
Mecanismos implicados en la regulación de la fibrosis cutánea: Galectina-3

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO 3139 EN MEDICINA



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Doctoranda: Miriam Alonso Carpio

Directores: Dr. Severiano Marín Bertolín

Dr. Julio Cortijo Gimeno

Valencia, marzo 2024



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Cirugía
Programa de doctorado: 3139 Medicina

Mecanismos implicados en la regulación de la fibrosis cutánea: Galectina-3

Tesis Doctoral presentada por:

Miriam Alonso Carpio

Dirigida por:

Dr. Severiano Marín Bertolín

Dr. Julio Cortijo Gimeno

Valencia, marzo 2024

DR. D. SEVERIANO MARÍN BERTOLÍN, N.I.F. 22688497-D, Doctor en Medicina, jefe de Servicio de Cirugía Plástica, Reparadora y Estética del Consorci Hospital General Universitari de València, Profesor asociado del Departament de Cirurgia de la Universitat de València.

DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO, N.I.F.22520597-D, Catedrático Numerario de Universidad, Departament de Farmacologia de la Universitat de València.

CERTIFICAN

Que la graduada en Medicina por la Facultat de Medicina – Universitat de València, MIRIAM ALONSO CARPIO ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral titulada “MECANISMOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA FIBROSIS CUTÁNEA: GALECTINA-3” que se presenta en esta memoria, y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación, para optar al grado de Doctora en Medicina, por la Universitat de València.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado.

En Valencia, enero de 2024.

DR. D. SEVERIANO MARÍN BERTOLÍN

SEVERIANO
O|MARIN|
BERTOLIN

Firmado digitalmente por SEVERIANO| MARIN|BERTOLIN
Fecha: 2024.01.19 16:52:21 +01'00'

DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO

JULIO
FRANCISCO
O|CORTIJO|
GIMENO

Firmado digitalmente por JULIO FRANCISCO| CORTIJO|GIMENO
Fecha: 2024.01.18 21:30:25 +01'00'

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que me apoyan y celebran conmigo cada sueño, proyecto y decisión.

A mi familia, en especial a mamá, a papá y mi hermana Sari, por quererme, por haberme dado todo y enseñarme a volar alto, tanto como yo quiera. A mis amigas y amigos, los de toda la vida y las que son como si lo fueran, la familia que he elegido, por incondicionalmente compartir conmigo cada atrevimiento o emoción. A la música, por la magia que nos da y nos dará siempre. A la suerte, por pillarme siempre trabajando...

A todas y todos mis profesores y profesoras, médicos, médicas, cirujanas y cirujanos que me han regalado su tiempo en el camino, así como a los que ahora me enseñan a ser cada día un poquito mejor. Al Dr. Severiano Marín, por ser mi maestro, causa y efecto de que adore mi profesión, por confiar en mí y ayudarme siempre. Al Dr. Julio Cortijo, y todo su equipo del laboratorio, por su tiempo, carisma y dedicación – Gracias por permitirme formar parte de esta gran oportunidad.

*“Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas”
Santiago Ramón y Cajal*

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Agradecimientos.....	6
Índice.....	10
Abreviaturas.....	14
Resumen.....	19
1. Introducción.....	24
1.1. La piel.....	26
1.2. Cicatrización normal de la piel.....	29
1.2.1. Fases de la cicatrización normal.....	29
1. Fase de hemostasia.....	29
2. Fase inflamatoria de la cicatrización.....	30
Neutrófilos.....	31
Mediadores de la inflamación.....	33
3. Fase proliferativa de la cicatrización.....	35
Macrófagos.....	35
1.3. Regulación de la cicatrización.....	38
Factores de crecimiento.....	38
Factor Transformante β (Transforming Growth Factor β , TGF β).....	39
Fibroblastos, matriz extracelular y curación mediante formación de cicatrices.....	41
1.4. Cicatrización patológica y fibrosis cutánea.....	44
1.5. La Galectina-3.....	55
2. Metodología.....	69
2.1. Cultivos celulares.....	71
2.2. Muestras de piel humana: tejido sano y queloides.....	72
2.3. Modelo animal de fibrosis cutánea.....	73
2.4. RT-PCR en tiempo real.....	74
2.5. Estudios Histológicos, Inmunohistoquímicos e Inmunofluorescencia.....	77
2.6. Western blot.....	81
2.7. ELISA.....	84
2.8. Análisis estadístico.....	85
3. Resultados.....	87
3.1. Expresión de GAL-3 en modelos <i>in vitro</i> de fibrosis cutánea estimulación TGFβ1.....	89
3.1.1. Modelo de transición fibroblasto a miofibroblasto.....	89
3.1.2. Modelo de fibrocitos humanos.....	90
3.2 Expresión de GAL-3 en modelos <i>in vivo</i>.....	90
3.2.1. Expresión de GAL-3 en modelos murinos de fibrosis cutánea.....	90
3.3 Expresión de GAL-3 en muestras de cicatrices queloides de humanos.....	94
3.3.1. Expresión de marcadores fibróticos en muestras de queloides humanos.....	94
3.3.2. Expresión de GAL-3 en muestras de queloides humanos.....	95
4. Discusión.....	98
5. Conclusiones.....	106
6. Referencias bibliográficas.....	110
7. Anexo.....	133

ABREVIATURAS

Abreviaturas

- AA: ácido araquidónico
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ARN: ácido ribonucleico
- ARNm: ARN mensajero
- α -SMA: actina α del músculo liso (*α -smooth muscle actin*)
- BSA: albúmina de suero bovino
- BT: braquiterapia
- CHGUV: Consorcio Hospital General Universitario de Valencia
- COL1: colágeno
- CRD: dominio de reconocimiento de carbohidratos
- CRGF: factor de crecimiento de tejido conectivo profibrótico
- CTGF: connective tissue growth factor
- DAB: 3,3'-Diaminobenzidine
- DMEM: medio de Eagle modificado de Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- EA: enfermedad de Alzheimer
- ECM: matriz extracelular (*extracellular matrix*)
- EGF- α : factor de crecimiento epidérmico α
- ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assays*
- EPC: células progenitoras endoteliales
- ERC: enfermedad renal crónica
- ES: esclerosis sistémica
- ESD: esclerosis sistémica difusa
- ESL: esclerosis sistémica limitada
- FGF: factor de crecimiento de fibroblastos
- Fn-EDA y Fn-EDB: fibronectinas
- FPI: fibrosis pulmonar idiopática
- FSAS: fenotipo secretor asociado a la senescencia
- GAL-3: galectina-3
- HiF-1 α : factor 1 α inducible por hipoxia
- H₂O₂: peróxido de hidrógeno
- HOCl: hipoclorito
- HRP: anticuerpo secundario de burro anti-ratón IgG-peroxidasa
- ICAM-1: molécula de adherencia intercelular 1
- IFN- γ : interferón γ
- IGFBP3: factor de crecimiento similar a la insulina
- IGF-I: factor de crecimiento similar a la insulina I

IL-1, IL-8: interleucina-1, interleucina-8

KGF: factor de crecimiento de los queratinocitos

LAP: péptido asociado latente

LFA: *lymphocyte function-associated antigen-1* (CD11a/CD18)

LLC: complejo grande de latencia

LTB 4: leucotrieno B4

LTBP: proteína de unión latente al TGF β

MAC-1: *macrophage-1 antigen* (CD11b/CD18)

MCP-1: *monocyte chemoattractant protein-1*

MMP: metaloproteinasas de la matriz

MPO: mieloperoxidasa

MSH: hormona estimulante de los melanocitos

NASH: esteatohepatitis no alcohólica (*Nonalcoholic steatohepatitis*)

N-CAM: molécula de adhesión celular neutra

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa

OH: hidroxilo

PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1

PBS: solución salina tamponada con fosfato

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*)

PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas

Q-PCR: PCR cuantitativa

ROS: *reactive oxygen species*

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (*reverse transcription polymerase chain reaction*)

SSc: esclerodermia sistémica

TCMH: trasplante de células madre hematopoyéticas

TEM, EMT: transición epitelio-mesenquimatosa

TGF- α : factor de crecimiento transformante α

TGF- β : factor de crecimiento transformante β

TLRs: receptores tipo Toll (o *Toll-like receptor*)

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

tPA: activador del plasminógeno tisular

uPA: activador del plasminógeno uroquinasa

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

Resumen Tesis Doctoral

“Mecanismos implicados en la regulación de la fibrosis cutánea: Galectina-3”

Introducción

Como mecanismo de respuesta ante cualquier injuria que altere la continuidad de la superficie cutánea y que afecte a la dermis, se activan mecanismos de reparación. En el desarrollo de la cicatrización de la piel se diferencian fases: fase de coagulación, inflamatoria, proliferativa y de maduración. La consecuencia última y normal es la formación de una cicatriz. Existen trastornos en los procesos de remodelación tisular y cicatrización cutánea, que dan lugar a patologías inflamatorias crónicas, fibrosis cutánea y/o cicatrices hipertróficas y queloides. El tratamiento de este último desorden fibroproliferativo de la dermis continúa siendo un reto tanto farmacológico como quirúrgico, pues todavía no existe un tratamiento específico efectivo, y con la escisión quirúrgica las probabilidades de recidiva son elevadas.

En los últimos años, la galectina-3 (GAL-3) ha emergido como un regulador central de la inflamación crónica y la fibrosis tisular. GAL-3 es un miembro de la familia de lectinas de unión a β -galactosidasa. GAL-3 está involucrada en interacciones intercelulares y de célula a matriz y participa en múltiples procesos biológicos cruciales, como proliferación celular, adhesión, diferenciación, angiogénesis, regulación de apoptosis, inflamación, defensa del huésped y fibrosis. GAL-3 se encuentra ampliamente distribuida en toda la anatomía. Entre sus múltiples funciones, se ha descrito un papel profibrótico en numerosos órganos. Particularmente en la piel, GAL-3 se expresa en los queratinocitos, glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas asociadas con folículos pilosos, en la matriz extracelular de la dermis, células de Langerhans, mastocitos, melanocitos y en fibroblastos. Por este motivo, GAL-3 se ha descrito como un mediador clave en múltiples enfermedades fibroproliferativas de la piel y es considerada un objetivo terapéutico importante en la fisiopatología de la fibrosis cutánea.

Metodología

Este proyecto pretende analizar el papel de GAL-3 en la piel y en la fibrosis cutánea. En primer lugar, se ha evaluado la expresión de GAL-3 en modelos *in vitro* relevantes de fibrosis cutánea, como el cultivo de células fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF), el cultivo de células de fibrocitos humanos y el cultivo de células de piel 3D, estimulándolas con el factor profibrótico TGF β 1. Posteriormente, se ha evaluado la expresión de GAL-3 en un modelo murino

in vivo de fibrosis cutánea y en biopsias humanas de tejido sano y queloides. Se ha realizado un estudio histológico, inmunohistoquímico y de inmunofluorescencia de fibroblastos de muestras de queloides, así como análisis Western blotting y ELISA.

Resultados

Los resultados indican que la expresión de GAL-3 aumenta en modelos *in vitro* de fibrosis cutánea, en cultivos de NHDF y en cultivos de fibrocitos humanos, tras la estimulación de TGF β 1. En el modelo *in vivo*, modelo murino de fibrosis cutánea, tanto los genes como la expresión de la proteína GAL-3, aumenta de forma significativa. La expresión del gen GAL-3 y los niveles de proteína GAL-3 están aumentadas en el tejido queloide. El TGF β 1 aumenta la expresión de la proteína α -SMA, del colágeno tipo 1 y del factor de crecimiento de tejido conectivo en cultivos de NHDF. En modelos murinos de fibrosis cutánea, la expresión génica de los marcadores TGF β 1, α -SMA, Col-1, fibronectina y pERK1/2 está aumentada en el grupo de ratones tratados con hipoclorito. α -SMA y la expresión de los genes del colágeno tipo-1 aumenta también en los queloides.

Conclusión

La estimulación mediante TGF β aumenta la expresión de GAL-3 en modelos murinos de fibrosis cutánea, así como en cultivos de fibrocitos humanos. El TGF β 1 aumenta la expresión de la proteína α -SMA, del colágeno tipo 1 y del factor de crecimiento de tejido conectivo en cultivos de NHDF. GAL-3 está aumentada en el tejido queloide. TGF β 1, α -SMA, Col-1, fibronectina y pERK1/2 están aumentados en modelos murinos de fibrosis cutánea.

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. La piel

La piel constituye el órgano más extenso del cuerpo humano con una función primordial de protección, termorregulación, inmunológica y metabólica, con una cinética de renovación constante. Histológicamente, se divide en tres capas. De más superficial a profunda se distinguen las siguientes capas (Fig.1) (Fig. 2):

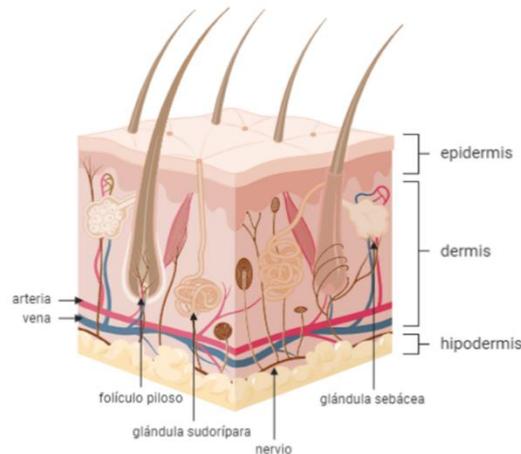


Figura 1. Estructura esquemática de la piel; epidermis, dermis, hipodermis. Creada con BioRender

- **Epidermis:** La capa más externa de la piel, conocida como la epidermis, está compuesta por un tipo de tejido epitelial llamado epitelio escamoso poliestratificado, sin vasos ni nervios. Esta capa consta de varios tipos de células, siendo los queratinocitos los más abundantes, representando alrededor del 90-95% del total. Estas células experimentan un proceso de diferenciación conocido como queratinización a medida que se desplazan desde la capa basal, la más interna, hasta el estrato córneo, que es la capa más externa de la epidermis. Este proceso de diferenciación conlleva la transformación de los queratinocitos en células escamosas anucleadas, llamadas corneocitos, que conforman finalmente el estrato córneo de la epidermis. En otras palabras, los queratinocitos experimentan una serie de cambios en su estructura y composición a medida que migran hacia la superficie de la piel, lo que resulta en la formación de una capa protectora de células muertas y queratinizadas en la capa más externa de la piel. Esta capa, el estrato córneo, es esencial para la función de barrera de la piel y su protección contra factores externos (1). Así pues, la epidermis se divide en 4 o 5 capas dependiendo de la zona anatómica del cuerpo:

- **Capa córnea** superficial: se encuentran células muertas queratinizadas, sin núcleo.
 - **Estrato granuloso**: Aparecen queratinocitos con gránulos de queratohialina y cuerpos de Odland (lípidos y proteínas necesarios para la función barrera de la epidermis).
 - **Estrato espinoso**: Se encuentran células con desmosomas que bajo microscopía electrónica tienen aspecto estrellado o de espinas. En esta capa también aparecen células de Langerhans, células dendríticas derivadas del mesoderm, que actúan como células presentadoras de antígenos.
 - **Capa basal**: Se encuentran las células con capacidad para proliferar y diferenciarse en queratinocitos que van madurando hasta la capa córnea. También aparecen melanocitos (células dendríticas derivadas de la cresta neural cuya principal función es la producción de melanina a través de la melanogénesis) y células de Merkel (células de origen neuroectodérmico que actúan como receptores táctiles que sintetizan factores activos localmente) (1).
-
- **Unión dermo-epidérmica**: se trata de la zona de transición entre epidermis y dermis, formada por prolongaciones citoplasmáticas de queratinocitos basales, hemidesmosomas, la lámina lúcida y lámina densa de la membrana basal y tonofibrillas de la dermis papilar (1).

