,1% presentaron un aumento significativo tanto en la intensidad total como en el porcentaje de píxeles azules por unidad de área respecto al grupo control ($p < 0,05$) (Figura 50).

Figura 47

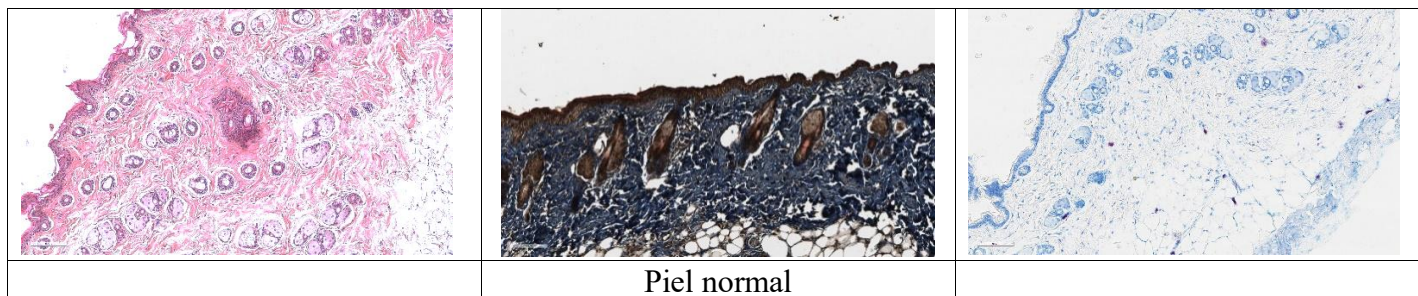
Imágenes histológicas teñidas para grupos experimentales tratados con BC.

Hematoxilina y Eosina	Tricromica de Masson	Azul de toluidina
		
	Control sin tratamiento	

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

		
	Beta-Cariofileno 0,5%	
		
	Beta-Cariofileno 0,05%	
		
	Beta-Cariofileno 0,1%	
		
	Beta-Cariofileno 1%	
		
	Vehículo	

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE



Nota. Imágenes histológicas de muestras de tejido (espesor de 5 μm) teñidas con hematoxilina y eosina, tricrómico de Masson y azul de toluidina después de 10 días para cada grupo experimental tratado con diferentes concentraciones de BC. Aumento: 40x.

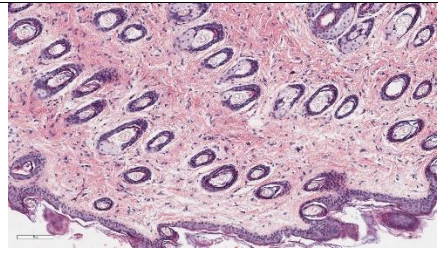
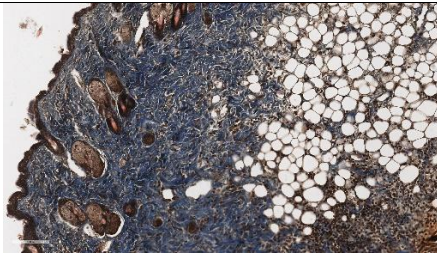
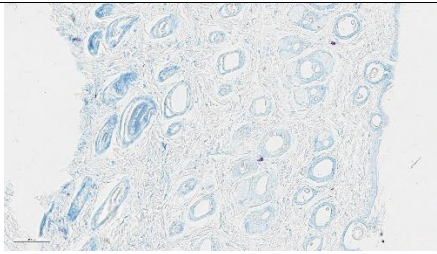
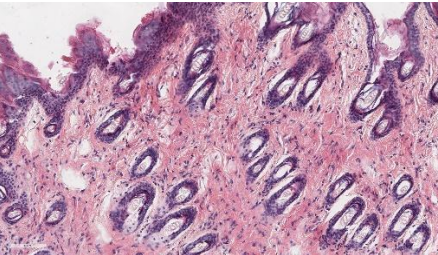
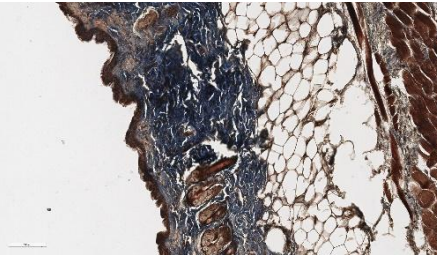
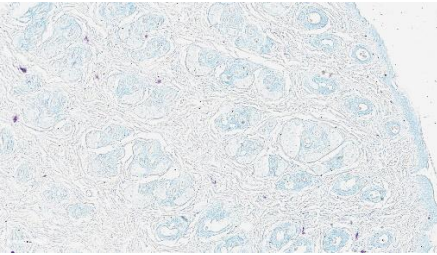
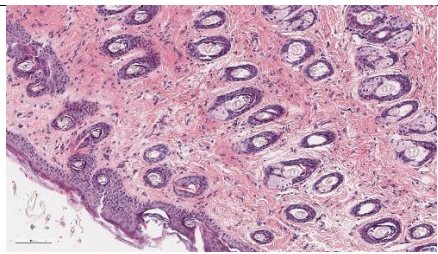
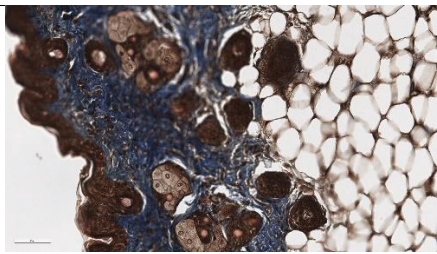
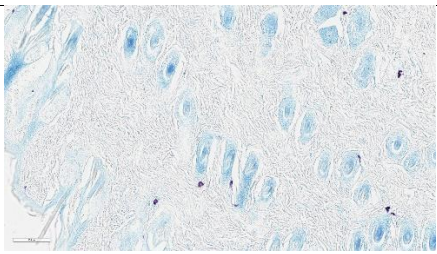
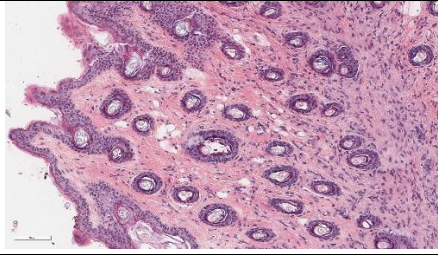
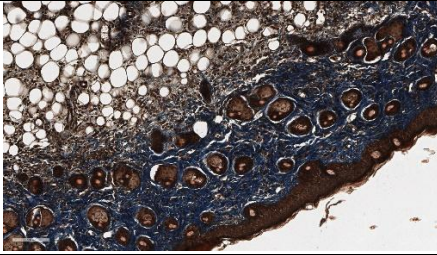
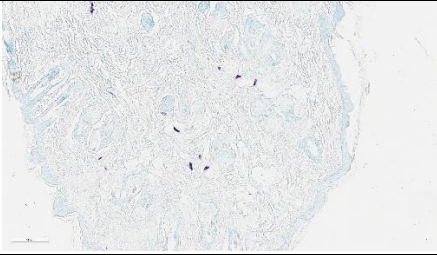
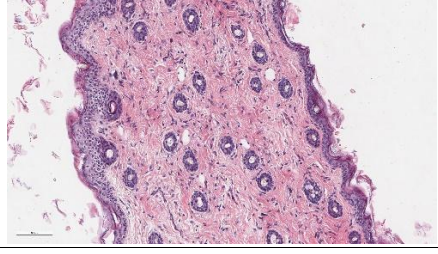
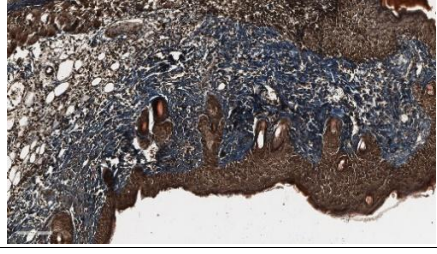
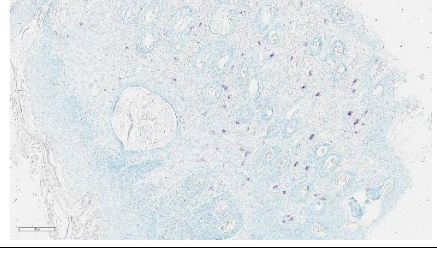
6.4.1.2 Óxido de cariofileno. El tratamiento con BCoxido (Figura 48) a concentraciones de 0,05%, 0,1%, 0,5% y 1% resultó en una disminución estadísticamente significativa en el número de mastocitos y de infiltrado celular en dermis por campo microscópico en comparación con el control sin tratamiento ($p < 0,05$) (Figura 49 A y B). El grosor de la epidermis mostro diferencias con el control no tratado (Figura 49 C), sin embargo, el grosor del estrato corneo si fue mayor ($p < 0,05$) (Figura 49 D). En cuanto a la densidad de fibras de colágeno, el grupo tratado con BCoxido al 0,5% presentó un aumento significativo en el porcentaje de píxeles azules en las tinciones con tricrómico de Masson ($p < 0,05$) (Figura 50).

Figura 48

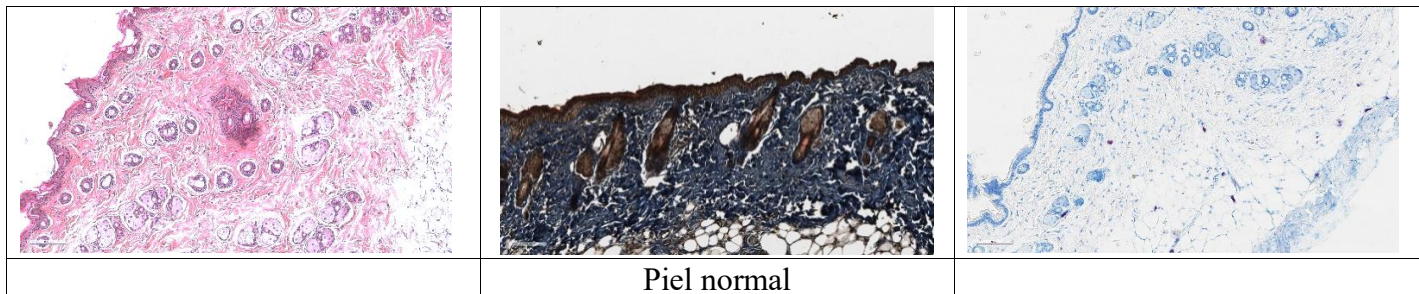
Imágenes histológicas teñidas para grupos experimentales tratados con BCoxido.



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

		
	Oxido de cariofileno 1%	
		
	Oxido de cariofileno 0,05%	
		
	Oxido de cariofileno 0,1%	
		
	Oxido de cariofileno 0,5%	
		
	Vehículo	

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

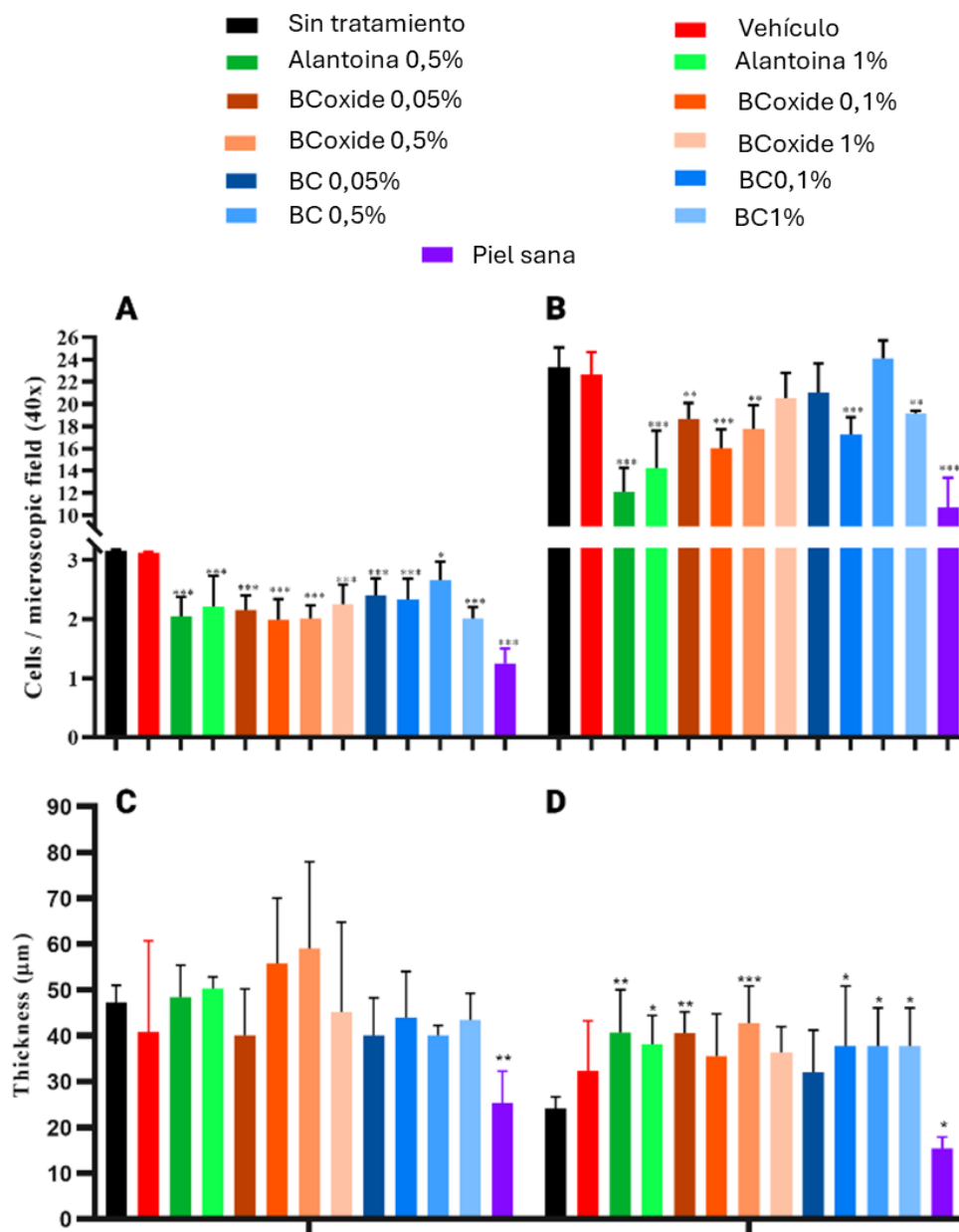


Nota. Imágenes histológicas de muestras de tejido (espesor de 5 μm) teñidas con hematoxilina y eosina, tricrómico de Masson y azul de toluidina después de 10 días para cada grupo experimental tratado con diferentes concentraciones de BCoóxido. Aumento: 40x

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 49

Análisis de imágenes microscópicas de biopsias al final del tratamiento con trans β -cariofileno (BC), oxido de cariofileno (BOxido) y controles.



