

**metas**  
DE ENFERMERIA

[www.enfermeria21.com](http://www.enfermeria21.com)

**La función  
activadora de un apósito  
bioactivo con carga iónica  
sobre los fibroblastos humanos**

Revista METAS de Enfermería  
VOLUMEN 8 - NÚMERO 7 - SEPTIEMBRE 05

**Autores:**<sup>1,2</sup> Conxita Castellarnau<sup>1</sup> Mercè Martín<sup>1</sup> Anna Marcos<sup>1,2</sup> Ricardo Casaroli-Marano<sup>1,2</sup> Manuel Reina<sup>1,2</sup> Senén Vilaró

<sup>1</sup> Advancell, SL.  
Parque Científico de Barcelona.  
Baldri Reixac, 10. 08028 Barcelona  
<sup>2</sup> Departamento de Biología Celular.  
Universidad de Barcelona.  
Avda. Diagonal, 645.  
08028 Barcelona.

**Dirección de Contacto:**

Dr. Senén Vilaró.  
Departamento de Biología Celular.  
Universidad de Barcelona  
Avda. Diagonal, 645.  
08028 Barcelona.  
Tel.: 93 4021550.  
E-mail:svilaro@ub.edu

# La función activadora de un apósito bioactivo<sup>(1)</sup> con carga iónica sobre los fibroblastos humanos

**Resumen / Abstract**

• La cicatrización de las heridas es un proceso complejo que implica diferentes fases que se solapan entre sí, incluyendo la inflamación, la epitelización, la angiogénesis y la síntesis y deposición de matriz extracelular. Los fibroblastos dérmicos tienen una función esencial en la formación del tejido de granulación. Migran hasta la lesión en respuesta a citoquinas, proliferan y sintetizan las proteínas de la matriz extracelular, las cuales son la base del proceso de reparación futuro. Los oligoelementos tales como el zinc y el manganeso son necesarios para muchas funciones celulares y, por consiguiente, pueden potencialmente estimular los procesos de reparación de las heridas. En el presente estudio hemos investigado el efecto de un apósito que contiene zinc, calcio y manganeso (Trionic<sup>®</sup>) sobre la proliferación, el crecimiento, la síntesis de colágeno I y III y la migración de los fibroblastos. Los resultados obtenidos indican que los oligoelementos solubles presentes en Trionic<sup>®</sup> actúan estimulando la proliferación, el crecimiento, la biosíntesis de colágeno y la migración de los fibroblastos. Dada la participación crucial que estas funciones celulares tienen sobre el comportamiento de los fibroblastos durante el proceso de formación del tejido de granulación, concluimos que los iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  contenidos en Trionic<sup>®</sup> pueden proporcionar potenciales beneficios en el tratamiento de las heridas crónicas y durante la fase reparativa del proceso de cicatrización.

**Palabras clave:**

Cicatrización; proliferación celular; migración celular; colágeno; iones; zinc; manganeso; calcio; Trionic<sup>®</sup>.

**The activating function of bioactive dressing with ionic charge on human fibroblasts**

• The healing of wounds is a complex process that involves different overlapping phases, including inflammation, epithelization, angiogenesis and the synthesis and deposition of extracellular matrix. Dermic fibroblasts play an essential role in the formation of granulated tissue. Dermic fibroblast migrate to the lesion in response to cytokines, proliferating and synthesising proteins of the extracellular matrix, which are the basis of future repair processes. Oligoelements such as zinc and manganese are necessary for many cells functions and, thus, can potentially stimulate the repair processes of wounds. In this study, we sought out to determine the effect of a dressing containing zinc, calcium and manganese (Trionic<sup>®</sup>) on the proliferation, growth, collagen I and III synthesis and the migration of fibroblasts. The results obtained indicate that soluble oligoelements that are present in Trionic<sup>®</sup> act by stimulating proliferation, growth, collagen biosynthesis and the migration of fibroblasts. Given the key participation that these cell functions have on the behaviour of fibroblasts during the process of granulated tissue, we conclude that ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  contained in Trionic<sup>®</sup> can provide potential benefits for the management of chronic wounds and during the reparative phase of the healing process.