 - **Dermis**: La dermis constituye una capa de tejido conectivo de notable espesor. Deriva del mesodermo. Se encuentra situada inmediatamente debajo de la epidermis, desempeñando un papel de suma relevancia en la estructura y función de la piel. Esta capa dérmica se compone, en su mayoría, de fibras de colágeno y elastina, proteínas que le confieren resistencia y flexibilidad, respectivamente. La dermis es, esencialmente, matriz extracelular y colágeno, con un componente celular escaso de fibroblastos y células inflamatorias. Esta capa sí contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. De estas fibras son las de colágeno las que predominan de manera destacada, representando más del 90% del tejido dérmico, y se componen principalmente de colágeno tipo I y colágeno tipo III (1).

La dermis se subdivide en dos capas distintas: la dermis papilar, la cual se encuentra inmediatamente adyacente a la epidermis, y la dermis reticular. La dermis papilar se caracteriza por su mayor densidad celular y está formada por una malla fina de haces de colágeno. Por su parte, la dermis reticular, la capa más profunda, está compuesta por haces de colágeno más gruesos dispuestos de manera paralela a la superficie cutánea. (Fig. 3). Dentro de la dermis, podemos identificar una variedad de tipos celulares, entre los que se incluyen los fibroblastos, responsables de la producción de colágeno y elastina, los dendrocitos dérmicos, que participan en la respuesta inmunológica de la piel, y los mastocitos, que desempeñan un papel en las reacciones inflamatorias y las respuestas alérgicas. Además, la dermis alberga vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas que desempeñan un papel vital en la circulación sanguínea y la percepción sensorial de la piel. En su conjunto, la dermis representa un componente esencial de la piel que brinda soporte, resistencia y funcionalidad a este órgano crítico en el organismo humano (2).

- **Hipodermis:** La capa más profunda constituida por adipocitos, corpúsculos sensoriales y anejos cutáneos (folículos pilosos y glándulas sudoríparas). Esta capa desempeña un papel importante en la termorregulación y el suministro de energía (1).

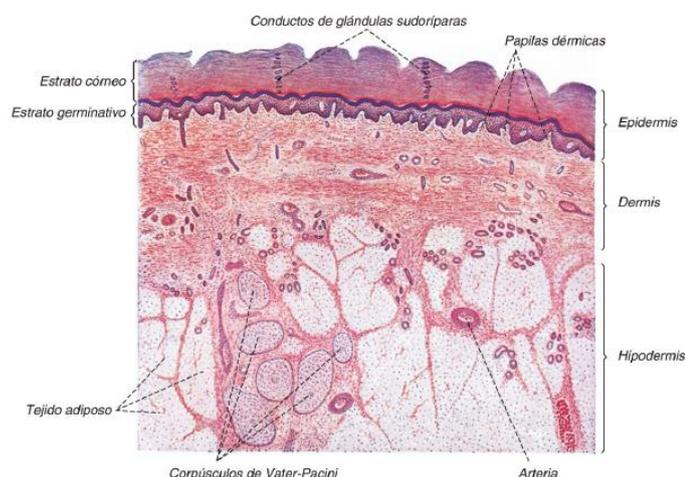


Figura 2. Capas de la piel de la palma de la mano humana, tinción hematoxilina-eosina; 18x. La epidermis se divide en la capa córnea superficial y las capas celulares subyacentes (estrato basal, estrato espinoso y estrato granuloso). La dermis de tejido conjuntivo está interdigitada con la epidermis a través de sus papilas (capa papilar); la capa reticular de la dermis, contiene en su límite con la hipodermis la mayor parte de las glándulas y los vasos sanguíneos. La hipodermis de tejido subcutáneo contiene principalmente tejido adiposo en el cual se encuentran algunos corpúsculos sensoriales. Imagen adaptada de Sobotta J. Atlas and epitome of human histology and microscopic anatomy. Huber GC, editor. Whitefish, MT, Estados Unidos de América: Kessinger Publishing; 2010 (3).

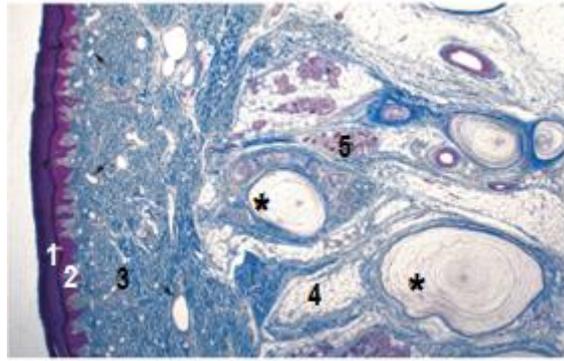


Figura 3. Piel del pulpejo de un dedo de la mano, tinción Tricrómica de Masson; 25 x: 1) Epidermis; 2) Capa papilar; 3) Capa reticular; 4) Tejido adiposo; 5) Glándula sudorípara ecrina. *) Corpúsculos laminares de Vater-Pacini. →) Vasos sanguíneos en la dermis. Imagen adaptada de Sobotta J. Atlas and epitome of human histology and microscopic anatomy. Huber GC, editor. Whitefish, MT, Estados Unidos de América: Kessinger Publishing; 2010 (3).

1.2. Cicatrización normal de la piel

El proceso de cicatrización normal de la piel comprende una serie de respuestas ante estímulos y señales derivadas del propio tejido lesionado y de un microambiente proinflamatorio generado en la propia herida. A continuación, se resumen dichas fases superpuestas de las cuales se deriva la cicatrización de las heridas (4).

1.2.1. Fases de la cicatrización normal

1. Fase de hemostasia

Los procesos biológicos que definen la evolución de la cicatrización comienzan con la hemostasia, primer paso para mantener el sangrado tras la lesión aguda de los vasos sanguíneos mediante la vasoconstricción y la formación de un coágulo de plaquetas y fibrina. La cascada de coagulación se activa mediante un daño vascular que supone la exposición de los componentes sanguíneos a los componentes subendoteliales de la pared vascular (Fig. 4).

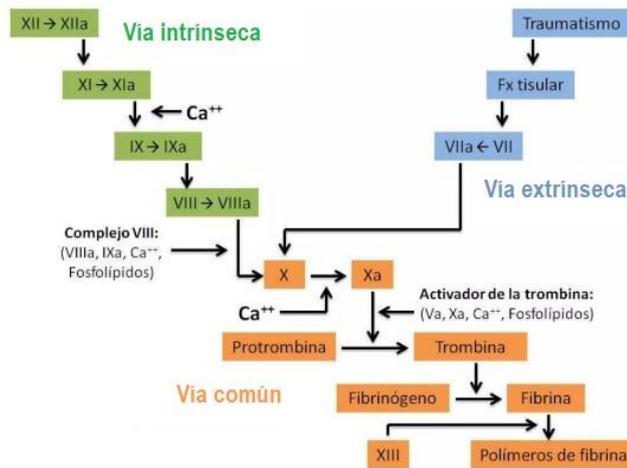


Figura 4. Esquema vía intrínseca, extrínseca y común de la coagulación, para la formación del coágulo de fibrina.

2. Fase inflamatoria de la cicatrización

La inflamación aguda supone una serie de respuestas rápidas activadas a través de mediadores químicos producidos en el propio tejido lesionado. Esencialmente se producen alteraciones en la permeabilidad y calibre vascular que aumentan el flujo sanguíneo y suscitan la salida de líquido plasmático y proteínas al espacio extravascular, así como la emigración al foco de lesión y activación de los leucocitos, y otras células implicadas, para la reparación del tejido cutáneo.

En cuestión de horas tras la formación del trombo plaquetario, se produce el proceso de reclutamiento de los leucocitos, lo que se conoce como transmigración de los leucocitos o diapédesis. Un gran número de neutrófilos se extravasan a través de la pared endotelial de las vénulas postcapilares hacia el sitio de la lesión. Las citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interferón γ (IFN- γ) y las quimiocinas tales como IL-8 y MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*), producidas en primera instancia por el propio endotelio, inducen la expresión de moléculas de adhesión necesarias para la unión de las integrinas expresadas en la superficie de los neutrófilos, como LFA (*Lymphocyte function-associated antigen-1*) (CD11a/CD18) o MAC-1 (*Macrophage-1 antigen*) (CD11b/CD18).

Tras abandonar la circulación, los leucocitos migran por los tejidos hacia el foco de lesión a favor de gradiente químico por quimiotaxis. Las quimiotaxinas endógenas incluyen diversos mediadores como quimiocinas (p. ej., IL-8), componentes del sistema del complemento (sobre todo C5a, y 3) metabolitos del ácido araquidónico (AA), sobre todo leucotrieno B4 (LTB 4). (Fig.5)

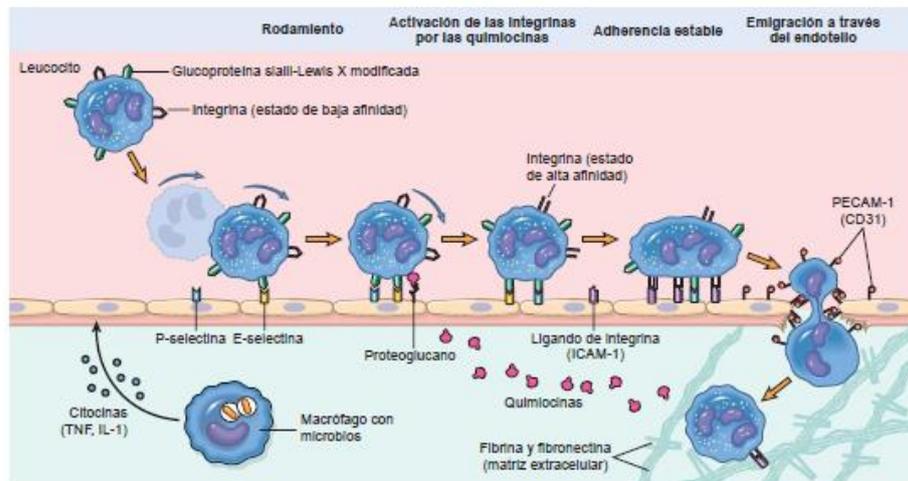


Figura 5. En este esquema se representa el proceso de diapédesis de los neutrófilos a través de las uniones interepiteliales. Se produce la unión a selectinas en el rodamiento, la adhesión de integrinas con su ligando molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), y a CD31 (PECAM-1) en la transmigración, atraviesan la membrana basal y migran hacia las quimiotaxinas (ligadas a los proteoglicanos) que se originan en el lugar de la lesión. Imagen adaptada de Robbins y Cotran. *Patología estructural y funcional*. 10th. ed. Elsevier España; 2021. (4)

Más adelante en el texto se nombrará la función y las células productoras de los mediadores de la inflamación más relevantes. La naturaleza del infiltrado leucocitario sufre modificaciones según el momento de la respuesta inflamatoria, así como el tipo de estímulo. Durante las primeras 24 horas de la inflamación, el neutrófilo es la célula predominante. A las 24-48 horas, éstos serán sustituidos por monocitos/macrófagos.

Neutrófilos

Estos leucocitos juegan un papel primordial en la respuesta inflamatoria provocada tras una lesión en la piel. Los neutrófilos tienen una amplia variedad de funciones, entre las cuales destacan la fagocitosis de los agentes infecciosos y la limpieza del tejido desvitalizado. Para ello, expresan receptores que reconocen estímulos externos y emiten señales activadoras:

- **Receptores tipo Toll (o Toll-like receptor TLRs)**, glicoproteínas transmembranas las cuales desempeñan papeles esenciales en las respuestas celulares frente a lipopolisacáridos bacterianos o ARN de doble cadena producido por algunos virus.
- **Receptores acoplados a la proteína G**, que reconocen péptidos bacterianos, los cuales contienen residuos N -formilmetionil, así como otros receptores acoplados a la proteína G que reconocen quimiocinas, productos de degradación del complemento y mediadores lipídicos, incluidos el factor activador de las plaquetas (PDGF), las prostaglandinas y los leucotrienos.
- **Receptores para las opsoninas**, sustancias que incluyen anticuerpos, proteínas del complemento y lectinas cuya función trata de recubrir una partícula, como un microbio, para señalarla para la fagocitosis.

El proceso de la fagocitosis es complejo e implica la integración de muchas señales iniciadas por un receptor para conseguir el remodelamiento de la membrana y cambios en el citoesqueleto. Cuando una partícula se liga a los receptores de los fagocitos, se produce su atrapamiento mediante la invaginación de la membrana celular y se incorpora al fagosoma intracelular, que luego se fusiona con un gránulo lisosómico, con la consiguiente liberación de los contenidos del gránulo hacia el fagolisosoma. En respuesta a los estímulos activadores, los componentes citosólicos del complejo enzimático NADPH oxidasa (llamada fagocito-oxidasa), se traslocan a la membrana del fagosoma, donde se ensamblan y dan lugar a un complejo enzimático funcional, que oxida la NADPH y, durante este proceso, reduce el oxígeno a anión superóxido. Por tanto, es dentro del lisosoma donde se producen las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés, *reactive oxygen species*). Entonces, el anión superóxido se convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mediante dismutación espontánea. Por otra parte, los gránulos azurófilos de los neutrófilos contienen la enzima mieloperoxidasa (MPO), que, en presencia de haluros como el cloro, convierte H_2O_2 en hipoclorito. El sistema H_2O_2 -MPO-cloruro es el sistema bactericida más eficiente de los neutrófilos. H_2O_2 se convierte también a radical hidroxilo ($\bullet OH$), otro potente agente destructivo. El óxido nítrico (NO), producido a partir de la arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), participa también en la destrucción de los microbios (Fig. 6).

Secuencialmente, los neutrófilos pueden activar más leucocitos para amplificar la respuesta inflamatoria y modificar la función de los macrófagos, y, por tanto, regular la respuesta inmunitaria innata durante la cicatrización de las heridas (5).

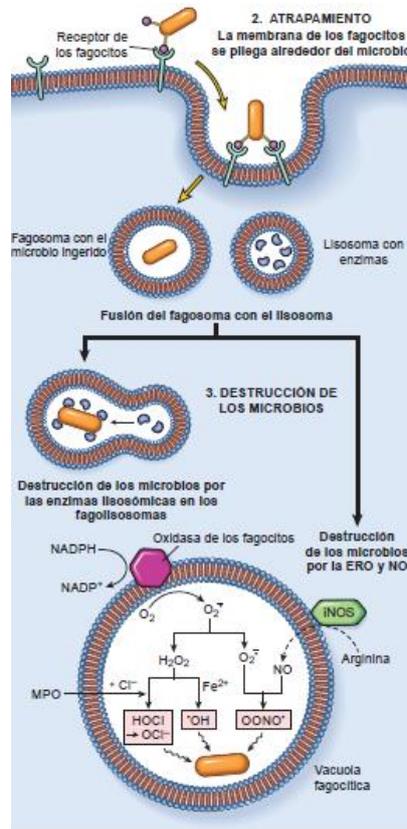


Figura 6. En este esquema se resume el proceso de destrucción intracelular de una partícula dentro de los fagolisosomas por las enzimas lisosómicas y las especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno. Los productos microbicidas generados a partir del superóxido son el hipoclorito y el radical hidroxilo, y a partir del óxido nítrico (NO) el peroxinitrito. Imagen adaptada de Robbins y Cotran. *Patología estructural y funcional*. 10th. ed. Elsevier España; 2021 (4).

Mediadores de la inflamación

Toda la secuencia de acontecimientos que suponen la producción de la respuesta inflamatoria inicial, fase aguda y común del proceso de cicatrización, se lleva a cabo mediante mediadores químicos responsables de estas reacciones.

Los mediadores se generan a partir de células o de proteínas plasmáticas, tales como plaquetas, neutrófilos, monocitos/macrófagos y mastocitos, células del endotelio, y fibroblastos. Los mediadores de origen celular se encuentran en gránulos intracelulares y se pueden secretar mediante exocitosis de los gránulos o sintetizarse *de novo* (6).

