

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**“DESARROLLO DE ANDAMIOS BIOACTIVOS, COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA EN LESIONES CUTÁNEAS”**

ASESOR:  
DR. DIEGO REGINENSI

PRESENTADO POR:  
DIGNA YAU

TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA CON  
ORIENTACIÓN EN GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

I SEMESTRE, 2024



---

TRIBUNAL EXAMINADOR

---

Título:

**“DESARROLLO DE ANDAMIOS BIOACTIVOS, COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA  
EN LESIONES CUTÁNEAS”**

Por:

**DIGNA YAU**  
**8-931-2134**

---

Trabajo de Graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Genética y Biología Molecular.

**Dr. Diego Reginensi**

---

**Dra. Magaly de Chial**

---

**Dra. Claudia Pérez**

---

## **DEDICATORIA**

A Hyposaurus.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis asesores, especialmente al Dr. Diego Reginensi, quien me dio esta extraordinaria oportunidad de investigación. Su apoyo, orientación experta y sabios consejos fueron pilares fundamentales en la realización de este proyecto. Asimismo, el invaluable aporte de la Dra. Magaly de Chial y la Dra. Claudia Pérez, por su dedicación y comentarios constructivos que fueron fundamentales para dar forma a este trabajo y llevarlo a su culminación con éxito.

Además, deseo expresar mi gratitud a todas las personas que participaron en este estudio, ya sea de manera directa o indirecta. Su tiempo, esfuerzo y valiosas contribuciones fueron esenciales para el desarrollo y conclusión de esta investigación.

Es importante destacar que, sin el respaldo y la colaboración de todos, esta tesis no habría sido posible. Me siento profundamente agradecida por la oportunidad de haber realizado este trabajo de investigación y el aprendizaje invaluable que he adquirido en todo el proceso.

## ÍNDICE GENERAL

HOJA DE APROBACIÓN .....	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
ÍNDICE GENERAL.....	IV
ÍNDICE DE CUADROS.....	VII
ÍNDICE DE GRÁFICAS Y FIGURAS .....	VIII
RESUMEN EJECUTIVO. ....	X
ABSTRACT.....	XI
<b>CAPÍTULO I. ASPECTOS GENERALES DE LA INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.2. PROBLEMÁTICA .....	5
1.2.1. IMPACTO GLOBAL DE LOS TRASTORNOS CUTÁNEOS, A NIVEL SOCIO SANITARIO.....	5
1.2.2. DESARROLLO DE NUEVAS BIOTECNOLOGÍAS APLICADAS EN EL CUIDADO DE LESIONES CUTÁNEAS. ....	8
1.3 JUSTIFICACIÓN .....	11
1.3 OBJETIVOS.....	14
▪ OBJETIVO GENERAL .....	14
▪ OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
2.1. CLASIFICACIÓN DE LAS HERIDAS CUTÁNEAS.....	16
2.1.1. HERIDAS AGUDAS (CICATRIZANTES).....	17
2.1.2. HERIDAS CRÓNICAS (NO CICATRIZANTES).....	17
2.2. PROCESO DE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS CUTÁNEAS .....	19
2.2.1. FASE DE HEMOSTASIA .....	21
2.2.2. FASE INFLAMATORIA .....	22
2.2.3. FASE DE PROLIFERACIÓN.....	23
2.2.4. FASE DE REMODELACIÓN .....	24
2.3. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS, BASADAS EN PARCHES INNOVADORES COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA DE LAS LESIONES CUTÁNEAS.....	25
2.3.1. APÓSITOS TRADICIONALES.....	26
2.3.2. APÓSITOS MODERNOS .....	26
2.3.3. FORMULACIONES FARMACEÚTICAS.....	32
2.3.3.1. EXTRACTOS VEGETALES CON PRINCIPIOS FITOTERAPÉUTICOS EN APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS CUTÁNEAS. ....	35
2.3.3.2. MIEL, COMO EXTRACTO BIOACTIVO EN APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS CUTÁNEAS.....	39
2.4. TRATAMIENTOS DE AVANZADAS EN BIOTECNOLOGIA MÉDICA EN EL TRATAMIENTO DE LAS LESIONES CUTÁNEAS.....	43
2.4.1 VEGETALES DESCELULARIZADOS, COMO UNA ESTRATEGIA INNOVADORA EN INGENIERÍA TISULAR. ....	43
2.4.2 TRATAMIENTO HIPEROXIGÉNICO, BASADO EN TERAPIA FOTOSINTÉTICA, COMO ESTRATEGIA DE INGENIERIA TISULAR. ....	45
2.5. MODELOS EN EL ESTUDIO DE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS.....	46
2.5.1. MODELOS IN VITRO DE LESIONES CUTÁNEAS. ....	47
2.5.2. MODELOS IN VIVO DE LESIONES CUTÁNEAS. ....	48

<b>CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO .....</b>	<b>50</b>
<b>OBJETIVO I: DESARROLLAR ANDAMIOS BIOTECNOLÓGICOS ECOSUSTENTABLES PARA APLICACIONES EN LESIONES CUTÁNEAS CRÓNICAS.....</b>	<b>51</b>
3.1. GENERACIÓN DE ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO #1: HIDROCOLOIDE BIOACTIVO.....	53
3.1.1. GENERACIÓN DE ANDAMIO DE HIDROCOLOIDE PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS.....	53
3.2. GENERACIÓN DE ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO #2: PARCHE ECOSUSTENTABLE HÍBRIDO. ....	53
3.2.1. ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE ANDAMIO VEGETAL DESCELULARIZADO PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS .....	53
3.2.2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL ANDAMIO VEGETAL DESCELULARIZADO .....	56
3.2.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL ANDAMIO VEGETAL DESCELULARIZADO .....	57
3.2.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) DEL ANDAMIO VEGETAL DESCELULARIZADO .....	58
3.2.5. OBTENCIÓN DE ANDAMIO DE ALGINATO PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS .....	59
<b>OBJETIVO II: DESARROLLAR ESTUDIOS IN VITRO DE LOS ANDAMIOS BIOTECNOLÓGICOS MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR, MOLECULAR Y BIOINGENIERÍA. ....</b>	<b>61</b>
3.3. ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO #1: APLICACIÓN DEL HIDROCOLOIDE.....	61
3.3.1. EVALUACIÓN DE ABSORCIÓN DE AGUA DE LOS ANDAMIOS.....	61
3.3.2. GENERACIÓN DE ANDAMIO DE HIDROCOLOIDE CON PRINCIPIOS TERAPÉUTICOS ACTIVOS PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS .....	62
3.3.3. MODELO DE CICATRIZACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR.....	63
3.4. ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO #2: APLICACIÓN DEL PARCHE ECOSOSTENIBLE OXIGÉNICO. ....	65
3.4.1. GENERACIÓN DE ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO HÍBRIDO (ALGINATO + HOJA DESCELULARIZADA) .....	65
3.4.2. GENERACIÓN DE ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO HÍBRIDO CON PRODUCTOS OXIGÉNICOS (HOJA DESCELULARIZADA + ALGINATO + SISTEMA OXIGÉNICO).....	67
I. IMPLEMENTACIÓN DE CULTIVO DE ALGAS OXIGÉNICAS MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR.....	67
III. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE OXÍGENO DEL ANDAMIO OXIGÉNICO .....	68
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
<b>OBJETIVO I: DESARROLLAR ANDAMIOS BIOTECNOLÓGICOS ECOSUSTENTABLES PARA APLICACIONES EN LESIONES CUTÁNEAS CRÓNICAS.....</b>	<b>71</b>
4.1 GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIO PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS .....	71
4.2. ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLO DE OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ANDAMIO VEGETAL DESCELULARIZADO PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS .....	72
<b>OBJETIVO II: DESARROLLAR ESTUDIOS IN VITRO DE LOS ANDAMIOS BIOTECNOLÓGICOS MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR, MOLECULAR Y BIOINGENIERÍA. ....</b>	<b>79</b>
4.3. EVALUACIÓN DE ABSORCIÓN DE AGUA DEL ANDAMIO DE HIDROCOLOIDE .....	79
4.4. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ANDAMIO DE HIDROCOLOIDE CON PRINCIPIOS TERAPÉUTICOS ACTIVOS PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS .....	80
4.5. ENSAMBLAJE DE ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO HÍBRIDO (HOJA DESCELULARIZADA + ALGINATO).....	82
4.6. GENERACIÓN DE ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO OXIGÉNICO (HOJA DESCELULARIZADA + HIDROGEL ALGINATO + SISTEMA OXIGÉNICO).....	85
4.6.1 IMPLEMENTACIÓN DE CULTIVO DE ALGAS OXIGÉNICAS MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR .....	85
4.6.2 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE OXÍGENO DEL ANDAMIO OXIGÉNICO.....	86
4.7 ESTUDIO IN VITRO DE CICATRIZACIÓN (CIERRE DE HERIDA) DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR (PROYECCIÓN A FUTURO). ....	87
<b>CAPÍTULO V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>89</b>
<b>CAPÍTULO VI. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>94</b>
<b>CONCLUSIONES. ....</b>	<b>95</b>

RECOMENDACIONES.....	95
PROPIEDAD INTELECTUAL.....	96
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

## ÍNDICE DE CUADROS

TABLA 1. TIPOS DE APÓSITOS Y SUS USOS, VENTAJAS Y LIMITACIONES .....	29
TABLA 2. TIPOS DE FORMULACIONES FARMACÉUTICAS, VENTAJAS Y LIMITACIONES .....	34
TABLA 3. PLANTAS UTILIZADAS EN APLICACIONES DE CICATRIZACIÓN DE HERIDAS.....	37
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DE LA MIEL, COMO EXTRACTO BIOACTIVO.....	41
TABLA 5. FASES DE CICATRIZACIÓN Y TIPOS DE TRATAMIENTO TERAPÉUTICO UTILIZADOS EN CADA FASE. ....	42
TABLA 6. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS BIOTECNOLÓGICOS. ....	80

## ÍNDICE DE GRÁFICAS Y FIGURAS

FIGURA 1. INCIDENCIA GLOBAL DE HERIDAS .....	5
FIGURA 2. CRECIMIENTO DEL MERCADO DE LOS APÓSITOS CUTÁNEOS MODERNOS .....	9
FIGURA 3. TIPOS DE LESIONES CUTÁNEAS. ....	16
FIGURA 4. CRONOLOGÍA DE LAS ETAPAS DE CICATRIZACIÓN DE HERIDAS AGUDAS Y CRÓNICAS. ....	20
FIGURA 5. PROCESO DE CICATRIZACIÓN DE HERIDAS. ....	25
FIGURA 6. COMPARACIÓN ENTRE APÓSITOS TRADICIONALES Y MODERNOS, CONSIDERANDO SUS VENTAJAS Y DESVENTAJAS. ....	32
FIGURA 7. DIAGRAMA DE PROPORCIÓN DE FASE ACUOSA Y OLEOSA EN LAS FORMULACIONES FARMACÉUTICAS PARA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS, INCLUYENDO LOCIÓN, CREMA, UNGÜENTO Y VASELINA. ....	33
FIGURA 8. TÉCNICAS DE DESCELULARIZACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE ANDAMIOS DE ORIGEN VEGETAL, DESTACANDO SUS VENTAJAS Y DESVENTAJAS. ....	44
FIGURA 9. MODELOS <i>IN VITRO</i> UTILIZADOS EN ESTUDIOS DE CICATRIZACIÓN DE HERIDAS. ....	48
FIGURA 10. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LAS ETAPAS DEL PROYECTO .....	51
FIGURA 11. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LA METODOLOGÍA PARA EL DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA DE INGENIERÍA TISULAR Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR PARA APLICACIONES EN MODELO DE CICATRIZACIÓN .....	52
FIGURA 12. METODOLOGÍA PARA LA GENERACIÓN DE ANDAMIO DE HIDROCOLOIDE PARA APLICACIONES EN MODELO DE CICATRIZACIÓN .....	53
FIGURA 13. METODOLOGÍA PARA LA ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE ANDAMIO VEGETAL DESCELULARIZADO PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS.....	55
FIGURA 14. DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL PROCESO DEL ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL ANDAMIO VEGETAL. ..	56
FIGURA 15. METODOLOGÍA PARA LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL ANDAMIO VEGETAL.....	58
FIGURA 16. METODOLOGÍA PARA LA CARACTERIZACIÓN EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DEL ANDAMIO VEGETAL. ....	59
FIGURA 17. METODOLOGÍA PARA LA FORMULACIÓN DEL ANDAMIO DE ALGINATO PARA APLICACIONES EN MODELO DE CICATRIZACIÓN .....	59
FIGURA 18. METODOLOGÍA PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL ANDAMIO DE HIDROCOLOIDE Y ALGINATO, QUE INCLUYE LA EVALUACIÓN ORGANOLÉPTICA Y LA EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICAS.....	60
FIGURA 19. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LA METODOLOGÍA PARA EL DESARROLLO DE ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> BASADOS EN ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS DE LOS ANDAMIOS .....	61
FIGURA 20. METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE ABSORCIÓN DE AGUA DE LOS ANDAMIOS .....	62
FIGURA 21. METODOLOGÍA PARA LA GENERACIÓN DE ANDAMIO DE HIDROCOLOIDE CON PRINCIPIOS TERAPÉUTICOS ACTIVOS PARA APLICACIONES EN MODELO DE CICATRIZACIÓN .....	63
FIGURA 22. METODOLOGÍA PARA EL MODELO DE CICATRIZACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR .....	63
FIGURA 23. METODOLOGÍA DE LA IMPLEMENTACIÓN DE CULTIVO DE FIBROBLASTO DÉRMICO MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR.....	64

FIGURA 24. METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DE CICATRIZACIÓN (CIERRE DE HERIDA) DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR.....	65
FIGURA 25. METODOLOGÍA PARA LA GENERACIÓN DE ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO HÍBRIDO (ANDAMIO DE ALGINATO + HOJA DESCELULARIZADA) CON PRODUCTOS OXIGÉNICOS. ....	66
FIGURA 26. METODOLOGÍA PARA LA GENERACIÓN DEL ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO HÍBRIDO OXIGÉNICO (HOJA DESCELULARIZADA + ANDAMIO DE ALGINATO + SISTEMA OXIGÉNICO).....	68
FIGURA 27. METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE OXÍGENO DEL ANDAMIO. ....	69
FIGURA 28. CARACTERIZACIÓN DEL ANDAMIO LOS ANDAMIOS GENERADOS PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS. ....	72
FIGURA 29. SECUENCIA TEMPORAL DE LA DESCELULARIZACIÓN DE UNA HOJA DE <i>HYDROCOTYLE SP.</i> ....	73
FIGURA 30. ESQUEMA TEMPORAL DE LOS DIVERSOS PROTOCOLOS DE DESCELULARIZACIÓN VEGETAL ESTABLECIDOS. ....	74
FIGURA 31. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL ANDAMIO VEGETAL DESCELULARIZADO. ....	76
FIGURA 32. ANÁLISIS HISTOLÓGICO Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) DEL ANDAMIO VEGETAL. ....	78
FIGURA 33. COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE ABSORCIÓN DE AGUA DE DIVERSOS ANDAMIOS. ....	79
FIGURA 34. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS DE HIDROCOLOIDE PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS. ....	81
FIGURA 35. COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE ABSORCIÓN DE AGUA DE DIVERSOS ANDAMIOS. ....	82
FIGURA 36. ANÁLISIS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y ANÁLISIS MOLECULAR DE <i>MUSA SP</i> (PLANTA DE BANANO) DESCELULARIZADO. ....	83
FIGURA 37. ENSAMBLAJE DE ANDAMIO VEGETAL DESCELULARIZADO EN COMBINACIÓN CON ANDAMIO DE ALGINATO OXIGÉNICO. ....	84
FIGURA 38. ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO HÍBRIDO. ....	85
FIGURA 39. CULTIVO DE MICROALGAS OXIGÉNICAS. ....	86
FIGURA 40. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE OXÍGENO DEL ANDAMIO OXIGÉNICO.....	87
FIGURA 41. ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DE CIERRE DE HERIDA. ....	88

## RESUMEN EJECUTIVO.

La cicatrización de heridas es un proceso esencial y coordinado para preservar la función protectora de la piel. Aunque las heridas agudas suelen sanar dentro de un período de cuatro a seis semanas, problemas médicos subyacentes pueden dificultar este proceso y llevar a heridas crónicas. La alta incidencia de trastornos cutáneos a nivel global y en Panamá destaca la necesidad de mejorar las estrategias de tratamiento de heridas. A pesar de los avances en apósitos y técnicas quirúrgicas, persisten desafíos en encontrar terapias efectivas para la cicatrización.

Los apósitos tradicionales, como gasas y vendajes, son los más usados por su bajo costo y fácil fabricación, pero presentan limitaciones, como la dificultad para mantener la herida húmeda y la tendencia a adherirse al tejido. En contraste, los apósitos modernos (p. ej., hidrogeles, alginatos, hidrocoloides) crean un ambiente húmedo favorable para la cicatrización, con mejor biocompatibilidad, degradabilidad y retención de humedad, lo que alivia el dolor y mejora el ambiente de la herida, crucial para mejorar los resultados y reducir las heridas crónicas.

En este estudio se generaron biotecnologías innovadoras para aplicaciones de lesiones cutáneas crónicas, las cuales vienen dadas por:

(i) andamio de hidrocoloide con propiedades fitoterapéuticas activas, que aprovecha los beneficios curativos de compuestos naturales (p. ej., *Centella asiatica*, miel). Este andamio mostró buenas propiedades organolépticas, con una apariencia ligeramente translúcida y lisa con tonalidades amarillentas. Además, su estructura relativamente delgada mostró una capacidad superabsorbente significativa en ensayos *in vitro*, confirmando su efectividad en la absorción de fluidos.

(ii) andamio híbrido ecosostenible híbrido que incorpora andamios vegetales descelularizados que conserva la arquitectura natural de la hoja para actuar una matriz bioactiva. Este andamio se combina con un andamio de hidrogel de alginato gelificado sobre el andamio vegetal, actuando como un sistema encapsulante para un sistema oxigénico (p. ej., microalgas fotosintéticas). Este andamio híbrido tiene la capacidad de producir oxígeno gracias a su componente fotosintético.

## ABSTRACT

Wound healing is an essential and coordinated process to preserve the protective function of the skin. While acute wounds typically heal within four to six weeks, underlying medical issues can complicate this process and lead to chronic wounds. The high incidence of skin disorders globally and in Panama underscores the need to improve wound treatment strategies. Despite advancements in dressings and surgical techniques, challenges remain in finding effective therapies for wound healing.

Traditional dressings, such as gauze and bandages, are commonly used due to their low cost and ease of production, but they have limitations, such as difficulty maintaining a moist wound environment and a tendency to adhere to tissue. In contrast, modern dressings (e.g., hydrogels, alginates, hydrocolloids) create a favorable moist environment for healing, with improved biocompatibility, degradability, and moisture retention, which alleviates pain and enhances the wound environment, crucial for improving outcomes and reducing chronic wounds.

This study developed innovative biotechnologies for applications in chronic skin lesions, including:

- (i) hydrocolloid scaffold with active phytotherapeutic properties, harnessing the healing benefits of natural compounds (e.g., *Centella asiatica*, honey). This scaffold exhibited good organoleptic properties, with a slightly translucent and smooth appearance with yellowish tones. Additionally, its relatively thin structure demonstrated significant superabsorbent capacity in in vitro tests, confirming its effectiveness in fluid absorption.
- (ii) eco-sustainable hybrid scaffold incorporating decellularized plant scaffolds that retain the natural leaf architecture to act as a bioactive matrix. This scaffold is combined with an alginate hydrogel scaffold gelled over the plant scaffold, acting as an encapsulating system for an oxygen-generating system (e.g., photosynthetic microalgae). This hybrid scaffold has the capability to produce oxygen due to its photosynthetic component.

# **CAPÍTULO I. ASPECTOS GENERALES DE LA INVESTIGACIÓN**

## 1.1. INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más extenso en el cuerpo humano, se compone de tres capas distintas: la epidermis, la dermis y la hipodermis (Lopez-Ojeda et al., 2017). Estas capas son inherentemente auto-renovables y desempeñan una serie de funciones esenciales, como barrera protectora contra microbios y radiación ultravioleta, la regulación de la temperatura corporal y la contribución al sistema inmunológico y sensorial (Singer & Clark, 1999). La integridad de la piel puede alterarse por daños, inflamación o irritación, dando lugar a diversas afecciones cutáneas, desde úlceras y quemaduras hasta manifestaciones de enfermedades sistémicas como la *diabetes mellitus* (Lin et al., 2020).

El proceso de cicatrización de heridas es complejo y dinámico, en términos generales, el proceso normal de cicatrización consta de cuatro fases: homeostasis, inflamación, proliferación y remodelación celular (Gosain & DiPietro, 2004). Las heridas cutáneas son alteraciones de la continuidad anatómica y celular del tejido. Estas heridas pueden ser accidentales o intencionales, como mediante una incisión quirúrgica (Pollock & Schumacher, 2012). Pueden clasificarse de diversas maneras: como agudas (p. ej., laceraciones, quemaduras, cortes) o crónicas (p. ej., úlceras, heridas infecciosas, heridas isquémicas), según la causa (p. ej., presión mecánica, traumatismo, déficit metabólico), la profundidad de la afectación del tejido u otras características como el cierre (intención primaria o secundaria) (Ather et al., 2019).

Una herida aguda se adquiere como resultado de una incisión o traumatismo y sana de manera oportuna y ordenada (Ather et al., 2019); por el contrario, las heridas crónicas no siguen el curso normal de cicatrización, sino que quedan detenidas en una etapa inflamatoria autoperpetuante y permanecen intratables a pesar de un manejo adecuado (Kekonen & Viik, 2021). Numerosos factores pueden retrasar la cicatrización de heridas, como enfermedades crónicas, insuficiencia vascular, diabetes, desnutrición, envejecimiento o factores locales como presión, infección y edema (Zhao et al., 2016). Algunos ejemplos de heridas crónicas son las úlceras venosas de las piernas, las úlceras por presión y las úlceras del pie diabético. Estas representan una carga significativa para pacientes y sistemas de atención médica, afectando la calidad de vida de millones de personas en el mundo (Sen, 2021).

El tratamiento de las lesiones puede abarcar el uso de medicamentos, tanto locales como sistémicos (Vittalrao et al., 2020) y tienen por objetivo de acelerar la recuperación y la reducción del riesgo de complicaciones no deseados (MacKay & Miller, 2003). Sin embargo, a pesar de los avances en apósitos y tratamientos convencionales, actualmente persiste la necesidad de opciones más efectivas y sostenibles (Frykberg & Banks, 2015). Por ello, el uso de principios terapéuticos activos basados en la generación de andamios bioactivos para aplicaciones biomédicas se considera una alternativa novedosa, ecológica y sustentable en medicina regenerativa (Indurkar et al., 2021).

Los apósitos tradicionales, también conocidos como apósitos inertes (p. ej., gasas, almohadillas de algodón y vendajes), son los más utilizados en la práctica clínica debido a su bajo costo y sencillo proceso de fabricación (Broughton et al., 2006). No obstante, presentan varias

limitaciones que restringen su aplicación, como la dificultad para mantener la herida húmeda y la tendencia a adherirse al tejido de granulación (Moore & Webster, 2018).

En contraste, los apósitos modernos pueden ser más adecuados gracias a sus propiedades que crean un ambiente húmedo propicio para la cicatrización de las heridas (Heyer et al., 2013; Moura et al., 2013). En comparación con los apósitos tradicionales, los modernos destacan por su mejor biocompatibilidad, degradabilidad y capacidad de retención de humedad. Estas ventajas no solo alivian el dolor, sino que también mejoran el ambiente hipóxico o anaeróbico de la herida (Hopper et al., 2012; Thu et al., 2012; Okuma et al., 2015).

En biomedicina, destacan los compuestos de origen natural para la generación de diversos parches, como hidrogeles, hidrocoloides y alginatos. Estos apósitos mantienen la temperatura y la humedad ideales para que la herida estimule la cicatrización y la protejan de bacterias externas y prevengan infecciones cruzadas (Heyer et al., 2013). Además, estos apósitos tienen la propiedad de no ser adhesivos para los tejidos, lo que causa menos dolor durante los cambios de apósito de los pacientes, superando la limitación de los apósitos tradicionales (Aswathy et al., 2020).

Los diversos parches biotecnológicos, están asociados, generalmente, a numerosos recursos naturales, de forma tradicional, en el tratamiento de heridas, destacando su considerable potencial para influir positivamente en el proceso de cicatrización (Santos-Buelga et al., 2014). Dentro de los principios vegetales se incluyen extractos de plantas, como los de *Centella asiatica*, *Calendula officinalis* y *Mangifera indica*, así como otros compuestos naturales, como la miel, que han demostrado inducir la cicatrización y regeneración de tejidos mediante mecanismos diversos, a menudo mostrando un efecto sinérgico que aumenta la recuperación tisular (Maver et al., 2015). Estos productos derivados de recursos naturales son accesibles y generalmente presentan mínimos efectos secundarios no deseados (Ekor, 2014), lo que ha impulsado una investigación exhaustiva en el campo de la curación y tratamiento de heridas, con un enfoque particular en productos medicinales de origen vegetal (Nagori & Solanki, 2011).

En este proyecto fueron desarrollados andamios biotecnológicos innovadores para el tratamiento de heridas cutáneas, que vienen dados por:

- (i) andamio de hidrocoloide con propiedades fitoterapéuticos activos, aprovechando los beneficios curativos de compuestos naturales (p. ej., *Centella asiatica*, miel).
- (ii) andamio híbrido ecosostenible basado en andamios vegetales descelularizados + hidrogel oxigénico (p. ej., microalgas fotosintéticas).

Estos andamios de enfoque innovador no solo buscan mejorar la efectividad de los tratamientos actuales, sino también aprovechar el potencial de los recursos naturales para acelerar y optimizar el proceso de cicatrización de manera segura y efectiva. Así es como, por un lado, la integración de andamios de hidrocoloide con propiedades fitoterapéuticas activas proporcionará un ambiente propicio para la regeneración del tejido, minimizando las complicaciones asociadas con las heridas crónicas complejas (p. ej., úlceras de presión) asociadas a un elevado exudado dermatológico; mientras, que por otro lado, los andamios

vegetales descelularizados ofrecen una matriz extracelular adecuada, y su combinación con andamios de alginato oxigénico, enriquecidos con microalgas, permitirá un suministro continuo de oxígeno, un factor crítico para la curación de heridas (p. ej., quemaduras). Este enfoque multidimensional, basado en biotecnología, proporcionará un tratamiento avanzado y efectivo para las heridas cutáneas.

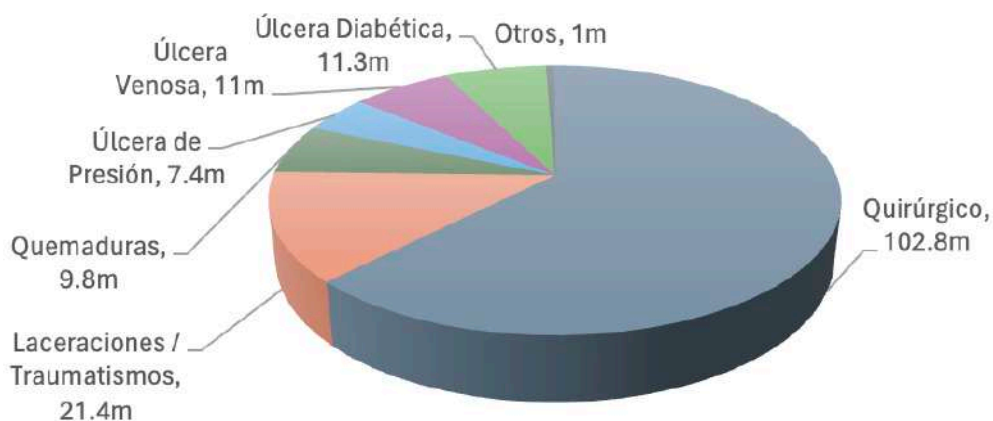
## 1.2. PROBLEMÁTICA

### 1.2.1. IMPACTO GLOBAL DE LOS TRASTORNOS CUTÁNEOS, A NIVEL SOCIOSANITARIO.

Los trastornos cutáneos constituyen una de las causas más frecuentes de enfermedad en la población mundial, afectando a aproximadamente un tercio de la población. A pesar de ser visibles, su impacto se subestima con frecuencia (Hay et al., 2014; Karimkhani et al., 2017). Estos trastornos tienen una alta incidencia global y representan una carga importante para la salud pública, tanto en países desarrollados como en desarrollo (Karimkhani et al., 2017). Afectan a personas de todas las edades, siendo los niños uno de los grupos más vulnerables debido a la delicadeza de su piel (Vora et al., 2012).

Actualmente, aproximadamente el 35% de las heridas son clasificadas como crónicas, con una prevalencia del 2% en la población general (Sen et al., 2009). A medida que el número de personas con diabetes ha aumentado de 108 millones (4.7%) en 1980 a 422 millones (8.5%) en 2014 (WHO, 2016), la incidencia de heridas crónicas también ha crecido, imponiendo una gran carga económica al sistema de salud. En Estados Unidos, aproximadamente 6.5 millones de personas fueron afectadas por heridas que no cicatrizan en 2009, con un costo total de tratamiento que alcanzó los 25 mil millones de USD por año (Han & Ceilley, 2017).

En términos de la incidencia global de heridas, se estima que las heridas quirúrgicas representan la mayor parte con 102.8 millones de casos. Las laceraciones y traumatismos siguen con 21.4 millones de casos, mientras que las quemaduras afectan a 9.8 millones de personas. Las úlceras de presión, venosa y diabética afectan a 7.4 millones, 11 millones y 11.3 millones de personas, respectivamente. Otros tipos de heridas suman aproximadamente 1 millón de casos. Esta distribución resalta la diversidad y magnitud de las heridas en la población mundial, subrayando la necesidad de un manejo adecuado y eficiente para reducir su impacto en la salud pública (Ashtikar & Wacker, 2018) (**Figura 1**).



**Figura 1.** Incidencia global de heridas (Ashtikar & Wacker, 2018).

En términos de carga de enfermedad, las afecciones de la piel y subcutáneas fueron responsables de 41.6 millones de Años de Vida Ajustados por Discapacidad (AVAD) y 39.0

millones de Años Perdidos debido a la Discapacidad (APD) en 2013. Esto las posiciona como la 18ª causa principal de AVAD a nivel global, y son la cuarta causa principal de discapacidad en todo el mundo, excluyendo la mortalidad. Además, entre 1990 y 2017, hubo un aumento del 46.8% en estas enfermedades (Karimkhani et al., 2017).

Las heridas crónicas, como las úlceras en las piernas, representan una preocupación importante, con una prevalencia global de 1.67 por cada 1000 habitantes (Järbrink et al., 2016). En Reino Unido, por ejemplo, entre 1.5 y 2 millones de personas se ven afectadas por heridas agudas o crónicas (Lindholm & Searle, 2016). El manejo de estas heridas ya sea en hospitales, centros de atención comunitaria o en el hogar, presenta desafíos considerables para la evaluación médica y los costos asociados. Globalmente, las úlceras diabéticas tienen una prevalencia del 6.3%, siendo del 5.1% en Europa, con mayor incidencia en hombres y pacientes con diabetes tipo 2 (Zhang et al., 2017).

En 2014, las estimaciones de Medicare para el costo de tratamientos de heridas agudas y crónicas en Estados Unidos variaron entre 28.1 mil millones y 96.8 mil millones de dólares, incluyendo los costos de manejo de infecciones, entre los cuales las heridas quirúrgicas y las úlceras diabéticas fueron las más costosas de tratar. Además, los costos ambulatorios (entre 9.9 mil millones y 35.8 mil millones de dólares) fueron más altos que los costos hospitalarios (entre 5.0 mil millones y 24.3 mil millones de dólares), posiblemente debido a un aumento en los tratamientos ambulatorios de heridas que actualmente se ofrecen. Los gastos más elevados relacionados con las heridas fueron atribuidos a las heridas quirúrgicas, seguidas de las úlceras en el pie diabético (Nussbaum et al., 2018). Desde un punto de vista económico, se espera que el mercado anual de productos para el cuidado de heridas alcance entre 15 mil millones y 22 mil millones de dólares para el año 2024 (Sen, 2019).

El cuidado de las heridas representa un desafío crítico para la salud, proyectándose para el año 2025, 380 millones de personas en todo el mundo sufrirán de heridas. En Europa en 2018, la prevalencia poblacional de heridas crónicas fue de 3-4 por cada 1,000 personas, afectando aproximadamente entre 1.5 y 2.0 millones de los 491 millones de habitantes de la Unión Europea, y la estimación anual de la incidencia tanto de heridas agudas como crónicas se sitúa en 4 millones en la región (Krefeld et al., 2018). Existe una amplia gama de heridas, como las quirúrgicas, úlceras (venosas, diabéticas, arteriales, por presión, decúbito, entre otras), lesiones traumáticas y quemaduras.

En Estados Unidos, el gasto estimado en cuidado de heridas alcanzó los \$126.8646 mil millones de dólares en 2019, mientras que en Panamá el gasto estimado fue de \$206 millones de dólares en el mismo año (Queen & Harding, 2023). El costo de un vendaje estándar es de aproximadamente USD \$24, con cambios de vendaje cada dos días, acumulando un costo total de tratamiento por paciente de hasta USD \$3,456 durante un período de seis meses (Al-Gharibi et al., 2018). Este alto costo, especialmente de los apósitos avanzados, representa una barrera significativa para su uso, especialmente en países en desarrollo o en pacientes con recursos económicos limitados.

En el caso de Panamá, en el 2009 la tasa de morbilidad para las enfermedades de la piel y el tejido subcutáneo fue 3.290,1 por 100.000 habitantes, representando el sexto lugar en la república (MINSA, 2013). En los últimos años, ha habido un aumento progresivo de las enfermedades dermatológicas, especialmente en pacientes diabéticos e hipertensos, lo cual ha generado una considerable carga en el sistema de salud (MINSA, 2013). Las estadísticas indican que durante el año 2017 atendieron un total 9,758 curaciones, en el 2018 atendieron 11,677, el año 2019 atendieron cerca de 14,500 y el año 2020 fueron atendidos cerca de las 20,000 personas (Díaz et al., 2023). En el año 2023, se atendieron más de 32,000 pacientes en las Clínicas de Curación de Heridas, Úlceras y Pie Diabético de la Caja de Seguro Social, efectuando aproximadamente 368,000 procedimientos médicos (Sanchez, 2024). En el cual, aproximadamente 7,000 corresponden a lesiones crónicas. Los casos más frecuentes incluyen el pie diabético, la insuficiencia venosa, la úlcera por presión, así como úlceras arteriales y falcémicas (Tello, 2024)

Las hospitalizaciones anuales debido a quemaduras de diversos grados implican costos considerables que incluyen días de hospitalización, personal médico, medicamentos y consultas especializadas. Estos gastos pueden superar los 7,000 dólares por paciente, reflejando la necesidad de recursos financieros significativos para proporcionar una atención médica adecuada y completa en casos de quemaduras graves (Vasquéz, 2013). Se han invertido más de \$18 millones en insumos y materiales médico-quirúrgicos para las Clínicas de Heridas a nivel nacional durante los años 2023 y 2024, evidenciando así un considerable costo asociado a la gestión y tratamiento de heridas cutáneas en el país (Ruíz, 2023).

El alto costo de los apósitos no solo afecta a los pacientes, sino también a los sistemas de salud. Los tratamientos prolongados y la necesidad de cambios frecuentes de apósitos pueden incrementar significativamente los gastos médicos (Schmitz et al., 2014). Esto se traduce en una carga financiera considerable para los servicios de salud pública, afectando su capacidad para proporcionar atención de calidad en los pacientes; no obstante, a pesar de la disponibilidad de apósitos más avanzados, muchos productos en el mercado no han sido integrados en los servicios sanitarios, ya que sea por sus elevado de coste, como también por tener procesos de manufactura, a nivel local. Por ello, es esencial que futuras investigaciones se centren en realizar estudios que respalden la producción local, desarrollo científico y efectividad de nuevos andamios biotecnológicos y el desarrollo de alternativas más económicas, accesibles y ecológicas.

En general, las heridas cutáneas representan un problema de salud significativo tanto en términos de morbilidad como de mortalidad, siendo más prevalentes en países en desarrollo debido a una variedad de factores, que incluyen acceso limitado a atención médica de calidad, condiciones socioeconómicas desfavorables, entre otros (Barreto et al., 2012). La presencia de heridas y el retraso en su cicatrización plantean desafíos considerables para los médicos y profesionales de la salud en general. Estas ejercen una influencia significativa a largo plazo en la salud y calidad de vida tanto de los pacientes como de sus familiares. Estos impactos incluyen la aparición de depresión, pérdida de función y movilidad, aislamiento social, estancias hospitalarias prolongadas y costos elevados de tratamiento. Para abordar estas complejidades,

el cuidado de heridas de emergencia y la competencia técnica de los profesionales clínicos son aspectos cruciales para lograr una atención efectiva.

### **1.2.2. DESARROLLO DE NUEVAS BIOTECNOLOGÍAS APLICADAS EN EL CUIDADO DE LESIONES CUTÁNEAS.**

El avance de la biotecnología ha permitido el desarrollo de nuevas y mejoradas estrategias para el cuidado de las heridas cutáneas. Sin embargo, a pesar de los progresos científicos y tecnológicos, existe una falta de investigaciones exhaustivas sobre la eficacia y seguridad de muchos apósitos cutáneos disponibles en el mercado. Esta carencia de estudios rigurosos dificulta la evaluación objetiva de su desempeño y sugiere la necesidad de más investigación en esta área.

Los apósitos cutáneos tradicionales, como las gasas y los vendajes, han sido utilizados durante siglos. Sin embargo, estos productos presentan limitaciones significativas en términos de promoción de la cicatrización y prevención de infecciones. Una de las principales desventajas de los apósitos tradicionales es su incapacidad para mantener un equilibrio adecuado de humedad en la herida (Moore & Webster, 2018). La cicatrización óptima de heridas requiere un ambiente húmedo, ya que la desecación puede retrasar el proceso de curación. Las gasas y vendajes tradicionales tienden a absorber el exudado de la herida, llevándola a un estado seco que no favorece la regeneración tisular (Dhivya et al., 2015).

Los apósitos tradicionales no proporcionan una barrera eficaz contra los patógenos. Esto aumenta el riesgo de infección, especialmente en heridas crónicas o en pacientes inmunocomprometidos. El cambio frecuente de estos apósitos puede introducir bacterias adicionales a la herida, complicando aún más el proceso de curación. Las gasas y vendajes tradicionales tienden a adherirse al lecho de la herida, lo que puede causar trauma y dolor al ser retirados. Este problema no solo es incómodo para el paciente, sino que también puede dañar el tejido recién formado, retrasando así la cicatrización y aumentando el riesgo de infección (Bhoyar et al., 2023). Además, de la incapacidad de los apósitos tradicionales para liberar agentes terapéuticos, como factores de crecimiento, antimicrobianos o analgésicos, directamente en la herida (Boateng et al., 2008). Además, limita la oxigenación en la herida, un componente esencial para varios procesos en la curación de heridas, tales como: la deposición de colágeno, la reepitelización tisular, los procesos de angiogénesis y la actividad inmunitaria; lo que impide la aceleración de los procesos de cicatrización de manera eficaz.

Las gasas y vendajes son relativamente económicos en términos de costo unitario, sin embargo, existe la necesidad de múltiples cambios frecuentes y periódicos en el paciente, lo que aumenta significativamente el costo total del tratamiento, como también la posibilidad infecciones. Además, el tiempo y los recursos necesarios para realizar estos cambios frecuentes pueden representar una carga considerable tanto para los pacientes como para los proveedores de atención médica (Boateng et al., 2008).

El aumento de las enfermedades crónicas no transmisibles y sus procedimientos quirúrgicos asociados impulsan la demanda de soluciones avanzadas para el cuidado de heridas; sin embargo, el alto costo de los productos de cuidado avanzado de heridas se presenta como una de las principales barreras en el crecimiento del mercado de los andamios cutáneos. Actualmente, los elevados precios de los productos biotecnológicos de cuidado avanzado de heridas implican la limitada aplicación de los parches (andamios) bioactivos en los pacientes de lesiones cutáneas, como una opción potencial. El mercado global de cuidado de heridas está valorado en 14.61 mil millones de USD en 2023 y se predice que superará los 24.05 mil millones de USD para 2033, desarrollándose a una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) del 4.93% entre 2023 y 2033 (James, 2024). El mercado biotecnológico de las lesiones cutáneas se encuentra en un creciente desarrollo que ha conllevado la incorporación de nuevas tecnologías de medicina regenerativa, tales como productos sanitarios como: formulaciones farmacéuticas (p. ej., cremas), apósitos cutáneos (p. ej., hidrogeles, parches hidrocoloides, etc.), dispositivos biomédicos (terapia de presión negativa, desbridamiento, etc.) y terapia celular (p. ej., piel artificial, implantes autólogos) (Figura 2).

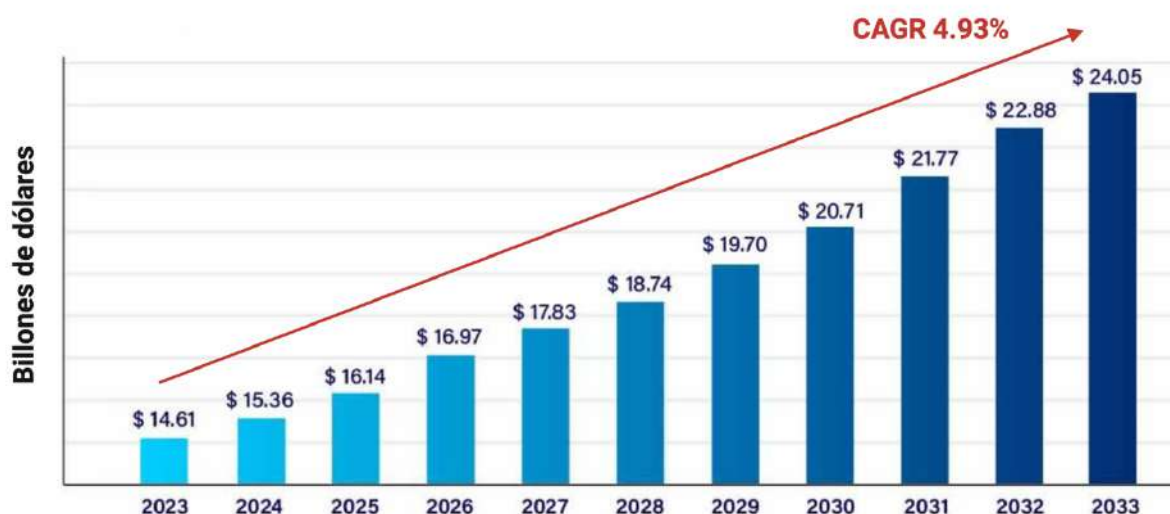


Figura 2. Crecimiento del mercado de los apósitos cutáneos modernos (James, 2024).

A pesar de la disponibilidad de apósitos más avanzados, muchos de los productos en el mercado no se han integrado en los procesos sociosanitarios, ya que se encuentran en etapas preclínicas. Por ello, es esencial que futuras investigaciones se centren en realizar estudios para respaldar su efectividad. El desarrollo de nuevas estrategias biotecnológicas tiene el potencial de transformar el cuidado de heridas, sin embargo, para maximizar este potencial es crucial invertir en investigación y desarrollo en biotecnologías cutáneas, esto permitirá que nuevos productos no solo sean efectivos, accesibles y sostenibles y puedan beneficiar a un mayor número de pacientes a nivel global.

Actualmente, los apósitos bioactivos están ganando un reconocimiento significativo dentro del campo médico. Estos apósitos, elaborados con materiales naturales o sintéticos, tienen la

capacidad de influir en el proceso de cicatrización de heridas, ya sea de manera directa o indirecta (Schoukens, 2019). Su eficacia se debe a la liberación de factores bioactivos o a la presencia de materiales con actividad endógena. Esta categoría incluye una amplia variedad de productos como alginatos, colágeno, hidrocoloides, biotextiles, quitosano, quitina y sus derivados (Peng et al., 2022).

Los apósitos interactivos tienen el potencial de servir como plataforma para agentes bioactivos, ofreciendo un enfoque más preciso y adaptado a las condiciones específicas de las úlceras y los requisitos específicos para la restauración de la piel (Guo & DiPietro, 2010). Estos apósitos no solo permiten una cicatrización más rápida, sino que también son económicos en comparación con los cuidados estándar establecidos (Sarkar & Poundarik, 2022).

El uso de apósitos bioactivos tiene un impacto directo en la disminución de los costos asociados al tratamiento de heridas. Al acelerar la cicatrización, disminuyen significativamente el tiempo de hospitalización de los pacientes, lo que a su vez reduce los costos hospitalarios y libera recursos para otros tratamientos. Además, la tasa de complicaciones y la mortalidad asociada a heridas crónicas puede reducirse, mejorando así la calidad de vida de los pacientes y disminuyendo los gastos de salud a largo plazo. Estos beneficios incluyen una menor necesidad de intervenciones quirúrgicas adicionales, menos consultas de seguimiento y una reducción en el uso de medicamentos y otros recursos médicos (Sarkar & Poundarik, 2022).

## **1.3 JUSTIFICACIÓN**

### **1.3.1. BUSQUEDA DE ESTRATEGIAS BIOMÉDICAS PARA LA DISMINUCIÓN DE LA INCIDENCIA DE HERIDAS CUTÁNEAS.**

A nivel mundial, los trastornos cutáneos afectan a aproximadamente un tercio de la población, con una alta incidencia de heridas crónicas que representan una carga importante para la salud pública (Flohr & Hay, 2021). En Panamá, la tasa de morbilidad por enfermedades de la piel y el tejido subcutáneo fue de 3.290,1 por 100.000 habitantes en 2009, y ha habido un aumento progresivo de estas enfermedades, especialmente en pacientes diabéticos e hipertensos. Las estadísticas recientes indican que, en 2023, cerca de 32.000 personas recibieron atención por heridas, reflejando una creciente demanda de servicios de salud para el manejo de estas condiciones (Sanchez, 2024). Este incremento subraya la necesidad urgente de mejorar las estrategias de tratamiento y manejo de heridas en Panamá, para reducir la carga económica y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

La cicatrización de heridas es un proceso dinámico y complejo que está influenciado por una serie de cascadas y factores que en conjunto conducen al cierre de la herida. El éxito en la recuperación de la piel depende de la secuencia de eventos implicados en las respuestas celulares, bioquímicas y moleculares (Wilkinson & Hardman, 2020); por ello, mejorar el manejo de las lesiones cutáneas representa un desafío multifactorial, dado el carácter intrincado de la cicatrización de heridas. En el caso, de las heridas agudas, si no se manejan adecuadamente, pueden convertirse en heridas más complejas de tipo crónico, lo que exige un enfoque interdisciplinario por parte del equipo médico (p. ej., dermatólogo, enfermera, etc.) para promover la recuperación del tejido con daño crónico. Esto requiere una comprensión sinérgica de las posibles intervenciones biomédicas que permitirían en el restablecimiento de las cascadas de cicatrización, que han sido frenadas y reprimidas por la cronicidad de la herida.

El proceso de recuperación de las lesiones crónicas no solo es fundamental para la salud física del paciente, sino que también tiene un impacto significativo en la calidad de vida de los familiares. Una cicatrización efectiva no solo reduce el riesgo de infecciones y complicaciones secundarias, sino que también promueve una recuperación más rápida, reducción del dolor y un menor coste sanitario (Wu & Li, 2024). Por el contrario, una cicatrización deficiente puede conducir a una serie de problemas, desde la formación de queloides hasta úlceras crónicas, lo que resulta en un deterioro de la salud y una disminución de la calidad de vida en el paciente crónico (Chhabra et al., 2017). Además, las heridas crónicas cutáneas requieren tratamientos prolongados y costosos, lo que implica una carga significativa tanto para los sistemas de salud como para los pacientes y sus familias.

Por ello, la generación de aplicaciones biotecnológicas que facilite la cicatrización de la herida y la absorción del exudado es crucial para que las lesiones crónicas puedan recuperarse, de forma adecuada. La utilización de andamios bioactivos puede ayudar a reducir el número de heridas agudas que se convierten en crónicas, promoviendo así una mejor curación, reduciendo las complicaciones asociadas y ayudando a tener un mejor sistema de salud

sociosanitario. Ante este escenario, la implementación de tecnologías avanzadas en la generación de andamios biotecnológicos, que sean innovadores y propiedades bioactivas regenerativas puede ofrecer una solución prometedora para la mejora de los pacientes, disminuyendo la necesidad de tratamientos prolongados y mejorando significativamente su calidad de vida.

### **1.3.2. DESAFÍOS EN INVESTIGACIÓN DE APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS PARA HERIDAS CUTÁNEAS**

El desarrollo de modelos de laboratorio juega un papel fundamental en este entendimiento, al permitir la replicación controlada de condiciones específicas y el estudio detallado de las respuestas biológicas implicadas en la cicatrización. Estos modelos, como cultivos celulares, permiten a los investigadores manipular variables específicas y observar cómo afectan el proceso de cicatrización. Además, permiten la evaluación de la eficacia y la seguridad de nuevas terapias en un entorno biológico.

