



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 229 376**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/05** (2006.01)

**A61K 31/135** (2006.01)

**A61K 31/565** (2006.01)

**A61K 31/58** (2006.01)

**A61P 17/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **97932922 .4**

96 Fecha de presentación : **22.07.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **0930876**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.07.1999**

54

Título: **Uso de compuestos que promueven la actividad estrogénica para acelerar la cicatrización de las heridas de la piel.**

30

Prioridad: **22.07.1996 GB 9615348**  
**27.01.1997 GB 9701600**

45

Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.04.2005**

45

Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **25.10.2010**

45

Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **25.10.2010**

73

Titular/es: **Renovo Limited**  
**Manchester Incubator Building**  
**48 Grafton Street**  
**Manchester M13 9XX, GB**

72

Inventor/es: **Ferguson, Mark, William, James y**  
**Ashcroft, Gillian, Sarah**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 229 376 T5

## DESCRIPCIÓN

Uso de compuestos que promueven la actividad estrogénica para acelerar la cicatrización de las heridas de la piel.

5 La presente invención se refiere al uso de compuestos que favorecen la actividad estrogénica para acelerar la cicatrización de heridas.

10 La cicatrización de heridas en adultos es un proceso reparativo complicado. El proceso de cicatrización se inicia con el reclutamiento de una variedad de células especializadas en el sitio de la herida e implica la matriz extracelular y la deposición de la membrana de base, angiogénesis, actividad de la proteasa selectiva y re-epitelización. Un componente importante del proceso de cicatrización en mamíferos adultos es la estimulación de los fibroblastos para generar la matriz extracelular. Esta matriz extracelular constituye un componente principal del tejido conectivo que se desarrolla para reparar el área herida.

15 El tejido conectivo que se forma durante el proceso de cicatrización es a menudo fibroso en esencia y comúnmente se forma en una cicatriz de tejido conectivo (un procedimiento conocido como fibrosis).

20 Una cicatriz es una estructura morfológica anormal que resulta de un daño o herida previa (por ejemplo una incisión, escisión o trauma). Las cicatrices están compuestas de un tejido conectivo que es de forma predominante una matriz de tipos de colágeno 1 y 3 y fibronectina. La cicatriz puede consistir en fibras de colágeno en una organización anormal (tal como se observa en la cicatrices de la piel) o puede ser una acumulación anormal de tejido conectivo (tal como se observa en las cicatrices del sistema nervioso central). La mayor parte de las cicatrices consisten en colágeno organizado de forma anormal y también en exceso de colágeno. En el hombre, las cicatrices en la piel pueden ser rebajadas por debajo de la superficie o elevadas por encima de la superficie de la piel. Las cicatrices hipertróficas son una forma más severa de la cicatrización normal, son elevadas por encima de la superficie normal de la piel y contienen el colágeno excesivo ordenado en un modelo anormal. Un queloide es otra forma de cicatrización patológica que no está elevada por encima de la superficie de la piel pero que también se extiende más allá de los límites del daño original. En un queloide hay excesivo tejido conectivo que está organizado de un modo anormal predominantemente en vueltas de tejido conectivo. Hay predisposiciones genéticas para formar tanto cicatrices hipertróficas como los queloides. Éstas son particularmente comunes en las razas Africo-caribeñas y Mongoloides.

35 Existe la necesidad de proporcionar medicamentos para favorecer la cicatrización de heridas. Por ejemplo, a menudo es deseable incrementar la velocidad de cicatrización en el caso de heridas agudas (tales como daños penetrantes, quemaduras, daños en los nervios o incluso heridas resultantes de la cirugía facultativa), heridas crónicas (tales como ulceración diabética, venosa y de decúbito) o para los individuos expuestos a heridas de forma general (por ejemplo los ancianos). En estos ejemplos, las heridas pueden influenciar de forma severa en la calidad de vida o incluso resultar en daño y por consiguiente la velocidad de cicatrización precisa a menudo ser incrementada tanto como sea posible clínicamente. Cuando se incrementa la velocidad de cicatrización, a menudo hay un incremento asociado de la formación de cicatrices pero esto puede ser de importancia secundaria en comparación con el incremento deseado de la velocidad de cicatrización.

45 El término "herida" tal como se utiliza en el presente documento es ejemplificado pero no está limitado a los daños de la piel.

Aunque las consideraciones anteriores tienen principalmente aplicación a las condiciones, trastornos o enfermedades del hombre se apreciará que la cicatrización de heridas también puede ser problemática en otros animales, particularmente veterinarios o animales domésticos (por ej. caballos, vacas, perros, gatos, etc).

50 Ha habido varios desarrollos recientes en el campo de la cicatrización de heridas. Algunos de estos desarrollos giran alrededor del reciente conocimiento de que una formación de citoquinas y de factores de crecimiento está íntimamente implicada en la reparación de tejidos.

55 El documento WO-A-92/17206 desvela el uso de agentes neutralizantes para los factores de crecimiento que favorecen la fibrosis que pueden ser utilizados para inhibir la formación de cicatrices durante la curación de heridas. Por ejemplo, el documento WO-A-92/17206 demuestra que las composiciones que inhiben de forma específica la actividad de los Factores de Crecimiento Transformantes  $\beta 1$  y  $\beta 2$  y del Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas son particularmente beneficiosas para reducir la formación de cicatrices.

60 El documento WO-A-93/19769 desvela el uso de factores de crecimiento no fibróticos, tales como los Factores de Crecimiento Transformantes  $\beta 3$ , de los que se ha encontrado de forma sorprendente que favorecen la cicatrización de una herida sin inducir fibrosis.

65 El documento GB-A-2.288.118 desvela el uso de anticuerpos específicos generados contra los factores de crecimiento que favorecen la curación porque potencian las acciones de dichos factores de crecimiento.

Otro desarrollo implica el uso de manosa-6-fosfato para uso en el tratamiento de los trastornos fibróticos asociados con la acumulación de la matriz extracelular y con los niveles elevados de Factores de Crecimiento Transformantes  $\beta 1$

o  $\beta 2$  (documento GB-A-2.265.310). Se cree que la manosa-6-fosfato interfiere con la conversión de formas latentes de estos Factores de Crecimiento Transformantes en su forma activa.

Otras composiciones que influyen en la eficacia del factor de crecimiento y que favorecen la curación de heridas están descritas en el documento WO-A-95/26203.

Además, Jaworski (Base de datos Embase Elsevier Science Publishers, Amsterdam, NL, No de acceso 279680 Roczn. Akad. Marchewskiego, 1973S desvela que el estradiol tiene un efecto en la curación de heridas de la vejiga urinaria en cobayas.

A pesar de estos avances, hay todavía una necesidad de continuar el desarrollo de medicamentos que pueden ser utilizados para modular la curación de heridas.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un compuesto que favorece la actividad estrogénica, en el que dicho compuesto es estrógeno o un agonista del receptor de estrógeno seleccionado entre etinilestradiol, dienestrol, mestranol, estradiol, estriol, estrógenos conjugados, sulfato de piperacina estrona, estilboestrol, fosfesterol tetrasódico, fosfato de poliestradial, tibolona o un fitoestrógeno, en la fabricación de un medicamento para acelerar la curación de heridas de la piel.

La invención se ha basado en nuestros estudios que han mostrado que la velocidad de curación de heridas disminuye con la edad del sujeto en términos de re-epitelialización, deposición de la matriz extracelular y de la membrana de base. También nos hemos dado cuenta que las mujeres de edad curan más rápidamente que los hombres de edad. En las mujeres esto ha sido asociado con un número incrementado de fibroblastos en la herida, con los niveles de Factor de Crecimiento Transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) y con la actividad proteolítica incrementada en comparación con los hombres de edad pero disminuido en comparación con hombres y mujeres jóvenes. También se ha señalado que en hombres jóvenes hay una pérdida de cicatrización en comparación con la observada en mujeres jóvenes que hemos asociado con las diferencias entre los niveles de TGF- $\beta 1$  observados en los dos sexos. Otra diferencia entre los sexos fue que la curación de heridas en mujeres está asociada generalmente con niveles superiores de elastina y de angiogénesis que en los hombres.

Estos descubrimientos nos han conducido al conocimiento de que los compuestos de acuerdo con la invención tienen una influencia en la velocidad y en la calidad (extensión de la formación de la cicatriz o fibrosis) de la curación de la herida y también influencia en la deposición de tejido fibroso en los trastornos fibróticos. Esta hipótesis fue examinada y confirmada por la valoración del efecto de la Terapia Hormonal Sustitutiva (THS) en la velocidad y calidad de la curación de heridas de mujeres post-menopáusicas. Las mujeres tratadas con THS sólo con estrógenos o con estrógenos y progesterona tienen velocidades de curación de heridas significativamente incrementadas (en términos de re-epitelialización y de la deposición de la matriz extracelular) en comparación con las mujeres de edades similares sin medicación. La actividad proteolítica tanto en piel normal (no dañada) como en las heridas de las mujeres post menopáusicas con THS se redujo al valor del grupo de mujeres de entre 20 y 30 años. Estos efectos también fueron asociados con una reversión de los cambios relacionados con la edad en los perfiles del factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  o de interleucina-1.

Aunque los inventores no desean estar limitados por ninguna hipótesis, creen que es posible que el mecanismo por el que los compuestos ejercen su efecto de cicatrización de heridas es por modulación de la actividad de moléculas que regulan la curación de heridas tal como las citoquinas (por ej., TGF- $\beta 1$ , Factor del Crecimiento Derivado de las Plaquetas o interleucina-1) y por consiguiente por influencia en la función celular (por ejemplo la función de los fibroblastos). Por ejemplo, nuestros estudios *in vitro* han establecido que los estrógenos incrementan la producción de TGF- $\beta$  en los fibroblastos que puede estar asociada con el efecto de los estrógenos para causar un incremento en la velocidad de curación de heridas. Otros compuestos que ejercen influencia en el sistema de hormonas sexuales también modulan la actividad de los fibroblastos. Por ejemplo la progesterona inhibe la proliferación de fibroblastos en sujetos de edad mientras que los andrógenos tienen efectos similares a los de los estrógenos.

Los inventores han encontrado que los compuestos de acuerdo con la invención también modulan los perfiles de las enzimas en una herida o tejido afectado por un trastorno fibrótico. En particular se ha encontrado que los niveles de enzima de las metaloproteinasas matriz (MMPs) (especialmente de MMP2 y MMP9) así como de otras enzimas líticas tales como las elastasas están moduladas por compuestos tales como estrógenos. Los inventores creen que esta modulación es suficiente para influir en la velocidad de curación de heridas o para modular la fibrosis (y por consiguiente influenciar en la cicatrización de los trastornos fibróticos) y es posible que estos efectos representen un mecanismo complementario, adicional o incluso alternativo (a lo discutido en el párrafo anterior) por el que los compuestos sean capaces de tratar heridas o trastornos fibróticos.

Los compuestos que son capaces de favorecer la actividad estrogénica incluyen las hormonas (o derivados biológicamente activos de las mismas) y agonistas de los receptores hormonales.

Los inventores han establecido que los compuestos que favorecen la actividad estrogénica son capaces de acelerar la velocidad de curación de las heridas, aunque esto puede ser a expensas de proporcionar una cicatrización o fibrosis incrementada. Dichos compuestos son obviamente particularmente útiles cuando la velocidad de curación de una herida es una prioridad y la calidad de cualquier cicatriz es una consideración secundaria. De este modo dichos com-

puestos serán útiles para las heridas agudas (tales como daños penetrantes, quemaduras, o incluso heridas resultantes de un cirugía electiva) y heridas crónicas (tales como ulceración en diabéticos, úlceras venosas o de decúbito). Dichas heridas pueden influenciar de forma severa la calidad de vida o incluso dar lugar a la muerte y por consiguiente la velocidad de curación puede necesitar ser incrementada tanto como sea clínicamente posible.