**Key words:**

Healing process; cell proliferation; cell migration; collagen; ions; zinc; manganese; calcium; Trionic<sup>®</sup>.

**“Trionic® actúa  
estimulando  
la proliferación,  
el crecimiento,  
la biosíntesis  
de colágeno,  
la migración y  
la adhesión  
de fibroblastos  
humanos”**

## Introducción

El proceso de cicatrización es un proceso complejo y dinámico que involucra la participación coordinada de distintos tipos celulares y factores de crecimiento que participan en las tres distintas fases del mismo: la fase inflamatoria, la regenerativa (granulación y epitelización) y la de maduración. En esta última los fenómenos celulares principales son la producción de nuevo tejido conjuntivo formado por los fibroblastos principalmente, y la proliferación y migración de los queratinocitos que conduce a la reepitelialización de la herida. La interacción entre múltiples citocinas como la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), las células

la y la matriz extracelular es básica para la iniciación, progresión y resolución de las heridas.

Tan pronto como los fibroblastos sintetizan las fibras de colágeno de la nueva matriz extracelular, su actividad mitótica se reduce, al igual que la densidad celular y la vascularización del tejido. Tanto la deposición de colágeno como la orientación de los fibroblastos es determinada por la fibronectina, la cual constituye la más importante proteína de la matriz extracelular en esta fase del proceso (Greiling et al.; 1997). La reepitelización fisiológica es iniciada por varios estímulos: factores de crecimiento, la ausencia de células vecinas en los márgenes de la herida, lo que dispara tanto la proliferación como la migración de las células epidérmicas; la pérdida de contacto de las células epidérmicas con la membrana basal y el establecimiento de nuevas interacciones entre las células con los componentes de la matriz dérmica; la producción y liberación de colagenasa o MMP1 por las células epidérmicas y la activación de plasmina por el plasminógeno, la cual a su vez activa la colagenasa y otras metaloproteinasas (Parks; 1996).

Trionic® es un apósito distribuido por Jonhson & Jonhson que ha sido diseñado para liberar de modo fisiológico estos iones durante el proceso de cicatrización de las heridas. Los iones zinc y manganeso tienen un papel fundamental en el proceso de cica-

trización, dada su acción universal como co-factores de muchos de los enzimas implicados en el metabolismo y la homeostasis celular. En este sentido se ha descrito (véase Andrews and Gallagher-Allred C; 1999 y Ravanti and Kahari; 2000, para revisiones recientes y Trionic®-Technical File,) que el zinc y el manganeso: activan la proliferación y migración de fibroblastos; la síntesis de colágeno; la proliferación y migración de queratinocitos; la actividad metabólica de todas las células implicadas en el proceso de cicatrización; la activación de macrófagos; la adhesión de las células con la matriz extracelular; etc.

Dados los antecedentes anteriormente citados, el objetivo global del presente estudio fue determinar el efecto de los iones divalentes Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> liberados de la matriz del nuevo apósito Trionic® distintos parámetros determinantes y representativos de la participación de los fibroblastos dérmicos humanos en el proceso de cicatrización.

## Materiales y métodos

Para el presente estudio se utilizaron fibroblastos dérmicos humanos (HDF, cultivos primarios derivados de biopsias obtenidas y procesadas de piel de voluntarios sanos). El medio de cultivo para hacer crecer las células fue Dulbecos-1g/L glucosa (Invitrogen) el cual contenía un 10% de suero bovino fetal (FCS), 2mM L-glutamina, 100  $\mu$ g /ml estreptomycin, 100 U/ml de penicilina y 1mM de HEPES (Biowhitaker). Entre el cuarto y séptimo pase, las células fueron sembradas en placas de 12, 24 ó 96 pocillos (en función del ensayo) (Costar 3526, Corning INC, USA) a una densidad de  $1,5 \times 10^4$  cel/cm<sup>2</sup>.