El uso de fármacos químicos en el manejo de heridas puede ofrecer beneficios terapéuticos significativos, sin embargo, puede conllevar el riesgo de efectos secundarios no deseados. Por lo tanto, es esencial buscar un equilibrio entre la eficacia terapéutica y la seguridad del paciente, así como explorar enfoques alternativos (Saghazadeh et al., 2018). El uso de apósitos, por su parte, se ha convertido en una práctica estándar para el manejo de heridas. La variedad de apósitos disponibles en el mercado refleja la diversidad de enfoques en el cuidado de heridas, desde parches simples hasta innovaciones más avanzadas. Estos apósitos desempeñan un papel crucial en la creación de un entorno óptimo para la cicatrización. Al mantener la herida limpia, húmeda y protegida de agentes externos, los apósitos pueden acelerar el proceso de curación y reducir el riesgo de complicaciones.

Sin embargo, a pesar de los avances en este campo, aún enfrentamos una serie de desafíos importantes. La efectividad de muchos tratamientos actuales sigue siendo limitada, y la cicatrización de heridas sigue siendo un problema persistente. Los apósitos tradicionales, como las gasas y vendajes, presentan múltiples desventajas, incluyendo la incapacidad para mantener un ambiente húmedo, el riesgo de infecciones, y la adherencia al lecho de la herida que puede causar trauma y dolor al retirarse. Estas limitaciones subrayan la necesidad de desarrollar nuevos materiales y enfoques que puedan superar estas barreras.

La comprensión del proceso de cicatrización y el desarrollo de intervenciones efectivas son fundamentales para mejorar los resultados clínicos y reducir la carga médica asociada. Los modelos de laboratorio desempeñan un papel crucial al permitir una comprensión más profunda de los mecanismos subyacentes de la cicatrización de heridas, lo que a su vez facilita el diseño y la evaluación de nuevos tratamientos. La investigación en este campo es esencial para desarrollar tratamientos más efectivos y avanzados.

El desarrollo de un material de apósito que aborde los principales factores que interfieren en el proceso de cicatrización ayudará enormemente a los pacientes y a los profesionales del

cuidado de heridas. La inversión en investigación y desarrollo de apósitos avanzados puede ofrecer soluciones más eficaces y seguras, que no solo mejoren la tasa de cicatrización, sino que también reduzcan el dolor, el riesgo de infección y el costo general del tratamiento. Esto es crucial no solo para la salud individual de los pacientes, sino también para la sostenibilidad y eficiencia de los sistemas de salud a nivel global.

### 1.3 OBJETIVOS

- **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar biotecnologías innovadoras para aplicaciones de lesiones cutáneas crónicas.

- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Desarrollar andamios biotecnológicos ecosustentables para aplicaciones en lesiones cutáneas crónicas.
2. Desarrollar estudios *in vitro* de los andamios biotecnológicos mediante técnicas de biología celular, molecular y bioingeniería.

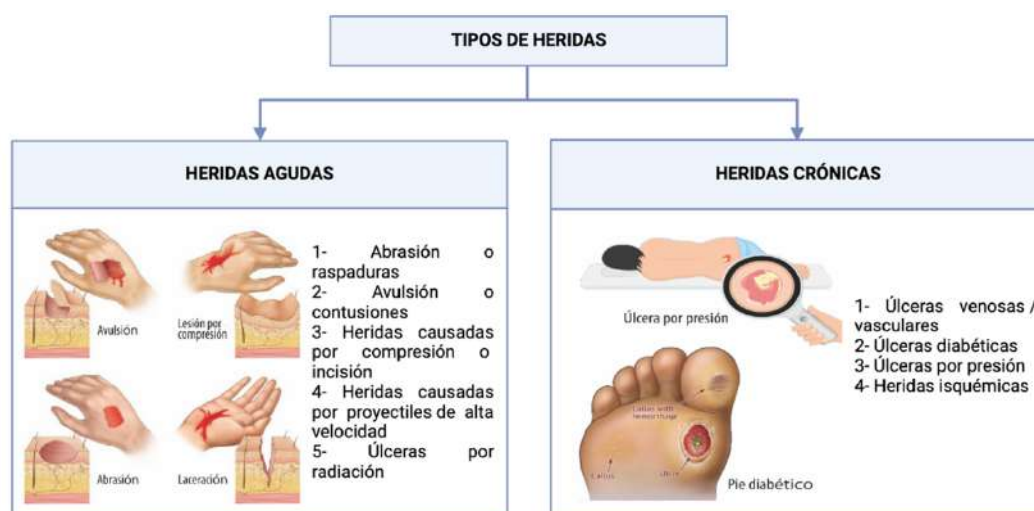
# **CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

## 2.1. CLASIFICACIÓN DE LAS HERIDAS CUTÁNEAS

La piel es el órgano más grande y extenso del cuerpo humano, lo que la hace especialmente susceptible a enfermedades, lesiones y quemaduras. Las heridas en la piel, son lesiones que pueden presentarse como desgarros, fracturas o defectos anormales, representan una preocupación importante debido a su necesidad de tratamiento (Nisar et al., 2023). Estas heridas pueden ser causadas por una variedad de factores, incluyendo condiciones patológicas, factores endógenos (como diabetes, tumores malignos y enfermedades vasculares), traumas físicos y quemaduras (Percival, 2002).

Las heridas cutáneas se definen como la alteración de la integridad de la piel debido a factores tanto externos como internos. Los factores externos también denominados factores ambientales dañan la piel de forma exógena, como lesiones accidentales; mientras que los factores internos son causados por desregulaciones en las vías metabólicas, como lesiones de pie diabético. Actualmente, existe una amplia variedad de heridas cutáneas y se pueden clasificar según sus causas (Irfan-Maqsood, 2018) en: heridas crónicas, como úlceras cutáneas, y heridas agudas, como cortes de cuchillo.

Las heridas crónicas, que incluyen úlceras venosas/vasculares, úlceras diabéticas, úlceras por presión y heridas isquémicas, se caracterizan por un desequilibrio extenso en el tiempo de la recuperación de la homeostasis de la zona dañada, lo que conlleva a un largo período de cicatrización. En contraste, las heridas agudas tienden a cicatrizar en un período de tiempo más corto y equilibrado (**Figura 3**) (Moreo, 2005; Mustoe, 2004).



**Figura 3.** Tipos de lesiones cutáneas. Se muestra la clasificación de las heridas en dos categorías principales: heridas agudas y heridas crónicas. Las heridas agudas incluyen abrasiones o raspaduras, avulsión o contusiones, heridas causadas por compresión o incisión, heridas causadas por proyectiles de alta velocidad y úlceras por radiación. Estas heridas suelen resultar de eventos traumáticos y tienden a sanar en un tiempo relativamente corto si se manejan adecuadamente. Por otro lado, las heridas crónicas comprenden úlceras venosas o vasculares, úlceras diabéticas, úlceras por presión y heridas isquémicas. Las heridas crónicas son generalmente de larga duración y pueden requerir tratamientos especializados debido a su resistencia a la cicatrización y la presencia de condiciones subyacentes que complican su manejo. (Diseño: Digna Yau)

### **2.1.1. HERIDAS AGUDAS (CICATRIZANTES)**

Una herida es una lesión del tejido cutáneo que rompe su continuidad debido a una agresión o trauma. Las heridas agudas son lesiones recientes, de cualquier etiología, que se espera que progrese a través de las fases secuenciales normales de cicatrización: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación. Son las lesiones cotidianas y comunes en la vida diaria y pueden ser causadas por cortes, rasguños, cirugías o traumatismos y que unas 2-3 semanas son capaces de recuperarse por completo (Kekonen & Viik, 2021).

Las heridas agudas exhiben un equilibrio preciso y exacto en la producción y degradación de células y de la matriz extracelular, lo que permite una cicatrización ordenada y tardan sólo unos pocos días y/o semanas en promover la recuperación de la zona dañada. Se clasifican en diversas categorías según el tipo de factores ambientales presentes en la lesión; generalmente, se dividen en dos categorías principales: heridas traumáticas y heridas quirúrgicas (Irfan-Maqsood, 2018).

La literatura identifica seis categorías de heridas traumáticas o quirúrgicas agudas: abrasiones o raspaduras, avulsiones o contusiones, heridas por aplastamiento o corte, laceraciones, heridas por proyectil y heridas por radiación (Irfan-Maqsood, 2016; Leaper, 2006). Las abrasiones o raspaduras se producen cuando una superficie áspera entra en contacto con la piel, causando fricción. Ejemplos de estas, incluyen: quemaduras causadas por cuerda o rodillas raspadas (Chu et al., 2014). Las avulsiones o contusiones son heridas causadas por un golpe violento en el cuerpo o por la separación forzada de una parte de este. Ejemplos, incluyen: fracturas óseas por impacto de un objeto como una pelota, lesiones por explosiones, mordeduras de animales, pérdida de un diente permanente, uñas arrancadas o lóbulos de orejas desgarrados (Kostka et al., 2014). Las heridas por aplastamiento o corte ocurren cuando un objeto pesado cae sobre una persona, resultando en el aplastamiento de una parte del cuerpo o en el corte de estructuras corporales con un instrumento afilado. Esto puede incluir lesiones de tráfico, quirúrgicas o domésticas, así como la penetración de la piel con clavos o cuchillos. Estas heridas pueden ser superficiales o profundas, dañando la epidermis o las estructuras internas (dermis y parte de la hipodermis) del cuerpo, respectivamente (Karimkhani et al., 2014). Las laceraciones, también conocidas como desgarros de estructuras corporales, requieren una gran fuerza contra el cuerpo para producirse. Pueden ser causadas por factores internos, como el parto, o externos, como golpes en el cuerpo (Lawton & Hadj, 2014; Said et al., 2015). Las heridas por proyectil o velocidad ocurren cuando un objeto de alta velocidad, como una bala, penetra en el cuerpo. Ejemplos incluyen heridas de bala o trauma balístico (Kummoona, 2011). Por último, las heridas por radiación o úlceras, que son lesiones causadas por los efectos agudos o crónicos de la radiación ionizante. Estas lesiones pueden afectar la piel, los tejidos blandos subyacentes e incluso estructuras más profundas como el hueso (Irfan-Maqsood, 2018; Rudolph et al., 1982).

### **2.1.2. HERIDAS CRÓNICAS (NO CICATRIZANTES)**

En algunos casos, una herida aguda puede extender en el tiempo y evolucionar a una herida crónica, la cual no avanza más allá de la fase inflamatoria y puede permanecer sin cicatrizar

durante meses, años o incluso indefinidamente (Kekonen & Viik, 2021). Cuando una herida no muestra signos de cicatrización dentro de un plazo de 12 semanas bajo un tratamiento adecuado, se le considera una lesión cutánea crónica o no cicatrizante (Harding et al., 2002). Este tipo de heridas pueden derivarse de heridas agudas que no sanan adecuadamente, a menudo debido a infecciones persistentes que no son tratadas eficazmente. Sin embargo, en muchos casos, las heridas crónicas son el resultado de un deterioro progresivo del tejido, causado por condiciones subyacentes como enfermedades vasculares, lesiones por presión, radiación o tumores (Enoch, 2006).

Cuando el flujo sanguíneo normal hacia un área de tejido se ve comprometido, independientemente de la causa, se produce un desequilibrio en el suministro de nutrientes y oxígeno, lo que puede llevar a la muerte del tejido. En tales casos, la capacidad del cuerpo para iniciar el proceso de cicatrización se ve gravemente afectada, ya que la falta de oxígeno y nutrientes impide los procesos de granulación y epitelización, produciendo un estancamiento en la fase inflamatoria de la cicatrización. Además, la presencia de tejido necrótico y bacterias en la herida puede provocar una mayor degradación del tejido circundante. Por lo tanto, se hace necesaria el desarrollo de intervenciones terapéuticas para que la herida pueda cicatrizar, forma inducida (Boateng et al., 2008).

Es importante tener en cuenta que muchas de las causas subyacentes de las heridas no cicatrizantes (p. ej., enfermedades autoinmunes, insuficiencia vascular) son comunes en pacientes tanto hospitalizados, como ancianos. Muchas de las heridas crónicas se asocian con trastornos metabólicos, lo que conlleva que su proceso de cicatrización es significativamente más prolongado (Farrar, 2011). Además, se caracterizan por una disfunción en la producción y degradación celular, así como en la matriz extracelular, incluyendo el colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas (Xue & Jackson, 2013). Por lo general, estas heridas se clasifican en categorías como úlceras venosas/vasculares, úlceras diabéticas, úlceras por presión y heridas isquémicas (Irfan-Maqsood, 2018; Moreo, 2005).

Las úlceras venosas/vasculares, también conocidas como úlceras de estasis o dermatitis, son una forma crónica de heridas que afectan principalmente a la extremidad inferior, es decir, las piernas, representando más del 70% de todas las heridas crónicas (Nelson & Jones, 2008). Estas úlceras son generalmente el resultado de procesos inflamatorios que incluyen la activación de leucocitos, daño endotelial, agregación plaquetaria y edema intracelular. Suelen manifestarse en la vejez, asociadas a condiciones como la obesidad, lesiones previas o trombosis venosa profunda (Brem et al., 2004). Por otro lado, las úlceras diabéticas son otro tipo común de heridas crónicas, originadas por condiciones diabéticas. En estas heridas, el principal mecanismo involucrado es el desequilibrio hormonal, asociado a una baja de la función del sistema inmunológico y el desarrollo de condiciones neuropáticas (Mustoe, 2004). En ambos casos, la lesión cutánea puede pasar desapercibida debido a la neuropatía y al sistema inmunológico comprometido, lo que conduce a una mayor susceptibilidad a las infecciones y al desarrollo de heridas crónicas.

Las úlceras por presión, o úlceras de decúbito, constituyen la tercera forma de heridas crónicas y suelen afectar a personas con condiciones de baja movilidad, tales como: hospitalizados, postoperatorios y la población envejecida. La inmovilidad del cuerpo provoca la isquemia de los tejidos, ya que la presión sobre estos supera la presión en los capilares, lo que restringe el flujo sanguíneo, especialmente en los músculos. Esto causa la ruptura de la piel y la formación de úlceras (Sodeman & Sodeman, 2005). Del 60% al 80% de pacientes con movilidad reducida (p. ej., pacientes con lesión de la médula espinal) desarrollan úlceras de presión. Muchos pacientes desarrollan su primera úlcera durante su estancia inicial tras la lesión, y la tendencia continúa durante toda su vida (Spangler, 2007). La gravedad de las úlceras por presión se ha caracterizado tradicionalmente por el grado de degradación, desde el grado I (menos grave) hasta el grado IV (más grave) (Ho & Bogie, 2008).

Finalmente, las heridas isquémicas son otro tipo de heridas crónicas ocasionadas por la restricción del suministro sanguíneo a los tejidos, lo que resulta en una insuficiente oxigenación y aporte de glucosa necesarios para el metabolismo celular (Xue et al., 2009).

## **2.2. PROCESO DE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS CUTÁNEAS**

La cicatrización de heridas es un proceso dinámico y cuidadosamente orquestado que involucra células sanguíneas, citoquinas, células parenquimatosas (como los fibroblastos) y la reorganización de la matriz extracelular. En una herida normal, este proceso es capaz de restaurar la integridad funcional de la dermis y la epidermis de manera secuencial y oportuna (Castilla et al., 2012).

Una molécula moduladora que es clave en la cicatrización normal de heridas es el oxígeno, ya que es necesario para varios procesos cruciales, como: la deposición de colágeno, la epitelización, la fibroplasia, la angiogénesis y la resistencia a las infecciones. Por lo tanto, una limitación en la entrega de sangre rica en oxígeno al tejido de la herida impide la normal cicatrización en la zona dañada (Castilla et al., 2012). La limitación en la entrega de oxígeno a la herida suele ser multifactorial (p. ej., hipoxia tisular, edema, enfermedades vasculares periféricas); sin embargo, el desbalance fisiológico es el mismo y que corresponde a la generación de un microambiente hipóxico (privado de oxígeno) caracterizado por una entrega insuficiente de nutrientes y oxígeno en el tejido lesionado / dañado. En este contexto, el estado de oxigenación en la herida es uno de los principales determinantes en el correcto proceso de cicatrización tisular (Greif et al., 2000).

Por ello, cuando un tejido se enfrenta a una condición hipóxica aguda, de leve a moderada, generalmente es capaz de promover procesos de adaptación sistémica (Sen, 2009); por el contrario, cuando el tejido que enfrenta una hipoxia crónica y severa se produce la muerte tisular. Así es como, en una herida tisular, un aumento leve de las presiones parciales elevadas de oxígeno (hiperoxia moderada) puede estimular la producción de factores de crecimiento y la formación de nuevos vasos sanguíneos; mientras que una hiperoxia extrema puede inducir muerte celular por daño mitocondrial y aumento de estrés oxidativo. Por lo tanto, la complejidad inherente del proceso de cicatrización exige una combinación precisa de

señalización celular hipóxica y mecanismos de defensa antioxidante asociados a una oxigenación adecuada del tejido (Sen, 2009).

La cicatrización de heridas es un proceso fundamental que ocurre en todos los tejidos y órganos del cuerpo. Aunque este proceso es continuo, se divide en diferentes fases para facilitar la comprensión de los complejos procesos fisiológicos involucrados (Komarcević, 2000). Se trata de un proceso complejo que implica la coordinación de diversos sistemas inmunológicos y biológicos, con una secuencia precisa de eventos que coincide con la aparición de diferentes tipos de células en el área de la herida durante las distintas fases de cicatrización (Broughton et al., 2006).

Es importante destacar que diferentes partes de una herida pueden estar en distintas etapas de cicatrización al mismo tiempo. Además, de la temporalidad de los procesos y las diversas interacciones entre los componentes que intervienen en el proceso de cicatrización, también pueden variar según se trate de heridas agudas o crónicas, aunque las fases principales permanecen consistentes (Robert F Diegelmann & Melissa C Evans, 2004).

Los procesos de reparación de tejidos, desencadenados por la lesión, pueden agruparse en una secuencia de cuatro fases dependientes del tiempo:

- (i) coagulación y hemostasia, que inicia inmediatamente después de la lesión;
- (ii) inflamación, que comienza poco después;
- (iii) proliferación, que se desarrolla en los días siguientes a la lesión e involucra los principales procesos de curación; y
- (iv) remodelación de la herida, durante la cual se forma el tejido cicatricial.

El proceso de cicatrización cutáneas, en su totalidad, puede extenderse desde un par de semanas (herida aguda) hasta por muchos meses / años (herida crónica) (**Figura 4**) (Hunt et al., 2000a; Vanwijck, 2001).



**Figura 4. Cronología de las etapas de cicatrización de heridas agudas y crónicas.** Se ilustra las fases del proceso de cicatrización tanto en heridas agudas como crónicas. En las heridas agudas, el proceso de cicatrización se divide en cuatro etapas principales: coagulación y hemostasia (alrededor de 1 hora), inflamación (temprana, de 1-2 días y tardía, de 3-4 días), proliferación (de 4 a 21 días) y remodelación (hasta 3 meses). Este proceso está diseñado para ser eficiente y resolver rápidamente la lesión. Por otro lado, el

proceso de cicatrización en heridas crónicas se caracteriza por un estancamiento en la fase inflamatoria, lo que resulta en una duración mayor a 3 meses. Las heridas crónicas a menudo no progresan a las fases de proliferación y remodelación de manera eficiente, lo que retrasa significativamente la cicatrización y puede requerir intervenciones médicas especializadas. (Diseño: Digna Yau).

A continuación, se explican con detalle las etapas de las fases de la cicatrización:

### **2.2.1. FASE DE HEMOSTASIA**

El primer evento molecular que ocurre tras una lesión cutánea es el desencadenamiento del proceso de coagulación y hemostasia en la herida (Broughton et al., 2006). Este proceso se caracteriza por tres etapas: (i) vasoconstricción, (ii) formación del tapón plaquetario y (iii) coagulación, que generalmente se completa en las primeras horas tras la lesión (**Figura 5**). El propósito principal de estos mecanismos es detener el sangrado después de un daño vascular (Pool, 1977), protegiendo así el sistema vascular para mantener intacta la función de los órganos vitales a pesar de la lesión. Además, a largo plazo, proporcionan una matriz para las células invasoras necesarias en las fases posteriores de la cicatrización (Robson, 2001).

Cuando la piel sufre una herida, la vasoconstricción de las paredes vasculares es la primera respuesta para detener el sangrado; luego, la hemostasia primaria y secundaria ocurren de manera simultánea y estrechamente relacionada (Furie & Furie, 2008). La fase inicial de la hemostasia implica la unión y agrupación de plaquetas para formar un tapón plaquetario, que es inducido por la exposición del colágeno en la matriz subendotelial. Por otro lado, la hemostasia secundaria se caracteriza por la activación de la cascada de coagulación, durante la cual el fibrinógeno soluble se transforma en fibrina insoluble, generando una red que refuerza el tapón plaquetario. Estas dos etapas culminan en la formación de un trombo que detiene el sangrado, libera compuestos y factores de crecimiento, y proporciona una estructura provisional para las células que infiltran la herida y son necesarias para su cicatrización (Pool, 1977).

Además de su papel en la coagulación, las plaquetas son esenciales para reclutar células inmunes en el sitio de la lesión cutánea. Pueden capturar directamente células inmunes en la zona de la herida o liberar un conjunto de señales químicas atractivas, como quimiocinas, durante la desgranulación (Golebiewska & Poole, 2015a). Al ser las células más abundantes durante las primeras etapas de la reparación, las plaquetas juegan un papel crucial en la inhibición temprana de las infecciones bacterianas. Por otro lado, el fibrinógeno es un componente esencial en el proceso de cicatrización, el cual forma una red de fibrina que estabiliza el coágulo (Golebiewska & Poole, 2015b). En condiciones no lesionadas, las plaquetas están protegidas de la activación prematura por el endotelio vascular intacto (Rumbaut, 2010); aunque, el fibrinógeno circula en la sangre y también está presente en las plaquetas, no se convierte en fibrina, que es crucial para la formación del coágulo sanguíneo (Kaplan et al., 1979).

Las plaquetas activadas liberan citocinas y factores de crecimiento, incluyendo tromboxano A-2 y serotonina, que son importantes mediadores inflamatorios y que también causan

vasoconstricción. El coágulo también sirve para concentrar las citocinas y los factores de crecimiento elaborados, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ 1) (Singer & Clark, 1999). La coagulación da inicio al proceso de hemostasia, que desencadena el proceso inflamatorio mediante la activación de mensajeros moleculares. Por ello, la deficiencia de factores de coagulación (Factor VII, IX, XII) conduce a una cicatrización deficiente de las heridas (Beck et al., 1961).

### **2.2.2. FASE INFLAMATORIA**

Después de detener el sangrado, comienza la etapa de inflamación, que puede durar de 2 a 5 días, completándose generalmente en las primeras 48 a 72 horas, aunque en ocasiones puede extenderse hasta 5 a 7 días (Cañedo-Dorantes & Cañedo-Ayala, 2019; Haas, 1995). Esta etapa se caracteriza por procesos de vasoconstricción iniciales, seguidos de una dilatación y un aumento de la permeabilidad vascular en respuesta a sustancias bioactivas (p. ej., histamina, serotonina) (Fernández-Guarino et al., 2023) (**Figura 5**).

La inflamación innata se ha desarrollado como la respuesta principal contra el ingreso de agentes patógenos en las heridas cutáneas. Este proceso inmunológico se desencadena por señales inducidas por lesiones, como los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, por las siglas en inglés: Danger Associated Molecular Pattern) liberados por células necróticas y tejido dañado, así como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por las siglas en inglés: Pathogen-associated molecular patterns) presentes en componentes bacterianos. Estos patrones activan células inmunitarias residentes como mastocitos, células de Langerhans, células T y macrófagos, al unirse a los receptores de reconocimiento de patrones, desencadenando vías inflamatorias (Chen & DiPietro, 2017).

La fase inflamatoria se compone de dos etapas distintas: una fase inflamatoria temprana y una fase inflamatoria tardía (Hart, 2002). Durante la fase temprana, se activan eventos moleculares que atraen neutrófilos al sitio de la herida (Hess, 2000). Los neutrófilos dentro de las 24-36 horas posteriores a la lesión eliminan el material extraño, agentes patógenos (p. ej., bacterias) y el tejido dañado mediante la liberación de enzimas proteolíticas y especies reactivas de radicales libres derivados de oxígeno (Broughton et al., 2006; Flanagan, 2000). Posteriormente, los neutrófilos son eliminados de la herida; y durante la fase inflamatoria tardía, los macrófagos aparecen en la herida para la continuación del proceso de fagocitosis, antes de avanzar a la siguiente fase de cicatrización (Ennis & Meneses, 2000; Velnar et al., 2009). Además de su función fagocítica, los macrófagos actúan como células reguladoras del proceso inflamatorio y, además son capaces de almacenar una serie de factores de crecimiento tisular importantes para las siguientes etapas del proceso (R. F. Diegelmann & M. C. Evans, 2004; Ramasastry, 2005). Finalmente, las últimas células en entrar en el sitio de la herida (en la fase inflamatoria tardía) son los linfocitos, que desempeñan un papel importante en la regulación de la remodelación de la matriz extracelular del colágeno y su degradación tisular (Hunt et al., 2000b).

Este proceso conlleva la liberación de citocinas proinflamatorias y quimiocinas que atraen leucocitos circulantes al sitio de la lesión. Además, las moléculas proinflamatorias estimulan la

vasodilatación y la expresión de moléculas de adhesión celular endotelial, facilitando la adherencia y migración de neutrófilos y monocitos hacia el área afectada (Vestweber, 2015). Una vez en la herida, los neutrófilos son reclutados en la herida desde los vasos dañados, atraídos por quimioatrayentes, como la interleucina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y endotoxinas bacterianas como el lipopolisacárido (LPS) (Kolaczowska & Kubes, 2013). En respuesta a las señales proinflamatorias y la activación inflamatoria, los neutrófilos fagocitan y eliminan el tejido necrótico y los patógenos (Segel et al., 2011). La respuesta inflamatoria es un proceso complejo, modulado por una variedad de factores intrínsecos y extrínsecos. La inflamación descontrolada y excesiva puede provocar daño tisular y retrasar el proceso de cicatrización (Boniakowski et al., 2017). Por lo tanto, las respuestas de las células inmunes deben ser precisas y proporcionadas, aumentando para combatir la infección, pero también permitiendo la resolución efectiva de la herida.

Además, los monocitos circulantes ingresan a nivel sistémico a través de la herida cutánea, en donde se diferencian en macrófagos en respuesta al microambiente local. Los macrófagos, se presentan como células efectoras de la reparación tisular que muestran gran versatilidad y alta plasticidad (Das et al., 2015). Al igual que los neutrófilos, los macrófagos eliminan los restos celulares necróticos y los agentes patógenos mediante receptores conservados evolutivamente, pero también exhiben comportamientos diferenciales y cambios morfológicos en respuesta a citocinas (Mantovani et al., 2005).

Aunque los neutrófilos y los macrófagos son esenciales en la respuesta inicial a las heridas, otros tipos celulares como los linfocitos T y los mastocitos también desempeñan roles importantes. Los linfocitos T residentes son críticos para la respuesta temprana a la lesión, mientras que los linfocitos T circulantes son reclutados para resolver la inflamación (Nosbaum et al., 2016). Los mastocitos liberan histamina para ayudar al reclutamiento de neutrófilos durante la inflamación temprana (Weller et al., 2006).

### **2.2.3. FASE DE PROLIFERACIÓN**

La fase de proliferación abarca los principales procesos de cicatrización y comienza alrededor del tercer día, después ocurrida la herida cutánea y puede continuar por hasta 3 o 4 semanas (Vitale et al., 2022). Se caracteriza por la aparición de fibroblastos en la zona de la herida y se superpone con la fase inflamatoria (**Figura 5**). Al igual que en otras fases, los cambios en esta etapa no suceden de manera lineal, sino que se superponen en el tiempo.

Esta fase se subdivide en cuatro etapas fundamentales: formación del tejido de granulación, angiogénesis, epitelización y contracción. La formación del tejido de granulación comienza alrededor del tercer o cuarto día después de la lesión, alcanzando su punto máximo entre el séptimo y decimocuarto día. Durante este proceso, los fibroblastos migran desde los bordes de la herida utilizando la matriz provisional de fibrina creada durante la fase inflamatoria (Cialdai et al., 2022). Bajo la influencia de factores de crecimiento, como el Factor de Crecimiento Transformador-Beta (TGF- $\beta$ ), el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, del inglés, Basic Fibroblast Growth Factor) que son secretados por macrófagos (Thulabandu et al., 2018); mientras que los fibroblastos proliferan

y sintetizan componentes de la matriz extracelular, tales como: glicosaminoglicanos, proteoglicanos, elastina, colágeno y fibronectina (Ather et al., 2019). A medida que el número de macrófagos disminuye, los fibroblastos comienzan a secretar los mismos factores de crecimiento, así como factores adicionales como el factor de crecimiento de queratinocitos y el factor de crecimiento de insulina I. Así es como, la deposición de colágeno resultante proporciona resistencia a la tracción de la herida, mientras que las células involucradas en procesos inflamatorios, angiogénesis y construcción de tejido conectivo se adhieren, proliferan y se diferencian en la matriz de colágeno producida por los fibroblastos (Ruszczak, 2003).

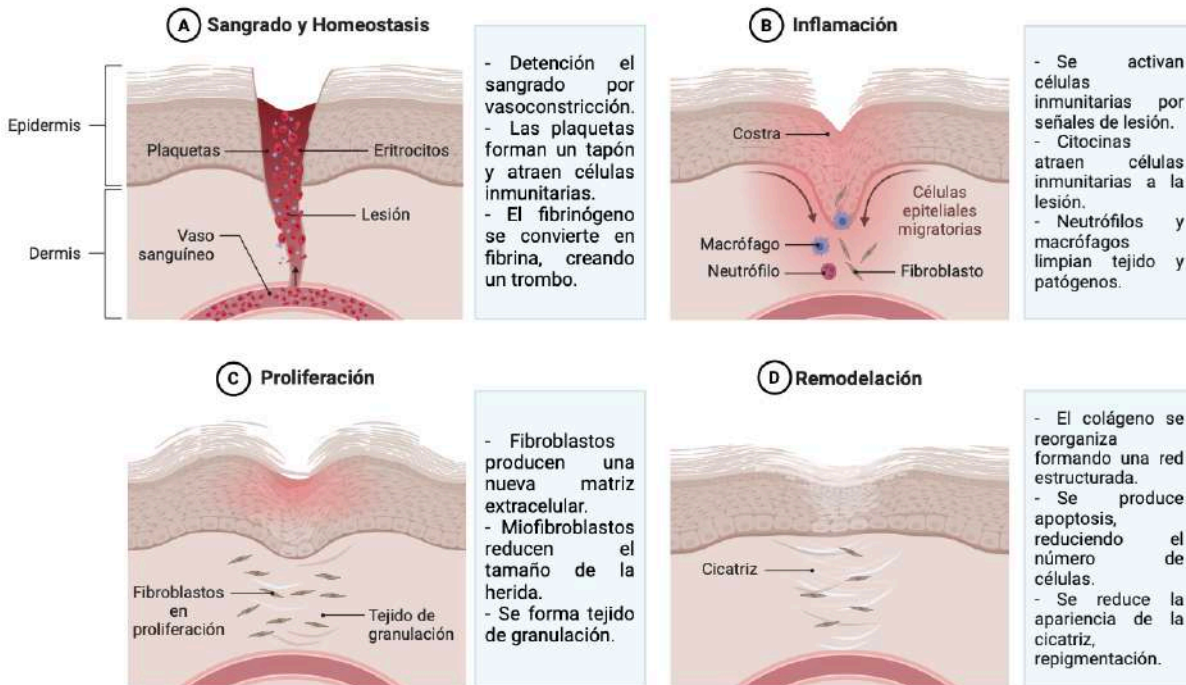
Simultáneamente, la angiogénesis, esencial para en el proceso de la formación de la cicatriz cutánea, acompaña a la fase de fibroplasia. Las células endoteliales, estimuladas por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) secretado por diferentes células, incluyendo queratinocitos, macrófagos, fibroblastos y plaquetas, invaden la herida mediante la degradación del coágulo de fibrina, estableciendo nuevos vasos sanguíneos que más tarde se organizan en capilares y establecen el flujo sanguíneo (Greenhalgh, 1998). La epitelización comienza con la migración de células epiteliales desde los márgenes de la herida, estimuladas por factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el TGF- $\alpha$  producidos por plaquetas activadas y macrófagos (Lawrence & Diegelmann, 1994). Posteriormente, los queratinocitos proliferan y migran hacia el lecho de la herida, formando nuevas uniones con la membrana basal, una vez que las células migratorias a través de inhibición por contacto, detienen su proceso migratorio (Garrett, 1998).

Estos eventos culminan en la formación del tejido de granulación, que consiste en células inflamatorias, fibroblastos y una nueva red vascular, todo enmarcado dentro de una matriz extracelular, rica en glicoproteínas, colágeno y glicosaminoglicanos (Ruszczak, 2003). Esta matriz provisional, es muy diferente en composición a la del tejido normal, es capaz de proporcionar el entorno adecuado para el proceso de cicatrización. Finalmente, la contracción de la herida, iniciada aproximadamente una semana después de la lesión, se lleva a cabo por miofibroblastos derivados de los fibroblastos, reduciendo el tamaño de la herida y facilitando la reepitelización (Eichler & Carlson, 2006). A medida que la fase de granulación llega a su fin, los fibroblastos experimentan apoptosis, transformando el tejido de granulación en un entorno rico en colágeno (Stadelmann et al., 1998).

#### **2.2.4. FASE DE REMODELACIÓN**

La maduración y remodelación del colágeno, representa la etapa final del proceso de cicatrización, abarcando desde el día 8 hasta 3 meses después de la lesión, dependiendo de la gravedad de la lesión (**Figura 5**); por ello, cuando este proceso se ve comprometido, la fuerza de la herida se ve significativamente afectada. Por otro lado, una síntesis excesiva de colágeno puede conducir a la formación de cicatrices hipertróficas o queloides. La duración de la fase de maduración puede extenderse por dos años o incluso más, dependiendo del tamaño de la herida (Ather et al., 2019). Conforme la herida va cicatrizando, el crecimiento de los capilares y flujo sanguíneo se detienen, la densidad de fibroblastos y macrófagos y la actividad metabólica decrece (Attinger et al., 2006; Baum & Arpey, 2005). El resultado final es una cicatriz completamente madura con un número reducido de células y vasos sanguíneos, y una alta

resistencia a la tracción (Attinger et al., 2006). Aunque la mayoría de las heridas son el resultado de lesiones simples, factores sistémicos y locales pueden alterar y ralentizar el curso del proceso de reparación finamente equilibrado, lo que lleva a la aparición de heridas que no cicatrizan de manera oportuna y ordenada, evolucionando en heridas crónicas no cicatrizantes. Por lo tanto, según la capacidad del tejido para reparar completamente la herida, estas se clasifican generalmente como heridas agudas o crónicas (Vitale et al., 2022).



**Figura 5.** Proceso de cicatrización de heridas. El proceso de cicatrización de heridas se categoriza comúnmente en cuatro fases distintas: **(A)** Homeostasis (coagulación), caracterizado por la formación de un coágulo para detener la hemorragia; **(B)** Fase Inflamatoria (inflamación temprana/tardía), caracterizado por la eliminación de bacterias y restos celulares mediante la respuesta inflamatoria; **(C)** Fase Proliferativa, caracterizado por la formación de tejido de granulación, angiogénesis, epitelización y contracción de la herida; **(D)** fase de remodelación, donde se da la reorganización y fortalecimiento del tejido cicatricial. (Diseño: Digna Yau).

### 2.3. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS, BASADAS EN PARCHES INNOVADORES COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA DE LAS LESIONES CUTÁNEAS

El tratamiento de heridas ha experimentado una evolución significativa a lo largo del tiempo, con una serie de cambios y mejoras que han surgido en el proceso. En este sentido, se han desarrollado diversas formas terapéuticas para el tratamiento de las lesiones cutáneas, clasificadas dependiendo de su función en el tratamiento de la herida (como desbridamiento, antibacteriano, oclusivo, absorbente, adherente), el tipo de material utilizado para producir el apósito (por ejemplo, hidrocoloide, alginato, colágeno) y la forma física del apósito (pomada, película, espuma, gel) (**Tabla 1**) (Boateng et al., 2008; Deutsch et al., 2017; Rezvani et al., 2019).

Los apósitos se subdividen en primarios, secundarios y apósitos tipo isla. Los apósitos primarios son aquellos que tienen contacto físico con la superficie de la herida, mientras que los apósitos secundarios se aplican sobre el apósito primario y los apósitos tipo isla cuentan una región absorbente central rodeada por una porción adhesiva (Sonar et al., 2021). Además, existen criterios de clasificación adicionales, que incluyen apósitos tradicionales, modernos y avanzados, así como los productos de reemplazo de piel y dispositivos de cicatrización de heridas (Borda et al., 2016). A lo largo del tiempo, se han llevado a cabo numerosos estudios relacionados con diversos tipos de apósitos específicos, contribuyendo al continuo avance en el tratamiento de heridas.

### **2.3.1. APÓSITOS TRADICIONALES**

En cuanto a los apósitos tradicionales para la cicatrización de heridas, estos abarcan una variedad de formulaciones tópicas líquidas y semisólidas, así como apósitos tradicionales secos, como gasa, algodón, apósitos y vendajes, ya sea naturales y/o sintéticos (Dhivya et al., 2015) (**Figura 6**).

Los apósitos tradicionales secos, como la gasa y los vendajes, no proporcionan un entorno húmedo para la herida, se utilizan principalmente como apósitos primarios o secundarios para proteger la herida de contaminaciones, o forman parte de un conjunto de apósitos (Boateng et al., 2008). Los vendajes pueden elaborarse con materiales naturales, como lana de algodón o celulosa, así como materiales sintéticos como la poliamida. Las gasas están fabricadas con fibras tejidas y no tejidas de algodón o poliéster, y deben ser cambiadas regularmente para evitar la maceración del tejido sano subyacente, lo que las hace menos rentables en comparación con apósitos modernos (Harding et al., 2000). Los apósitos tradicionales secos son empleados, principalmente, en heridas limpias y secas o sino, como apósito secundario para absorber exudados y proteger la herida (Morgan, 2002). Aunque estos recursos son económicos y fácilmente accesibles, presentan múltiples limitaciones en su aplicación. Por ejemplo, tienden a adherirse a la herida al secarse, lo que puede dificultar y provocar dolor al retirarlas (Chang et al., 1998); proporcionan poca oclusión y permiten la evaporación de la humedad, lo que puede resultar en una cama de herida deshidratada (Jones, 2006); tienen una efectividad recuperativa que es inferior a los apósitos más modernos (Nguyen et al., 2023) y requieren ser reemplazadas con regularidad para prevenir la saturación del tejido circundante, lo cual incrementa los gastos y provocan daño recurrente al tejido (Boateng et al., 2008). Por consiguiente, en su mayoría, los apósitos tradicionales secos están empezando a ser reemplazados por apósitos modernos debido las ventajas comparativas que tiene en el favorecimiento del proceso de cicatrización.

### **2.3.2. APÓSITOS MODERNOS**

Los apósitos modernos, esenciales en el tratamiento de heridas, se destacan por mantener un entorno húmedo alrededor de la herida, lo que facilita su cicatrización. Estos apósitos pueden ser fabricados con polímeros naturales (p. ej., alginato de sodio, pectina, gelatina) o sintéticos (p. ej., polivinil alcohol, poliuretano, polietileno), y se dividen principalmente en hidrocoloides, alginatos e hidrogeles, películas y espumas (Boateng et al., 2008) (**Figura 6, Tabla 2**).

Los apósitos de hidrocoloide, se componen de dos capas: una interna coloidal y otra externa impermeable al agua. Los materiales gelificantes, que incluyen carboximetilcelulosa, gelatina y pectina, junto con otros agentes como elastómeros y adhesivos, permiten que el apósito forme un gel absorbente al entrar en contacto con el exudado de la herida (Dhivya et al., 2015). Además de su capacidad de absorción, estos apósitos son permeables al agua, pero no tiene características antimicrobianas (Sung & Lee, 2016). El entorno húmedo creado debajo del apósito promueve la síntesis de colágeno y la proliferación de fibroblastos, impulsando la epitelización rápida (Sung & Lee, 2016). Son utilizados comúnmente en heridas con exudado leve a moderado, como úlceras por presión, quemaduras leves y heridas traumáticas. Gracias a sus propiedades oclusivas, proporciona un ambiente óptimo para el desbridamiento autolítico, ayudando a eliminar el tejido necrótico o no viable mediante la acción de las proteasas liberadas por la herida (Koksal & Bozkurt, 2003). Aunque estos apósitos se adhieren tanto a áreas húmedas como secas, no son adecuados para el tratamiento de úlceras neuropáticas o heridas con exudado abundante (Boateng et al., 2008). Es importante destacar que solo se cambian cuando ocurre un drenaje o una fuga, para evitar traumatismos en la herida al retirarlos. Algunos ejemplos de apósitos de hidrocoloide disponibles incluyen Granuflex™, Comfeel™, DuoDerm® y Tegasorb™ (Boateng et al., 2008).

Los apósitos de alginato, elaborados a partir de un polisacárido natural, derivado de algas marinas, constan de cadenas lineales de dos ácidos urónicos, ácido maurónico y ácido gulurónico, que al interaccionar con el calcio son capaces de formar alginato de calcio (Jayakumar et al., 2009). Es uno de los polímeros más utilizados para la fabricación de hidrogeles debido a su buena procesabilidad mediante entrecruzamiento iónico, sostenibilidad ambiental, bajo costo, biocompatibilidad y biodegradabilidad (Lee & Mooney, 2012; Zheng et al., 2022). Los hidrogeles de alginato pueden prepararse mediante diversos métodos de entrecruzamiento (p. ej., gelificación iónica, química, térmica) (Tan et al., 2023); además, tienen una similitud estructural con las matrices extracelulares de los tejidos biológicos lo cual les permite una amplia aplicación en lesiones cutáneas, mediante la entrega de agentes bioactivos y en el encapsulamiento celular (Lee & Mooney, 2012). Los apósitos de alginato mantienen un microambiente fisiológicamente húmedo, minimizan la infección bacteriana en el sitio de la herida y facilitan el proceso de curación (Balakrishnan et al., 2005). Además, los geles de alginato pueden administrarse de forma oral o inyectarse en el cuerpo de manera mínimamente invasiva, lo que permite amplias aplicaciones en el ámbito farmacéutico. Asimismo, los geles de alginato muestran un gran potencial para el trasplante celular en la ingeniería de tejidos, que busca ofrecer sustitutos de tejidos y órganos fabricados por el ser humano a pacientes que han sufrido la pérdida o el fallo de un órgano (Lavik & Langer, 2004). La capacidad de formación de gel se atribuye a la presencia de cationes divalentes, especialmente iones de calcio, que actúan como agentes entrecruzamiento (Kurczewska et al., 2015). Esta propiedad de entrecruzamiento de los iones de calcio con el polímero de ácido algínico hace que los apósitos de alginato de calcio sean adecuados como andamios tridimensionales en ingeniería de tejidos (Kuo & Ma, 2001). Además, estos apósitos poseen una excelente promoción en los mecanismos de coagulación, debido a la presencia de iones de calcio durante la etapa inicial de la cicatrización de la herida (Blair et al., 1990; Segal et al., 1998). Los hidrogeles de alginato pueden utilizarse para heridas en diversos tipos de heridas,

incluyendo heridas agudas como cortes, abrasiones y quemaduras (Boateng et al., 2008). Además, los apósitos de alginato pueden presentarse en forma de láminas porosas liofilizadas (espumas) o como fibras flexibles. Algunos ejemplos de estos apósitos disponibles en el mercado incluyen Kaltostat™, Maxsorb®, Tegagen™ y Comfeel Plus™ (Borda et al., 2016).

Los apósitos de hidrogel, compuestos por polímeros sintéticos (p. ej., metacrilatos y polivinilpirrolidona) o naturales (p. ej., agar-agar, gelatina, alginato de sodio), se entrecruzan para retener agua (Jiang et al., 2016). Se caracterizan por retener entre el 70% hasta el 90% de agua, manteniendo así un ambiente húmedo y elástico alrededor de la herida, reduciendo la irritación y proporcionando alivio del dolor (Jiang et al., 2016). Estos apósitos poseen propiedades únicas que los hacen ideales para el tratamiento de heridas profundas, como su capacidad de no adherencia, retención de humedad, permeabilidad gaseosa, absorción de exudado, biocompatibilidad y comodidad para el paciente. Además, su textura gomosa y baja tensión interfacial, contribuyen a minimizar la irritación y reacciones inflamatorias en áreas adyacentes (Bartkowiakb & Frydrych, 2011). Los apósitos de hidrogel también tienen propiedades elásticas suaves que facilitan su aplicación y remoción sin causar molestias una vez haya sanado la herida. Estos apósitos también reducen la temperatura de las heridas cutáneas, proporcionando un efecto refrescante, que reduce la sensación de dolor. Además, se asemejan al tejido dérmico, con una estructura similar a la matriz extracelular, lo que favorece la migración celular y la regeneración parcial del tejido cutáneo dañado (Mogha et al., 2019). Una gran ventaja adicional es su capacidad de mejorar sus capacidades mediante la adición de compuestos activos, tales como: antibióticos, nanopartículas y factores de crecimiento, lo que permite mayor eficiencia en el tratamiento. Por otra parte, pueden responder a estímulos externos permitiendo la liberación controlada de medicamentos o el monitoreo del proceso de curación (Francesko et al., 2018; Singh et al., 2018). Los hidrogeles no necesitan un apósito secundario, sino simplemente un vendaje para mantener el apósito en su lugar, y pueden ser recortados para adaptarse a la forma de la herida debido a su gran flexibilidad (Boateng et al., 2008). Son utilizados en una variedad de heridas cutáneas, incluyendo heridas necróticas, úlceras por presión, quemaduras y heridas crónicas secas. poseen una capacidad de absorción limitada, por lo que son más adecuados para heridas con exudado leve; por ello, en heridas con exudado abundante, su baja tasa de absorción y la proliferación bacteriana pueden ser un problema, lo que puede llevar a olores desagradables. Algunos ejemplos de apósitos de hidrogel incluyen Nu-gel™, Intrasite™, Aquaform™ y diversos apósitos en láminas (Borda et al., 2016).

Los apósitos de película semipermeable, elaborados con poliuretano transparente adhesivo, delgado y poroso, permiten el paso de oxígeno, dióxido de carbono y vapor de agua de la herida, al mismo tiempo que poseen propiedades de desbridamiento autolítico y son impermeables al líquido y las bacterias (Weller & Sussman, 2006). Son altamente flexibles y elásticos, adaptándose a cualquier contorno sin necesidad de cinta adicional (Boateng et al., 2008). La transparencia de las películas permite inspeccionar el cierre de la herida sin necesidad de retirar el apósito; sin embargo, debido a que estas películas no son absorbentes, no son adecuadas para heridas con exudado abundante, que usuales en pacientes de lesiones crónicas. Por consiguiente, se recomiendan especialmente para heridas en proceso de

epitelización y lesiones superficiales con bajo exudado. Además, pueden ser utilizados como apósitos secundarios para impermeabilizar los apósitos primarios. Es importante retirarlos adecuadamente para evitar producir daño en los tejidos circundantes (Weller & Sussman, 2006). Entre los apósitos de película disponibles comercialmente se encuentran Opsite™, Bioocclusive™ y Tegaderm™, que presentan diferencias en cuanto a su conformabilidad, elasticidad, permeabilidad al vapor y propiedades adhesivas (Dhivya et al., 2015).

Por último, los apósitos de espuma están compuestos por espuma de poliuretano poroso, hidrofílica e hidrofóbica, con bordes adhesivos en ocasiones (Morgan, 2002). Las propiedades hidrofóbicas de la capa exterior protegen de los líquidos, pero permiten el intercambio de gases y vapor de agua debido a su estructura de poros abiertos. La espuma de goma a base de silicona (silástica) se moldea y adapta a la forma de la herida. Los apósitos de espuma son altamente absorbentes, proporcionan amortiguación y protección, también ofrecen una buena aislación térmica, mantienen un entorno húmedo y se adaptan bien a las superficies corporales (Boateng et al., 2008). Son preferibles en términos de reducción del dolor y satisfacción del paciente en comparación con la gasa en heridas postoperatorias; sin embargo, requieren cambios frecuentes y no son adecuados para heridas con bajo exudado, heridas y cicatrices secas, ya que dependen de los exudados para su curación (Ramos-e-Silva & Ribeiro de Castro, 2002). Estos apósitos son recomendados para úlceras en la pierna, heridas granulantes y heridas con exudado moderado a abundante. Por lo general, se utilizan como apósito primario para la absorción de exudado, y no requiere de un apósito secundario debido a su alta absorción de líquidos y permeabilidad al vapor de agua. También pueden ser utilizados para heridas en cavidades profundas resistentes al tratamiento (Ramos-e-Silva & Ribeiro de Castro, 2002). Sin embargo, no se recomiendan para heridas epitelizantes secas, con bajo exudado y cicatrificaciones secas (Weller & Sussman, 2006). Entre los disponibles comercialmente se encuentra Allevyn™, Lyofoam™ y Tielle™ (Dhivya et al., 2015).

A continuación, se presenta una tabla con los tipos de apósitos utilizados en Biomedicina (TABLA 1).