Su célula de origen y su acción se resumen en la Tabla 1. Asimismo, existen mediadores derivados de las proteínas plasmáticas, pertenecientes a tres sistemas interrelacionados: 1) el sistema del complemento, que actúa en la inmunidad innata y adaptativa para la defensa frente a los patógenos bacterianos, proceso en el cual se elaboran productos de degradación de las proteínas del complemento, que aumentan la permeabilidad vascular e inducen quimiotaxis y opsonización; 2) La bradicinina, que aumenta la permeabilidad vascular e induce la contracción del músculo liso, la dilatación de los vasos y el dolor; 3) La vía intrínseca y extrínseca de la coagulación.

Mediador	Célula productora	Función
Histamina	Mastocito	Vasodilatación y aumento permeabilidad vascular
Serotonina	Plaquetas y células neuroendocrinas	Aumento permeabilidad vascular Vinculación entre coagulación e inflamación
Prostaglandinas	Mastocitos, macrófagos, células endoteliales	Vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria Dolor y fiebre
Tromboxano (TxA ₂)	Plaquetas	Agregación plaquetaria y vasoconstricción
Leucotrienos	Leucocitos (neutrófilo 5-lipooxigenasa)	Vasoconstricción, broncoespasmo, agregación y adherencia al endotelio Aumento permeabilidad vascular
Lipoxina	Plaquetas	Inhibición de la inflamación: del reclutamiento de los leucocitos, quimiotaxis de neutrófilos y adherencia al endotelio
Factor activador de las plaquetas (PAF)	Plaquetas, basófilos, mastocitos, neutrófilos, macrófagos y las células endoteliales	Agregación plaquetaria, vasoconstricción y broncoconstricción
Especies reactivas del oxígeno	Leucocitos	Fagocitosis, inactivación de antiproteasas, lesión de células endoteliales Aumento de permeabilidad vascular
Óxido nítrico (NO)	Neutrófilos y macrófagos, células endoteliales	Inhibición de las respuestas inflamatorias: de la agregación y la adherencia plaquetaria Vasodilatación
Citocinas IL-1, IL-6, TNF- α (7) y quimiocinas	Macrófagos activados	Inducción de reacciones de fase aguda sistémicas
Citocinas IL-12, IL-17, INF- γ	Macrófagos, células dendríticas, linfocitos T	Inflamación crónica
Gránulos lisosómicos	Lisosomas de los leucocitos (neutrófilo, monocito).	Gránulos específicos: lisozima, colagenasa, gelatinasa, lactoferrina, activador del plasminógeno, histaminasa y fosfatasa alcalina. Gránulos azurófilos: mieloperoxidasa, lisozima, defensinas, hidrolasas ácidas y proteasas neutras (elastasa, catepsina G, colagenasas inespecíficas, proteinasa 3).

Tabla 1. Se resumen los mediadores de la inflamación de origen celular más importantes, su origen y función.

3. Fase proliferativa de la cicatrización

La fase proliferativa comienza aproximadamente desde dos días después del momento de la lesión hasta tres semanas después, solapándose con la fase inflamatoria. El trombo de fibrina, formado durante la fase de hemostasia, es degradado por los macrófagos y sustituido por tejido conectivo muy bien perfundido. Los macrófagos activados producen también citocinas que inducen al fibroblasto a producir factores de crecimiento para la angiogénesis, influjo de fibroblastos y síntesis de la matriz extracelular y migración y proliferación de los queratinocitos para la re-epitelización (4).

Macrófagos

Los macrófagos representan el tipo celular predominante en el proceso de cicatrización de tres a cinco días después de la lesión inicial. Aunque en los tejidos dañados se pueden encontrar macrófagos residentes, la mayoría de los macrófagos son reclutados de la circulación periférica. (Fig. 7) La extravasación de los monocitos se facilita por los mismos factores implicados en la emigración de los neutrófilos, la interacción entre las moléculas de adhesión e integrinas del monocito, en presencia de factores de crecimiento, proteínas quimiotácticas y citocinas proinflamatorias. La fuente de estos quimioatrayentes incluye los leucocitos del sitio de la herida, las plaquetas del trombo plaquetario, queratinocitos del borde de la herida y fibroblastos hiperproliferativos. (4)

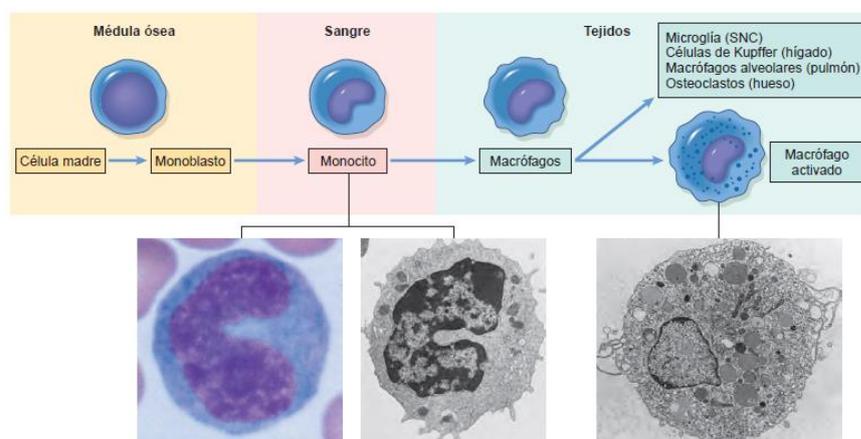


Figura 7. Maduración de los fagocitos mononucleares. Imagen adaptada de Robbins y Cotran. *Patología estructural y funcional*. 10th. ed. Elsevier España; 2021. (4)

Una vez se encuentra en el tejido de la herida, los macrófagos cumplen funciones de células presentadoras de antígenos y de fagocitosis de células muertas y detritus. Asimismo, los macrófagos liberan factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento transformante α (TGF- α), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), que promoverán la cicatrización, mediante la proliferación celular, angiogénesis, síntesis de colágeno, y síntesis de la matriz extracelular (ECM) (Fig. 8).

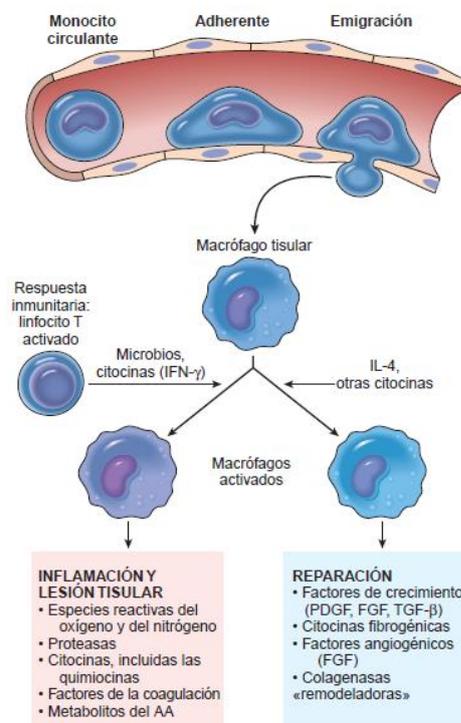


Figura 8. Funciones del macrófago activado en la inflamación crónica. Los macrófagos se activan por estímulos no inmunológicos, como las endotoxinas, o por citocinas producidas por los linfocitos T (IFN- γ) y cumplen funciones de fagocitosis y reparación y cicatrización. Imagen adaptada de Robbins y Cotran. *Patología estructural y funcional*. 10th. ed. Elsevier España;2021.(4)

Los macrófagos han emergido como un conductor primordial de la reparación cutánea eficiente. Los macrófagos pueden diferenciarse en fenotipos proinflamatorios (M1) o antiinflamatorios reparativos (M2), según distintos estímulos. Los macrófagos activados por la vía clásica (M1) que responden a los productos microbianos y las citocinas de los linfocitos T como IFN- γ , realizan una importante actividad microbicida,

mientras que los macrófagos activados de forma alternativa (M2) que responden a citocinas como IL-4 e IL-13, participan principalmente en la reparación tisular y la fibrosis. La población de macrófagos que participan en primera instancia en la inflamación podría cambiar su fenotipo a uno más antiinflamatorio y asumir el rol de resolverla. El estado inflamatorio persistente de los macrófagos en heridas crónicas, podría ser causado por el deterioro de la capacidad de estas células para fagocitar células apoptóticas y la inhabilidad de virar de un fenotipo M1 a M2 (Fig. 9) (5).

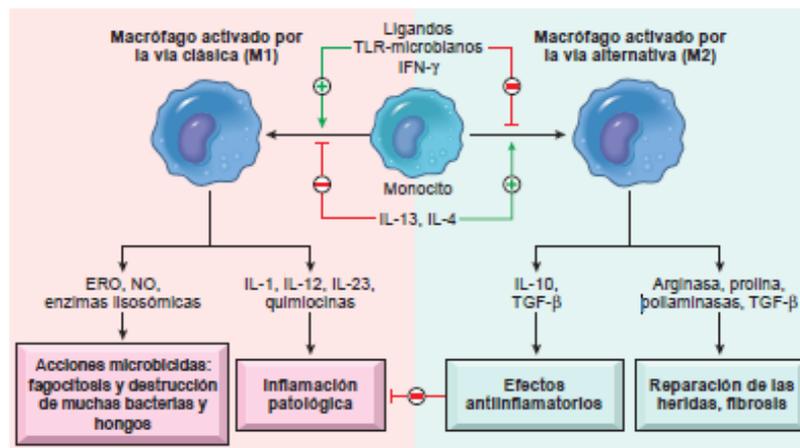


Figura 9. Subgrupos de macrófagos activados. Distintos estímulos activan los monocitos/macrófagos para que se conviertan en poblaciones distintas a nivel funcional. Los macrófagos activados de forma clásica (M1) son inducidos por microbios y citocinas como IFN- γ y cumplen acciones microbicidas e inflamación persistente. Los macrófagos activados por la vía alternativa (M2) son inducidos por otras citocinas y participan en la resolución de la inflamación y reparación tisular. Imagen adaptada de Robbins y Cotran. *Patología estructural y funcional*. 10th. ed. Elsevier España;2021 (4).

Todo este potente sistema de inflamación y cicatrización posee asimismo una **regulación estrecha** con el fin de no provocar lesiones tisulares secundarias no deseadas. En ausencia de patología, los mediadores inflamatorios se producen en brotes mientras persiste el estímulo, su semivida es corta, y se degradan tras su liberación. La vida media de los neutrófilos en los tejidos también es corta, sufriendo apoptosis mueren a las pocas horas de salir de la sangre. Además, la propia reacción que desarrolla la respuesta inflamatoria activa señales que inducen un cambio del tipo de metabolitos del ácido araquidónico elaborados, que pasan de los leucotrienos proinflamatorios a las lipoxinas antiinflamatorias y la liberación de citocinas antiinflamatorias, como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) o la IL-10 (8).

1.3. Regulación de la cicatrización

Las reacciones inflamatorias agudas pueden evolucionar según diversas variables, incluida la intensidad y naturaleza de la lesión, el tipo de tejido afectado y la capacidad o incapacidad de la respuesta inflamatoria y cicatrización inherente al individuo. El proceso puede llevar a la **resolución completa** del foco de inflamación y la recuperación de la normalidad tras la regeneración celular del tejido, cuando la agresión es limitada y las células parenquimatosas tienen la capacidad sustituir los tejidos dañados por otros nuevos que deberán cumplir la misma función. Por el contrario, la progresión a **inflamación crónica** se produce cuando no se consigue resolver la respuesta aguda, bien por persistencia del agente lesivo o por alguna interferencia con el proceso de curación normal. Tras una destrucción tisular considerada o una lesión en tejidos que no se pueden regenerar, como por ejemplo son las lesiones que afectan a la dermis, se produce la **cicatrización y sustitución por tejido conjuntivo (fibrosis)** (5).

Factores de crecimiento

Durante la cicatrización de las heridas de la piel, y en general para la regulación de la inflamación y proliferación de muchos tipos celulares, se producen polipéptidos conocidos como factores de crecimiento, que actúan como ligandos que transmiten señales a las células diana, estimulando la transcripción de genes que participan y regulan todos los procesos de reparación tisular. (9) En la Tabla 2 se resumen los factores de crecimiento y sus funciones más importantes en la cicatrización cutánea.

Factor de crecimiento	Célula productora	Función
Factor de necrosis tumoral (TNF)	Macrófagos, linfocitos T	Proinflamación: ↑ Moléculas de adhesión endotelial, ↑ otros mediadores, apoptosis, proliferación celular, activa leucocitos
Factor de crecimiento epidérmico α (EGF) (Fig. 10)	Macrófagos, plaquetas, queratinocitos	Estimula producción de queratinocitos y fibroblastos y tejido de granulación
Factor de crecimiento transformante α (TGF- α)	Macrófagos, linfocitos T, queratinocitos y muchos tejidos	Estimula producción de queratinocitos, fibroblastos y tejido de granulación y células epiteliales
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Macrófagos, plaquetas, queratinocitos, y células mesangiales; células tumorales	Angiogénesis, ↑ permeabilidad vascular, estimula células endoteliales, vasodilatación

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)	Plaquetas, macrófagos, células endoteliales, queratinocitos, células musculares lisas	Quimiotaxis y activación neutrófilos, macrófagos, fibroblastos. Estimula la producción de metaloproteinasas de la matriz (MMP), fibronectina y ácido hialurónico; estimula la angiogénesis y la contracción de la herida
Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)	Macrófagos, mastocitos, linfocitos T, células endoteliales, fibroblastos	Quimiotaxis y mitosis para fibroblastos. Estimula la emigración de Queratinocitos. Angiogénesis, contracción de la herida y depósito de matriz
Factor de crecimiento transformante β (TGF-β)	Plaquetas, linfocitos T, macrófagos, células endoteliales, queratinocitos, células musculares lisas, fibroblastos	Potente agente fibrogénico, induce la producción de colágeno, fibronectina y proteoglicanos. Quimiotaxis neutrófilos, macrófagos, linfocitos, fibroblastos y células musculares lisas. Estimula la síntesis de inhibidor tisular de MMP (TIMP) e inhibe la producción de MMP. Estimula angiogénesis. Inhibidor del crecimiento de la mayoría de las células epiteliales.
Factor de crecimiento de los Queratinocitos (KGF)	Fibroblastos	Estimula la emigración, proliferación y diferenciación de queratinocitos

Tabla 2. Factores de crecimiento y citocinas implicados en la cicatrización cutánea.



Figura 10. Determinación inmunohistoquímica del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en las células nucleadas de la epidermis humana. Imagen adaptada de Sobotta J. *Atlas and epitome of human histology and microscopic anatomy*. Huber GC, editor. Whitefish, MT, Estados Unidos de América: Kessinger Publishing; 2010 (3).

Factor Transformante β (Transforming Growth Factor β , TGF β)

La superfamilia de citocinas TGF β está compuesta por TGF β s, activinas, inhibinas, proteínas morfogénicas óseas (BMP), la hormona anti-mülleriana y factores de diferenciación y crecimiento. Los TGF β s desempeñan un papel fundamental en una variedad de procesos celulares, incluyendo la proliferación, la transición epitelio-mesénquima (TEM) y la remodelación de la matriz extracelular (MEC). Las TGF β s forman parte de los mecanismos de mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, estas moléculas se sobre-expresan en patologías tales como el cáncer, procesos fibróticos e inflamación (10).

Se encuentran tres isoformas de TGF β en seres humanos: TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3. TGF β 1 es de especial relevancia debido a su papel fundamental en el proceso de cicatrización de heridas. (11) TGF β 1 es la isoforma más prevalente y se halla de manera ubicua en todos los tejidos. De hecho, se le atribuye principalmente el desarrollo de la fibrosis tisular.(12) Todas las isoformas de TGF β se encuentran en su forma inactiva latente, como homodímeros unidos a una secuencia de aminoácidos denominada péptido asociado latente (LAP). Este complejo, a su vez, se encuentra ligado a una proteína de unión latente al TGF β (LTBP), dando origen a una estructura denominada complejo grande de latencia (LLC). El proceso de activación de los TGF β s implica la liberación del LLC de la MEC, así como la posterior proteólisis del complejo LAP-LTBP. Los TGF β s activos, se unen y activan a los receptores serina/treonina quinasa tipo I y II (receptores de TGF β tipo I (T β RI) y receptores TGF β tipo II (T β RII)), lo que conlleva la activación de las rutas de señalización: la vía canónica dependiente de SMAD y las vías independientes de SMAD o no canónicas.