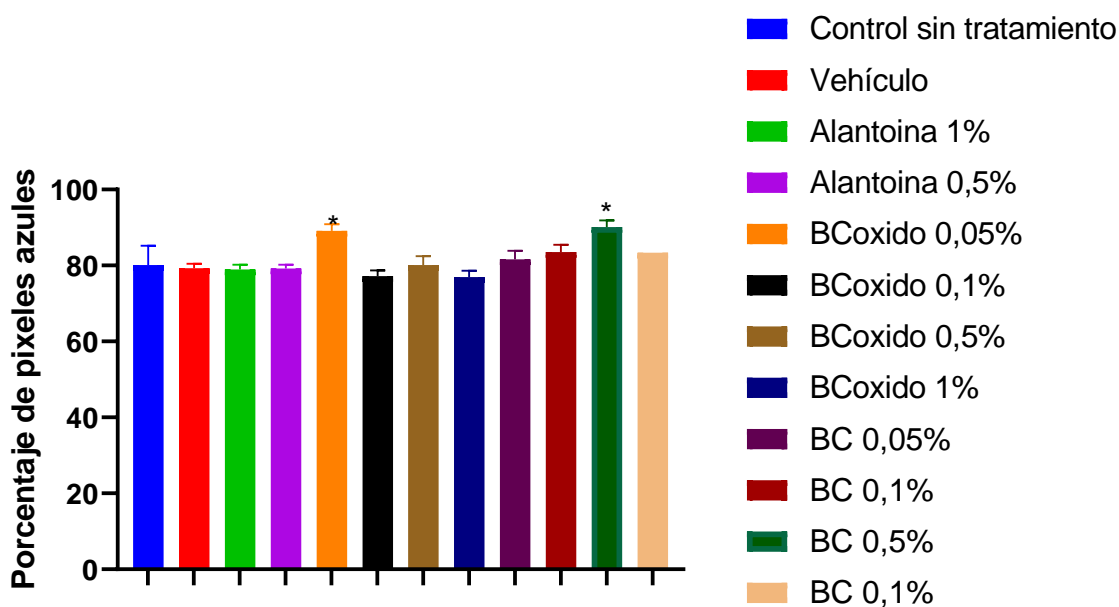
Nota. (a.) Infiltrado de mastocitos, (b.) Infiltrado de células dérmicas, (c.) Espesor (μm) de la epidermis, excluyendo el estrato córneo (SC), y (d.) Espesor (μm) del SC, en 300 campos

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

microscópicos con aumento de 40x. Alantoína (control positivo), Bcoxide = óxido de cariofileno, BC = β -cariofileno. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación estadística, con la prueba de Dunn para comparaciones múltiples entre el grupo no tratado y los demás grupos experimentales. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Figura 50

Porcentaje de píxeles azules en tejidos teñidos con tricrómico de Masson tratados con BC, BCoxido y alantoína



Nota: Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación estadística, con la prueba de Dunn para comparaciones múltiples entre el grupo no tratado y los demás grupos experimentales.

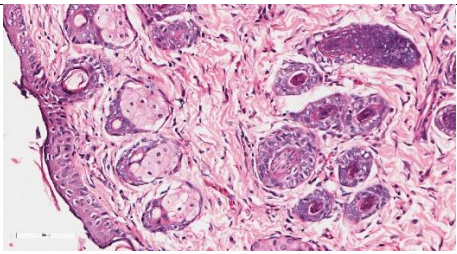
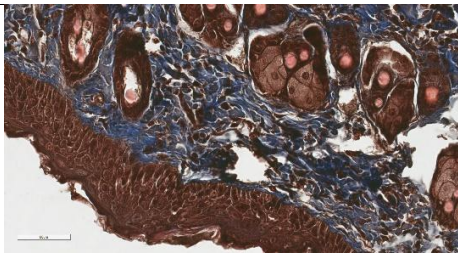
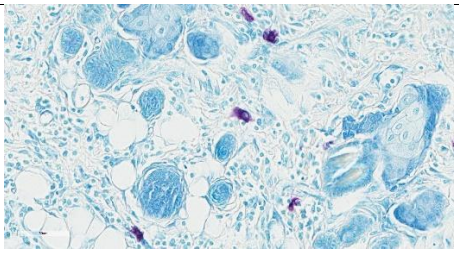
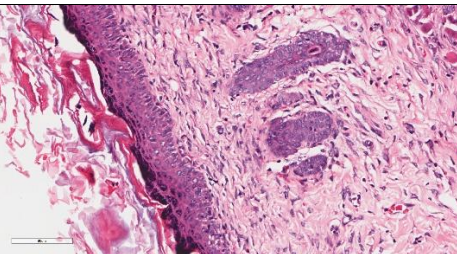

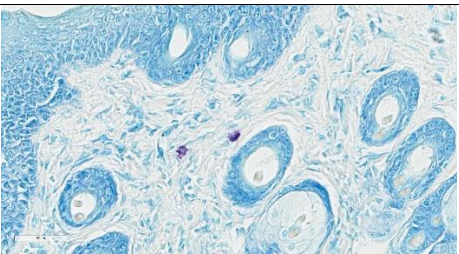
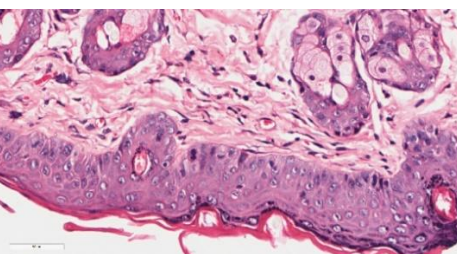
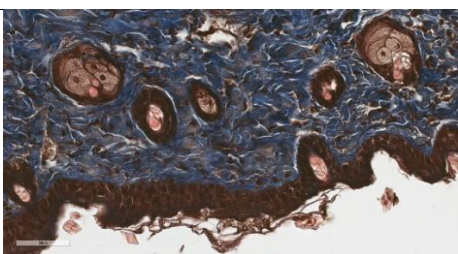
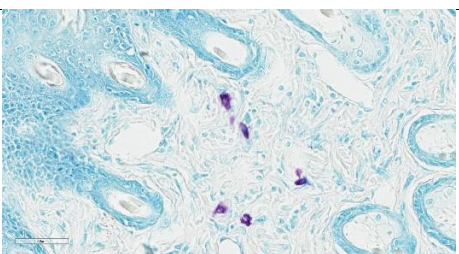
* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

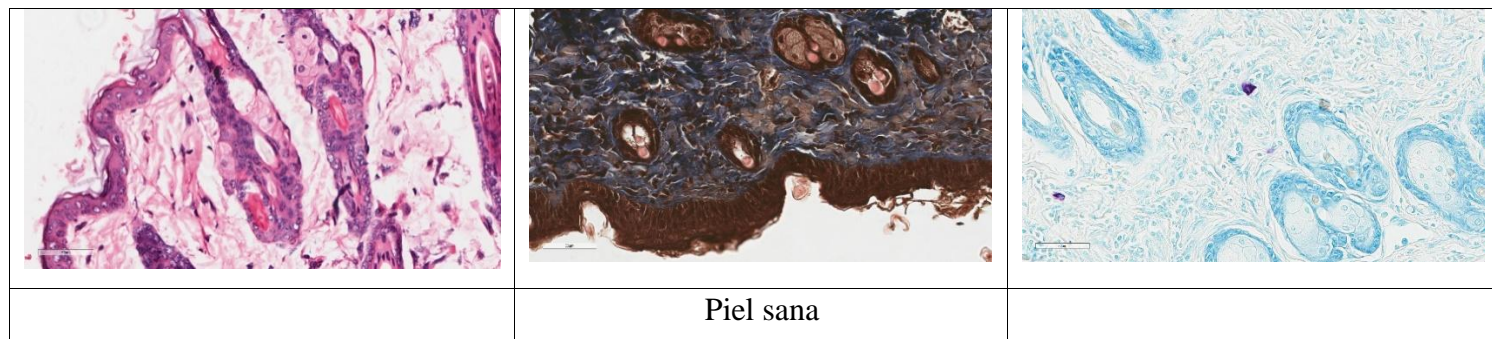
6.4.1.3 Eugenol. El tratamiento con eugenol al 0,3% (Figura 51) produjo una disminución estadísticamente significativa en el número de mastocitos y del número de células infiltrantes por campo microscópico respecto al control sin tratamiento ($p < 0,05$) (Figura 49 A y B). En contraste, no se evidenciaron cambios significativos en el espesor de la epidermis ni del estrato córneo (Figura 49 C y D). Finalmente, el tratamiento no mostró diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de píxeles azules en las tinciones con tricrómico de Masson respecto al grupo control (Figura 50).

Figura 51

Imágenes histológicas teñidas para grupos experimentales tratados con Eugenol.

Hematoxilina y Eosina	Tricromica de Mason	Azul de toluidina
		
Control sin tratamiento		
		
Eugenol 0.30%		
		
Vehículo		

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE



Nota. Imágenes histológicas de muestras de tejido (espesor de 5 μm) teñidas con hematoxilina y eosina, tricrómico de Masson y azul de toluidina después de 10 días para cada grupo experimental tratado con diferentes concentraciones de eugenol. Aumento: 40x.

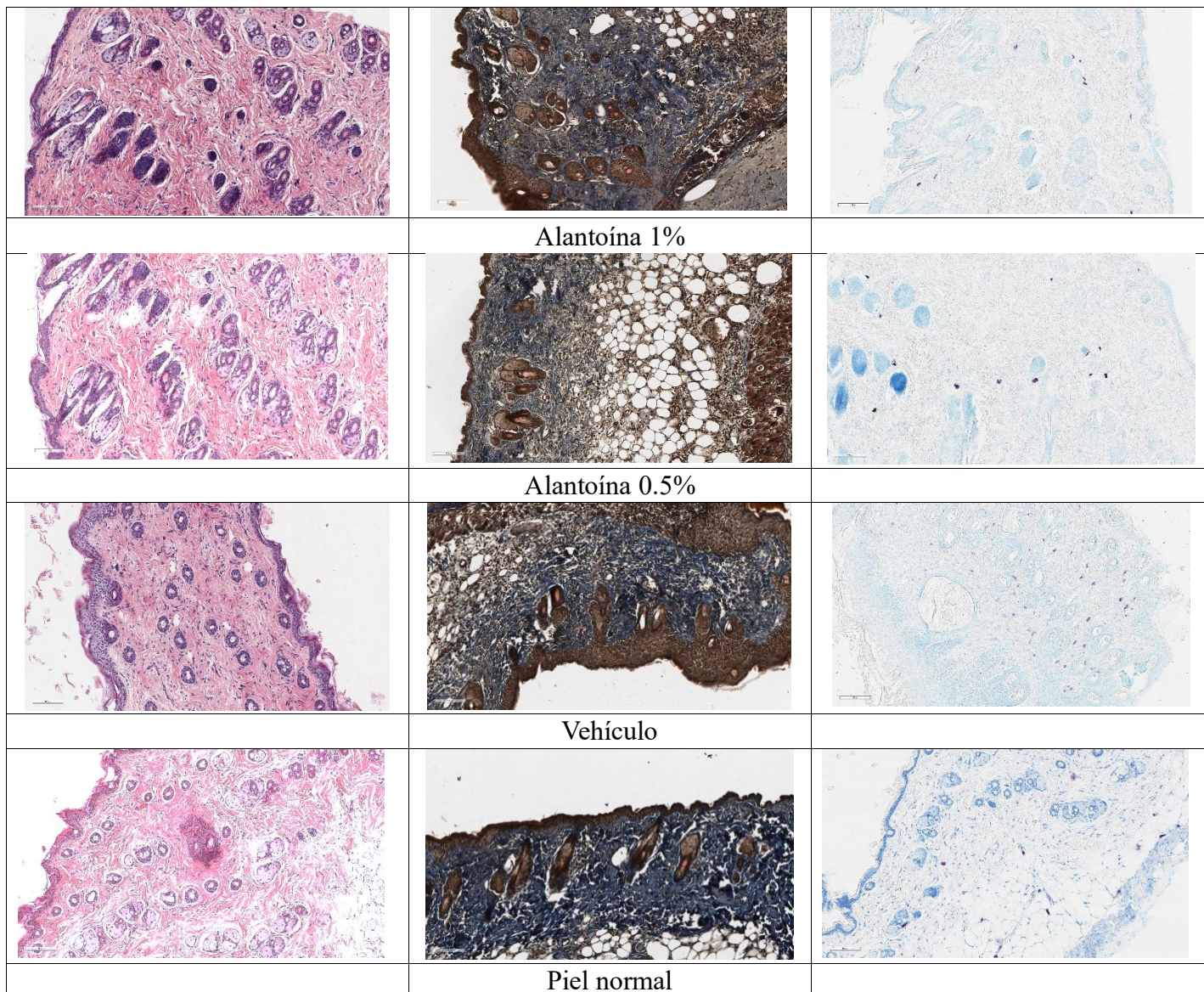
6.4.1.4 Alantoína. El tratamiento con Alantoína al 0,5 % y 1% (Figura 52) produjo una disminución estadísticamente significativa en el número de mastocitos por campo microscópico respecto al control sin tratamiento ($p < 0,05$) (Figura 49 A). Además, se observó una reducción significativa en el número de células infiltrantes en la dermis en comparación con el grupo control ($p < 0,05$) (Figura 53 B). No se evidenciaron cambios significativos en el espesor de la epidermis, pero sí en el grosor del estrato córneo en ambas concentraciones (Figura 49 C y D) ($p < 0,05$). El porcentaje de píxeles azules en los tejidos no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control no tratado (Figura 50).