**Tabla 1. Tipos de apósitos y sus usos, ventajas y limitaciones**

APÓSITO	PROPIEDADES	VENTAJAS	LIMITACIONES	REFERENCIAS	
TRADICIONALES	Gasa	Fabricadas con fibras tejidas y no tejidas de algodón o poliéster Adecuado para heridas limpias y secas o utilizarse para absorber exudados	Fácil de utilizar Fácilmente accesible Económico	Secos y no retiene la humedad Se adhiere a la herida provocando dolor Requiere reemplazos frecuentes, aumentando el costo total Deben combinarse con otros apósitos Susceptible a la contaminación bacteriana	(Boateng et al., 2008; Dhivya et al., 2015; Jones, 2006)

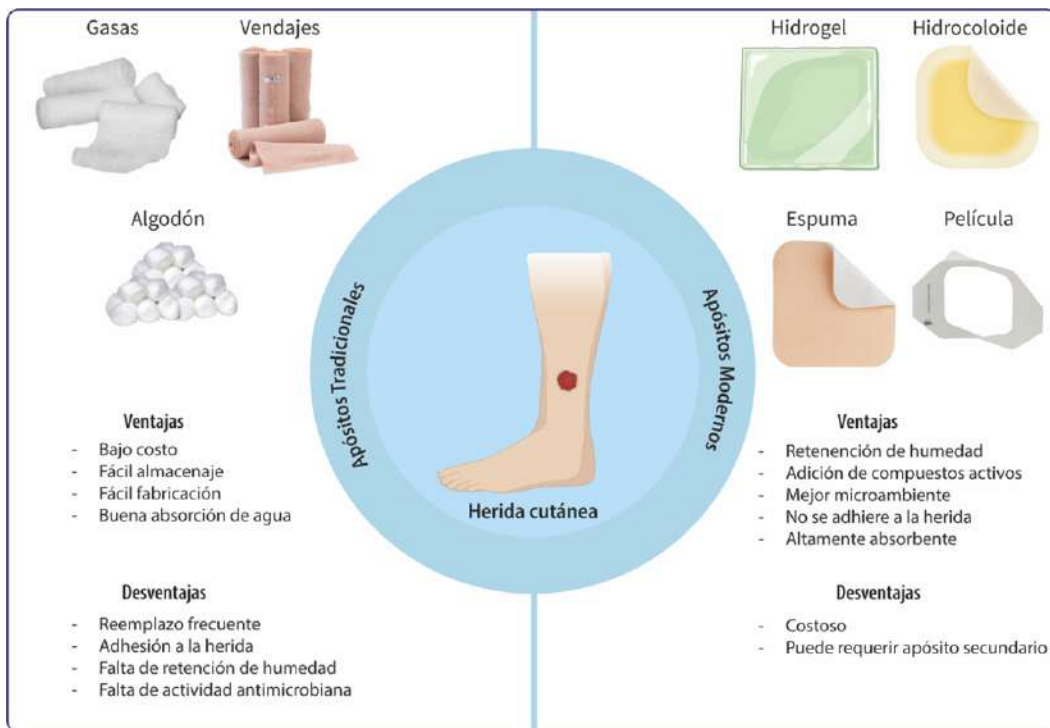
<b>MODERNOS</b>	Hidrogeles	<p>Polímeros naturales y sintéticos, predominantemente compuestos de agua</p> <p>Utilizados como calmante y refrescante de heridas cutáneas</p> <p>Adecuado para la mayoría de heridas, especialmente heridas secas y quemaduras</p>	<p>Mantiene un ambiente húmedo, lo que fomenta el desbridamiento autolítico</p> <p>Absorbente</p> <p>Fácilmente removibles de la herida</p> <p>Aceleran la cicatrización</p> <p>Reducción del dolor e inflamación</p> <p>Efecto de enfriamiento</p>	<p>No adherente</p> <p>Capacidad de absorción limitada</p> <p>Pueden ser incompatibles con heridas con exceso de exudado</p> <p>Semipermeable a gases y vapor de agua</p> <p>Requieren un apósito secundario</p>	<p>(Boateng et al., 2008; Dhivya et al., 2015; Rezvani et al., 2019)</p>
	Hidrocoloide	<p>Polímeros reticulados con celulosa, gelatina o pectina</p> <p>Sistema de dos fases, una capa interna coloidal y otra externa impermeable al agua</p> <p>Adecuado para úlceras crónicas y quemaduras, heridas exudativas mínimas o moderadas</p>	<p>Estimula el desbridamiento autolítico</p> <p>Fácil de eliminar con solución salina</p> <p>No adherente, Impermeables</p> <p>Reducen el pH de la herida, inhibiendo el crecimiento bacteriano</p>	<p>Poca citotoxicidad</p> <p>Volumétricamente inestable</p> <p>Alta fuga de exudado</p>	<p>(Broussard &amp; Powers, 2013; Jones et al., 2006; Rezvani et al., 2019)</p>
	Espumas	<p>Compuestos por espuma de poliuretano poroso que es hidrofílica e hidrofóbica con bordes adhesivos en ocasiones</p> <p>Adecuados para heridas con alto nivel de exudado, como quemaduras, heridas crónicas y úlceras profundas</p>	<p>Cómodo, no se adhiere a la herida</p> <p>Altamente absorbente</p> <p>Semiocclusivos y semipermeables</p> <p>Proporcionan amortiguación y protección contra el trauma externo</p> <p>Ofrecen aislación térmica</p>	<p>Incapacidad de visualizar la herida</p> <p>No se puede utilizar en heridas con escaras o heridas que no drenan</p>	<p>(Boateng et al., 2008; Morgan, 2002; Shi et al., 2020)</p>
	Películas	<p>Elaborados con poliuretano transparente y adhesivo</p> <p>Adecuados para heridas no contaminadas y superficiales (poco profundas)</p>	<p>Fácil de visualizar la herida</p> <p>Mantiene seco el lecho de la herida</p> <p>Previene la contaminación bacteriana</p> <p>Semipermeables, permite intercambio de gases</p>	<p>Puede adherirse a algunas heridas</p> <p>No son absorbentes e impermeables al fluido, pueden causar maceración</p> <p>No es adecuado para heridas con mucho drenaje</p>	<p>(Borda et al., 2016; Weller &amp; Sussman, 2006)</p>
	Alginatos	<p>Derivado de un polisacárido herbal natural derivado de algas marinas</p> <p>Adecuados para heridas quirúrgicas y quemaduras, heridas exudativas de moderadas a pesadas</p>	<p>Muy absorbente y no adherente</p> <p>Proporciona barrera bacteriana</p> <p>Se elimina fácilmente con solución salina</p> <p>Altamente poroso</p> <p>El calcio liberado tiene propiedades hemostáticas</p>	<p>Diffcil de manipular</p> <p>No disponible debido a su escasa presencia</p> <p>Requiere un apósito secundario</p>	<p>(Borda et al., 2016; Rezvani et al., 2019; Sood et al., 2014)</p>

Las diversas biotecnologías utilizadas en el cuidado de lesiones cutáneas tienen sus ventajas y desventajas, y su eficiencia en el tratamiento de diferentes tipos de herida varía según la naturaleza específica de la lesión, incluyendo su tipo, profundidad y gravedad.

En el caso de los hidrogeles tienen la capacidad de responder a diversos estímulos, como cambios de pH, variación de presión, temperatura específica y cambios iónicos, los convierte en herramientas valiosas para monitorear la evolución de una herida y contrarrestar posibles complicaciones, como la proliferación anormal o la infección (Aswathy et al., 2020). Sin embargo, su alta sensibilidad a las condiciones ambientales puede llevar a su degradación prematura, lo que limita su eficiencia. Los hidrogeles parecen ser especialmente efectivos para retener la humedad en la zona de la herida y facilitar la migración celular, dos aspectos fundamentales para una cicatrización óptima y rápida (Norahan et al., 2023). Su estructura polimérica proporciona una barrera protectora más sólida que la capa lipídica ofrecida por las cremas. Las formulaciones farmacéuticas, como las cremas, no ofrecen la misma versatilidad que los hidrogeles, tienen sus propias ventajas, como la capacidad de incorporar tanto ingredientes solubles en agua como en lípidos, lo que las hace útiles para una variedad de aplicaciones terapéuticas (Stan et al., 2021).

Los hidrocoloides tienen la capacidad de absorber cantidades mínimas hasta moderadas de drenaje y son adecuados tanto para heridas agudas como crónicas (Kordestani, 2019). Al ser oclusivos, estos apósitos no permiten la entrada de agua o bacterias en la herida, lo que facilita la angiogénesis y granulación. Además, pueden responder a estímulos, como cambios de pH, bajando el pH de la superficie de la herida para inhibir el crecimiento de bacterias. Al igual que los hidrogeles, los hidrocoloides ayudan en la granulación o epitelización y fomenta el desbridamiento autolítico en heridas con tejido necrótico. Sin embargo, estos andamios no pueden utilizarse en heridas infectadas, dado su naturaleza oclusiva (Vowden & Vowden, 2017).

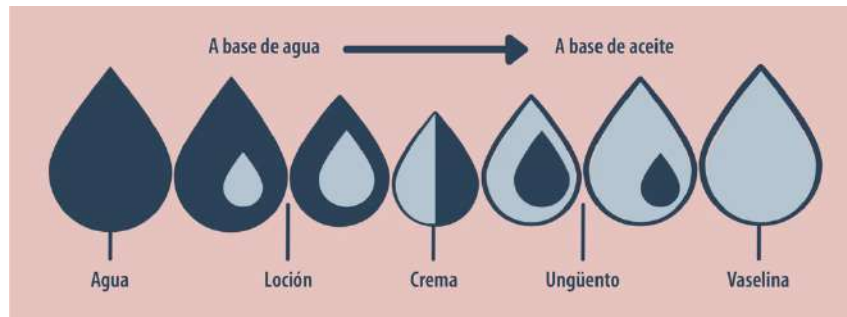
En resumen, se debe tener certeza que el apósito ideal para una determinada herida cutánea debe cumplir con una serie de requisitos fundamentales, estos incluyen: no toxicidad, una estabilidad robusta (p. ej., mecánica, estructural) y la capacidad de proporcionar un aislamiento efectivo de factores externos que pueda interferir con el proceso de cicatrización (p. ej., contaminaciones) (Vowden & Vowden, 2017). Además, debe ofrecer protección a los ingredientes activos presentes en el apósito y permitir su liberación controlada en el sitio de la herida; asimismo, es esencial que los ingredientes activos seleccionados para ser parte del apósito sean evaluados en función de la capacidad para estimular los mecanismos de reparación intrínseca del cuerpo y proporcionar una protección eficaz contra las infecciones microbianas (Stan et al., 2021).



**Figura 6.** Comparación entre apósitos tradicionales y modernos, considerando sus ventajas y desventajas. Los apósitos tradicionales, como gasas y vendajes convencionales, ofrecen una aplicación sencilla y son de bajo costo, pero pueden tener limitaciones en términos de capacidad de absorción y manejo de exudados. Por otro lado, los apósitos modernos, como hidrocoloides, hidrogeles y espumas, destacan por su alta capacidad de absorción, capacidad de mantener un entorno húmedo para la cicatrización y menor frecuencia de cambios, aunque pueden ser más costosos y requerir habilidades específicas para su aplicación adecuada. (Diseño: Digna Yau).

### 2.3.3. FORMULACIONES FARMACEÚTICAS

Las formulaciones farmacéuticas se presentan en diversas formas, como líquidos (soluciones, suspensiones y emulsiones) y las preparaciones semisólidas (ungüentos y cremas) (**Figura 7**), y se utilizan ampliamente en la práctica clínica. Las soluciones especialmente eficaces en las etapas iniciales de la cicatrización de heridas, ya que reducen la carga bacteriana y actúan como agentes de desbridamiento para prevenir la maceración del tejido sano, eliminando el tejido necrótico de la herida fresca (Boateng et al., 2008). Por otro lado, las preparaciones semisólidas, como las cremas y los ungüentos, son utilizadas para tratar infecciones bacterianas y suelen permanecer en la superficie de la herida durante un tiempo más prolongado en comparación con las soluciones; sin embargo, en el caso de heridas altamente exudativas, estas preparaciones no son muy efectivas para permanecer en el área de la herida, ya que tienden a absorber el líquido rápidamente, perdiendo sus características reológicas (Deutsch et al., 2017).



**Figura 7.** Diagrama de proporción de fase acuosa y oleosa en las formulaciones farmacéuticas para cicatrización de heridas, incluyendo loción, crema, ungüento y vaselina. Las lociones, con alta fase acuosa, son ideales para heridas superficiales, proporcionando humectación sin dejar residuos grasos. Las cremas equilibran fase acuosa y oleosa para favorecer la absorción y la humedad de heridas moderadas. Los ungüentos, ricos en fase oleosa, forman una barrera protectora efectiva para heridas secas o profundas. La vaselina, predominantemente oleosa, se utiliza para sellar y proteger heridas. (Adaptación: Digna Yau; (Plott, 2022)).

La principal diferencia entre un ungüento y una crema radica en su consistencia y formulación. Mientras que un ungüento tiende a ser más espeso y grasoso debido a su base de aceite, una crema es más ligera y se absorbe más fácilmente, generalmente debido a su base acuosa (Datti et al., 2022; Kaur et al., 2016). Además, los ungüentos tienden a proporcionar una barrera más intensa sobre la piel, ideal para retener la humedad y proteger contra irritaciones. Las cremas, en particular, son formas de administración comunes para emolientes y humectantes, permitiendo la entrega rápida y conveniente de una amplia variedad de ingredientes para tratar condiciones específicas de la piel. Las cremas pueden ser emulsiones de agua en aceite (cremas oleosas) o de aceite en agua (cremas desvanecedoras), donde el principio activo se dispersa entre las fases oleosa y acuosa (Okamoto et al., 2016). Por características estructurales, las cremas son opacas, viscosas, con una textura que varía desde no grasa hasta ligeramente grasosa y tienden a evaporarse o absorberse cuando se frota sobre la piel. En comparación con los ungüentos, las cremas son significativamente menos grasas, menos viscosas, menos hidratantes y más untables, y se utilizan por sus propiedades humectantes y emolientes (Stan et al., 2021).

En el ámbito de las cremas de agua en aceite o de aceite en agua, es importante considerar que la fase acuosa puede consistir en agua u otros líquidos hidrófilos, como los hidrosolubles, mientras que la fase oleosa puede estar compuesta por diversas sustancias lipófilas, como aceites, ésteres o alcoholes grasos. La distinción entre cremas de aceite en agua y de agua en aceite radica en la disposición de las fases. En una emulsión "aceite en agua", el aceite se dispersa en la fase continua de agua, mientras que en una emulsión "agua en aceite" ocurre lo contrario (Okamoto et al., 2016).

Las cremas de aceite en agua se recomiendan para medicamentos solubles en agua, mientras que las cremas de agua en aceite son más apropiadas para los medicamentos solubles en lípidos (Mayba & Gooderham, 2017). La estructura más básica de las cremas de aceite en agua comprende una fase acuosa, una fase hidrófoba y un agente emulsionante. Estas estructuras coloidales, derivadas de los componentes, no solo influyen en las propiedades viscoelásticas,

sino que también garantizan la estabilidad del producto (Okamoto et al., 2016). Dado que las cremas tienden a ser inestables por naturaleza, con la fase interna propensa a fusionarse con el tiempo, los agentes tensioactivos juegan un papel crucial en su estabilización al reducir la energía superficial libre. El nivel de agitación de las dos fases determina el área de superficie de cualquier volumen dado de la fase interna, y, por ende, la estabilidad del sistema.

Las cremas ofrecen ventajas sobre otras formulaciones al permitir la incorporación de componentes acuosos y oleosos, así como una mayor liberación de numerosos fármacos incorporados y el control de sus propiedades reológicas. Son ampliamente utilizados como vehículos dermatológicos tópicos, y su efecto sobre la liberación y absorción de fármacos han sido estudiados por muchos investigadores (Farooq et al., 2019; Okamoto et al., 2016; Sepulveda et al., 2003).

A continuación, se presenta una tabla con los diferentes tipos de formulaciones farmacéuticas utilizados en Biomedicina (**TABLA 2**).

**Tabla 2. Tipos de formulaciones farmacéuticas, ventajas y limitaciones**

	APÓSITO	PROPIEDADES	VENTAJAS	LIMITACIONES	APLICACIONES	REFERENCIAS
<b>FORMULACIÓN FARMACÉUTICA</b>	Crema	Emulsión semisólida de agua en aceite o de aceite en agua. Textura suave	No invasivo Forma más sencilla de administrar un medicamento Buena penetración en capas superficiales de la piel.	Debido al excipiente de fármaco, puede producir irritación en la piel	Ideales para lesiones superficiales, como quemaduras. Útiles en la fase de cicatrización de heridas donde es importante mantener la piel hidratada.	(Gwarzo et al., 2022; Stan et al., 2021)
	Ungüento	Base oleosa Textura grasosa y espesa	Retiene la humedad y protege contra irritaciones.	Pueden ser pegajosos y grasosos, lo que puede ser incómodo para el uso en áreas expuestas.	Ideales para lesiones superficiales. Útiles para mantener la humedad y proteger la herida contra infecciones.	(Kuhlmann et al., 2019)
	Geles	Base de polímeros que forman una red tridimensional que atrapa agua. Textura liviana, no grasa	Rápida absorción en la piel Proporcionan un efecto refrescante, útil para reducir la inflamación y el dolor en lesiones. Generalmente son transparentes, lo que permite una fácil observación de la lesión.	Pueden secarse y volverse menos efectivos si no se almacenan correctamente, lo que puede reducir su eficacia en lesiones. Pueden ser menos estables que las cremas y ungüentos en ciertas condiciones ambientales.	Ideales para lesiones inflamatorias y quemaduras debido a su efecto refrescante.	(Wigger-Alberti et al., 2012)

Para los médicos convencionales, los remedios naturales resultan prometedores para mejorar la curación de diversos tipos de heridas, como quemaduras y cortes (Ibrahim et al., 2018). La modernización ha inspirado avances en estrategias de curación, como el uso de cremas tópicas medicinales con extractos terapéuticos activos (Datta et al., 2011). Las aplicaciones tópicas, como las cremas formuladas con ingredientes terapéuticos podría sustituir los apósitos tradicionales, acelerando el proceso de curación y reduciendo las infecciones bacterianas (Sarabahi, 2012).

En la medicina ancestral se han utilizado diversos principios activos vegetales capaces de promover la regeneración cutánea, gracias a sus propiedades fitoterapéuticas, su accesibilidad, disponibilidad y coste relativamente bajo (WHO, 2002). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la medicina tradicional, también conocida como medicina "alternativa" o "complementaria", se enfoca en el empleo de terapias tradicionales para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales (WHO, 2012). Estas terapias abarcan prácticas, productos y conocimientos de diversas culturas, que involucran el uso de compuestos naturales obtenidos de una amplia variedad de fuentes (como plantas, hongos y minerales). Los productos basados en plata se han utilizado en el cuidado de heridas y son ampliamente utilizados en muchos sistemas de atención médica (Pereira & Bártolo, 2016).

Los avances recientes en métodos de extracción, técnicas de purificación y procesos de elaboración han logrado un papel crucial en la mejora de la calidad, eficacia y seguridad de las terapias tradicionales. Aunque algunas de estas terapias se apoyan principalmente en la sabiduría y experiencia acumulada a lo largo del tiempo, en lugar de una evidencia científica sólida, en los últimos años varios investigadores han dirigido sus estudios hacia los mecanismos que explican la eficacia terapéutica de los compuestos curativos tradicionales, lo que ha contribuido a ampliar nuestro conocimiento sobre su mecanismo de acción y propiedades biológicas (Pereira & Bártolo, 2016).

#### **2.3.3.1. EXTRACTOS VEGETALES CON PRINCIPIOS FITOTERAPÉUTICOS EN APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS CUTÁNEAS.**

Los productos químicos derivadas de animales, plantas y microorganismos se han utilizado para tratar enfermedades desde los albores de la medicina, mientras que los productos derivados de plantas han dominado la farmacopea humana durante miles de años y han proporcionado una fuente inagotable de medicamentos (Schmidt et al., 2008). Sin embargo, la farmacología sintética rompió la conexión entre las plantas y la salud humana, lo que condujo a una era dominada por la industria farmacéutica, caracterizada por el concepto de terapias de monofármacos para el tratamiento de enfermedades complejas y el desarrollo de fármacos de diseño por el advenimiento de la síntesis orgánica guiada por actividad estructural y la detección de alto rendimiento. En consecuencia, ha disminuido el uso de productos naturales en el descubrimiento de fármacos (Raskin & Ripoll, 2004). Sin duda, este enfoque ha mejorado en gran medida la atención médica y la salud humana, extendiendo así la vida humana. Por lo

que, los médicos comenzaron a ver el uso de hierbas medicinales como una práctica de atención médica "alternativa", no calificada, primitiva y no científica para quienes no tienen acceso a una atención médica "real". Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 70-95% de la población mundial depende de la medicina tradicional para su atención primaria de salud, y la mayoría de estas prácticas incluyen el uso de extractos de plantas o sus componentes activos (Robinson & Zhang, 2011).

A lo largo de la historia, el ser humano ha aprovechado los recursos naturales, incluyendo plantas, animales, microorganismos y organismos marinos, para elaborar medicamentos destinados a aliviar y tratar diversas enfermedades (Shi et al., 2010). El uso de productos naturales con fines medicinales se ha registrado en forma de remedios tradicionales, pociones y aceites, con muchos de estos productos bioactivos aún sin identificar. La principal fuente de conocimiento sobre el uso de productos naturales procedentes de plantas medicinales proviene de la experimentación a través de diversos ensayos, en un esfuerzo para encontrar remedios disponibles para el tratamiento de enfermedades (Kinghorn et al., 2011). Con el avance del conocimiento, los productos naturales comenzaron a ser utilizados como componentes en la fabricación de cosméticos, medicamentos, alimentos y otros productos para la salud. En los últimos años, se han publicado más de 110.000 estudios relacionados con plantas medicinales, revelando propiedades como inmunomoduladoras, inmunoestimuladoras, antidiabéticas, anticancerígenas, antimicrobianas y antioxidante, respaldando así su uso tradicional en la medicina popular (Salmerón-Manzano et al., 2020). El uso de plantas como fuente de medicina ha ganado popularidad internacional debido a que tiene ventajas comparativas: su origen natural (amigable con el ecosistema), disponibilidad local, bajo costo y facilidad de administración. Los medicamentos a base de hierbas o plantas medicinales son considerados como tratamientos alternativos en casos donde los medicamentos convencionales presentan efectos secundarios o resistencia (Salmerón-Manzano et al., 2020). En la actualidad, se llevan a cabo investigaciones multidisciplinarias para caracterizar completamente los extractos de plantas y desarrollar formulaciones novedosas con valor funcional y medicinal. La extracción de componentes activos de las plantas, como alcaloides, flavonoides, terpenos, saponinas y esteroides, se realiza mediante procesos de extracción utilizando solventes adecuados y procedimientos estándar. Hoy en día se dispone de una amplia gama de tecnologías con diferentes métodos de extracción (Azwanida, 2015; Ingle et al., 2017).

Las plantas contienen una amplia gama de compuestos químicos que desempeñan un papel crucial en el tratamiento de enfermedades crónicas e infecciosas. Los fitoquímicos son compuestos que ocurren naturalmente en las plantas como metabolitos secundarios (Hussein & El-Anssary, 2019). Se han identificado miles de estos compuestos, muchos de los cuales han demostrado poseer beneficiosas actividades biológicas, como propiedades anticancerígenas, antimicrobianas, antioxidantes, antidiarreicas, analgésicas y cicatrizantes (Jaeger & Cuny, 2016). La investigación en etnobotánica ha sido fundamental en el desarrollo de aproximadamente el 30% de los medicamentos modernos, destacando así su contribución significativa al descubrimiento farmacéutico. En los últimos años, ha surgido un creciente

interés por los medicamentos a base de plantas medicinales, impulsada por la preferencia de los consumidores por los productos naturales (Ekor 2014)

De acuerdo con la medicina tradicional de diferentes países hay una gran variedad plantas medicinales que potencialmente poseen un efecto de curación de heridas cutáneas, algunas de las cuales actualmente se están investigando, como se presenta en la **Tabla 3**.

**Tabla 3. Plantas utilizadas en aplicaciones de cicatrización de heridas.**

PLANTA	COMPONENTES PRINCIPALES	FORMAS FÍSICAS Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN	EVIDENCIA CLÍNICA Y DE LABORATORIO	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	REFERENCIAS
<i>Crescentia cujete</i>	Flavonoides, triterpenos y esteroides.	Formas: geles, extractos acuosos, hexano y extractos etanólicos. Vías: tópica	Actividad antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias, neuroprotectoras y cicatrizantes.	Nativa de América tropical continental, cultivada y naturalizada en los trópicos.	(Balogun & Sabiu, 2021; Hartati et al., 2018; Parvin et al., 2015)
<i>Moringa oleifera</i>	Glucósidos, sitosterol, tocoferol, piridoxina, ácidos ascórbicos, metionina y lisina y proteínas.	Formas: geles, extractos acuosos, hexano y extractos etanólicos. Vías: tópica	Propiedades antioxidantes, antimicrobianas.	Se cultiva en América Central y el Caribe, los países del norte de América del Sur, África, Asia y varios países de Oceanía.	(Muhammad et al., 2013; Singh & Sharma, 2021)
<i>Aloe vera</i>	Antraquinonas, aloesina, aloína, aloe emodina (producto oxidativo de la aloína) y quininas aromáticas tricíclicas.	Formas: soluciones, cremas, mucílago, geles y apósitos. Vías: tópica y oral	Actividad antiinflamatoria y antimicrobiana; estimula la proliferación celular, la síntesis de colágeno y la angiogénesis; promueve la contracción de la herida.	Ampliamente cultivado en regiones áridas, templadas y tropicales de continentes templados.	(Chithra et al., 1998; Eshghi et al., 2010; Tarameshloo et al., 2012)
<i>Calendula officinalis</i>	Triterpenoides (lupeol, eritrodiol y calendulósido) y flavonoides (quercetina, isoquercetina e isorhamnetina).	Formas: geles, extractos acuosos, hexano y extractos etanólicos disueltos en dimetilsulfóxido. Vías: tópica	Actividad antiinflamatorias y antibacterianas; estimula la proliferación y migración de fibroblastos in vitro; estimula la producción de colágeno y la angiogénesis.	Se encuentra en toda Asia, América y Europa.	(Janiszowska et al., 1976; Parente et al., 2012; Preethi et al., 2009; Preethi & Kuttan, 2009) (Wiłkomirski, 1985; Wojciechowski et al., 1972)
<i>Mangifera indica</i>	Metabolitos secundarios, principalmente compuestos polifenólicos (p.e., flavonoides y mangiferina).	Formas: geles, extractos acuosos, hexano y extractos etanólicos disueltos en dimetilsulfóxido. Vías: tópica	Actividad contra los radicales libres, activar la migración de células endoteliales, alterar la membrana celular de los microorganismos e inhibir las vías inflamatorias y del dolor.	Ampliamente cultivada en países de clima tropical.	(Espinosa-Espinosa et al., 2022; Suhatri et al., 2022; Sushanth et al., 2016).

<i>Morinda citrifolia</i>	Ácidos, alcoholes, fenoles, ésteres, antraquinonas, esteroides, flavonoides, triterpenoides, sacáridos, carotenoides, ésteres, cetonas, lactonas, lignanos y nucleósidos.	Formas: extracto etanólico de hojas de plantas mezcladas con agua. Vías: oral y tópica	Mejora el contenido de hidroxiprolina y reduce tanto el área de la herida como el tiempo de epitelización en heridas de escisión.	Nativa del sureste asiático y Australia, se ha distribuido ampliamente por los trópicos y naturalizada en América Central, Sudamérica y África.	(Nayak et al., 2009; Palu et al., 2010)
<i>Catharanthus roseus</i>	Contienen dos clases principales de compuestos activos: alcaloides (p. ej., vincamina) y taninos.	Formas: extracto etanólico de hoja Vías: tópica	Actividad antimicrobiana contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> ; aumenta la fuerza de la herida, la epitelización y la contracción de la herida.	Originaria de Madagascar, actualmente está naturalizada en casi todas las regiones tropicales.	(Nayak & Pinto Pereira, 2006; Satish et al., 2021)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Terpenoides y polifenoles, como carnosol, ácido carnósico y ácido rosmarínico.	Formas: extracto acuoso y aceite esencial. Vías: inyección tópica e intraperitoneal	Reduce la inflamación y mejora la contracción de la herida, la reepitelización, la angiogénesis y el depósito de colágeno.	Su cultivo está extendido por toda el área mediterránea.	(Abu-Al-Basal, 2010; Khezri et al., 2019; Li Pomi et al., 2023)
<i>Hippopha rhamnoides</i>	Flavonoides (p. ej., quercetina, isorhamnetina), carotenoides (p. ej., caroteno, licopeno), taninos, triterpenos, glicéridos y aminoácidos.	Formas: extracto acuoso de hoja, aceite de semilla. Vías: tópica y oral	Actividad antioxidante y antiinflamatoria; estimula el proceso de curación; mejora la contracción de la herida y la epitelización; aumenta el contenido de hidroxiprolina y proteína en la herida.	Nativa de Europa, Asia Menor y el Cáucaso.	(Priyadarshi et al., 2022; Upadhyay et al., 2011)

En los últimos años, se ha avanzado significativamente en la introducción de recursos naturales en forma de formulaciones tópicas como agentes terapéuticos para el tratamiento de heridas. Estos enfoques innovadores no solo buscan acelerar el proceso de cicatrización, sino también mejorar la calidad de vida de los pacientes. Entre los materiales más comunes utilizados en este ámbito se encuentran los hidrocoloides, los hidrogeles y los alginatos (Rezvani et al., 2019).

Las formulaciones más efectivas para la cicatrización de heridas provienen de recursos naturales que contienen fitoquímicos como flavonoides, alcaloides y saponinas. Estos compuestos son ampliamente reconocidos por sus potentes propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes, lo que los convierte en componentes esenciales para favorecer la cicatrización (Datti et al., 2022).

La interacción sinérgica de estos fitoquímicos no solo mejora los procesos naturales de curación del cuerpo, sino que también estimula la regeneración de la piel. Al combatir infecciones y reducir la inflamación de manera eficaz, estas formulaciones aceleran la reparación del tejido

y disminuyen la formación de cicatrices. Además, sus propiedades antioxidantes ayudan a mitigar el estrés oxidativo en los tejidos dañados, contribuyendo a una recuperación más saludable (Bhoyar et al., 2023). La incorporación de estos recursos naturales en los productos de cuidado de heridas ofrece un enfoque prometedor para el desarrollo de terapias más efectivas y holísticas en la gestión de heridas.

### **2.3.3.2. MIEL, COMO EXTRACTO BIOACTIVO EN APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS CUTÁNEAS.**

También, destaca como extracto bioactivo con propiedades curativas, la miel que ha sido utilizada desde tiempos remotos para acelerar la curación de heridas (Van den Berg et al., 2008), donde descubrimientos arqueológicos y textos antiguos indican que civilizaciones como la egipcia, griega y romana recurrieron a la miel para el tratamiento de heridas cutáneas (Minden-Birkenmaier & Bowlin, 2018), sumando a una extensa evidencia de su capacidad para el favorecimiento del proceso cicatrización cutánea (Molan, 2006; Oryan et al., 2016; Tashkandi, 2021; Yaghoobi et al., 2013); ello asociado, al establecimiento de los antibióticos en la década de los 40's (1940-1950) como tratamiento estándar, conllevó que la utilización de miel como alternativa en el tratamiento para heridas perdiera consideración como posible terapia cutánea (Clardy et al., 2009). No obstante, en la actualidad el aumento de la resistencia a los antibióticos, respaldan el renacimiento de la terapia cutánea basada en la utilización de miel en el tratamiento de heridas, como también agente antibacteriano de amplio espectro natural en la medicina clínica (Minden-Birkenmaier & Bowlin, 2018).

La miel es un producto natural elaborado por diversas especies de abejas en todo el mundo, se obtiene del procesamiento del néctar recolectado por las abejas de la vegetación circundante, resultando en una solución densa y viscosa compuesta por azúcares, proteínas, enzimas y aminoácidos (Minden-Birkenmaier & Bowlin, 2018). Sus componentes incluyen agua, sacarosa, glucosa, fructosa, aminoácidos, cera de abejas, polen, pigmentos, minerales y glucosa oxidasa, que transforma la sacarosa en glucosa y fructosa simples y produce ácido glucónico (Stewart et al., 2014). Aunque cada uno de estos componentes posee propiedades curativas que se encuentran por separado en productos farmacológicos, en la miel se combinan todas estas actividades beneficiosas para la cicatrización (Molan & Rhodes, 2015). La actividad antioxidante de la miel se ve potenciada por la presencia de compuestos fenólicos, los cuales son transferidos desde las plantas al néctar y posteriormente a la miel (Bahari et al., 2022). Estos compuestos, como los ácidos fenólicos y los flavonoides, tienen la capacidad de neutralizar los radicales libres, reduciendo así el daño tisular y la inflamación.

En el ámbito biomédico, la miel se ha utilizado para tratar heridas, quemaduras e inflamaciones, y su efecto se ve potenciado cuando se combina con agentes antimicrobianos (Thirupathi et al., 2022). Estudios previos han demostrado que las posiciones de los grupos hidroxilo en el anillo aromático de los ácidos fenólicos tienen un impacto significativo en su efecto antioxidante (Oryan et al., 2016). La miel es reconocida como un recurso médico ancestral en el tratamiento de úlceras, escaras y otras infecciones cutáneas derivadas de quemaduras y diversas lesiones cutáneas (p. ej., cortes, úlceras, heridas quirúrgicas) (Cooper et al., 2002; Tashkandi, 2021), sus propiedades curativas se atribuyen a su actividad

antibacteriana, su capacidad para mantener un entorno húmedo en la herida que favorece la cicatrización y su viscosidad específica que actúa como barrera mecánica protectora contra el ingreso de infecciones en la zona afectada (Lusby et al., 2005). Actualmente, existen numerosos estudios que destacan la eficacia de la miel como vendaje en heridas, quemaduras, úlceras cutáneas e inflamaciones; sus propiedades antibacterianas aceleran la formación de nuevo tejido para la recuperación de la herida (Reham F. El-Kased et al., 2017; Lusby et al., 2002; Yasin et al., 2023).

En términos curativos, la miel puede contribuir a la recuperación de tejidos dañados y al proceso de recuperación de las heridas cutáneas debido a su contenido alto de azúcar, la generación de especies reactivas de oxígeno y sus propiedades antiinflamatorias (Mieles et al., 2022); además, puede eliminar la infección en la herida, promover el crecimiento de tejidos y la regeneración de la epidermis, así como reducir la formación de cicatrices (Bahari et al., 2022). Estos aspectos son importantes en las diferentes etapas de cicatrización de heridas; por ejemplo, durante la fase inflamatoria, la miel puede inhibir el crecimiento bacteriano, ajustar el pH, aumentar la actividad antioxidante y liberar citocinas proinflamatorias (Yilmaz & Aygin, 2020), mientras, que en la fase proliferativa, facilita la epitelización y la proliferación celular y en la fase de remodelación, ayuda a restaurar la integridad de la herida y prevenir la formación de cicatrices (Gonzalez et al., 2016).

La miel como tratamiento terapéutico, al aplicarse directamente sobre la piel, elimina rápidamente la infección de las heridas para favorecer la cicatrización de heridas quirúrgicas profundas infectadas (Ahmed et al., 2003). Su uso puede estimular la curación en heridas infectadas que no responden a los tratamientos convencionales como los antibióticos y los antisépticos (Ahmed et al., 2003), incluso en casos de infección complejas, tales como *Staphylococcus aureus* (Dunford et al., 2000; Natarajan et al., 2001). También, se ha demostrado su efectividad en el tratamiento de injertos de piel y sitios donantes en pacientes crónicos (Misirlioglu et al., 2003); además, la miel tiene la capacidad de activar los monocitos, precursores de los macrófagos, para que secreten TNF- $\alpha$ , en conjunto, a la reducción de la liberación de 'intermediarios reactivos', puede modular y reducir el daño tisular debido a sus características inmunomoduladoras (Kalantari et al., 2016; Navaei-Alipour et al., 2021; Tonks et al., 2003). La aplicación de miel en heridas también ha demostrado reducir los síntomas de inflamación y promover la reducción del exudado en heridas inflamadas crónicas (Ahmed et al., 2022; Ahmed et al., 2003; Zeleníková & Vyhlídalová, 2019).

Actualmente, el uso de terapias naturales en el tratamiento de heridas ha ganado atención en la medicina moderna debido a sus propiedades antimicrobianas y promotoras de la curación (Vaou et al., 2021). La miel, en conjunto, a una serie de productos naturales como la cúrcuma, *Centella asiatica* y el *Aloe vera*, se presentan como opciones biomédicas en el tratamiento de lesiones cutáneas (Liu et al., 2022). En el caso de la miel, ha sido utilizada como tratamiento tópico desde hace milenios y ha sido reconocida oficialmente como un extracto clínico de propiedades excepcionales, a menudo en combinación, con apósitos de plata u otras formulaciones para mejorar su efectividad en la terapia cutánea (Alvarez-Suarez et al., 2014; Masood et al., 2019). Además, a fecha de hoy se están desarrollando diversos apósitos

innovadores, basados en extractos vegetales y miel, que prometen revolucionar el campo del tratamiento de heridas complejas; en donde, se aprovecharían las propiedades curativas y antimicrobianas, para ofrecer una alternativa eficaz y natural en la curación de heridas (Gopal et al., 2021; Noori et al., 2018; Tavakoli & Tang, 2017).

A continuación, se presenta una tabla con las principales características de la miel (**TABLA 4**).

**Tabla 4. Características de la miel, como extracto bioactivo.**

Extracto	Componentes Principales	Formas físicas y Vías de Administración	Evidencia Clínica y de Laboratorio	Distribución geográfica	Referencias
Miel	Flavonoides, incluidos pinobanksina, crisina y pinocembrina, así como luteolina, quercetina, 8-metoxikaempferol, isorhamnetina, kaempferol y galangina,	Formas: tableta, geles, cápsula o elixir u otra forma líquida Vías: tópica y oral	Actividades antioxidantes y eficacia antiinflamatoria, así como eliminar tanto los radicales superóxidos como los hidroxilo, el radical 1,1-difenil 1,3-picrilhidrazilo, los radicales proxys, el óxido nítrico y los radicales libres centrados en el carbono, radicales libres de lípidos, y también peroxinitrito al prevenir la nitración de la tirosina	Producido mundialmente.	(Al-Waili et al., 2011; R. F. El-Kased et al., 2017; Lund-Nielsen et al., 2011; Molan, 2001)

En resumen, existen diversos tipos de apósitos cutáneos, cada uno con características específicas que los hacen adecuados para diferentes tipos de heridas y etapas de la cicatrización. Los hidrocoloides, que absorben exudado y crean un ambiente húmedo, promoviendo el desbridamiento autolítico, son ideales para heridas con exudado leve a moderado. Los hidrogeles de alginato, derivados de algas marinas, mantienen un microambiente húmedo en el sitio de la herida, minimizan la infección bacteriana y facilitan el proceso de curación. Los hidrogeles, compuestos por polímeros naturales y sintéticos, retienen una alta cantidad de agua, proporcionando alivio del dolor y favoreciendo la migración celular en heridas secas y profundas. Los apósitos de película semipermeable, hechos de poliuretano, permiten el intercambio de gases y vapor de agua, siendo útiles en heridas superficiales con bajo exudado. Las espumas de poliuretano, altamente absorbentes, protegen la herida y son recomendadas para heridas con exudado moderado a abundante (Bhojar et al., 2023; Vowden & Vowden, 2014).

Además de los apósitos, las formulaciones farmacéuticas como cremas y ungüentos desempeñan un papel crucial en la cicatrización de heridas, ofreciendo una barrera protectora y facilitando la entrega de agentes terapéuticos (Stan et al., 2021). Además, se están desarrollando aplicaciones innovadoras que incorporan agentes fitoterapéuticos activos, como extractos de plantas, incluyendo el aloe vera y la caléndula, reconocidos por sus efectos cicatrizantes y su capacidad para reducir la inflamación y el dolor (Vitale et al., 2022). Asimismo,

la miel, se utiliza en diversas heridas, desde quemaduras hasta úlceras, por su capacidad para crear un entorno húmedo y promover la granulación (Tashkandi, 2021). Otro enfoque innovador es el tratamiento hiperoxigénico, el cual consiste en aumentar la cantidad de oxígeno disponible en el tejido dañado, lo que reduce la inflamación y promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos, resultando en una cicatrización más rápida y efectiva (Sen, 2009).

En cada etapa de la cicatrización, la elección adecuada del apósito y los tratamientos tópicos es esencial para optimizar la curación y mejorar los resultados clínicos. A continuación, se presenta una tabla con los tipos de tratamiento estandarizado en base a la etapa de la cicatrización (**Tabla 5**).

**Tabla 5. Fases de cicatrización y tipos de tratamiento terapéutico utilizados en cada fase.**

FASES DE LA CICATRIZACIÓN	TIEMPO DESPUÉS DE LA LESIÓN	ACTIVIDAD	ASPECTO	TIPO DE TRATAMIENTO UTILIZADO
<b>ETAPA 1 HEMOSTASIA</b>	Inmediato	Coagulación y liberación de factores de crecimiento	Sangrado con posible exudado claro	Capa de contacto primaria, película transparente, hidrocoloide, formulaciones farmacéuticas.
<b>ETAPA 2 INFLAMACIÓN</b>	Días 1 – 4	Fagocitosis Los neutrófilos pasan de los vasos sanguíneos al área dañada y comienzan el desbridamiento	La piel circundante puede estar enrojecida, caliente e hinchada. Esfacelo blanco/amarillo. Exudado abundante/moderado	Espuma, alginato/hidrofibra, hidrocoloide, hidrogel, formulaciones farmacéuticas.
<b>ETAPA 3 PROLIFERACIÓN (GRANULACIÓN Y CONTRACCIÓN)</b>	Días 4 – 21	Angiogénesis y Epitelización Defecto de relleno Restauración de la función de la piel Cierre de la herida	Tejido granulado cubierto de tejido epitelial rosado/blanco, muy delicado. Exudado mínimo	Espuma, hidrocoloide.
<b>ETAPA 4 REMODELACIÓN (MADURACIÓN)</b>	Hasta 3 meses	Colágeno original convertido en colágeno de mayor resistencia Desarrollar fuerza de tensión	La herida está cerrada pero no completamente curada.	Almohadilla no absorbente

## **2.4. TRATAMIENTOS DE AVANZADAS EN BIOTECNOLOGIA MÉDICA EN EL TRATAMIENTO DE LAS LESIONES CUTÁNEAS.**

### **2.4.1 VEGETALES DESCELULARIZADOS, COMO UNA ESTRATEGIA INNOVADORA EN INGENIERÍA TISULAR.**

Los biomateriales naturales destacan en la ingeniería de tejidos debido a sus diversas y favorables propiedades, como una biodegradabilidad adecuada, excelente biocompatibilidad, facilidad de fabricación, buena adhesión, alta absorción y permeabilidad, y finalmente, alta capacidad de regeneración y reparación de tejidos dañados (Chinta et al., 2022; Kamoun et al., 2017). Además, la capacidad de extraerlos desde la biomasa natural, a diferencia de los andamios sintéticos de origen industrial, los hace más accesibles, económicos y ecosustentables (Isaza-Pérez et al., 2020).

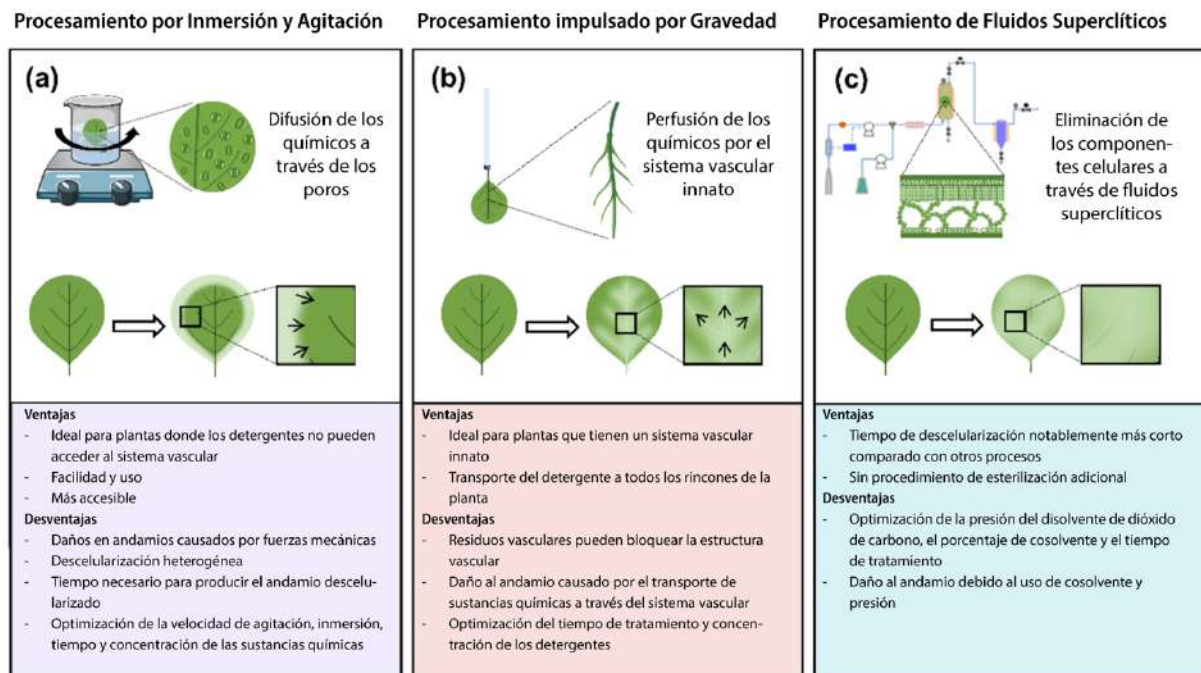
Los biomateriales naturales derivados de fuentes renovables como plantas (p. ej., celulosa y almidón vegetales), animales (p. ej., gelatina, seda, quitosano y colágeno), algas (p. ej., alginato) y microorganismos (p. ej., celulosa bacteriana y dextrano) han llevado al desarrollo de nuevos biomateriales para la ingeniería de tejidos (Ige et al., 2012; Troy et al., 2021). Sin embargo, aunque estos biomateriales imitan algunas propiedades de los tejidos nativos, su uso está limitado debido a problemas como la capacidad limitada de ajuste, tasa de degradación incontrolable y resistencia mecánica insuficiente (Reddy et al., 2021).

Recientemente, los andamios basados en plantas han surgido como biomateriales prometedores, dada su alta superficie, redes vasculares naturales, rangos de porosidad variables, rigidez, propiedades mecánicas y transporte de agua (Adamski et al., 2018; Hickey & Pelling, 2019). Para su aplicación biomédica, se requiere el proceso de descelularización que consiste en la eliminación, casi por completo (>90%), del material celular del tejido vegetal. La descelularización tiene el objetivo de generar un andamio tridimensional acelular (carcasa estructural) utilizando métodos físicos, químicos y biológicos, preservando la estructura, composición y propiedades mecánicas de la matriz extracelular (ECM, del inglés Extracellular matrix) del vegetal nativo (Gilbert et al., 2006). Para minimizar la alteración de la composición de la ECM, los protocolos de descelularización en las plantas deben adaptarse específicamente, considerando características del tejido como la densidad celular, el tipo de planta, las partes anatómicas (p. ej., tallo, hoja, raíz) y los agentes de descelularización utilizados en el proceso, respectivamente (Arslan et al., 2023)

La descelularización de tejidos vegetales ha surgido como una alternativa para crear andamios de ingeniería de tejidos sin los riesgos asociados a los tejidos animales (Modulevsky et al., 2014). Dado que en el reino vegetal existe una gran variedad de arquitecturas, los andamios descelularizados derivados de plantas pueden seleccionarse según su estructura y propiedades nativas para imitar una multiplicidad de tejidos de mamíferos (Gershlak et al., 2017). De hecho, además de su fácil disponibilidad, bajo costo económico, facilidad de utilización, elevada biocompatibilidad y ausencia de problemas éticos (Modulevsky et al., 2016). Hasta el momento, se han explorado una variedad de plantas para su uso potencial en ingeniería de

tejidos, incluyendo *Spinacia oleracea* (espinaca) (Dikici et al., 2019; Gershlak et al., 2017), *Brassica oleracea* (repollo) (Salehi et al., 2021), *Allium porrum* (puerro) (Toker et al., 2020), *Apium graveolens* (apio) (Contessi et al., 2020), *Daucus carota* (zanahoria) (Contessi et al., 2020), *Malus domestica* (manzana) (Modulevsky et al., 2016) e incluso macroalgas, como *Ulva sp.* y *Cladophora sp.* (Bar-Shai et al., 2021).

Los tejidos vegetales descelularizados ofrecen una alternativa viable, como andamios para la ingeniería de tejidos, debido a su estructura tridimensional, ya que imitan los tejidos nativos y ofrecen un microambiente mimético para el crecimiento de las células. Los andamios vegetales descelularizados podrían superar los problemas de disponibilidad, los altos costos y las preocupaciones éticas, relacionadas con el uso de fuentes animales (Contessi et al., 2020). La amplia variedad de características que ofrecen diferentes plantas ofrece una gran oportunidad para el desarrollo de andamios innovadores, basándose en las peculiaridades morfoestructurales, como mecánicas de cada vegetal específico. Sin embargo, a pesar de las ventajas que presentan los andamios descelularizados derivados de plantas y los resultados prometedores obtenidos hasta ahora, la versatilidad de estas estructuras en términos de los tejidos que podrían regenerar potencialmente aún no ha sido completamente desarrollado y sólo se cuenta con algunas incipientes aproximaciones *in vitro* (Harris et al., 2021; Hasan et al., 2024; Zhu et al., 2021). La ingeniería tisular vegetal que surge a partir de las diversas características que presentan las diferentes plantas, como morfología, estructura y propiedades mecánicas, representan una alternativa única, ecosostenible e innovadora para el desarrollo de andamios en medicina regenerativa (Contessi et al., 2020). Por ejemplo, en la **Figura 8** se pueden observar las diferentes técnicas de descelularización vegetal para la obtención de andamios de origen vegetal.