La familia de proteínas SMAD se compone de tres grupos principales: los R-SMAD (SMAD regulados por receptores), que incluyen a SMAD 1, 2, 3, 5 y 8; el Co-SMAD (SMAD mediador común), que es el SMAD 4; y los I-SMAD (SMAD inhibitorios), que son SMAD 6 y 7 (13). Únicamente los R-SMAD son fosforilados y activados por el receptor T β RI. SMAD2 y SMAD3 principalmente responden a las señales de la subfamilia TGF β s, mientras que SMAD1, 5 y 8 lo hacen en respuesta a las señales de BMP (14). En la vía dependiente de SMAD, el receptor fosforila a SMAD2 y SMAD3, que luego se trasladan al núcleo en compañía de SMAD4. Allí interactúan con otros factores de transcripción para modular la expresión génica de proteínas como α -SMA, lo que a su vez promueve la acumulación de proteínas de la matriz extracelular como el colágeno tipo I y III (15).

Además de las vías SMAD, existen vías no canónicas que involucran rutas de señalización dependientes de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (10). Estas proteínas regulan diversos procesos celulares, como la diferenciación, la proliferación, la supervivencia y la apoptosis. Una de las vías de señalización MAPK activadas por TGF β es la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) (12) (Fig. 11).

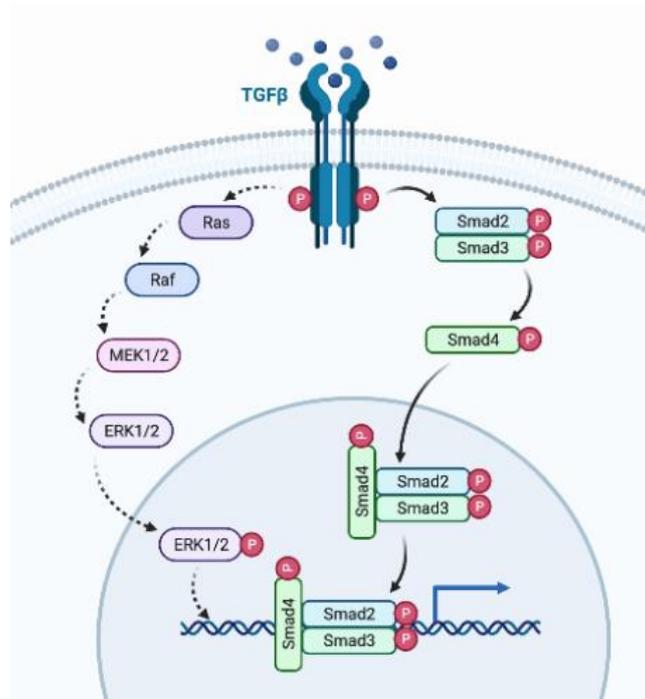


Figura 11. Vía canónica dependiente de SMAD y vía no canónica MAPK/ERK. El factor de crecimiento transformante β (TGF β) se une al receptor heterodimérico que se autofosforila y fosforila a su vez a proteínas intracelulares tales como SMAD2 y SMAD3 o ERK1/2, lo que conlleva la activación de rutas de señalización y la transcripción de genes relacionados con procesos celulares tales como la transcripción epitelio mesenquimal (TEM). Creada con BioRender.

Fibroblastos, matriz extracelular y curación mediante formación de cicatrices

El **fibroblasto** es el tipo celular característico y más abundante del tejido conectivo, célula predominante en el sitio de la herida a los cinco días tras una lesión cutánea (Fig. 12). Su principal acción protagoniza la síntesis de **matriz extracelular (ECM)** (1).

La ECM está constituida por:

- Proteínas estructurales (**colágeno**, elastina y fibras elásticas).
- Proteínas de adherencia celular, llamadas también moléculas de adhesión celular (MAC) (immunoglobulinas, cadherinas, integrinas y selectinas), que se unen a otras proteínas de la MEC, como por ejemplo a la fibronectina.
- Glucosaminoglucanos (GAG), como el ácido hialurónico, y proteoglucanos.

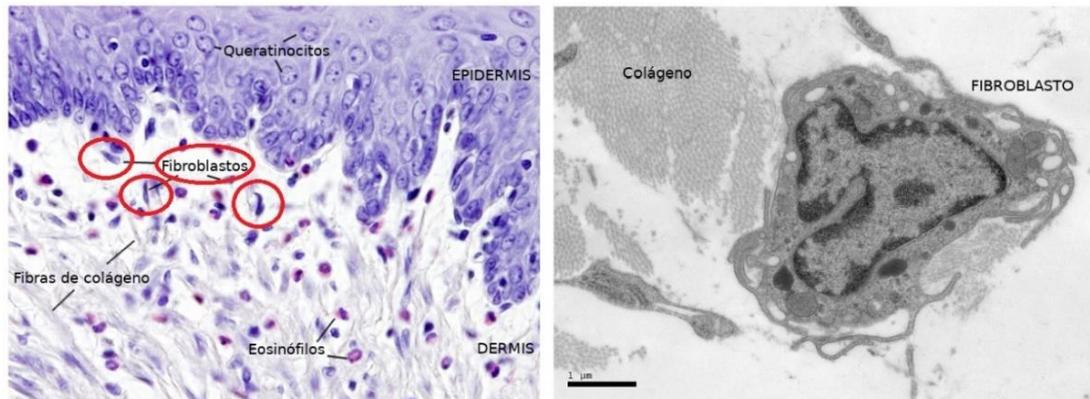


Figura 12. La imagen de la izquierda corresponde a microscopía óptica. Se señalan fibroblastos en la dermis, células fusiformes o estrelladas con prolongaciones citoplasmáticas. A la derecha imagen de microscopía electrónica, donde se observan fibras de colágeno cortadas transversalmente y un fibroblasto, con su núcleo ovoide, un prominente nucléolo y por un citoplasma poco abundante con gran desarrollo de los orgánulos relacionados con la síntesis de los componentes de la matriz extracelular. Megías Pacheco M, Molist García P, Pombal Diego MA. Atlas de histología vegetal y animal [Internet]. Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Facultad de Biología, Universidad de Vigo, España. [Citado 27 de julio de 2023]. Recuperado a partir de: <https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/fibroblasto.php> (16).

Los fibroblastos, los macrófagos y las células endoteliales vasculares proliferan y crean el famoso **tejido de granulación** (Fig. 13A). Este consiste en neovasos pequeños muy permeables, formados a partir de vasos preexistentes o de precursores endoteliales reclutados desde la médula ósea, embebidos en una matriz provisional de fibronectina, colágeno débil y ácido hialurónico, que invaden de forma progresiva el sitio de la lesión. Este proceso se conoce como **angiogénesis** o angiogenia, y es muy característico de la reparación tisular. El VEGF es el factor de crecimiento implicado más importante (5).

Durante la fase de fibroplastia, los macrófagos segregan quimiocinas, IL-1, TNF α , EGF, PDGF, FGF, TGF β (el agente fibrogénico más importante) que atraen y activan a los fibroblastos para la síntesis y remodelación de la ECM. Inicialmente consiste en una red provisional de fibrina, fibronectina y débil colágeno tipo III, pero será sustituida después por largas cadenas de colágeno resistente tipo I, evidenciadas ya en el tejido cicatricial (Fig. 13B). Todo este juego de remodelación tisular implica cambios en la composición de la MEC, un equilibrio entre su síntesis y su degradación, llevado a cabo mediante la síntesis y activación de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) (17).

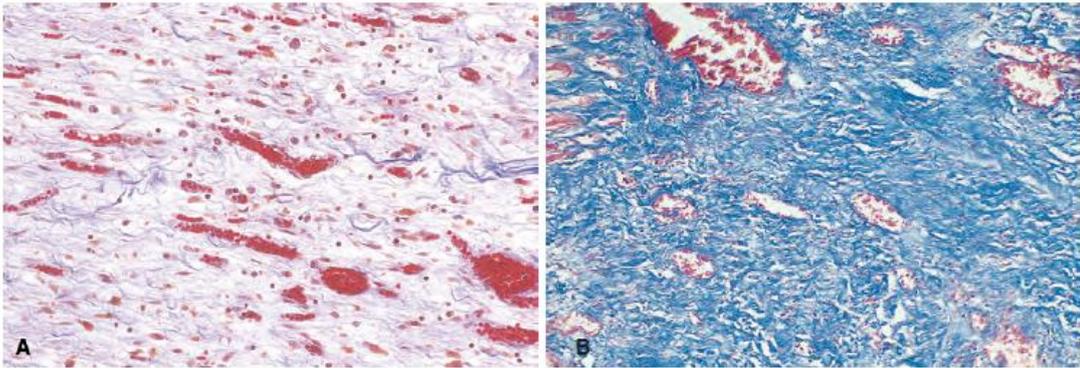


Figura 13. A. Tejido de granulación con vasos, edema y MEC, sin apenas colágeno y algunas células inflamatorias. **B.** Misma tinción tricrómica de Masson pero de una cicatriz madura que muestra colágeno denso con ocasionales canales vasculares dispersos. Imagen adaptada de Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. 10th. ed. Elsevier España; 2021 (4).

Finalmente, como resultado de un proceso de regeneración epitelial, con la migración direccional de queratinocitos de la capa basal sobre la matriz provisional, se produce la restauración de la barrera epidérmica (Fig. 14).

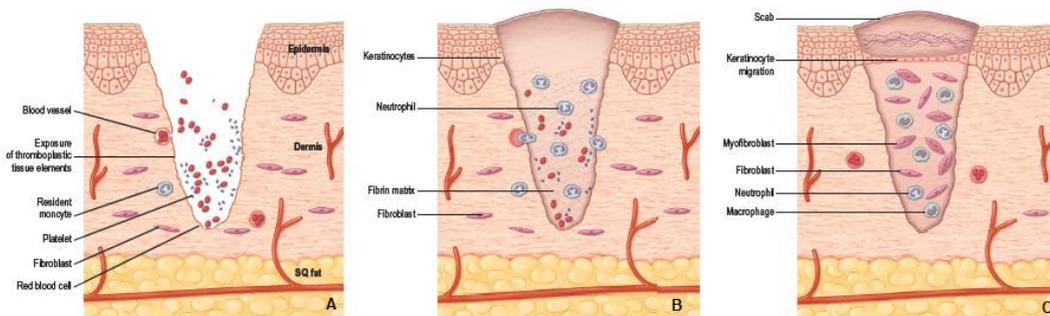


Figura 14. A) Fase de hemostasia tras una lesión cutánea, formación del trombo plaquetario. **B)** Influjos de neutrófilos activados en las primeras 24h, secretan citocinas para la activación de más leucocitos; los fibroblastos comienzan a sintetizar matriz provisional. **C)** Los fibroblastos acuden entre tres y cinco días después, secretan componentes de la matriz y factores de crecimiento. Los queratinocitos migran desde los bordes de la herida y anejos a la nueva matriz. Imagen adaptada de Gurtner G, Neligan P. Plastic Surgery: Volume 1: Principles. 4a ed. Filadelfia, PA, Estados Unidos de América: Elsevier - Health Sciences Division; 2017 (5).

Posteriormente, cesa la inflamación y disminuye la vascularización, aumenta la cantidad de colágeno, comienza el blanqueamiento de la cicatriz, la cual queda pálida y avascular, constituida por fibroblastos fusiformes, colágeno denso, fragmentos de tejido elástico, sin apéndices dérmicos.

En la siguiente fase de contracción de la herida, los fibroblastos, estimulados por tensión mecánica y otros factores de crecimiento como TGF β , FGF y PDGF, se diferencian a miofibroblastos, que expresan α -actina de músculo liso con capacidad contráctil, y adhesiones locales para unir su citoesqueleto a la ECM. (18) Las fuerzas de contracción circunferenciales en los bordes de una herida abierta contribuyen al cierre de la misma. La resistencia de la cicatriz aumentará en las siguientes cuatro semanas, alcanzando la recuperación del 70-80% de la fuerza tensil de la piel no lesionada (5).

1.4. Cicatrización patológica y fibrosis cutánea

La formación de una cicatriz es considerada una respuesta fisiológica del cuerpo humano cuya intención principal pretende recuperar la naturaleza perfecta del tejido dañado. El producto final del proceso de cicatrización normal es una cicatriz madura, que se caracteriza por un depósito desorganizado de fibras de colágeno inelástico y la pérdida de los anejos dérmicos. Una característica destacada del proceso fisiológico normal de la reparación de heridas es su habilidad para poner fin a la producción continua de colágeno, alcanzando un máximo aproximadamente a los 21 días (19). En esta etapa, también se produce una proliferación de las células epiteliales para restaurar la integridad de la barrera epidérmica (20). Posteriormente, el tejido de granulación es sustituido por tejido conectivo normal durante la fase de maduración (21). Este último proceso depende de un equilibrio preciso entre la apoptosis de las células existentes y la generación de nuevas células.

La cicatrización de la piel es un proceso muy regulado, con señales de “stop”. Cuando las señales adecuadas están ausentes o son inefectivas, o el estímulo persiste y provoca una inflamación crónica, los macrófagos y los linfocitos siguen activos y se producen factores de crecimiento y citocinas, que aumentan la síntesis de colágeno y reducen su degradación por las MMP, causando cicatrices excesivas. El término fibrosis hace referencia al depósito excesivo de colágeno y otros componentes de la MEC en un tejido. Los mecanismos reguladores responsables de su fisiopatología no se conocen todavía, aunque se acepta que las citocinas profibróticas, el TGF β , y falta de apoptosis

del fibroblasto tienen un papel relevante (13). Particularmente, el TGF β es considerado un regulador crucial en la fibrosis y es responsable de la activación de muchos genes relacionados con el estrés oxidativo, implicados en vías profibróticas, así como de la regulación de la proliferación celular, diferenciación, y producción de ECM (22) (23). La persistencia de la población de miofibroblastos en el contexto de cicatrices hipertróficas podría estar asociada a una inhibición de la apoptosis. De hecho, se ha observado que los miofibroblastos que se originan a partir de cicatrices hipertróficas responden de manera diferente a estímulos inductores de la muerte celular programada en comparación con los miofibroblastos que provienen de heridas cutáneas normales. La apoptosis programada, se podría inducir mediante la reducción de la concentración de factores de crecimiento o por la remodelación de la MEC por parte de las metaloproteinasas, lo cual supondría una interferencia en la adhesión de los miofibroblastos con la ECM (24).

TGF β 1 parece tener un papel fundamental en la formación de cicatrices al reclutar células inflamatorias en las primeras fases del proceso de curación y promover la síntesis de componentes de la MEC y la contracción de la herida. En el caso de los queloides, se ha observado que hay una sobreexpresión de los receptores T β RI y T β RII en comparación con los fibroblastos normales (25). Asimismo, se ha demostrado en estudios posteriores que la adición exógena de anticuerpos neutralizantes de TGF β 1 en modelos de ratón adultos, resulta en una menor aparición de cicatrices y en una disminución de la deposición de colágeno y fibronectina (26). Se realizó un experimento in vivo en el cual primero se generaban heridas en ratones y al tercer día se les administraba un inhibidor de TGF β asociado a un péptido de direccionamiento vía intravenosa que dirigía el inhibidor a los vasos sanguíneos angiogénicos, donde se extravasaba los tejidos. Los análisis histológicos demostraron que, al décimo día, el tejido de granulación en las lesiones de los ratones que habían sido tratados con el inhibidor de TGF β era un 50% menor con respecto al grupo control. Además, también se redujo significativamente la longitud de las heridas, se redujo la expresión de α -SMA y el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) (27).