Figura 52

Imágenes histológicas teñidas para grupos experimentales tratados con Alantoína.



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE



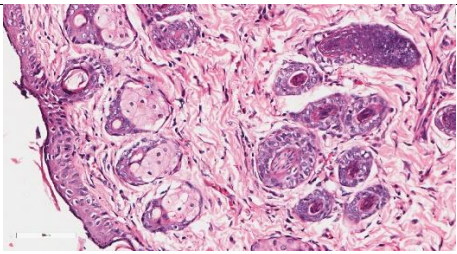
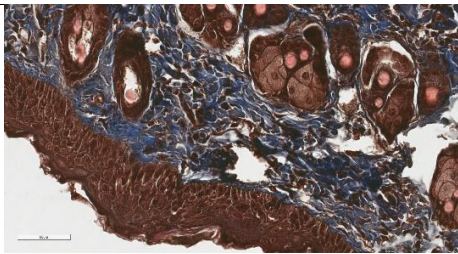
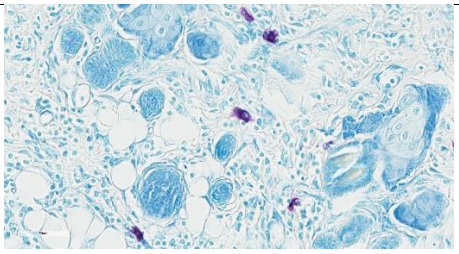
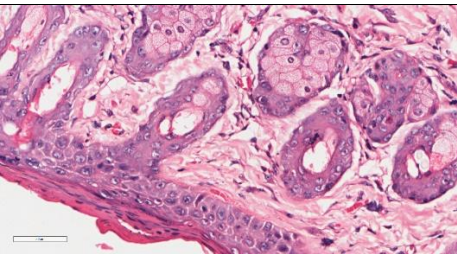
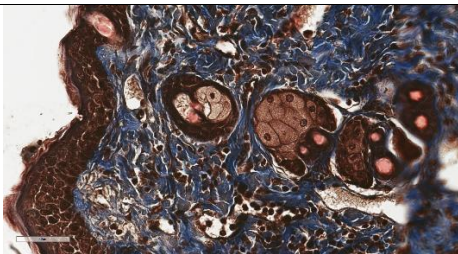
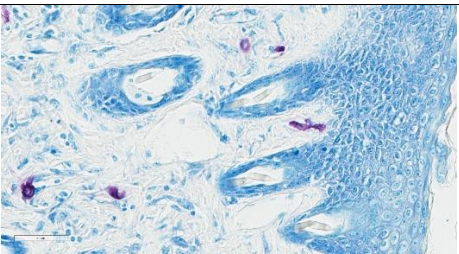
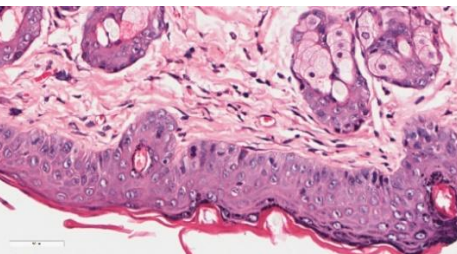
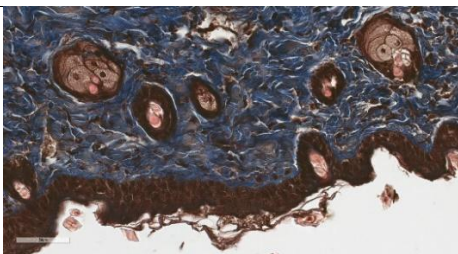
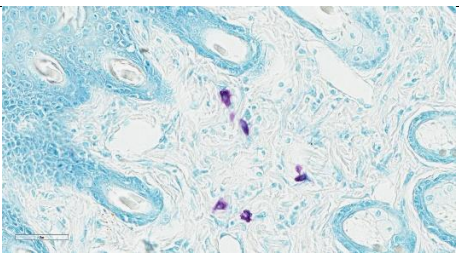
Nota. Imágenes histológicas de muestras de tejido (espesor de 5 μm) teñidas con hematoxilina y eosina, tricrómico de Masson y azul de toluidina después de 10 días para cada grupo experimental tratado con diferentes concentraciones de Alantoína. Aumento: 40x.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

6.4.1.5 Fitostimoline®. El tratamiento tópico con Fitostimoline® (Figura 53) generó una reducción significativa en el número de mastocitos (Figura 54 A) y en el infiltrado inflamatorio (Figura 54 B) en comparación con el grupo control sin tratamiento ($p < 0,05$). Además, el grosor del estrato córneo fue significativamente menor en los grupos tratados respecto al control no tratado (Figura 54 D). En el análisis de colágeno mediante tinción tricrómica de Masson, se observó un incremento significativo en el porcentaje de píxeles azules por área ($p < 0,05$) (Figura 56).

Figura 53

Imágenes histológicas teñidas para grupos experimentales tratados con Fitostimoline®.

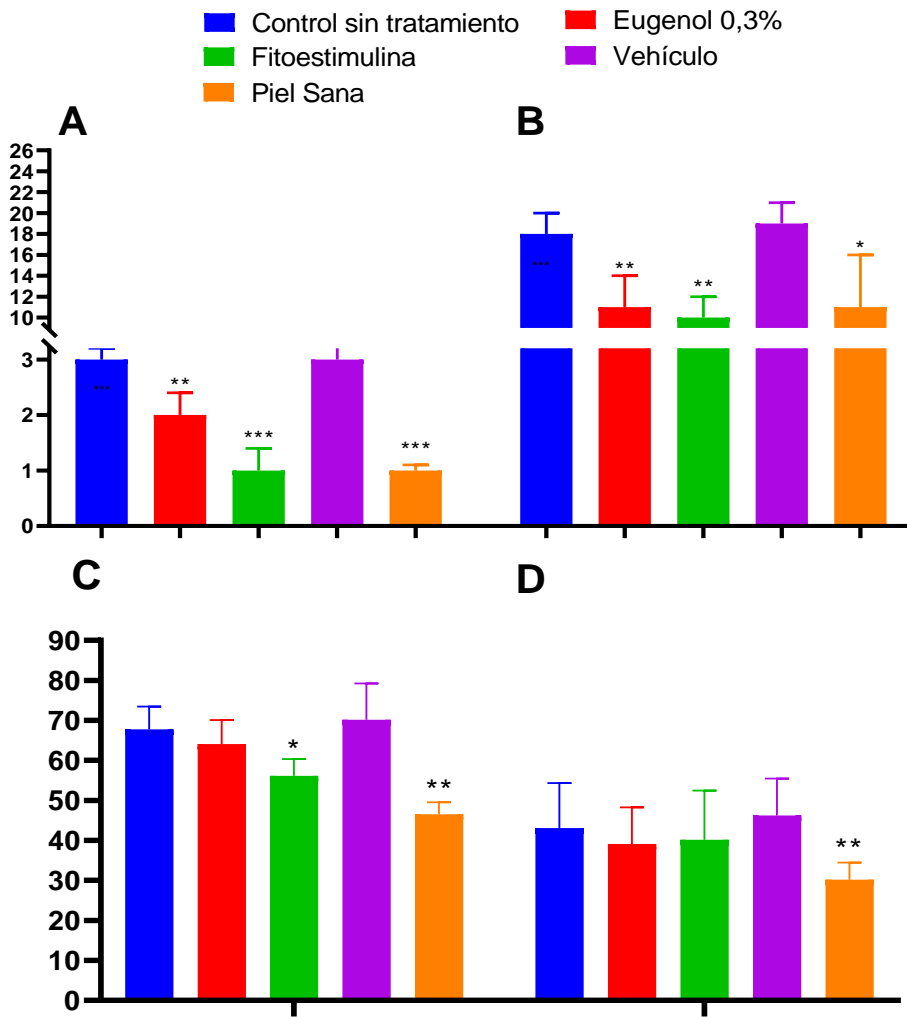
Hematoxilina y Eosina	Tricromica de Mason	Azul de toluidina
		
	Control sin tratamiento	
		
	Fitoestimuline®	
		
	Vehículo	

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE



Figura 54

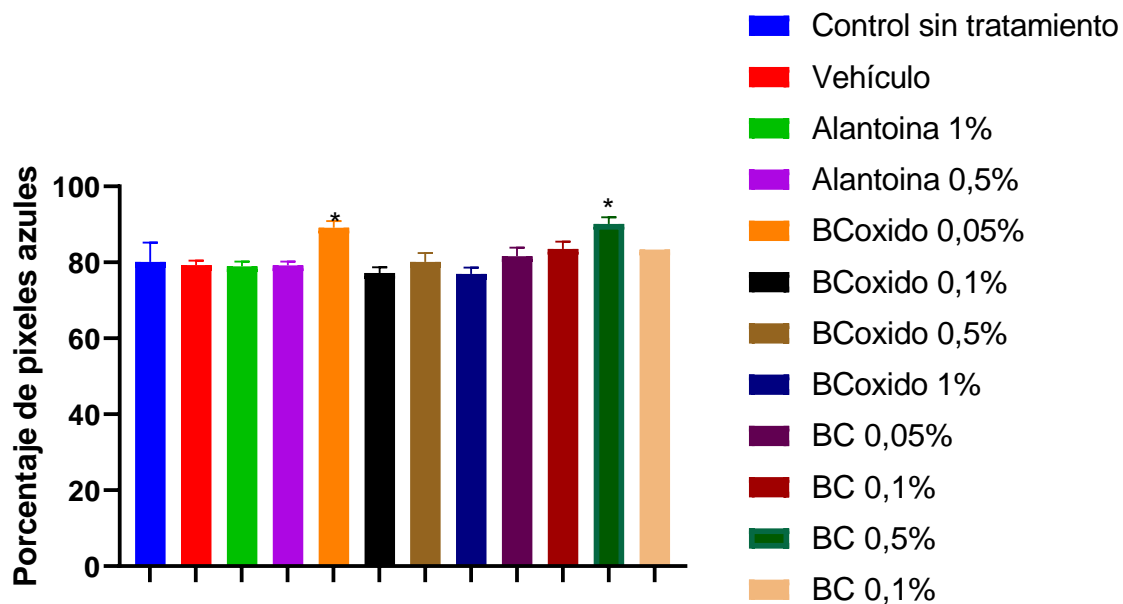
Análisis de imágenes microscópicas de biopsias al final del tratamiento con eugenol y controles.



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 55

Porcentaje de píxeles azules en tejidos teñidos con tricrómico de Masson tratados con BC y BCoxido

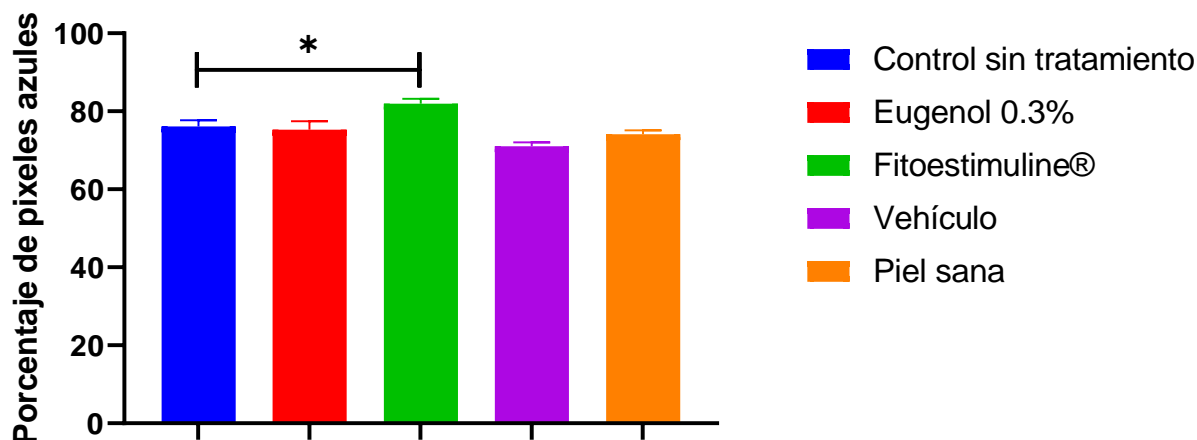


Nota: Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación estadística, con la prueba de Dunn para comparaciones múltiples entre el grupo no tratado y los demás grupos experimentales.

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Figura 56

Porcentaje de píxeles azules en tejidos teñidos con tricrómico de Masson tratados con eugenol



Nota: Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación estadística, con la prueba de Dunn para comparaciones múltiples entre el grupo no tratado y los demás grupos experimentales.