**Figura 8.** Técnicas de descelularización para la obtención de andamios de origen vegetal, destacando sus ventajas y desventajas. Representación esquemática del uso de agentes químicos en **(A)** procesos basados

en inmersión y agitación, los cuales son ampliamente accesibles y relativamente simples, aunque pueden requerir largos tiempos de descelularización y presentar riesgos de degradación del andamio. **(B)** impulsados por gravedad, como la perfusión, son eficaces en plantas con sistema vascular, asegurando una distribución uniforme de agentes descelularizantes. Esto preserva la integridad del andamio mientras elimina eficientemente los componentes celulares. **(C)** basados en fluidos supercríticos (SC-CO<sub>2</sub>), ofrecen tiempos de descelularización más cortos en comparación con otros métodos, pero pueden causar daño al andamio debido al uso de cosolventes y altas presiones (Arslan et al., 2023).

#### **2.4.2 TRATAMIENTO HIPEROXIGÉNICO, BASADO EN TERAPIA FOTOSINTÉTICA, COMO ESTRATEGIA DE INGENIERIA TISULAR.**

Diversas investigaciones recientes se han centrado en el papel del oxígeno en diversas enfermedades crónicas no transmisibles. La hipoxia, o suministro insuficiente de oxígeno, puede conllevar el desarrollo de diversas enfermedades, incluidas heridas crónicas, accidente cerebrovascular y enfermedad cardíaca isquémica (Frykberg, 2021).

En particular, las heridas cutáneas crónicas, generalmente, van asociadas a condiciones hipóxicas debido a la falta de oxígeno en el lecho tisular, lo que afecta significativamente los procesos de cicatrización (Kranke et al., 2015). Las heridas crónicas cutáneas se caracterizan por tener una baja presión parcial de oxígeno (pO<sub>2</sub>) en el centro de la herida, lo cual reprime los procesos esenciales de cicatrización tisular (Frykberg et al., 2023; Gupta et al., 2022; Sen, 2009). Así es como, las lesiones crónicas cutáneas tienen asociado, un desbalance tisular que involucra: la interrupción del suministro vascular, la inflamación crónica, la sobrecarga bacteriana y el déficit de oxígeno crónico, a nivel local. El proceso de hipoxia crónica cutánea es capaz de dificultar la recuperación tisular, debido la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), falta de señalización intracelular y la aparición de agentes bacterianos (Gottrup et al., 2017).

El proceso de oxigenación tisular es crucial en la cicatrización de heridas cutáneas; a pesar, de que la hipoxia aguda (en breve tiempo) es capaz de estimular la neovascularización y acelerar la cicatrización momentánea. En el caso de las heridas crónicas, el proceso hipoxia sostenido (modo crónico) es un factor predominante en el retraso de la cicatrización debido a que altera las actividades de las células reparadoras (p. ej., fibroblastos y queratinocitos), lo que provoca la necrosis tisular y disminuye la angiogénesis, lo cual reprime la cicatrización del tejido cutáneo (Darby & Hewitson, 2016). Por lo tanto, un suministro adecuado de oxígeno puede cambiar este proceso patológico y promover el proceso de cicatrización cutánea; por ello, se han explorado diversos métodos para suministrar oxígeno a las heridas, tanto de manera sistémica como local, incluyendo la terapia de oxígeno hiperbárico (HBOT) y la terapia de oxígeno tópica (TOT) (Barysch & Läuchli, 2020; de Smet et al., 2017; Gottrup et al., 2017).

La oxigenoterapia hiperbárica (HBOT, por sus siglas en inglés) consiste en el uso de oxígeno al 100% a presiones superiores a la atmosférica. Durante el tratamiento, el paciente respira oxígeno al 100% de manera intermitente mientras la presión en la cámara de tratamiento se eleva por encima de 1 atmósfera absoluta (ATA), mejorando el suministro de oxígeno a los tejidos afectados, lo cual es crucial para el proceso de cicatrización (Ortega et al., 2021; Sahni et al., 2004). La terapia de oxígeno tópica (TOT) se define como la administración de oxígeno

aplicada directamente sobre el tejido lesionado mediante sistemas de difusión continua o presurizada. Aunque también, existen apósitos, geles y sprays de hemoglobina que pueden liberar oxígeno cuando se aplican a las heridas (Gottrup et al., 2017). Específicamente, existen tres tipos generales de sistemas de administración física para la TOT: los sistemas que proporcionan una entrega continua de oxígeno (CDO), tales como: TransCu O<sub>2</sub>, EpiFlo y Natrox (Frykberg, 2021). La evidencia actual aún no proporciona resultados consistentes o significativos en ambos tratamientos terapéuticos, lo que subraya la necesidad de estudios más amplios y rigurosos (Al-Jalodi et al., 2022; Kimmel et al., 2016).

También, de forma complementaria se han diseñado apósitos que suministran oxígeno localmente a través de compuestos químicos como peróxido de hidrógeno, peróxido de calcio y perfluorocarbonos (Lim & Jang, 2021). Actualmente, estos apósitos representan un enfoque prometedor en Biomedicina, pero presentan limitaciones como toxicidad local, poca estabilidad y un suministro de oxígeno de corto plazo (Ortega et al., 2022).

Una tecnología de una mirada visionaria, es la utilización de microalgas como elementos celulares capaces de liberar O<sub>2</sub>, de forma *in situ*. A fecha de hoy, las microalgas están ganando gradualmente el favor de los investigadores debido a su abundancia natural, bajo costo y buena biocompatibilidad en comparación con los tratamientos oxigénicos tradicionales; por ello, en los últimos años, el campo de investigación sobre microalgas ha experimentado un crecimiento significativo, como una alternativa prometedora para aumentar la concentración local de oxígeno en procesos de cicatrización de heridas (Chen et al., 2020; Kang et al., 2024; Miguel et al., 2021) y otros ámbitos médicos, tales como: antitumorales (Qiao et al., 2020; Wang et al., 2022), tratamiento de accidentes cerebrovasculares e isquemia (Özugur et al., 2021; Wang et al., 2021), y preservación de órganos (Velo-Giménez et al., 2021; Yamaoka et al., 2012).

En el contexto de la cicatrización de heridas, se ha observado que los andamios que contienen microalgas pueden disminuir la hipoxia tisular *in vitro* (Corrales-Orovio et al., 2023; Hopfner et al., 2014; Mao et al., 2024). Además, estos andamios también han sido probados en modelos murinos (Chávez et al., 2016; Kang et al., 2024), como también se ha realizado el primer estudio clínico en pacientes humanos (Obaid et al., 2021). Esto sugiere un gran potencial para la aplicación clínica de las microalgas en el tratamiento de heridas y otras condiciones médicas, respaldado por evidencia experimental sólida.

## **2.5. MODELOS EN EL ESTUDIO DE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS**

Los estándares éticos en la investigación científica prohíben el empleo de seres humanos como sujetos clínicos directos, especialmente aquellos con una capacidad de cicatrización reducida, si ello implica un riesgo de lesión para el sujeto (Varkey, 2021). No obstante, es crucial demostrar clínicamente la eficacia de los medicamentos, así como investigar sus acciones farmacológicas, características toxicológicas y eficacia en el tratamiento de heridas. Por tanto, el uso de modelos se convierte en un método específico para entender las complejidades del proceso de cicatrización de heridas, garantizando al mismo tiempo el establecimiento de la eficacia del candidato a tratamiento. En este sentido, se han desarrollado diversos *modelos in vitro* e *in vivo* para examinar dicho proceso, siendo herramientas esenciales que facilitan la

realización de investigaciones traslacionales con estudios clínicos relevantes que puedan mejorar el cuidado y manejo de las heridas (Sarian et al., 2023).

Antes de que un producto farmacéutico sea comercializado o utilizado con fines médicos, se realiza un estudio detallado, que comienza con pruebas *in vitro*, además de evaluaciones preclínicas y clínicas. Por ejemplo, células como fibroblastos, macrófagos, queratinocitos y endoteliales pueden ser adquiridas comercialmente (Stamm et al., 2016b). Algunos investigadores también han recurrido a modelos *in vitro* para generar cultivos de órganos (Al-Lamki et al., 2017). Por otro lado, los modelos *in vivo* se basan principalmente en modelos animales (tales como cerdos, conejos, ratas, ratones o peces cebras) para estudiar cómo sanan las heridas en tejidos y órganos (Grada et al., 2018), mientras que los estudios clínicos involucran a humanos como sujetos de estudio.

Dada la complejidad del proceso de cicatrización de heridas, es necesario recurrir tanto a modelos *in vitro* como *in vivo*, a pesar de sus diferencias. Los modelos *in vitro* se caracterizan por ser rápidos, simples, menos costosos y generar mínimas consideraciones éticas (Stamm et al., 2016b). Permiten examinar directamente cómo un cambio ambiental o una sustancia afecta al tejido sin influir en otros componentes (Shrivastav et al., 2018; Ud-Din & Bayat, 2017), lo que los convierte en herramientas valiosas para estudiar el mecanismo de acción de un compuesto (Sorg et al., 2017). Sin embargo, estas ventajas vienen acompañadas de limitaciones, ya que los modelos *in vitro* no pueden reproducir completamente procesos dinámicos de cicatrización, como la inflamación o la angiogénesis, y carecen de la complejidad biológica presente en organismos vivos.

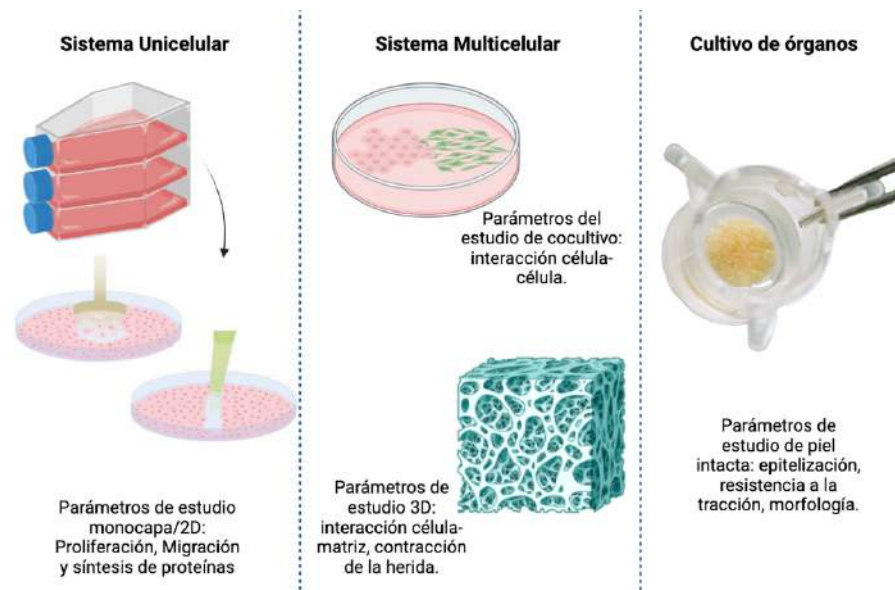
Por otro lado, los modelos *in vivo* son considerados superiores para evaluar el potencial de cicatrización de heridas, ya que replican de manera más fiel el proceso observado en humanos. Permiten la evaluación simultánea de múltiples factores de cicatrización en un entorno complejo, aunque su utilización implica procedimientos éticos rigurosos para obtener la aprobación de comités de ética animal. A pesar de sus ventajas, los modelos *in vivo* también presentan limitaciones, como la dificultad para examinar componentes tisulares individuales y la necesidad de crear heridas que sean representativas de las observadas en la práctica clínica (Sarian et al., 2023).

### **2.5.1. MODELOS *IN VITRO* DE LESIONES CUTÁNEAS.**

El primer modelo de evaluación rápida para investigar la cicatrización de heridas en el laboratorio (modelo *in vitro*) se basa en un sistema de células individuales, destacado por su rapidez, fiabilidad y coste asequible. La técnica comúnmente empleada es el “ensayo de raspado”, donde se crea una herida mecánica en una monocapa de células utilizando instrumentos punzantes como la punta de una pipeta (Liang et al., 2007). También se utilizan dispositivos de raspado como raspadores de células especiales, microindentadores metálicos y palillos de dientes. Además, se pueden utilizar métodos de destrucción mecánica como el método de “estampado”, heridas térmicas, eléctricas y ópticas para inducir lesiones en las células. Estos métodos permiten evaluar tanto el cierre de la herida como la migración celular (Stamm et al., 2016a). Sin embargo, el ensayo de raspado presenta desventajas importantes,

como la creación de rasguños irregulares durante la manipulación manual y el posible daño de los revestimientos de la matriz extracelular en el plato de cultivo celular (Goetsch & Niesler, 2011). Además, las células eliminadas pueden acumularse en el borde de la brecha introducida artificialmente, lo que podría obstaculizar el análisis de datos y comprometer la proliferación y migración necesarias para el cierre de la herida (Ashby & Zijlstra, 2012).

El desarrollo de modelos *in vitro* ha contribuido significativamente a la comprensión de los procesos de cicatrización de heridas, permitiendo estudiar diversos aspectos como la proliferación celular, la migración, la síntesis de proteínas, la interacción célula-célula y célula-matriz, la resistencia a la tensión y la dinámica del proceso (Pastar et al., 2018). Se han realizado estudios para identificar rápidamente los posibles efectos de cicatrización de heridas de los compuestos o elementos seleccionados utilizando tres modelos principales: sistemas de células individuales (Cui et al., 2021), sistemas multicelulares (Miranda-Azpiazu et al., 2018) y cultivos de órganos (Varani, 2012). Estas investigaciones son fundamentales para el desarrollo de nuevos modelos *in vitro* destinados al estudio de la cicatrización de heridas. La **Figura 9** proporciona detalles sobre estos modelos y representaciones de heridas utilizados en los estudios.



**Figura 9. Modelos *in vitro* utilizados en estudios de cicatrización de heridas.** Se ilustran tres modelos principales utilizados para estudios de cicatrización de heridas: el sistema unicelular, que emplea parámetros de estudio en monocapa o 2D; el sistema multicelular, que utiliza parámetros de estudio en cocultivo y en 3D; y el cultivo de órganos, que se centra en el estudio de la piel intacta como parámetro principal. Estos modelos son fundamentales para comprender y simular procesos complejos de cicatrización de heridas en entornos controlados de laboratorio (Sarian et al., 2023).

### 2.5.2. MODELOS *IN VIVO* DE LESIONES CUTÁNEAS.

Los modelos *in vivo* (modelos murinos) son fundamentales para comprender los procesos celulares y moleculares de la cicatrización de las heridas. Además, este tipo de modelos son altamente predictivos para la evaluación de la efectividad de los tratamientos farmacológicos, en la cicatrización de heridas. Este tipo de abordaje conlleva la generación de un tipo de heridas

cutánea (p. ej., quemadura, incisión cutánea, etc.) en animales de laboratorio con el objetivo del monitoreo del cierre de la herida y estudiar el tiempo de cicatrización (Ahmad, 2023).

Las lesiones cutáneas son utilizadas en diversos modelos animales, tales como: ratas, ratones, conejos y cerdos para la comprensión de la evolución del proceso de cicatrización de la herida, empleando una variedad de tipos de daños. Sin embargo, debido a las diferencias anatómicas y fisiológicas entre los modelos animales y los seres humanos, no existe un consenso claro sobre cuál modelo animal es el más apropiado (Saeed & Martins-Green, 2024; Saeed & Martins-Green, 2022; Sami et al., 2018). Por lo tanto, al emplear modelos animales, es imperativo seguir los principios de las 3R (reemplazo, reducción y refinamiento) con el objetivo de garantizar un tratamiento ético hacia los animales. Además, cabe destacar que la eficacia en la cicatrización de heridas se ve influenciada por factores experimentales, tales como: el modelo animal, el tipo de apósito, la ubicación de la herida y el microbiota (Ahmad, 2023; Elliot et al., 2018).

Las técnicas más comunes para evaluar la cicatrización de heridas en modelos *in vivo* con el uso de apósitos (p. ej., parches, hidrogeles, cremas) incluyen: (i) la observación visual para medir cambios en el tamaño de la herida; (ii) el análisis de la tasa de cicatrización mediante epitelización, vascularización y deposición de la matriz extracelular; (iii) ensayos bioquímicos de metabolismo de colágeno, el estrés oxidativo o la actividad de la mieloperoxidasa; y (iv) estudios histológicos (p. ej., conteo nuclear, proteínas cutáneas) e estudios inmunohistoquímicos, como la liberación de citoquinas y factores de crecimiento (Masson-Meyers et al., 2020). Estas técnicas de evaluación proporcionan información detallada sobre las características de la herida, tales como: el crecimiento del tejido, el grado de cicatrización, la vascularización y la presencia de contaminación bacteriana (Deng et al., 2022; Shrivastav et al., 2018).

Los métodos de evaluación de la cicatrización de heridas se clasifican en: no invasivos e invasivos, dependiendo del enfoque utilizado. Los métodos no invasivos incluyen la observación visual macroscópica, la medición de la tasa de cicatrización (cambio en el área superficial de la herida y trazado de la misma) y la evaluación biofísica de la herida mediante técnicas de imagen *in vivo*, como la tomografía de coherencia óptica (OCT), la espectroscopía difusa en el infrarrojo cercano y la microscopía confocal de barrido láser (Yazdanpanah et al., 2021). Por otro lado, los métodos de evaluación de heridas invasivos comprenden enfoques bioquímicos, histológicos e inmunológicos. Ejemplos de ensayos bioquímicos utilizados para medir diversas macromoléculas, como la actividad de los macrófagos, incluyen ensayos de mieloperoxidasa para evaluar la fase inflamatoria y el reclutamiento/acumulación de neutrófilos, perfiles de estrés oxidativo para cuantificar oxígeno y nitrógeno reactivos y N-acetilglucosaminidasa (Barreto et al., 2016; Chiang et al., 2017).

# **CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO**

El proyecto consiste en la generación de innovaciones biotecnológicas dirigidas a mejorar el proceso de cicatrización de lesiones cutáneas. Este enfoque integral incluye el desarrollo y la caracterización de andamios biotecnológicos avanzados, diseñados para estimular el crecimiento celular y el desarrollo de prueba de laboratorio para la validación de sus capacidades, como andamios cutáneos innovadores para ser utilizados en Biomedicina.

El proyecto consta de dos etapas:

1. Desarrollar andamios biotecnológicos ecosustentables para aplicaciones en lesiones cutáneas crónicas.
2. Desarrollar estudios *in vitro* aplicados de los andamios biotecnológicos cutáneos generados, a partir de técnicas de ingeniería tisular.

El cuadro esquemático, de la **Figura 10** representa un diagrama conceptual de las etapas I y II de la propuesta de investigación que ha sido desarrollada experimentalmente.

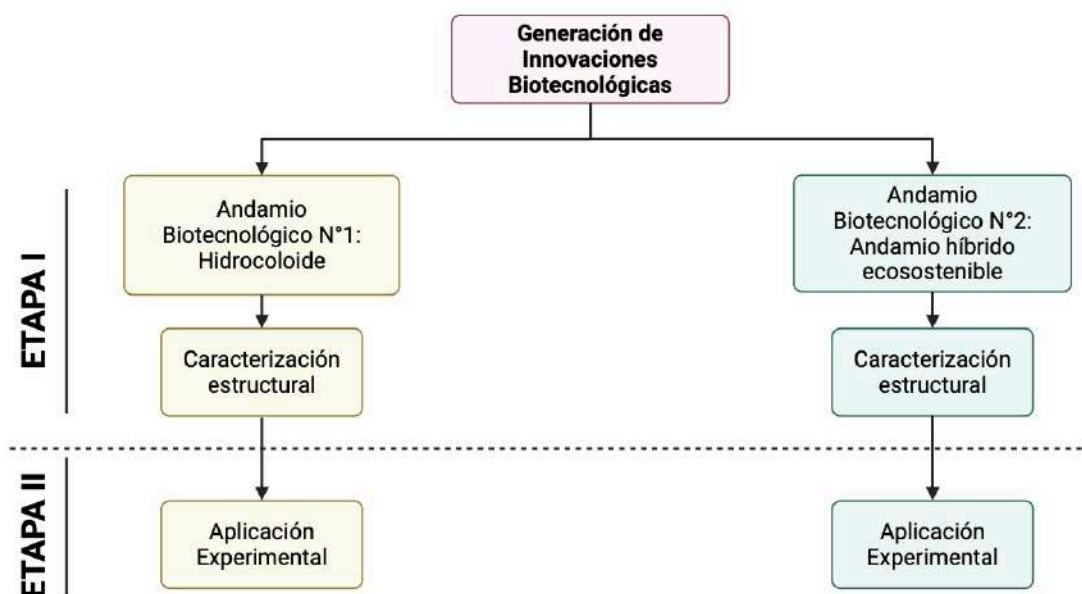


Figura 10. Diagrama esquemático de las etapas del proyecto (Este estudio).

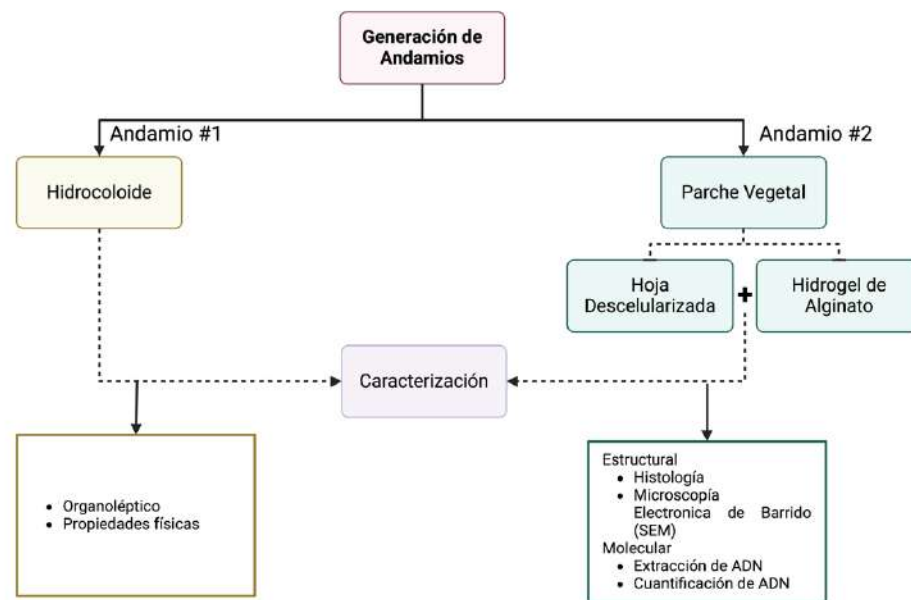
**OBJETIVO I: DESARROLLAR ANDAMIOS BIOTECNOLÓGICOS ECOSUSTENTABLES PARA APLICACIONES EN LESIONES CUTÁNEAS CRÓNICAS.**

A grandes rasgos, se plantea la generación de dos tipos de andamios para aplicaciones en lesiones cutáneas, basados en innovaciones de ingeniería tisular. El primer andamio biotecnológico corresponde a un hidrocoloide bioactivo, que consiste en un apósito delgado que incorpora agentes gelificantes hidrofílicos (p. ej., gelatina, carboximetilcelulosa sódica y pectina) dentro de un compuesto adhesivo, laminado con una capa exterior flexible y resistente al agua. Este tipo de apósito es conocido por su capacidad de absorción y mantener un ambiente húmedo, lo que favorece la cicatrización (Thomas, 2008).

El segundo andamio biotecnológico es parche ecosustentable híbrido, basado en dos interfaces estructurales: una capa interna basada en vegetal descelularizado y una capa externa, derivada de un hidrogel, confeccionado a partir de alginato. La monocapa interna fue obtenida tras un proceso de descelularización de una hoja de banana, como la zona de contacto cutánea y una capa gelificante derivada de un hidrogel de alginato, que tiene incorporado un sistema fotosintético para la liberación de oxígeno.

Los andamios biotecnológicos cutáneos, han sido caracterizados y evaluados mediante: sus propiedades organolépticas y físicas, tales como su apariencia, textura y características sensoriales que podrían influir en su aplicación (en el caso de hidrocoloide bioactivo) y mediante caracterización estructural (p. ej., microscopía electrónica), molecular (p. ej., ensayo de ADN) y reológica (p. ej., rigidez estructural) (en el caso de parche ecosustentable híbrido). Finalmente, los andamios biotecnológicos son sometidos a estudios *in vitro* para estudiar sus propiedades superabsorbentes, biocompatibilidad y capacidad de liberación de principios bioactivos.

En conjunto, estas metodologías proporcionan una evaluación integral de los andamios desarrollados, permitiendo determinar su idoneidad para futuras aplicaciones en modelos de cicatrización y su potencial en la ingeniería tisular, como también su posible escalabilidad en aplicaciones de Biomedicina (**Figura 11**).

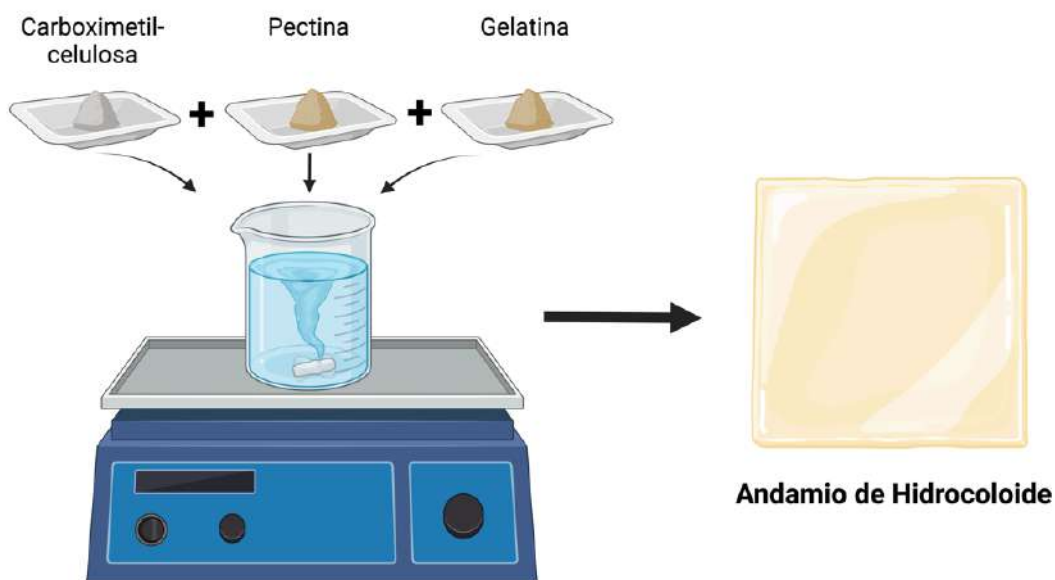


**Figura 11.** Diagrama esquemático de la metodología para el desarrollo de una estrategia de ingeniería tisular y caracterización molecular para aplicaciones en modelo de cicatrización (Este estudio).

### **3.1. GENERACIÓN DE ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO #1: HIDROCOLOIDE BIOACTIVO.**

#### **3.1.1. GENERACIÓN DE ANDAMIO DE HIDROCOLOIDE PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS**

Se prepararon películas de hidrocoloide mediante la disolución de polímeros en solvente. Las películas poliméricas producidas están compuestas de gelatina (Sigma-Aldrich, 6% p/v), pectina (Sigma-Aldrich, 3.5% p/v) y carboximetilcelulosa de sodio (Sigma-Aldrich, 3.5% p/v). Los compuestos poliméricos fueron pesados en balanza digital, para luego ser disueltos gradualmente en agua destilada. Posteriormente, se añadió glicerol (Loba Chemie, 10% v/v) y propilenglicol (Sigma-Aldrich, 5% v/v) hasta formar un gel homogéneo mediante agitación constante a 500 rpm. El gel fue calentado 50°C durante 30 minutos para asegurar la disolución completa. Finalmente, se vertieron 25 g. del gel en una placa de petri de poliestireno transparente (diámetro = 90 mm) y se ha dejado secar en el horno a  $39 \pm 3$  °C, durante 24 horas para la formación del andamio hidrocoloide (**Figura 12**) (Chin et al., 2018).



**Figura 12. Metodología para la generación de andamio de hidrocoloide para aplicaciones en modelo de cicatrización (Este estudio).**

### **3.2. GENERACIÓN DE ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO #2: PARCHE ECOSUSTENTABLE HÍBRIDO.**

#### **3.2.1. ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE ANDAMIO VEGETAL DESCELULARIZADO PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS**

Se realizaron comparaciones entre diferentes métodos de descelsularización utilizados en tejidos vegetales por medio de detergentes iónicos (SDS) y no iónicos (Tritón-X-100), con el fin de evaluar la eficacia de cada protocolo establecido. En donde, se implementaron seis protocolos diferentes: Dikici et al., 2019; Gershlak et al., 2017; Lacombe et al., 2020; Robbins et al., 2020; Salehi et al., 2020; Wang et al., 2020, utilizando hojas de espinaca como modelo vegetal para el estudio debido a su facilidad de adquisición y su uso extendido en investigaciones anteriores con métodos de descelsularización (**Figura 13**).

**Protocolo 1: Robbins et al., 2020, Journal of Biomedical Materials Research.**

Se realizaron cortes de 8 mm en las hojas de espinaca utilizando un biopunch (Ted Pella, Inc., Estados Unidos). Las hojas fueron tratadas tres veces en serie con hexano (Sigma-Aldrich, 98%) y solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma-Aldrich, 1X) para la eliminación de la capa de cutícula de la superficie de la hoja. Posteriormente, las hojas fueron descelularizadas por inmersión con soluciones de 1% de dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma-Aldrich) en agua desionizada (DI), seguidas por 0.1% de Triton X-100 (VWR) + hipoclorito de sodio (Sigma-Aldrich, 10%) en agua desionizada, y por último agua desionizada, cada una durante 24 horas. Por último, los andamios de las hojas fueron enjuagados en una solución tampón Tris (VWR, 10 mM) con pH 9.0 durante toda la noche en placa agitadora (Robbins et al., 2020).

**Protocolo 2: Lacombe et al., 2020, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.**

Se efectuaron cortes de 8 mm en las hojas de espinaca utilizando un biopunch. Para el proceso de descelularización, las hojas de espinaca se sumergieron directamente en las soluciones descelularizantes en un agitador orbital. La eliminación de la cutícula cerosa que recubría las hojas se llevó a cabo mediante tres ciclos de lavados alternados con hexano, en conjunto, una solución salina tamponada con fosfato. La descelularización mediante tratamiento químico se inició con una solución al 1% de dodecil sulfato de sodio (SDS) en agua desionizada durante 2 días, seguida de una solución de hipoclorito de sodio al 10% + Triton-X 100 al 0.1% en agua DI a lo largo de 2 días. Finalmente, las hojas fueron enjuagadas con agua DI durante 48 horas para la remoción de impurezas de los detergentes (Lacombe et al., 2020).

**Protocolo 3: Wang et al., 2020, Developmental Biology.**

Se realizaron cortes de 8 mm en las hojas de espinaca utilizando un biopunch. Para la eliminación de la cutícula, las hojas fueron lavadas alternadamente en una solución salina tamponada de fosfato (DPBS) al 10% y una solución de hexano; realizada tres veces por un tiempo de 5 minutos. Posteriormente, las hojas fueron tratados por inmersión con SDS al 10% durante 24 horas, seguido de Triton-X-100 al 0.5% que contenía un 1.2% de blanqueador de hipoclorito de sodio en agua desionizada hasta que las hojas se volvieron transparentes (aproximadamente, 24 horas). Finalmente, las hojas descelularizados fueron lavados con agua desionizada durante 24 horas para eliminar detergentes y blanqueadores residuales (Wang et al., 2020).

**Protocolo 4: Dikici et al., 2019, Journal of Biomaterial Applications.**

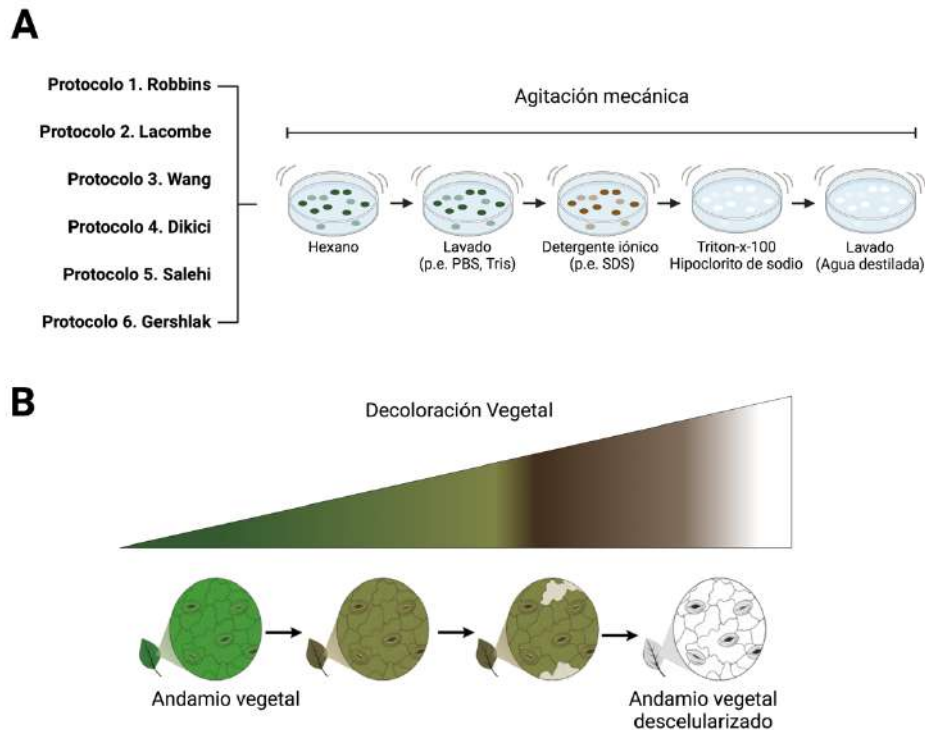
Se realizaron cortes de 8 mm en las hojas de espinaca utilizando un biopunch. Las hojas se sumergieron en una mezcla de hexano durante 1 hora para eliminar las cutículas y, luego se lavaron con solución salina tamponada con fosfato. Posteriormente, las hojas se sumergieron en una solución al 10% de dodecil sulfato de sodio durante cinco días, luego en 1% de Triton-X100 durante un día; enseguida, en Triton-X-100 (0.1%) durante el siguiente día y finalmente, en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 4 horas; las hojas se mantuvieron en un agitador orbital a 60 rpm. Las soluciones descelularizantes fueron cambiadas diariamente para mejorar la eficiencia de la descelularización. En la etapa final, después de los pasos de lavado con detergentes, las hojas descelularizadas obtenidas se enjuagaron en una solución de PBS estéril (Dikici et al., 2019).

**Protocolo 5: Salehi et al., 2020, Gene.**

Se realizaron cortes de 8 mm en las hojas de espinaca utilizando un biopunch. Para eliminar las cutículas de las hojas de espinaca, se lavaron con agua desionizada y se enjuagaron en hexano al 98% durante 5 minutos. Luego, se realizó un lavado con solución salina tamponada con fosfato; en donde, este proceso se repitió 3 veces para asegurar la eliminación completa de la cera epicuticular en la superficie de las hojas de espinaca. Posteriormente, las muestras vegetales se trataron con SDS al 10X durante 5 días (mediante inmersión) y enseguida, se lavaron 3 veces con agua desionizada, seguido de un enjuague en Triton-X-100 al 0.1% en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 2 días. Finalmente, las muestras vegetales se lavaron con agua desionizada y se transfirieron al hexano al 98% y PBS por un minuto, por separado. Las hojas se mantuvieron en un agitador orbital a 60 rpm, considerando cambio de medio de descelularización, de forma diaria, para mejorar la eficiencia del proceso de descelularización (Salehi et al., 2020).

**Protocolo 6: Gershlak et al., 2017, Biomaterials.**

Se realizaron cortes de 8 mm de diámetro en las hojas de espinaca utilizando un biopunch. Para la eliminación de las cutículas de las hojas de espinaca, estas fueron sometidas a un tratamiento, en serie, con lavados con hexano y PBS 1X. Posteriormente, las hojas fueron tratadas por inmersión con una solución al 10% de dodecil sulfato de sodio en agua desionizada durante 5 días, seguido de una solución al 0.1% de Triton-X-100 en una solución de blanqueador de hipoclorito de sodio al 10% en agua desionizada durante 48 horas. Las hojas se mantuvieron en un agitador orbital a 60 rpm y las soluciones se cambiaron diariamente para mejorar la eficiencia de la descelularización (Gershlak et al., 2017).

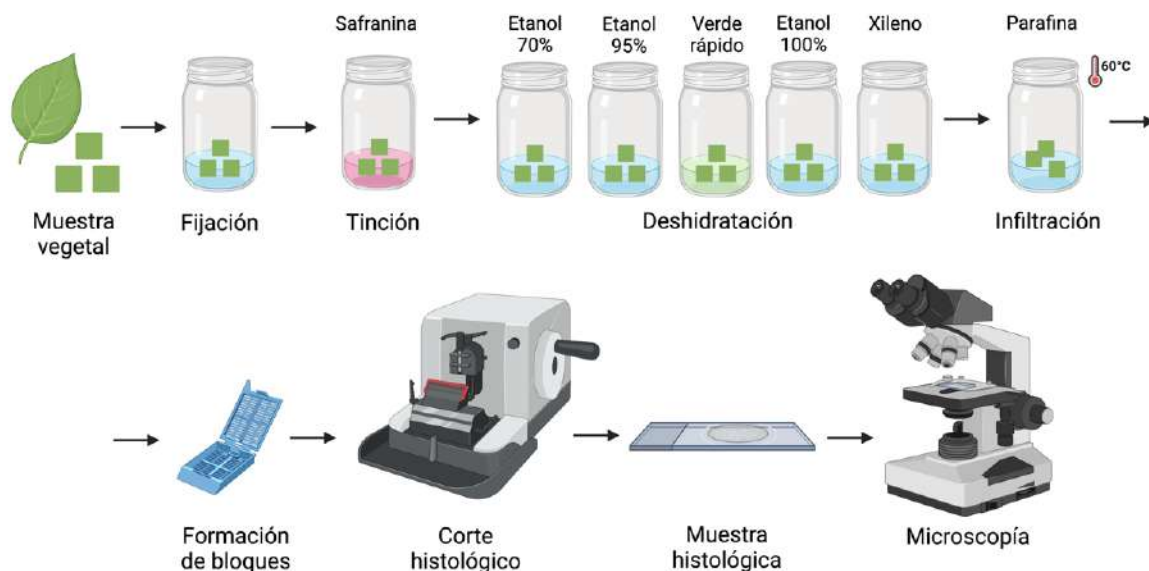


**Figura 13. Metodología para la estandarización del protocolo de obtención de andamio vegetal descelularizado para aplicaciones biotecnológicas. A. Se compararon seis protocolos de diferentes autores:**

Robbins, Lacombe, Wang, Dikici, Salehi y Gershlak. Se muestra el procedimiento general utilizado para la descelularización de hojas de espinaca mediante diferentes protocolos. Los cortes de las hojas fueron tratados con una serie de reactivos: hexano, soluciones tamponadas (PBS, Tris), detergentes (iónico SDS, no iónico Triton-X-100), blanqueador (hipoclorito de sodio) y finalmente agua destilada. **B.** Los procesos de descelularización son genéricos y se diferencian principalmente por el tipo de reactivo utilizado y el tiempo de tratamiento. La ilustración muestra el andamio vegetal desde una hoja nativa hasta una descelularizada, con la hoja volviéndose más clara a medida que se eliminan las células, terminando en una estructura casi transparente. (Este estudio).

### 3.2.2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL ANDAMIO VEGETAL DESCELULARIZADO

Las muestras vegetales (tanto nativas, como descelularizadas) fueron cortadas en cuadrados de aproximadamente 1 cm y se fijaron paraformaldehído (PFA) al 4%. Luego, se embebieron en parafina, tras ser deshidratadas mediante lavados en alcoholes. Los bloques de parafina se seccionaron en cortes de 14  $\mu\text{m}$  mediante disección microtómica. Para el proceso de tinción las muestras vegetales, se utilizó el protocolo de Safranina (del inglés, Safranin) y Verde Rápido (del inglés, Fast Green). En resumen, los cortes vegetales fueron teñidos en una solución acuosa al 1% (p/v) de Safranina-O durante 1 hora, y posteriormente se enjuagaron en agua desionizada durante aproximadamente 5 minutos para eliminar el tinte residual. Después, las secciones se deshidrataron en etanol al 70% y luego al 95%, y se sumergieron durante 30 segundos en Verde Rápido FCF (0.1% p/v en etanol al 95%). Luego, las secciones se lavaron en dos cambios de etanol al 100% (2 min/paso) y se aclararon en dos cambios de xileno (2 min/paso) (Ruzin, 1999). Finalmente, las muestras fueron visualizadas mediante el uso de un microscopio (Olympus, Japón) (**Figura 14**).



**Figura 14. Diagrama de flujo para el proceso del análisis histológico del andamio vegetal.** Se detalla paso a paso el proceso utilizado para el análisis histológico del andamio vegetal, mediante técnicas histológicas. Comienza con la fijación del tejido para preservar su estructura, seguido de la tinción para mejorar la visualización. Luego, se realiza la deshidratación gradual utilizando diferentes reactivos y la infiltración con

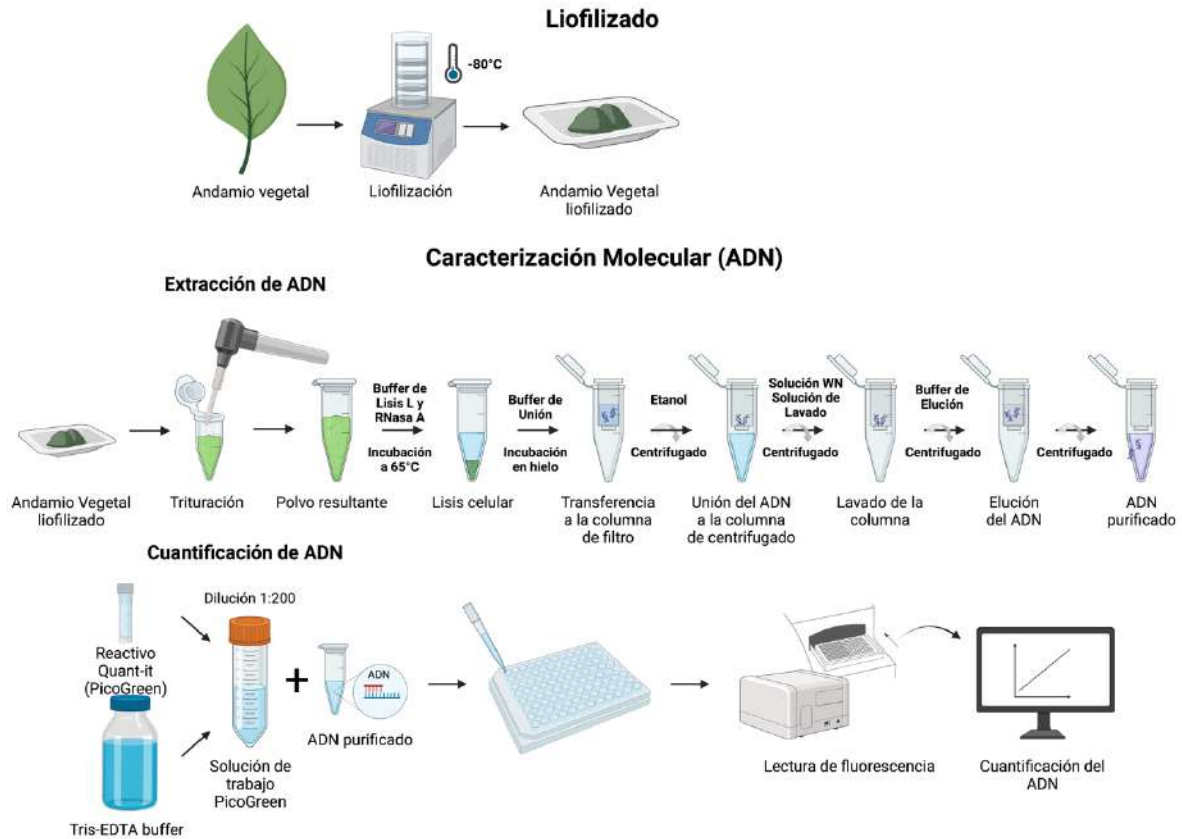
parafina para facilitar la inclusión del tejido. Posteriormente, se forman bloques de parafina y se realizan cortes histológicos en secciones delgadas que se montan en portaobjetos para la observación microscópica. Este análisis detallado permite evaluar las características celulares y estructurales del andamio vegetal. (Este estudio).

### **3.2.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL ANDAMIO VEGETAL DESCELULARIZADO**

En primer lugar, la extracción del ADN de hojas nativas y descelularizadas se realizó utilizando un Kit de Aislamiento de ADN de Plantas (Norgen Biotek, Canada), según las indicaciones del fabricante. La purificación se basa en la cromatografía en columna de centrifugado. De manera breve, el proceso implicó el triturado del tejido vegetal liofilizado en un mortero con nitrógeno líquido. Seguido, al polvo resultante se le agregaron 500µL de Buffer de Lisis L y 1 µL RNasa A, incubándose a 65°C durante 10 minutos, mezclándolo ocasionalmente el microtubo por inversión. A continuación, se añadieron 100µL de Buffer de Unión I al lisado y se incubó en hielo durante 5 minutos. El lisado se centrifugó durante 2 minutos a 14.000 RPM a través de una Columna de Filtro y el sobrenadante claro fue transferido a un nuevo microtubo. A este lisado clarificado se le añadieron 100 µL de etanol al 70% y fue mezclado en un vortex (Kim et al., 2009) **(Figura 15)**.

Posteriormente, se añadieron 650µL del lisado a la columna de centrifugado en un microtubo de recolección y fue centrifugado durante 1 minuto a 10.000 RPM, seguido de dos lavados con 100µL de Solución WN y 500µL de Solución de Lavado A, ambos centrifugados durante 1 minuto a 10.000 RPM. Finalmente, el ADN fue eluido con 100µL de Buffer de Elución B, durante 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugado durante 1 minuto a 10.000 RPM, para la recuperación eficiente y pura del ADN aislado de la muestra original (Kim et al., 2009) **(Figura 15)**.

Para la medición del contenido de ADN, se utilizó un método cuantitativo utilizando el Kit Quant-iT Picogreen (PG) dsDNA (Invitrogen, Estados Unidos), un colorante fluorescente ultrasensible que cuantifica ADN de doble hebra. Se preparó una solución de trabajo diluyendo 20x Tris-EDTA (TE) 1:20 en agua destilada (1x TE) y diluyendo el reactivo PG 1:200 en 1x TE. Se mezclaron 100µL del ADN aislado con 100 µL de la solución de trabajo PG en placas de 96 pocillos envueltas en papel aluminio y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La lectura de fluorescencia se realizó en un lector multimodal (Biotek, Estados Unidos) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 528 nm. La eficiencia de la descelularización se determinó comparando el contenido de % ADN en hojas frescas y descelularizadas (Dikici et al., 2019) **(Figura 15)**.

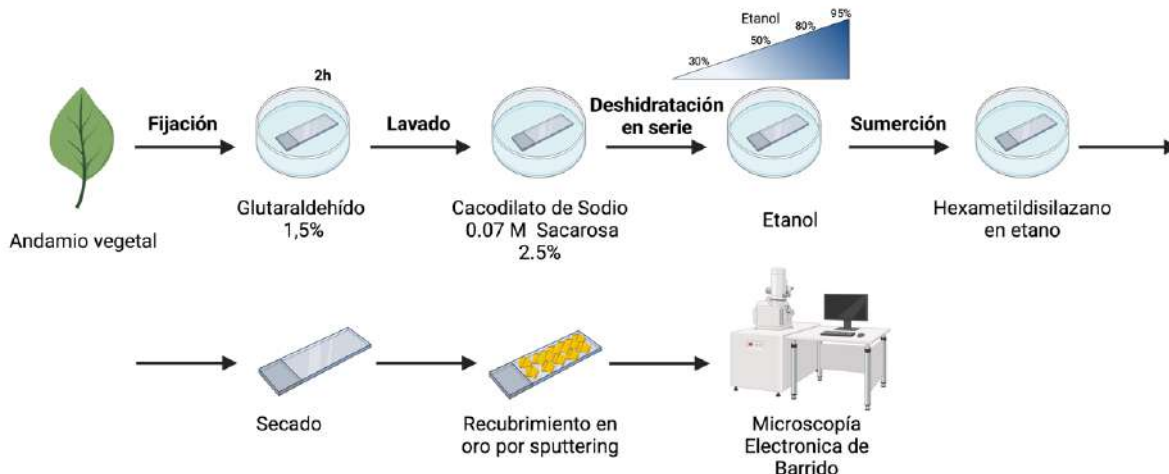


**Figura 15. Metodología para la caracterización Molecular del Andamio Vegetal.** Se ilustra el proceso de extracción y cuantificación de ADN, utilizando el Kit de aislamiento de ADN de plantas de Norgen Biotek y el Kit Quant-iT PicoGreen dsDNA (Este estudio).