Los componentes solubles, que estaban compuestos por calcio, zinc y manganeso, fueron obtenidos del medio condicionado a diferentes tiempos (según lo indicado en las figuras correspondientes). Para ello, piezas del apósito de  $4 \times 4$  cm<sup>2</sup> fueron incubados en 40 ml de medio de cultivo que contenía 2,5% FBS a 37°C. Después del tiempo indicado, el apósito se retiró y el medio restante fue empleado para los experimentos subsiguientes.

La tinción cristal violeta (CVDE) fue realizada de acuerdo con el protocolo expuesto en Gillies et al (1986) y fue medida en el lector de placas (ELISA) con un filtro de longitud de onda de 590 nm. Los análisis de la citotoxicidad fueron efectuados usando el reactivo de proliferación celular Wst-1 (Boehringer Mannheim, diagnóstico de Roche), a las 24 y 72 horas después del tratamiento de los fibroblastos con los diferentes medios condicionantes. Este análisis es

un análisis colorimétrico, no radiactivo, para la cuantificación de la viabilidad de la célula, basada en la transformación de la sal tetrazolium de Wst-1 a formazán por las deshidrogenasas mitocondriales producida en células viables. La absorbencia de las muestras fue medida en un lector de la placas (ELISA) con un filtro de longitud de onda de 450 nm. Los controles usados para los ensayos de citotoxicidad eran 0,02% SDS, y medio completo que contenía FCS al 10%, como control negativo y positivo de la proliferación, respectivamente.

Para determinar el efecto sobre la producción del colágeno, las células fueron tratadas primero con el medio condicionado y después fijadas con 10 mM DPBS/3% paraformaldehído. Entonces las células fueron tratadas con una solución permeabilizante que consistía en DPBS/0, 0,5% Tween-20/0, el 1% Tritón X-100, durante 10 minutos. Después de lavar y de bloquear los sitios reactivos libres, las células fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales contra colágeno tipo I o colágeno tipo III ( $\sigma$ igma) a 4°C durante toda la noche. Después de ser lavadas, las células fueron incubadas con biotinilado-IgG (Vector laboratories), el cual reconoce los anticuerpos primarios monoclonales. Finalmente, las células fueron tratadas durante 1 hora con el complejo Streptavidin-streptavidin-Biotin-HRP-HRP y teñidas con el sustrato HRP de OPD ( $\sigma$ igma). La absorbancia fue determinada en un espectrofotómetro ELISA Elx800 a 490 nm.

La migración de los fibroblastos fue comprobada en un test *in vitro* de Wound-healing, el cual consiste en monitorizar el tiempo que las células tardan en reestablecer una herida artificial realizada sobre la monocapa confluyente de fibroblastos y su relación con los componentes presentes en Trionic®. Los fibroblastos fueron sembrados en placas revestidas con gelatina y se extendieron durante la noche en el medio suplementado con FCS. Después, una herida fue producida sobre la monocapa y se le agregó nuevamente medio condicionado pero sin FCS, para evitar su posible efecto en la proliferación celular. Se utilizó el microscopio de Time-lapse para seguir la migración de los fibroblastos en la herida. Las imágenes fueron tomadas con una cámara fotográfica Hamamatsu a intervalos de 15 minutos. Como control se realizó una herida en las mismas condiciones, pero se mantuvo el cultivo sin medio condicionado.

## Resultados

### Efecto de Trionic® sobre la proliferación de fibroblastos

La proliferación de los fibroblastos constituye uno de los elementos críticos de todo el proceso de curación de las heridas y especialmente durante la fase regenerativa del mismo.