5 Los compuestos que son más efectivos de acuerdo con la primera realización de la invención son generalmente aquellos que favorecen la actividad estrogénica en el sitio de la herida. Es esta facilitación lo que acelera la curación de la herida.

10 Ejemplos de compuestos que pueden ser utilizados para facilitar la actividad estrogénica incluyen estrógenos, agonistas de los receptores de estrógenos (tales como etinilestradiol, dienestrol, mestranol, estradiol, estriol, estrógenos conjugados, sulfato de piperacin estrona, estilboestrol, fosfesterol tetrasódico, fosfato de poliestradial, tibolona), o fitoestrógenos.

15 El compuesto preferido para uso de acuerdo con la invención es un agonista del receptor de la hormona estrógeno. Es particularmente preferido el 17  $\beta$ -estradiol.

20 Los regímenes de tratamiento preferidos contemplados por la presente invención son tratamientos no sistémicos debido a que la aplicación sistémica de los compuestos puede tener efectos indeseables, tales como influencia en las características sexuales secundarias mientras que la administración no sistémica (por ej. la aplicación tópica a la piel) sólo tiene una acción local y por consiguiente no tiene dichos efectos indeseables. Sin embargo, hay casos (por ejemplo daño severo o cuando se requiere terapia aguda) en que son útiles las aplicaciones sistémicas.

25 Las composiciones de la invención pueden tomar un número de formas diferentes dependiendo, en particular, del modo en que se vaya a utilizar la composición. De este modo, por ejemplo, la composición puede ser en la forma de un líquido, ungüento, crema, gel, hidrogel, polvo o aerosol. Se apreciará que el vehículo de la composición de la invención sea uno que sea bien tolerado por el paciente y que permita la liberación del compuesto activo a la herida. Dicho vehículo es preferiblemente biodegradable, biorreabsorbible y/o no inflamatorio.

30 Cuando el compuesto sea un esteroide (tal como un estrógeno), el vehículo puede contener una molécula soporte que mejora la solubilidad acuosa del compuesto. Un soporte adecuado es la 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina que está presente de forma preferible en la composición en concentraciones aproximadamente equimolares a las del esteroide.

35 La composición de la invención puede ser utilizada de diferentes modos. Así, por ejemplo, una composición de acuerdo con la invención puede ser aplicada en y/o alrededor de una herida de un paciente para proporcionar la regulación deseada de la curación de la herida.

40 Si la composición va a ser aplicada directamente a una herida, trauma o daño efectivo, entonces el vehículo farmacéuticamente aceptable será uno que no provoque respuesta inflamatoria o que no sea tóxico al tejido.

45 Sin embargo, también es posible utilizar composiciones de acuerdo con la invención como un profiláctico. Por ejemplo, antes de la cirugía (particularmente de la cirugía electiva) puede ser deseable proporcionar un compuesto que inflencie el sistema de hormona sexual para la regulación de la curación de la herida quirúrgica formada subsecuentemente de modo que incremente la velocidad de curación de la herida. En este caso el vehículo de la composición precisará ser uno capaz de liberar el compuesto del sitio objetivo. Por ejemplo el vehículo puede precisarse para llevar el compuesto a través de la capa queratinosa de la piel. Ejemplos de vehículos adecuados para este objetivo incluyen el sulfóxido de dimetilo y el ácido acético.

50 La composición puede ser proporcionada en un apósito o parche estéril que puede ser utilizado para cubrir o incluso envolver una herida a tratar. En este respecto los parches de la Terapia Sustitutiva Hormonal convencional pueden ser utilizados de forma adecuada para tratar heridas y/o trastornos fibróticos.

55 Se podrá apreciar que la cantidad del compuesto a incorporar en una composición de acuerdo con la invención y/o la cantidad del compuesto a aplicar en el sitio de la herida depende de un número de factores tales como la actividad biológica y la biodisponibilidad del compuesto, que a su vez depende del modo de administración y de las propiedades fisicoquímicas del compuesto. Otros factores incluyen:

- 60 A) La vida media del compuesto en el sujeto a tratar.
- B) El estado específico a tratar.
- C) Si se desea una curación rápida o una cicatrización reducida.
- 65 D) La edad del sujeto.
- E) El sexo del sujeto.

La frecuencia de administración también estará influenciada por los factores anteriormente mencionados y particularmente la vida media del compuesto en el sujeto a tratar.

Generalmente, cuando se utilizan las composiciones para tratar heridas existentes, el compuesto debe ser administrado tan pronto como se produce la herida. La terapia con la composición debe continuar hasta que la herida haya curado hasta satisfacción de los médicos.

Las composiciones que favorecen la velocidad de curación de una herida deben ser aplicadas a una herida tan pronto como sea posible después de que la herida se haya formado. Para heridas agudas y heridas de sujetos que sean capaces de curación (por ej. el joven) la aplicación de la composición se hará de forma ideal en el momento de la herida, preferiblemente en las horas de formación de la herida y no más de unos pocos días después de la herida. Para heridas crónicas o heridas con la curación comprometida (por ej. en personas de edad) la administración debe hacerse tan pronto como sea posible.

Cuando se utilizan como un profiláctico (por ej. antes de la cirugía) las composiciones deben ser administradas tan pronto como se haya reconocido el riesgo o una posible baja velocidad de curación de la herida (como puede ser en el caso de sujetos de edad avanzada). Por ejemplo, puede aplicarse una crema o ungüento conteniendo  $17\beta$ -estradiol en un sitio de la piel del sujeto en donde se vaya a llevar a cabo la cirugía electiva y subsecuentemente se desee una velocidad incrementada de la curación de la herida. En este caso, la composición puede ser aplicada durante la preparación preoperatoria del sujeto o incluso puede ser deseable aplicar la composición en las horas o días antes de la cirugía (dependiendo del estado de salud y de la edad del sujeto así como del tamaño de la herida a formar).

La frecuencia de la administración dependerá de la vida media biológica del compuesto utilizado. De forma típica deberá administrarse una crema o ungüento conteniendo un compuesto a un tejido objetivo de modo que la concentración del compuesto en el sitio de la herida o el tejido afectado por un trastorno fibrótico se mantenga a un nivel adecuado para tener un efecto terapéutico. Esto puede requerir la administración diaria o incluso de varias veces al día. En el caso del uso de  $17\beta$ -estradiol para la curación de heridas, hemos encontrado que la administración del compuesto (por un parche aplicado a la herida) durante 24 horas después de la formación de la herida es suficiente para mejorar la velocidad a la que curan las heridas.

Pueden utilizarse procedimientos conocidos, tales como los utilizados de forma convencional por la industria farmacéutica (por ej. experimentación *in vivo*, ensayos clínicos, etc.) para establecer las formulaciones específicas de composiciones y precisar regímenes terapéuticos (tal como dosis diarias de los compuestos y la frecuencia de administración).

De forma general, las composiciones de acuerdo con la invención contendrán entre el 0,001% y el 4% en peso del compuesto que ejerce influencia sobre el sistema de hormona sexual. Puramente por vía del ejemplo una composición que contenga entre el 0,005% y el 1% en peso de estradiol o etinilestradiol es adecuada para la aplicación a una herida existente (es decir "abierta").

A modo de un ejemplo adicional, una composición que se vaya a utilizar de forma preoperatoria como una composición profiláctica puede contener entre el 0,01% y el 2% en peso de estriol, estradiol o etinilestradiol para tener el efecto deseado en la curación de la herida.

Una composición preferida para uso en la presente invención comprende un máximo del 1% (por ej. entre el 0,005% y el 1%) de  $17\beta$ -estradiol.

Una dosis diaria adecuada de un compuesto dependerá de los factores discutidos anteriormente así como del tamaño de la herida a tratar. De forma típica la cantidad del compuesto requerido para el tratamiento de heridas o trastornos fibróticos estará comprendida en el intervalo de 1 ng a 100 g del compuesto activo/ 24 horas dependiendo del tamaño de la herida o de la extensión de la fibrosis entre otros varios factores. Por vía del ejemplo, entre 0,5-500  $\mu$ g/24 horas de  $17\beta$ -estradiol es una dosis adecuada para el tratamiento de una herida (para incrementar la velocidad de curación) hecha por una biopsia de la piel con un punzón de 4 mm, más preferiblemente se utilizan entre 10-100  $\mu$ g/24 horas de  $17\beta$ -estradiol y más preferiblemente 25  $\mu$ g/24 horas de  $17\beta$ -estradiol.

Aunque las consideraciones anteriores son principalmente aplicables a las heridas de humanos será apreciado que la curación de heridas también puede ser problemática en otros animales (especialmente animales domésticos tales como caballos, perros, gatos, etc) Los compuestos, composiciones y sistemas de liberación discutidos anteriormente son adecuados para uso en la curación de dichos animales.

La presente invención será ahora descrita de forma adicional con referencia a los siguientes Ejemplos no limitativos y a los dibujos que los acompañan en los que:

La Figura 1 representa las fotografías de las secciones histológicas teñidas de heridas de ratas en el Ejemplo 1;

La Figura 2 es un gráfico que representa la velocidad de re-epitelialización en el día 7 después de la herida en los sujetos del Ejemplo 2;

La Figura 3 representa las fotografías de las secciones histológicas de las heridas teñidas con H & E para los sujetos del Ejemplo 2;

La Figura 4 representa la inmunotinción para muestras de heridas del Ejemplo 2;

La Figura 5 representa los niveles de TGF- $\beta$ 1 en el día 7 después de la herida en los sujetos del Ejemplo 2;

La Figura 6 es un gráfico que representa el efecto de los estrógenos en la proliferación de fibroblastos humanos en fibroblastos derivados de los sujetos del Ejemplo 2; y

La Figura 7 es un gráfico que representa el efecto de estrógeno y progesterona en la formación de cicatriz evaluada microscópicamente en el Ejemplo 3; y

La Figura 8 es un gráfico que representa el efecto de estrógeno y progesterona en la formación de cicatriz evaluada macroscópicamente en el Ejemplo 3.

## Ejemplo 1

Se llevaron a cabo experimentos en los que hubo el efecto de la ovariectomía (y de este modo la eliminación de estrógenos) en la curación de la herida.

### 1.1 Procedimiento

#### 1.1.1 Preparación de las ratas

Se alojaron ratas Dawley Sprague hembras juntas en tres grupos (1A, 1B y 1C) de nueve para permitir ciclos de estros sincronizados. El grupo 1A fue ovariectomizado (OVX) 18 días antes de la formación de la herida para permitir la eliminación de los niveles de hormona sexual circulantes. El Grupo 1B (control) no estuvo tratado y el Grupo 1C tuvo el mismo procedimiento operativo que el OVX (Grupo 1A), pero sin la eliminación de los ovarios, para asegurar que el procedimiento operativo OVX no tenía efecto en los estudios de formación de heridas (simulacro).

#### 1.1.2 Tratamientos

Se preparó el 17  $\beta$ -estradiol (Sigma) en forma de soluciones estériles del 0,1% y del 1% en solución salina tamponada de fosfato (PBS) conteniendo entre el 0,1% y el 1% de 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina respectivamente. Se utilizó la 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en las preparaciones como una molécula soporte para incrementar la solubilidad en agua del  $\beta$ -estradiol. Se utilizó PBS/ciclodextrina como un vehículo control.