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

6.4.2 Niveles de citocinas en las lesiones excisionales de ratones BALB/c

Los niveles de citocinas IL-6, IL-1 y TNF- α y VEGF fueron más altos en los tejidos tratados con BC, BCoxido, alantoína y vehículo, así como en los no tratados en comparación con las muestras de piel normal, excepto por IL-1 en el día 10 (Figura 57 A-D). El tratamiento con alantoína redujo significativamente los niveles de IL-6 en los días 3 y 5 ($p < 0,05$), pero no tuvo un efecto significativo en otras citocinas o en VEGF. En contraste, la administración de 0,5% y 1% de BC resultó en una reducción significativa de los niveles de IL-6 en los días 3 y 5 ($p < 0,05$) (Figura 57 A). En los días 5 y 10, hubo una disminución significativa en los niveles de IL-1 β ($p < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados y no tratados (Figura 58 B).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

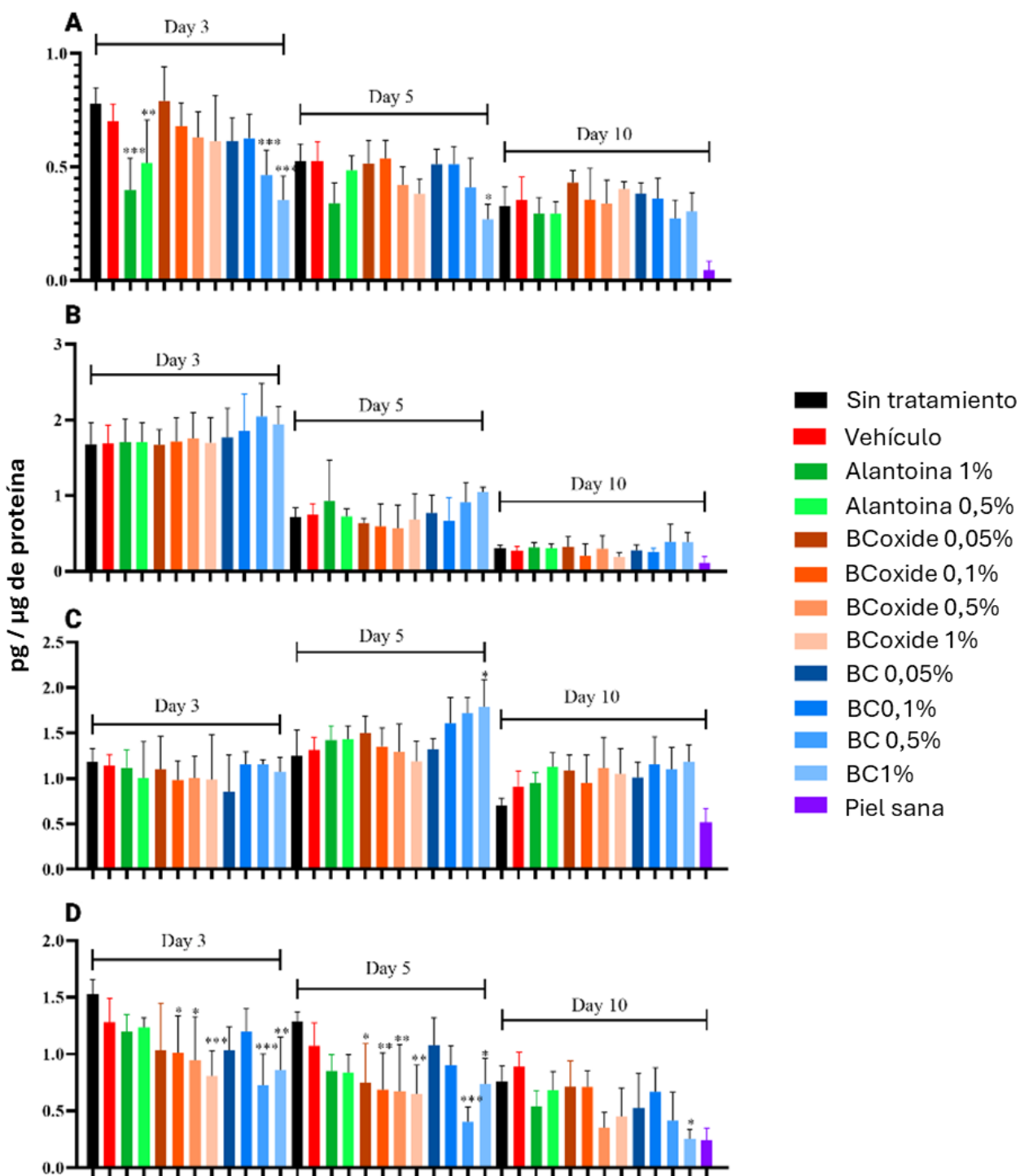
Tras el tratamiento con 1% BC, se observó un aumento significativo en los niveles de VEGF en el día 5 ($p < 0,05$). Sin embargo, para el día 10, los niveles habían disminuido (Figura 57 C). VEGF es un potente estimulador de procesos como la angiogénesis, la permeabilidad vascular, y el crecimiento, movimiento, diferenciación y supervivencia de las células endoteliales (Krishnaswamy et al., 2017).

El estudio reveló una disminución constante en los niveles de TNF- α en todos los días ($p < 0,05$) con el tratamiento con 1% BC (Figura 57 D). Además, el tratamiento con 0,1% y 0,5% Bcoxide resultó en una reducción de los niveles de TNF- α en los días 3 y 5 ($p < 0,05$). TNF- α es una citocina que se considera un objetivo terapéutico en casos de cicatrización alterada de heridas (Ashcroft et al., 2012).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 57

Niveles de citoquinas tisulares en tejidos de lesión



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Nota. (A. IL-6, B. IL-1, C. VEGF, D. TNF- α). Niveles de las moléculas después del tratamiento (días 3, 5 y 10) en el modelo de cicatrización de heridas en ratones. Se utilizaron piel normal y piel no tratada como controles. Los niveles se determinaron mediante ELISA en homogeneizados de tejido (pg/ μ g de proteína). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (SD). Alantoína (control positivo), Bcoxide = óxido de cariofileno, BC = β -cariofileno. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación estadística, con la prueba de Dunn para comparaciones múltiples entre el grupo no tratado y los demás grupos experimentales en los días 3, 5 y 10. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

6.5 Discusión

El tratamiento con BC se asoció con una disminución significativa en el número de mastocitos y la infiltración celular en el tejido, disminuyendo la celularidad al final del tratamiento. Esta reducción de mastocitos se ha relacionado directamente con una menor formación de cicatrices hipertróficas o queloides, tal como lo describe Syed et al. (2013). En modelos murinos, la aplicación tópica de BC ha estimulado la proliferación y migración de fibroblastos y queratinocitos, promoviendo una deposición abundante y ordenada de fibras de colágeno (Koyama et al., 2019). Adicionalmente, estudios previos en ratas tratadas con emulgel de BC al 1% evidenciaron un aumento temprano del colágeno (día 3), aunque para el día 14 los niveles se igualaron con los controles (Gushiken et al., 2022).

A nivel molecular, BC mostró un efecto regulador sobre mediadores clave de la reparación tisular. El aumento de los niveles de VEGF observado tras el tratamiento podría estar vinculado a la estimulación de la angiogénesis, aunque este incremento fue modesto (1,5 veces respecto al control) y probablemente insuficiente para catalogarlo como factor angiogénico principal. Más relevante fue la modulación de IL-6, ya que su reducción favorece la resolución inflamatoria, el

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

reclutamiento y polarización de macrófagos, y la proliferación de células reparativas, mejorando la calidad de la cicatriz y reduciendo el riesgo de fibrosis (Johnson et al., 2020).

Asimismo, la capacidad de BC para disminuir los niveles de TNF- α ha sido reportada en otros modelos, incluidos ratas diabéticas, donde su administración oral redujo TNF- α plasmático y tisular, mejorando la función de las células β pancreáticas y disminuyendo el estrés oxidativo (Hashiesh et al., 2020). Sin embargo, respecto a IL-1 β , los hallazgos no han sido consistentes en todos los modelos. En fibroblastos primarios de pterigión humano, Viveiros et al. (2022) expusieron células a β -cariofileno a concentraciones de hasta 25 μ mol/L. Luego, midieron los niveles de IL-1 β , en el medio de cultivo por ELISA a las 12, 24 y 48 h. Los niveles de IL-1 β (así como IL-8, IL-10 y TNF- α) permanecieron muy bajos y sin variaciones estadísticas tras el tratamiento.

El efecto positivo sobre el depósito de colágeno observado en este trabajo es concordante con lo reportado por Shan et al. (2017), quienes demostraron que BC incrementa la síntesis de colágeno y la actividad osteoblástica en células MC3T3-E1, favoreciendo la reparación y mantenimiento del tejido conectivo. De manera complementaria, Gushiken et al. (2022) reportaron que, en ratas Wistar con heridas excisionales, la aplicación tópica de BC promovió la reepitelización, aumentó el colágeno dérmico (tinción de Masson), disminuyó citocinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) y elevó IL-10 y la actividad antioxidante, confirmando el doble papel del BC en la regulación inflamatoria y en la remodelación de la matriz extracelular.

El BCoxido, al igual que el BC, mostró acción antiinflamatoria significativa. experimentalmente, la aplicación tópica redujo tanto el número de mastocitos como la infiltración celular, con implicaciones directas en la mejoría de la calidad cicatricial. Estudios preclínicos han reportado que la administración intraperitoneal en modelos de inflamación aguda inducida por

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

carragenina de BCoxido, aislado de *Annona squamosa*, ejerce efectos anti inflamatorios redujo la inflamación de manera dosis-dependiente, mostrando una eficacia comparable a la del estándar (aspirina). Además, se evidenció actividad analgésica central y periférica, sugiriendo la participación de mecanismos múltiples en la modulación de la inflamación y el dolor (Chavan et al., 2010).

El tratamiento con eugenol resultó en una disminución en el número de mastocitos y un adelgazamiento del estrato córneo, lo que indica una atenuación de la respuesta inflamatoria aguda. Este hallazgo es coherente con la capacidad reportada del eugenol para inhibir la liberación de mediadores proinflamatorios, como histamina, leucotrienos y prostaglandinas (Barboza et al., 2018; Huang et al., 2015). Dicha modulación temprana de la inflamación establece un microambiente tisular más favorable para la proliferación fibroblástica y la síntesis ordenada de matriz extracelular (Bacci, 2022; Jiménez et al., 2021).

Desde el punto de vista inmunológico, se ha demostrado que el eugenol regula la producción de mediadores como TNF- α , IL-1 β , IL-4 e IL-6, principalmente mediante la inhibición de vías de señalización como NF- κ B y MAPK (Deepak et al., 2015; Yeh et al., 2011). En modelos de inflamación pulmonar inducida, el eugenol redujo el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos, disminuyó la expresión de TNF- α e inhibió la activación de NF- κ B, mejorando la estructura y función pulmonar (Huang et al., 2015). Estos efectos confirman el papel del eugenol como modulador de la inflamación y la respuesta inmune en el contexto de heridas.

La alantoina, utilizada como control positivo en este estudio, tiene una acción sobre la cicatrización asociada principalmente con la capacidad de promover la proliferación celular y el depósito ordenado de matriz extracelular, facilitando la transición de la fase inflamatoria a la proliferativa (Araújo et al., 2010; Han & Ceilley, 2017). Los resultados obtenidos mostraron que

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

el tratamiento con alantoína fue efectivo en la reducción temprana de los niveles de IL-6 durante las primeras etapas de la cicatrización, lo que sugiere un control parcial y selectivo del perfil inflamatorio. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en otros mediadores como VEGF o TNF- α . Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que han documentado la capacidad de la alantoína para mejorar la reepitelización, estimular la proliferación fibroblástica y contribuir a una mejor organización del colágeno, aunque su impacto sobre la angiogénesis y la modulación de citocinas es limitado en comparación con otros agentes pro-cicatrizantes (Araújo et al., 2010; Han & Ceilley, 2017; Tito et al., 2020).

La piel normal (no lesionada) mostró niveles inferiores de mastocitos, grosor de dermis y grosor de estrato corneo; así como menores niveles de citoquinas pro inflamatorias y VEGF. Un tratamiento capaz de acercarse a los parámetros de la piel sana se relacionaría más a la reparación fetal que a la cicatrización adulta, con una remodelación más rápida, menor inflamación e infiltración celular (Larson et al., 2010). En particular, el tratamiento con BC a concentraciones de 0,1% y 0,5% mostró el perfil más cercano a la cicatrización fetal, evidenciado por una reducción significativa de la respuesta inflamatoria, bajos niveles de mastocitos y citocinas proinflamatorias, así como un mayor porcentaje de colágeno depositado en el tejido reparado.

Entre los CDP evaluados, el BC fue el único que mostró diferencias significativas tanto en el aumento del depósito de colágeno como en la reducción de los niveles tisulares de IL-6 y TNF- α en el modelo de herida. El BC oxidado también disminuyó mastocitos y células inflamatorias y aumentó los depósitos de colágeno, mientras que su acción inflamatoria en los homogenizados se limitó a la disminución de TNF- α . Por su parte, el eugenol limitó su efecto a la reducción de mastocitos y adelgazamiento del estrato córneo, sin influir sobre los niveles de colágeno en el tejido.

6.6 Conclusión

- El tratamiento tópico con BC y BCoxido en heridas murinas reduce de manera significativa la infiltración de mastocitos y células inflamatorias, lo que favorece un microambiente antiinflamatorio óptimo para la reparación tisular.
- La aplicación de BC y BCoxido no produce alteraciones en el espesor de la epidermis, pero sí incrementa el espesor del estrato córneo a concentraciones de 0,1% y 0,5%, promueve una mayor deposición de fibras de colágeno en la dermis.
- El β -cariofileno demuestra un efecto inmunomodulador, evidenciado por la reducción de los niveles tisulares de IL-6 y TNF- α durante la fase inflamatoria y proliferativa de la cicatrización.
- El tratamiento con BC induce un incremento transitorio de VEGF en fases tempranas del proceso reparativo, sugiriendo un posible apoyo a la angiogénesis sin desencadenar una sobreestimulación prolongada.
- El eugenol al 0,3% modula el proceso reparativo al disminuir la infiltración de mastocitos y el grosor del estrato córneo, sin modificar de manera significativa la síntesis de colágeno ni el cierre macroscópico de la herida.
- El BC mostró un perfil de cicatrización con parámetros más similares a los de la piel normal, lo que indica procesos más reparativos que cicatrizantes: menor inflamación, menor celularidad y mejor remodelamiento tisular.

7 Conclusiones generales

A nivel *in silico*, siete metabolitos derivados de plantas presentaron interacciones estables y energéticamente favorables con dianas terapéuticas claves asociadas a la cicatrización, como

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

TNF- α , MMP-3, MMP-9, MMP-13 y VEGFR1. El eugenol destacó por su capacidad de establecer interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno con residuos esenciales en sitios activos, sugiriendo un potencial efecto multitarget en la modulación de procesos inflamatorios y angiogénicos. Estos hallazgos respaldan la relevancia biológica de estos compuestos y su potencial como candidatos para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en cicatrización cutánea.