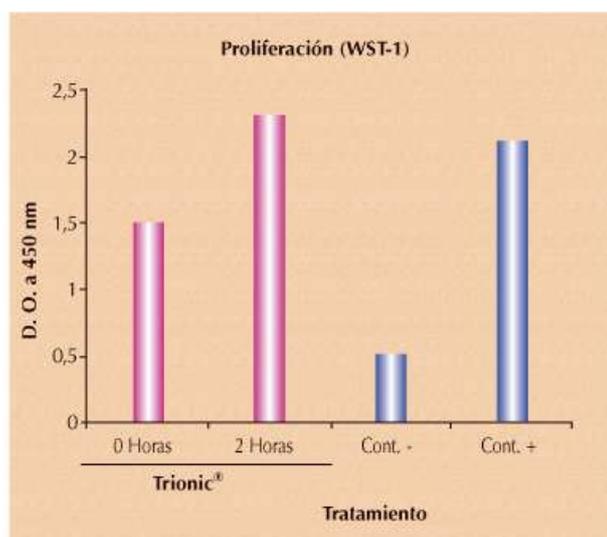


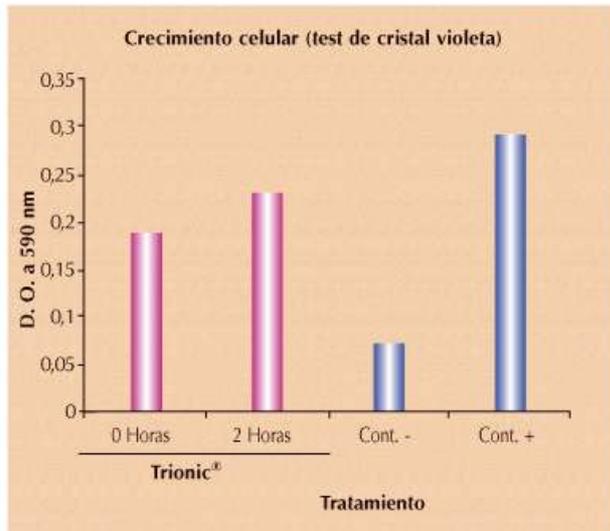
Figura 1. Efecto de Trionic® sobre la proliferación de los fibroblastos medida por el método WST-1. Los fibroblastos humanos fueron tratados durante 72 horas con medio condicionado obtenido en los tiempos indicados a partir de Trionic® o bien con los controles positivos o los negativos

El incremento del número de fibroblastos dérmicos en la zona que se produce la herida facilitará la síntesis de la matriz extracelular, la secreción de factores de crecimiento que regulan el proceso de neovascularización o angiogénesis y la formación del nuevo tejido conjuntivo que facilita la reepitelización.

Con el objetivo de determinar si Trionic® puede ser citotóxico o estimulador de la proliferación de los fibroblastos, se ha utilizado el test del WST-1, como método indirecto de la reducción (citotoxicidad) o el incremento (proliferación) en el número de los fibroblastos. Tal como se muestra en la Figura 1, los componentes liberados durante las dos primeras horas de tratamiento inducen un fuerte incremento del 53% en la actividad mitocondrial medida por el método del WST-1, sin provocar ningún efecto citotóxico. Este resultado indica que los componentes liberados por Trionic® activan la proliferación de los fibroblastos hasta valores equivalentes a los inducidos por los controles positivos. Estudios realizados en paralelo, utilizando tinción de los fibroblastos con cristal violeta, indican que los elementos presentes en Trionic® también incrementan el crecimiento de los fibroblastos hasta valores equivalentes a los encontrados para la proliferación.

### Trionic® induce la producción de matriz extracelular por los fibroblastos humanos

La matriz extracelular formada por los fibroblastos que participan en la fase regenerativa, constituye el elemento principal que facilita la adhesión de las células endoteliales en el proceso de vascularización y la base principal sobre la que se forma el nuevo tejido conjuntivo de la cicatriz. De todos los elementos