A los animales de los Grupos 1A, 1B y 1C se les hicieron heridas incisionales de 4 x 1 cm de longitud en todo su espesor a 4,5-5,5 cm y 7,5-8,5 cm por debajo de la base del cráneo, 1 cm a cada lado de la línea central. A continuación se dio una única inyección intradérmica de 100  $\mu$ l a cada uno de los cuatro sitios de herida. Cada una de las heridas (un total de 36 heridas en 9 ratas en cada grupo) recibieron o bien 100  $\mu$ l de estradiol (0,1% o 1%) 100  $\mu$ l del vehículo control (0,1% o 1% de ciclodextrina) o se dejaron sin manipular (sin inyección).

#### 1.1.3 Ensayos en el Día 7 después de la herida

Se dejaron curar las heridas durante 7 días después de los que se separó el tejido herido para el análisis histológico.

Se tiñeron secciones de 7  $\mu$ m inmersas en parafina con H & E y Masson's Trichrome. Se determinó la velocidad de re-epitelialización (en el día 7 después de la herida), y los tamaños de las heridas tal como se determinaron por planimetría, con análisis de imagen utilizando una cámara Olympus Vanox y un sistema de toma de imagen PC. Se determinó la cantidad de colágeno en la herida por dos observadores ciegos respecto a la identidad de la muestra.

### 1.2 Resultados (7 días después de la herida)

Las heridas en el grupo de simulacro sin manipular (Grupo 1C) y en el grupo control (Grupo 1B) tuvieron re-epitelialización, fueron celulares y dejaron nuevo colágeno. Las heridas del grupo no manipulado ovariectomizado (OVX; Grupo 1A) mostraron una re-epitelialización retardada, fueron muy anchas y celulares en comparación con las heridas del grupo de simulacro/control (1B y 1C) y dejaron muy poco colágeno nuevo. Esto indicó que el OVX causa un retraso en la curación de la herida a los 7 días después de la formación de la herida (ver Tabla I).

La ciclodextrina (controles del vehículo) tuvo un efecto adverso en las heridas a la mayor dosis del 1%. En los tres grupos las heridas fueron anchas y celulares con poco colágeno nuevo. Estos efectos no fueron apreciables con ciclodextrina al 0,1%, donde las heridas fueron similares a las heridas con PBS control que tuvieron menos células y dejaron algún colágeno nuevo.

## ES 2 229 376 T5

Todas las heridas tratadas con  $\beta$ -estradiol al 1% tuvieron re-epitelialización y dejaron colágeno nuevo. Las heridas del grupo OVX fueron más estrechas que las heridas del grupo control/de simulacro, indicando que tuvieron una velocidad de curación de la herida incrementada en comparación con las heridas control tratadas con PBS y con las heridas no manipuladas. Todas ellas tuvieron mucho colágeno nuevo, muy pocas células inflamatorias y fueron muy estrechas. En las heridas tratadas con 0,1% de  $\beta$ -estradiol del OVX, una única aplicación de  $\beta$ -estradiol al 0,1% fue capaz de superar los efectos adversos del vehículo de ciclodextrina y el OVX, para mostrar una curación de la herida acelerada en comparación con las heridas control. Estos descubrimientos correlacionan con los datos de heridas en humanos que muestran una aceleración de la curación de heridas en los primeros puntos de tiempo cuando las mujeres post-menopáusicas están tomando estrógeno y progesterona HRT.

Se encontraron diferencias entre las dos dosis de  $\beta$ -estradiol mostrando mejores resultados la del 0,1% de  $\beta$ -estradiol que la del 1% de  $\beta$ -estradiol. Esto puede ser un resultado de los efectos adversos del vehículo de ciclodextrina ya que éste está presente al 1% en la solución de  $\beta$ -estradiol al 1% y al 0,1% en la solución de  $\beta$ -estradiol al 0,1%.

Estos descubrimientos indican que una dosis óptima de  $\beta$ -estradiol menor del 1% (particularmente cuando se utiliza la ciclodextrina como soporte), y utilizando un vehículo diferente, dosis diferentes y diferentes tiempos de administración pueden dar lugar a incluso a una mayor aceleración de la curación de la herida.

En las secciones de la fig. 1 se tiñeron con Mallory's Trichrome *a* = herida del día 7 en una ratona hembra intacta (1B); *b* = herida del día 7 en una ratona OVX (1A) (es de notar la re-epitelialización retardada y la deposición de colágeno reducida y un incremento significativo en la anchura de la herida); *c* = herida del día 7 a partir de una hembra intacta tratada con estrógeno en 5 mm; *d* = herida del día 7 en una ratona OVX (es de notar una curación de la herida mejorada en *c* y *d* con mayores cantidades de colágeno maduro en una herida estrecha y la completa re-epitelialización). Barra de la escala = 100  $\mu$ m.

TABLA 1

TRATAMIENTO	GRUPO	EPITELIALIZACIÓN	ANCHO DE LA HERIDA	NUEVO COLÁGENO	CÉLULAS
SIN MANIPULAR	OVX	retrasado	muy ancha	+	+++
	simulado	Y	promedio	++	++
Ciclodextrina al 1 % (vehículo)	OVX	retrasado	ancha	++	+++
	simulado	Y	ancha	+	+++
Ciclodextrina al 0,1 % (vehículo)	OVX	Y	promedio	++	+
	simulado	Y	promedio	++	++
Estradiol al 1 % (con 1 % del vehículo ciclodextrina)	OVX	Y	estrecha	+++	++
	simulado	Y	ancha	++	++
Estradiol al 0,1 % (con 0,1 % del vehículo ciclodextrina)	OVX	Y	estrecha	++++	+
	simulado	Y	estrecha	+++	++

(Y = epitelizada, + = pequeño/poco, ++++ = muchas)

### Ejemplo 2

Se examinó el efecto de la terapia de reemplazo hormonal (es decir, el suplemento con estrógenos) en la curación de heridas en mujeres post-menopáusicas para demostrar cómo, los compuestos que favorecen la actividad estrogénica, son capaces de modular la curación de heridas.

## 2.1 Procedimientos

### 2.1.1 Pacientes

5 La aprobación para este estudio la dio el Comité Ético local. Se dividieron en dos grupos veinte mujeres posmenopáusicas en una situación definida como sanas, de edades comprendidas entre 55 y 65 años:

10 (i) GRUPO 2A comprendió diez sujetos que no estaban tomando medicación excepto la Terapia de Reemplazo Hormonal (HRT) (edad promedio de 55,9 años, SD (desviación estándar) 2,92; parche de estrógenos y combinación de progesterona oral durante más de 3 meses)

(ii) GRUPO 2B comprendió diez sujetos que no estaban tomando medicación, y que nunca habían tomado HRT (edad del grupo: edad promedio de 59,5 años, SD 4,28).

15 Además, se formó para el estudio un tercer grupo de diez mujeres en un estado definido como sano, con edades comprendidas entre 20-39 años (GRUPO 2C: edad promedio 29,8 años, SD 5,03) que no estaban tomando medicación (incluyendo la píldora contraceptiva oral).

20 Todos los sujetos tuvieron historias médicas y exámenes, CXR, ECG, hematológicos, lípidos y perfiles bioquímicos normales. Los sujetos fueron todos ellos no fumadores, con historias dietéticas e índices de masas corporales normales.

### 2.1.2 Biopsias

25 Después del consentimiento informado, se hicieron a los sujetos de cada uno de los Grupos 2A, 2B y 2C dos biopsias por punción de 4 mm en la parte superior interna del brazo (en un sitio no expuesto al aire) siguiendo con una infiltración local con 1 ml de lignocaina al 1%. Cada biopsia de piel normal fue biseccionada y una mitad fue inmersa en un compuesto de Temperatura de Corte Óptima (Miles Inc. Elkhart, IN), congelada sobre nitrógeno líquido, y almacenada a -70°C, y una mitad congelada de forma rápida en nitrógeno líquido y almacenada a -70°C.

30 Las heridas fueron cubiertas con un apósito de gasa seco Multisorb (Smith & Nephew, UK) durante 24 horas y a continuación se dejaron al descubierto.

### 2.1.3 Nueva-biopsia

35 Cinco sujetos de los Grupos 2A, 2B y 2C fueron sometidos a una nueva escisión de las heridas en el día 7 después de la herida, y los otros cinco sujetos en el día 84 después de la herida.

40 Se limpió la parte interior superior del brazo izquierdo con alcohol isopropílico, se hicieron escisiones elípticas de las heridas después de la infiltración de lignocaina al 1% y se utilizaron dos suturas para cerrar la abertura. Cada herida se biseccionó y se procesó tal como se ha descrito anteriormente (2.1.2).

### 2.1.4 Estudio de las Biopsias

45 Se utilizaron algunas biopsias para el análisis molecular. Se llevó a cabo la micro-dissección de estas heridas para asegurar que no había contaminación de la piel normal.

#### 2.1.4.1 Inmunotinción

50 Se prepararon criosecciones de 7  $\mu$ m y se inmunotñieron utilizando una anticuerpo TGF- $\beta$ 1 en la herida.

#### 2.1.4.2. Análisis por la imagen y valoración de la cicatrización de heridas

55 Se determinó la velocidad de re-epitelialización (sólo en el día 7 después de la herida) con análisis de la imagen utilizando un Joyce Loebel Mini-magiscan. Se valoró la apariencia macroscópica de las heridas humanas curadas teñidas con Trichrome de Masson utilizando el siguiente sistema:

a) *Color* - (comparado con el de la piel del contorno) 1 = Perfecto; 2 = desigualdad Menor; 3 = Desigualdad Obvia; 4 = Desigualdad Grande.

60 b) *Contorno* 1 = Normal; 2 = Palpable; 3 = Hipertrófico; 4 = Queloides.

c) *Textura* 1 = la misma que la piel normal; 2 = saliente/dentada; 3 = Firme; 4 = Dura.

65 Se valoró la apariencia microscópica de las heridas curadas utilizando el siguiente sistema de puntuación:

a) *Orientación del colágeno* (valoraciones separadas de la papilaridad superior y de los niveles dérmicos reticulares de la herida): 1 = ligamento radiado normal; 2 = ligamento radiado > fibras paralelas; 3 = fibras paralelas > fibras de ligamento radiado; 4 = fibras paralelas.



b) *Densidad del bulto* (valoraciones separadas de la papilaridad superior y de la profundidad reticular de la herida): 1 = todos los bultos normales; 2 = > 50% de los bultos normales; 3 = < 50% de los bultos normales; 4 = todos los bultos anormales (densidad incrementada o disminuida).

5 c) Formación del reborde del plexo: 1 = Apariencia normal; 2 = números reducidos; 3 = ninguna.

#### 2.1.5 Experimentos con los Fibroblastos *in vitro*

10 Se extrajeron fibroblastos de las primeras muestras de biopsia de los Grupos 2A, 2B y 2C y se cultivaron con el fin de medir la expresión del TGF- $\beta$  de las células.

##### 2.1.5.1 Cultivo de las Células

15 Se extirparon y mantuvieron en cultivo fibroblastos dérmicos de humanos obtenidos de muestras de biopsia con perforación de 4 mm de piel normal. Se cultivaron los fibroblastos utilizados en el estudio a 37°C en aire del 95%: 5% de CO<sub>2</sub> a una humedad relativa del 100%, en rojo de fenol libre de DMEM (Gibco), 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin, 1 mM de piruvato de sodio, 2 mM de L-glutamina, amino ácidos no esenciales y FCS al 10% purificado sobre carbón (Gibco, UK) (para eliminar los esteroides endógenos).