A partir de los resultados obtenidos, se concluye que los compuestos derivados de plantas (CDPs) evaluados, en particular β -cariofileno, óxido de cariofileno y eugenol, presentan un perfil diferencial en su actividad procicatrizante, modulando de manera específica distintos aspectos del proceso reparativo cutáneo. La evaluación *in vivo* demostró que β -cariofileno y su óxido no exhiben citotoxicidad relevante en queratinocitos humanos HaCaT, y que únicamente β -cariofileno estimula la migración y proliferación celular. Por el contrario, el eugenol mostró una citotoxicidad moderada dependiente del tipo celular evaluado.

En el modelo murino de heridas excisionales, los tratamientos tópicos con los compuestos seleccionados no aceleraron significativamente el cierre macroscópico de las lesiones respecto a los controles, aunque se observaron modulaciones cualitativas relevantes en el proceso reparativo. Particularmente, el eugenol evidenció una acción antiinflamatoria caracterizada por la reducción de la infiltración de mastocitos y el adelgazamiento del estrato córneo, así como una regulación del microambiente tisular favorable para la re-epitelización. En el contexto de hiperglucemia, el uso de extracto de *Triticum vulgare* (Fitostimoline®) demostró mejoras significativas en la organización de colágeno, disminución del infiltrado inflamatorio y de los niveles de citocinas proinflamatorias, así como una reducción en el número de mastocitos, reafirmando su utilidad clínica potencial en heridas de difícil cicatrización.

8 Perspectivas

A partir de los hallazgos obtenidos en este trabajo, se abren diversas líneas de investigación que podrían fortalecer y ampliar el conocimiento sobre el uso de compuestos naturales de origen vegetal como agentes pro-cicatrizantes. En primer lugar, los resultados promisorios observados en modelos celulares y murinos sugieren la necesidad de avanzar hacia estudios clínicos controlados que validen la seguridad y eficacia de compuestos como el β -cariofileno y el eugenol en seres humanos, definiendo además las dosis y formulaciones más adecuadas para su aplicación en heridas agudas y crónicas. Asimismo, sería relevante explorar el potencial sinérgico entre diferentes compuestos derivados de plantas o su combinación con terapias convencionales, con el objetivo de optimizar la cicatrización y reducir complicaciones asociadas a la inflamación crónica. El desarrollo de nuevas formulaciones, como hidrogeles, sistemas nanoestructurados o apósitos inteligentes, representa otra perspectiva importante para mejorar la biodisponibilidad, la liberación controlada y la eficacia terapéutica de estos compuestos en el sitio de la lesión.

Por otro lado, es recomendable profundizar en los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la acción de los compuestos estudiados, mediante la integración de estudios ómicos y modelos tridimensionales de piel humana, lo que permitiría una comprensión más integral y traslacional de su efecto. Considerando la alta prevalencia de comorbilidades como la diabetes, futuras investigaciones también deberían validar la eficacia de estos agentes en modelos preclínicos de heridas complicadas acercándose así al contexto clínico real.

Referencias bibliográficas

Ab Rahman, M. R., Abdul Razak, F., & Mohd Bakri, M. (2014). Evaluation of wound closure activity of *Nigella sativa*, *Melastoma malabathricum*, *Pluchea indica*, and *Piper sarmentosum* extracts on scratched monolayer of human gingival fibroblasts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 190342.

Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213–1221.

Ågren, M. S., Schnabel, R., Christensen, L. H., & Mirastschijski, U. (2015). Tumor necrosis factor- α -accelerated degradation of type I collagen in human skin is associated with elevated matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 ex vivo. *European Journal of Cell Biology*, 94(1), 12–21.

Cao, Y., Harvey, B. P., Hong, F., Ruzek, M., Wang, J., Murphy, E. R., & Kaymakcalan, Z. (2021). Adalimumab Induces a Wound Healing Profile in Patients with Hidradenitis Suppurativa by Regulating Macrophage Differentiation and Matrix Metalloproteinase Expression. *The Journal of Investigative Dermatology*, 141(11), 2730-2740.e9.

Cao, Y., Sun, J., Qin, S., Zhou, Z., Xu, Y., & Liu, C. (2024). Advances and Challenges in Immune-Modulatory Biomaterials for Wound Healing Applications. *Pharmaceutics*, 16(8), 990.

Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19, 716-723.

Ali, M., Kwak, S. H., Byeon, J. Y., & Choi, H. J. (2023). In Vitro and In Vivo Evaluation of Epidermal Growth Factor (EGF) Loaded Alginate-Hyaluronic Acid (AlgHA) Microbeads System for Wound Healing. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(8).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Alonso, H., Bliznyuk, A. A., & Gready, J. E. (2006). Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Medicinal Research Reviews*, 26(5), 531–568.

Alsenani, F., Ashour, A. M., Alzubaidi, M. A., Azmy, A. F., Hetta, M. H., Abu-Baih, D. H., Elrehany, M. A., Zayed, A., Sayed, A. M., Abdelmohsen, U. R., & Elmaidomy, A. H. (2021). Wound Healing Metabolites from Peters' Elephant-Nose Fish Oil: An In Vivo Investigation Supported by In Vitro and In Silico Studies. *Marine Drugs*, 19(11).

Alvarez, O. M., Patel, M., Booker, J., & Markowitz, L. (2004). Effectiveness of a bi-layered cellular matrix in healing venous ulcers. *Wound Repair and Regeneration*, 12, 494-502.

Amalraj, A., Pius, A., Gopi, S., & Gopi, S. (2017). Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives – A review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(2), 205–233. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.05.005>

Andrade, J. I. A., Muxel, S. M., Zampieri, R. A., Laranjeira-Silva, M. F., Müller, K. E., Nerland, A. H., & Floeter-Winter, L. M. (2017). RNA-seq transcriptional profiling of *Leishmania amazonensis* reveals an arginase-dependent gene expression regulation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(8), e0006026.

Anuar, N. S., Zahid, N. Z. M., & Ghazali, A. R. (2008). The effect of *Carica papaya* leaf extract on wound healing in mice. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2, 371-374.

Araújo LU; Grabe-Guimarães, A. M. V. C. C. S.-B. N. M. (2010). Profile of wound healing process induced by allantoin. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 25(5), 460–466.

Arribas-López, E., Zand, N., Ojo, O., Snowden, M. J., & Kochhar, T. (2022). A Systematic Review of the Effect of *Centella asiatica* on Wound Healing. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(6), 3266.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Aschner, P. (2010). Epidemiología de la diabetes en Colombia. *Avances en Diabetología*, 26(2), 95–100.

Ashcroft, G. S., Horan, M. A., & Ferguson, M. W. J. (1997). Age-related differences in the temporal and spatial regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) in normal skin and acute cutaneous wounds. *British Journal of Dermatology*, 136, 1022-1029

Ashcroft, G. S., Jeong, M.-J., Ashworth, J. J., Hardman, M., Jin, W., Moutsopoulos, N., Wild, T., McCartney-Francis, N., Sim, D., McGrady, G., Song, X., & Wahl, S. M. (2012). Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 20(1), 38–49.

Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.-M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E. H., Rollinger, J. M., Schuster, D., Breuss, J. M., Bochkov, V., Mihovilovic, M. D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V. M., & Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1582–1614.

Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., Orhan, I. E., Banach, M., Rollinger, J. M., ... & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200–216.

Babich, H., Stern, A., & Borenfreund, E. (1993). Eugenol cytotoxicity evaluated with continuous cell lines. *Toxicology in vivo*.

Bahadur, S., & Fatima, S. (2024). Essential Oils of Some Potential Medicinal Plants and their Wound Healing Activities. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 25(14), 1818–1834.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Balachandran, P., Govindarajan, R., & Pushpangadan, P. (2023). A review of ethnomedicinal plants with wound healing activity. *Journal of Ethnopharmacology*, *154*, 989-1001.

Balekar, N., Katkam, N. G., Nakpheng, T., Srichana, T., & Somanabandhu, A. (2012). Wound healing potential of standardized extract of *Curcuma longa* in rats. *Pharmacognosy Research*, *4*, 197-204.

Barnett, K., Bell, C. J., McKnight, W., Dickey, W., Sharkey, K. A., & Wallace, J. L. (2000). Role of cyclooxygenase-2 in modulating gastric acid secretion in the normal and inflamed rat stomach. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*.

Berlanga-Acosta, J., Garcia-Ojalvo, A., Fernández-Montequin, J., Falcon-Cama, V., Acosta-Rivero, N., Guillen-Nieto, G., Pujol-Ferrer, M., Limonta-Fernandez, M., Ayala-Avila, M., & Eriksson, E. (2024). Epidermal Growth Factor Intralesional Delivery in Chronic Wounds: The Pioneer and Standalone Technique for Reversing Wound Chronicity and Promoting Sustainable Healing In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25, Issue 20).

Bermudez, D. M., Herdrich, B. J., Xu, J., Lind, R., Beason, D. P., Mitchell, M. E., Soslowsky, L. J., & Liechty, K. W. (2011). Impaired Biomechanical Properties of Diabetic Skin: Implications in Pathogenesis of Diabetic Wound Complications. *The American Journal of Pathology*, *178*(5), 2215–2223.

Bergant Suhodolčan, E., Lunder, T., & Mrhar, A. (2021). The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in chronic wounds and their potential as a therapeutic target. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*, 1331.

Biswas, T. K., & Mukherjee, B. (2003). Plant medicines of Indian origin for wound healing activity: A review. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, *2*(1), 25–39

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Blanco Tirado, C. B., Stashenko, E. E., Combariza, M. Y., & Martínez, J. R. (1995). Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 697(1–2), 501–513

Blomme, E. A. G., Chinn, K. S., Hardy, M. M., Casler, J. J., Kim, S. H., Opsahl, A. C., Hall, W. A., Trajkovic, D., Khan, K. N., & Tripp, C. S. (2003). Selective cyclooxygenase-2 inhibition does not affect the healing of cutaneous full-thickness incisional wounds in SKH-1 mice. *The British Journal of Dermatology*, 148(2), 211–223.

Bolla, S. R., Al-Subaie, A. M., Al-Jindan, R. Y., Balakrishna, J. P., Ravi, P. K., Veeraraghavan, V. P., ... & Surapaneni, K. M. (2019). *In vivo* wound healing potency of methanolic leaf extract of *Aristolochia saccata* is possibly mediated by its stimulatory effect on collagen-1 expression. *Heliyon*, 5(10), e02514.

Broughton, G., Janis, J. E., & Attinger, C. E. (2006). The basic science of wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117, 12S-34S.

Brown, G. L., Nanney, L. B., Griffen, J., Cramer, A. B., Yancey, J. M., Curtsinger, L. J., Holtzin, L., Schultz, G. S., Jurkiewicz, M. J., & Lynch, J. B. (1986). Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *The New England Journal of Medicine*, 321, 76-79.

Budovsky, A., Yarmolinsky, L., & Ben-Shabat, S. (2015). Effect of medicinal plants on wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 23(2), 171–183.

Buriti, B. M. A. de B., Figueiredo, P. L. B., Passos, M. F., & da Silva, J. K. R. (2024). Polymer-Based Wound Dressings Loaded with Essential Oil for the Treatment of Wounds: A Review. *Pharmaceuticals*, 17(7), 897.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Caley, M. P., Martins, V. L., & O'Toole, E. A. (2015). Metalloproteinases and wound healing. *Advances in Wound Care*, 4, 225-234.

Casadiegos, O., Macias, O., García, L., Sanabria-Chanaga, E., Baay-Guzmán, G. J., Mantilla, J. C., & Escobar, P. (2023). In-Silico Selection of Wound-Healing Plant Secondary Molecules and Their Pro-Healing Activities on Experimental Models. *Chemistry & Biodiversity*.

Della Pepa, G., Lombardi, G., Gianfrancesco, S., Piccolo, R., Chirico, G., Pellegrino, M., Santella, L., Tecce, N., Volpicelli, A., Sollo, E., Bozzetto, L., Masulli, M., Riccardi, G., Rivellese, A. A., & Saldalamacchia, G. (2023). Triticum vulgare Extract and Polyhexanide (Fitostimoline® Hydrogel/Fitostimoline® Plus Gauze) versus Saline Gauze Dressing in Patients with Diabetic Foot Ulcers: Results of a Randomized Controlled Trial. *Journal of Clinical Medicine*, 12(10), 3596.

Demidova-Rice, T. N., Hamblin, M. R., & Herman, I. M. (2012). Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Advances in Skin & Wound Care*, 25(7), 304–314.

Dong, M.-W., Li, M., Chen, J., Fu, T.-T., Lin, K.-Z., Ye, G.-H., Han, J.-G., Feng, X.-P., Li, X.-B., Yu, L.-S., & Fan, Y.-Y. (2016). Activation of $\alpha 7$ nAChR Promotes Diabetic Wound Healing by Suppressing AGE-Induced TNF- α Production. *Inflammation*, 39(2), 687–699.

Chattopadhyay, S., & Raines, R. T. (2014). Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*, 101, 821-833.

Chan, B. C. L., Ip, M., Lau, C. B. S., Lui, S. L., Jolivald, C., Ganem-Elbaz, C., Litaudon, M., Reiner, N. E., Gong, H., See, R. H., Fung, K. P., & Leung, P. C. (2011). Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against NorA over-expressed methicillin-resistant Staphylococcus

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

aureus (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 767–773.

Chang, S.-T., Chen, P.-F., & Chang, S.-C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(1), 123–127.

Chavan, M. J., Wakte, P. S., & Shinde, D. B. (2010). Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*, 17(2), 149–151.

Chen, L., & Parks, W. C. (2009). Role of matrix metalloproteinases in epithelial migration. *Journal of Cell Biochemistry*, 108, 1233-1243.

Criollo-Mendoza, E., Rivera, L., Mendoza, A., & Bolaños, L. (2023). Cutaneous wound healing: From bench to bedside. *Journal of Wound Care*, 32, 342-357.

Dashti, S., Hashemzadeh, S., & Raeeszadeh, M. (2024). The effect of eugenol on wound healing and tissue repair: a systematic review. *Journal of Herbal Medicine*, 46, 100535.

Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines*, 3, 25.