La **fibrosis cutánea** se presenta en diversas enfermedades, como la esclerosis sistémica (ES) o esclerodermia, queloides, cicatrices hipertróficas y otras condiciones. Todas estas patologías comparten una característica común: la acumulación excesiva de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular, resultado de la activación de los fibroblastos dérmicos.(28) Estos trastornos fibróticos pueden tener un impacto significativo en calidad de vida de los pacientes y en su supervivencia, provocando disfunciones orgánicas, así como problemas psicológicos.

Como ejemplo, el caso de la **esclerosis sistémica** (ES). Se trata de una enfermedad sistémica del tejido conectivo que afecta varios órganos, con un mayor impacto en los pulmones, el corazón, el tracto gastrointestinal, los riñones y la piel. Desde una perspectiva patogénica, se considera que la autoinmunidad, la vasculopatía y la fibrosis son los principales procesos fisiopatológicos. En las etapas avanzadas de la ES, se produce un exceso de depósito de colágeno en la dermis, con la pérdida de estructuras anexas y tejido adiposo relacionado (29). La ES se clasifica en dos formas clínicas principales según la afectación de la piel: 1) Esclerosis sistémica limitada (ESL), que afecta la piel en la cara y extremidades distales, con una progresión más lenta y un mejor pronóstico; 2) Esclerosis sistémica difusa (ESD), que se presenta en el tronco y partes proximales de las extremidades, los cuales sufren un porcentaje mucho mayor de complicaciones sistémicas.(30) En cuanto a las características moleculares de esta enfermedad, investigaciones previas han mostrado que los fibroblastos de pacientes con ESD sobreexpresan los receptores T β RI y T β RII en comparación con fibroblastos sanos, de igual forma que en los queloides (31), lo que está relacionado con un aumento en la deposición de colágeno tipo I (32). También se ha observado un aumento en la fosforilación de SMAD2/3 en la epidermis de pacientes con ES (33). Además, se ha documentado la sobreexpresión de la proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP3) en pacientes con ES, así como en otras afecciones fibróticas como la fibrosis pulmonar idiopática (FPI). Se ha observado que la estimulación de los fibroblastos pulmonares con IGFBP3 conduce a un aumento en la deposición de fibronectina, lo que sugiere que esta proteína desempeña un papel importante en el inicio y/o perpetuación de la fibrosis(34). Además, se ha observado una mayor expresión de calponina en las biopsias de piel de pacientes con ES, una proteína que promueve la motilidad celular y cuya expresión está aumentada en los miofibroblastos (35).

El objetivo en el tratamiento de la fibrosis de la piel podría enfocarse en restaurar el perfil de fibroblastos dérmicos que se encuentran anormalmente activados produciendo ese exceso de MEC tan característico. Generalmente, la activación anormal de este tipo celular es consecuencia final de los procesos fisiopatológicos de la enfermedad, como la activación del sistema inmunitario o la vasculopatía (36). De ahí que los tratamientos hayan ido encaminados a la utilización de inmunosupresores y antineoplásicos, como el Metrotexato, la Ciclofosfamida o el Rituximab (29) (37). Por otro lado, se están desarrollando estudios basados en anticuerpos anti-TGF β , que podría convertirse en una prometedora estrategia terapéutica para el control de la ES, a través del bloqueo de las tres isoformas de TGF β . (38) Otro enfoque terapéutico es el trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) autólogas. Recientemente, en particular con el TCMH autólogas mieloablativo (trasplante tras administración de quimioterapia y/o radioterapia), se han observado beneficios a largo plazo, incluyendo una mayor supervivencia, en pacientes con ES (39).

Por otro lado, como resultado de este desorden fibroproliferativos se forman cicatrices hipertróficas o queloides. Histológicamente ambas entidades son similares. Las cicatrices patológicas se distinguen basándose en sus características clínicas.

Las **cicatrices hipertróficas** se describen como cicatrices que no sobrepasan los límites de la herida original, pero sí se encuentran elevadas y engrosadas (Fig. 15). A veces pueden ser pruriginosas y dolorosas. Eventualmente, con el paso de los años, estas cicatrices podrían aclararse y aplanarse por sí solas. De hecho, el objetivo en el tratamiento de las cicatrices hipertróficas es promover su capacidad espontánea de retroceder con el tiempo (40).

Los **queloides** se definen como cicatrices que crecen más allá de los límites de la herida original (13) (Fig. 16). Está demostrada una predisposición genética a la formación de queloides, incluyendo factores étnicos y genes familiares. Es más frecuentes en personas de piel oscura (5-10% de africanos padecen queloides), así como en zonas particulares de la anatomía (tórax anterior, escápula, hombro, abdomen inferior). Se han descrito factores sistémicos que también pueden estar relacionados con la formación de queloides, como el estímulo hormonal de los estrógenos en las mujeres (motivo por el cual los queloides empeoran durante el embarazo) o la hipertensión (41).



Figura 15. Cicatriz hipertrófica en cuello, elevada y engrosada, pero sin sobrepasar los límites de la herida. Imagen tomada de pacientes reales



Figura 16. Queloides en pabellón auricular (izquierda) y queloides en área preesternal (derecha), cicatrices que crecen más allá de los límites de la herida original. Imagen tomada de pacientes reales.

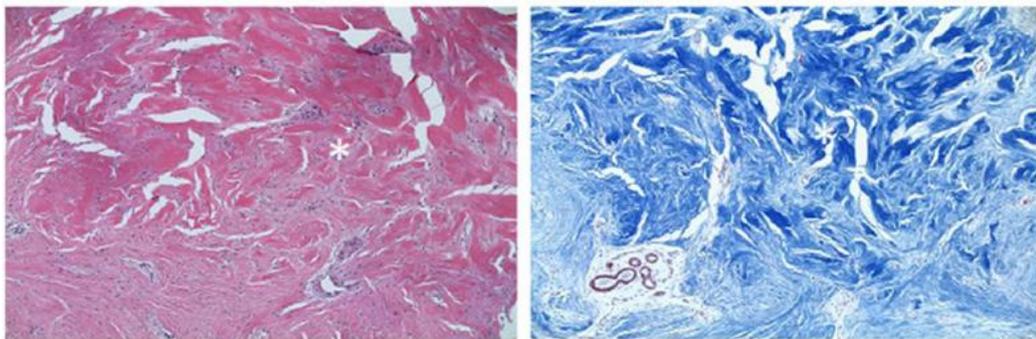


Figura 17. Los queloides se caracterizan histopatológicamente por la acumulación de colágeno densamente compactado (marcado con asteriscos). Algunas partes de las lesiones muestran celularidad (fibroblastos). Tinción de Hematoxilina-Eosina en la imagen izquierda; Tinción de Tricrómico de Masson en la imagen derecha (13).

Histológicamente, un queloide es, en esencia, colágeno (Fig. 17). Son cicatrices relativamente acelulares. En cuanto a los componentes celulares implicados en el proceso fibrótico de los queloides, destacan (13):

- Fibroblastos. Como se ha comentado anteriormente, los fibroblastos son mayoritariamente responsables de la deposición de colágeno y matriz extracelular, impulsadas por factores de crecimiento fibrogénicos, como el TGF- β , el PDGF, el FGF- β y el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I). Se ha descrito en la literatura que los fibroblastos y queratinocitos de los queloides responden de forma diferente a los factores de crecimiento. Por ejemplo, el grado de expresión de los genes del colágeno al TGF- β es mayor que en los fibroblastos de cicatrices normales (42). Los fibroblastos aislados de tejido queloidal son más sensibles al TGF- β 1, PDGF e IGF-I in vitro que sus homólogos en la piel normal (43). Además, la densidad y las tasas de proliferación de los fibroblastos queloides aumentan (44). Asimismo, se ha demostrado una disminución de la expresión de sus genes apoptóticos.(45) La ubicación de los fibroblastos en la piel también contribuye al grado de fibrosis: los profundos aislados muestran expresiones elevadas de COL1A1, TGF- β 1, periostina, PAI-2 e inhibina beta A en comparación con sus homólogos superficiales y normales (46).
- Miofibroblastos. Aunque previamente se había conceptualizado la ausencia de formas diferenciadas de fibroblasto, la literatura reciente sugiere la presencia de marcadores celulares característicos de miofibroblastos activados, como la transgelina, la citoglobina/STAP y la prolin 4-hidroxilasa β , (47) que están implicados en el tejido queloidal, así como la presencia de miofibroblastos positivos para la actina α del músculo liso (α SMA). (48)
- Queratinocitos. Se ha implicado la interferencia epitelial-mesenquimatosa entre los queratinocitos y los fibroblastos dérmicos (49). Mediados por la secreción de varios factores de crecimiento, el factor 1 α inducible por hipoxia (HiF-1 α) y la liberación de IL-1, los queratinocitos aislados de tejido queloide inducen un comportamiento similar al queloide en fibroblastos normales (50). También se ha demostrado que los queratinocitos contribuyen a la disminución de la tasa de apoptosis de los fibroblastos a través de la señalización paracrina(51).
- Melanocitos. Su papel en la formación de queloides se ha visto reforzado al observarse una mayor aparición de queloides en personas de piel oscura. En condiciones homeostáticas, los melanocitos no proliferan ni expresan citocinas autocrinas, pero, durante la cicatrización, se activa la proliferación de melanocitos y la producción de

melanina como resultado de la propia inflamación (52). También se ha demostrado que los fibroblastos cocultivos con melanocitos tienen una mayor expresión de colágeno tipo I y TGF- β , mientras que los efectos supresores de la hormona estimulante de los melanocitos α (α MSH) sobre la producción de colágeno parecen estar desregulados en los queloides en comparación con los controles (53).

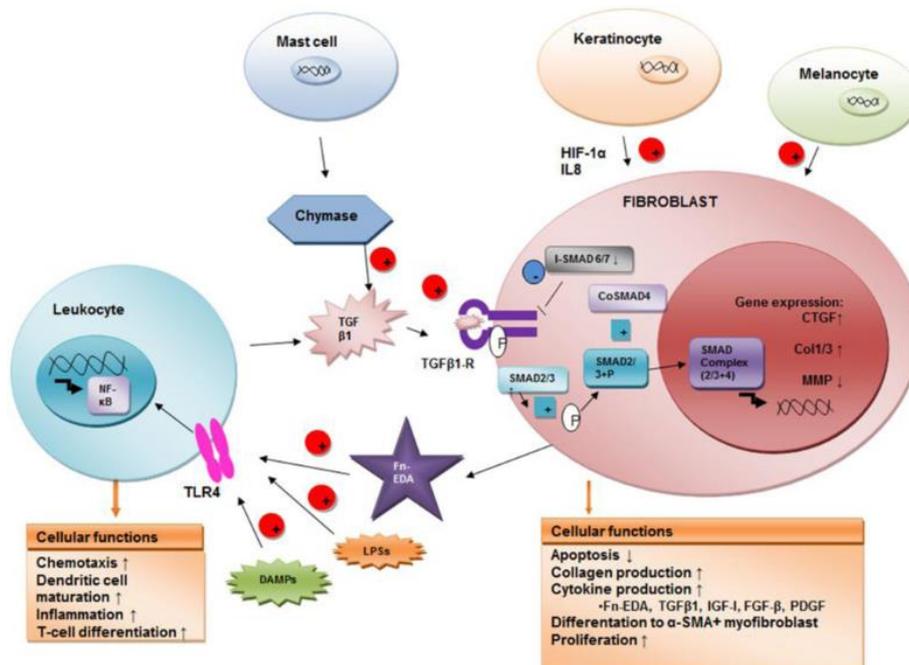


Figura 18. Vías de señalización de células fibróticas en queloides. Los fibroblastos son el tipo de célula central en el proceso de eventos profibróticos que conducen a una acumulación excesiva de colágeno en la ECM, así como más producción de citocinas, proliferación y diferenciación a miofibroblastos. En la imagen se representan las interacciones clave entre células, incluyendo al leucocito con que perpetúa la inflamación (13).

Respecto a lo que se refiere a mediadores involucrados en la patogénesis de los queloides, se ha demostrado que el TGF- β actúa como un modulador principal de la fibrosis (Fig. 18), estimulando la proliferación de fibroblastos, la síntesis de colágeno y la inhibición de la actividad degradante de las metaloproteinasas de matriz (MMP) (54) (55). TGF- β también estimula indirectamente la acumulación de ECM a través de la regulación positiva del PDGF, el cual, durante las últimas etapas de la cicatrización de heridas, acelera la formación de tejido de granulación y estimula la producción de colágeno. VEGF promueve la angiogénesis, actuando de forma específica en las células endoteliales. Se ha observado que las células progenitoras endoteliales (EPC) proangiogénicas circulantes están presentes en un mayor grado en pacientes con queloides (56).

Se ha visto que, la señalización persistente de la vía canónica de TGF β 1 promueve, además de la proliferación de fibroblastos, la producción excesiva de fibronectina, lo que da lugar a una cicatrización hipertrófica. La sobreexpresión de esta proteína también ha quedado probada en tejido queloide (57) (58). De la misma manera, ha quedado demostrado que la expresión génica de Col tipo 1 está aumentada tanto en queloides como en el tejido hipertrófico, sin embargo, la proporción de Col tipo I/III solo se ve aumentada en el caso del tejido queloide en comparación con la piel sana (59). Por el contrario, la proporción de Col tipo III/I esta aumentada en heridas hipertróficas versus no hipertróficas (60).

En los queloides, se ha observado que las concentraciones de IL-6, factor de necrosis tumoral- α e INF- β aumentan, todo lo cual promueve la migración y proliferación celular y señala una respuesta inflamatoria. Por el contrario, las concentraciones circulantes de INF- α , INF- γ y TNF- β , moléculas que regulan negativamente la síntesis de colágeno y la proliferación de fibroblastos, se reducen, lo que conduce al depósito y acumulación descontrolado de colágeno (61).

Durante la última etapa de remodelación de las heridas, se lleva a cabo la degradación de la ECM. Fisiológicamente, se sintetizan proteoglicanos, el colágeno III se reemplaza por colágeno I, y las serinproteinasas, como el activador del plasminógeno tisular (tPA) y el activador del plasminógeno uroquinasa (uPA), y las metaloproteinasas de matriz (MMP) degradan el exceso de fibrina, colágeno y fibronectina(62). Se ha encontrado que, en los queloides, MMP-1, MMP2, MMP3 y MMP9 están elevadas en fibroblastos derivados de queloides, cuando se aíslan de la periferia de las lesiones. La síntesis y actividad de proteasas y MMP es un proceso complejo regulado en gran medida por TGF- β 1 y SMAD 3 y 4 (63). El inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), es un inhibidor del uPA y del tPA. uPA induce la degradación de la MEC y por lo tanto PAI-1, al inhibirla, tiene efectos profibróticos. PAI-1 es uno de los genes más regulados al alza por la vía canónica de TGF β 1. Se ha visto que, la expresión de PAI-1 está aumentada tanto in vivo como in vitro en queloide en comparación con muestras de piel sana (64).

Todos los mediadores mencionados, activan cascadas profibróticas cuando se unen a sus receptores. Por ejemplo, la vía de transducción de señales a través de la familia de proteínas intracelulares SMAD (SMAD activados por receptores (R-SMAD 1, 2, 3, 5 y 8; SMAD mediador común (Co-SMAD 4); SMAD inhibidores (I-SMAD 6 y 7)), o los receptores transmembrana Toll-like, clásicos de la inmunidad innata. La formación de queloides puede reducirse notablemente mediante la inhibición de la vía de señalización TGF- β 1-SMAD y la activación de TLR7 o SMAD 7 (65) (66). También se ha demostrado que la fosforilación de SMAD3 está regulada al alza en queloides y que su inhibición con ARN de interferencia disminuye la expresión del gen procolágeno en fibroblastos del queloide (67). Además, la expresión de SMAD6 y SMAD7 está disminuida en fibroblastos de queloides en comparación con fibroblastos normales. Se ha probado que la inhibición en la expresión de TGF β 1, da como resultado una menor fosforilación de ERK1/2 y SMAD2/3 en fibroblastos derivados de queloide (57).