##### 2.1.5.2 Tratamiento de los fibroblastos

20 Se sembraron células cultivadas en el paso 3-5 durante toda la noche en placas de 24 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células por pocillo en un medio libre de suero. A la mañana siguiente se añadieron al medio, estrógeno o progesterona (solubilizados por la incorporación del soporte ciclodextrina; Sigma, Poole), durante 24 horas. Todas las muestras se valoraron por triplicado. Se eliminó el medio después de 24 horas de incubación. A continuación se añadió 1 mg/ml de aprotinina, leupeptina y pepstatina A al medio el cual se utilizó de forma inmediata en un ensayo de TGF- $\beta$  (ver a continuación). Los controles incluyeron ciclodextrina a la concentración apropiada, y el medio libre de suero solo.

##### 2.1.5.3 Valoración de la proliferación de fibroblastos

30 A continuación se incubaron las células con timidina [ $H^3$ ] en un medio libre de suero (0,5  $\mu$ Ci/pocillo) para valorar el efecto del estrógeno o la progesterona en la proliferación de fibroblastos. Después de 24 horas, se aspiró la solución de timidina y se substituyó por TCA al 10% durante 4 horas a 4°C. Se substituyó el TCA por 250  $\mu$ ls de una solución de NaOH 1 M durante 18 horas. Se midieron dos alícuotas de 100  $\mu$ l cada una a partir de cada pocillo para determinar la radioactividad en un contador de centelleo. En experimentos en paralelo, se investigó el efecto de hormonas/controles sobre la síntesis de proteínas por la adición de 20  $\mu$ g/ml de cicloheximida (para inhibir la transformación de proteínas) durante 15 minutos antes del periodo de incubación de 24 horas. Se utilizó la progesterona como un compuesto de referencia.

##### 2.1.5.4 Ensayo de TGF- $\beta$

40 Se determinaron los niveles de TGF- $\beta$  en el medio (2.1.5.2) utilizando un ensayo de inhibición del crecimiento del pulmón de visón tal como ha descrito Danielpour y col. (J. Cell. Physiol. 138 p. 79-86). De forma resumida, se mantuvieron células epiteliales de pulmón de visón (MLECs) en DMEM y en FCS al 10% a 37°C en un 10% de CO<sub>2</sub>. Se tripsinizaron las células subconfluentes, se suspendieron de nuevo en FCS al 10% se transformaron en gránulos a 500 g durante 5 min, se lavaron con 10 ml del tampón del ensayo ( DMEM, FCS al 2%, 10 mM de HEPES pH 7.4, 25 U/ml de penicilina, 25  $\mu$ g/ml de estreptomycin), se suspendieron de nuevo en el tampón del ensayo y se sembraron a una concentración de  $10^5$  células/pocillo en una placa Costar de 24 pocillos. Después de 1 hora se añadió el medio acondicionado o el medio control (con concentraciones variadas de hormonas oscilando entre 1 pM-1mM o sólo ciclodextrina). Después de 22 horas las células se pulsaron con timidina [ $H^3$ ] (0,5  $\mu$ Ci/pocillo) durante 2 horas a 37°C, y se siguió con el procedimiento descrito anteriormente para la extracción y medición de la radioactividad (2.1.5.3). Se produjo una curva estándar utilizando entre 10-100 pg/ml de TGF- $\beta$  estándar (R & D) a partir de la cual los datos de inhibición pudieron ser convertidos a pg/ml. Los resultados se presentaron como pg/ml de TGF- $\beta$ /10<sup>5</sup> células (con relación a las válvulas control para cada concentración de hormona individual).

#### 2.1.6 RT-PCR Cuantitativo

60 Se utilizó el RT-PCR cuantitativo para determinar los niveles de estado fijo de TGF- $\beta$ 1 ARNm en la herida aguda y en 10<sup>5</sup> células a partir del fibroblasto en estudios *in vitro* (2.1.5). Se aisló el ARN celular a partir de muestras utilizando el procedimiento de Chomczynski y Sacchi (Anal. Biochem. 162 p156-159 (1987)). Se valoró la pureza de la extracción utilizando la relación A<sub>260/280</sub> espectrofotométricamente, lo que en todos los casos estuvo por encima de 1,75. No se observó ninguna diferencia significativa en el contenido de ARN total/ $\mu$ g de peso del tejido húmedo entre individuos a cada punto de tiempo. Se llevó a cabo el RT-PCR cuantitativo tal como ha sido descrito por Tarnuzzer y col. (Biotechniques 20 p. 670-674 (1996)). De forma resumida la reacción de la transcriptasa reversa se llevó a cabo utilizando 8 diluciones sucesivas del patrón con 1  $\mu$ g de ARN celular auténtico. Se utilizó la  $\beta$ -actina como un control positivo. Se llevaron a cabo las reacciones del PCR en la reacción de transcripción reversa. A continuación se llevó a cabo la electroforesis en un gel de agarosa al 2% conteniendo 25 ng/ml de bromuro de etidio a 100 v durante

1 hora utilizando un tanque Electro 4 (Hybaid, Teddington, UK) y se fotografió utilizando un transiluminador de intensidad dual (Genetic Research instrumentation, Dunmow (UK) con una cámara Polaroid MP 4+ y una película en blanco y negro Polaroid 665. Las imágenes fotográficas se capturaron utilizando un sistema de Software de Imagen para PC (Foster Finley, Newcastle, UK) en un ordenador 486 Dan DX2 (Dan, UK) y una cámara CCD (Swift, UK). Se determinaron las intensidades de banda por análisis de imagen utilizando un ordenador Macintosh y un programa de software NIH. Se normalizaron los valores de intensidad de banda basados en los pesos moleculares de los productos. Se representó el log de la relación de las intensidades de banda entre cada línea frente al log del número de copia del patrón añadido por reacción. Se determinaron las cantidades de los mensajes objetivo cuando las relaciones entre el patrón y las intensidades de banda objetivo fueron iguales a 1. Los números de copia se expresaron por ARN total (para el tejido herido) o se expresaron por célula (para los estudios *in vitro*). Estos últimos se calcularon asumiendo 26 pg de ARN/célula.

### 2.1.7 Análisis estadístico

Todos los datos se presentaron como promedio  $\pm$  SD (desviación estándar). Todos los datos siguieron una distribución normal. Las diferencias entre los valores promedio se evaluaron por un ensayo t de Student independiente en los casos en que era apropiado y por un ANOVA de un factor y múltiple (análisis de varianza) complementado por un ensayo Tukey-HSD. En todas las circunstancias  $p < 0,05$  fue considerado como ser significativo.

## 2.2 Resultados

### 2.2.1 Los efectos de la edad y de los esteroides sexuales circulantes en la reparación de heridas en humanos

#### 2.2.1.1 Velocidad de curación: re-epitelialización y deposición de colágeno

Se asoció el envejecimiento intrínseco (Grupo 2B) con un retraso en la velocidad de curación de una herida en términos de re-epitelialización en el día 7 después de la herida (Fig. 2), y con una deposición de colágeno matriz reducida en los días 7 y 84. Sin embargo, el grupo HRT (2A) mostró una marcada aceleración de la velocidad de re-epitelialización en el día 7, similar a la observada en el grupo joven (2C) (Fig. 2). Además, el grupo HRT tuvo niveles marcadamente incrementados de la deposición de colágeno (que se aproximaron a los niveles observados en el grupo joven, 2C) en los días 7 y 84 en comparación con el grupo de mayor edad.

La Fig. 3 representa una secciones histológicas de heridas teñidas con H & E para  $a = 28$  años de edad (grupo 2C),  $b = 57$  años de edad (grupo 2B) y  $c = 58$  años de edad en HRT (grupo 2A). La tinción con H & E mostró la deposición de colágeno (CO) en las heridas de los grupos 2A y 2C ( $c$  y  $a$ ). En  $b$  (grupo 2B) el tejido de granulación (G) es inmaduro con ausencia de tinción para el colágeno. La re-epitelialización es completa en  $a$  (2C) y  $c$  (2A) con neoepidermis (E) cubriendo completamente la herida (las fechas indican la capa basal de la epidermis). En  $b$  la flecha señala a la neo-epidermis migrante que está presente sólo en el eje de la herida, C = bulto. Barra de escala = 100  $\mu$ m.

#### 2.2.1.2 Calidad de la curación: grado de cicatrización microscópico y macroscópico

La apariencia macroscópica del tejido de la cicatriz madura fue significativamente superior en los sujetos de edad (Grupos 2A y 2B) en términos de color, textura y contorno, en contraste con la cicatrización hipertrófica en los sujetos jóvenes (2C) (puntuaciones con  $n = 5$  para cada grupo: jóvenes (2C) promedio = 10 SD = 1; de edad (2B) promedio = 4 SD = 2; HRT (2A) promedio = 10 SD = 2;  $p < 0,001$ ). Las cicatrices del grupo de edad (2B) fueron consistentemente pálidas y planas en comparación con las lesiones hacia dentro, pigmentadas en el grupo joven (2C). El incremento de edad también fue un factor significativo en determinar la calidad de la reparación microscópica, con restauración de la arquitectura dérmica en las heridas del grupo de edad (puntuaciones para los jóvenes (2C) promedio = 13 SD = 2; de edad (2B) promedio = 9 SD = 2; HRT (2A) promedio = 13 SD = 2;  $p < 0,01$ ). De forma notable, en las heridas de los sujetos de edad los rebordes de los plexos se habían regenerado, se observaron vasos sanguíneos de mayor papilaridad y la organización del ligamento radiado del colágeno se pareció a de la dermis normal. En las heridas del joven (2C), la unión dermo-epidérmica fue plana, y se encontraron capas paralelas de colágeno agrupadas densamente a lo largo de toda la herida. Se asoció HRT (2A) con perfiles de cicatrices adversas similares tanto de forma microscópica como macroscópica a éstas hembras jóvenes. De forma microscópica la unión dermo-epidérmica fue plana y la dermis consistió en capas paralelas de colágeno del tejido de la cicatriz y fibroblastos. De forma macroscópica, las heridas estuvieron de forma invariable subidas y pigmentadas.

#### 2.2.1.3. Inmunotinción del TGF- $\beta$ 1 y niveles de ARNm

Los niveles de TGF- $\beta$ 1 disminuyeron de forma marcada y consistente en el grupo de edad (2B) en el día 7 después de la herida en comparación tanto con el grupo joven (2C) como con el grupo HRT (2A) tal como se ilustra en la Fig 4 en la que la tinción para el TGF- $\beta$ 1 se muestra para  $a = 22$  años de edad (grupo 2C),  $b = 60$  años de edad (grupo 2B) y  $c = 61$  años de edad en HRT (grupo 2A).

Los datos de RT-PCR cuantitativos indican que el envejecimiento intrínseco en hembras del grupo 2B estuvo asociado con niveles bajos de ARNm de estado fijo para TGF- $\beta$ 1 con un promedio de 87 copias/pg de ARN total (SD de 6) en el día 7 después de la herida y un promedio de 116 copias/pg de ARN total (SD de 9) en el día 84, mientras que para el grupo joven (2C) el número de copia promedio/pg de ARN total fue de 5656 (SD de 74) en el día 7,

disminuyendo hasta 140 copias/pg (SD de 9) en el día 84. Para el grupo HRT (2A) los niveles promedio fueron de 6216 copias/pg (SD de 97) en el día 7, disminuyendo hasta 140 copias/pg de ARN total (SD de 9) en el día 84.

Las diferencias entre los niveles de ARNm en el día 7 entre los diferentes grupos se ilustran en la Fig 5. En la Fig. 5 se muestran el ARNm de  $a = 22$  años de edad (grupo 2C),  $b = 60$  años de edad (grupo 2B) y  $c = 61$  años de edad en HRT (grupo 2A). Las diferencias en ARNm entre el grupo de edad (2B) y el joven (2C) o el grupo HRT (2A) fue altamente significativo ( $p = 0,0006$ ). De este modo, el HRT revierte la disminución relacionada con la edad de los niveles de estado fijo de ARNm del TGF- $\beta 1$  local observada durante la pronta curación de la herida. Esto sugiere que los compuestos que influyen el sistema de hormona sexual pueden hacerlo por un mecanismo que implica la modulación de la expresión del TGF- $\beta$ .