### 3.2.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) DEL ANDAMIO VEGETAL DESCELULARIZADO

La preparación de las muestras para el análisis con Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, del inglés, Scanning Electron Microscope) consistió en una fijación con glutaraldehído al 1.5% en un tampón de cacodilato de sodio 0.07 M recién preparado durante 2 horas. Luego, las muestras se enjuagaron en cacodilato de sodio 0.07 M con la adición de 2.5% de sacarosa y se deshidrataron mediante inmersión en una serie de soluciones de etanol en agua, con las siguientes concentraciones: 30%, 50%, 80% y 95%. Posteriormente, las muestras se sumergieron en soluciones seriadas de hexametildisilazano (HMDS) en etanol con las mismas concentraciones: 30%, 50%, 80% y 95%. Las muestras se dejaron secar en el soporte y luego se recubrieron con una capa de oro por pulverización atómica (del inglés, sputtering) antes de realizar la imagen en el SEM (**Figura 16**) (Gershlak et al., 2017).

## Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

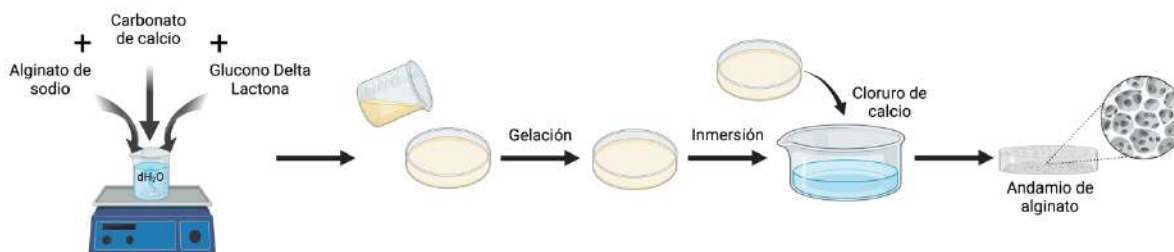


**Figura 16. Metodología para la caracterización en Microscopía Electrónica de Barrido del andamio vegetal.**

El proceso incluye la fijación del andamio con glutaraldehído para preservar su estructura, seguido de lavado con cacodilato de sodio para eliminar residuos. Posteriormente, se realiza la deshidratación mediante sumersión en hexametildisilazano en etanol y el secado del andamio. Finalmente, el andamio se recubre con una capa delgada de oro mediante sputtering antes de la observación en el microscopio electrónico de barrido, permitiendo una visualización detallada de la estructura tridimensional y las características superficiales del andamio a alta resolución (Este estudio).

### 3.2.5. OBTENCIÓN DE ANDAMIO DE ALGINATO PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

Para la obtención del andamio de alginato, se prepararon soluciones madre de alginato de sodio (Sigma-Aldrich, 2.5%) y carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) (Sigma-Aldrich, 248.5 mM), y se disolvió ácido D-(+)-gluconico  $\delta$ -lactona (GDL) en agua a una concentración de 420 mM. Para preparar 1 ml de andamio de alginato, se mezclaron 400  $\mu\text{l}$  de alginato de sodio y 217  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCO}_3$  con 183  $\mu\text{l}$  de agua. Para iniciar la polimerización, finalmente se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de GDL a la mezcla. Después de gelificar durante la noche, los andamios de alginato se sumergieron en cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) al 3.5% durante 30 segundos y se colocaron en placas petri selladas adecuadamente para evitar el secado del andamio de alginato (Figura 17) (Corrales-Orovio et al., 2023).



**Figura 17. Metodología para la formulación del andamio de alginato para aplicaciones en modelo de cicatrización** (Este estudio).

### 3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS: HIDROCOLOIDE Y ALGINATO

El andamio de hidrocoloide y alginato fue evaluado en cuanto a su apariencia física, color, olor y textura. Estas características fueron evaluadas mediante observación visual y la textura fue examinada presionando los andamio entre el pulgar y el índice (Chen et al., 2016). Además, el espesor de las películas de hidrocoloide y de alginato fueron medidos utilizando un micrómetro digital (Total Tools, Australia), registrando el espesor en diez posiciones aleatorias en cada película (Pereira et al., 2013). Para la variación de peso, se pesarán muestras de los andamios de  $5 \times 5 \text{ cm}^2$  (Figura 18).

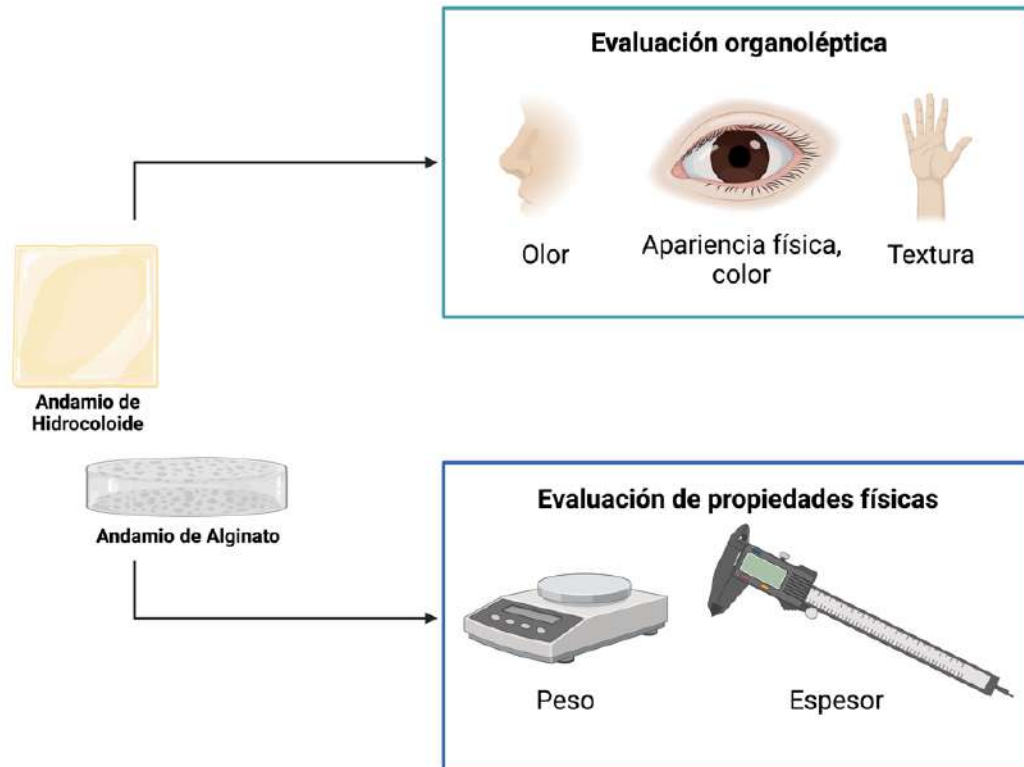


Figura 18. Metodología para la caracterización del andamio de hidrocoloide y alginato, que incluye la evaluación organoléptica y la evaluación de propiedades físicas (Este estudio).

## **OBJETIVO II: DESARROLLAR ESTUDIOS IN VITRO DE LOS ANDAMIOS BIOTECNOLÓGICOS MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR, MOLECULAR Y BIOINGENIERÍA.**

En la segunda etapa del proyecto, se llevaron a cabo estudios aplicados sobre los andamios generados: el andamio de hidrocoloide y el parche vegetal ecosostenible.

Para el andamio de hidrocoloide, se inició con una aplicación biotecnológica para evaluar su capacidad de superabsorción. Este proceso incluye la incorporación de extracto de *Centella asiatica* y miel, con el objetivo de generar un hidrocoloide bioactivo para mejorar sus propiedades de cicatrización del andamio. Una vez preparado, se realizaron ensayos *in vitro* para comprobar su efectividad tanto en la absorción de fluidos como en la promoción de la cicatrización (**Figura 19**).

Por otro lado, el parche vegetal ecosostenible híbrido se desarrolla a través del ensamblaje de un parche vegetal descelularizado combinado con alginato oxigénico. Para la formación del andamio oxigénico, se cultivaron microalgas *Chlorella vulgaris*, las cuales actúan como sistema oxigénico. Este parche oxigénico se sometió a una caracterización funcional para evaluar su desempeño y funcionalidad en términos de eficacia en la entrega de oxígeno (**Figura 19**).

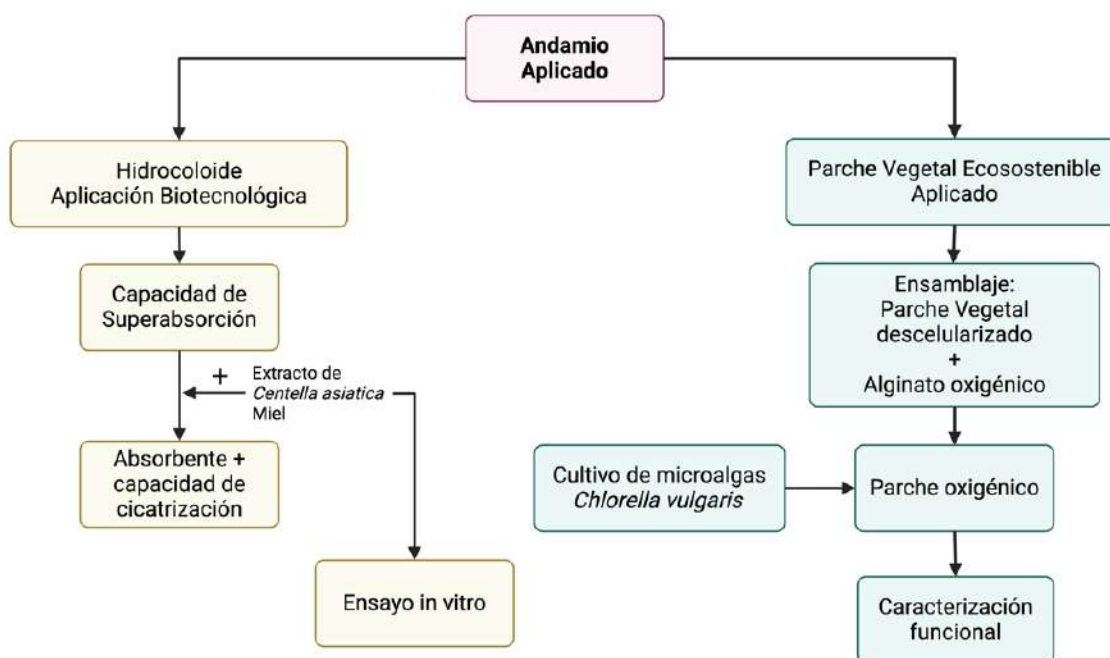


Figura 19. Diagrama esquemático de la metodología para el desarrollo de estudios *in vitro* basados en estrategias biotecnológicas de los andamios (Este estudio)

### **3.3. ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO #1: APLICACIÓN DEL HIDROCOLOIDE**

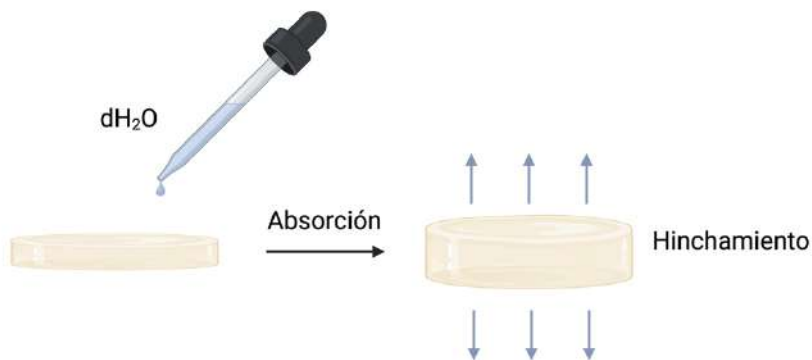
#### **3.3.1. EVALUACIÓN DE ABSORCIÓN DE AGUA DE LOS ANDAMIOS**

Las películas de hidrocoloide cargada con extracto de *Centella asiatica* y miel fueron cortadas en cuadrados de 5 x 5 cm. Las películas fueron pesadas y sumergidas en agua en un plato petri. Después de 24 horas de inmersión, las películas fueron pesadas nuevamente y el porcentaje de absorción de humedad fue calculada como la diferencia entre el peso final de la película y

el peso inicial de la película (Chin et al., 2018) (**Figura 20**). El porcentaje de absorción de humedad de la película se calculó utilizando:

$$\text{Absorción de agua} = \frac{[W_t - W_0]}{W_0} * 100$$

donde,  $W_t$  es el peso de las muestras de película después de 24 horas, y  $W_0$  el peso de la muestra de película antes de ser insertada en la cámara húmeda.

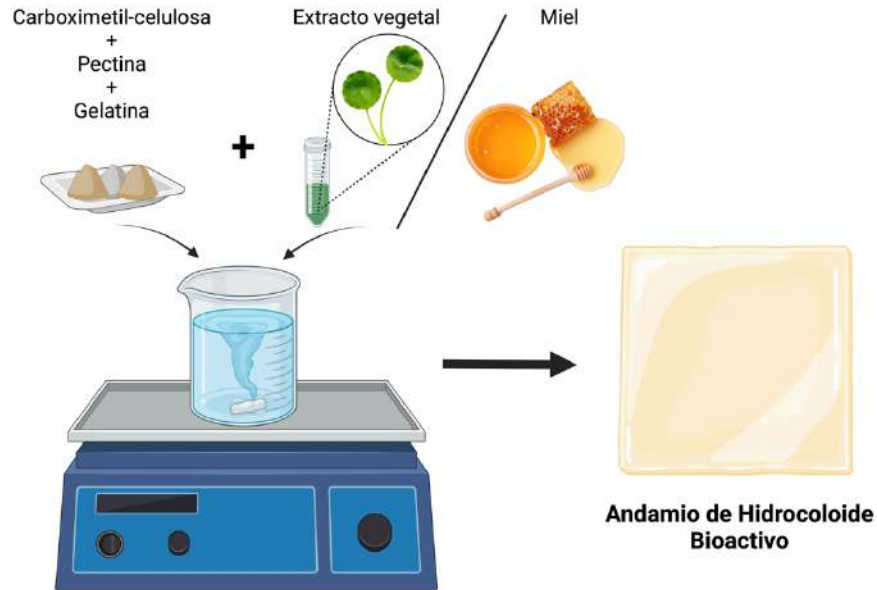


**Figura 20. Metodología para la evaluación de absorción de agua de los andamios (Este estudio)**

Para el análisis estadístico, todos los valores en el gráfico se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). La significancia estadística de estos resultados se determinó mediante una prueba ANOVA de una vía (one-way ANOVA) para múltiples comparaciones utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Las diferencias se consideraron significativas para un valor de probabilidad (p) de \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

### **3.3.2. GENERACIÓN DE ANDAMIO DE HIDROCOLOIDE CON PRINCIPIOS TERAPÉUTICOS ACTIVOS PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS**

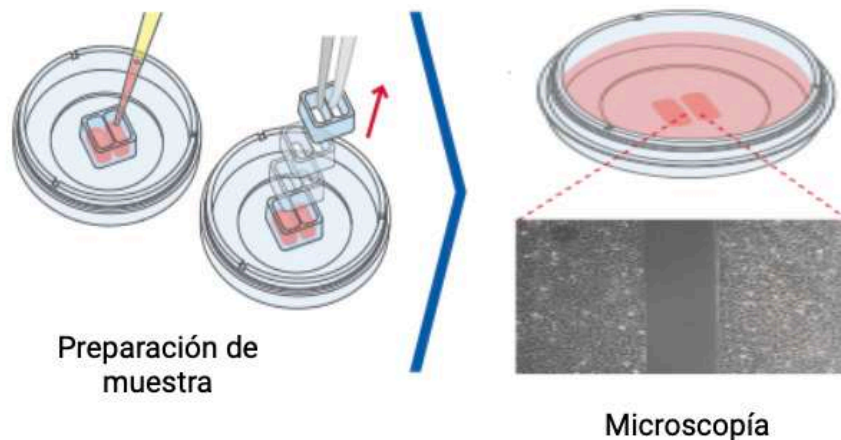
Para la producción de películas de hidrocoloide cargadas con extracto de *Centella asiatica* y miel, se utilizó el método descrito en el **punto 3.1.1.**, donde se generó un andamio de hidrocoloide mediante la disolución de polímeros en un solvente. Las películas poliméricas se componían de gelatina, pectina y carboximetilcelulosa de sodio. Los componentes poliméricos se pesaron con precisión y se disolvieron gradualmente en agua destilada. Se añadió glicerol y propilenglicol al gel resultante, que se homogeneizó y se calentó a 50°C durante 30 minutos para asegurar la disolución completa de cualquier grumo restante. La única diferencia fue la adición de 5% de extracto acuoso de *Centella asiatica* o miel (Miel Boqueteña, Panamá), disueltos gradualmente en la mezcla de gel antes de secarse en el horno (**Figura 21**).



**Figura 21. Metodología para la generación de andamio de hidrocoloide con principios terapéuticos activos para aplicaciones en modelo de cicatrización (Este estudio).**

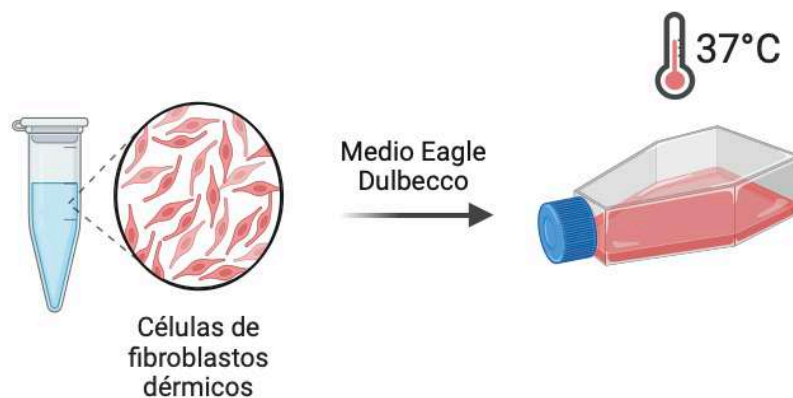
### 3.3.3. MODELO DE CICATRIZACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Para el modelo de cicatrización de herida in vitro, fue empleado un inserto de cultivo (Ibidi Scientific, Alemania) para crear una herida en un cultivo celular. Las células fueron sembradas en cada pocillo del inserto de cultivo IBIDI en un  $\mu$ -Dish (IBIDI Scientific, Alemania). Después de al menos 24 horas de incubación a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sup>2</sup> para permitir la adherencia celular, se retiraron los insertos para verificar la adherencia celular (Jeffery Marano et al., 2015; Lin et al., 2020). Posteriormente, se realizó un lavado suave con solución de PBS para eliminar las células no adheridas en el  $\mu$ -Dish. Finalmente, las muestras fueron visualizadas en el microscopio de contraste de fases (Olympus, CX-50, Estados Unidos) (Balachandran et al., 2023; Zhu et al., 2014) (**Figura 22**).



**Figura 22. Metodología para el modelo de cicatrización mediante técnicas de biología celular y molecular (Este estudio).**

El cultivo celular hace referencia a técnicas de laboratorio que posibilitan el crecimiento de células eucariotas o procariontas en condiciones fisiológicas controladas. En este estudio, se cultivaron células de fibroblastos dérmicos (ATCC, PCS-201-012), las cuales son esenciales en la cicatrización debido a su capacidad para producir colágeno, migrar al sitio de la herida, secretar factores de crecimiento y remodelar la matriz extracelular. Estas células fueron cultivadas en Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich), utilizado por su composición enriquecida con nutrientes esenciales, su versatilidad para soportar una amplia variedad de tipos celulares, y su capacidad para proporcionar un entorno consistente y reproducible, adecuado para mantener la viabilidad y funcionalidad celular en condiciones de cultivo. El DMEM fue suplementado con 10% de suero de bovino fetal para proporcionar una fuente completa de nutrientes y 1% de antibióticos de penicilina/estreptomicina para prevenir contaminaciones bacterianas. Las células se cultivaron hasta que alcanzaron una confluencia de alrededor del 80% y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sup>2</sup> (Zhang et al., 2018) (**Figura 23**).



**Figura 23. Metodología de la implementación de cultivo de fibroblasto dérmico mediante técnicas de biología celular (Este estudio).**

Con el fin de evaluar la capacidad de migración y reparación de una monocapa celular lesionada, se creó una herida en un cultivo celular utilizando un inserto de cultivo Ibidi (Balachandran et al., 2023). El cierre de la herida fue monitoreado capturando imágenes digitalizadas al inicio del experimento (tiempo 0, inmediatamente después de crear la herida) y después de 30 horas para evaluar el estado de migración de las células y la cobertura del área herida (Prelipcean et al., 2022) (**Figura 24**).

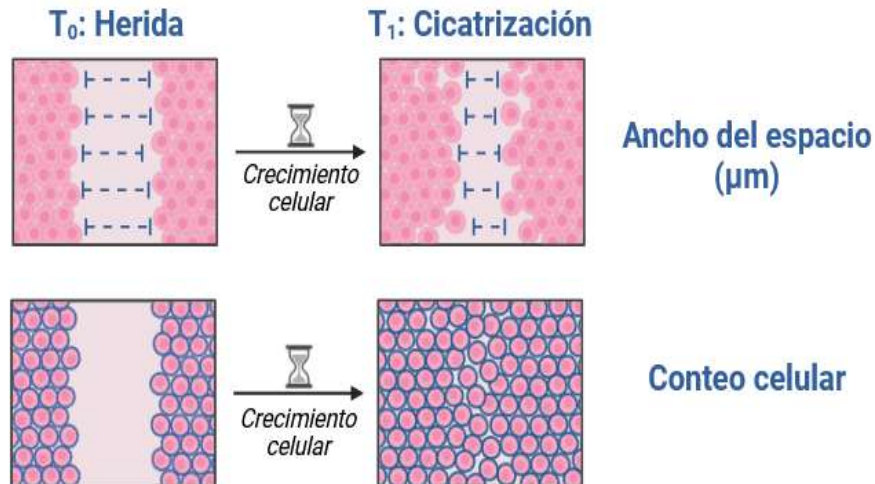


Figura 24. Metodología para el estudio in vitro de cicatrización (cierre de herida) de biología celular y molecular (Este estudio).

### **3.4. ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO #2: APLICACIÓN DEL PARCHÉ ECOSOSTENIBLE OXIGÉNICO.**

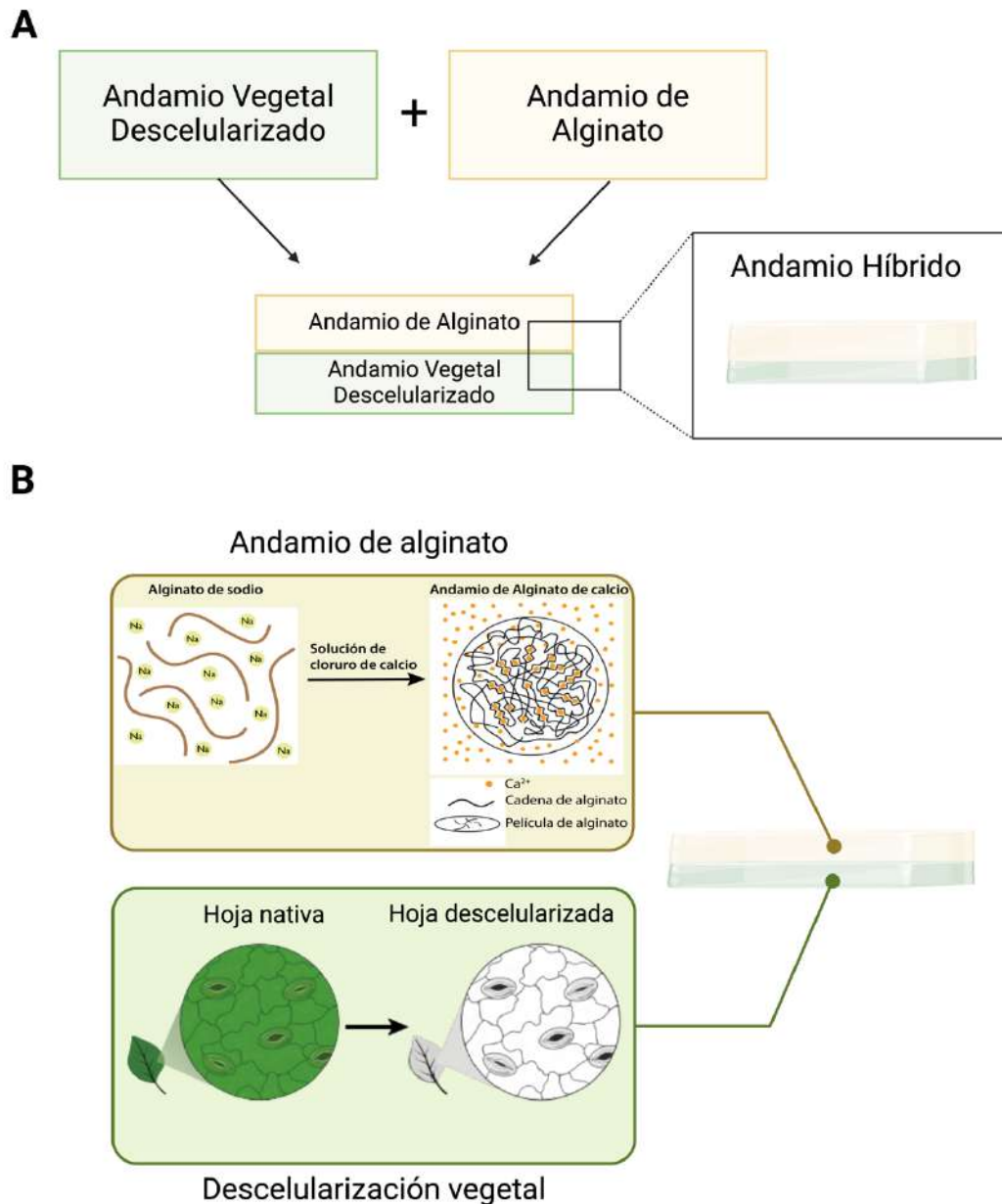
#### **3.4.1. GENERACIÓN DE ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO HÍBRIDO (ALGINATO + HOJA DESCELULARIZADA)**

En primer lugar, se utilizó el Protocolo 3 de Wang (**punto 3.2.1.**) para obtener el andamio vegetal descelularizado de *Musa sp.* (planta de banano), elegido por su eficiencia en el tiempo de descelularización en comparación con otros métodos. Este protocolo implicó el lavado alterno con hexano y solución salina tamponada y tratamiento con SDS al 10% seguido de Triton-X-100 al 0.5% con blanqueador de clorito de sodio, y finalmente, lavados prolongados con agua desionizada para eliminar residuos (Wang et al., 2020).

Posteriormente, el andamio vegetal descelularizado fue sometido a análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) según el protocolo descrito en el **punto 3.2.3.** Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 1.5%, enjuagadas con una solución de cacodilato de sodio y sacarosa, deshidratadas con etanol en series ascendentes, seguidas de deshidratación con hexametildisilazano (HMDS), y finalmente recubiertas con oro por pulverización atómica de la observación en SEM (Gershlak et al., 2017).

Por otra parte, para generar el andamio de alginato se siguió lo descrito en el **punto 3.2.4.** Se prepararon soluciones madre de alginato de sodio al 2.5% y carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) a 248.5 mM, y se disolvió ácido D-(+)-gluconico  $\delta$ -lactona (GDL) en agua a una concentración de 420 mM. Para la preparación de 20 ml de andamio de alginato, se añadieron 8ml de alginato de sodio a un vaso de precipitado, seguidos de 4.34 ml de  $\text{CaCO}_3$  y 3.66 ml de agua destilada. Para iniciar la polimerización, se añadieron finalmente 4 ml de GDL a la mezcla, dando una solución viscosa. Posteriormente, se cortaron las hojas descelularizadas de *Musa sp.* en forma de rectángulo y se colocaron en un plato Petri. Se agregaron entonces 20 ml de la mezcla de alginato sobre la hoja, la cual se dejó gelificar durante la noche. Para promover el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, se vertió cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) al 3.5% sobre

el plato petri, donde los iones de calcio reemplazaron a los iones de sodio en el alginato, formando así una película de alginato de calcio sobre el andamio vegetal descelularizado. Tras unos minutos, se descartó el cloruro de calcio (Corrales-Orovio et al., 2023) (**Figura 25**).



**Figura 25. Metodología para la generación de andamio biotecnológico híbrido (andamio de alginato + hoja descelularizada) con productos oxigénicos. A.** Representación esquemática de la generación del andamio biotecnológico híbrido. Un andamio vegetal descelularizado se combina con un andamio de alginato para formar el andamio híbrido. **B.** Proceso de los componentes del andamio híbrido. El andamio de alginato se forma mediante la mezcla de alginato de sodio con una solución de cloruro de calcio, resultando en una red de alginato de calcio. Paralelamente, se descelulariza una hoja nativa, dejando una estructura de soporte descelularizada. Finalmente, ambos componentes se combinan para formar el andamio híbrido (Este estudio).

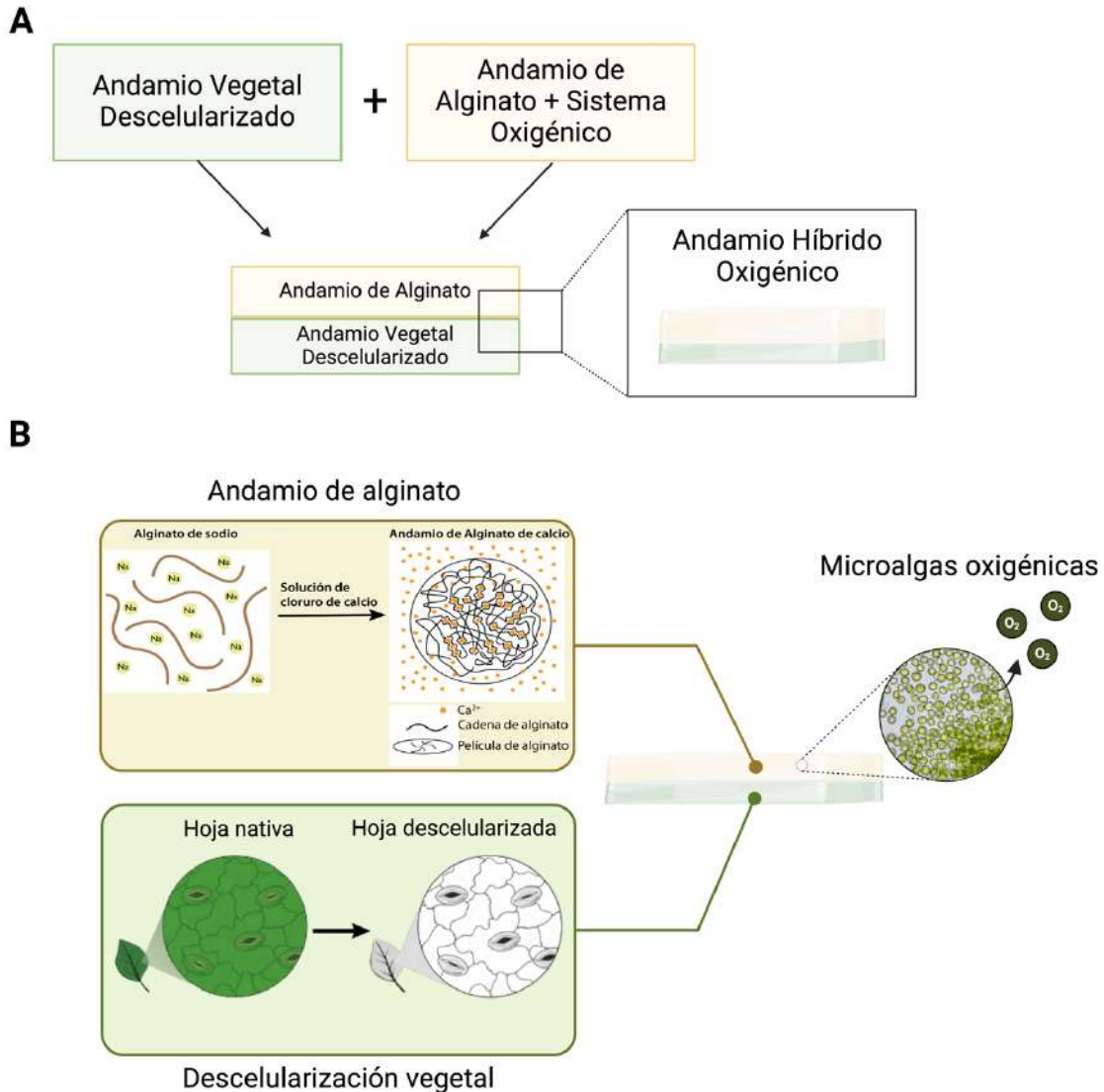
### **3.4.2. GENERACIÓN DE ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO HÍBRIDO CON PRODUCTOS OXIGÉNICOS (HOJA DESCELULARIZADA + ALGINATO + SISTEMA OXIGÉNICO)**

#### **I. IMPLEMENTACIÓN DE CULTIVO DE ALGAS OXIGÉNICAS MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR**

Las microalgas, al igual que las plantas superiores, producen oxígeno y biomasa comestible a través de la fotosíntesis, consumiendo dióxido de carbono, nutrientes y agua. *Chlorella vulgaris*, una microalga eucariota verde perteneciente al género *Chlorella*, se cultivó axénicamente en el Medio Basal de Bold (UTEX, Estados Unidos), medio mineral inorgánico estándar para el cultivo de microalgas de agua dulce, en frascos de cultivo a 26 °C con iluminación continua. El medio basal de Bold fue esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 121 °C para prevenir cualquier contaminación en las primeras etapas del crecimiento. Los cultivos se incubaron con el medio estéril y se agitaron manualmente dos a tres veces al día para evitar que las células se asentaran (Ahmad et al., 2010). Este entorno controlado asegura el crecimiento óptimo de la microalga. *C. vulgaris* requiere un rango tolerable de temperatura, intensidad de luz y pH, con valores óptimos de 25-30°C (Ma et al., 2022) y de 6.5-9 (Jiang et al., 2021), respectivamente.

#### **II. GENERACIÓN DEL ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO HÍBRIDO CON PRODUCTOS OXIGÉNICOS (HOJA DESCELULARIZADA + ALGINATO + MICROALGAS)**

Para generar el andamio de alginato con microalgas, se siguió el procedimiento descrito en el **punto 3.2.4**. Se utilizó microalgas *C. vulgaris* a una concentración de  $5 \times 10^7$  microalgas/ml de andamio de alginato. Para preparar 20 ml de andamio de alginato, se añadieron 8 ml de alginato de sodio a un vaso de precipitado, seguidos de 4.34 ml de  $\text{CaCO}_3$ . Posteriormente, se incorporaron  $1 \times 10^9$  microalgas resuspendidas en 3.66 ml de agua a la mezcla. Para iniciar la polimerización, se añadieron finalmente 4 ml de GDL, resultando en una solución viscosa. Esta solución viscosa se vertió sobre un plato petri que contenía hojas previamente descelularizadas y cortadas en forma de rectángulo de *Musa sp.*, y se dejó gelificar durante la noche. Para promover el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, se vertió cloruro de calcio al 3.5% ( $\text{CaCl}_2$ ) sobre el plato petri. Los iones de calcio reemplazaron a los iones de sodio en el alginato, formando así una película de alginato de calcio con microalgas integradas sobre un andamio vegetal descelularizado. Tras unos minutos, se descartó el cloruro de calcio del plato y las placas se sellaron adecuadamente para prevenir el secado del andamio de alginato (Corrales-Orovio et al., 2023) (**Figura 26**).

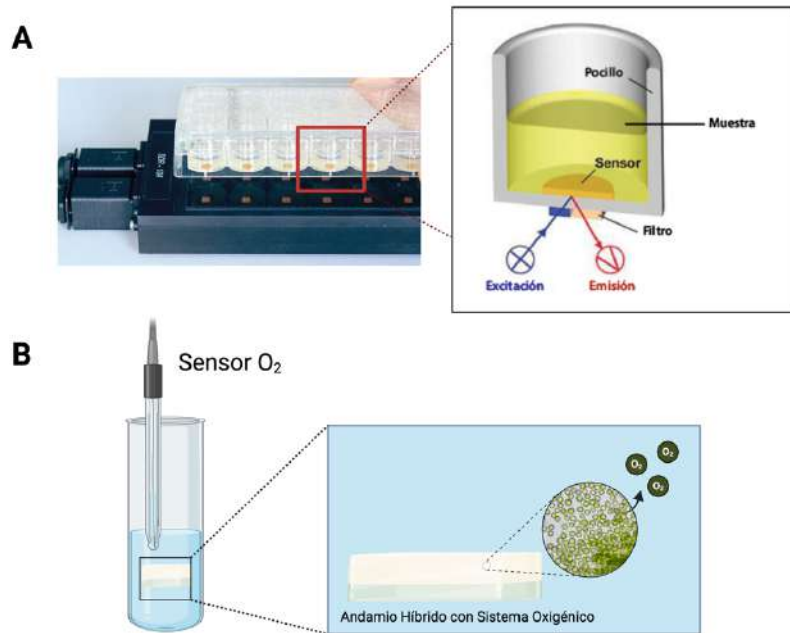


**Figura 26. Metodología para la generación del andamio biotecnológico híbrido oxigénico (hoja descelularizada + andamio de alginato + sistema oxigénico).** **A.** Representación esquemática de la generación del andamio biotecnológico híbrido. Un andamio vegetal descelularizado se combina con un andamio de alginato oxigénico para formar el andamio híbrido oxigénico. **B.** Proceso de los componentes del andamio híbrido oxigénico. El andamio de alginato se forma al mezclar alginato de sodio con microalgas y una solución de cloruro de calcio sobre una hoja previamente descelularizada, lo que resulta en una red de alginato de calcio, formando así el andamio híbrido oxigénico (Este estudio).

### III. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE OXÍGENO DEL ANDAMIO OXIGÉNICO

La actividad metabólica o la producción de oxígeno de los andamios de alginato oxigénico fue evaluada en Oxodishes utilizando el sistema SensorDishReader (PreSens, Alemania). Este sistema monitorea el porcentaje de contenido de oxígeno disuelto (% pO<sub>2</sub>) en el medio de cultivo utilizando un sensor de oxígeno fluorométrico. El sensor óptico está inmovilizado en el fondo de cada pocillo del multidish (**Figura 27**) y contiene un tinte luminiscente que es excitado por el lector SDR SensorDish colocado debajo del SensorDish. La vida útil de luminiscencia se detecta de manera no invasiva a través del fondo transparente de los pocillos y depende de la

presión parcial de oxígeno. Donde posteriormente, el software SDR convierte la respuesta del sensor en el valor de oxígeno (Schenck et al., 2015).



**Figura 27. Metodología para la evaluación de la producción de oxígeno del andamio. A.** Principio de medición de oxígeno del sistema PreSens. El sistema utiliza un sensor de oxígeno fluorométrico en cada pocillo que detecta la cantidad de oxígeno en el medio de cultivo. Este sensor utiliza un tinte que emite luz cuando se excita con un lector específico (SDR SensorDish). La intensidad de esta luz varía según la cantidad de oxígeno presente, y el software asociado convierte estas variaciones en valores numéricos, proporcionando una medición precisa de la actividad metabólica en entornos de cultivo. **B.** Diagrama esquemático de la medición de oxígeno en un andamio híbrido con sistema oxigénico. La concentración de oxígeno es medida utilizando el Sistema PreSens, permitiendo evaluar la liberación de oxígeno por las microalgas integradas en el andamio (Este estudio).

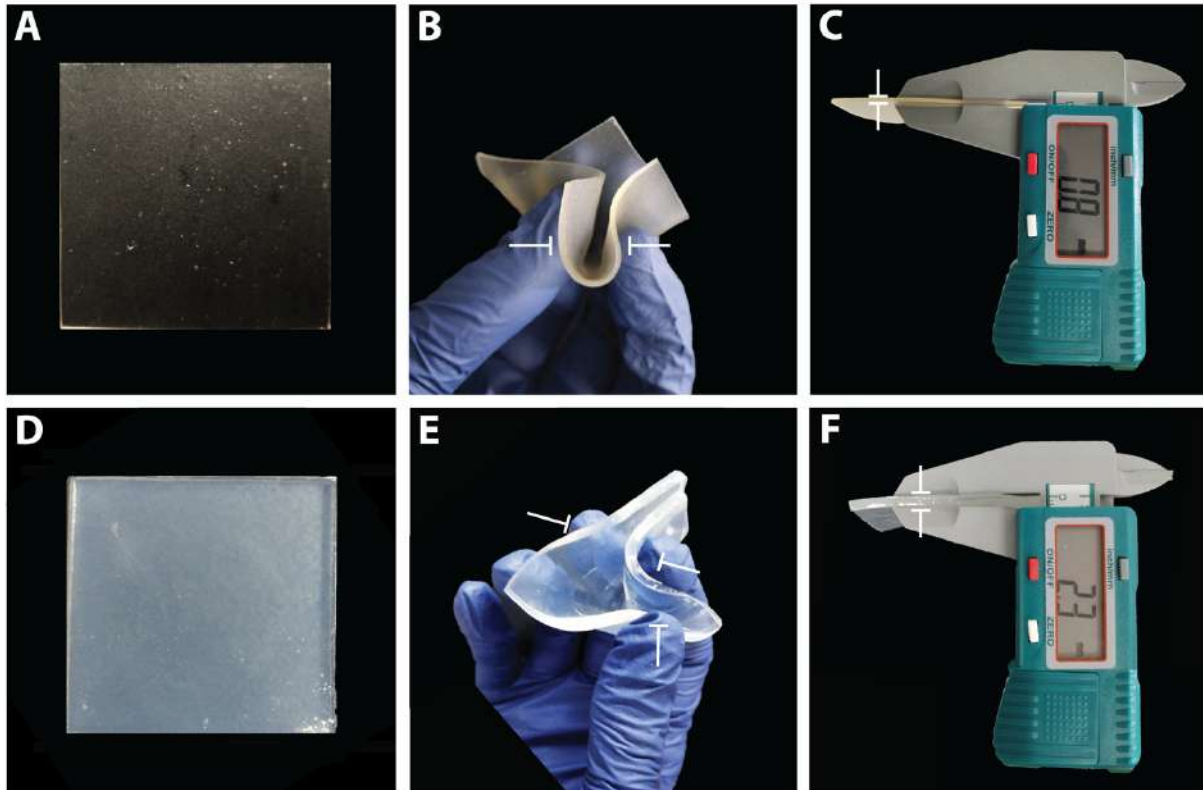
# **CAPÍTULO IV. RESULTADOS**

## **OBJETIVO I: DESARROLLAR ANDAMIOS BIOTECNOLÓGICOS ECOSUSTENTABLES PARA APLICACIONES EN LESIONES CUTÁNEAS CRÓNICAS.**

### **4.1 GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIO PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS**

En primer lugar, se generaron los andamios hidrocóloides a partir de la combinación de polímeros de carboximetilcelulosa sódica, pectina y gelatina. Los andamios de hidrocóloide demostraron ser homogéneas y translúcidas, con una superficie lisa que es esencial para su función. Presentaron una apariencia física transparente con un tono amarillento, una textura lisa y viscosa, y un olor neutro característico de los reactivos utilizados en su preparación **(Figura 28 A)**. Los andamios demostraron una buena resistencia al plegado, sin degradarse al manipularlas, lo que demuestra que poseen excelentes propiedades mecánicas, capaces de resistir el estrés del transporte y la manipulación sin romperse al aplicarlas en heridas. Esta característica es esencial para su uso práctico, ya que asegura que el apósito mantenga su integridad durante su aplicación y uso **(Figura 28 B)**. Además, el grosor de todas las películas no mostró diferencias significativas, oscilando entre  $0.8 \pm 0.1$  mm, mientras que sus pesos oscilan entre  $1.60 \pm 0.1$ g. Estos parámetros indican que el método empleado es adecuado para producir películas de hidrocóloides, garantizando uniformidad en contenido y grosor, lo cual es crucial para la producción en grandes cantidades **(Figura 28 C)**.

En segundo lugar, se generaron los andamios de hidrogel de alginato (geles 3D) a partir de polímeros de alginato de sodio. Estos andamios demostraron ser homogéneas y translúcidas, con una apariencia física transparentosa y una textura lisa y olor neutro característico de los reactivos utilizados. El grosor de las películas generadas osciló entre  $2.3 \pm 0.1$  mm, mientras que su peso osciló entre  $4.85 \pm 0.30$  g. Estos andamios demostraron una buena resistencia al plegado, lo que demuestra su buena propiedad mecánicas **(Figura 28 D-F)**.



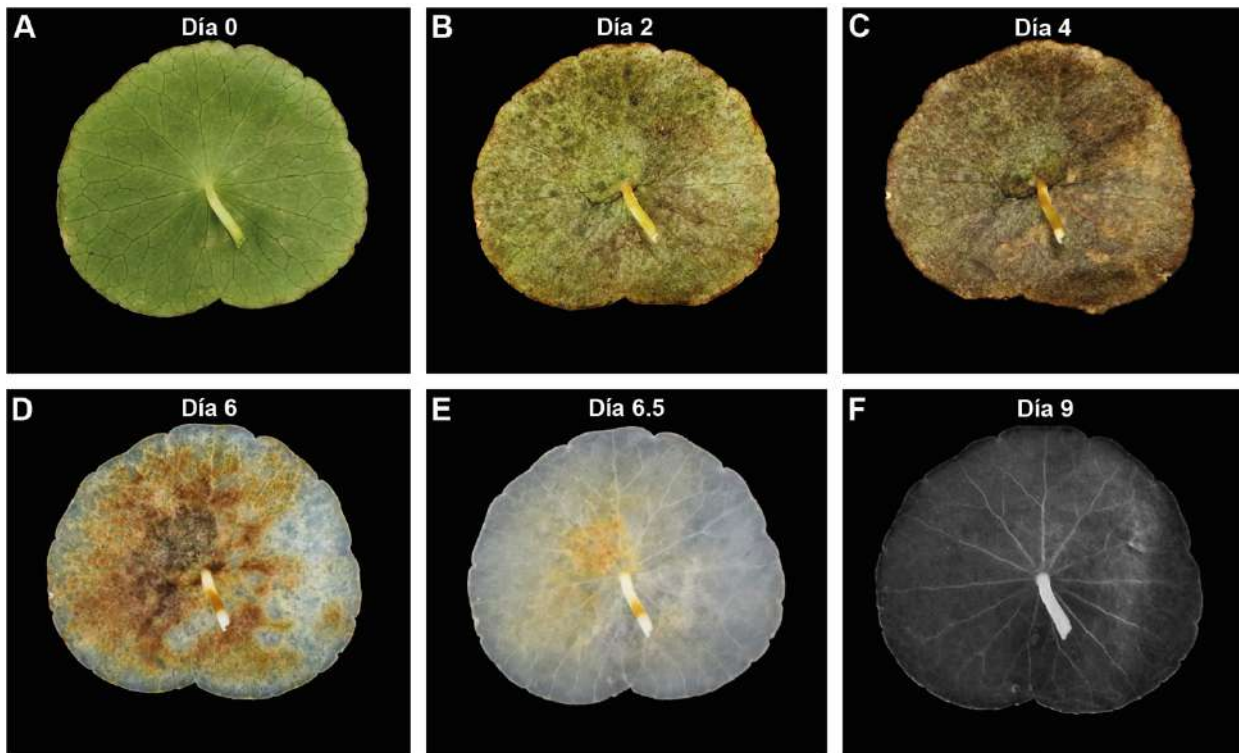
**Figura 28. Caracterización del andamio los andamios generados para aplicaciones biotecnológicas.** Se visualiza el andamio de hidrocoloide en: **A.** vista de plano superior, en donde se puede observar su superficie lisa con un tono amarillento. **B.** plegado, demostrando sus propiedades mecánicas. **C.** medido con micrómetro, indicando su espesor de 0.8mm. Y el andamio de alginato en: **D.** vista de plano superior, donde se observa su superficie lisa con un tono transparentoso. **E.** plegado, mostrando sus propiedades mecánicas. **F.** medido con micrómetro, indicando su espesor de 2.3mm.

#### **4.2. ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLO DE OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ANDAMIO VEGETAL DESCELULARIZADO PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS**

Las estructuras de las plantas son potenciales andamios sustentables para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Por ello, con el propósito de explorar el potencial de obtener andamios vegetales, que sean amigables con el ecosistemas se ha utilizado el proceso de descelsularización en hojas *Hydrocotyle sp.*, como posible alternativa ecosostenible en biomedicina.

A nivel experimental, las hojas de *Hydrocotyle sp.* fueron tratadas por con detergentes, tales como: dodecil sulfato de sodio, triton-X-100 y solución blanqueadora (clorito de sodio) durante un largo período de una semana (7 días), basado el protocolo de Gershlak y cols (Gershlak et al., 2017). A lo largo del proceso de descelsularización, se evidenció que las hojas experimentaron un cambio de color, pasando de verde a un tono marrón oscuro, indicando una disminución en la concentración de clorofila (**Figura 29 A-D**); asociado a la pérdida de cloroplastos del tejido foliar. Finalmente, se obtuvo por resultado hojas transparentes (tejido descelsularizado) (**Figura 29 F**). A pesar del extenso protocolo, las hojas descelsularizadas

mantuvieron su arquitectura vascular tridimensional intrínseca de las hojas nativas (**Figura 30 A-F**).