Dhivya, S., Padma, V. V., & Santhini, E. (2015). Wound dressings—a review. *BioMedicine*, 5, 24.

Dinda, B., Debnath, S., Banik, R., & Saha, S. (2015). Therapeutic potential of flavonoids in wound healing. *Natural Product Research*, 29, 1297-1307.

Dinh, T., & Veves, A. (2005). The diabetic foot: pathophysiology and evaluation. In *The foot in diabetes* (pp. 37-44). John Wiley & Sons, Ltd.

Doble, B. W., & Woodgett, J. R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 7), 1175–1186.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Dong, L., Yin, L., Zhang, Y., Fu, X., & Yu, L. (2020). The protective effect of β -caryophyllene on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in mice is associated with inhibition of oxidative stress and inflammatory response. *International Immunopharmacology*, *82*, 106357.

Dokun, A. O., Chen, L., Lanjewar, S. S., Lye, R. J., & Annex, B. H. (2014). Glycaemic control improves perfusion recovery and VEGFR2 protein expression in diabetic mice following experimental PAD. *Cardiovascular Research*, *101*(3), 364–372.

Eo, H., Lee, H.-J., & Lim, Y. (2016). Ameliorative effect of dietary genistein on diabetes induced hyper-inflammation and oxidative stress during early stage of wound healing in alloxan induced diabetic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *478*(3), 1021–1027.

Eming, S. A., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*, *6*, 265sr6.

Farinella, E., Bertona, L., Manca, M., & Esposito, G. (1986). The effect of a topical treatment with Fitostimoline® on wound healing: a histological and histochemical study. *Minerva Chirurgica*, *41*, 1055-1062.

Ferrara, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, *9*, 669-676.

Fidy, K., Fiedorowicz, A., Strzdała, L., & Szumny, A. (2016). β -Caryophyllene and β -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Medicine*, *5*(10), 3007–3017.

Firdous, S., & Sautya, D. (2018). Integrative medicine in wound management: A comprehensive review. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, *9*, 1-11.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Frykberg, R. G., & Banks, J. (2015). Challenges in the treatment of chronic wounds. *Advances in Wound Care*, 4, 560-582.

Fujita, K., Ichimura, T., & Nomura, T. (2005). Antibacterial mechanism of action of eugenol against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 174-178.

Gallucci, R. M., Sloan, D. K., Heck, D. E., & Laskin, D. L. (2000). Role of cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 8, 222-230.

Gharaboghaz, M. N. zadeh, Farahpour, M. R., & Saghaie, S. (2020). Topical co-administration of *Teucrium polium* hydroethanolic extract and Aloe vera gel triggered wound healing by accelerating cell proliferation in diabetic mouse model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 127, 110189,

Giostri, G. S., Novak, E. M., Buzzi, M., & Guarita-Souza, L. C. (2022). Treatment of acute wounds in hand with *Calendula officinalis* L.: A randomized trial. *Tissue Barriers*, 10(3).

Gill, S. E., & Parks, W. C. (2008). Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40, 1334-1347.

Givol, O., Kornhaber, R., Visentin, D., Cleary, M., Haik, J., & Harats, M. (2019). A systematic review of *Calendula officinalis* extract for wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 27(5), 548–561.

Goldberg, S. R., Diegelmann, R. F., & Yager, D. R. (2007). The dual role of tumor necrosis factor in wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 8, 1344-1356.

Golezar, S., Farmani, F., & Zare, H. (2016). Enzyme therapy for wound healing: Current perspectives and future directions. *Wound Medicine*, 13, 20-26.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Grellner, W., Georg, T., & Wilske, J. (2000). Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) in human skin wounds. *Forensic Science International*, 113(1-3), 251-264.

Guo, S., & Dipietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, 89, 219-229.

Halim, A. S., Khoo, T. L., & Mat, A. Z. (2012). Wound bed preparation from a clinical perspective. In *Indian Journal of Plastic Surgery* (Vol. 45, Issue 2, pp. 193-202).

Han, Y., Sun, Q., Wang, B., Li, X., & Wang, D. (2001). Effects of tumor necrosis factor-alpha on wound healing in diabetic rats. *International Journal of Molecular Medicine*, 8, 517-520.

Hantke, B., Milner, C. M., & Day, A. J. (2002). Matrix metalloproteinases: key regulators of wound healing and tissue remodeling. *Trends in Molecular Medicine*, 8, 517-523.

Hardwicke, J., Schmaljohann, D., Boyce, D., & Thomas, D. (2008). Epidermal growth factor therapy and wound healing - Past, present and future perspectives. In *Surgeon* (Vol. 6, Issue 3, pp. 172-177). Edinburgh University Press.

Harish, B. G., Krishna, V., Santosh Kumar, H. S., Khadeer Ahamed, B. M., Sharath, R., & Kumara Swamy, H. M. (2008). Wound healing activity and docking of glycogen-synthase-kinase-3-beta-protein with isolated triterpenoid lupeol in rats. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 15(9), 763-767.

Harsch, I. A., Brzozowski, T., Bazela, K., Konturek, S. J., Kukharsky, V., Pawlik, T., Pawlowski, E., Hahn, E. G., & Konturek, P. C. (2003). Impaired gastric ulcer healing in diabetic rats: role of heat shock protein, growth factors, prostaglandins and proinflammatory cytokines. *European Journal of Pharmacology*, 481(2-3), 249-260.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Holstad, M., & Sandler, S. (2001). A Transcriptional Inhibitor of TNF- α Prevents Diabetes Induced by Multiple Low-Dose Streptozotocin Injections in Mice. *Journal of Autoimmunity*, 16(4), 441–447.

Hong, J. P., Jung, H. D., & Kim, Y. W. (2006). Recombinant Human Epidermal Growth Factor (EGF) to Enhance Healing for Diabetic Foot Ulcers. *Annals of Plastic Surgery*, 56(4). https://journals.lww.com/annalsplasticsurgery/fulltext/2006/04000/recombinant_human_epidermal_growth_factor__egf__to.12.aspx

Hu, Y., Liang, D., Li, X., Liu, H.-H., Zhang, X., Zheng, M., Dill, D., Shi, X., Qiao, Y., Carvalho, B., Angst, M., Clark, J., & Peltz, G. (2010). The Role of Interleukin-1 in Wound Biology. Part II: In Vivo and Human Translational Studies. *Anesthesia and Analgesia*, 111, 1534–1542.

Huang, Y., Ejiofor, J. I., & Yakubu, M. I. (2018). Acute and chronic toxicity profiles of the methanol leaf extract of *Acacia ataxacantha* D.C (Leguminosae) in Wistar rats. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*.

Huang, Y.-W., Zhu, Q.-Q., Yang, X.-Y., Xu, H.-H., Sun, B., Wang, X.-J., & Sheng, J. (2019). Wound healing can be improved by (—)-epigallocatechin gallate through targeting Notch in streptozotocin-induced diabetic mice. *The FASEB Journal*, 33(1), 953–964.

Ibarra-Berumen, J., Ordaz-Pichardo, C., & Rosales-Castro, M. (2023). Phenolic and antioxidant evaluation in *Prosopis laevigata* wood and *Acrocarpus fraxinifolius* bark. *Madera y Bosques*, 29(2).

Irani, P. S., Ranjbar, H., Mehdipour-Rabori, R., Torkaman, M., Amirsalari, S., & Alazmani-Noodeh, F. (2024). The Effect of Aloe vera on the Healing of Diabetic Foot Ulcer: A Randomized, Double-blind Clinical Trial. *Current Drug Discovery Technologies*, 21(3).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Jardim, M. S., Sousa, A. A., Santos, M. P., & Silva, D. F. (2015). Curcumin in wound healing: a systematic review. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *135*, 827-835.

Jensen, G. S., Beaman, J. L., & He, Y. (2015). Effects of aloe vera on wound healing in diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *168*, 212-219.

Jere, S. W., Houreld, N. N., & Abrahamse, H. (2019). Role of the PI3K/AKT (mTOR and GSK3 β) signalling pathway and photobiomodulation in diabetic wound healing. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *50*, 52–59.

Jetten, N., Roumans, N., Gijbels, M. J., Romano, A., Post, M. J., de Winther, M. P. J., van der Hulst, R. R. W. J., & Xanthoulea, S. (2014). Wound administration of M2-polarized macrophages does not improve murine cutaneous healing responses. *PloS One*, *9*(7), e102994.

Jiménez, M., Cervantes-García, D., Córdova-Dávalos, L. E., Pérez-Rodríguez, M. J., Gonzalez-Espinosa, C., & Salinas, E. (2021). Responses of mast cells to pathogens: Beneficial and detrimental roles. *Frontiers in Immunology*, *12*, 685865

Johnson, B. Z., Stevenson, A. W., Prêle, C. M., Fear, M. W., & Wood, F. M. (2020). The role of IL-6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing. *Biomedicines*, *8*(5).

Jones, R. E., Foster, D. S., & Longaker, M. T. (2018). Management of chronic wounds—2018. *JAMA*, *320*, 1481-1482.

Kapoor, M., Liu, S., Shi-wen, X., Huh, K., McCann, M., Denton, C. P., Woodgett, J. R., Abraham, D. J., & Leask, A. (2008). GSK-3 β in mouse fibroblasts controls wound healing and fibrosis through an endothelin-1-dependent mechanism. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(10), 3279–3290.

Karami, M., Ebrahimi, S. A., & Khorramizadeh, M. R. (2013). Thymol-loaded nanofibers for wound healing applications. *Materials Science and Engineering: C*, *33*, 3991-3998.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Kitamura, M., Akamatsu, M., Machigashira, M., Hara, Y., Sakagami, R., Hirofuji, T., Hamachi, T., Maeda, K., Yokota, M., Kido, J., Nagata, T., Kurihara, H., Takashiba, S., Sibutani, T., Fukuda, M., Noguchi, T., Yamazaki, K., Yoshie, H., Ioroi, K., ... Murakami, S. (2011). FGF-2 stimulates periodontal regeneration. *Journal of Dental Research*, *90*(1), 35–40.

Khan, A., Kihara, M., Omoloso, A. D., & Dash, P. R. (2006). Piperine, a major alkaloid of black pepper, inhibits oxidative stress and inflammatory responses. *Food Chemistry*, *102*, 1727-1736.

Koike, Y., Yozaki, M., Utani, A., & Murota, H. (2020). Fibroblast growth factor 2 accelerates the epithelial–mesenchymal transition in keratinocytes during wound healing process. *Scientific Reports*, *10*(1), 18545.

Koyama, T., Omura, S., & Koyama, T. (2019). Chemical composition and wound healing activity of essential oil from *Lavandula angustifolia*. *Natural Product Research*, *33*, 2456-2460.

Krieger, E., & Vriend, G. (2014). YASARA View—molecular graphics for all devices—from smartphones to workstations. *Bioinformatics*, *30*(20), 2981–2982

Krishnaswamy, V. R., Mintz, D., & Sagi, I. (2017). Matrix metalloproteinases: The sculptors of chronic cutaneous wounds. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*.

Krzyszczuk, P., Schloss, R., Palmer, A., & Berthiaume, F. (2018). The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Frontiers in Physiology*, *9*, 419. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00419>

Kulac, M., Aktas, C., Tulubas, F., Uygur, R., Kanter, M., Erboğa, M., & Topcu, B. (2013). The effects of topical curcumin on wound healing in a rat model. *Acta Cirurgica Brasileira*, *28*, 38-43.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Kusuhara, H., Itani, Y., Isogai, N., & Tabata, Y. (2011). Randomized controlled trial of the application of topical b-FGF-impregnated gelatin microspheres to improve tissue survival in subzone II fingertip amputations. *The Journal of Hand Surgery, European Volume*, 36, 455–460.

Laato, M., Heino, J., Kahari, V.-M., Niinikoski, J., & Gerdin, B. (1989). Epidermal Growth Factor (EGF) Prevents Methylprednisolone-Induced Inhibition of Wound Healing. In *JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH* (Vol. 47).

Latifi-Pupovci, H., Kuçi, Z., Wehner, S., Bönig, H., Lieberz, R., Klingebiel, T., Bader, P., & Kuçi, S. (2015). In vitro migration and proliferation (“wound healing”) potential of mesenchymal stromal cells generated from human CD271+ bone marrow mononuclear cells. *Journal of Translational Medicine*, 13(1), 315.

Lee, E. G., Luckett-Chastain, L. R., Calhoun, K. N., Frempah, B., Bastian, A., & Gallucci, R. M. (2019). Interleukin 6 Function in the Skin and Isolated Keratinocytes Is Modulated by Hyperglycemia. *Journal of Immunology Research*, 2019, 5087847.

Li, M., Li, F., Wang, T., Zhao, L., & Shi, Y. (2019). Fabrication of carboxymethylcellulose hydrogel containing β -cyclodextrin–eugenol inclusion complexes for promoting diabetic wound healing. *Journal of Biomaterials Applications*, 34, 088532821987325.

Li, K., Tay, F. R., & Yiu, C. K. Y. (2020). The past, present and future perspectives of matrix metalloproteinase inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*, 207, 107465.

Lien, H. T., Lin, Y. C., & Tsai, S. C. (2015). Piper betle leaf extract promotes wound healing in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 175, 113-124.

Lin, T.-K., Zhong, L., & Santiago, J. L. (2017). Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Goto, H., & Lindoso, J. A. L. (2012). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), 293–307

MacLeod, A. S., & Mansbridge, J. N. (2016). The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*, 5(2), 65–78.

Macleod, J., Smith, L., & Jones, R. (2021). The Role of IL-1 in Tissue Injury and Repair. *Journal of Inflammation Research*, 14, 123–136. <https://doi.org/10.1016/j.jir.2021.03.015>

Mahmood, T., Akhtar, N., & Khan, B. A. (2015). The morphology, characteristics, and medicinal properties of *Curcuma longa* Linn. (Zingiberaceae). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6, 895-902.

Manfredi, M. (2007). Essential oils in wound healing. *Journal of Wound Care*, 16, 247-250.

Martin, P., & Nunan, R. (2015). Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *British Journal of Dermatology*, 173, 370-378.