#### 2.2.1.4 El efecto del HRT en los números de macrófagos

La inmunotinción para un marcador monocito/macrófago reveló que el HRT (2A) estuvo asociado con un incremento en los números de macrófagos en las heridas del día 7 con un promedio de 39 células/área de campo (SD de 6). Esto fue similar en grado a los números de macrófagos observados en las heridas de hembras jóvenes (2C): promedio de 35 células/área de campo (SD de 4). Las heridas del grupo de edad (2B) tuvieron números de macrófagos reducidos de forma significativa en comparación con los otros dos grupos con un promedio de 12 células/área de campo (SD de 4) (un factor ANOVA  $F(2,14) = 14,3$ ,  $p = 0,0007$ , intervalo Turkey-HSD para el nivel  $0,05 = 3,77$ ). La infiltración de macrófagos incrementadas observada en las heridas del grupo HRT en comparación con el grupo de edad puede tener consecuencias importantes para el procedimiento de curación de heridas: además a su papel en fagocitosis, los macrófagos también producen una variedad de citoquinas, incluyendo el TGF- $\beta 1$ , que es importante en la estimulación de la migración de células, la proliferación y la producción de la matriz.

#### 2.2.3 Efectos de los estrógenos en la proliferación de fibroblastos dérmicos humanos y en la producción de TGF- $\beta 1$

Para investigar de forma adicional los efectos de los compuestos que influyen el sistema de hormonas sexuales en la curación de heridas hemos determinado los efectos del estrógeno y de la progesterona de forma separada en la proliferación de fibroblastos y en la producción de TGF- $\beta$ . La progesterona se utilizó como un compuesto de referencia. La proliferación de fibroblastos de línea de base promedio después de 24 horas (sólo media) no fue significativamente diferente entre los tres grupos.

Los estrógenos a dosis comprendidas entre 1 pM y 1 mM inhibieron la proliferación de fibroblastos tanto en los sujetos jóvenes como en los de edad (en comparación con los controles de ciclodextrina) (Fig. 6). El grado de inhibición de la proliferación fue similar para los fibroblastos tanto de hembras jóvenes como de edad.

La viabilidad de las células no se vio afectada por el tratamiento hormonal tal como se determinó por el ensayo de exclusión de Azul de Tripano. La pre-incubación del medio durante 30 minutos con un anticuerpo neutralizante a TGF- $\beta 1$  (10  $\mu\text{g/l}$ ; sistemas R & D) antes de la adición a las células no revertió el efecto de la hormona, indicando que la inhibición de la proliferación se produjo de forma independiente del TGF- $\beta 1$ .

Utilizando el ensayo de células de pulmón de visón (2.1.5.2), los medios acondicionados de los cultivos de fibroblastos de control de la línea de base de sujetos hembra jóvenes (Grupo 2C) tratados sólo con medio libre de suero (sin hormonas o soporte de ciclodextrina) mostraron una inhibición significativamente mayor de la proliferación de la célula epitelial de pulmón de visón (MLEC) en comparación con los fibroblastos de hembra de edad (Grupos 2A o 2B) ( $p < 0,05$ ; Tabla II). La preincubación del medio durante 30 minutos con un anticuerpo neutralizante al TGF- $\beta 1$  antes de la adición a las MLECs revertió completamente el efecto de la hormona, indicando que la inhibición de la proliferación de la MLEC fue dependiente del TGF- $\beta 1$ .

Cuando se incubaron los fibroblastos con estrógeno o progesterona, los medios acondicionados indujeron la inhibición del crecimiento de las MLECs dependientes de la hormona en cuestión, y de su concentración (relativa a los controles) (Tabla II). El anticuerpo neutralizante al TGF- $\beta 1$  (a 10  $\mu\text{g/ml}$ ; R & D) abolió los efectos de las hormonas a todas las concentraciones valoradas cuando se pre-incubó con muestras durante 30 minutos antes de la adición a las células de pulmón de visón (los anticuerpos al TGF- $\beta 2$  y  $\beta 3$  no tuvieron efecto). Los anticuerpos a esta concentración añadidos a células de pulmón de visón (en medios de control) no tuvieron efecto en la captación de timidita en comparación con sólo los medios de control. Los niveles de TGF- $\beta 1$  totales en los medios acondicionados activados por calor se incrementaron después del tratamiento de 24 horas con estrógeno en todos los sujetos analizados, con un incremento máximo de TGF- $\beta 1$  a la dosis de estrógeno mM (en comparación con los controles), con un incremento promedio de 4 veces en los niveles para células jóvenes (2C), y un incremento de 12 veces para las células de sujetos de edad (2A y 2B) (Tabla II). El tratamiento con progesterona de fibroblastos no tuvo efecto significativo en la producción de TGF- $\beta 1$  (comparado con los controles) para fibroblastos jóvenes (Grupo 2C). Sin embargo hubo un incremento significativo de 2 veces en los niveles a las dosis nM y  $\mu\text{M}$  para los fibroblastos de los sujetos de edad (2A o 2B). No hubo incremento en el TGF- $\beta 1$  activo tanto después del tratamiento con estrógeno como con progesterona (es decir las muestras no activadas con calor no tuvieron efecto en el ensayo de célula de pulmón de visón en comparación con el control apropiado). Estos datos sugieren que el estrógeno es el mayor esteroide sexual implicado en la producción de fibroblastos dérmicos/secreción de TGF- $\beta 1$  y que el mecanismo por el que los compuestos que influyen en el sistema de hormonas sexuales ejerce su efecto en la curación de heridas puede ser por modulación de los niveles de TGF- $\beta 1$ .

TABLA II

Niveles de TGF- $\beta$ 1 segregados por fibroblastos dérmicos de hembras jóvenes (2C) y de edad (2A o 2B) tal como se determinó por el ensayo de inhibición del crecimiento de células de pulmón de Visón.

TIPO DE CÉLULA	TRATAMIENTO	NIVELES DE TGF-beta (pg/ml/10 <sup>5</sup> células/24 horas)	VECES DE LA INDUCCIÓN
<b>HEMBRA JOVEN</b>	CONTROL (sólo medio)	108 $\pm$ 26	
	Estrógeno pM	118 $\pm$ 24	1
	Estrógeno nM	312 $\pm$ 30	3*
	Estrógeno $\mu$ M	282 $\pm$ 22	2,6*
	Estrógeno mM	428 $\pm$ 58	4*
	Progesterona pM	70 $\pm$ 31	0,6
	Progesterona nM	115 $\pm$ 20	1
	Progesterona $\mu$ M	96 $\pm$ 13	1
	Progesterona mM	82 $\pm$ 13	0,8
<b>HEMBRAS DE EDAD AVANZADA</b>	CONTROL (sólo medio)	34 $\pm$ 11	
	Estrógeno pM	80 $\pm$ 50	2,4*
	Estrógeno nM	280 $\pm$ 60	8,3*
	Estrógeno $\mu$ M	315 $\pm$ 47	9,3*
	Estrógeno mM	416 $\pm$ 80	12,2*
	Progesterona pM	32 $\pm$ 13	1
	Progesterona nM	90 $\pm$ 38	2,6*
	Progesterona $\mu$ M	65 $\pm$ 15	2*
	Progesterona mM	33 $\pm$ 13	1

Para distinguir entre el control transcripcional y el post-transcripcional de los niveles de TGF- $\beta$ 1, se determinaron los niveles de estado fijo de ARNm de fibroblastos tratados con concentraciones variables de estrógenos. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de ARNm del TGF- $\beta$ 1 entre los fibroblastos control y tratados de todas las hembras (sin tener en cuenta la edad) (Tabla III). La cicloheximida añadida conjuntamente con las hormonas o sólo el medio no tuvieron efecto en los niveles de proteína de TGF- $\beta$ 1 total observados, indicando que la inhibición de la síntesis de proteínas no tenía efecto en los niveles aumentados de TGF- $\beta$ 1 en el medio después del tratamiento con estrógenos. La cicloheximida no tuvo efecto en la viabilidad de las células a la dosis utilizada en el estudio. Los datos sugieren que el incremento en los niveles de citoquina totales en el medio secundario al tratamiento con estrógenos fue debido a los sucesos post-translacionales.

TABLA III

Efectos de la edad y del tratamiento hormonal en los niveles de ARNm del TGF- $\beta$ 1 de los fibroblastos dérmicos tal como se determinaron por RT-PCR cuantitativo.		
TIPO DE CÉLULA	TRATAMIENTO	NIVELES DE ARNm de los TGF-beta (copias/célula)
HEMBRA JOVEN (2C)	CONTROL (sólo medio)	1200 $\pm$ 158
	Estrógeno pM	1190 $\pm$ 300
	Estrógeno nM	1300 $\pm$ 272
	Estrógeno $\mu$ M	1180 $\pm$ 130
	Estrógeno mM	1250 $\pm$ 188
	Progesterona pM	1130 $\pm$ 254
	Progesterona nM	1145 $\pm$ 206
	Progesterona $\mu$ M	1090 $\pm$ 280
	Progesterona mM	1100 $\pm$ 310
	CONTROL (sólo medio)	1080 $\pm$ 160
HEMBRAS DE EDAD AVANZADA (2A o 2B)	Estrógeno pM	1155 $\pm$ 215
	Estrógeno nM	1100 $\pm$ 370
	Estrógeno $\mu$ M	1100 $\pm$ 235
	Estrógeno mM	990 $\pm$ 325
	Progesterona pM	950 $\pm$ 210
	Progesterona nM	1000 $\pm$ 275
	Progesterona $\mu$ M	1110 $\pm$ 290
	Progesterona mM	1300 $\pm$ 430

## Ejemplo 3

Los experimentos se llevaron a cabo para ilustrar el efecto de los estrógenos tópicos en la curación de heridas en un ensayo clínico utilizando hombres y mujeres.

## 3.1 Procedimientos

## 3.1.1 Pacientes

La aprobación para este estudio fue dada por el Comité Ético. Se dividieron cuarenta voluntarios definidos en el estatus de sanos en cuatro grupos:

(i) GRUPO 3A que comprendió diez mujeres con edad promedio de 76,3 años (Sd 5,6) quienes recibieron suplementos de estrógenos (25  $\mu$ g/24 horas de estradiol)

(ii) GRUPO 3B que comprendió diez mujeres con edad promedio de 72,5 años (Sd 7,1) quienes recibieron placebo en lugar de estrógeno.

(iii) GRUPO 3C que comprendió diez hombres con edad promedio de 69,6 años (Sd 3,6) quienes recibieron suplementos de estrógeno.

5 (iv) GRUPO 3D que comprendió diez hombres con edad promedio de 71,8 años (Sd 8,9) quienes recibieron placebo en lugar de estrógeno.

Todos los sujetos tuvieron historias médicas y exámenes de CXR, ECG, hematológicos, de lípidos y perfiles bioquímicos normales. Los sujetos fueron todos ellos no fumadores, con historias dietéticas e índices de masas corporales normales.

### 10 3.1.2 Biopsias

Después del consentimiento informado los sujetos de cada uno de los Grupos 3A, 3B, 3C y 3D fueron sometidos a dos biopsias por punción de 4mm en la parte superior interna del brazo (un sitio de no exposición al sol) siguiendo por una infiltración local con 1 ml de lignocaína al 1%. Cada biopsia de piel normal fue diseccionada y una mitad fue inmersa en el compuesto de Temperatura de Corte Óptimo (Miles Inc. Elkhart, IN), congelado sobre nitrógeno líquido y almacenado a -70°C.