Las fibronectinas, Fn-EDA y Fn-EDB, son glicoproteínas de alto peso molecular que participan en una variedad de procesos fisiológicos, interactuando tanto con los componentes de la MEC como con los receptores de la superficie celular. El papel de las isoformas de la fibronectina en la fisiología y patología de los tejidos no están claramente descritas, pero se conoce que las Fn-EDA están prácticamente ausentes en tejido adulto normal, mientras que en condiciones patológicas, como los queloides, Fn-EDA es abundante, un componente estructural de la ECM, así como una molécula de señalización que regula los procesos celulares adhesivos, proliferativos y migratorios (68). Además, Fn-EDA es crucial para la diferenciación de los fibroblastos normales a miofibroblastos, impulsada por TGF- β (69). Se ha descrito de forma reciente, que Fn-EDA actúa como un ligando endógeno de TLR4, estimulando la producción de TGF- β 1, que a su vez se retroalimenta para regular aún más Fn-EDA, lo que lleva a un círculo vicioso de fibrosis (70) (71).

Referente a la senescencia celular, se trata de una detención irreversible del crecimiento que se produce como resultado de diferentes estímulos dañinos, incluyendo daño al ADN, acortamiento y disfunción de los telómeros o estrés oncogénico (72). Las células adquieren un fenotipo secretor asociado a la senescencia (FSAS), lo que implica la expresión de genes que codifican citocinas inflamatorias y factores de crecimiento (73). Consecuentemente se activan vías de respuesta al daño en el ADN, lo que resulta

en la activación de la proteína supresora de tumores p53, que activan al inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina p16. Ambas vías pueden activar a su vez al inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina p21, lo que conduce a la detección del ciclo celular (74) (75). Estudios han demostrado que los fibroblastos derivados de tejido queloide tienen una mayor tasa de senescencia en comparación con los fibroblastos normales (76). Por otro lado, se ha visto que existe un mayor acortamiento de los telómeros en el tejido queloide en comparación con piel sana (77).

No obstante, como se ha comentado anteriormente, la fisiopatología y la causa de la formación de queloides sigue sin comprenderse. Además, su tratamiento efectivo continúa siendo un reto para la cirugía plástica. La ratio de recurrencia tras la escisión quirúrgica de un queloide oscila entre 50 y el 80%. Es por ello que no se recomienda, de entrada, el tratamiento quirúrgico. En el caso de recurrir a dicho tratamiento, se suelen utilizar terapias adyuvantes como por ejemplo la radioterapia, pues se ha demostrado que la radioterapia postcirugía de queloides reduce la tasa de recurrencia al 2.4-50% (Fig. 19) (78). Existe gran variabilidad en los esquemas de braquiterapia para el tratamiento postquirúrgico de queloides, según autores (Fig. 20). La radioterapia por si sola tiene una tasa de respuesta del 10 al 94%, con una tasa de recurrencia en queloides del 50 al 100% (79). Es prioritario la colaboración y trabajo en equipo con la Unidad de Radioterapia de los centros hospitalarios, para una indicación de tratamiento, realización y seguimiento adecuados. Los controles postoperatorios y tras la radiación, deben realizarse a la semana postcirugía, cada 3 meses el primer año y posteriormente, cada 6 meses, en los cuales se registra la evolución inicial de la cicatriz, la aparición de complicaciones, la toxicidad tardía y las posibles recidivas. A corto plazo, es frecuente la aparición de edema, eritema y descamación. Menos frecuente dehiscencias o necrosis. Como toxicidad tardía (10-15%), pueden aparecer cambios en la pigmentación, atrofia, telangiectasias, fibrosis subcicatricial y alopecia (80).

La presoterapia, las láminas de gel de silicona, crioterapia, se han utilizado clásicamente y de forma extendida como alternativa de tratamiento tópico, que debido a que son seguros, no invasivos y de fácil aplicación tienen su papel dentro de las opciones terapéuticas, aunque con efectividad relativa (79). Las inyecciones intralesionales de corticoide se considera el tratamiento de primera línea (81). El tratamiento único con corticoides intralesionales tiene tasas de respuesta del 50-100%,

con tasas de recurrencia del 9 al 50%. El acetónido de triamcinolona es el corticosteroide más utilizado (82).

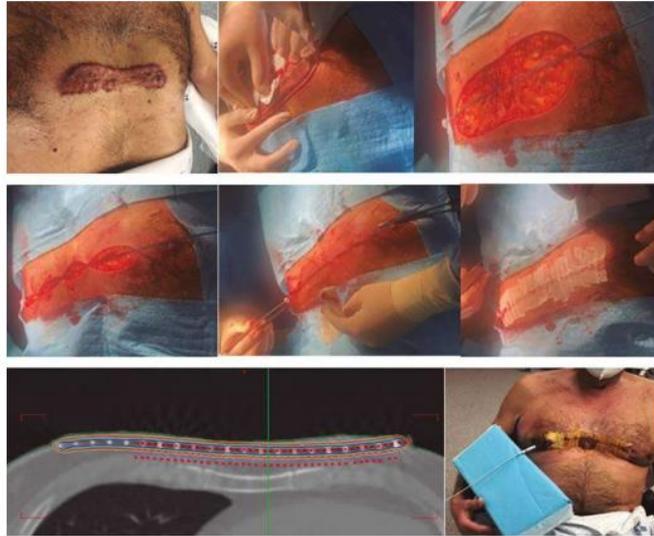


Figura 19. Exéresis quirúrgica del queloide esternal, aproximación de bordes de a herida y sutura intradérmica sobre el tubo de plástico. Adhesivos quirúrgicos. Curvas de isodosis y paciente en tratamiento. El tratamiento de los queloides con la braquiterapia (BT) de alta tasa está indicada en casos de pacientes que no han respondido al tratamiento tópico (corticoides tópicos, silicona, etc). En el quirófano la cirujana plástica diseña la técnica quirúrgica más apropiada que permita realizar la exéresis de la lesión, con un pequeño margen de tejido sano, para que se puedan aproximar los bordes sin tensión. Posteriormente se realiza el cierre por planos de la herida, colocando un tubo plástico (aplicador) en la dermis y se cierran los bordes de la piel por encima del tubo con una técnica de sutura intradérmica. Para la técnica de BT, se utiliza un aplicador externo que se coloca sobre la piel, con uno o varios canales paralelos, con espaciador que separa 5 mm el aplicador de la superficie de la piel y que incluye la herida +5 mm de margen (80).

Autor	Tipo BT-HDR	N Lesiones	Fraccionamiento	Pauta dosis	Tiempos
Guix (2001)	Intersticial	169	4 × 3 Gy	A 1 cm	1ª fracción en < 1 h Las 4 fracciones en 24 h
Van Leeuwen (2014)	Intersticial	67	2 × 6 Gy	A 0,5 cm	1ª fracción en < 4 h 2ª fracción en < 24 h
Jiang (2016)	Intersticial	32	3 × 6 Gy	A 0,5 cm	1ª fracción en < 6 h 2ª y 3ª al día siguiente
Narkwon (2006)	Superficial (molde)	24	3 × 5 Gy	A 0,5 cm	Fracciones separadas al menos 6 h
Kuribayashy (2011)	Superficial (molde)	36	4 × 5 Gy 3 × 5 Gy según lugar	A 0,2 cm de superficie piel	1 fracción al día
Bautista (2020)	Superficial (molde o Leipzig)	80	3 × 5 Gy	Isodosis 95%	1 fracción al día

Figura 20. Diferentes series de la BT-HDR en queloides (80).

El objetivo de las terapias futuras va dirigido a reducir o eliminar factores que participen o promuevan la cascada de fibrosis. Lo cual supone la descripción exacta de las células y proteínas que participan en todo el proceso desregulado de inflamación, cicatrización y fibrosis cutánea, su papel en la fisiopatología del proceso, así como desarrollar dianas terapéuticas específicas contra ellos o su función.

1.5. La galectina-3 (GAL-3)

La galectina-3 (GAL-3) es un miembro de la familia de las galectinas, una familia de proteínas solubles altamente conservadas que se encuentran en células y tejidos humanos, así como en diversos mamíferos, hongos, insectos y virus (83). Son lectinas de unión a β -galactósidos en glucoconjugados. La evidencia sugiere que las galectinas están involucradas en una amplia variedad de procesos moleculares y celulares significativos, se encuentran distribuidas ampliamente en toda la anatomía, tanto en piel como otros órganos, y aparecen implicadas en los mecanismos patogénicos de diversos trastornos (84).

En 1993, Hirabayashi y Kasai clasificaron las galectinas en tres grupos según sus estructuras: prototipo, quimera y tipo de repetición en tándem (85) (Fig. 21). Las galectinas se dividen en tres tipos según la organización de su dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD):

Tipo I) Galectinas con un solo CRD. Las galectinas del tipo prototipo, representadas por GAL-1, GAL-2 y GAL-7, poseen un dominio de CRD y existen como dímeros. Aunque las galectinas reconocen la β -galactosa, la afinidad de unión de cada subtipo de galectina difiere según la estructura del glicoconjugado. Por ejemplo, GAL-1 muestra una alta afinidad por las N-glicanos de tipo complejo.

Tipo II) Galectinas con dos CRD. Las galectinas del tipo repetición en tándem, que incluyen a GAL-4, GAL-8 y GAL-9, tienen dos dominios de reconocimiento de carbohidratos conectados por un péptido corto, y estos CRD poseen afinidades de unión a carbohidratos diferentes.

Tipo III) Galectinas de tipo quimera con un solo CRD conectado a un dominio N-terminal. La galectina-3 humana es una proteína de 35 kDa que está codificada por un solo gen, LGALS3, ubicado en el cromosoma 14. Es la única galectina de tipo quimera. Su dominio N-terminal es esencial para su multimerización, es sensible a la proteólisis por MMP de matriz y puede participar en la interacción con otras proteínas intracelulares. El CRD C-terminal es responsable de su

interacción con glicoconjugados que contienen N-acetil-lactosamina (86). Precisamente es esta estructura molecular lo que diferencia a la galectina-3 del resto de galectinas: su estructura monomérica comprende un dominio de reconocimiento de carbohidratos en el extremo C-terminal, un dominio intermedio repetitivo de prolina-glicina-alanina-tirosina y un breve dominio N-terminal (Fig. 22).

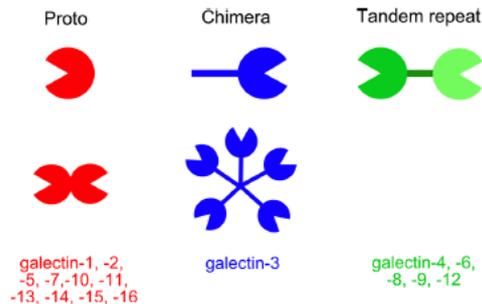


Figura 21. Clasificación estructural de las galectinas en tres tipos. Las galectinas prototipo poseen un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) y existen como dímeros. La galectina-3 del tipo quimera tiene un dominio no-CRD en el extremo N-terminal y un dominio CRD en el extremo C-terminal. El dominio no-CRD en la galectina-3 participa en la formación de pentámeros. Las galectinas del tipo repetición en tándem poseen dos CRDs con afinidades de unión a azúcares diferentes, unidas por un péptido corto (87).

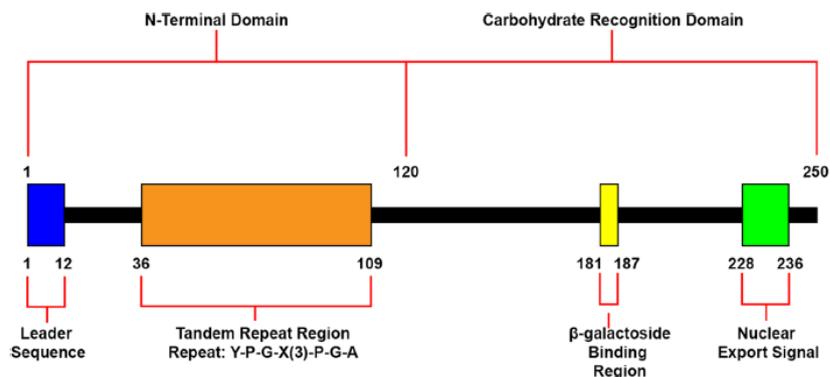


Figura 22. Dominios de la Galectina-3 humana. GAL-3 es una proteína de 250 aminoácidos. Cuenta con un Región N-terminal de 120 aminoácidos, que contiene una secuencia líder y una región repetida en tándem rica en prolina, glicina y arginina. También consta de un CRD que contiene una región de unión a β-galactósido y una secuencia requerida para la exportación del núcleo (88).

Los 15 galectinas conocidas están ampliamente expresadas en el cuerpo de mamíferos con distribuciones específicas de tejidos y células. Algunos subtipos de galectinas, como GAL-5, GAL-6, GAL-10 y GAL-16, se ha informado que existen solo en ratones o humanos. En la figura 23 se resume clasificación estructural de galectinas y su distribución tisular y celular (87).

Subtype	Type	Animals	Tissues and cells
Galectin-1	Proto	Human, mouse, rat, cow, sheep, pig	Ubiquitous, fibroblasts, neurons
Galectin-2	Proto	Human, mouse, rat, cow, sheep, pig	Stomach, small intestine
Galectin-3	Chimera	Human, mouse, rat, cow, sheep, pig	Ubiquitous, macrophage, epithelium
Galectin-4	Tandem repeat	Human, mouse, rat, cow, sheep, pig	Gastrointestinal tract
Galectin-5	Proto	Rat	Red blood cells
Galectin-6	Tandem repeat	Mouse	Gastrointestinal tract
Galectin-7	Proto	Human, mouse, rat, cow, pig	Stratified squamous epithelium
Galectin-8	Tandem repeat	Human, mouse, rat, cow, sheep, pig	Ubiquitous
Galectin-9	Tandem repeat	Human, mouse, rat, cow, pig	Immune cells, lung, gastrointestinal tract
Galectin-10	Proto	Human	Eosinophil, basophil
Galectin-11 ^a	Proto	Sheep, goat	Stomach, placenta
Galectin-12	Tandem repeat	Human, mouse, rat, cow, sheep, pig	Adipose tissue
Galectin-13	Proto	Human, pig	Placenta
Galectin-14	Proto	Human, sheep	Eosinophil, placenta
Galectin-15 ^a	Proto	Sheep, goat	Stomach, placenta
Galectin-16	Proto	Human	Placenta

Figura 23. Clasificación estructural de galectinas y su distribución tisular y celular.

GAL-3 es la proteína más estudiada de la familia de galectinas. GAL-3 se encuentra ampliamente distribuida en múltiples tejidos del cuerpo humano, incluido todos los tipos de células inmunitarias (macrófagos, monocitos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, células asesinas naturales y células T y B activadas), células epiteliales, células endoteliales y neuronas sensoriales (89). La galectina-3 es secretada por macrófagos activados y células T y B, monocitos, células de Langerhans, células dendríticas, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células NK, mastocitos y fibroblastos (89). La expresión de galectina-3 es más abundante durante la embriogénesis localizándose predominantemente en el epitelio, riñón, condrocitos e hígado (90). GAL-3 se localiza predominantemente en el citoplasma, aunque también puede detectarse en el núcleo, en la cara intra o extracelular de la membrana celular e incluso en el espacio extracelular. La complejidad de su modo de acción radica en el hecho de que interactúa con infinidad de proteínas presentes dentro de las células, en la membrana celular, en la matriz extracelular y en los fluidos biológicos. Tiene la capacidad de interactuar también proteína-proteína, independientes de su CRD. Es por este motivo por lo que GAL-3 está involucrada en una gran cantidad de procesos biológicos y eventos patológicos (91).