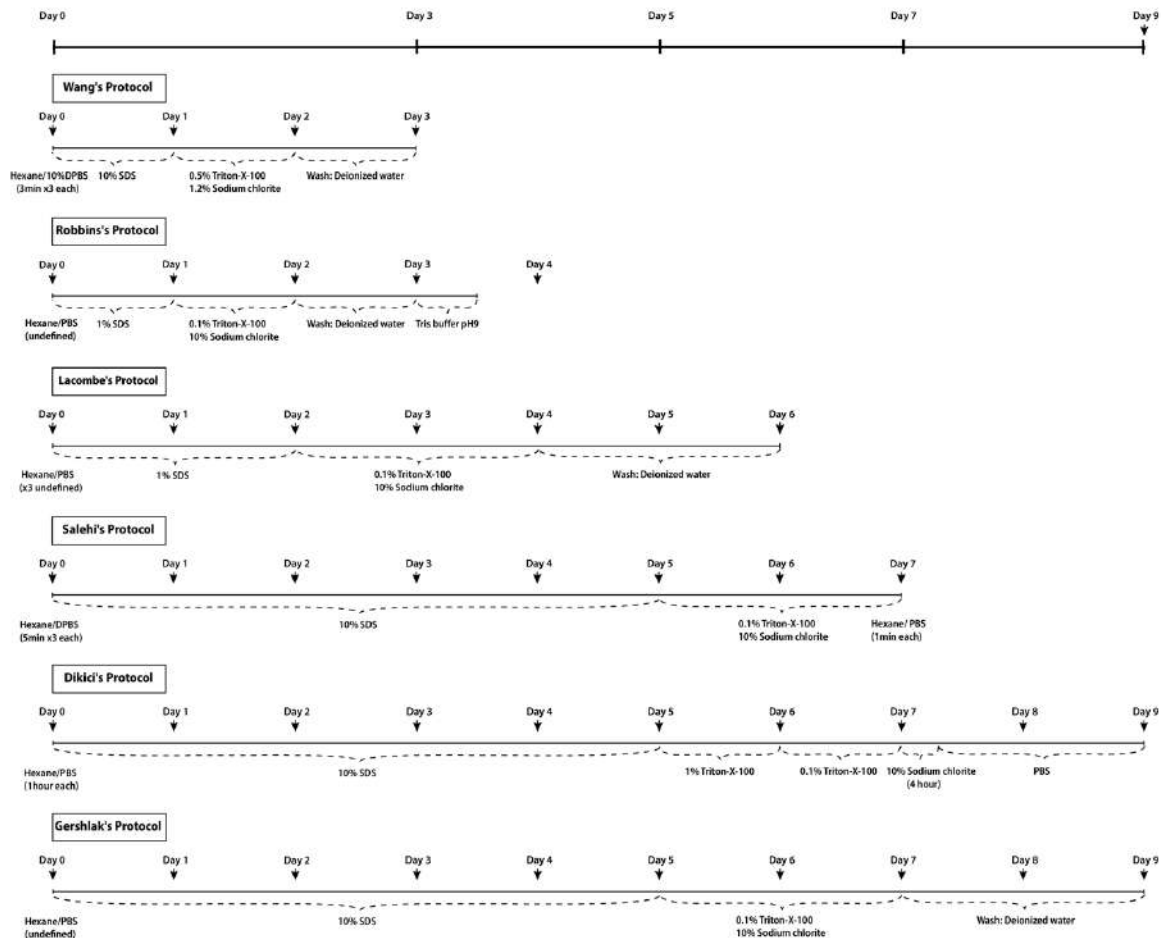


**Figura 29. Secuencia temporal de la descelularización de una hoja de *Hydrocotyle sp.*** (A) En el Día 0, la hoja exhibe un color verde oscuro y opacidad antes de iniciar el proceso de descelularización. (B) Al Día 2, la hoja comienza a perder parte de su coloración verde oscura y empieza a adquirir tonalidades marrones al ser tratada con SDS. (C) Al Día 4 de tratamiento con SDS, la hoja se torna completamente marrón. (D) Al día 6, después de un día de tratamiento con hipoclorito de sodio, la hoja comienza a volverse transparente y a perder su color. (E) Al día 6.5, tras un día y medio de tratamiento con hipoclorito de sodio, la hoja está casi completamente transparente, presentando algunas manchas amarillentas. (F) Al día 9, después de dos días de tratamiento con hipoclorito de sodio y lavado con agua destilada, la hoja pierde por completo su coloración y se vuelve completamente transparente, alcanzando así un estado de descelularización total.

A fecha de hoy, la estandarización del proceso de descelularización vegetal no ha sido establecida y existen protocolos que van desde los 3 días hasta 7 días, tal disparidad tanto en términos temporales, como metodológicos dan cabida al desarrollo de la búsqueda de una respuesta ante tal disyuntiva. Ante este escenario, en nuestro caso hemos querido hacer unos análisis comparativos entre los seis (6) principales protocolos de descelularización vegetales que han sido establecidos por los autores: Robbins y cols., Lacombe y cols., Salehi y cols., Wang y cols., Dikici y cols. y Gershlak y cols. (Dikici et al., 2019; Gershlak et al., 2017; Lacombe et al., 2020; Robbins et al., 2020; Salehi et al., 2020; Wang et al., 2020).

Por ello, se llevó a cabo un análisis comparativo entre los seis (6) protocolos de descelularización vegetales, utilizando como vegetal modelo: hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) (Dikici et al., 2019; Robbins et al., 2020; Salehi et al., 2020). Cada protocolo fue

evaluado en términos de eficiencia de descelerización, considerando la eliminación celular y la preservación de la estructura de la hoja descelerizada (andamio) (**Figura 30**).



**Figura 30. Esquema temporal de los diversos protocolos de descelerización vegetal establecidos.** Se muestran los 6 protocolos utilizados (Wang y cols, Robbins y cols, Lacombe y cols, Salehi y cols, Dikici y cols, y Gershlak y cols), detallando el tiempo requerido y los reactivos utilizados en sus diferentes concentraciones para cada protocolo.

El análisis comparativo de los niveles de ADN vegetal, tras los protocolo de descelerización (Dikici et al., 2019; Gershlak et al., 2017; Lacombe et al., 2020; Robbins et al., 2020; Salehi et al., 2020; Wang et al., 2020), fue realizado mediante un análisis molecular, basado en ensayo de picogreen, es altamente sensible y específico para la detección de ADN, permitiendo una evaluación precisa del contenido de ADN nativo vegetal en comparación con el ADN descelerizado (ADN residual post-tratamiento). Los resultados mostraron que la las hojas de espinaca que fueron sometidas al protocolo de descelerización tuvieron una reducción superior al 85% en el contenido de ADN, en los seis (6) protocolos realizados, lo que representa una disminución significativa en la cantidad de ADN presente comparado con el tejido vegetal original (hoja nativa) (**Figura 31 D**).

En el protocolo Robbins et al., 2020 (Journal of Biomedical Materials Research) (tiempo duración: ~2.5 días), las hojas de espinaca, al día 3 de descelularización, tras ser tratado con SDS al 1% durante 1 día y Triton X-100 al 0.1% e hipoclorito al 10% durante 1 día, se observó una reducción de aproximadamente 86% en el contenido de ADN ( $17 \pm 0.5$  ng vs  $2.5 \pm 0.5$  ng de ADN/mg de tejido seco).

En el protocolo Wang et al., 2020 (Developmental Biology), (tiempo duración: ~2.5 días), las hojas de espinaca, al día 3 de descelularización, tras ser tratado con SDS al 10% durante 1 día y Triton X-100 al 0.5% + hipoclorito al 1.2% durante 1 día, se observó una reducción de aproximadamente 90% en el contenido de ADN ( $19 \pm 1.5$  ng vs  $2 \pm 0.5$  ng de ADN/mg de tejido seco).

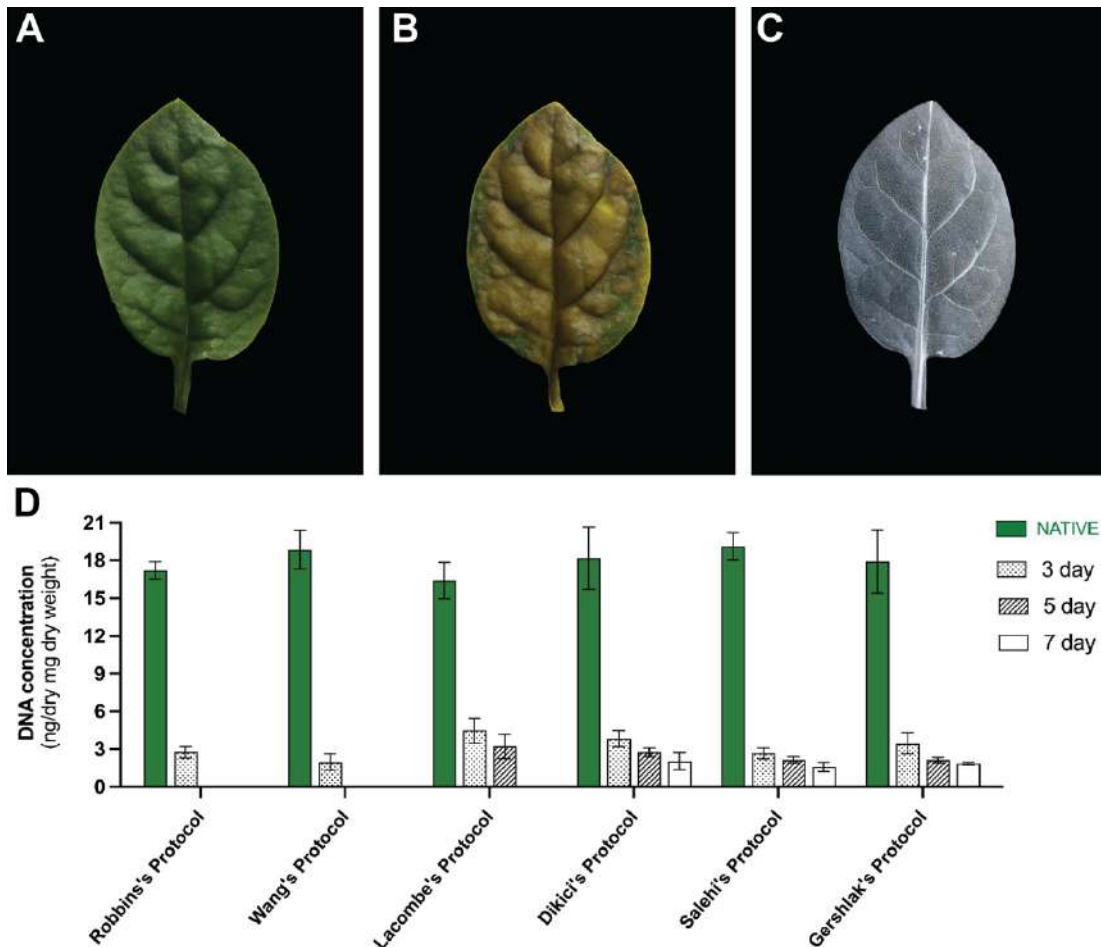
En el protocolo Lacombe et al., 2020 (Frontiers in Bioengineering and Biotechnology) (tiempo duración: ~5.0 días), las hojas de espinaca, al día 3 de descelularización, tras ser tratado con SDS al 1% durante 2 días y Triton X-100 al 0.1% + hipoclorito al 10% durante 1 día, se observó una reducción de aproximadamente 73% en el contenido de ADN ( $16.5 \pm 1.5$  ng vs  $4.46 \pm 1$  ng de ADN/mg de tejido seco). Finalmente, al día 5, tras ser tratado con Triton X-100 al 0.1% + hipoclorito al 10% durante 1 día, la reducción adicional fue de aproximadamente 30% ( $4.46 \pm 1$  ng vs  $3 \pm 1$  ng de ADN/mg de tejido seco), obteniendo una reducción total de 82% en el contenido del ADN ( $16.5 \pm 1.5$  ng vs  $3 \pm 1$  ng de ADN/mg de tejido seco).

En el protocolo Dikici et al., 2019 (Journal of Biomaterial Applications) (tiempo duración: ~7.5 días), las hojas de espinaca, al día 3 de descelularización, tras ser tratado con SDS al 10% durante 3 días, se observó una reducción de aproximadamente 80% en el contenido de ADN ( $18 \pm 2.5$  ng vs  $3.80 \pm 0.7$  ng de ADN/mg de tejido seco). Al día 5, tras ser tratado con SDS al 10% durante 2 días, se observó una reducción adicional de 30% ( $3.80 \pm 0.7$  ng vs  $2.70 \pm 0.5$  ng de ADN/mg de tejido seco). Finalmente, al día 7, tras ser tratado con Triton X-100 al 1% durante 1 día y Triton X-100 al 0.1% durante 1 día, la reducción final fue de aproximadamente 20% ( $2.70 \pm 0.5$  ng vs  $2 \pm 0.5$  ng de ADN/mg de tejido seco), obteniendo una reducción total de 86% en el contenido del ADN ( $18 \pm 2.5$  ng vs  $2 \pm 0.5$  ng de ADN/mg de tejido seco).

En el protocolo Salehi et al., 2020 (Gene) (tiempo duración: ~7.5 días), las hojas de espinaca, al día 3 de descelularización, tras ser tratado con SDS al 10% durante 3 días, se observó una reducción de aproximadamente 86% en el contenido de ADN ( $17.4 \pm 1$  ng vs  $2.35 \pm 0.5$  ng de ADN/mg de tejido seco). Al día 5, tras ser tratado con SDS al 10% durante 2 días, se observó una reducción adicional de 10% ( $2.37 \pm 0.5$  ng vs  $2 \pm 0.5$  ng de ADN/mg de tejido seco). Finalmente, al día 7, tras ser tratado con Triton X-100 al 0.1% + Hipoclorito de sodio al 10% durante 2 días, la reducción final fue de aproximadamente 20% ( $2 \pm 0.5$  ng vs  $1.5 \pm 0.5$  ng de ADN/mg de tejido seco), obteniendo una reducción total de 91% en el contenido del ADN ( $17.4 \pm 2.5$  ng vs  $1.5 \pm 0.5$  ng de ADN/mg de tejido seco).

En el protocolo Gershlak et al., 2017 (Biomaterials) (tiempo duración: ~7.5 días), las hojas de espinaca, al día 3 de descelularización, tras ser tratado con SDS al 10% durante 3 días, se observó una reducción de aproximadamente 81% en el contenido de ADN ( $18 \pm 2.5$  ng vs  $3.36$

$\pm 1$  ng de ADN/mg de tejido seco). Al día 5, tras ser tratado con SDS al 10% durante 2 días, se observó una reducción adicional de 40% ( $3.36 \pm 1$  ng vs  $2 \pm 0.3$  ng de ADN/mg de tejido seco). Finalmente, al día 7, tras ser tratado con Triton X-100 al 0.1% + Hipoclorito de sodio al 10% durante 2 días, la reducción final fue de aproximadamente 10% ( $2 \pm 0.3$  ng vs  $1.76 \pm 0.2$  ng de ADN/mg de tejido seco), obteniendo una reducción total de 90% en el contenido del ADN ( $18 \pm 2.5$  ng vs  $1.76 \pm 0.2$  ng de ADN/mg de tejido seco).



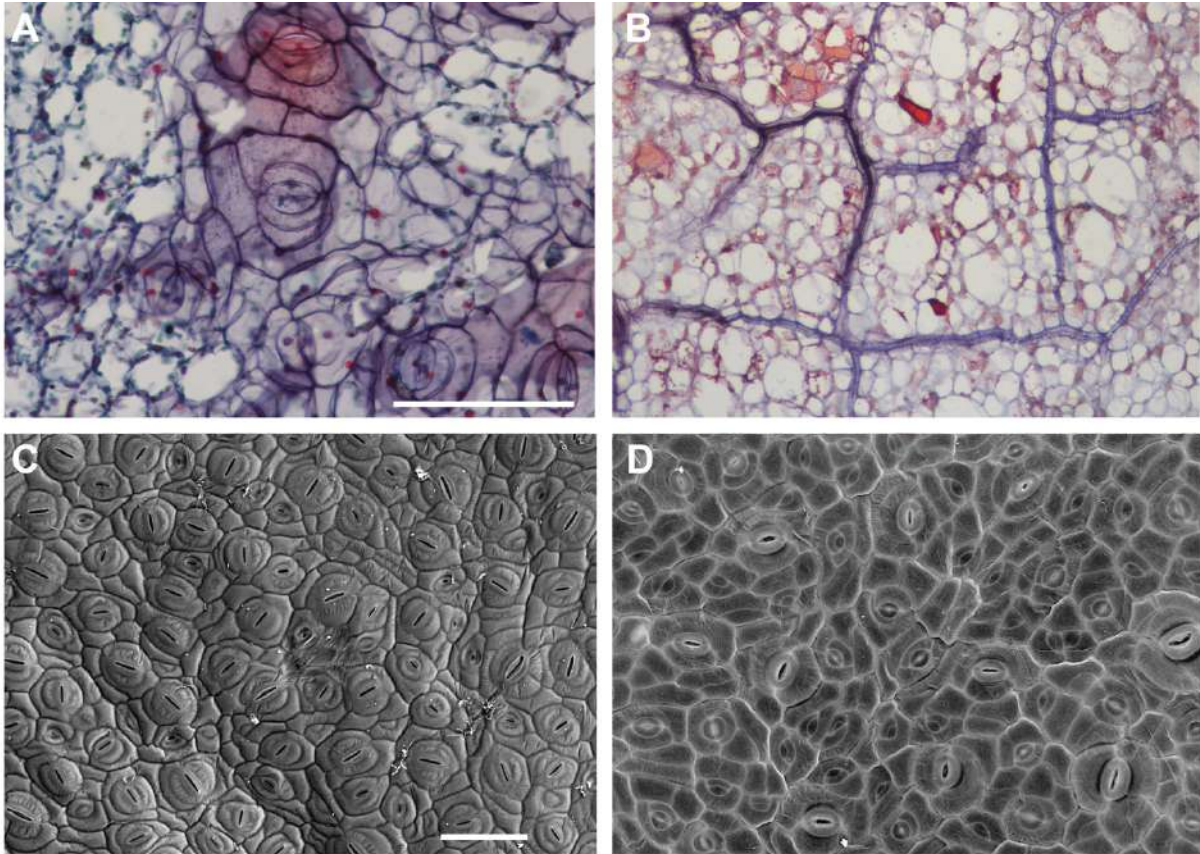
**Figura 31. Caracterización molecular del andamio vegetal descelularizado.** La descelularización de una hoja de espinaca se ilustra en tres etapas: **A**) en su estado nativo, mostrando una coloración verde; **B**) tratada con detergente iónico (SDS), mostrando una coloración marrón; y **C**) tratada con blanqueador (hipoclorito de sodio), volviéndose transparente. **D.** Análisis de PicoGreen para la comparación de concentraciones de ADN (ng de ADN/ mg de tejido seco) en hojas de espinaca tratadas según distintos protocolos de descelularización. Los valores se presentan para hojas nativas y para muestras tratadas durante 3, 5 y 7 días. Los protocolos de descelularización incluyen aquellos propuestos por Robbins et al., 2020 (Journal of Biomedical Materials Research), Wang et al., 2020 (Developmental Biology), Lacombe et al., 2020 (Frontiers in Bioengineering and Biotechnology), Dikici et al., 2019 (Journal of Biomaterial Applications), Salehi et al., 2020 (Gene), y Gershlak et al., 2017 (Biomaterials).

Los resultados obtenidos confirman que el proceso de descelularización es altamente capaz de eliminar los componentes celulares y, de forma indirecta, se puede evaluar mediante la

reducción de los niveles de ADN celular. En nuestro caso, se han alcanzado los niveles de los estándares necesarios que corresponde a un valor superior al 80%; además, diversas investigaciones indican que se considera un tejido descelularizado cuando contiene un valor menos a 5 ng de ADN por mg de tejido, lo cual es lo que obtenemos en nuestros resultados experimentales.

De forma complementaria, se pueden analizar el contenido de número de núcleos de tejido nativo versus tejido descelularizado, como manera de cuantificación del proceso de descelularización. Por ello, mediante un estudio histológico de secciones de hojas nativas y descelularizadas se identificó que las hojas nativas tienen células con alto contenido nuclear, asociado a gran cantidad de cloroplastos, mostrando células vegetales intactas con paredes celulares bien definidas (**Figura 32 A**). En contraste, las hojas descelularizadas en los cortes histológicos presentaban ausencia de componentes celulares, asociada de pérdida de componentes cloroplásticos; no obstante, la citoarquitectura se conserva debido a la presencia de celulosa / pectina que otorga gran capacidad estructural al tejido vegetal descelularizado (**Figura 32 B**).

Finalmente, se ha realizado un estudio de ultraestructura mediante análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) que ha mostrado una conservación estructural entre las hojas de espinaca nativa y hojas de espinaca descelularizada. En las hojas nativas, se observaron una estructura de cutícula, bien definida, con estomas claramente visibles, indicando una hoja bien definida desde el punto de vista anatómico (**Figura 32 C**); mientras, que las hojas descelularizadas muestran gran conservación de la superficie estructural del vegetal, incluso de las estomas, lo cual indica que la topografía de la hoja se mantiene tras el proceso de descelularización (**Figura 32 D**).



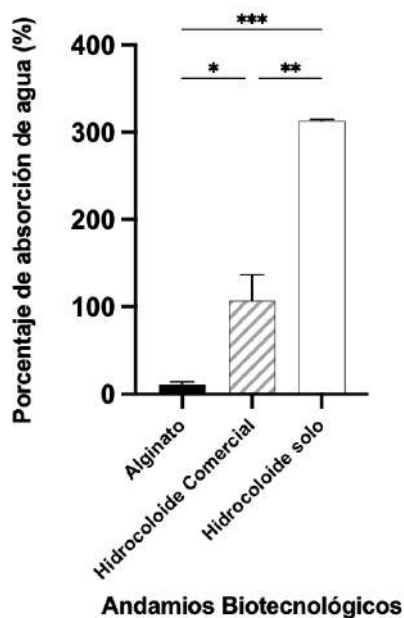
**Figura 32. Análisis histológico y microscopía electrónica de barrido (SEM) del andamio vegetal.** Se muestra la comparación histológica de **A)** una hoja nativa de espinaca, donde se observan células con núcleos y cloroplastos, indicando una estructura celular intacta y funcional, y **B)** una hoja descelularizada de espinaca, que revela la ausencia de componentes celulares internos, quedando solo la matriz extracelular. Las hojas fueron teñidas con Safranina y Verde Rápido; donde la Safranina-O (rojo) tiñe los cromosomas y núcleos, mientras que Verde Rápido (verde-azulado) tiñe el citoplasma y las paredes celulares celulósicas. Las esferas azul oscuro indican la presencia de cloroplastos, abundante en la hoja nativa. Las imágenes de SEM muestran **C)** hoja nativa de espinaca, destacando la estructura organizada de las células epidérmicas y estomas claramente visibles, y **D)** hoja descelularizada de espinaca, mostrando una superficie rugosa y menos definida, con estomas no funcionales debido a la ausencia de células vivas. Barra de dimensiones **A-B** 250 $\mu$ m, **C-D** 100 $\mu$ m.

## OBJETIVO II: DESARROLLAR ESTUDIOS IN VITRO DE LOS ANDAMIOS BIOTECNOLÓGICOS MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR, MOLECULAR Y BIOINGENIERÍA.

### 4.3. EVALUACIÓN DE ABSORCIÓN DE AGUA DEL ANDAMIO DE HIDROCOLOIDE

Una de las características más importantes de un apósito ideal es su capacidad para absorber el exceso de exudado mientras mantiene un ambiente húmedo. La absorción de líquido por parte de la película crea las condiciones adecuadas para una cicatrización húmeda, favoreciendo un entorno que acelera el proceso de curación. Por lo tanto, la evaluación de la absorción de líquido es esencial en la caracterización de los materiales para apósitos (Minsart et al., 2022; Rezvani Ghomi et al., 2019).

En nuestro estudio, se compararon los porcentajes de absorción de tres tipos de apósitos: un andamio de alginato (control (-)), un andamio de hidrocoloide comercial (control (+)) y un andamio de hidrocoloide (experimental). Los resultados obtenidos fueron: **(i)** el andamio de alginato (control negativo) registró un porcentaje de absorción aproximado del  $10\% \pm 3\%$ , siendo el menos absorbente entre los tres materiales evaluados, esto sugiere que el andamio de alginato puede no ser adecuado para heridas que producen gran cantidad de exudado, debido a su capacidad limitada para absorber líquidos; **(ii)** el andamio de hidrocoloide comercial (control positivo) mostró un porcentaje de absorción de alrededor del  $100\% \pm 30\%$ , indicando una menor capacidad para manejar grandes volúmenes de exudado y finalmente, **(iii)** el andamio de hidrocoloide experimental que hemos generado a lo largo de la ETAPA I ha demostrado una capacidad de absorción promedio del  $312\% \pm 2\%$ , destacándose por su alta capacidad para retener exudado y mantener el ambiente adecuadamente húmedo para la cicatrización (**Figura 33**).



**Figura 33. Comparación del porcentaje de absorción de agua de diversos andamios.** Se ilustra que el andamio de Alginato tiene el menor porcentaje de absorción de agua con  $10\% \pm 3\%$ , seguido por el andamio de Hidrocoloide Comercial con  $100\% \pm 30\%$ , que presenta una absorción significativamente mayor que Alginato, pero menor en comparación con el andamio de hidrocoloide generado  $312\% \pm 2\%$ . Los niveles de significancia se indican con asteriscos: (\*  $p < 0.05$ ) para diferencias significativas, (\*\*  $p < 0.01$ ) para diferencias muy significativas, y (\*\*\*)  $p < 0.001$ ) para diferencias altamente significativas.

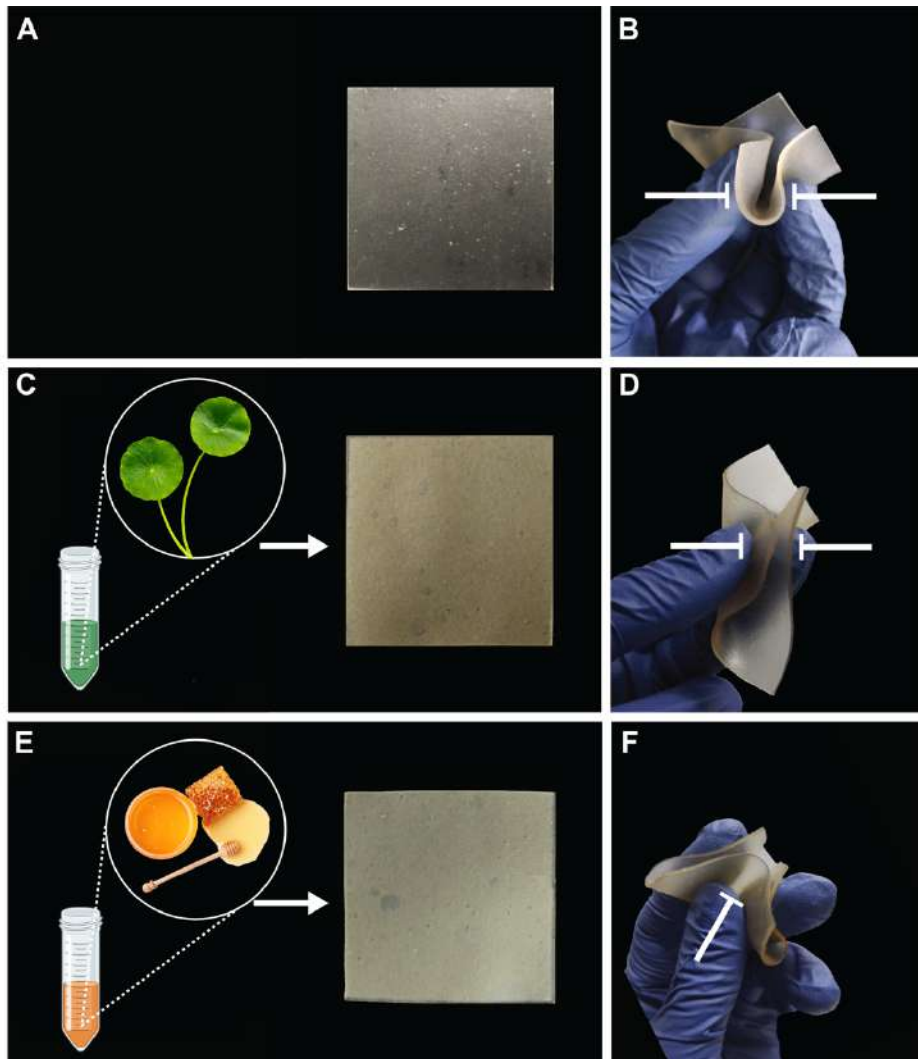
#### 4.4. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ANDAMIO DE HIDROCOLOIDE CON PRINCIPIOS TERAPÉUTICOS ACTIVOS PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

Posteriormente, se han generado andamios hidrocoloideos asociados a principios bioactivos: extractos vegetales y miel panameña. Los andamios de hidrocoloide bioactivos con extracto de *Centella asiatica* (Selleck Chemicals, Estados Unidos) y miel panameña (Miel boqueteña, Panamá) presentaron como una solución sólida homogénea, con una apariencia translúcida y una superficie lisa, similar a andamio hidrocoloide sin principios bioactivos. El extracto de *Centella asiatica* no alteró significativamente el color, manteniéndose un tono amarillento, aunque con una ligera tonalidad anaranjada y un olor herbáceo atribuida al extracto, por el contrario, la miel le dio un color más amarillento al andamio de hidrocoloide y un olor a miel. La textura permaneció lisa y viscosa. A diferencia de la formulación del andamio de hidrocoloide con miel, el andamio de hidrocoloide con extracto de *Centella asiatica* tiene un tono amarillento más oscuro. Además, el grosor de estas películas se mantuvo uniforme, con un promedio de  $1.0 \pm 0.1$  mm, mientras que sus pesos oscilaron alrededor de  $1.68g \pm 0.04g$  para los hidrocoloideos con extracto de *Centella asiatica* y  $1.90g \pm 0.02g$  para los hidrocoloideos con miel, mostrando un aumento mínimo en comparación con las formulaciones sin ingredientes activos. Esto sugiere que la adición del extracto de *Centella asiatica* y miel pudo haber contribuido ligeramente al peso total de las películas, aunque no afectó significativamente su grosor ni la uniformidad del producto final (Tabla 6).

En términos de resistencia al plegado, los andamios con *Centella asiatica* y miel mostraron propiedades mecánicas comparables a las formulaciones sin ingredientes activos, lo que sugiere que los componentes activos pueden ser incorporados sin comprometer la durabilidad del andamio. Estas películas demostraron una excelente resistencia al estrés, manteniendo su integridad durante la manipulación y aplicación, lo que es crucial para su efectividad como apósito en el tratamiento de heridas (Figura 34).

**Tabla 6. Caracterización de los andamios biotecnológicos.**

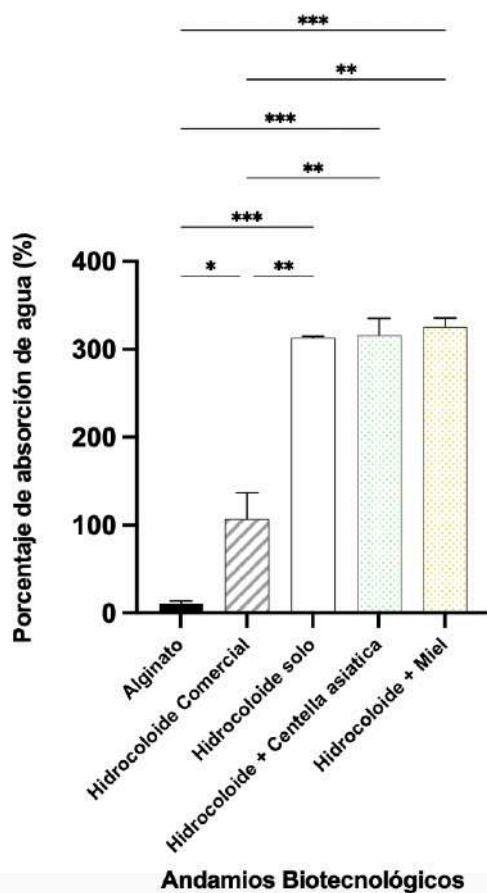
Andamio	Evaluación organoléptica			Evaluación Física	
	Olor	Apariencia física	Textura	Grosor	Peso
Alginato de Calcio	Neutro	Transparente	Lisa	$2.3 \pm 0.1$ mm	$4.85 \pm 0.30$ g
Hidrocoloide sin principios activos	Neutro	Transparente con tono amarillo	Lisa y viscosa	$0.8 \pm 0.1$ mm	$1.60 \pm 0.1g$
Hidrocoloide con extracto de <i>Centella asiatica</i>	Herbáceo	Transparente con tono anaranjado	Lisa y viscosa	$1.0 \pm 0.1$ mm	$1.68g \pm 0.04g$
Hidrocoloide con Miel	Miel	Transparente con tono amarillo	Lisa y viscosa	$1.0 \pm 0.1$ mm	$1.90g \pm 0.02g$



**Figura 34. Caracterización de los andamios de hidrocoloide para aplicaciones biotecnológicas.** Se muestra el hidrocoloide solo, sin principios activos: **A.** en vista superior y **B.** plegado. Hidrocoloide con extracto de *Centella asiatica*: **C.** en vista superior y **D.** plegado. Hidrocoloide con miel: **E.** en vista superior y **F.** plegado.

Además, se compararon los porcentajes de absorción de diferentes andamios de hidrocoloides: control (hidrocoloide comercial), hidrocoloide blanco (sin aditivos), hidrocoloide con extracto de *Centella asiatica*, e hidrocoloide con miel. Los andamios de hidrocoloides blanco, con extracto de *Centella asiatica* y con miel exhibieron una capacidad de absorción notablemente superior, superando el 300%. En detalle, el hidrocoloide blanco mostró una media de absorción del  $312\% \pm 2\%$ , el hidrocoloide con extracto de *Centella asiatica* alcanzó una media del  $315\% \pm 20\%$ , y el hidrocoloide con miel tuvo una media del  $325\% \pm 10\%$ . En contraste, el hidrocoloide comercial registró el menor porcentaje de absorción, alrededor del  $100\% \pm 30\%$ , y el andamio de alginato registró un porcentaje de absorción alrededor del  $10\% \pm 3\%$ . Esto indica que, aunque tiene cierta capacidad de absorción, es significativamente inferior en comparación con los andamios de hidrocoloides formulados (**Figura 35**). Estos resultados destacan que los andamios de hidrocoloides formulados, ya sea con aditivos terapéuticos o sin ellos, superan

considerablemente al hidrocoloide comercial en términos de absorción de agua. Además, sugieren que la inclusión de principios terapéuticos como el extracto de *Centella asiática* y la miel no afecta negativamente la capacidad de absorción del andamio.



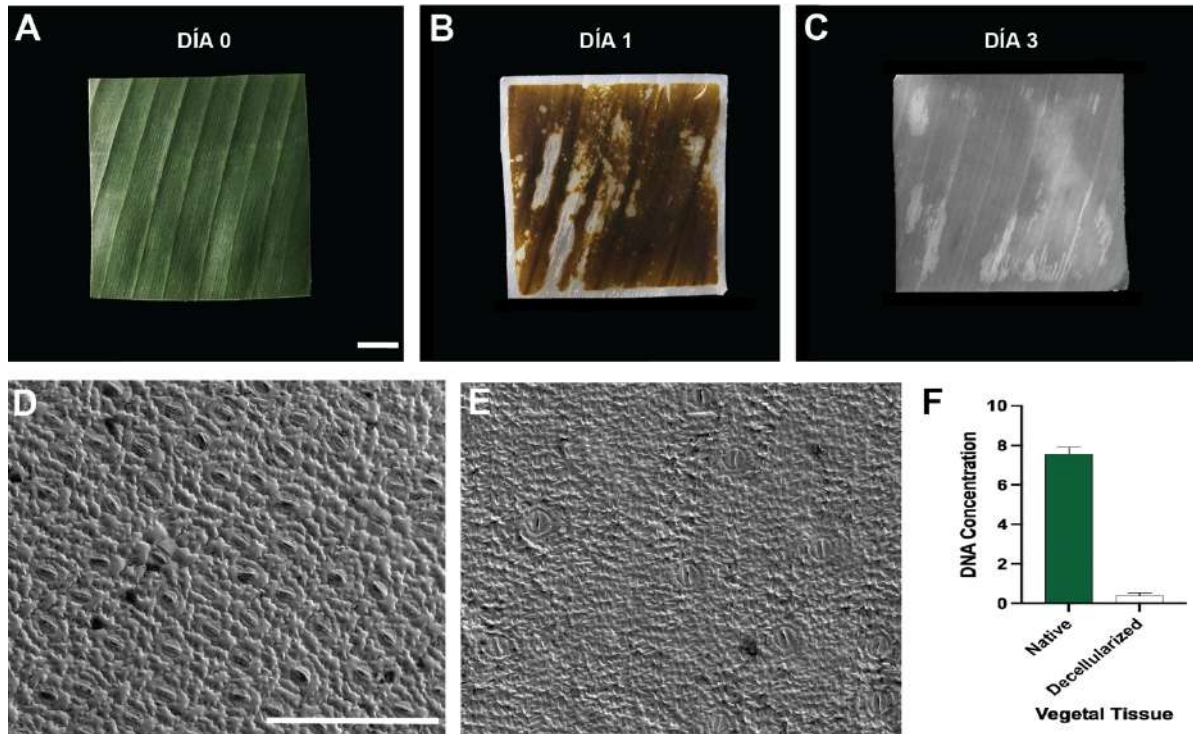
**Figura 35. Comparación del porcentaje de absorción de agua de diversos andamios.** Se ilustra que el andamio de Alginato tiene el menor porcentaje de absorción de agua, seguido por el andamio de Hidrocoloide Comercial, que presenta una absorción significativamente mayor que Alginato, pero menor en comparación con los andamios de hidrocoloides generados (hidrocoloide sin principios activos, con extracto de *Centella asiatica* y con miel). Los niveles de significancia se indican con asteriscos: (\*  $p < 0.05$ ) para diferencias significativas, (\*\*  $p < 0.01$ ) para diferencias muy significativas, y (\*\*\*)  $p < 0.001$ ) para diferencias altamente significativas.

#### 4.5. ENSAMBLAJE DE ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO HÍBRIDO (HOJA DESCELULARIZADA + ALGINATO).

En primer lugar, se empleó el Protocolo de Wang (Wang et al., 2020) para el proceso de descelularización el andamio vegetal de *Musa sp.* (banana panameña), seleccionado debido a su eficacia en comparación con otros métodos de descelularización. En este caso, se utiliza la banana panameña como estructura vegetal debido a gran biodisponibilidad nacional, rigidez estructural y textura superficial. El protocolo de Wang y colaboradores permitió obtener un andamio vegetal descelularizado que conservaba la estructura tridimensional original del tejido, eliminando eficientemente las células y preservando la capa celulósica fundamental (Figura 36 A-C).

El análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de las hojas de *Musa sp.* revela que las hojas nativas tienen una superficie organizada con una textura fina, donde las células epidérmicas y las estomas son claramente visibles. En las hojas descelularizadas, la superficie aparece más áspera y menos definida, mostrando la capa celulósica con organización celular

característica de las hojas nativas (**Figura 36 D-E**). El análisis cuantitativo de ADN mide la efectividad del protocolo de descelularización, mostrando una reducción aproximada del 93% en el contenido de ADN. Esto representa una disminución significativa en la cantidad de ADN presente comparado con el tejido nativo ( $7,73 \pm 0.24$  ng de ADN/mg de tejido vs  $0,49 \pm 0.05$  ng de ADN/mg de tejido), lo que demuestra una descelularización exitosa del andamio vegetal (**Figura 36F**).

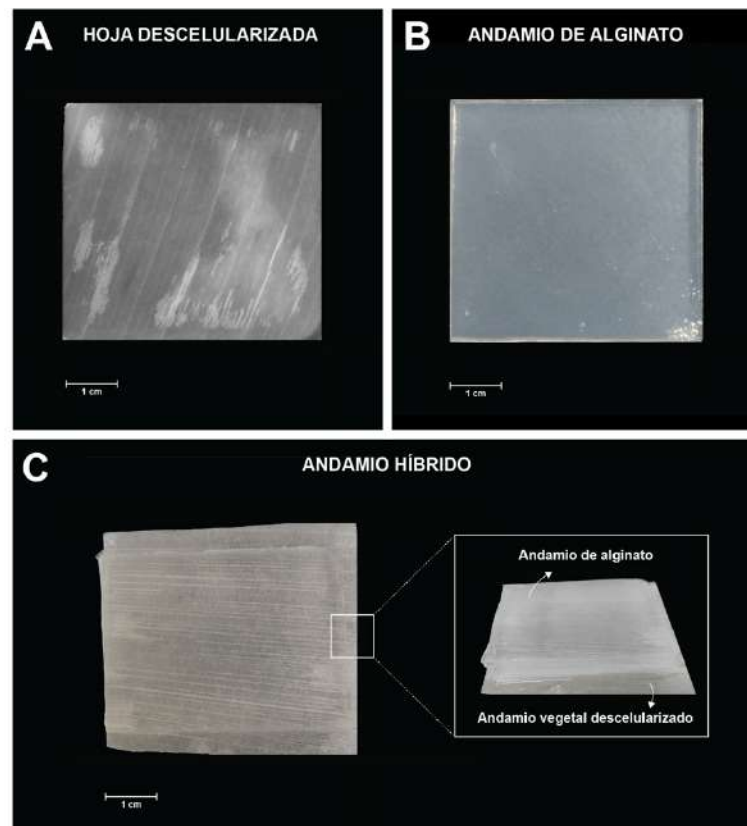


**Figura 36. Análisis mediante Microscopía Electrónica de Barrido y Análisis Molecular de *Musa sp* (planta de banano) descelularizado.** Se ilustra la descelularización de una hoja de *Musa sp*. en tres etapas: **A)** en su estado nativo, mostrando una coloración verde; **B)** tratada con detergente iónico (SDS), mostrando una coloración marrón; y **C)** tratada con blanqueador (hipoclorito de sodio), volviéndose transparente. Las imágenes de SEM muestran **D)** hoja nativa, revelando una superficie organizada con una textura fina y estomas visibles y bien dispuestos, y **E)** hoja descelularizada, donde la superficie aparece áspera y menos definida, con la matriz extracelular sin la organización celular característica de la hoja nativa. **F)** El análisis cuantitativo de ADN muestra una reducción del 93% en el contenido de ADN, de 7,5 a 0,5 ng de ADN/mg de tejido, indicando una descelularización exitosa del andamio vegetal. Barra de dimensión **A-C)** 1cm, **D-E)** 200µm.

Inicialmente, se obtuvieron en un andamio simple de alginato, resultando en la formación de una matriz de alginato con una red regular y homogénea. Los andamios de alginato gelificados con cloruro de calcio proporcionan un entorno tridimensional que favorece la adhesión celular y la proliferación de células dérmicas y epiteliales, facilitando la migración celular, la síntesis de matriz extracelular y la regeneración tisular. Para mejorar las propiedades mecánicas y funcionales del andamio, se implementó una estrategia que incluyó la incorporación de una capa de vegetal descelularizado obteniendo un “andamio ecosustentable híbrido” compuesto de: hidrogel de alginato + hoja descelularizada (**Figura 37 A-B**). El andamio de vegetal

descelularizado no solo proporciona soporte estructural, sino que también actúa como una matriz extracelular bioactiva reconocida por sus propiedades para favorecer la cicatrización de heridas cutáneas, facilitando la regeneración tisular y reduciendo el riesgo de respuestas inmunológicas adversas. Además, la integración del vegetal descelularizado en el andamio de alginato oxigénico se complementó con una inmersión posterior en una solución de cloruro de calcio, que induce la gelificación del alginato, mejorando así la resistencia y flexibilidad del material (**Figura 37 C**).

Este enfoque innovador, ecológico y biotecnológico incorpora el andamio vegetal descelularizado junto con el andamio de alginato no solo fortalece el andamio para su manipulación práctica en aplicaciones biomédicas, sino que maximiza su potencial terapéutico en el tratamiento de heridas cutáneas, proporcionando un entorno favorable para la curación y la regeneración de tejidos.

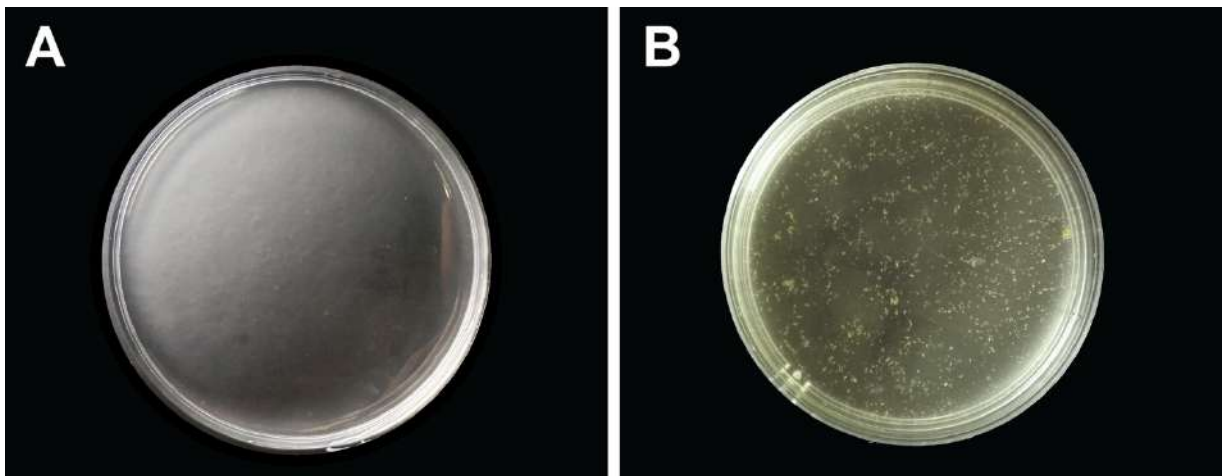


**Figura 37. Ensamblaje de andamio vegetal descelularizado en combinación con andamio de alginato oxigénico.** Se ilustra **A**) la capa de vegetal descelularizado, **B**) la matriz de alginato homogénea sin microalgas, y **C**) la integración del andamio de alginato con microalgas oxigénicas en la capa de vegetal descelularizado, con la capa superior de alginato oxigénico y la capa inferior de andamio vegetal descelularizado.

#### 4.6. GENERACIÓN DE ANDAMIO BIOTECNOLÓGICO OXIGÉNICO (HOJA DESCELULARIZADA + HIDROGEL ALGINATO + SISTEMA OXIGÉNICO)

Para la generación de un andamio híbrido con productos oxigénicos, se incorporó un andamio de alginato con un sistema oxigénico mediante la inclusión de microalgas oxigénicas dentro de la matriz de alginato. Esto resultó en una estructura con funcionalidad biológica gracias a la presencia de microalgas. La incorporación de microalgas oxigénicas mejora la biocompatibilidad y la funcionalidad del andamio, aprovechando las propiedades fotosintéticas de las microalgas para proporcionar un suministro continuo de oxígeno, lo que mejora la regeneración tisular al crear un entorno más favorable para la cicatrización de heridas.

Al tiempo que el andamio vegetal descelularizado proporciona un soporte estructural y una matriz extracelular bioactiva reconocida por sus propiedades para favorecer la cicatrización de heridas cutáneas, se utilizó una metodología específica para asegurar la integración óptima de los componentes (**Figura 38**).



**Figura 38. Andamio biotecnológico híbrido.** A. Andamio híbrido compuesto por una hoja descelularizada y un andamio de alginato. B. Andamio híbrido con sistema oxigénico, compuesto por una hoja descelularizada y un andamio de alginato con microalgas integradas.

##### 4.6.1 IMPLEMENTACIÓN DE CULTIVO DE ALGAS OXIGÉNICAS MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

El cultivo de algas *Chlorella vulgaris* fue exitoso, destacando su importancia en la oxigenación debido a su capacidad de realizar fotosíntesis y liberar oxígeno como subproducto. Esta capacidad es crucial en aplicaciones biomédicas, como la cicatrización de heridas, donde la liberación de oxígeno en el sitio de la herida puede acelerar significativamente el proceso de curación, esencial para la regeneración celular y la reparación de tejidos.

El cultivo axénico del alga *Chlorella vulgaris* en el Medio Basal de Bold (BBM), un medio estándar que proporciona una combinación equilibrada de nutrientes esenciales fue llevado a cabo con éxito bajo las condiciones experimentales establecidas. Los cultivos fueron mantenidos a una iluminación continua, lo cual es crucial para promover el crecimiento y la fotosíntesis de las algas. Durante el periodo de incubación, los cultivos se agitaron para evitar

el asentamiento de las células en el fondo de los frascos de cultivo, asegurando así una distribución homogénea y una mejor exposición a la luz, lo que es esencial para el crecimiento uniforme de las algas.

A lo largo del cultivo, se observó un cambio colorimétrico notable. Inicialmente, las algas presentaron un color verde claro, que gradualmente se intensificó hasta convertirse en un verde más oscuro. Este cambio de color es indicativo de un incremento en la densidad celular y una mayor concentración de clorofila, lo cual es un signo de la salud y proliferación de las algas, indicando una proliferación saludable de las algas bajo las condiciones de cultivo descritas (**Figura 39**).