20 Se cubrió el área de la biopsia con un parche de 2 x 3 cm (con placebo los Grupos 3B y 3 D o con estradiol activo los grupos 3A y 3C) sobre la zona en que se habían hecho las biopsias. El parche se cubrió con un apósito en gasa seca Multisorb (Smith & Nephew) y ambos se eliminaron después de 24 horas. Los parches activos conteniendo suficiente estradiol como los de los sitios de las heridas fueron expuestos a 25 µg/24 horas de estradiol.

### 25 3.1.3. Nueva biopsia

Cinco sujetos de los grupos 3A, 3B, 3C y 3D fueron sometidos a una nueva escisión de las heridas en el día 7 después de la herida, y los otros cinco sujetos de cada grupo en el día 84 después de la herida.

30 Se limpió la parte superior interna del brazo izquierdo con alcohol isopropílico, y se hicieron escisiones elípticas de las heridas siguiendo con la infiltración de lignocaína al 1% y se utilizaron dos suturas para cerrar la abertura. Cada herida fue diseccionada y se procesó tal como se ha descrito anteriormente (3.1.3).

### 3.1.4 Mediciones de las hormonas Endógenas

35 Los niveles de estrógenos circulantes en los grupos hembras (3A y 3B) fueron < 50 pmol/l con progesterona < 2 nmol/l tanto en la biopsia inicial como en la nueva escisión.

40 Para los grupos macho (3C y 3D) todos los niveles de progesterona fueron < 2 nmol/l. Para el Grupo 3C: los niveles de testosterona fueron de 15,9 nmol/l (Sd 3,9). El SHBG fue de 47,3 (SD 14,2) y los niveles de estrógenos 92 pmol/l (Sd 16,6). Para el Grupo 3: los niveles de testosterona fueron de 13,0 nmol/l (Sd 3,5). SHBG fue de 46,9 (SD 27,4) y los niveles de estrógeno de 100 pmol/l (Sd 14,7). Los niveles de prolactina y los niveles de PSA (3C y 3D) estuvieron dentro de los límites normales.

### 45 3.1.5 Estudio de la Biopsias

Se utilizaron algunas biopsias para el análisis molecular y se llevó a cabo la micro-disección de la herida para asegurar que no había contaminación de la piel normal.

#### 50 3.1.5.1 Análisis por la imagen de las heridas

Se tensaron secciones de 7 µm inmersas en parafina con H & E y Masson's Tricrome. Se determinó la velocidad de re-epitelialización (en el día 7 después de la herida), y los tamaños de las heridas por planimetría, con análisis por la imagen utilizando una cámara Olympus Vanox y un sistema de toma de imágenes por PC. Se determinó la cantidad de colágeno en la herida por dos observadores ciegos respecto a la identidad de la muestra en la siguiente escala + = cantidades mínimas; ++ = menos que en la piel normal; +++ = similar a lo normal; ++++ = mayor que en la piel normal.

#### 60 3.1.5.2 Sistema de Análisis Dimensional

Se determinó la rigidez de la herida en el día 80 utilizando el Sistema de Análisis Dimensional no disruptivo (Das). Los estudios previos han correlacionado los valores de fuerza para la rotura de la herida (presión última de fallo) para la rigidez de la herida utilizando este sistema. El sistema aplica una pendiente multiaxial (presión negativa) a la herida y mide la deformación debida a la pendiente de dos puntos de referencia de reflexión situados en los ejes de la herida, utilizando una cámara de alta resolución y un procesador de video. Se aplicó presión a un máximo de 100 mm de Hg y a continuación se liberó. Se midió la rigidez entre 20 y 80 mm de Hg.

### 3.1.5.3 Zimografía de la Fibronectina

Se identificaron las proteasas responsables de la degradación de la fibronectina por zimografía utilizando geles de acrilamida conteniendo fibronectina (acrilamida al 12% y 0,33 mg/ml de fibronectina, Central Blood Products Ltd.). Se liofilizaron las muestras de tejido y se homogenizaron utilizando un homogenizador de cristal esmerilado conteniendo 0,5 ml de tampón (100 mM de Tris/HCl, 6 M de Urea, 15 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,25% de Triton-X100, pH 7,4). Después de centrifugación a 11.000 rpm durante 10 min a 4°C se incubaron las muestras (20 µg en peso seco) durante 30 min a 37°C con 2 x tampón de muestra Laemmli y se sometieron a electroforesis bajo condiciones de reducción (Laemmli, 1970). Después de la electroforesis, se lavaron los geles dos veces con 2,5% de Triton-X100 durante 1 hora para eliminar el SDS. Los geles se lavaron de forma breve con agua destilada dos veces y se incubaron durante 18 horas a 37°C en un tampón de desarrollo conteniendo 50 mM de Tris/HCl, 150 mM de NaCl y 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4. Al final de la incubación se tiñeron los geles con azul brillante de Coomassie al 0,5% y se destiñeron. Las áreas de actividad de la proteasa aparecieron como zonas claras frente a un fondo azul oscuro. Se incubaron los geles duplicados tanto con la adición de 10 mM del inhibidor de la metaloproteasa, EDTA (BDII, Poole) o 1,7 mM de inhibidor de la serina proteasa, fluoruro de aminoetilbencenosulfonilo (AEBSF; Sigma). Se utilizaron estándares preteñidos con un amplio margen de pesos moleculares (Bio-rad) como marcadores de peso molecular. Se cargaron líneas separadas con 500 ng y 50 ng de neutrofil elastasa humana (ICN).

### 3.1.5.4. SDS-PAGE e Inmuno-formación de manchas

Se sometieron a electroforesis muestras de proteínas (20 µg de peso seco) extraídas tal como se ha descrito anteriormente en un gel de acrilamida al 12%. Se hicieron correr los zimogramas de fibronectina paralela de forma simultánea. Para la inmuno-formación de manchas, se transfirieron los polipéptidos a un papel de nitrocelulosa (0,45 µm de tamaño de poro, Bio-rad) por electroforesis a 20 V durante 30 minutos (aparato de manchas de transferencia en seco Bio-Rad Semi) en un tampón de transferencia (25 mM tris/HCl), 192 mM de glicina, 10% de metanol, pH 8,3). Para bloquear la unión no específica, se incubaron las inmunomanchas en un 4% de leche baja en grasas Marcel en TBST (10 mM de Tris/HCl, 150 mM de NaCl, 0,5% de Tween-20, pH 7,5) durante 18 horas a 4°C. Se incubaron las proteínas transferidas con anticuerpo policlonal anti-humano de neutrofil elastasa (Calbiochem Co) diluido 1:500 en TBST durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación seguido por incubación con peroxidasa de rábano picante conjugado con IgG de cabra anti-conejo (Sigma) a una dilución de 1:3000 en TBST con un 4% de leche no grasa durante 1 hora a temperatura ambiente. Se visualizó la unión a anticuerpos utilizando el equipo ECL de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham Int.).

### 3.1.5.5 Determinación de Elastasa

Las muestras de tejido (20 µg de peso seco) y de neutrofil elastasa humana (0,01-0,3 µg/ml) se incubaron hasta 1 hora a 37°C en 200 µl de tampón Hepes 0,1 M, pH 7,5, conteniendo 0,5 M de NaCl, dimetilsulfóxido al 10% y 0,1 mM de sustrato de elastasa (metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida; Calbiochem Co;). Se determinó la degradación del sustrato por medición del OD<sub>410</sub> (Dynatech MR5000). Se preparó una curva estándar para la degradación a partir de los datos de la elastasa. Los resultados se expresaron como ng/ml de actividad de la elastasa/20 µg de peso seco.

### 3.1.6. Análisis Estadístico

Todos los datos se normalizaron y valoraron utilizando un análisis t de student independiente. Se considera que P < 0,05 es significativa.

## 3.2 Resultados

### 3.2.1 El efecto del estrógeno en la velocidad de curación de la herida

El tratamiento con estrógeno aceleró la velocidad de re-epitelialización tanto se sujetos hembra (3A) como en sujetos machos (3C) en relación con los controles de placebo (3B y 3D respectivamente) (ver Tabla IV). Los resultados fueron sólo significativos en el grupo de hembras (p > 0,005) debido a la discrepancia entre los sexos en el grupo de placebo (los machos se re-epitelizaron más rápidamente que las hembras). El área de la herida en el día 7 después de la formación de la herida se vio reducida de forma significativa con el tratamiento con estrógeno tanto en los Grupos de machos 3C y 3D (p < 0,05). Los niveles de colágeno se vieron incrementados de forma consistente tanto en el día 7 como en el día 80 después de la herida en ambos sexos tratados con estrógeno (3A y 3C) en comparación con el placebo (3B y 3D). La rigidez de la herida no se vio afectada por el tratamiento con estrógeno en el día 80 después de la herida.

### 3.2.2 El efecto del estrógeno en la actividad de la elastasa de la herida

Los extractos de tejido de las heridas agudas del día 7 degradaron todos la fibronectina mostrando una banda mayor a aproximadamente 30 kd, pero de forma consistente se produjo menos degradación en los grupos tratados con estrógeno (3A y 3C). La actividad de la proteasa específica de la fibronectina de 30 kd en todas las muestras fue eliminada por incubación con el amplio intervalo de inhibidor de la serina proteasa, AEBSF, pero no por el inhibidor de la metaloproteasa, EDTA, sugiriendo que la mayor actividad de degradación de la fibronectina era debida a la serina proteasa, que co-emigró con la neutrofilelastasa comercial. Las manchas de inmunotinción confirmaron que

## ES 2 229 376 T5

la actividad de la proteasa de 30 kd observada en los zimogramas de la fibronectina fue elastasa. La actividad de la elastasa estuvo presente sólo en los grupos tratados con placebo (3B y 3D). Se cuantificó la actividad de la elastasa utilizando un ensayo de degradación del sustrato de la elastasa sintética, que mostró que el tratamiento con estrógeno reduce de forma significativa la actividad de la elastasa en las heridas en el día 7 en comparación con el placebo (< 50 ng de elastasa por 20 µg de peso seco de tejido para los grupos de placebo concurrentes con los datos de manchas Western) (Tabla IV).

TABLA IV

*El estrógeno tópico acelera la curación de heridas en machos y hembras ancianos*

	HEMBRAS		MACHOS	
	PLACEBO (3B)	ESTRÓGENO (3A)	PLACEBO (3D)	ESTRÓGENO (3C)
Área herida	1408,7 (19)	1204 (49)*	1461 (28)	1173 (61)*
% de velocidad de re-epitelialización	3,3 (3,3)	74,5 (10,5)*	30 (16,9)	62,5 (21,7)
Cantidades de colágeno en el DÍA 7	+	++	+	++
DÍA 80	+++	++++	+++	++++

### 3.2.3 El efecto del estrógeno en la cicatrización

Las Figuras 7 y 8 ilustran el efecto del estrógeno (e) en la cicatrización (microscópicamente y macroscópicamente respectivamente) tal como se determinó en 2.1.4.2. El tratamiento con estrógeno estuvo asociado con una inferior calidad de la herida (que pudo estar correlacionada con los niveles del TGF-β).



REIVINDICACIONES

1. El uso de un compuesto que favorece la actividad estrogénica, en el que dicho compuesto es un estrógeno o un agonista del receptor de estrógeno seleccionado entre etinilestradiol, dienolestrol, mestranol, estradiol, estriol, estrógenos conjugados, sulfato de piperacina estrona, estilboestrol, fosfesterol tetrasódico, poliestradial fosfato, tibolona o un fitoestrógeno, en la fabricación de un medicamento para la aceleración de la curación de las heridas de la piel.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicho compuesto es el 17  $\beta$ -estradiol.