Particularmente en la piel, GAL-3 se expresa en los queratinocitos de la capa basal y suprabasal de la epidermis, en la matriz extracelular de la dermis, en fibroblastos proliferativos, en células de Langerhans, mastocitos, monocitos y melanocitos, en las glándulas sudoríparas y sebáceas asociadas al folículo piloso y en el propio folículo piloso (92).

En cuanto a sus funciones biológicas la Galectina-3 se encuentra dentro del citoplasma donde interacciona con proteínas asociadas a la supervivencia celular. Participa en la proliferación celular, diferenciación, apoptosis y supervivencia a través de diversas vías de señalización, como la Wnt/ β -catenina, que regula la proliferación celular, invasión y migración (93). GAL-3 también modula la apoptosis celular al interactuar con sinexina (94), NF- κ B (95) y CD95 (APO-1/Fas) (96). GAL-3 también desempeña un papel clave en el mantenimiento de la función mitocondrial, modulando la actividad de los complejos de la cadena respiratoria (97). A nivel lisosomal, GAL-3 induce la autofagia y activa la biogénesis lisosomal, coordinando así la reparación, eliminación y reemplazo lisosomal (98). También se encuentra en el núcleo, donde regula la transcripción de genes, y desempeña funciones esenciales al interactuar con diversos factores (99). GAL-3 puede transportarse a la superficie celular, al espacio extracelular y la circulación a través de vías secretoras no clásicas, para modular las interacciones célula-célula y entre las células y la matriz. Las actividades biológicas extracelulares de GAL-3 dependerán pues principalmente de la unión a ligandos relacionados con glicanos en la superficie celular y la matriz extracelular, como laminina, MAC-2, colágeno IV, fibronectina, Mac-2BP y antígenos de superficie de macrófagos. Estos procesos promueven interacciones célula-célula y célula-matriz y respuestas inflamatorias (100). En resumen, GAL-3 está implicada en procesos biológicos fundamentales como la diferenciación celular, la apoptosis, la inflamación, la angiogénesis y la fibrogénesis. GAL-3 contribuye al inicio y amplificación de la respuesta inflamatoria aguda al reclutar macrófagos en los sitios de lesión y perpetúa un estado de inflamación crónica a través de la activación de vías proinflamatorias (Fig. 24). Esto puede provocar fibrosis, inflamación crónica y reparación tisular aberrante (101).

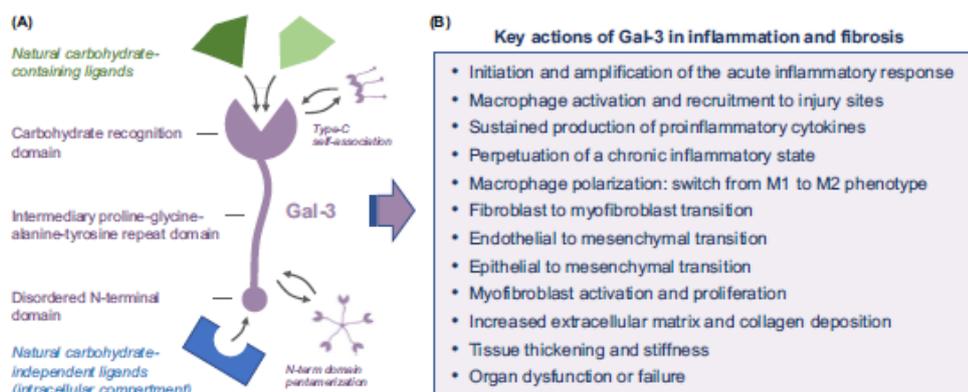


Figura 24. **A)** Estructura de la Galectina-3 y sus sitios de interacción. **B)** Cuadro resumen de las funciones de la Galectina-3 en la fibrosis e inflamación (101).

Debido a la diversidad de ligandos a los que puede unirse, modulando múltiples acciones, según sus niveles y los de sus ligandos, ha surgido un interés creciente en los últimos años en su estudio y su potencial rol como biomarcador, habiéndose descrito su implicación en el cáncer (102) (103) (Fig. 25), en enfermedades autoinmunes (104), trastornos neuroinflamatorios y neurodegenerativos (105), en enfermedades cardiovasculares (106), enfermedades renales crónicas (107), así como en muchas enfermedades inflamatorias y trastornos fibroproliferativos de la piel (92) (108) (109) (110) (111) (112).

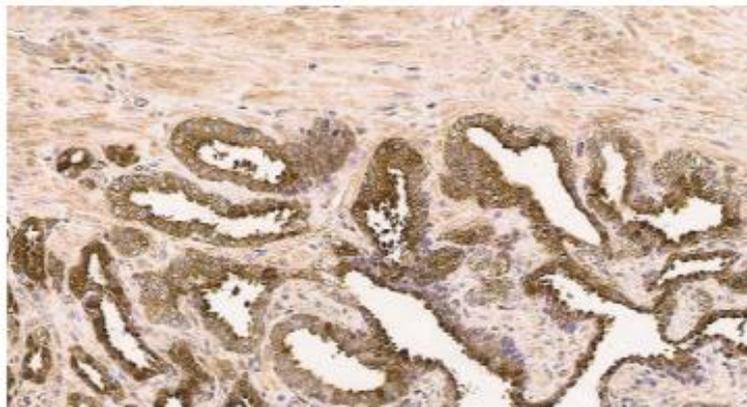


Figura 25. Tinción inmunohistoquímica de galectina-3 en las células neoplásicas de un carcinoma de próstata. Leica Biosystems. *Histología, IHQ, Patología Digital y Citogenética*. Barcelona. [Internet]. [Citado 27 de julio de 2023]. Recuperado a partir de: <https://shop.leicabiosystems.com/en-es/en-es/pid-PA0238> (113).

Niveles elevados de GAL-3 están asociados con inflamación y fibrosis de órganos, los cuales se procede a resumir en este texto (Fig. 26), destacando su valor como biomarcador y/o terapéutico en muchos trastornos fibróticos:

- **Inflamación cardíaca y fibrosis:** La proteína Gal-3 desempeña un papel crucial en la remodelación patológica del miocardio en respuesta a lesiones cardíacas, estrés crónico o inflamación, lo que conduce a la fibrosis miocárdica. Este resultado es característico de la fibrilación auricular y la insuficiencia cardíaca (101). En 2014, la FDA de EE.UU. incluyó GAL-3 en la lista de biomarcadores cardiovasculares validados. En las guías del año 2017, la *American Heart Association* recomendó la medición de GAL-3 para el pronóstico de la insuficiencia cardíaca, y se sugirió que los niveles circulantes de GAL-3 podrían servir como biomarcadores tanto para enfermedades cardiovasculares como para enfermedades no cardiovasculares(114).

Los niveles séricos de Gal-3 fueron pronósticos de muerte o rehospitalización en la insuficiencia cardíaca crónica y afectaron adversamente la función vascular en pacientes postinfarto de miocardio (115). En estudios con modelos animales, resultados reportan que la sobreexpresión de GAL-3 comprometía la viabilidad de los miocitos, y ratones con sobreexpresión selectiva de GAL-3 mostraban defectos fenotípicos cardíacos, como dilatación ventricular, exceso de grasa pericárdica y disfunción cardíaca asociada con cambios fibroinflamatorios y pérdida de miocitos. En modelos de isquemia miocárdica en ratones, niveles elevados de GAL-3 se asociaban con disfunción ventricular izquierda y aumento de la respuesta inflamatoria y fibrosante en áreas cardíacas lesionadas, mientras que los ratones sin GAL-3 estaban protegidos contra la inflamación miocárdica, el estrés oxidativo y la apoptosis tisular (116) (117). En el contexto de la aterosclerosis, una condición clave en enfermedades cardiovasculares causada por la acumulación de placas inflamatorias en arterias de tamaño medio y grande, se ha observado que GAL-3 tiene principalmente un papel proinflamatorio. No obstante, también se ha informado de una acción antiinflamatoria que está asociada con un subconjunto específico de macrófagos (118). Estudios actuales han indicado que GAL-3 desempeña un papel fundamental en la estratificación del riesgo de muerte cardíaca súbita al mostrar niveles elevados de Gal-3 en la circulación 10 días antes de la muerte súbita en comparación con los 30 días previos (119). En sus análisis inmunohistoquímicos se revelaba niveles aumentados de periostina y tricromo (marcadores de fibrosis) en personas que experimentaron muerte cardíaca súbita. A diferencia de otros biomarcadores clínicos, GAL-3 muestra actividad profibrótica, lo que podría conducir a una disminución en la función cardíaca. Estudios previos han asociado niveles elevados de GAL-3 en la circulación con resultados cardiovasculares adversos en pacientes con infarto agudo de miocardio (120). El aumento sostenido de los niveles circulantes de GAL-3 podría representar un mecanismo anormal durante la transición de paro cardíaco repentino a muerte cardíaca súbita. La vigilancia continua de los niveles elevados de GAL-3 podría ser valiosa para predecir a la población de alto riesgo para la muerte cardíaca súbita. Además, debido a las acciones pleiotrópicas de GAL-3, es posible observar roles potenciales de este biomarcador en cardiomiocitos, como la modulación de los canales iónicos cardíacos. Esto incluye la interacción de GAL-3 con residuos de β -galactósidos de glicoproteínas de la superficie celular y de la matriz (121). Los oligómeros de GAL-3 pueden unirse a canales de potasio en los miocitos atriales, lo que lleva al acortamiento del potencial de acción y, por lo tanto, a la progresión de la fibrilación auricular (122).

- **Esteatohepatitis no alcohólica y enfermedades autoinflamatorias:** En relación con la participación de GAL-3 en la inflamación y fibrosis hepática, se ha demostrado en estudios ratones que aquellos deficientes en GAL-3 estaban protegidos de la esteatohepatitis no alcohólica inducida por la dieta (NASH), mediante la atenuación de la producción de citocinas inflamatorias y la activación de la transdiferenciación de fibroblastos a miofibroblastos(123). Incluso GAL-3 ha sido propuesto como un posible biomarcador en pacientes con NASH (124). El inhibidor de galectina-3 *belapectin* fue evaluado en un ensayo clínico de fase IIb con 162 pacientes con NASH, cirrosis e hipertensión portal, y aunque no se observó mejoría en los puntos finales clínicamente relevantes, incluida la regresión de la fibrosis, un subgrupo de pacientes mostró una mejora en el gradiente de presión venosa hepática, lo que conllevó a la realización de otros estudios (125). También se ha indicado una asociación de GAL-3 con el inflammasoma NLRP3 en enfermedades autoinmunes/inflamatorias como la colitis ulcerosa o la colangitis biliar primaria (126) (127). La disfunción de la inmunidad innata media una respuesta inflamatoria que involucra la activación del inflammasoma NLRP3. El inflammasoma activado en los macrófagos hepáticos libera citocinas proinflamatorias que dañan las células epiteliales biliares. En estudios con modelos animales, se ha observado que GAL-3 puede estimular directamente la activación del inflammasoma y la promoción de la respuesta inmune Th17, lo que lleva a la colangitis. GAL-3 podría interactuar con NLRP3 a través de su dominio N-terminal. Los modelos de ratones con colangitis biliar primaria muestran que la expresión de NLRP3 es mayor en animales Galectin-3+/+ en comparación con aquellos Galectin-3-/- . En general, la investigación actual sugiere que la inhibición de la señalización de GAL-3 y la activación del inflammasoma podrían ser objetivos terapéuticos potenciales en la colangitis biliar primaria (128). También se ha observado que la GAL-3 hepática estaba significativamente correlacionada con parámetros de gravedad de la enfermedad y marcadores inflamatorios en pacientes con cirrosis avanzada (129).
- **Enfermedad renal crónica (ERC):** La GAL-3 urinaria es un biomarcador potencial de la progresión de la enfermedad renal. Trabajos muy recientes han estudiado los niveles de GAL-3 en la orina, y como resultados se correlacionó de manera inversa la GAL-3 urinaria con la tasa de filtración glomerular estimada y de manera positiva con el nivel de GAL-3 en plasma, el nivel de creatinina y la relación proteína-creatinina en orina. En este estudio se observó un aumento gradual en los niveles de GAL-3 en la orina a medida

que progresaba la etapa de la ERC, siendo el aumento más pronunciado en pacientes con ERC en la etapa 5 (estadio grave en el cual el daño renal provoca una disminución de la filtración glomerular hasta situarse en 15 ml/min o menos) (130). Niveles más altos de GAL-3 en la orina se asociaron histopatológicamente en las biopsias de renales con un engrosamiento, rigidez y colapso de la membrana basal glomerular, hipertrofia endocapilar, inflamación intersticial, fibrosis intersticial y atrofia tubular.

- **Inflamación, infección y fibrosis pulmonar:** GAL-3 desempeña un papel importante en enfermedades pulmonares inflamatorias y fibrosas como la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), y la COVID-19. Los niveles de GAL-3 se han encontrado aumentados en muestras de lavados broncoalveolares de pacientes con FPI, así como un aumento de expresión de GAL-3 por los macrófagos alveolares de estos pacientes, en comparación con individuos sanos (131). En un modelo de ratones con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, se observó una correlación entre el aumento de la expresión de GAL-3 y la transición endotelial-mesenquimal, una importante fuente de células fibróticas en la FPI (132). Debido a su función conocida en la fibrosis pulmonar y la inflamación, y a la observación de que la inhibición de GAL-3 reduce la liberación de citocinas proinflamatorias involucradas en la tormenta de citocinas, se sugirió que GAL-3 podría ser un marcador pronóstico y/o un objetivo terapéutico para la enfermedad por coronavirus en el contexto de la pandemia sufrida en 2020. Niveles elevados de GAL-3 en la sangre tienen valor pronóstico para pacientes con COVID-19 que tienen riesgo de requerir cuidados intensivos, desarrollar neumonía grave, sufrir síndrome de dificultad respiratoria aguda severa y fallecer. Además, se ha encontrado una relación positiva entre los niveles de GAL-3 y las citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α y IL-12) en pacientes en estados críticos, y los pacientes más graves han mostrado niveles aumentados de células T CD56-CD3+ GAL-3 positivas en su sangre periférica (133) (134) (135) (136) (137).
- **Enfermedades neuroinflamatorias:** Recientemente, la expresión de GAL-3 ha sido investigada en numerosos procesos patológicos como mediador de la neuroinflamación. Sin embargo, los mecanismos subyacentes por los cuales se involucra a la microglía, las células del sistema fagocítico mononuclear del sistema nervioso central, y la expresión de GAL-3 en enfermedades del sistema nervioso central es aún foco de investigación (138). Las microglías activadas son los efectores principales en la reacción inflamatoria

del sistema nervioso central, mostrando un potencial de proliferación activa, cambios morfológicos a fenotipos M1 proinflamatorios, migración a zonas dañadas y producción de citocinas. En condiciones de inflamación cerebral por algún proceso patológico, la expresión y liberación de GAL-3 puede aumentar significativamente debido a la estimulación de IFN- γ en las microglías. A su vez, GAL-3 podría activar el fenotipo M1 de las microglías a través de IFN- γ y, mediante cascadas de señalización de la vía JAK/STAT, inducir la producción de citoquinas proinflamatorias (93). Se ha descrito que la Galectina-3 liberada en el cerebro por la microglía, actúa como un ligando endógeno paracrino para el receptor TLR4, desencadenando una respuesta M1 proinflamatoria sostenida en condiciones neuroinflamatorias agudas (139). Estudios proponen a GAL-3 como mediadora de la inflamación durante la isquemia cerebral en pacientes con accidente cerebrovascular. Se han realizado estudios para analizar la relación entre los niveles de GAL-3 en suero en relación con la gravedad moderada a alta de un accidente cerebrovascular, habiéndose demostrado que niveles séricos más altos de galectina-3 están asociados con la gravedad del accidente cerebrovascular isquémico al momento de la admisión y el pronóstico al momento del alta (140). Por otra parte, se ha confirmado que la interacción entre GAL-3 y TLR4 es clave en la respuesta inflamatoria durante lesiones cerebrales traumáticas, activando la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α (141). En cuanto a la enfermedad de Alzheimer (EA), se ha revelado el papel perjudicial de la galectina-3 en la activación de las microglías agrupadas alrededor de las placas de beta amiloide (A β), tanto en el cerebro humano como en el de modelos murinos (142). Se han encontrado niveles elevados de GAL-3 en muestras de líquido cefalorraquídeo, así como en la corteza e hipocampo de estos pacientes. La presencia aumentada de GAL-3 derivada de las microglías se ha observado en otras enfermedades neurodegenerativas, y su asociación con la neuroinflamación en modelos experimentales de lesiones de médula espinal, a través de mecanismos de la vía del inflamasoma NLRP3 (143).