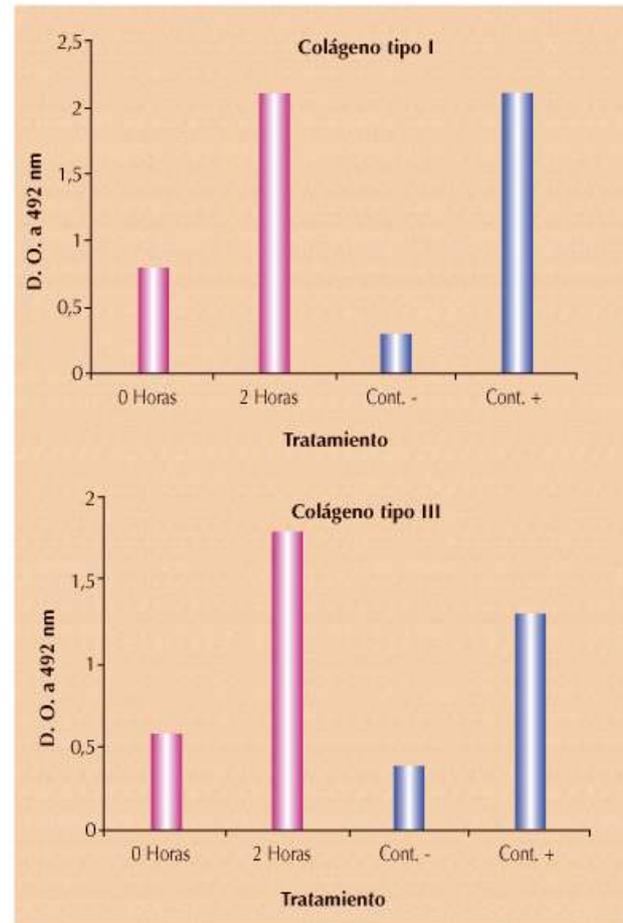
**Figura 2.** Efecto de Trionico® sobre el crecimiento de los fibroblastos medida por el test del cristal violeta. Los fibroblastos humanos fueron tratados durante 72 horas con medio condicionado obtenido en los tiempos indicados a partir de Trionico® o bien con los controles positivos o los negativos.

proteicos de la matriz extracelular, el colágeno y la fibronectina son los más abundantes y determinantes, dada su función estructural y de señalización sobre los otros tipos celulares. En el tejido conjuntivo de la dermis, los colágenos más abundantes son los de Tipo I y III, los cuales se organizan en fibras. Mediante un test de tipo ELISA, se ha determinado si los componentes presentes en Trionico® pueden modular la producción de Colágeno I y III por los fibroblastos humanos tratados con la fracción soluble del apósito. Tal y como muestra la Figura 3, los componentes liberados durante 24 horas por Trionico® inducen un fuerte incremento, tanto en la producción de colágeno I como de colágeno III (de 3 a 4 veces por encima del control). El incremento está incluso por encima del inducido por el control positivo. Estos resultados sugieren que los oligoelementos contenidos en Trionico® son potentes estimuladores de la producción de matriz extracelular.

### Trionico® estimula la migración de los fibroblastos

Durante el proceso de cicatrización de las heridas, además de una elevada proliferación celular de los fibroblastos se produce una intensa actividad migratoria de estas células, con el objetivo de ocupar las zonas del tejido donde se iniciará la fase regenerativa. Esta actividad migratoria está directamente relacionada con la síntesis y orientación de la matriz extracelular y con la actividad de metaloproteinasas, las cuales son dependientes de iones zinc.

Con el objetivo de determinar el efecto de los principios activos de Trionico® sobre el incremento de la migración celular, el medio condicionado de Trionico® y