3. El uso de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones en el que la herida es una herida aguda.

4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3 en el que la herida es una herida penetrante, una quemadura o el resultado de una cirugía electiva.

5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 en el que la herida es una herida crónica.

6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5 en el que la herida es una ulceración diabética, venosa o de decúbito.

7. El uso de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones para una aplicación no sistémica.

8. El uso de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones para la fabricación de un medicamento en la forma de un líquido, ungüento, crema, gel, hidrogel, polvo, aerosol o implante o gotas para los ojos.

9. El uso de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones en el que el medicamento contiene entre un 0,001% y un 4% en peso de dicho compuesto.

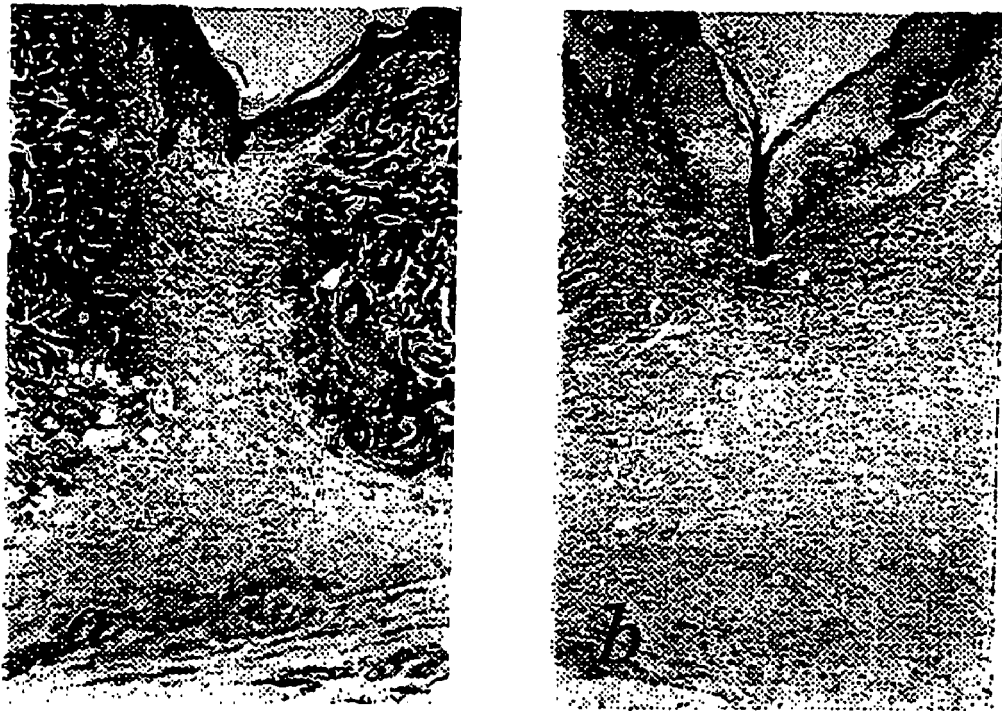
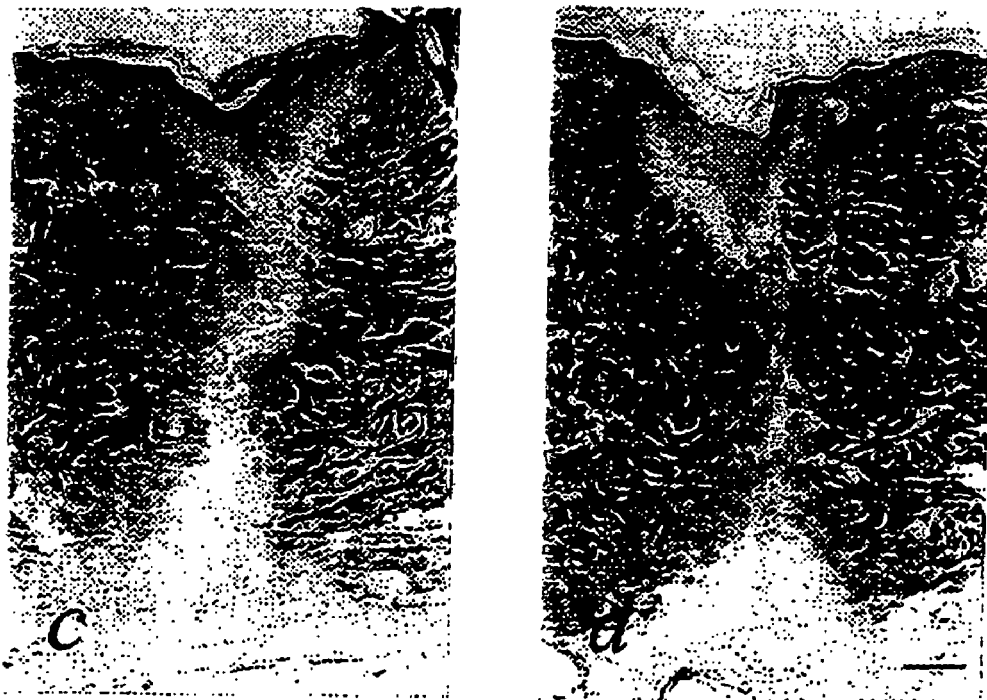
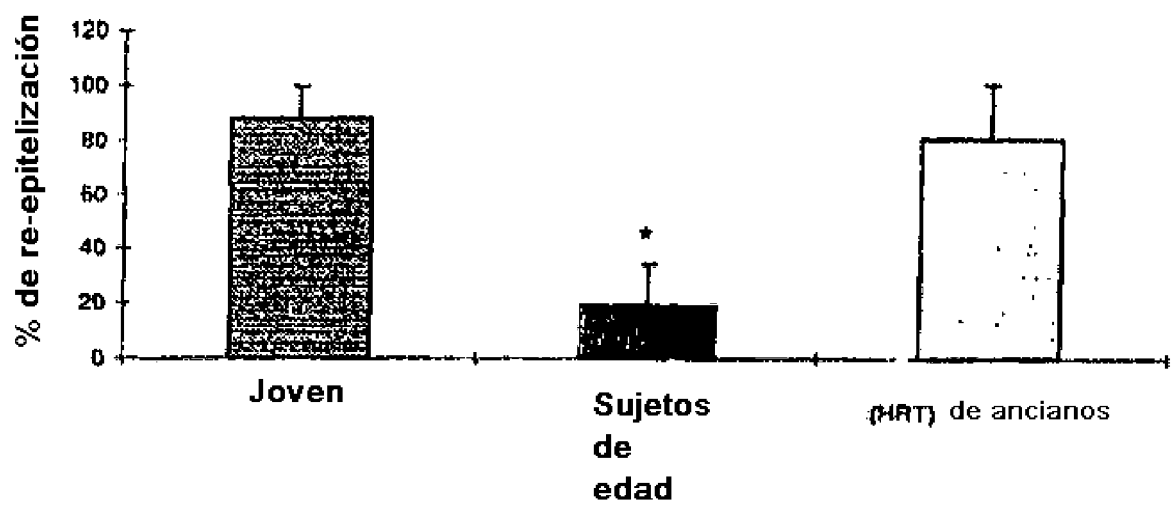
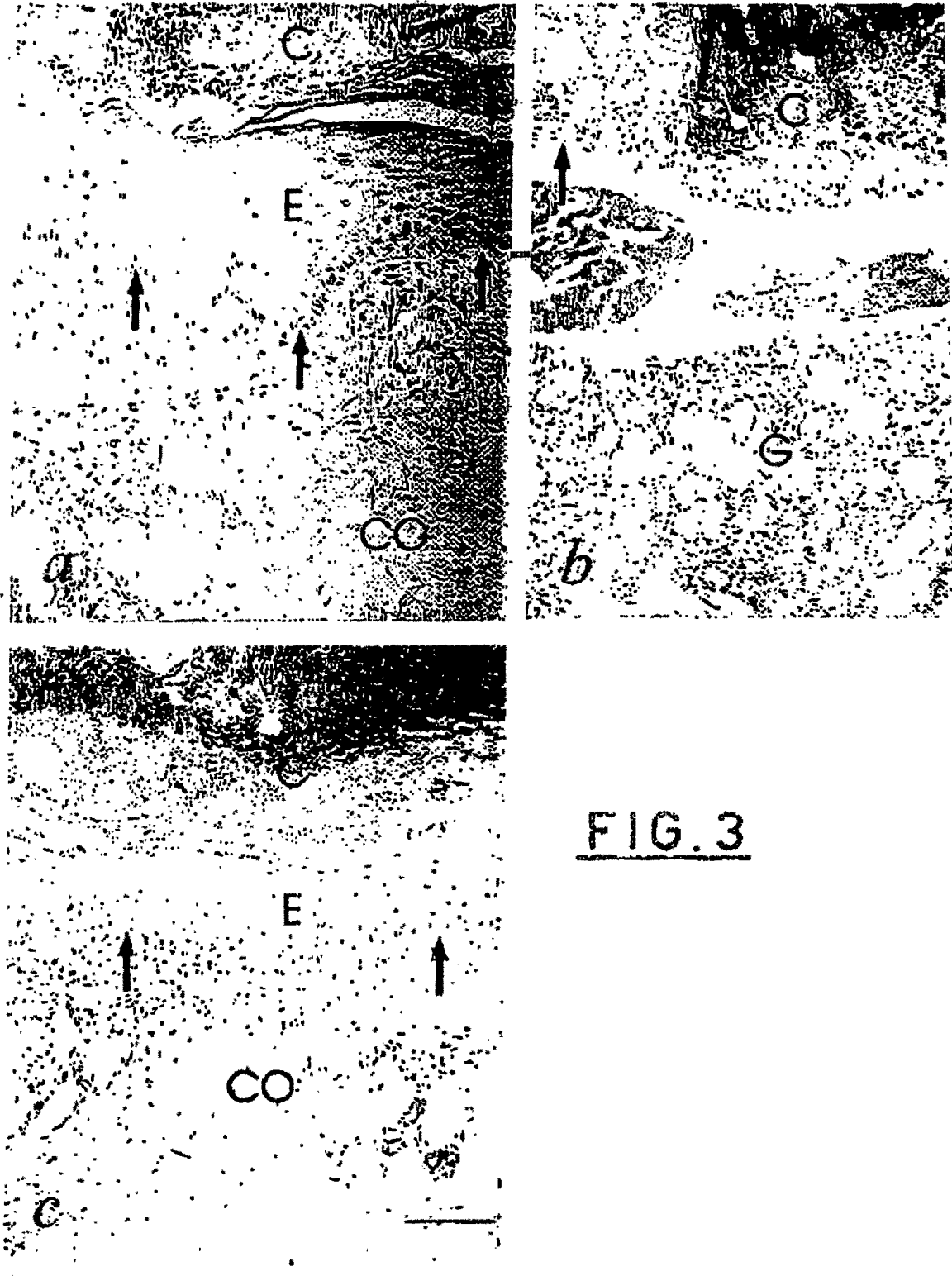