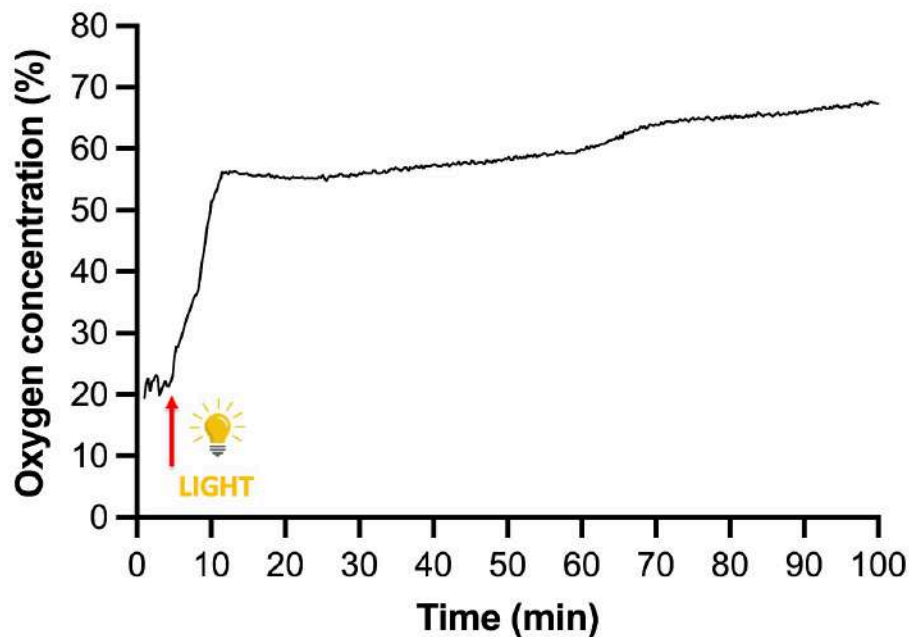
**Figura 39. Cultivo de microalgas oxigénicas.** Se ilustra el cultivo de *Chlorella vulgaris*, donde se observa un cambio notable en el color de las algas a lo largo del experimento. Inicialmente, las algas presentaron un tono verde claro que se intensificó progresivamente hasta alcanzar un verde más oscuro. Este cambio de color sugiere un aumento en la densidad celular y una mayor concentración de clorofila, indicativos de una salud óptima y una proliferación de las algas.

#### 4.6.2 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE OXÍGENO DEL ANDAMIO OXIGÉNICO

La capacidad de producción de oxígeno de los andamios de alginato oxigénico fue evaluada utilizando Oxodishes y el sistema SensorDishReader, que monitorea el porcentaje de oxígeno disuelto (% pO<sub>2</sub>) en el medio de cultivo mediante un sensor de oxígeno fluorométrico. Los resultados mostraron que la capacidad de liberación de oxígeno de los andamios oxigénicos se incrementa significativamente al ser expuestos a la luz (**Figura 41**). Este incremento se debe a la presencia de microalgas *Chlorella vulgaris* integradas en el andamio, las cuales, mediante la fotosíntesis, producen oxígeno cuando son expuestas a la luz.

La concentración de oxígeno se mantuvo constante alrededor del 20.73% en ausencia de luz. Al activar la luz se observó un aumento rápido en la concentración de oxígeno, alcanzando aproximadamente el 58.88% en un período de tiempo corto. Después de este incremento inicial, la concentración de oxígeno se mantuvo constante durante el tiempo restante del experimento (**Figura 40**).

Estos resultados sugieren que los andamios de alginato oxigénico tienen una capacidad efectiva de producción de oxígeno cuando son estimulados por la luz, lo cual podría tener aplicaciones importantes en la cicatrización de heridas, donde la oxigenación controlada es crucial. El oxígeno es fundamental en el proceso de cicatrización ya que promueve la síntesis de colágeno, la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y combate las infecciones. La provisión adecuada de oxígeno a las heridas puede acelerar el proceso de curación y mejorar la cicatrización.

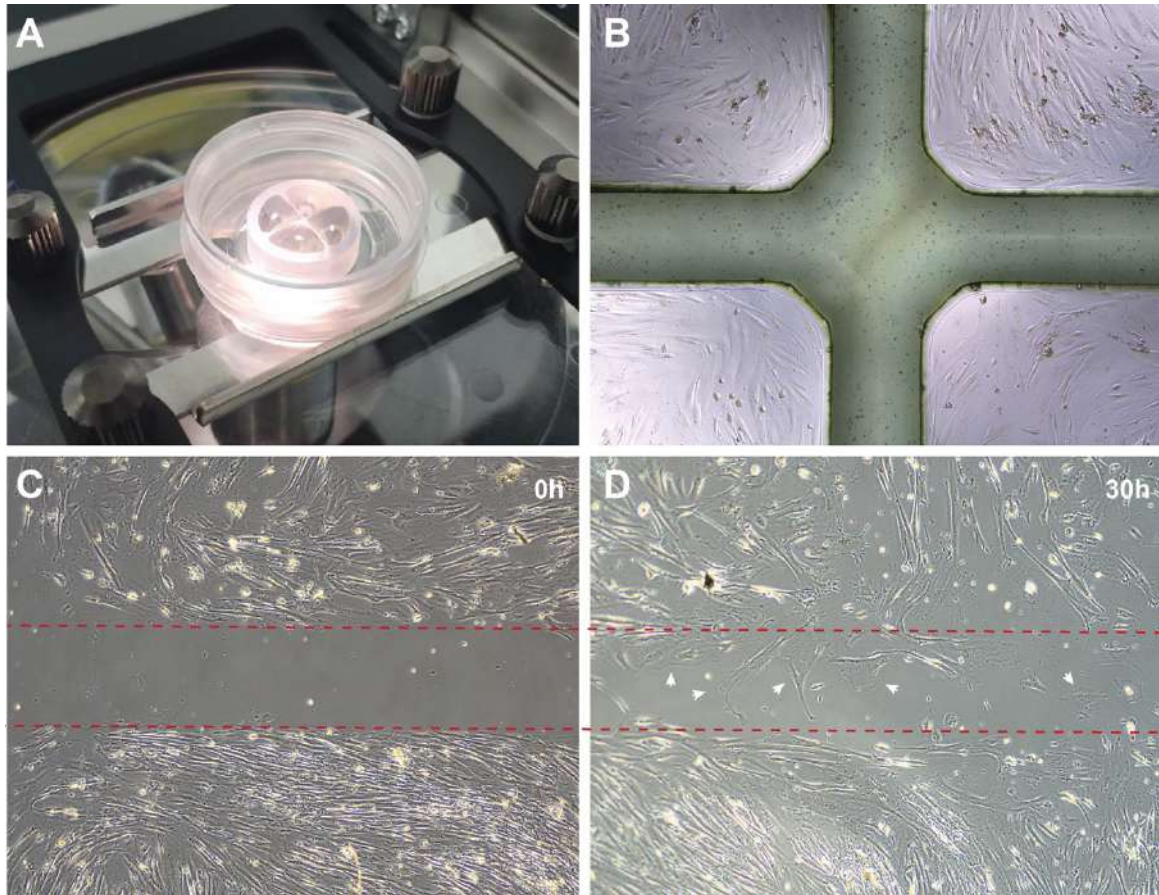


**Figura 40. Evaluación de la producción de oxígeno del andamio oxigénico.** Se ilustra la dinámica de la concentración de oxígeno disuelto a lo largo del tiempo, tanto en presencia como en ausencia de luz. En condiciones de oscuridad, la concentración de oxígeno disuelto se mantiene alrededor del 20%. Sin embargo, al activar el andamio con luz, se observa un rápido incremento en la concentración de oxígeno, alcanzando aproximadamente el 60% en un corto periodo de tiempo.

#### **4.7 ESTUDIO *IN VITRO* DE CICATRIZACIÓN (CIERRE DE HERIDA) DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR (PROYECCIÓN A FUTURO).**

El ensayo de cicatrización de heridas es una técnica estándar *in vitro* utilizada para estudiar cómo las células migran en un monocapa. En este método, se crea un área libre de células en un monocapa confluyente mediante la utilización de un inserto de cultivo IBIDI en un  $\mu$ -Dish (**Figura 41 A**) para asegurar la uniformidad y reproducibilidad del área de la herida. Esta técnica estimula a las células circundantes a migrar hacia la brecha generada. En nuestro caso, se realizó con éxito el modelo de cicatrización utilizando el inserto de cultivo, donde se pudo visualizar el movimiento de los fibroblastos hacia la brecha generada. Las imágenes microscópicas de las capas de células de fibroblasto dérmico lesionadas, capturadas tanto al inicio (0h) como después de 30 h, se presentan en la **Figura 41 B-D**.

En nuestro caso, se ha realizado la implementación de un modelo de cicatrización *in vitro* que sería usado para estudios de capacidad cicatrizante de diferentes moléculas bioactivas, como: *Centella asiatica*, miel y otros (en el futuro). Este tipo de herramientas abre el camino para posibles nuevas líneas de investigación y desarrollo de nuevos experimentos que tiene por objetivo comprender los procesos de migración, dinámica y cierre en la cicatrización *in vitro*.



**Figura 41. Estudio *in vitro* de cierre de herida.** Se ilustra el sistema de modelo de cicatrización en un inserto de cultivo Ibidi. **B.** Micrografía de la monocapa de células de fibroblasto lesionada. **C.** Micrografía de la monocapa de células a las 0h. **D.** Micrografía de la monocapa de células a las 30h.

# **CAPÍTULO V. DISCUSIÓN**

La cicatrización de heridas es un proceso complejo que implica la sustitución de tejidos dañados y estructuras celulares, siendo fundamental para la recuperación de la integridad de la piel y otras estructuras corporales afectadas por la lesión. El tratamiento de las lesiones puede abarcar el uso de medicamentos, tanto locales como sistémicos (Vittalrao et al., 2020) y tienen por objetivo de acelerar la recuperación y la reducción del riesgo de complicaciones no deseados (MacKay & Miller, 2003). A pesar de los avances en apósitos y tratamientos convencionales, actualmente persiste la necesidad de opciones más efectivas y sostenibles (Frykberg & Banks, 2015). Por ello, el uso de principios terapéuticos activos basados en la generación de andamios bioactivos para aplicaciones biomédicas se considera una alternativa novedosa, ecológica y sustentable en medicina regenerativa (Indurkar et al., 2021).

En la búsqueda por mejorar el manejo de heridas, se han explorado diversas estrategias como el desarrollo de nuevas terapias y apósitos. La selección del vendaje adecuado se fundamenta en las características anatómicas y fisiopatológicas de la herida, con el propósito de optimizar resultados para el paciente, tales como acelerar la recuperación, prevenir infecciones, aliviar el dolor y minimizar las cicatrices (Ather et al., 2019).

Los apósitos para heridas son cruciales para facilitar el proceso de cicatrización. Un vendaje ideal debería absorber los exudados, mantener un ambiente de curación húmedo adecuado, resistir el movimiento de la piel sin romperse durante el contacto prolongado con la herida, permitir el intercambio gaseoso, prevenir infecciones y poseer propiedades antimicrobianas y antifúngicas (Bhoyar et al., 2023; Vowden & Vowden, 2017). Recientemente se ha investigado el uso de principios terapéuticos activos en la generación de andamios para la cicatrización de heridas, tales como hidrogeles, alginatos e hidrocoloideos. Estos incluyen extractos vegetales con propiedades bioactivas, miel, y otros compuestos fitoterapéuticos (Adamu et al., 2021)

Entre las aplicaciones biotecnológicas avanzadas para el tratamiento de lesiones, los hidrogeles de alginato y los andamios de hidrocoloide han captado particular interés. Estos materiales no solo aceleran la cicatrización al proporcionar un ambiente húmedo óptimo, sino que también son biodegradables y ofrecen una barrera efectiva contra infecciones (Tatarusanu et al., 2023). Los apósitos de hidrocoloide se destacan por su alta capacidad de absorción, crucial para el tratamiento de heridas exudativas, mientras que los apósitos de hidrogel de alginato, derivados de algas marinas, crean un entorno oclusivo que favorece la cicatrización al mantener la herida protegida y húmeda, reduciendo así el riesgo de contaminación externa (Francesko et al., 2018; Thomas, 2008).

En este estudio, se desarrollaron andamios biotecnológicos innovadores para el tratamiento de heridas cutáneas, que incluyen apósitos de hidrocoloide con compuestos fitoterapéuticos activos, miel y extracto de *Centella asiatica*, y andamios híbridos ecosostenibles basados en andamios vegetales descelularizados en conjunto con andamio de hidrogel de alginato con sistema oxigénico mediante la integración de microalgas fotosintéticas.

Los andamios de hidrocoloide generados mediante la disolución de polímeros presentaron características físicas homogéneas y translúcidas, con una superficie lisa y buena resistencia al plegado, fundamentales para su función en aplicaciones biomédicas.

En términos de capacidad de absorción, los andamios de hidrocoloide mostraron una notable capacidad de absorción, con una absorción promedio del  $312\% \pm 2\%$ , siendo considerablemente mayor al porcentaje de absorción de los andamios de hidrocoloide comerciales  $100\% \pm 30\%$ . Esta alta capacidad de absorción es crucial para aplicaciones en la cicatrización de heridas con alto exudado, ya que permite mantener un ambiente húmedo, promoviendo la regeneración celular y la reepitelización. Además, la gestión efectiva del exudado es esencial para prevenir la maceración de los tejidos circundantes y reducir el riesgo de infección. La incorporación de agentes fitoterapéuticos, extracto de *Centella asiatica* y miel, en los andamios de hidrocoloide no mostraron diferencias significativas en términos de absorción,  $315\% \pm 20\%$ , y  $325\% \pm 10\%$ , respectivamente. Destacando que los andamios de hidrocoloides formulados, ya sea con aditivos terapéuticos o sin ellos, superan considerablemente al hidrocoloide comercial en términos de absorción de agua. Esto se traduce a una mayor eficiencia en el manejo del exudado de las heridas. Además, sugieren que la inclusión de principios terapéuticos como el extracto de *Centella asiatica* y la miel no afecta negativamente la capacidad de absorción del andamio. De hecho, estos aditivos bioactivos pueden potenciar el proceso de cicatrización gracias a sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y promotoras de la regeneración tisular (Yang et al., 2024).

La integración de estos componentes terapéuticos no solo conserva las propiedades esenciales del hidrocoloide, sino que también puede mejorar la efectividad del tratamiento, proporcionando un enfoque multifuncional que combina soporte estructural, absorción eficiente y efectos bioactivos directos sobre la herida. Este avance subraya el potencial de los andamios formulados para ofrecer soluciones superiores en el cuidado de heridas, especialmente en heridas crónicas que tienen un alto nivel de exudado y son propensas a infecciones recurrentes. Las heridas crónicas, como las úlceras diabéticas y las úlceras por presión, presentan desafíos significativos debido a su lenta cicatrización y alta probabilidad de complicaciones, por lo que la mejora en la absorción y la adición de componentes terapéuticos pueden resultar cruciales para un tratamiento más eficaz (Eriksson et al., 2022).

Los andamios de hidrogel de alginato, generados en ausencia de disolventes tóxicos, mediante gelificación iónica basado en la interacción del alginato de sodio con los iones de calcio de la solución de cloruro de calcio, estos andamios presentaron redes tridimensionales homogéneas y transparentes, lo cual es considerado una característica importante para el proceso de seguimiento de la progresión de la cicatrización de la herida (Cao et al., 2023).

La incorporación de microalgas en los apósitos de hidrogel de alginato aporta beneficios adicionales, potenciando el proceso de cicatrización al mejorar la oxigenación de tejido lesionado. Las microalgas, como la *Chlorella*, son ricas en clorofila y pueden liberar oxígeno en el microambiente de la herida, lo que puede acelerar la cicatrización y mejorar la salud del tejido circundante. La adecuada oxigenación es crucial para la cicatrización de heridas,

especialmente en heridas crónicas, donde la hipoxia (falta de oxígeno) es un factor común que dificulta el proceso de reparación. La oxigenación adecuada del tejido favorece la proliferación celular, la síntesis de colágeno y la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos), procesos esenciales para una cicatrización efectiva (Gupta et al., 2022). En este estudio, los andamios de alginato oxigenado con microalgas demostraron ser efectivos para mejorar la oxigenación, un factor crucial para acelerar la cicatrización de heridas.

El enfoque innovador de utilizar matrices vegetales descelularizadas como andamios para la ingeniería de tejidos surge de la similitud estructural entre la vasculatura de las plantas y los mamíferos. Este enfoque aprovecha la estructura y la composición natural de las plantas para proporcionar soporte estructural y promover la cicatrización efectiva de heridas. La descelularización de tejidos vegetales, como hojas de espinaca, manzana y repollo, ha demostrado ser efectiva para mantener la estructura y la permeabilidad de la vasculatura vegetal (Zhu et al., 2021). Esto se logra eliminando el material nuclear mientras se conserva la composición nativa del tejido vegetal, esencial para la funcionalidad del andamio en aplicaciones de ingeniería de tejidos.

La eliminación casi total del ADN es crucial para minimizar el riesgo de respuestas inmunológicas adversas en aplicaciones clínicas. La eficacia de los protocolos de descelularización, subraya su potencial para generar andamios vegetales seguros y biocompatibles. Estos andamios tienen múltiples aplicaciones biomédicas, incluyendo la cicatrización de heridas, donde pueden actuar como matrices extracelulares (ECM) que facilitan la regeneración tisular. La ECM proporcionada por los andamios vegetales puede promover la migración celular, la proliferación y la diferenciación, creando un entorno favorable para la reparación de tejidos dañados, lo que los convierte en un recurso de bajo costo y sostenible para aplicaciones en ingeniería de tejidos (Arslan et al., 2023).

El uso de plantas como base para andamios de ingeniería de tejidos no solo aprovecha las propiedades estructurales y funcionales de la matriz extracelular vegetal, sino que también representa una alternativa más sostenible y respetuosa con el medio ambiente en comparación con los biomateriales derivados de animales o sintéticos. La producción de biomateriales sintéticos conlleva un alto costo y un impacto ambiental significativo, mientras que la producción de andamios a partir de tejidos vegetales descelularizados es menos invasiva y más fácilmente escalable bajo prácticas agrícolas controladas (Prete et al., 2023). Sin embargo, la diversidad del reino vegetal requiere protocolos optimizados para eliminar completamente los residuos en los productos finales de la descelularización. Factores como la especie de planta, la parte de la planta utilizada y la presencia de nervaduras influyen en la selección del proceso de descelularización. Además, la concentración de los agentes descelularizantes y el tiempo de tratamiento son cruciales para asegurar la eficacia y reproducibilidad del proceso.

A fecha de hoy, la estandarización del proceso de descelularización vegetal no ha sido establecida y existen protocolos que varían desde los 3 hasta los 7 días. Esta disparidad temporal y metodológica resalta la necesidad de desarrollar un enfoque unificado y optimizado. Ante este escenario, se evaluaron y optimizaron protocolos de descelularización,

evaluando diferentes protocolos existentes en términos de eficiencia de descelularización, considerando la eliminación celular y la preservación de la estructura de la hoja descelularizada, para garantizar la consistencia en la calidad de los andamios producidos. La descelularización de las muestras se verificó meticulosamente mediante diferentes técnicas moleculares (cuantificación del contenido de ADN) y estructurales (tinción histológica), los resultados confirmaron la efectiva eliminación de material nuclear del tejido vegetal de todos los protocolos evaluados, preservando simultáneamente su estructura y composición nativa. Por lo cual, para estudios posteriores fue escogido el protocolo con el menor tiempo de duración (~2.5 días).

La implementación de un andamio híbrido que incorpora un andamio vegetal descelularizado y un andamio de hidrogel de alginato con sistema oxigénico fue generado con éxito, La incorporación del vegetal descelularizado fortalece las propiedades mecánicas y funcionales del andamio del hidrogel, proporcionando un soporte estructural robusto que actúa como una matriz extracelular bioactiva. Esta combinación crea un entorno favorable para la cicatrización y regeneración de tejidos. En donde, el hidrogel oxigénico permitiría una mejor oxigenación del tejido lesionado, dado que las microalgas fotosintéticas incorporadas permiten la liberación de oxígeno en el microambiente de la herida, lo que puede favorecer procesos claves en la cicatrización de la herida, como la proliferación celular, la síntesis de colágeno y angiogénesis (Chen et al., 2020).

Este enfoque integrado no solo aborda las limitaciones de los andamios tradicionales al proporcionar una solución más efectiva y sostenible, sino que también demuestra una sinergia entre los componentes naturales y bioactivos. La combinación del soporte estructural del vegetal descelularizado con las propiedades bioactivas y de oxigenación del hidrogel ofrece una plataforma prometedora para aplicaciones avanzadas en la medicina regenerativa y el tratamiento de heridas crónicas.

Aunque los resultados *in vitro* son prometedores, es necesario continuar investigando y optimizando estos apósitos para garantizar su seguridad y eficacia en aplicaciones clínicas. Esto incluye evaluar su comportamiento *in vivo*, con modelo murino, para asegurar su viabilidad para el tratamiento de heridas cutáneas en humanos. La investigación futura debe centrarse en la optimización de los procesos de descelularización, la caracterización detallada de las propiedades físicas y químicas de los andamios, y la evaluación de su biocompatibilidad y eficacia en modelos preclínicos y clínicos. Además, es importante explorar la integración de estos andamios con terapias avanzadas, como la administración controlada de fármacos y factores de crecimiento, para maximizar su potencial terapéutico (Adamu et al., 2021; Ansari & Darvishi, 2024; Deng et al., 2022).

# **CAPÍTULO VI. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES**

## **CONCLUSIONES.**

1. Se obtuvieron andamios de hidrocoloide, como un posible parche cutáneo en aplicaciones en Biomedicina.
2. Se obtuvieron biomateriales hidrocoloides que presentaron características superabsorbentes, muy superiores a los hidrocoloides comerciales e hidrogeles convencionales.
3. Se obtuvieron hidrogeles de alginato con características idóneas para el desarrollo de estudio *in vitro*.
4. Se obtuvieron andamios vegetales descelularizados, como posibles interfases en aplicaciones *in vitro* caracterizados por técnicas de biología molecular.
5. Se ha generado un andamio ecosustentable híbrido a partir de un hidrogel de alginato + hoja descelularizada.
6. Se ha confeccionado un andamio híbrido (hoja descelularizada + hidrogel alginato) capaz de liberar oxígeno debido a sus componentes fotosintéticos.
7. Se realizaron experimentos de cicatrización en el laboratorio, como prueba de concepto para aplicaciones de lesiones cutáneas (a futuro).

## **RECOMENDACIONES.**

1. Se debe realizar mayor exploración de nuevos principios terapéuticos activos que potencien el proceso de cicatrización, puede ser significativa en avance en Biomedicina.
2. Se debe llevar a cabo estudios en modelos de cicatrización para determinar la efectividad de los principios terapéuticos activos.
3. Se debe implementar estudios *in vivo* con modelo murino, para una mejor evaluación de la eficacia de los andamios bioactivos.

## **PROPIEDAD INTELECTUAL.**

Los desarrollos tecnológicos obtenidos en el proyecto de investigación se encuentran incorporados en la oficina de Patentes de Panamá, como invenciones bajo el título: **Aplicación de patente Nro.: 93652-D1 2021: Andamios ecosostenibles, vegetales obtenidos a partir de sistemas biológicos fotosintetizadores, como estrategia innovadora en aplicaciones de biomedicina y desarrollo sostenible (Autor: Diego Reginensi).**

# **CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abu-Al-Basal, M. A. (2010). Healing potential of *Rosmarinus officinalis* L. on full-thickness excision cutaneous wounds in alloxan-induced-diabetic BALB/c mice. *J Ethnopharmacol*, 131(2), 443-450. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.007>
- Adamski, M., Fontana, G., Gershlak, J. R., Gaudette, G. R., Le, H. D., & Murphy, W. L. (2018). Two methods for decellularization of plant tissues for tissue engineering applications. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(135), e57586.
- Adamu, B. F., Gao, J., Jhatial, A. K., & Kumelachew, D. M. (2021). A review of medicinal plant-based bioactive electrospun nano fibrous wound dressings. *Materials & Design*, 209, 109942. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matdes.2021.109942>
- Ahmad, A. L., mat yasin, n. h., Derek, C., & Lim, J. (2010). *Coagulation-flocculation Process to Enhance Microfiltration of Separation Microalgae/culture medium*.
- Ahmad, N. (2023). In Vitro and In Vivo Characterization Methods for Evaluation of Modern Wound Dressings. *Pharmaceutics*, 15(1), 42. <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/1/42>
- Ahmed, A. A., Eltregy, S., & Kandil, M. I. (2022). Honey dressing: a missed way for orthopaedic wound care. *Int Orthop*, 46(11), 2483-2491. <https://doi.org/10.1007/s00264-022-05540-9>
- Ahmed, A. K. J., Hoekstra, M. J., Hage, J. J., & Karim, R. B. (2003). Honey-medicated dressing: transformation of an ancient remedy into modern therapy. *Annals of plastic surgery*, 50(2), 143-148.
- Al-Gharibi, K. A., Sharstha, S., & Al-Faras, M. A. (2018). Cost-Effectiveness of Wound Care: A concept analysis. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 18(4), e433-e439. <https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.04.002>
- Al-Lamki, R. S., Bradley, J. R., & Pober, J. S. (2017). Human organ culture: updating the approach to bridge the gap from in vitro to in vivo in inflammation, cancer, and stem cell biology. *Frontiers in medicine*, 4, 148.
- Al-Waili, N. S., Salom, K., Butler, G., & Al Ghamdi, A. A. (2011). Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control. *J Med Food*, 14(10), 1079-1096. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0161>
- Al-Jalodi, O., Kupcella, M., Breisinger, K., & Serena, T. E. (2022). A multicenter clinical trial evaluating the durability of diabetic foot ulcer healing in ulcers treated with topical oxygen and standard of care versus standard of care alone 1 year post healing. *International wound journal*, 19(7), 1838-1842.
- Alvarez-Suarez, J. M., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T. Y., Mazzoni, L., & Giampieri, F. (2014). The composition and biological activity of honey: a focus on Manuka honey. *Foods*, 3(3), 420-432.
- Ansari, M., & Darvishi, A. (2024). A review of the current state of natural biomaterials in wound healing applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 12, 1309541.
- Arslan, Y., Paradiso, A., Celiktas, N., Erdogan, T., Yesil-Celiktas, O., & Swieszkowski, W. (2023). Bioinspired microstructures through decellularization of plants for tissue engineering applications. *European Polymer Journal*, 198, 112415. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112415>
- Ashby, W. J., & Zijlstra, A. (2012). Established and novel methods of interrogating two-dimensional cell migration. *Integrative Biology*, 4(11), 1338-1350.

- Ashtikar, M., & Wacker, M. G. (2018). Nanopharmaceuticals for wound healing—lost in translation? *Advanced drug delivery reviews*, 129, 194-218.
- Aswathy, S. H., Narendrakumar, U., & Manjubala, I. (2020). Commercial hydrogels for biomedical applications. *Heliyon*, 6(4), e03719. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03719>
- Ather, S., Harding, K., & Tate, S. (2019). Wound management and dressings. In *Advanced textiles for wound care* (pp. 1-22). Elsevier.
- Attinger, C. E., Janis, J. E., Steinberg, J., Schwartz, J., Al-Attar, A., & Couch, K. (2006). Clinical approach to wounds: débridement and wound bed preparation including the use of dressings and wound-healing adjuvants. *Plast Reconstr Surg*, 117(7 Suppl), 72s-109s. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225470.42514.8f>
- Azwanida, N. (2015). A Review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 04 (03), 3–8. In.
- Bahari, N., Hashim, N., Md Akim, A., & Maringgall, B. (2022). Recent Advances in Honey-Based Nanoparticles for Wound Dressing: A Review. *Nanomaterials (Basel)*, 12(15). <https://doi.org/10.3390/nano12152560>
- Balachandran, A., Siyumbwa, S. N., Froemming, G. R. A., Beata, M.-M., Małgorzata, J., Lavilla, C. A., Billacura, M. P., & Okechukwu, P. N. (2023). In Vitro Antioxidant and Fibroblast Migration Activities of Fractions Eluded from Dichloromethane Leaf Extract of *Marantodes pumilum*. *Life*, 13(6), 1409. <https://www.mdpi.com/2075-1729/13/6/1409>
- Balakrishnan, B., Mohanty, M., Umashankar, P., & Jayakrishnan, A. (2005). Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials*, 26(32), 6335-6342.
- Balogun, F. O., & Sabiu, S. (2021). A review of the phytochemistry, ethnobotany, toxicology, and pharmacological potentials of *Crescentia cujete* L.(Bignoniaceae). *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2021.
- Bar-Shai, N., Sharabani-Yosef, O., Zollmann, M., Lesman, A., & Golberg, A. (2021). Seaweed cellulose scaffolds derived from green macroalgae for tissue engineering. *Scientific Reports*, 11(1), 11843. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90903-2>
- Barreto, R. S., Quintans, J. S., Barreto, A. S., Albuquerque-Júnior, R. L., Galvão, J. G., Gonsalves, J. K., Nunes, R. S., Camargo, E. A., Lucca-Júnior, W., & Soares, R. C. (2016). Improvement of wound tissue repair by chitosan films containing (–)-borneol, a bicyclic monoterpene alcohol, in rats. *International wound journal*, 13(5), 799-808.
- Barreto, S. M., Miranda, J. J., Figueroa, J. P., Schmidt, M. I., Munoz, S., Kuri-Morales, P. P., & Silva, J. B., Jr. (2012). Epidemiology in Latin America and the Caribbean: current situation and challenges. *Int J Epidemiol*, 41(2), 557-571. <https://doi.org/10.1093/ije/dys017>
- Bartkowiak, G., & Frydrych, I. (2011). 23 - Superabsorbents and their medical applications. In V. T. Bartels (Ed.), *Handbook of Medical Textiles* (pp. 505-546). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9780857093691.4.505>
- Barysch, M. J., & Läuchli, S. (2020). Oxygen therapy in wound healing. *Local Wound Care for Dermatologists*, 113-120.

- Baum, C. L., & Arpey, C. J. (2005). Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg*, 31(6), 674-686; discussion 686. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2005.31612>
- Beck, E., Duckert, F., & Ernst, M. (1961). The influence of fibrin stabilizing factor on the growth of fibroblasts in vitro and wound healing. *Thromb Diath Haemorrh*, 6, 485-491.
- Bhoyar, S. D., Malhotra, K., & Madke, B. (2023). Dressing Materials: A Comprehensive Review. *J Cutan Aesthet Surg*, 16(2), 81-89. [https://doi.org/10.4103/jcas.Jcas\\_163\\_22](https://doi.org/10.4103/jcas.Jcas_163_22)
- Blair, S., Jarvis, P., Salmon, M., & McCollum, C. (1990). Clinical trial of calcium alginate haemostatic swabs. *British Journal of Surgery*, 77(5), 568-570.
- Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N., & Eccleston, G. M. (2008). Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci*, 97(8), 2892-2923. <https://doi.org/10.1002/jps.21210>
- Boniakowski, A. E., Kimball, A. S., Jacobs, B. N., Kunkel, S. L., & Gallagher, K. A. (2017). Macrophage-mediated inflammation in normal and diabetic wound healing. *The Journal of Immunology*, 199(1), 17-24.
- Borda, L. J., Macquhae, F. E., & Kirsner, R. S. (2016). Wound dressings: a comprehensive review. *Current Dermatology Reports*, 5, 287-297.
- Brem, H., Kirsner, R. S., & Falanga, V. (2004). Protocol for the successful treatment of venous ulcers. *The American journal of surgery*, 188(1), 1-8.
- Broughton, G., 2nd, Janis, J. E., & Attinger, C. E. (2006). The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg*, 117(7 Suppl), 12s-34s. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2>
- Broussard, K. C., & Powers, J. G. (2013). Wound dressings: selecting the most appropriate type. *Am J Clin Dermatol*, 14(6), 449-459. <https://doi.org/10.1007/s40257-013-0046-4>
- Cañedo-Dorantes, L., & Cañedo-Ayala, M. (2019). Skin acute wound healing: a comprehensive review. *International journal of inflammation*, 2019(1), 3706315.
- Cao, Y., Cong, H., Yu, B., & Shen, Y. (2023). A review on the synthesis and development of alginate hydrogels for wound therapy. *Journal of materials chemistry B*, 11(13), 2801-2829.
- Castilla, D. M., Liu, Z. J., & Velazquez, O. C. (2012). Oxygen: Implications for Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 1(6), 225-230. <https://doi.org/10.1089/wound.2011.0319>
- Chang, K., Alsagoff, S., Ong, K., & Sim, P. (1998). Pressure ulcers--randomised controlled trial comparing hydrocolloid and saline gauze dressings. *The Medical Journal of Malaysia*, 53(4), 428-431.
- Chávez, M. N., Schenck, T. L., Hopfner, U., Centeno-Cerdas, C., Somlai-Schweiger, I., Schwarz, C., Machens, H.-G., Heikenwalder, M., Bono, M. R., & Allende, M. L. (2016). Towards autotrophic tissue engineering: photosynthetic gene therapy for regeneration. *Biomaterials*, 75, 25-36.
- Chen, H., Cheng, Y., Tian, J., Yang, P., Zhang, X., Chen, Y., Hu, Y., & Wu, J. (2020). Dissolved oxygen from microalgae-gel patch promotes chronic wound healing in diabetes. *Science advances*, 6(20), eaba4311.
- Chen, L., & DiPietro, L. A. (2017). Toll-like receptor function in acute wounds. *Advances in Wound Care*, 6(10), 344-355.

- Chen, M. X., Alexander, K. S., & Baki, G. (2016). Formulation and Evaluation of Antibacterial Creams and Gels Containing Metal Ions for Topical Application. *J Pharm (Cairo)*, 2016, 5754349. <https://doi.org/10.1155/2016/5754349>
- Chhabra, S., Chhabra, N., Kaur, A., & Gupta, N. (2017). Wound Healing Concepts in Clinical Practice of OMFS. *J Maxillofac Oral Surg*, 16(4), 403-423. <https://doi.org/10.1007/s12663-016-0880-z>
- Chiang, N., Rodda, O. A., Sleigh, J., & Vasudevan, T. (2017). Effects of topical negative pressure therapy on tissue oxygenation and wound healing in vascular foot wounds. *Journal of vascular surgery*, 66(2), 564-571.
- Chin, C. Y., Jalil, J., Ng, P. Y., & Ng, S. F. (2018). Development and formulation of Moringa oleifera standardised leaf extract film dressing for wound healing application. *J Ethnopharmacol*, 212, 188-199. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.10.016>
- Chinta, M. L., Gandam, P. K., & Parcha, S. R. (2022). Natural polymer based hydrogel systems for wound management. In *Natural polymers in wound healing and repair* (pp. 129-165). Elsevier.
- Chithra, P., Sajithlal, G. B., & Chandrakasan, G. (1998). Influence of aloe vera on the healing of dermal wounds in diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 59(3), 195-201. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(97\)00124-4](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(97)00124-4)
- Chu, G., Vlok, L., Zwaag-Pijls, C., Houser, C. M., & de Groot, B. (2014). Emergency department management and follow-up of children with bicycle spoke injuries. *The Journal of Emergency Medicine*, 47(3), 259-267.
- Cialdai, F., Risaliti, C., & Monici, M. (2022). Role of fibroblasts in wound healing and tissue remodeling on Earth and in space. *Front Bioeng Biotechnol*, 10, 958381. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.958381>
- Clardy, J., Fischbach, M. A., & Currie, C. R. (2009). The natural history of antibiotics. *Current biology*, 19(11), R437-R441.
- Contessi, N., Toffoletto, N., Farè, S., & Altomare, L. (2020). Plant tissues as 3D natural scaffolds for adipose, bone and tendon tissue regeneration. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 723.
- Cooper, R. A., Halas, E., & Molan, P. C. (2002). The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *The Journal of burn care & rehabilitation*, 23(6), 366-370.
- Corrales-Orovio, R., Carvajal, F., Holmes, C., Miranda, M., González-Itier, S., Cárdenas, C., Vera, C., Schenck, T. L., & Egaña, J. T. (2023). Development of a photosynthetic hydrogel as potential wound dressing for the local delivery of oxygen and bioactive molecules. *Acta biomaterialia*, 155, 154-166.
- Cui, Y., Ji, W., Gao, Y., Xiao, Y., Liu, H., & Chen, Z. (2021). Single-cell characterization of monolayer cultured human dental pulp stem cells with enhanced differentiation capacity. *International Journal of Oral Science*, 13(1), 44.
- Darby, I. A., & Hewitson, T. D. (2016). Hypoxia in tissue repair and fibrosis. *Cell and tissue research*, 365, 553-562.
- Das, A., Sinha, M., Datta, S., Abas, M., Chaffee, S., Sen, C. K., & Roy, S. (2015). Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *The American journal of pathology*, 185(10), 2596-2606.

- Datta, H. S., Mitra, S. K., & Patwardhan, B. (2011). Wound healing activity of topical application forms based on ayurveda. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011(1), 134378.
- Datti, I., Bohari, S., Wahab, R., & Zia, A. (2022). Recent advances and future prospects in topical creams from medicinal plants to expedite wound healing: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 36, 81-93. <https://doi.org/10.1080/13102818.2022.2053340>
- de Smet, G. H., Kroese, L. F., Menon, A. G., Jeekel, J., van Pelt, A. W., Kleinrensink, G. J., & Lange, J. F. (2017). Oxygen therapies and their effects on wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 25(4), 591-608.
- Deng, X., Gould, M., & Ali, M. A. (2022). A review of current advancements for wound healing: Biomaterial applications and medical devices. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 110(11), 2542-2573. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbm.b.35086>
- Deutsch, C., Edwards, D., & Myers, S. (2017). Wound dressings. *British Journal of Hospital Medicine*, 78(7), C103-C109.
- Dhivya, S., Padma, V. V., & Santhini, E. (2015). Wound dressings - a review. *Biomedicine (Taipei)*, 5(4), 22. <https://doi.org/10.7603/s40681-015-0022-9>
- Diaz, M. J., Tran, J. T., Gelman, B., Forouzandeh, M., Lipner, S. R., & Kaffenberger, B. (2023). Dermatologist utilization of Medicare Part B from 2010–2019: a cross-sectional analysis. *Archives of Dermatological Research*, 315(10), 2959-2960.
- Diegelmann, R. F., & Evans, M. C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*, 9(1), 283-289.
- Diegelmann, R. F., & Evans, M. C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*, 9, 283-289. <https://doi.org/10.2741/1184>
- Dikici, S., Claeysens, F., & MacNeil, S. (2019). Decellularised baby spinach leaves and their potential use in tissue engineering applications: Studying and promoting neovascularisation. *Journal of Biomaterials Applications*, 34(4), 546-559.
- Dunford, C., Cooper, R., & Molan, P. (2000). Using honey as a dressing for infected skin lesions.
- Eichler, M. J., & Carlson, M. A. (2006). Modeling dermal granulation tissue with the linear fibroblast-populated collagen matrix: a comparison with the round matrix model. *Journal of dermatological science*, 41(2), 97-108.
- Ekor, M. (2014). The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 177.
- Ekor, M. (2014). The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol*, 4, 177. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00177>
- El-Kased, R. F., Amer, R. I., Attia, D., & Elmazar, M. M. (2017). Honey-based hydrogel: In vitro and comparative In vivo evaluation for burn wound healing. *Scientific Reports*, 7(1), 9692. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08771-8>
- Elliot, S., Wikramanayake, T. C., Jozic, I., & Tomic-Canic, M. (2018). A modeling conundrum: murine models for cutaneous wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 138(4), 736-740.

- Ennis, W. J., & Meneses, P. (2000). Wound healing at the local level: the stunned wound. *Ostomy Wound Manage*, 46(1A Suppl), 39S-48S; quiz 49S-50S.
- Enoch, S. (2006). ABC of wound healing: Wound assessment. *BMJ*, 332(Suppl S3).
- Eriksson, E., Liu, P. Y., Schultz, G. S., Martins-Green, M. M., Tanaka, R., Weir, D., Gould, L. J., Armstrong, D. G., Gibbons, G. W., Wolcott, R., Olutoye, O. O., Kirsner, R. S., & Gurtner, G. C. (2022). Chronic wounds: Treatment consensus. *Wound Repair Regen*, 30(2), 156-171. <https://doi.org/10.1111/wrr.12994>
- Eshghi, F., Hosseinimehr, S. J., Rahmani, N., Khademloo, M., Norozi, M. S., & Hojati, O. (2010). Effects of Aloe vera cream on posthemorrhoidectomy pain and wound healing: results of a randomized, blind, placebo-control study. *J Altern Complement Med*, 16(6), 647-650. <https://doi.org/10.1089/acm.2009.0428>
- Espinosa-Espinosa, L., Garduño-Siciliano, L., Rodriguez-Canales, M., Hernandez-Portilla, L. B., Canales-Martinez, M. M., & Rodriguez-Monroy, M. A. (2022). The Wound-Healing Effect of Mango Peel Extract on Incision Wounds in a Murine Model. *Molecules*, 27(1). <https://doi.org/10.3390/molecules27010259>
- Farooq, A., Shafaghat, H., Jae, J., Jung, S. C., & Park, Y. K. (2019). Enhanced stability of bio-oil and diesel fuel emulsion using Span 80 and Tween 60 emulsifiers. *J Environ Manage*, 231, 694-700. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.098>
- Farrar, D. (2011). Introduction. In D. Farrar (Ed.), *Advanced Wound Repair Therapies* (pp. xix-xxi). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-84569-700-6.50027-9>
- Fernández-Guarino, M., Hernández-Bule, M. L., & Bacci, S. (2023). Cellular and Molecular Processes in Wound Healing. *Biomedicines*, 11(9), 2526. <https://www.mdpi.com/2227-9059/11/9/2526>
- Flanagan, M. (2000). The physiology of wound healing. *J Wound Care*, 9(6), 299-300. <https://doi.org/10.12968/jowc.2000.9.6.25994>
- Flohr, C., & Hay, R. (2021). Putting the burden of skin diseases on the global map. *British Journal of Dermatology*, 184(2), 189-190. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/bjd.19704>
- Francesko, A., Petkova, P., & Tzanov, T. (2018). Hydrogel Dressings for Advanced Wound Management. *Curr Med Chem*, 25(41), 5782-5797. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170920161246>
- Frykberg, R., Andersen, C., Chadwick, P., Haser, P., Janssen, S., Lee, A., Niezgodá, J., Serena, T., Stang, D., & Agarwal, A. (2023). Use of topical oxygen therapy in wound healing. *Journal of Wound Care*, 32(Sup8b), S1-S32.
- Frykberg, R. G. (2021). Topical Wound Oxygen Therapy in the Treatment of Chronic Diabetic Foot Ulcers. *Medicina*, 57(9), 917. <https://www.mdpi.com/1648-9144/57/9/917>
- Furie, B., & Furie, B. C. (2008). Mechanisms of thrombus formation. *New England Journal of Medicine*, 359(9), 938-949.
- Garrett, B. (1998). Re-epithelialisation. *Journal of Wound Care*, 7(7), 358-359.
- Gershlak, J. R., Hernandez, S., Fontana, G., Perreault, L. R., Hansen, K. J., Larson, S. A., Binder, B. Y., Dolivo, D. M., Yang, T., & Dominko, T. (2017). Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, 125, 13-22.

- Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., & Badylak, S. F. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27(19), 3675-3683.
- Goetsch, K., & Niesler, C. (2011). Optimization of the scratch assay for in vitro skeletal muscle wound healing analysis. *Analytical biochemistry*, 411(1), 158-160.
- Golebiewska, E. M., & Poole, A. W. (2015a). Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev*, 29(3), 153-162. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.10.003>
- Golebiewska, E. M., & Poole, A. W. (2015b). Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood reviews*, 29(3), 153-162.
- Gonzalez, A. C., Costa, T. F., Andrade, Z. A., & Medrado, A. R. (2016). Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol*, 91(5), 614-620. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>
- Gopal, R., Lo, A. Z. K., Masrol, M., Lai, C.-H., Zain, N. M., & Saidin, S. (2021). Susceptibility of stingless bee, giant bee and asian bee honeys incorporated cellulose hydrogels in treating wound infection. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 17(3), 242-252.
- Gosain, A., & DiPietro, L. A. (2004). Aging and wound healing. *World J Surg*, 28(3), 321-326. <https://doi.org/10.1007/s00268-003-7397-6>
- Gottrup, F., Dissemond, J., Baines, C., Frykberg, R., Jensen, P. Ø., Kot, J., Kröger, K., & Longobardi, P. (2017). Use of oxygen therapies in wound healing: focus on topical and hyperbaric oxygen treatment. *Journal of Wound Care*, 26(Sup5), S1-S43.
- Grada, A., Mervis, J., & Falanga, V. (2018). Research techniques made simple: animal models of wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 138(10), 2095-2105. e2091.
- Greenhalgh, D. G. (1998). The role of apoptosis in wound healing. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 30(9), 1019-1030.
- Greif, R., Akça, O., Horn, E.-P., Kurz, A., & Sessler, D. I. (2000). Supplemental perioperative oxygen to reduce the incidence of surgical-wound infection. *New England Journal of Medicine*, 342(3), 161-167.
- Guo, S., & DiPietro, L. A. (2010). Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219-229. <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>
- Gupta, S., Mujawdiya, P., Maheshwari, G., & Sagar, S. (2022). Dynamic Role of Oxygen in Wound Healing: A Microbial, Immunological, and Biochemical Perspective. *Arch Razi Inst*, 77(2), 513-523. <https://doi.org/10.22092/ari.2022.357230.2003>
- Gwarzo, I. D., Mohd Bohari, S. P., Abdul Wahab, R., & Zia, A. (2022). Recent advances and future prospects in topical creams from medicinal plants to expedite wound healing: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 36(1), 82-94.
- Haas, A. F. (1995). Wound healing. *Dermatol Nurs*, 7(1), 28-34, 74.
- Han, G., & Ceilley, R. (2017). Chronic wound healing: a review of current management and treatments. *Advances in therapy*, 34, 599-610.
- Harding, K., Cutting, K., & Price, P. (2000). The cost-effectiveness of wound management protocols of care. *British Journal of Nursing*, 9(Sup3), S6-S24.
- Harding, K., Morris, H., & Patel, G. (2002). Healing chronic wounds. *BMJ*, 324(7330), 160-163.