Masyita, A., Mustika Sari, R., Dwi Astuti, A., Yasir, B., Rahma Rumata, N., Emran, T. bin, Nainu, F., & Simal-Gandara, J. (2022). Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chemistry: X*, 13, 100217.

Mauviel, A., Temime, N., Charron, D., Loyau, G., & Pujol, J.-P. (1991). Induction of interleukin-1 β production in human dermal fibroblasts by interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α . Involvement of protein kinase-dependent and adenylate cyclase-dependent regulatory pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*, 47(2), 174–183.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Medeiros, F. F., da Costa, J. P., Nascimento, A. M., Fernandes, M. G., & de Oliveira, F. R. (2023). Lippia sidoides essential oil promotes wound healing in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *300*, 115759.

Mohan, R., Chintala, S. K., Jung, J. C., Villar, W. V., McCabe, F., Russo, L. A., ... & Fini, M. E. (2002). Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*, 2065-2072.

Morris, G. M., Huey, R., & Olson, A. J. (2009). Using AutoDock for ligand-receptor docking. *Current Protocols in Bioinformatics*, *24*, 8-14.

Murakami, Y., Kawata, A., Suzuki, S., & Fujisawa, S. (2003). Cytotoxicity and apoptosis induced by eugenol in human submandibular gland carcinoma cells and its antioxidant activity. *Toxicology*, *183*, 91-100.

Murakami, M., Zheng, Y., Hirashima, M., Suda, T., Morita, Y., Oechara, J., Ema, H., Fong, G.-H., & Shibuya, M. (2008). VEGFR1 tyrosine kinase signaling promotes lymphangiogenesis as well as angiogenesis indirectly via macrophage recruitment. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *28*(4), 658–664.

Mustafa, S., Ahmed, S., & Ahmed, I. (2023). Network pharmacology and molecular docking approaches for drug repurposing in wound healing. *Molecular Diversity*, *27*, 541-555.

Nagavalli, V., Kumar, A. R., & Divya, S. (2023). Docking studies of phytochemicals with wound healing proteins. *Computational Biology and Chemistry*, *101*, 107797.

Nascimento, A. S. do, Tamiasso, R. S. S., Morais, S. F. M., Gnatta, J. R., Turrini, R. N. T., Calache, A. L. S. C., & Poveda, V. de B. (2022). Essential oils for healing and/or preventing infection of surgical wounds: a systematic review. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, *56*, e20210348.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770–803.

Nunan, R., Harding, K. G., & Martin, P. (2014). Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Disease Models & Mechanisms*, 7, 1205-1213.

Nussbaum, S. R., Carter, M. J., Fife, C. E., DaVanzo, J., Haught, R., Nusgart, M., & Cartwright, D. (2018). An economic evaluation of the impact, cost, and Medicare policy implications of chronic nonhealing wounds. *Value in Health*, 21, 27-32.

Oldham, P., Hall, S., & Forero, O. (2013). Biological Diversity in the Patent System. *PLoS ONE*, 8(11), e78737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078737>

Oryan, A., Naeini, A. T., Nikahval, B., & Gorji, A. (2010). Effect of aqueous extract of Aloe vera on experimental cutaneous wound healing in rat. *Veterinary Medicine International*, 2010, 1-6.

Okizaki, S., Ito, Y., Hosono, K., Oba, K., Ohkubo, H., Kojo, K., Nishizawa, N., Shibuya, M., Shichiri, M., & Majima, M. (2016). Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Type-1 Signaling Prevents Delayed Wound Healing in Diabetes by Attenuating the Production of IL-1 β ; Recruited Macrophages. *The American Journal of Pathology*, 186(6), 1481–1498.

Panayi, A. C., Leavitt, T., & Orgill, D. P. (2017). Evidence based review of negative pressure wound therapy. *World Journal of Dermatology*, 6(1), 1.

Paramesha, M., Ramesh, C. K., Krishna, V., Kumar Swamy, H. M., Aditya Rao, S. J., & Hoskerri, J. (2015). Effect of dehydroabietylamine in angiogenesis and GSK3- β inhibition during wound healing activity in rats. *Medicinal Chemistry Research*, 24(1), 295–303.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Parente, L. M. L., Lino Júnior, R. S., Tresvenzol, L. M. F., Vinaud, M. C., de Paula, J. R., & Paulo, N. M. (2011). Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1-7.

Parisotto-Peterle, J., Bidone, J., Lucca, L. G., Araújo, G. de M. S., Falkembach, M. C., da Silva Marques, M., Horn, A. P., dos Santos, M. K., da Veiga, V. F., Limberger, R. P., Teixeira, H. F., Dora, C. L., & Koester, L. S. (2020). Healing activity of hydrogel containing nanoemulsified β -caryophyllene. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 148, 105318.

Pereira, R. F., & Bártolo, P. J. (2016). Traditional therapies for skin wound healing. *Advances in Wound Care*, 5, 208-229.

Machado, P. R. L., & Penna, G. (2012). Miltefosine and cutaneous leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 25(2), 141–144.

Picciolo, G., Pallio, G., Altavilla, D., Vaccaro, M., Oteri, G., Irrera, N., & Squadrito, F. (2020). β -Caryophyllene reduces the inflammatory phenotype of periodontal cells by targeting CB₂ receptors. *Biomedicines*, 8(6), 164.

Qing, C. (2017). The molecular biology in wound healing & non-healing wound. *Chinese Journal of Traumatology*, 20, 189-193.

Raziyeva, K., Kim, Y., Zharkinbekov, Z., Kassymbek, K., Jimi, S., Saparov, A. (2021). Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*, 11, 700.

Romana-Souza, B., dos Santos, J. S., Bandeira, L. G., & Monte-Alto-Costa, A. (2016). Selective inhibition of COX-2 improves cutaneous wound healing of pressure ulcers in mice through reduction of iNOS expression. *Life Sciences*, 153, 82–92.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Romanelli, M., Michela, M., Panduri, S., Battistino, P., Saponati, G., & Dini, V. (2015). Clinical evaluation of the efficacy and safety of a medical device in various forms containing *Triticum vulgare* for the treatment of venous leg ulcers – A randomized pilot study. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 2787.

Romero-Cerecero, O., Zamilpa, A., Tapia, M., Díaz, A., Aguilar-Santamaría, L., & Navarrete, A. (2017). *Ageratina pichinchensis* extract: An effective treatment for venous leg ulceration. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 291-298.

Saleem, U., Khalid, S., Zaib, S., Anwar, F., Akhtar, M. F., Hussain, L., Saleem, A., & Ahmad, B. (2022). Wound Healing Potential and In Silico Appraisal of *Convolvulus arvensis* L. Methanolic Extract. *BioMed Research International*, 2022, 1373160.

Sato, T., Amano, H., Ito, Y., Eshima, K., Minamino, T., Ae, T., Katada, C., Ohno, T., Hosono, K., Suzuki, T., Shibuya, M., Koizumi, W., & Majima, M. (2014). Vascular endothelial growth factor receptor 1 signaling facilitates gastric ulcer healing and angiogenesis through the upregulation of epidermal growth factor expression on VEGFR1+CXCR4 + cells recruited from bone marrow. *Journal of Gastroenterology*, 49(3), 455–469.

Santos, S. C. R., Miguel, C., Domingues, I., Calado, A., Zhu, Z., Wu, Y., & Dias, S. (2007). VEGF and VEGFR-2 (KDR) internalization is required for endothelial recovery during wound healing. *Experimental Cell Research*, 313(8), 1561–1574.

Santos, L. H. S., Ferreira, R. S., & Caffarena, E. R. (2019). Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2053, 13–34.

Selmi, S., Rtibi, K., Hosni, K., & Sebai, H. (2022). *Essential Oil, Chemical Compositions, and Therapeutic Potential*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102447>

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Seow, Y. X., Yeo, C. R., Chung, H. L., & Yuk, H. G. (2014). Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 625-644.

Seyed Ahmadi, S. G., Farahpour, M. R., & Hamishehkar, H. (2019). Topical application of Cinnamon verum essential oil accelerates infected wound healing process by increasing tissue antioxidant capacity and keratin biosynthesis. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 35(11), 686–694.

Song, N., Zhao, Z., Ma, X., Sun, X., Ma, J., Li, F., Sun, L., & Lv, J. (2017). Naringin promotes fracture healing through stimulation of angiogenesis by regulating the VEGF/VEGFR-2 signaling pathway in osteoporotic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 261, 11–17.

Shady, N. H., Mostafa, N. M., Fayez, S., Abdel-Rahman, I. M., Maher, S. A., Zayed, A., Saber, E. A., Khowdiary, M. M., Elrehany, M. A., Alzubaidi, M. A., Altemani, F. H., Shawky, A. M., & Abdelmohsen, U. R. (2022). Mechanistic Wound Healing and Antioxidant Potential of Moringa oleifera Seeds Extract Supported by Metabolic Profiling, In Silico Network Design, Molecular Docking, and In Vivo Studies. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(9).

Shaaban, H. A., El-Ghorab, A. H., Shibamoto, T., & Dejbakhsh, T. (2012). Chemical composition and biological activity of essential oils. *Food Research International*, 48, 234-240.

Shahzad, M. N., & Ahmed, N. (2013). Effectiveness of Aloe Vera Gel compared with 1% silver sulphadiazine cream as burn wound dressing in second degree burns. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 63(2), 225–230.

Shin, S. H., Koh, Y. G., Lee, W. G., Seok, J., & Park, K. Y. (2023). The use of epidermal growth factor in dermatological practice. In *International Wound Journal* (Vol. 20, Issue 6, pp. 2414–2423). John Wiley and Sons Inc.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Sahni, A., Khorana, A. A., Baggs, R. B., Peng, H., & Francis, C. W. (2006). FGF-2 binding to fibrin(ogen) is required for augmented angiogenesis. *Blood*, *107*(1), 126–131.

Shinozaki, M., Okada, Y., Kitano, A., & Yamanaka, N. (2009). Tumor necrosis factor-alpha regulates wound healing and skin carcinogenesis. *Journal of Dermatological Science*, *54*, 205-213.

Silva, S., Costa, C., Gelfuso, G., Guerra, E., Nóbrega, Y., Sueli Maria, G., Pic-Taylor, A., Fonseca, Y., Silveira, D., & Magalhães, P. (2019). Wound healing effect of essential oil extracted from *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) leaves. *Molecules*, *24*(1), 2.

Singer, A. J., & Clark, R. A. F. (1999). Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine*, *341*, 738-746.

Singh, A., Mishra, A., Verma, S., Purohit, V., & Goel, R. (2014). Regulation of wound strength by *Ocimum sanctum*: *In silico* and in vivo evidences. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, *3*(1), 179.

Solórzano-Santos, F., & Miranda-Novales, M. G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, *23*(2), 136–141..

Stashenko, E., Martínez, J. R., & Blanco-Tirado, C. (2004). Essential oils and their chemical composition. *Chemistry & Biodiversity*, *1*, 881-907.

Summer, D. S., Saleh, A. A., Hayashi, T., & Denning, G. M. (2024). Matrix remodeling in wound healing and disease. *Journal of Cellular Biochemistry*, *125*, 23-37.

Sundar, S., Sinha, P. K., Rai, M., Verma, D. K., Nawin, K., Alam, S., Chakravarty, J., Vaillant, M., Verma, N., Pandey, K., Kumari, P., Lal, C. S., Arora, R., Sharma, B., Ellis, S., Strub-Wourgaft, N., Balasegaram, M., Olliaro, P., Das, P., & Modabber, F. (2011). Comparison of

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *The Lancet*, 377(9764), 477–486.

Tan, J. L., Lash, B., Karami, R., Nayer, B., Lu, Y.-Z., Piotto, C., Julier, Z., & Martino, M. M. (2021). Restoration of the healing microenvironment in diabetic wounds with matrix-binding IL-1 receptor antagonist. *Communications Biology*, 4(1), 422.

Tevanov, I., Enescu, D. M., Bălănescu, R., Sterian, G., & Ulici, A. (2016). Negative Pressure Wound Therapy (NPWT) to Treat Complex Defect of the Leg after Electrical Burn. *Chirurgia (Bucharest, Romania : 1990)*, 111(2), 175–179.

Tito, A., Carola, A., Bimonte, M., Barbulova, A., Zappelli, C., & Apone, F. (2020). Triticum vulgare extract: a new tool in wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 482.

Toriseva, M., Ala-aho, R., Peltonen, S., Karvinen, J., Laitinen, L., Grenman, R., ... & Kähäri, V. M. (2012). Matrix metalloproteinase-13 in wound healing and cancer progression. *Matrix Biology*, 31, 259-267.

Trepa, M., Sułkowska-Ziaja, K., Kała, K., & Muszyńska, B. (2024). Therapeutic potential of fungal terpenes and terpenoids: Application in skin diseases. *Molecules*, 29(5), 1183

Yan, C., Gao, N., Sun, H., Yin, J., Lee, P., Zhou, L., Fan, X., & Yu, F.-S. (2016). Targeting Imbalance between IL-1 and IL-1 Receptor Antagonist Ameliorates Delayed Epithelium Wound Healing in Diabetic Mouse Corneas. *The American Journal of Pathology*, 186(6), 1466–1480.

Upadhyay, R. K., Kumar, R., & Mandal, A. (2011). Flavonoids: potential health benefits. *Pharmacognosy Reviews*, 5, 64-72.

Wei, S., Wang, W., Li, L., Meng, H. Y., Feng, C. Z., Dong, Y. Y., Fang, X. C., Dong, Q. Q., Jiang, W., Xin, H. L., Li, Z. Z., & Wang, X. (2021). Recombinant human epidermal growth factor

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

combined with vacuum sealing drainage for wound healing in Bama pigs. *Military Medical Research*, 8(1).

Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2023). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology*, 13, 230035.

Worsley, P., Smith, G., & Rogers, A. (2023). Wound care research in the 21st century: Future perspectives. *Wound Repair and Regeneration*, 31, 367-373.

Wu, J., & Yan, L. J. (2015). Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 8, 181-188.

Xu, F., Zhang, C., Graves, D. T., & Li, J. (2013). TNF- α in diabetic wound healing: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Journal of Diabetes Research*, 2013, 1-8.