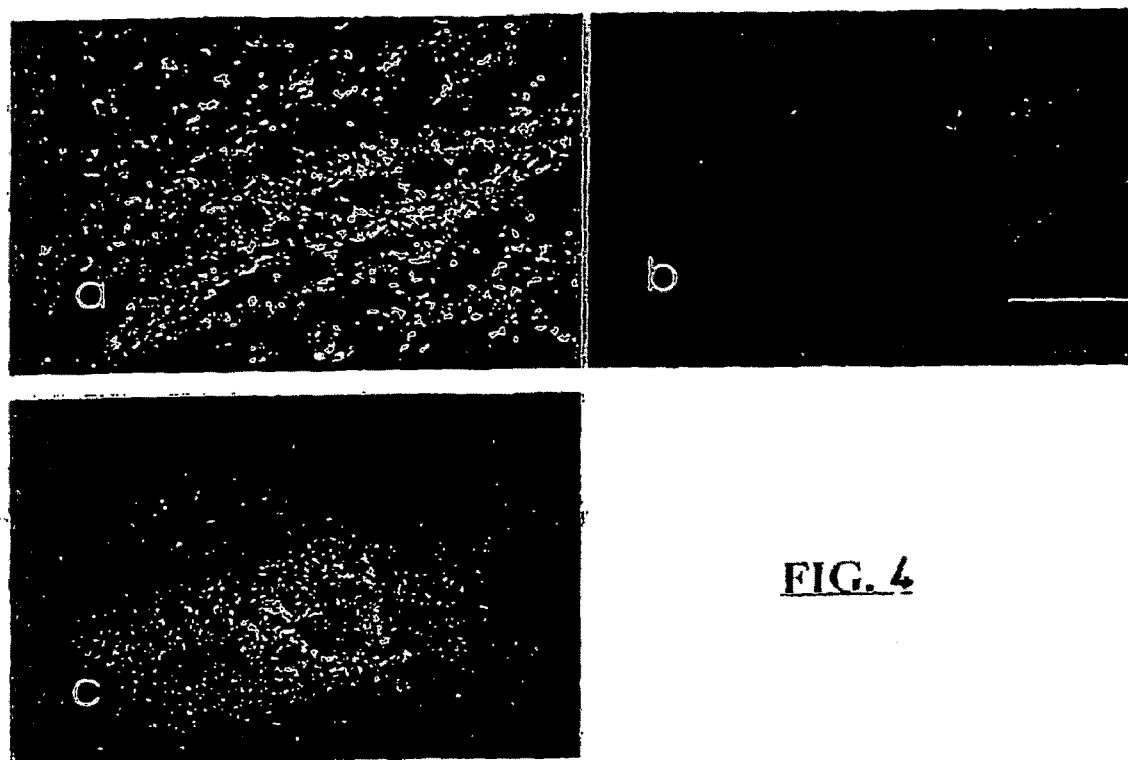
FIG. 1



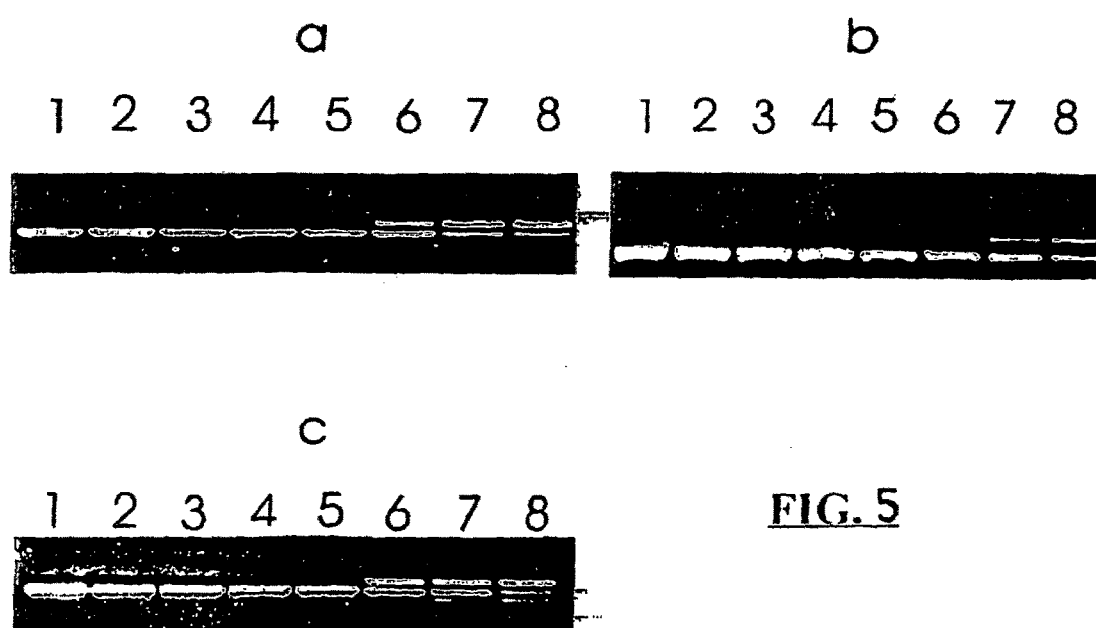


**FIG. 2**





**FIG. 4**



**FIG. 5**

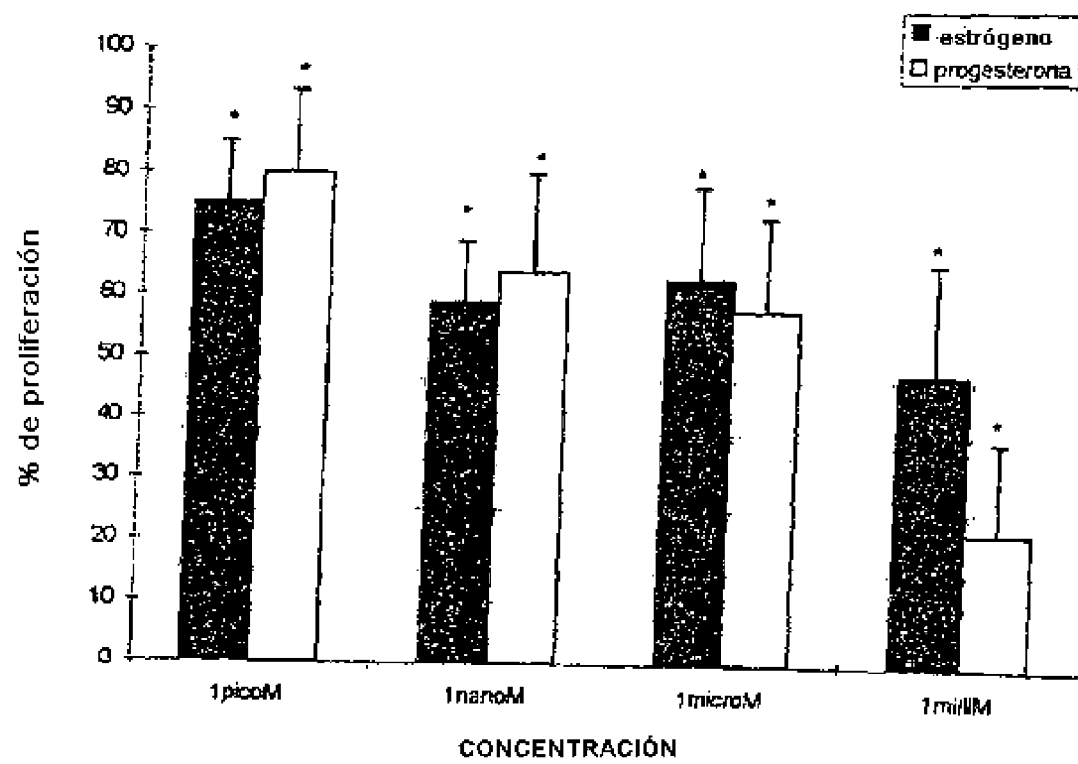
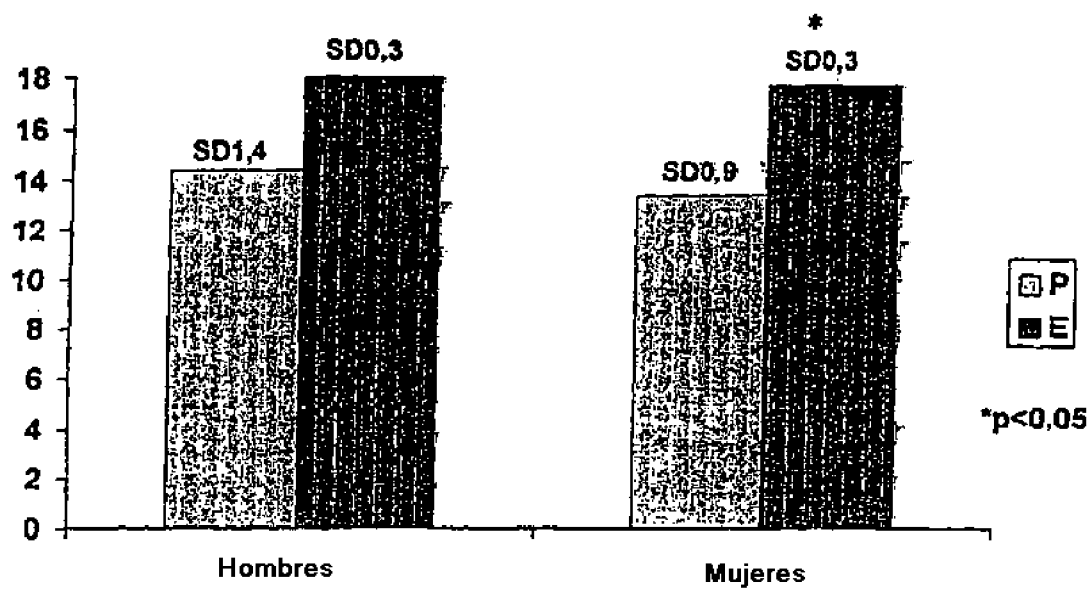
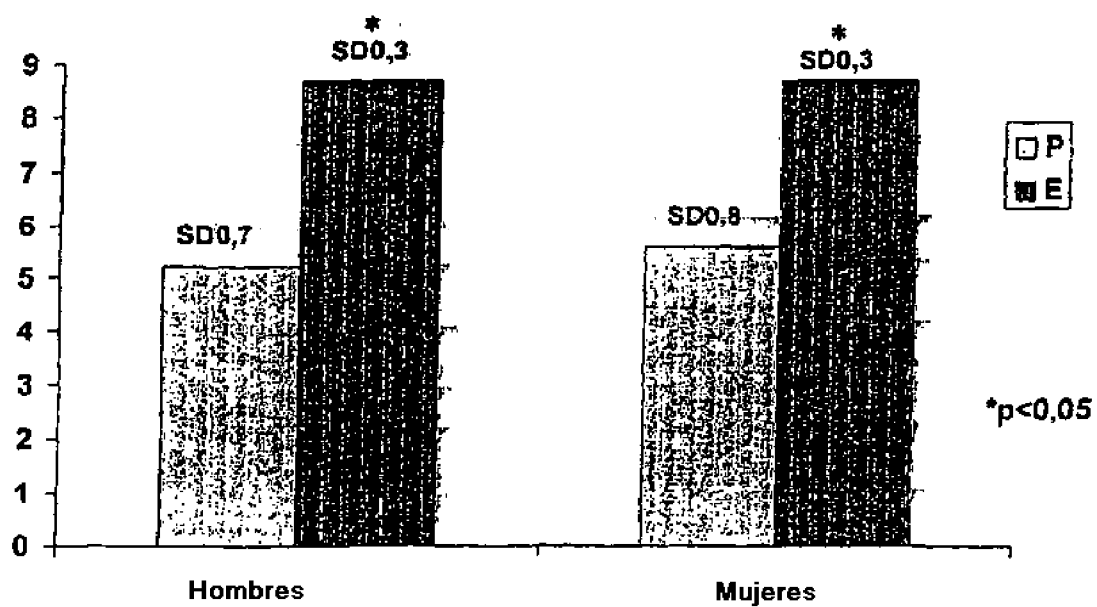


FIG. 6



**FIG. 7**



**FIG. 8**