- Harris, A. F., Lacombe, J., & Zenhausern, F. (2021). The Emerging Role of Decellularized Plant-Based Scaffolds as a New Biomaterial. *Int J Mol Sci*, 22(22). <https://doi.org/10.3390/ijms222212347>
- Hart, J. (2002). Inflammation. 1: Its role in the healing of acute wounds. *J Wound Care*, 11(6), 205-209. <https://doi.org/10.12968/jowc.2002.11.6.26411>
- Hartati, H., Ali, A., Idris, I. S., Karim, H., Pagarra, H., & Rachmawaty, R. (2018). Potential wound healing activity of the different extract of *Crescentia cujete* in albino rats. AIP Conference Proceedings,
- Hasan, M., Swapon, A., Dipti, T., Choi, Y.-J., & Yi, H.-G. (2024). Plant-Based Decellularization: A Novel Approach for Perfusion-Compatible Tissue Engineering Structures. *Journal of microbiology and biotechnology*, 34, 1-14. <https://doi.org/10.4014/jmb.2401.01024>
- Hay, R. J., Johns, N. E., Williams, H. C., Bolliger, I. W., Dellavalle, R. P., Margolis, D. J., Marks, R., Naldi, L., Weinstock, M. A., Wulf, S. K., Michaud, C., C, J. L. M., & Naghavi, M. (2014). The global burden of skin disease in 2010: an analysis of the prevalence and impact of skin conditions. *J Invest Dermatol*, 134(6), 1527-1534. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.446>
- Hess, C. T. (2000). Skin care basics. *Adv Skin Wound Care*, 13(3 Pt 1), 127-128.
- Heyer, K., Augustin, M., Protz, K., Herberger, K., Spehr, C., & Rustenbach, S. J. (2013). Effectiveness of advanced versus conventional wound dressings on healing of chronic wounds: systematic review and meta-analysis. *Dermatology*, 226(2), 172-184. <https://doi.org/10.1159/000348331>
- Hickey, R. J., & Pelling, A. E. (2019). Cellulose biomaterials for tissue engineering. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 45.
- Ho, C. H., & Bogie, K. (2008). Chapter 140 - Pressure Ulcers. In W. R. Frontera, J. K. Silver, & T. D. Rizzo (Eds.), *Essentials of Physical Medicine and Rehabilitation (Second Edition)* (pp. 813-821). W.B. Saunders. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-4007-1.50142-5>
- Hopfner, U., Schenck, T.-L., Chávez, M.-N., Machens, H.-G., Bohne, A.-V., Nickelsen, J., Giunta, R.-E., & Egaña, J.-T. (2014). Development of photosynthetic biomaterials for in vitro tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 10(6), 2712-2717.
- Hunt, T. K., Hopf, H., & Hussain, Z. (2000a). Physiology of wound healing. *Advances in skin & wound care*, 13, 6.
- Hunt, T. K., Hopf, H., & Hussain, Z. (2000b). Physiology of wound healing. *Adv Skin Wound Care*, 13(2 Suppl), 6-11.
- Hussein, R. A., & El-Anssary, A. A. (2019). Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. *Herbal medicine*, 1(3).
- Ibrahim, N. I., Wong, S. K., Mohamed, I. N., Mohamed, N., Chin, K.-Y., Ima-Nirwana, S., & Shuid, A. N. (2018). Wound healing properties of selected natural products. *International journal of environmental research and public health*, 15(11), 2360.
- Ige, O. O., Umoru, L. E., & Aribo, S. (2012). Natural products: a minefield of biomaterials. *International Scholarly Research Notices*, 2012.
- Indurkar, A., Pandit, A., Jain, R., & Dandekar, P. (2021). Plant-based biomaterials in tissue engineering. *Bioprinting*, 21, e00127. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00127>

- Ingle, K. P., Deshmukh, A. G., Padole, D. A., Dudhare, M. S., Moharil, M. P., & Khelurkar, V. C. (2017). Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(1), 32-36.
- Irfan-Maqsood, M. (2016). Classification of Wounds: Know before Research and Clinical Practice. *Cell Therapy and Regenerative Medicine Journal*, 1, 79. <https://doi.org/10.15562/ctrm.21>
- Irfan-Maqsood, M. (2018). Classification of wounds: know before research and clinical practice. *Journal of Genes and Cells*, 4(1), 1-4.
- Isaza-Pérez, F., Ramírez-Carmona, M., Rendón-Castrillón, L., & Ocampo-López, C. (2020). Potential of residual fungal biomass: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 13019-13031.
- Jaeger, R., & Cuny, E. (2016). Terpenoids with Special Pharmacological Significance: A Review. *Nat Prod Commun*, 11(9), 1373-1390.
- James, R. (2024). U.S. Wound Care Market Size To Hold USD 24.05 Bn By 2032. *Nova One Advisor*.
- Janiszowska, W., Michalski, W., & Kasprzyk, Z. (1976). Polyprenyl quinones and  $\alpha$ -tocopherol in *Calendula officinalis*. *Phytochemistry*, 15(1), 125-127. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89066-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89066-4)
- Järbrink, K., Ni, G., Sönnergren, H., Schmidtchen, A., Pang, C., Bajpai, R., & Car, J. (2016). Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. *Syst Rev*, 5(1), 152. <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0329-y>
- Jayakumar, R., Rajkumar, M., Freitas, H., Selvamurugan, N., Nair, S., Furuike, T., & Tamura, H. (2009). Preparation, characterization, bioactive and metal uptake studies of alginate/phosphorylated chitin blend films. *International journal of biological macromolecules*, 44(1), 107-111.
- Jeffery Marano, R., Jane Wallace, H., Wijeratne, D., William Fear, M., San Wong, H., & O'Handley, R. (2015). Secreted biofilm factors adversely affect cellular wound healing responses in vitro. *Scientific Reports*, 5(1), 13296. <https://doi.org/10.1038/srep13296>
- Jiang, Q., Wang, J., Tang, R., Zhang, D., & Wang, X. (2016). Hypromellose succinate-crosslinked chitosan hydrogel films for potential wound dressing. *International journal of biological macromolecules*, 91, 85-91.
- Jiang, R., Qin, L., Feng, S., Huang, D., Wang, Z., & Zhu, S. (2021). The joint effect of ammonium and pH on the growth of *Chlorella vulgaris* and ammonium removal in artificial liquid digestate. *Bioresour Technol*, 325, 124690. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124690>
- Jones, V., Grey, J. E., & Harding, K. G. (2006). Wound dressings. *BMJ*, 332(7544), 777-780. <https://doi.org/10.1136/bmj.332.7544.777>
- Jones, V. J. (2006). The use of gauze: will it ever change? *Int Wound J*, 3(2), 79-86. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4801.2006.00215.x>
- Kalantari, N., Ghasemi, M., Bayani, M., & Ghaffari, S. (2016). Effect of honey on mRNA expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 following acute toxoplasmosis in mice. *Cytokine*, 88, 85-90. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.029>

- Kamoun, E. A., Kenawy, E.-R. S., & Chen, X. (2017). A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of advanced research*, 8(3), 217-233.
- Kang, Y., Xu, L., Dong, J., Yuan, X., Ye, J., Fan, Y., Liu, B., Xie, J., & Ji, X. (2024). Programmed microalgae-gel promotes chronic wound healing in diabetes. *Nature Communications*, 15(1), 1042. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45101-9>
- Kaplan, K. L., Broekman, M. J., Chernoff, A., Lesznik, G. R., & Drillings, M. (1979). Platelet  $\alpha$ -Granule Proteins: Studies on Release and Subcellular Localization. *Blood*, 53(4), 604-618.
- Karimkhani, C., Amir, M., Dellavalle, R. P., & Ipaktchi, K. (2014). Current concepts for oil decontamination of crush injuries: a review. *Patient Safety in Surgery*, 8, 1-5.
- Karimkhani, C., Dellavalle, R. P., Coffeng, L. E., Flohr, C., Hay, R. J., Langan, S. M., Nsoesie, E. O., Ferrari, A. J., Erskine, H. E., Silverberg, J. I., Vos, T., & Naghavi, M. (2017). Global Skin Disease Morbidity and Mortality: An Update From the Global Burden of Disease Study 2013. *JAMA Dermatol*, 153(5), 406-412. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2016.5538>
- Kaur, J., Kaur, J., Jaiswal, S., & Gupta, G. (2016). Recent advances in topical drug delivery system. *Pharmaceutical Research*, 6(07), 6353-6369.
- Kekonen, A., & Viik, J. (2021). 7 - Monitoring wound healing. In P. Annus & M. Min (Eds.), *Bioimpedance and Spectroscopy* (pp. 221-270). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818614-5.00001-1>
- Khezri, K., Farahpour, M. R., & Mounesi Rad, S. (2019). Accelerated infected wound healing by topical application of encapsulated Rosemary essential oil into nanostructured lipid carriers. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 980-988. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1582539>
- Kim, W.-S., Dobbin, C., & Haj-Ahmad, Y. (2009). Non-Organic-Based Isolation of Plant microRNA using Norgen's Plant/Fungi RNA Purification Kit. *Norgen Biotek Corp Application note*.
- Kimmel, H. M., Grant, A., & Ditata, J. (2016). The Presence of Oxygen in Wound Healing. *Wounds: a Compendium of Clinical Research and Practice*, 28(8), 264-270.
- Kinghorn, A. D., Pan, L., Fletcher, J. N., & Chai, H. (2011). The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. *J Nat Prod*, 74(6), 1539-1555. <https://doi.org/10.1021/np200391c>
- Koksal, C., & Bozkurt, A. K. (2003). Combination of hydrocolloid dressing and medical compression stockings versus Unna s boot for the treatment of venous leg ulcers. *Swiss medical weekly*, 133(2526), 364-368.
- Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13(3), 159-175.
- Komarcević, A. (2000). The modern approach to wound treatment. *Medicinski pregled*, 53(7-8), 363-368.
- Kordestani, S. S. (2019). Chapter 5 - Wound Care Management. In S. S. Kordestani (Ed.), *Atlas of Wound Healing* (pp. 31-47). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-67968-8.00005-7>

- Kostka, E., Meissner, S., Finke, C. H., Mandirola, M., & Preissner, S. (2014). Multidisciplinary treatment options of tooth avulsion considering different therapy concepts. *The open dentistry journal*, 8, 180.
- Kranke, P., Bennett, M. H., Martyn-St James, M., Schnabel, A., Debus, S. E., & Weibel, S. (2015). Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(6).
- Krefeld, H. K., Kröger, K., & FASA, E. (2018). Prevalence of chronic wounds in different modalities of care in Germany.
- Kuhlmann, M., Wigger-Alberti, W., Mackensen, Y. v., Ebbinghaus, M., Williams, R., Krause-Kyora, F., & Wolber, R. (2019). Wound healing characteristics of a novel wound healing ointment in an abrasive wound model: A randomised, intra-individual clinical investigation. *Wound medicine*, 24(1), 24-32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.wndm.2019.02.002>
- Kummoona, R. K. (2011). Missile war injuries of the face. *Journal of Craniofacial Surgery*, 22(6), 2017-2021.
- Kuo, C. K., & Ma, P. X. (2001). Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*, 22(6), 511-521.
- Kurczewska, J., Sawicka, P., Ratajczak, M., Gajęcka, M., & Schroeder, G. (2015). Will the use of double barrier result in sustained release of vancomycin? Optimization of parameters for preparation of a new antibacterial alginate-based modern dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, 496(2), 526-533.
- Lacombe, J., Harris, A. F., Zenhausern, R., Karsunsky, S., & Zenhausern, F. (2020). Plant-Based Scaffolds Modify Cellular Response to Drug and Radiation Exposure Compared to Standard Cell Culture Models [Original Research]. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00932>
- Lavik, E., & Langer, R. (2004). Tissue engineering: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 65, 1-8.
- Lawrence, W. T., & Diegelmann, R. F. (1994). Growth factors in wound healing. *Clinics in dermatology*, 12(1), 157-169.
- Lawton, B., & Hadj, A. (2014). Laceration repair in children. *Australian Family Physician*, 43(9), 600-602.
- Leaper, D. J. (2006). Traumatic and surgical wounds. *BMJ*, 332(7540), 532-535. <https://doi.org/10.1136/bmj.332.7540.532>
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 37(1), 106-126.
- Li Pomi, F., Papa, V., Borgia, F., Vaccaro, M., Allegra, A., Cicero, N., & Gangemi, S. (2023). Rosmarinus officinalis and Skin: Antioxidant Activity and Possible Therapeutical Role in Cutaneous Diseases. *Antioxidants (Basel)*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/antiox12030680>
- Liang, C.-C., Park, A. Y., & Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2(2), 329-333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>

- Lim, D.-J., & Jang, I. (2021). Oxygen-releasing composites: a promising approach in the management of diabetic foot ulcers. *Polymers*, *13*(23), 4131.
- Lin, Z., Nica, C., Sculean, A., & Asparuhova, M. B. (2020). Enhanced Wound Healing Potential of Primary Human Oral Fibroblasts and Periodontal Ligament Cells Cultured on Four Different Porcine-Derived Collagen Matrices. *Materials*, *13*(17), 3819. <https://www.mdpi.com/1996-1944/13/17/3819>
- Lindholm, C., & Searle, R. (2016). Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. *Int Wound J*, *13 Suppl 2*(Suppl 2), 5-15. <https://doi.org/10.1111/iwj.12623>
- Liu, E., Gao, H., Zhao, Y., Pang, Y., Yao, Y., Yang, Z., Zhang, X., Wang, Y., Yang, S., & Ma, X. (2022). The potential application of natural products in cutaneous wound healing: A review of preclinical evidence. *Frontiers in pharmacology*, *13*, 900439.
- Lopez-Ojeda, W., Pandey, A., Alhadj, M., & Oakley, A. M. (2017). Anatomy, skin (integument).
- Lund-Nielsen, B., Adamsen, L., Kolmos, H. J., Rørth, M., Tolver, A., & Gottrup, F. (2011). The effect of honey-coated bandages compared with silver-coated bandages on treatment of malignant wounds—a randomized study. *Wound Repair Regen*, *19*(6), 664-670. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2011.00735.x>
- Lusby, P., Coombes, A., & Wilkinson, J. (2002). Honey: a potent agent for wound healing? *Journal of WOCN*, *29*(6), 295-300.
- Lusby, P. E., Coombes, A. L., & Wilkinson, J. M. (2005). Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Archives of medical research*, *36*(5), 464-467.
- Ma, W., Feng, C., Guan, F., Ma, D., & Cai, J. (2022). Effective *Chlorella vulgaris* biomass harvesting through sulfate and chloride flocculants. *Journal of Marine Science and Engineering*, *11*(1), 47.
- MacKay, D., & Miller, A. L. (2003). Nutritional support for wound healing. *Alternative medicine review*, *8*(4).
- Mantovani, A., Sica, A., & Locati, M. (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity*, *23*(4), 344-346.
- Mao, Y., Sun, Y., & Yang, C. (2024). Compound Microalgae-Type Biofunctional Hydrogel for Wound Repair during Full-Thickness Skin Injuries. *Polymers*, *16*(5), 692. <https://www.mdpi.com/2073-4360/16/5/692>
- Masood, N., Ahmed, R., Tariq, M., Ahmed, Z., Masoud, M. S., Ali, I., Asghar, R., Andleeb, A., & Hasan, A. (2019). Silver nanoparticle impregnated chitosan-PEG hydrogel enhances wound healing in diabetes induced rabbits. *International Journal of Pharmaceutics*, *559*, 23-36.
- Masson-Meyers, D. S., Andrade, T. A., Caetano, G. F., Guimaraes, F. R., Leite, M. N., Leite, S. N., & Frade, M. A. C. (2020). Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *International journal of experimental pathology*, *101*(1-2), 21-37.
- Maver, T., Maver, U., Stana Kleinschek, K., Smrke, D. M., & Kreft, S. (2015). A review of herbal medicines in wound healing. *International journal of dermatology*, *54*(7), 740-751.
- Mayba, J. N., & Gooderham, M. J. (2017). Review of Atopic Dermatitis and Topical Therapies. *J Cutan Med Surg*, *21*(3), 227-236. <https://doi.org/10.1177/1203475416685077>

- Mieles, J., Vyas, C., Aslan, E., Humphreys, G., Diver, C., & Bartolo, P. (2022). Honey: an advanced antimicrobial and wound healing biomaterial for tissue engineering applications. *Pharmaceutics*, 14 (8), 1663. In.
- Miguel, S. P., Ribeiro, M. P., Otero, A., & Coutinho, P. (2021). Application of microalgae and microalgal bioactive compounds in skin regeneration. *Algal Research*, 58, 102395. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102395>
- Minden-Birkenmaier, B. A., & Bowlin, G. L. (2018). Honey-based templates in wound healing and tissue engineering. *Bioengineering*, 5(2), 46.
- MINSA. (2013). *Situación de Salud de Panamá*.
- Minsart, M., Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., & Mignon, A. (2022). Commercial wound dressings for the treatment of exuding wounds: an in-depth physico-chemical comparative study. *Burns & Trauma*, 10. <https://doi.org/10.1093/burnst/tkac024>
- Miranda-Azpiazu, P., Panagiotou, S., Jose, G., & Saha, S. (2018). A novel dynamic multicellular co-culture system for studying individual blood-brain barrier cell types in brain diseases and cytotoxicity testing. *Scientific Reports*, 8(1), 8784.
- Misirlioglu, A., Eroglu, S., Karacaoglan, N., Akan, M., Akoz, T., & Yildirim, S. (2003). Use of honey as an adjunct in the healing of split-thickness skin graft donor site. *Dermatologic surgery*, 29(2), 168-172.
- Modulevsky, D. J., Cuerrier, C. M., & Pelling, A. E. (2016). Biocompatibility of subcutaneously implanted plant-derived cellulose biomaterials. *PloS one*, 11(6), e0157894.
- Modulevsky, D. J., Lefebvre, C., Haase, K., Al-Rekabi, Z., & Pelling, A. E. (2014). Apple derived cellulose scaffolds for 3D mammalian cell culture. *PloS one*, 9(5), e97835.
- Mogha, P., Srivastava, A., Kumar, S., Das, S., Kureel, S., Dwivedi, A., Karulkar, A., Jain, N., Sawant, A., Nayak, C., Majumder, A., & Purwar, R. (2019). Hydrogel scaffold with substrate elasticity mimicking physiological-niche promotes proliferation of functional keratinocytes. *RSC Advances*, 9, 10174-10183. <https://doi.org/10.1039/C9RA00781D>
- Molan, P. C. (2001). Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *Am J Clin Dermatol*, 2(1), 13-19. <https://doi.org/10.2165/00128071-200102010-00003>
- Molan, P. C. (2006). The evidence supporting the use of honey as a wound dressing. *The international journal of lower extremity wounds*, 5(1), 40-54.
- Molan, P. C., & Rhodes, T. (2015). Honey: a biologic wound dressing.
- Moore, Z. E. H., & Webster, J. (2018). Dressings and topical agents for preventing pressure ulcers. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(12). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009362.pub3>
- Moreo, K. (2005). Understanding and overcoming the challenges of effective case management for patients with chronic wounds. *The Case Manager*, 16(2), 62-67.
- Morgan, D. (2002). What should a dressings formulary include? *HOSPITAL PHARMACIST-LONDON-*, 9(9), 261-266.
- Muhammad, A. A., Pauzi, N. A., Arulselvan, P., Abas, F., & Fakurazi, S. (2013). In vitro wound healing potential and identification of bioactive compounds from *Moringa oleifera* Lam. *Biomed Res Int*, 2013, 974580. <https://doi.org/10.1155/2013/974580>
- Mustoe, T. (2004). Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *The American journal of surgery*, 187(5), S65-S70.

- Nagori, B. P., & Solanki, R. (2011). Role of medicinal plants in wound healing. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5(4), 392-405.
- Natarajan, S., Williamson, D., Grey, J., Harding, K., & Cooper, R. (2001). Healing of an MRSA-colonized, hydroxyurea-induced leg ulcer with honey. *Journal of Dermatological Treatment*, 12(1), 33-36.
- Navaei-Alipour, N., Mastali, M., Ferns, G. A., Saberi-Karimian, M., & Ghayour-Mobarhan, M. (2021). The effects of honey on pro- and anti-inflammatory cytokines: A narrative review. *Phytotherapy Research*, 35(7), 3690-3701. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ptr.7066>
- Nayak, B. S., & Pinto Pereira, L. M. (2006). Catharanthus roseus flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats. *BMC Complement Altern Med*, 6, 41. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-41>
- Nayak, B. S., Sandiford, S., & Maxwell, A. (2009). Evaluation of the Wound-healing Activity of Ethanolic Extract of Morinda citrifolia L. Leaf. *Evid Based Complement Alternat Med*, 6(3), 351-356. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem127>
- Nelson, E. A., & Jones, M. J. (2008). Venous leg ulcers. *BMJ Clinical Evidence*, 2008.
- Nguyen, H. M., Le, T. T. N., Nguyen, A. T., Le, H. N. T., & Pham, T. T. (2023). Biomedical materials for wound dressing: Recent advances and applications. *RSC Advances*, 13(8), 5509-5528.
- Nisar, S., Kashyap, P. K., Farooq, U., Ul-Islam, S., & Pandit, A. H. (2023). Recent advances in natural polymer based hydrogels for wound healing applications. *Advances in Healthcare and Protective Textiles*, 115-149.
- Noori, S., Kokabi, M., & Hassan, Z. (2018). Poly (vinyl alcohol)/chitosan/honey/clay responsive nanocomposite hydrogel wound dressing. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(21), 46311.
- Norahan, M. H., Pedroza-González, S. C., Sánchez-Salazar, M. G., Álvarez, M. M., & Trujillo de Santiago, G. (2023). Structural and biological engineering of 3D hydrogels for wound healing. *Bioact Mater*, 24, 197-235. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.11.019>
- Nosbaum, A., Prevel, N., Truong, H.-A., Mehta, P., Ettinger, M., Scharschmidt, T. C., Ali, N. H., Pauli, M. L., Abbas, A. K., & Rosenblum, M. D. (2016). Cutting edge: regulatory T cells facilitate cutaneous wound healing. *The Journal of Immunology*, 196(5), 2010-2014.
- 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 Health*, 21(1), 27-32. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2017.07.007>
- Obaíd, M. L., Camacho, J. P., Brenet, M., Corrales-Orovio, R., Carvajal, F., Martorell, X., Werner, C., Simón, V., Varas, J., & Calderón, W. (2021). A first in human trial implanting microalgae shows safety of photosynthetic therapy for the effective treatment of full thickness skin wounds. *Frontiers in medicine*, 8, 772324.
- Okamoto, T., Tomomasa, S., & Nakajima, H. (2016). Preparation and Thermal Properties of Fatty Alcohol/Surfactant/Oil/Water Nanoemulsions and Their Cosmetic Applications. *J Oleo Sci*, 65(1), 27-36. <https://doi.org/10.5650/jos.ess15183>

- Ortega, J. S., Corrales-Orovio, R., Ralph, P., Egaña, J. T., & Gentile, C. (2022). Photosynthetic microorganisms for the oxygenation of advanced 3D bioprinted tissues. *Acta biomaterialia*.
- Ortega, M. A., Fraile-Martinez, O., García-Montero, C., Callejón-Peláez, E., Sáez, M. A., Álvarez-Mon, M. A., García-Honduvilla, N., Monserrat, J., Álvarez-Mon, M., Bujan, J., & Canals, M. L. (2021). A General Overview on the Hyperbaric Oxygen Therapy: Applications, Mechanisms and Translational Opportunities. *Medicina (Kaunas)*, 57(9). <https://doi.org/10.3390/medicina57090864>
- Oryan, A., Alemzadeh, E., & Moshiri, A. (2016). Biological properties and therapeutic activities of honey in wound healing: A narrative review and meta-analysis. *Journal of tissue viability*, 25(2), 98-118. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtv.2015.12.002>
- Özugur, S., Chávez, M. N., Sanchez-Gonzalez, R., Kunz, L., Nickelsen, J., & Straka, H. (2021). Green oxygen power plants in the brain rescue neuronal activity. *Iscience*, 24(10).
- Palu, A., Su, C., Zhou, B.-N., West, B., & Jensen, C. J. (2010). Wound Healing Effects of Noni (*Morinda citrifolia* L.) Leaves: A Mechanism Involving its PDGF/A2A Receptor Ligand Binding and Promotion of Wound Closure. *Phytotherapy research : PTR*, 24, 1437-1441. <https://doi.org/10.1002/ptr.3150>
- Parente, L. M., Lino Júnior Rde, S., Tresvenzol, L. M., Vinaud, M. C., de Paula, J. R., & Paulo, N. M. (2012). Wound Healing and Anti-Inflammatory Effect in Animal Models of *Calendula officinalis* L. Growing in Brazil. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 375671. <https://doi.org/10.1155/2012/375671>
- Parvin, M. S., Das, N., Jahan, N., Akhter, M. A., Nahar, L., & Islam, M. E. (2015). Evaluation of in vitro anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark. *BMC research notes*, 8, 1-7.
- Pastar, I., Liang, L., Sawaya, A. P., Wikramanayake, T. C., Glinos, G. D., Drakulich, S., Chen, V., Stojadinovic, O., Davis, S. C., & Tomic-Canic, M. (2018). 10 - Preclinical models for wound-healing studies. In A. P. Marques, R. P. Pirraco, M. T. Cerqueira, & R. L. Reis (Eds.), *Skin Tissue Models* (pp. 223-253). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810545-0.00010-3>
- Peng, W., Li, D., Dai, K., Wang, Y., Song, P., Li, H., Tang, P., Zhang, Z., Li, Z., Zhou, Y., & Zhou, C. (2022). Recent progress of collagen, chitosan, alginate and other hydrogels in skin repair and wound dressing applications. *International journal of biological macromolecules*, 208, 400-408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.002>
- Percival, N. J. (2002). Classification of wounds and their management. *Surgery (Oxford)*, 20(5), 114-117.
- Pereira, R., Mendes, A., & Bártolo, P. (2013). Alginate/Aloe vera hydrogel films for biomedical applications. *Procedia CIRP*, 5, 210-215.
- Pereira, R. F., & Bártolo, P. J. (2016). Traditional Therapies for Skin Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 5(5), 208-229. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0506>
- Plott, R. (2022). *Moisturizer vs Lotion: What's the Difference & Which Should You Use?*
- Pollock, P. J., & Schumacher, J. (2012). Chapter 23 - Principles of wound management. In T. S. Mair, S. Love, J. Schumacher, R. K. W. Smith, & G. Frazer (Eds.), *Equine Medicine, Surgery and Reproduction (Second Edition)* (pp. 469-487). W.B. Saunders. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2801-4.00023-7>

- Pool, J. (1977). Normal hemostatic mechanisms: a review. *The American journal of medical technology*, 43(8), 776-780.
- Preethi, K. C., Kuttan, G., & Kuttan, R. (2009). Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. *Indian J Exp Biol*, 47(2), 113-120.
- Preethi, K. C., & Kuttan, R. (2009). Wound healing activity of flower extract of *Calendula officinalis*. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 20(1), 73-79. <https://doi.org/10.1515/jbcpp.2009.20.1.73>
- Prelipcean, A. M., Iosageanu, A., Gaspar-Pintiliescu, A., Moldovan, L., Craciunescu, O., Negreanu-Pirjol, T., Negreanu-Pirjol, B., Mitran, R. A., Marin, M., & D'Amora, U. (2022). Marine and Agro-Industrial By-Products Valorization Intended for Topical Formulations in Wound Healing Applications. *Materials (Basel)*, 15(10). <https://doi.org/10.3390/ma15103507>
- Prete, S., Dattilo, M., Patitucci, F., Pezzi, G., Parisi, O. I., & Puoci, F. (2023). Natural and Synthetic Polymeric Biomaterials for Application in Wound Management. *J Funct Biomater*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/jfb14090455>
- Priyadarshi, A., Keshri, G. K., & Gupta, A. (2022). Hippophae rhamnoides L. leaf extract diminishes oxidative stress, inflammation and ameliorates bioenergetic activation in full-thickness burn wound healing. *Phytomedicine Plus*, 2(3), 100292. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100292>
- Qiao, Y., Yang, F., Xie, T., Du, Z., Zhong, D., Qi, Y., Li, Y., Li, W., Lu, Z., & Rao, J. (2020). Engineered algae: A novel oxygen-generating system for effective treatment of hypoxic cancer. *Science advances*, 6(21), eaba5996.
- Queen, D., & Harding, K. (2023). What's the true costs of wounds faced by different healthcare systems around the world? *Int Wound J*, 20(10), 3935-3938. <https://doi.org/10.1111/iwj.14491>
- Ramasastri, S. S. (2005). Acute wounds. *Clin Plast Surg*, 32(2), 195-208. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2004.12.001>
- Ramos-e-Silva, M., & Ribeiro de Castro, M. C. (2002). New dressings, including tissue-engineered living skin. *Clin Dermatol*, 20(6), 715-723. [https://doi.org/10.1016/s0738-081x\(02\)00298-5](https://doi.org/10.1016/s0738-081x(02)00298-5)
- Raskin, I., & Ripoll, C. (2004). Can an apple a day keep the doctor away? *Curr Pharm Des*, 10(27), 3419-3429. <https://doi.org/10.2174/1381612043383070>
- Reddy, M. S. B., Ponnamma, D., Choudhary, R., & Sadasivuni, K. K. (2021). A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds. *Polymers*, 13(7), 1105.
- Rezvani, E., Khalili, S., Nouri Khorasani, S., Esmaeely Neisiany, R., & Ramakrishna, S. (2019). Wound dressings: Current advances and future directions. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(27), 47738.
- Rezvani Ghomi, E., Khalili, S., Nouri Khorasani, S., Esmaeely Neisiany, R., & Ramakrishna, S. (2019). Wound dressings: Current advances and future directions. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(27), 47738. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/app.47738>
- Robbins, E. R., Pins, G. D., Laflamme, M. A., & Gaudette, G. R. (2020). Creation of a contractile biomaterial from a decellularized spinach leaf without ECM protein coating: An in vitro study. *Journal of biomedical materials research Part A*, 108(10), 2123-2132.

- Robinson, M. M., & Zhang, X. (2011). Traditional medicines: global situation, issues and challenges. *The world medicines situation*, 3.
- Robson, M. (2001). Wound healing; biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Problems Surg*, 38, 61-140.
- Rudolph, R., Arganese, T., & Woodward, M. (1982). The ultrastructure and etiology of chronic radiotherapy damage in human skin. *Annals of plastic surgery*, 9(4), 282-292.
- Ruíz, N. (2023). CSS utilizará 18 millones de dólares para insumos para Clínicas de Heridas. *Telemetro*.
- Rumbaut, R. E. (2010). Platelet-vessel wall interactions in hemostasis and thrombosis.
- Ruszczak, Z. (2003). Effect of collagen matrices on dermal wound healing. *Advanced drug delivery reviews*, 55(12), 1595-1611.
- Ruzin, S. E. (1999). *Plant microtechnique and microscopy* (Vol. 198). Oxford University Press New York.
- Saeed, S., & Martins-Green, M. (2024). Assessing Animal Models to Study Impaired and Chronic Wounds. *Int J Mol Sci*, 25(7). <https://doi.org/10.3390/ijms25073837>
- Saeed, S., & Martins-Green, M. (2022). Animal Models for the Study of Acute Cutaneous Wound Healing. *Wound Repair and Regeneration*, 31. <https://doi.org/10.1111/wrr.13051>
- Saghazadeh, S., Rinoldi, C., Schot, M., Kashaf, S. S., Sharifi, F., Jalilian, E., Nuutila, K., Giatsidis, G., Mostafalu, P., Derakhshandeh, H., Yue, K., Swieszkowski, W., Memic, A., Tamayol, A., & Khademhosseini, A. (2018). Drug delivery systems and materials for wound healing applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 127, 138-166. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.008>
- Sahni, T., Hukku, S., Jain, M., Prasad, A., Prasad, R., & Singh, K. (2004). Recent advances in hyperbaric oxygen therapy. *Med Update*, 14, 632-639.
- Said, M. N., Al Ateeq Al Dosari, M., Al Subaii, N., Kawas, A., Al Mas, A., Al Ser, Y., Abuodeh, Y., Shakil, M., Habash, A., & Mukhter, K. (2015). Open Achilles tendon lacerations. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*, 25, 591-593.
- Salehi, A., Mobarhan, M. A., Mohammadi, J., Shahsavarani, H., Shokrgozar, M. A., & Alipour, A. (2020). Efficient mineralization and osteogenic gene overexpression of mesenchymal stem cells on decellularized spinach leaf scaffold. *Gene*, 757, 144852.
- Salehi, A., Mobarhan, M. A., Mohammadi, J., Shahsavarani, H., Shokrgozar, M. A., & Alipour, A. (2021). Cabbage-derived three-dimensional cellulose scaffold-induced osteogenic differentiation of stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 236(7), 5306-5316.
- Salmerón-Manzano, E., Garrido-Cardenas, J. A., & Manzano-Agugliaro, F. (2020). Worldwide Research Trends on Medicinal Plants. *Int J Environ Res Public Health*, 17(10). <https://doi.org/10.3390/ijerph17103376>
- Sami, D., Heiba, H., & Abdellatif, A. (2018). Wound Healing Models; A Systematic Review of Animal and Non-Animal Models. *Wound medicine*, 24, 8-17. <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2018.12.001>
- Sanchez, J. (2024). Más de 32 mil atenciones en Clínicas de Heridas. *La Prensa*.
- Santos-Buelga, C., Mateus, N., & De Freitas, V. (2014). Anthocyanins. Plant pigments and beyond. In (Vol. 62, pp. 6879-6884): ACS Publications.

- Sarabahi, S. (2012). Recent advances in topical wound care. *Indian journal of plastic surgery*, 45(02), 379-387.
- Sarian, M., Zulkefli, N., ZAIN, S., Maniam, S., & Fakurazi, S. (2023). A review with updated perspectives on in vitro and in vivo wound healing models. *Turkish Journal of Biology*, 47(4), 236-246.
- Sarkar, S., & Poundarik, A. A. (2022). Bioactive wound dressings for the management of chronic non healing ulcers (CNHU) – A review of clinical and translational studies. *Materialia*, 21, 101269. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mtla.2021.101269>
- Satish, A., K, J., Gangadhar, T., & Ramu, R. (2021). Evaluation of Wound Healing Activity of Catharanthus Roseus Aqueous Extract in Adult Albino Rats. *International Journal of pharma and Bio Sciences*, 11, 146-152. <https://doi.org/10.22376/ijpbs/lpr.2021.11.2.P146-152>
- Schenck, T. L., Hopfner, U., Chávez, M. N., Machens, H.-G., Somlai-Schweiger, I., Giunta, R. E., Bohne, A. V., Nickelsen, J., Allende, M. L., & Egaña, J. T. (2015). Photosynthetic biomaterials: a pathway towards autotrophic tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 15, 39-47.
- Schmidt, B., Ribnicky, D. M., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu, W. T., & Raskin, I. (2008). A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism*, 57(7 Suppl 1), S3-9. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.03.001>
- Schmitz, M., Eberlein, T., & Andriessen, A. (2014). Wound treatment costs comparing a bio-cellulose dressing with moist wound healing dressings and conventional dressings. *Wound medicine*, 6, 11-14.
- Schoukens, G. (2019). Bioactive dressings to promote wound healing. In *Advanced textiles for wound care* (pp. 135-167). Elsevier.
- Segal, H. C., Hunt, B. J., & Gilding, K. (1998). The effects of alginate and non-alginate wound dressings on blood coagulation and platelet activation. *Journal of Biomaterials Applications*, 12(3), 249-257.
- Segel, G. B., Halterman, M. W., & Lichtman, M. A. (2011). The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *Journal of leukocyte biology*, 89(3), 359-372.
- Sen, C. K. (2009). Wound healing essentials: let there be oxygen. *Wound Repair and Regeneration*, 17(1), 1-18.
- Sen, C. K. (2019). Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 8(2), 39-48. <https://doi.org/10.1089/wound.2019.0946>
- Sen, C. K. (2021). Human Wound and Its Burden: Updated 2020 Compendium of Estimates. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 10(5), 281-292. <https://doi.org/10.1089/wound.2021.0026>
- Sen, C. K., Gordillo, G. M., Roy, S., Kirsner, R., Lambert, L., Hunt, T. K., Gottrup, F., Gurtner, G. C., & Longaker, M. T. (2009). Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair and Regeneration*, 17(6), 763-771.
- Sepulveda, E., Kildsig, D. O., & Ghaly, E. S. (2003). Relationship between internal phase volume and emulsion stability: the cetyl alcohol/stearyl alcohol system. *Pharm Dev Technol*, 8(3), 263-275. <https://doi.org/10.1081/pdt-120022155>

- Shi, C., Wang, C., Liu, H., Li, Q., Li, R., Zhang, Y., Liu, Y., Shao, Y., & Wang, J. (2020). Selection of Appropriate Wound Dressing for Various Wounds. *Front Bioeng Biotechnol*, 8, 182. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00182>
- Shi, Q., Li, L., Huo, C., Zhang, M., & Wang, Y. (2010). Study on natural medicinal chemistry and new drug development. *Zhongcaoyao= Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 41(10), 1583-1589.
- Shrivastav, A., Mishra, A. K., Ali, S. S., Ahmad, A., Abuzinadah, M. F., & Khan, N. A. (2018). In vivo models for assesment of wound healing potential: A systematic review. *Wound medicine*, 20, 43-53.
- Singer, A. J., & Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*, 341(10), 738-746. <https://doi.org/10.1056/nejm199909023411006>
- Singh, B., & Sharma, V. (2021). Designing moringa gum-sterculia gum-polyacrylamide hydrogel wound dressings for drug delivery applications. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100062.
- Singh, T. R. R., Laverty, G., & Donnelly, R. (2018). *Hydrogels: design, synthesis and application in drug delivery and regenerative medicine*. CRC Press.
- Sodeman, W. A., & Sodeman, T. C. (2005). Pressure Sores: Patient and Caregiver's Guide. In W. A. Sodeman & T. C. Sodeman (Eds.), *Instructions for Geriatric Patients (Third Edition)* (pp. 381-382). W.B. Saunders. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-141600203-1.50160-8>
- Sonar, S. P., Kumar, N. A., Ali, N., Moharana, A., & Deepak, T. (2021). A Comprehensive review on wound dressing usage in clinical settings. *Int J Surg Med*, 8, 16-26.
- Sood, A., Granick, M. S., & Tomaselli, N. L. (2014). Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 3(8), 511-529. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0401>
- Sorg, H., Tilkorn, D. J., Hager, S., Hauser, J., & Mirastschijski, U. (2017). Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. *European surgical research*, 58(1-2), 81-94.
- Spangler, L. L. (2007). Chapter 20 - Nonprogressive Spinal Cord Disorders. In M. H. Cameron & L. G. Monroe (Eds.), *Physical Rehabilitation* (pp. 538-579). W.B. Saunders. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-072160361-2.50023-5>
- Stadelmann, W. K., Digenis, A. G., & Tobin, G. R. (1998). Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *The American journal of surgery*, 176(2), 26S-38S.
- Stamm, A., Reimers, K., Strauß, S., Vogt, P., Scheper, T., & Pepelanova, I. (2016a). In vitro wound healing assays – state of the art. *BioNanoMaterials*, 17(1-2), 79-87. <https://doi.org/doi:10.1515/bnm-2016-0002>
- Stamm, A., Reimers, K., Strauß, S., Vogt, P., Scheper, T., & Pepelanova, I. (2016b). In vitro wound healing assays–state of the art. *BioNanoMaterials*, 17(1-2), 79-87.
- Stan, D., Tanase, C., Avram, M., Apetrei, R., Mincu, N. B., Mateescu, A. L., & Stan, D. (2021). Wound healing applications of creams and "smart" hydrogels. *Exp Dermatol*, 30(9), 1218-1232. <https://doi.org/10.1111/exd.14396>
- Stewart, J. A., McGrane, O. L., & Wedmore, I. S. (2014). Wound care in the wilderness: is there evidence for honey? *Wilderness & environmental medicine*, 25(1), 103-110.

- Suhatri, S., Fidiyani, D., Azzahra, N., & Suardi, M. (2022). Effectiveness of Mango Leaf Extract (*Mangifera indica* L) on Healing of Second Level Cut Wound in Male White Mice (*Mus musculus*). *JURNAL KESEHATAN TERAPAN*, 9(2), 7-12.
- Sung, K.-Y., & Lee, S.-Y. (2016). Nonoperative Management of Extravasation Injuries Associated With Neonatal Parenteral Nutrition Using Multiple Punctures and a Hydrocolloid Dressing. *Wounds: a Compendium of Clinical Research and Practice*, 28(5), 145-151.
- Sushanth, K. A., Lakshmi, K. C., & Reddy, D. S. (2016). Evaluation of wound healing activity with a new formulation of dry *Mangifera indica* and honey using swiss albino mice. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 139-142.
- Tan, J., Luo, Y., Guo, Y., Zhou, Y., Liao, X., Li, D., Lai, X., & Liu, Y. (2023). Development of alginate-based hydrogels: Crosslinking strategies and biomedical applications. *International journal of biological macromolecules*, 239, 124275. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124275>
- Tarameshloo, M., Norouzian, M., Zarein-Dolab, S., Dadpay, M., Mohsenifar, J., & Gazor, R. (2012). Aloe vera gel and thyroid hormone cream may improve wound healing in Wistar rats. *Anat Cell Biol*, 45(3), 170-177. <https://doi.org/10.5115/acb.2012.45.3.170>
- Tashkandi, H. (2021). Honey in wound healing: An updated review. *Open Life Sci*, 16(1), 1091-1100. <https://doi.org/10.1515/biol-2021-0084>
- Tatarusanu, S.-M., Lupascu, F.-G., Profire, B.-S., Szilagy, A., Gardikiotis, I., Iacob, A.-T., Caluian, I., Herciu, L., Giscă, T.-C., Baican, M.-C., Crivoi, F., & Profire, L. (2023). Modern Approaches in Wounds Management. *Polymers*, 15(17), 3648. <https://www.mdpi.com/2073-4360/15/17/3648>
- Tavakoli, J., & Tang, Y. (2017). Honey/PVA hybrid wound dressings with controlled release of antibiotics: Structural, physico-mechanical and in-vitro biomedical studies. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 77, 318-325. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.272>
- Tello, N. (2024). Más de 35 mil pacientes con lesiones fueron atendidos en las Clínicas de Heridas en 2023. *Noticias Caja de Seguro Social*.
- Thirupathi, K., Raorane, C. J., Ramkumar, V., Ulagesan, S., Santhamoorthy, M., Raj, V., Krishnakumar, G. S., Phan, T. T. V., & Kim, S.-C. (2022). Update on chitosan-based hydrogels: Preparation, characterization, and its antimicrobial and antibiofilm applications. *Gels*, 9(1), 35.
- Thomas, S. (2008). Hydrocolloid dressings in the management of acute wounds: a review of the literature. *International wound journal*, 5(5), 602-613. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2008.00541.x>
- Thulabandu, V., Chen, D., & Atit, R. P. (2018). Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 7(2). <https://doi.org/10.1002/wdev.307>
- Toker, M., Rostami, S., Kesici, M., Gul, O., Kocaturk, O., Odabas, S., & Garipcan, B. (2020). Decellularization and characterization of leek: a potential cellulose-based biomaterial. *Cellulose*, 27, 7331-7348.
- Tonks, A. J., Cooper, R., Jones, K., Blair, S., Parton, J., & Tonks, A. (2003). Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine*, 21(5), 242-247.
- Troy, E., Tilbury, M. A., Power, A. M., & Wall, J. G. (2021). Nature-based biomaterials and their application in biomedicine. *Polymers*, 13(19), 3321.

- Ud-Din, S., & Bayat, A. (2017). Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: in silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. *Wound Repair and Regeneration*, 25(2), 164-176.
- Upadhyay, N. K., Kumar, R., Siddiqui, M. S., & Gupta, A. (2011). Mechanism of Wound-Healing Activity of Hippophae rhamnoides L. Leaf Extract in Experimental Burns. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 659705. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep189>
- Van den Berg, A., Van den Worm, E., Quarles van Ufford, H., Halkes, S., Hoekstra, M., & Beukelman, C. (2008). An in vitro examination of the antioxidant and anti-inflammatory properties of buckwheat honey. *Journal of Wound Care*, 17(4), 172-178.
- Vanwijck, R. (2001). Surgical biology of wound healing. *Bulletin et memoires de l'Academie royale de medecine de Belgique*, 156(3-4), 175-184; discussion 185.
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2021). Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. *Microorganisms*, 9(10), 2041.
- Varani, J. (2012). Human skin organ culture for assessment of chemically induced skin damage. *Expert review of dermatology*, 7(3), 295-303.
- Varkey, B. (2021). Principles of clinical ethics and their application to practice. *Medical Principles and Practice*, 30(1), 17-28.
- Vasqu ez, J. (2013). Hospital reduce ingreso de pacientes por quemaduras. *Panamá América*.
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*, 37(5), 1528-1542. <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>
- Veloso-Giménez, V., Escamilla, R., Necu nir, D., Corrales-Orovio, R., Riveros, S., Marino, C., Ehrenfeld, C., Guzmán, C. D., Boric, M. P., & Rebolledo, R. (2021). Development of a novel perfusable solution for ex vivo preservation: towards photosynthetic oxygenation for organ transplantation. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 796157.
- Vestweber, D. (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nature Reviews Immunology*, 15(11), 692-704.
- Vitale, S., Colanero, S., Placidi, M., Di Emidio, G., Tatone, C., Amicarelli, F., & D'Alessandro, A. M. (2022). Phytochemistry and Biological Activity of Medicinal Plants in Wound Healing: An Overview of Current Research. *Molecules*, 27(11). <https://doi.org/10.3390/molecules27113566>
- Vittalrao, A. M., SE, P. K., & Prabhath, S. (2020). Evaluation of Wound Healing Activity of an Ethanolic Extract of Anacardium occidentale Leaves in Wistar Rats. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 13(4), 2061-2068.
- Vora, R., Bodiwala, N., & Patel, S. (2012). Prevalence of various dermatoses in school children of Anand district. *National Journal of Community Medicine*, 3(01), 100-103.
- Vowden, K., & Vowden, P. (2014). Wound dressings: principles and practice. *Surgery (Oxford)*, 32(9), 462-467. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2014.07.001>
- Vowden, K., & Vowden, P. (2017). Wound dressings: principles and practice. *Surgery (Oxford)*, 35(9), 489-494. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.06.005>
- Wang, H., Liu, H., Guo, Y., Zai, W., Li, X., Xiong, W., Zhao, X., Yao, Y., Hu, Y., & Zou, Z. (2022). Photosynthetic microorganisms coupled photodynamic therapy for enhanced antitumor immune effect. *Bioactive Materials*, 12, 97-106.

- Wang, J., Su, Q., Lv, Q., Cai, B., Xiaohalati, X., Wang, G., Wang, Z., & Wang, L. (2021). Oxygen-generating cyanobacteria powered by upconversion-nanoparticles-converted near-infrared light for ischemic stroke treatment. *Nano Letters*, *21*(11), 4654-4665.
- Wang, Y., Dominko, T., & Weathers, P. J. (2020). Using decellularized grafted leaves as tissue engineering scaffolds for mammalian cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *56*, 765-774.
- Weller, C., & Sussman, G. (2006). Wound dressings update. *Journal of pharmacy practice and research*, *36*(4), 318-324.
- Weller, K., Foitzik, K., Paus, R., Syska, W., Maurer, M., Weller, K., Foitzik, K., Paus, R., Syska, W., & Maurer, M. (2006). Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *The FASEB journal*, *20*(13), 2366-2368.
- WHO, W. H. O. (2002). WHO traditional medicine strategy, 2002-2005 World Health Organization. *Geneva, Switzerland*, 70.
- WHO, W. H. O. (2012). The regional strategy for traditional medicine in the Western Pacific (2011-2020).
- WHO, W. H. O. (2016). *WHO Global report on diabetes*. World Health Organization.
- Wigger-Alberti, W., Stauss-Grabo, M., Grigo, K., Atiye, S., Williams, R., & Korting, H. C. (2012). Efficacy of a Tyrothricin-Containing Wound Gel in an Abrasive Wound Model for Superficial Wounds. *Skin Pharmacology and Physiology*, *26*(1), 52-56. <https://doi.org/10.1159/000343907>
- Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol*, *10*(9), 200223. <https://doi.org/10.1098/rsob.200223>
- Wiłkomirski, B. (1985). Pentacyclic triterpene triols from calendula officinalis flowers. *Phytochemistry*, *24*(12), 3066-3067. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422\(85\)80062-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422(85)80062-5)
- Wojciechowski, Z., Bocheńska-Hryniewicz, M., Kucharczak, B., & Kasprzyk, Z. (1972). Sterol and triterpene alcohol esters from Calendula officinalis. *Phytochemistry*, *11*(3), 1165-1168. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88473-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88473-3)
- Wu, N., & Li, L. (2024). A review on wound management strategies in enhanced recovery after craniotomy: An in-depth analysis of their influence on patient recovery and surgical outcomes. *International wound journal*, *21*(1), e14595. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/iwj.14595>
- Xue, C., Friedman, A., & Sen, C. K. (2009). A mathematical model of ischemic cutaneous wounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(39), 16782-16787.
- Xue, M., & Jackson, C. J. (2013). Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Advances in Wound Care*, *4*(3), 119-136. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0485>
- Yaghoobi, R., Kazerouni, A., & Kazerouni, O. (2013). Evidence for Clinical Use of Honey in Wound Healing as an Anti-bacterial, Anti-inflammatory Anti-oxidant and Anti-viral Agent: A Review. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, *8*(3), 100-104. <https://doi.org/10.17795/jjnpp-9487>
- Yamaoka, I., Kikuchi, T., Arata, T., & Kobayashi, E. (2012). Organ preservation using a photosynthetic solution. *Transplantation Research*, *1*, 1-7.

- Yang, D., Chen, H., Wei, H., Liu, A., Wei, D.-X., & Chen, J. (2024). Hydrogel wound dressings containing bioactive compounds originated from traditional Chinese herbs: A review. *Smart Materials in Medicine*, 5(1), 153-165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smaim.2023.10.004>
- Yasin, S. N. N., Said, Z., Halib, N., Rahman, Z. A., & Mokhzani, N. I. (2023). Polymer-Based Hydrogel Loaded with Honey in Drug Delivery System for Wound Healing Applications. *Polymers (Basel)*, 15(14). <https://doi.org/10.3390/polym15143085>
- Yazdanpanah, G., Shah, R., Somala, S. R. R., Anwar, K. N., Shen, X., An, S., Omid, M., Rosenblatt, M. I., Shokuhfar, T., & Djalilian, A. R. (2021). In-situ porcine corneal matrix hydrogel as ocular surface bandage. *The ocular surface*, 21, 27-36.
- Yilmaz, A. C., & Aygin, D. (2020). Honey dressing in wound treatment: a systematic review. *Complementary therapies in medicine*, 51, 102388.
- Zeleníková, R., & Vyhlídalová, D. (2019). Applying honey dressings to non-healing wounds in elderly persons receiving home care. *Journal of tissue viability*, 28(3), 139-143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtv.2019.04.002>
- Zhang, P., Lu, J., Jing, Y., Tang, S., Zhu, D., & Bi, Y. (2017). Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis (†). *Ann Med*, 49(2), 106-116. <https://doi.org/10.1080/07853890.2016.1231932>
- Zhang, X., Kang, X., Jin, L., Bai, J., Liu, W., & Wang, Z. (2018). Stimulation of wound healing using bioinspired hydrogels with basic fibroblast growth factor (bFGF). *Int J Nanomedicine*, 13, 3897-3906. <https://doi.org/10.2147/ijn.S168998>
- Zhao, R., Liang, H., Clarke, E., Jackson, C., & Xue, M. (2016). Inflammation in Chronic Wounds. *Int J Mol Sci*, 17(12). <https://doi.org/10.3390/ijms17122085>
- Zheng, K., Gu, Q., Zhou, D., Zhou, M., & Zhang, L. (2022). Recent progress in surgical adhesives for biomedical applications. *Smart Materials in Medicine*, 3, 41-65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smaim.2021.11.004>
- Zhu, T., Park, H. C., Son, K. M., Kwon, J. H., Park, J.-C., & Yang, H.-C. (2014). Effects of thymosin  $\beta$ 4 on wound healing of rat palatal mucosa. *Int J Mol Med*, 34(3), 816-821. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1832>
- Zhu, Y., Zhang, Q., Wang, S., Zhang, J., Fan, S., & Lin, X. (2021). Current Advances in the Development of Decellularized Plant Extracellular Matrix. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 712262. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.712262>