Yamakawa, S., & Hayashida, K. (2019). Advances in surgical applications of growth factors for wound healing. *Burns & Trauma*, 7, 10.

Yen, J. H., Chio, W. T., Chuang, C. J., Yang, H. L., & Huang, S. T. (2022). Improved Wound Healing by Naringin Associated with MMP and the VEGF Pathway. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(5).

Yen, J. H., Chen, C. J., & Lin, C. H. (2022). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in wound healing: an updated review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 1564.

Yi, T., Wang, J., & Zhu, L. (2007). Berberine: A review of its pharmacology in wound healing and anti-inflammatory activity. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 5, 144-148.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Yun, J., Park, S., Park, H. Y., & Lee, K. A. (2023). Efficacy of polydeoxyribonucleotide in promoting the healing of diabetic wounds in a murine model of streptozotocin-induced diabetes: A pilot experiment. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 1932.

Zhao, G., Usui, M. L., Lippman, S. I., James, G. A., Stewart, P. S., Fleckman, P., & Olerud, J. E. (2013). Biofilms and delayed wound healing. *Advances in Wound Care*, 2, 389-399.

Ziello, J. E., Jovin, I. S., & Huang, Y. (2007). Hypoxia inducible factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 80, 51-60.

Apéndice

Apéndice A. Resultados de la evaluación histológica y de los homogenizados de tejidos en ratones hiperglucémicos.

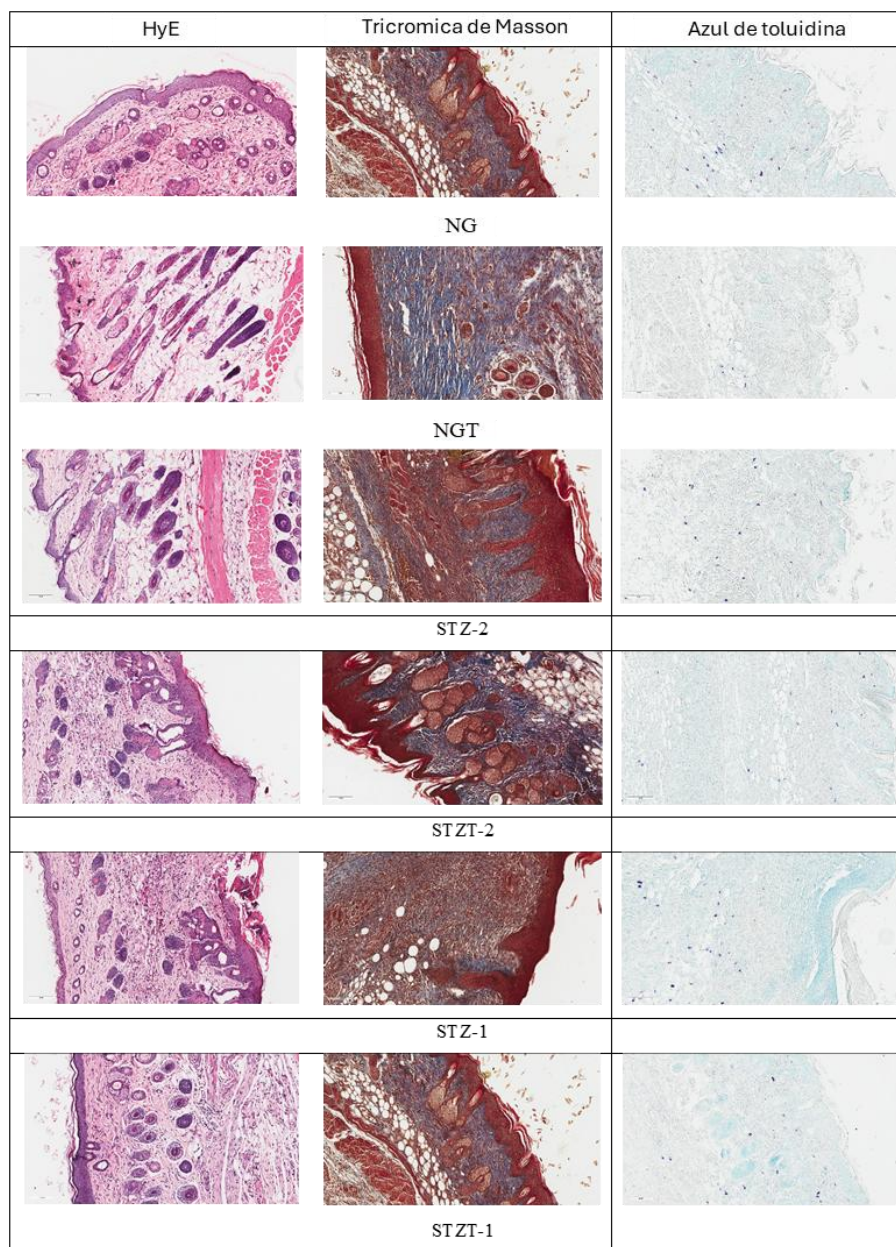
Los tejidos de los grupos tratados con FT® (STZT-1, STZT-2 y NGT) mostraron un bajo recuento de mastocitos en comparación con los grupos no tratados (STZ-1, STZ-2 y NG) ($p < 0,05$) (Figura 58, Tabla 18). El número de mastocitos fue estadísticamente similar entre los grupos HG (STZ) y NG ($p > 0,05$). En cuanto al infiltrado inflamatorio, se observó un bajo infiltrado celular en los grupos tratados con FT® en comparación con los ratones no tratados ($p < 0,05$). Sin embargo, el infiltrado celular fue estadísticamente mayor en los grupos HG (STZ) en comparación con el grupo NG ($p > 0,05$). Respecto al grosor del estrato córneo (SC), el tratamiento con FT® mostró valores más bajos en μm en comparación con los ratones no tratados ($p < 0,05$). El SC fue más grueso ($p < 0,05$) en los grupos HG (STZ) en comparación con el grupo NG (Tabla 1 y Figura 4). Finalmente, el análisis cuantitativo no reveló diferencias significativas en la deposición de colágeno entre los grupos no tratados (Tabla 18, Figura 58). Sin embargo, FT® incrementó significativamente la formación de colágeno en los grupos NG (NGT) y HG (STZ-1) (Tabla 18).

No se observaron diferencias significativas en la deposición de colágeno entre los grupos no tratados (Tabla 18, Figura 58). Resultados similares se observaron en ratas diabéticas inducidas por STZ, donde el número de fibroblastos y el contenido de colágeno en la piel diabética fueron comparables al grupo HG (Andrade et al., 2017).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 58

Microfotografías de tejido de cicatrización cutánea de ratones tras el uso de diversas técnicas de tinción histológica.



Nota. NG (ratones normoglucémicos, NG), NGT (NG más FT®), STZ-1 (ratones hiperglucémicos, HG-una dosis única de STZ), STZ-2 (HG-múltiples dosis de STZ), STZT-1 (HG, STZ-una dosis más FT®) y STZT-2 (HG, STZ-múltiples dosis más FT®).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Tabla 18*Parámetros histológicos en lesiones teñidas.*

Tinción	Parámetro histológico	NG	NGT	STZ-2	STZT-2	STZ-1	STZT-1
Azul de toluidina	Células masticas	+++ (1)	+++ (0)	+++ (3)	+++ (1)	+++ (4)	+++ (0)
		++ (6)	++ (2)	++ (3)	++ (1)	++ (2)	++ (2)
		+ (0)	+ (5)	+ (1)	+ (5)	+(1)	+ (5)
	SL		*		+		+
H/E	Infiltrado inflamatorio	+++ (2)	+++ (0)	+++ (2)	+++ (0)	+++ (4)	+++ (0)
		++ (4)	++ (1)	++ (5)	++ (2)	++ (2)	++ (2)
		+ (1)	+ (6)	+ (0)	+ (5)	+ (1)	+ (5)
	SL		*				+
H/E	Estrato corneo (µm)	76,86±6,56	61,46±4,93	86,20±2,79	66,84±2,50	92,57±8,57	59,18±9,26
			SL	***	*	+++ +++
TM	Logaritmo del número de pixeles azules /área mm ²	8,10 ± 0,36	8,99±0,16	8,07±1,06	8,66±0,85	8,07 ± 0,43	8,99 ± 0,21
			*				+

Nota. NG (ratones normoglucémicos, NG), NGT (NG más FT®), STZ-1 (ratones hiperglucémicos, HG-una dosis única de STZ), STZ-2 (HG-múltiples dosis de STZ), STZT-1 (HG, STZ-una dosis más FT®) y STZT-2 (HG, STZ-múltiples dosis más FT®). El análisis estadístico se realizó utilizando pruebas de Kruskal-Wallis con pruebas post-hoc de comparaciones múltiples de Dunn. Los niveles de significancia para la comparación con el grupo NG fueron $p < 0,05$ (), $p < 0,01$ () y $p < 0,001$ (); las comparaciones entre STZ-1 vs. STZT-1 y STZ-2 vs. STZT-2 fueron: $p < 0,05$ (+), $p < 0,01$ (++) y $p < 0,001$ (+++).

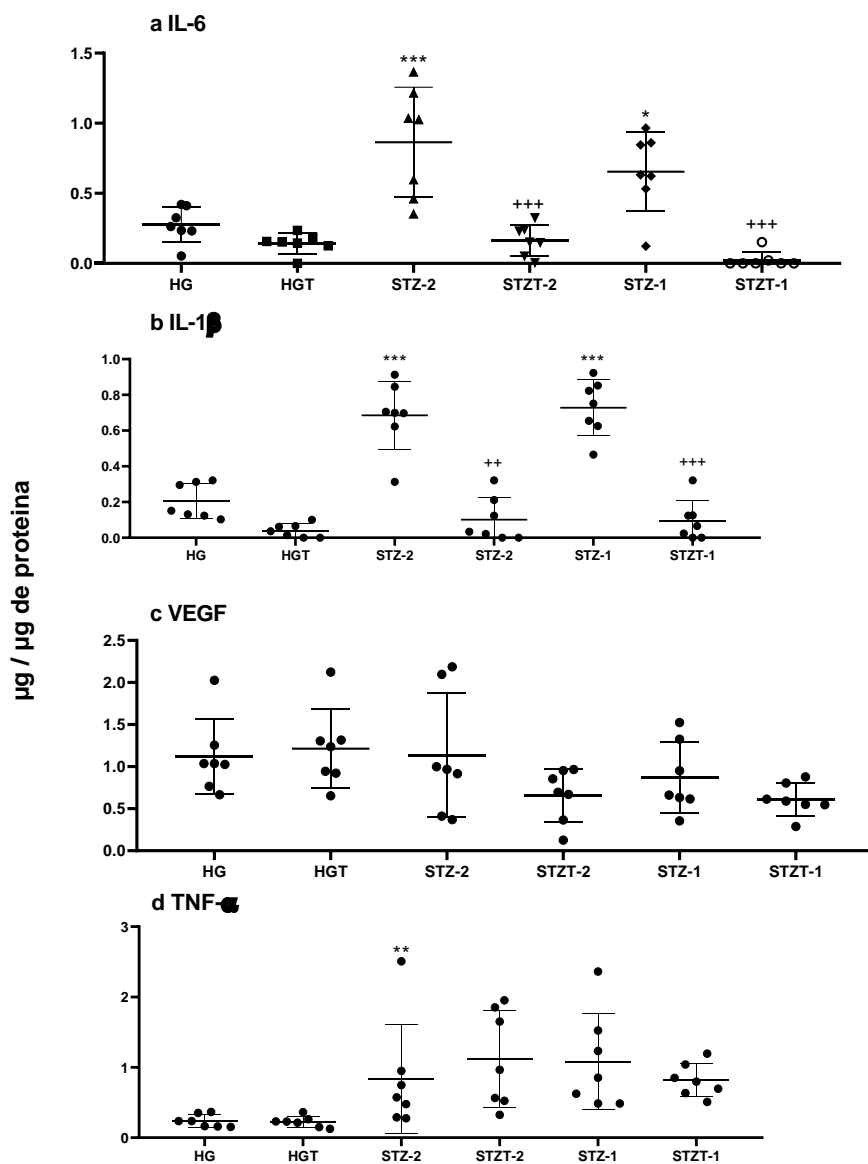
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Después de 10 días post-lesión (Figura 59), los niveles de IL-6 (Figura 59a) estuvieron elevados en los grupos STZ-2 y STZ-1 ($p < 0,05$), mientras que los grupos tratados con FT® (STZT-1 y STZT-2) mostraron una reducción en los niveles de citocinas en comparación con los grupos HG+ no tratados. Los niveles de IL-1 β (Figura 59b) disminuyeron en los grupos tratados (NGT, STZT-1 y STZT-2) y aumentaron en los grupos hiperglucémicos ($p < 0,05$). Los niveles de VEGF (Figura 59c) no mostraron diferencias estadísticamente significativas, mientras que los niveles de TNF- α (Figura 59d) estuvieron elevados en el grupo STZ-1 ($p < 0,05$).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

Figura 59

Evaluación de los niveles de citocinas en los lisados de tejidos de ratones heridos.



Nota. La figura muestra los niveles de IL-6 (a), IL-1 β (b), VEGF (c) y TNF- α (d) en los homogeneizados de las lesiones ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de proteína) en ratones BALB/c. NG (ratones normoglucémicos, NG), NGT (NG más FT®), STZ-1 (ratones hiperglucémicos, HG-una dosis única de STZ), STZ-2 (HG-múltiples dosis de STZ), STZT-1 (HG, STZ-una dosis más FT®) y

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRO CICATRIZANTE

STZT-2 (HG, STZ-múltiples dosis más FT®). Las pruebas de Kruskal-Wallis con análisis post-hoc de comparaciones múltiples de Dunn se realizaron como prueba estadística. Los niveles de significancia para la comparación con el grupo NG fueron $p < 0,05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***) ; las comparaciones entre STZ-1 vs. STZT-1 y STZ-2 vs. STZT-2 fueron: $p < 0,05$ (+), $p < 0,01$ (++) y $p < 0,001$ (+++).