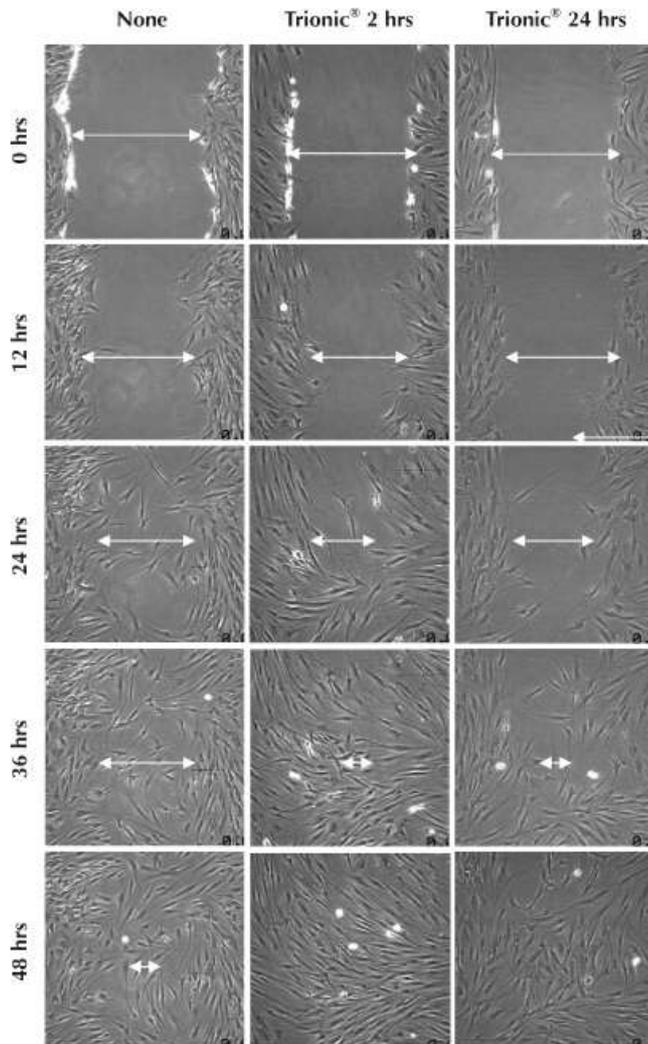


**Figura 3.** Efecto de Trionico® sobre la síntesis de colágeno I y III por fibroblastos humanos. La producción de colágeno fue determinada mediante un test ELISA, después de 7 días de tratamiento con el medio condicionado obtenido a partir de Trionico® en los tiempos indicados.

el control obtenido a las 2 y 60 horas se incubaba con los fibroblastos confluentes en placas de 24 pocillos, en los cuales se habrá realizado una herida artificial en el cultivo, después de mantener durante 24 h con un 1% de SBF. A varios tiempos después de la aplicación del producto (0, 12, 24, 36 y 48 h) se analizó, por medio de contraste de fases y de un sistema de análisis de imagen, la cinética de recubrimiento de la herida artificial. Para ello, se toman imágenes de una misma zona concreta de la herida a los tiempos indicados. Los resultados obtenidos (Figura 4) indican que el tratamiento de los fibroblastos con los elementos solubles de Trionico® induce una capacidad de migración mayor que las células control. La longitud de las flechas en la Figura 4 refleja la anchura de la herida artificial no cubierta por las células. Estos resultados demuestran que Trionico® estimula la migración de los fibroblastos.

### Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que Trionico® estimula el crecimiento y diferenciación celular. El calcio actúa como segundo mensajero



**Figura 4.** Efecto de Trionic® sobre la migración de los fibroblastos. Con el objetivo de determinar la capacidad de estimulación de la migración celular, se realizó una herida artificial sobre una monocapa de fibroblastos y las células fueron tratadas o no con el medio condicionado obtenido a partir de Trionic®. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en el microscopio durante 48 horas y las imágenes se tomaron cada 5 minutos. La figura muestra las imágenes tomadas a 0, 12, 24, 36 y 48 horas de tratamiento con el medio condicionado. Las flechas indican la amplitud de la herida a los diferentes tiempos de tratamiento

ro universal y muchas de las funciones celulares son moduladas por la concentración de calcio intra y extracelular. El zinc es un cofactor esencial en una gran variedad de procesos celulares, incluida la síntesis de DNA, el comportamiento, la reproducción, la formación de los huesos, el crecimiento y la cicatrización (Barceloux; 1999). El zinc es requerido por muchos enzimas para funcionar, al igual que por bastantes factores de transcripción. Muchos de estos enzimas y factores de transcripción participan activamente en el proceso de curación de heridas (Borkakoti; 1998, Andrews M and Gallagher-Allred, 1999, Ravanti and Kahari, 2000). Actualmente, es bien conocido que la deficiencia en zinc desemboca en una mala curación de las heridas, así como de otros síntomas (Scholl and Langkamp-Henken; 2001). Es por ello que el

zinc ha sido utilizado durante años en el tratamiento crónico de heridas (Ayello et al.; 1999, Wilkinson and Hawke; 1999). Por otro lado, el manganeso es, aparte de otras cosas, un cofactor específico para dos enzimas que son críticas en la curación de heridas: la prolidasa, necesaria en el proceso de maduración del colágeno y la superoxid-dismutasa, la cual protege a las células de los radicales libres (Robinson; 1998, Tenaud et al.; 1999, Macmillan-Crow and Cruthirds; 2001).

Hasta el momento, muy pocos estudios han aportado información respecto a la combinación de estos tres oligoelementos. Mediante este ensayo *in vitro*, hemos estudiado como estos tres oligoelementos presentes en Trionic® afectan a varios parámetros en los fibroblastos humanos que deben ser estimulados durante el proceso de cicatrización. Los resultados indican que Trionic® actúa estimulando la proliferación, el crecimiento, la biosíntesis de colágeno, la migración y la adhesión de los fibroblastos humanos. Al actuar sobre estas funciones claves en el comportamiento de los fibroblastos, concluimos que Trionic® tiene beneficios potenciales en el tratamiento de heridas crónicas en la fase de reparación del tejido.

## BIBLIOGRAFÍA

- Andrews M, Gallagher-Allred C. The role of zinc in wound healing. *Adv Wound Care* 1999;Apr;12(3):137-8.
- Ayello EA, Thomas DR, Litchford MA. Nutritional aspects of wound healing. *Home Healthc Nurse* Nov-Dec 1999;17(11):719-29; quiz 730.
- Barceloux DG. Zinc. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999;37(2):279-92.
- Borkakoti N. Matrix metalloproteases: variations on a theme. *Prog Biophys Mol Biol* 1998;70(1):73-94.
- Creiling D, Clark RAF. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J. Cell Sci* 1997;110:861-70.
- Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res* Apr 2001;34(4):325-36.
- Ravanti L, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in wound repair *Int J Mol Med* Oct 2000;6(4):391-407.
- Parks WC. Interstitial collagenase in the healing epidermis. In: Abatangelo C, Donati L, Vanscheidt W, eds. *Proteolysis in wound repair*. 1st ed. Berlin: Springer-Verlag, 1996:21-34.
- Robinson BH. The role of manganese superoxide dismutase in health and disease. *J Inherit Metab Dis* Aug 1998;21(5):598-603.
- Scholl D, Langkamp-Henken B. Nutrient recommendations for wound healing. *J Intraven Nurs* 2001 Mar-Apr;24(2):124-32.
- Singer AJ, Clark RAF. Mechanisms of disease: cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738-46.
- Tenaud I, Sainte-Marie I, Jumbou O, Litoux P, Dreno B. In vitro modulation of keratinocyte wound healing integrins by zinc, copper and manganese. *Br J Dermatol* Jan 1999;140(1):26-34.
- Wilkinson E, Hawke C. Zinc and chronic leg ulcers: a systematic review of oral zinc in the treatment of chronic leg ulcers. *J Tissue Viability* Jan 1999;9(1):21.

**3** estimulantes iónicos

**TRIONIC\***  
Reservorio de Zn-Ca-Mn



**Acelera el proceso de cicatrización**



**Johnson & Johnson**  
**Wound Management**

Contacta con nosotros en: [actisorbplus25@cscs.jnj.com](mailto:actisorbplus25@cscs.jnj.com)  
o regístrate en: [www.jnjgateway.com](http://www.jnjgateway.com)  
Oficina CENTRAL: tel.: 91 722 83 23 • fax: 91 722 83 54  
Servicio a CLIENTES: tel.: 91 722 83 09 • fax: 91 722 83 06