- **Cáncer:** Debido a ubicuidad de las galectinas, tanto en células normales como células cancerosas, median funciones intra y extracelulares importantes, acciones que incluyen la regulación del crecimiento celular, el pre-mRNA *splicing*, la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular, la polaridad celular, la motilidad, la migración celular, la diferenciación, la transformación, la transducción de señales y la apoptosis. En relación con el cáncer, numerosas investigaciones han revelado los diversos roles y mecanismos

de acción de las galectinas en la invasión y diseminación de las células tumorales. La desregulación de su expresión y su correlación con la agresividad se ha observado con frecuencia en muchos tipos de cánceres (144). Por ejemplo, GAL-3 está asociada con la señalización de Ras, ya que interactúa mediante su dominio de unión a carbohidratos con K-Ras activado. La consecuencia de esta interacción es el incremento en la señalización de K-Ras, promoviendo la activación de PI3-K, participando en la regulación de procesos como la supervivencia celular, la migración, la invasión y la progresión del ciclo celular en el cáncer (145). Se ha encontrado también que la galectina-3 aumenta la expresión de p21, controlando la progresión del ciclo celular (146). Extracelularmente, GAL-3 se une a una amplia variedad de glicoproteínas y glicolípidos en la superficie celular y en la matriz extracelular, ligandos como la fibronectina, laminina, molécula de adhesión celular neutra (N-CAM), integrinas, CD45 en leucocitos, o la inmunoglobulina y receptor de la IgE, provocando la agregación celular, la angiogénesis, la adhesión celular, la evasión del sistema inmunológico y la metástasis tumoral (147). Modificaciones post-traduccionales de GAL-3, como la fosforilación en serina 6, pueden promover la agresividad tumoral y la metástasis. La expresión de GAL-3 se ha encontrado en diversos tumores tales como melanoma, cáncer de pulmón, colon, gástrico, hepático o renal (148). Las galectinas y sus inhibidores son nuevos objetivos terapéuticos en el contexto del cáncer y la inmunomodulación, para convertirse en potenciales alternativas terapéuticas efectivas.

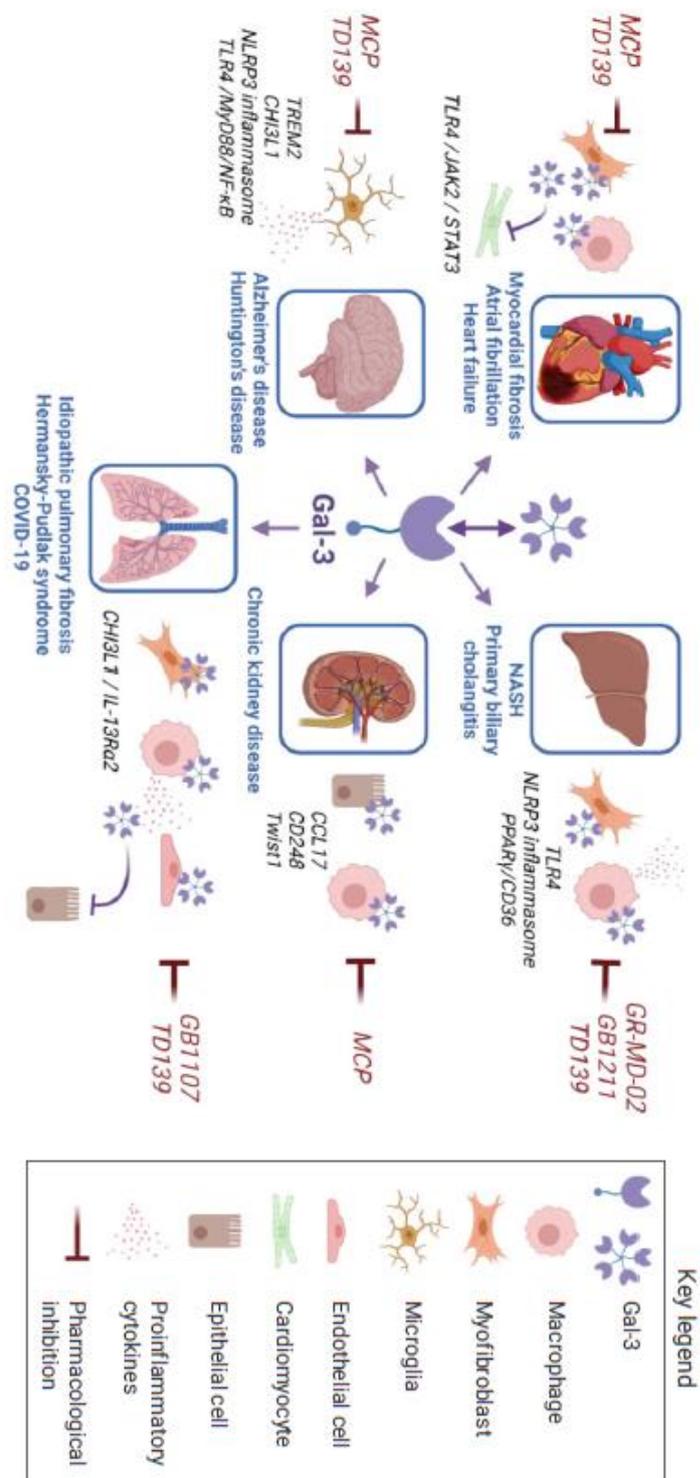


Figura 26. GAL-3 y sus inhibidores en enfermedades inflamatorias y fibrosas. GAL-3 está involucrada en la inflamación y fibrosis en diversas enfermedades, afectando órganos vitales como el corazón, el hígado, los riñones, los pulmones y el cerebro (101).

En resumen y como se ha desarrollado en el texto, la Galectina-3 influye en procesos asociados con la inflamación a través de su interacción con diversos tipos de células, incluyendo neutrófilos, monocitos y macrófagos, y de forma característica en la inflamación cutánea. Así ha sido demostrado en pasados estudios *in vitro*, observándose que Galectina-3 humana recombinante puede activar los neutrófilos de manera dependiente de la dosis, a través de un proceso que involucra su dominio de unión a carbohidratos en las etapas iniciales de la inflamación y cicatrización (149). Además de la activación de los neutrófilos, se ha demostrado que la Galectina-3 facilita la adhesión de los neutrófilos a la laminina y se ha implicado en el reclutamiento de neutrófilos en un modelo murino de infección cutánea (150). GAL-3 induce la migración del monocito, estimulando la quimiotaxis en concentraciones elevadas, así como la quimioquinesis en concentraciones menores. La migración de los monocitos y macrófagos se ve aumentada en presencia de fibronectina, sugiriendo que la Galectina-3 podría influir también en la unión de estas células a la fibronectina (151). También se ha postulado que GAL-3 actúa como una opsonina, facilitando la función fagocítica del macrófago (152), así como provocando un aumento del ratio de macrófagos M2, antiinflamatorios y proactivos en la reparación cutánea. En estudios *in vitro* e *in vivo*, GAL-3 ha demostrado inducir la angiogénesis mediante la estimulación de vías de señalización que modulan la migración de las células endoteliales, mediado por VEGF y FGF β . También se ha demostrado que GAL-3 impide la internalización de los receptores VEGFR1 y 2, aumentando la respuesta angiogénica (153).

En cuanto a re-epitelización de las heridas, diversos estudios se han realizado en otros órganos, como en los alvéolos de superficie del pulmón, o en modelos de heridas corneales, es decir, en células epiteliales de *turnover* rápido. Se ha mostrado un efecto positivo en la migración de las células epiteliales en presencia de GAL-3 después de una injuria (154). En el caso específico de la piel, se ha observado que ratones *knocked-out* para GAL-3, mostraban una epitelización retrasada atribuido a la endocitosis insuficiente del receptor EGFR (155).

En fases crónicas de la inflamación, cuándo esta es superada por la fibrosis, se produce la diferenciación de los miofibroblastos, y una consecuente síntesis excesiva de matriz extracelular. Teniendo en cuenta el papel crucial que juega GAL-3 en la fibrogénesis en múltiples órganos, y su implicación en diversas enfermedades de la piel

que involucran un componente inflamatorio excesivo, patológico y perpetuado, como la dermatitis (112) o la psoriasis (111), diversos estudios han señalado últimamente la presencia de esta proteína en algunos **trastornos dermatológicos asociados a fibrosis cutánea**. De manera relevante, la GAL-3 sérica se ha relacionado con la fibrosis y la inflamación en la esclerodermia sistémica (SSc), particularmente con la fibrosis cutánea y la vasculopatía proliferativa (156) (157). Además, GAL-3 se ha descrito como un biomarcador confiable de SSc, y su expresión inmunohistoquímica en la piel lesionada se ha asociado con la gravedad de la enfermedad (109) (158). La expresión histológica de GAL-3 se ha descrito también en queloides (110).

Sin embargo, tras explorar en la literatura publicada, se advirtieron escasos estudios *in vitro* o *in vivo* para investigar la expresión molecular de GAL-3 en estas cicatrices, en modelos fibróticos relevantes. Se desarrolló entonces el objetivo del presente trabajo. Se pretende determinar si la expresión de GAL-3 aumenta en modelos representativos para la fibrosis cutánea *in vitro* e *in vivo*, mediante el empleo de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) y de fibrocitos, en un modelo animal de fibrosis cutánea, en piel humana sana y en biopsias de cicatrices queloides.

2. METODOLOGÍA

2. Metodología

El presente proyecto de investigación es en esencia un proyecto transversal a una línea de investigación sólida, llevada a cabo por el departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Este trabajo de investigación tiene una vertiente clínica, basada en la fisiopatología de las células de la piel y la cicatrización, así como una vertiente claramente experimental, fundamentada en el estudio de la expresión de Galectina-3 en modelos murinos de fibrosis cutánea y en muestras de piel sana y muestras de pacientes con queloides. En el anexo 1 se adjunta el documento de autorización del procedimiento origen, por parte de la Consellería de la Generalitat Valenciana. En el anexo 2 se adjunta el documento de aprobación del presente proyecto por parte del Comité Ético de Investigación con medicamentos (CEIm) del Consorci Hospital General Universitari de València.

2.1. Cultivos celulares

Se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) (Fig. 27) (*Promocell; Heidelberg, Alemania; n.º de catálogo C-12300*) en el medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), alto en glucosa, glutamina y sodio (*Biowest; Riverside, EE. UU.; número de catálogo L0102-500*), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % (*Hyclone, GE Healthcare; Uppsala, Suecia; número de catálogo SV30160.03*), añadiendo penicilina y estreptomina (*Lonza; número de catálogo DE17-602E*) y anfotericina B (*Hyclone; número de catálogo SV30078.01*).

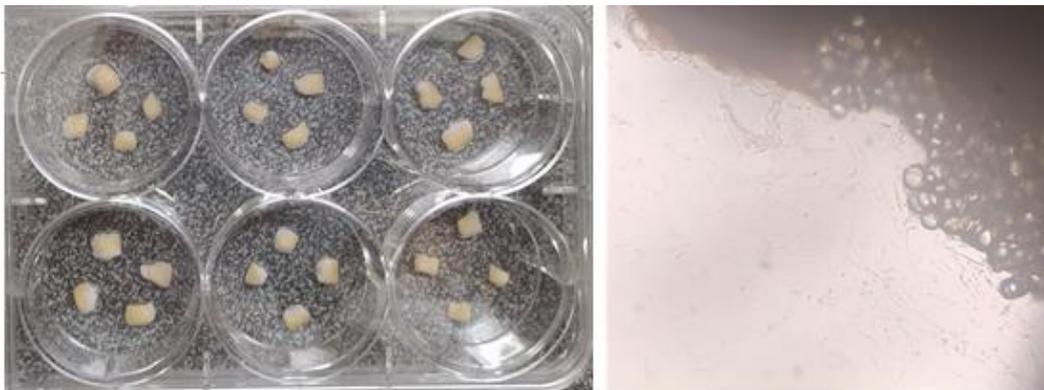


Figura 27. Aislamiento y cultivo de fibroblastos dérmicos. En la imagen de la izquierda se pueden observar fragmentos de piel con la dermis adherida a la superficie de 6 pocillos de cultivo celular. La imagen de la derecha corresponde a un aumento 40x de la superficie circundante a un fragmento de piel tras 1 semana de cultivo, donde se observan fibroblastos que han migrado y crecido en monocapa a partir del explante (parte superior de la fotografía). Fotografías tomadas en el laboratorio del Departamento de farmacología de la Facultad de Medicina, Universidad de Valencia.

Los fibrocitos empleados para el estudio se obtuvieron de muestras de capa leucocitaria (capa de células blancas, plaquetas y otras células, aislada del plasma y de los glóbulos rojos por centrifugación) de donantes sanos en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) en el periodo 2020-2021. El protocolo del proyecto para la obtención y utilización de muestras biológicas fue aprobado previamente por el comité de ética e investigación del CHGUV. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada participante para la "utilización de muestras biológicas". Para aislar los fibrocitos, se añadió solución salina tamponada con fosfato (PBS) (*Sig-ma-Aldrich, Madrid, España; número de catálogo P4417*) a la capa leucocitaria (1:1) en un tubo Falcon con Ficoll (para la separación de células mononucleares y otros elementos celulares de la sangre por gradiente de densidad en la centrifugación) (*GE Healthcare; número de catálogo 17-1440-03*). A continuación, la mezcla se centrifugó a 1300 rpm (revoluciones por minuto) durante 35 minutos y la fase blanca se recogió y mezcló con solución salina fisiológica NaCl al 0,9% (*B. Braun; Mell-sungen, Alemania; número de catálogo 12606097_0310*) y PBS. Después, esta mezcla de células blancas + NaCl + PBS se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos y el sedimento se resuspendió en DMEM suplementado con FBS al 20 %, penicilina-estreptomicina y anfotericina B.

2.2. Muestras de piel humana: tejido sano y queloides

Las muestras de piel se obtuvieron de pacientes donantes voluntarios en el Departamento de Cirugía Plástica y Reparadora del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) en el periodo 2020-2022. Se obtuvieron muestras de piel de espesor total, de cualquier localización del cuerpo, de pacientes sin ninguna enfermedad cutánea (muestras control), fragmentos sobrantes en actuaciones quirúrgicas, sin ningún valor diagnóstico o pronóstico (n=8). Se obtuvieron biopsias de queloides humanos de dos mujeres y seis hombres, con edades comprendidas entre 35 y 56 años, con una edad promedio de 49,5 años. El protocolo fue aprobado por el comité local de investigación y ética independiente del CHGUV en abril de 2022 y se realizó de acuerdo con los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos de la Declaración de Helsinki. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada participante para la "utilización de muestras biológicas", documento que se adjunta en el Anexo 3.

2.3. Modelo animal de fibrosis cutánea

Este estudio se llevó a cabo de acuerdo con las directrices del Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad de Valencia (Valencia, España; CEA 2017/VSC/PEA/00062) según la guía ARRIVE. Se adquirieron ratones macho BALB/c (cepa albina de ratón de laboratorio ampliamente utilizada en la experimentación), de 12 semanas de edad (*Harlan UK Ltd. Derby, Reino Unido*). Todos los ratones se mantuvieron en condiciones *specific-pathogen-free*, término que se emplea para indicar y asegurar que los animales de laboratorio no tienen patógenos particulares que pudieran interferir con los experimentos. Se les proporcionó comida y agua esterilizadas en autoclave y vivían en condiciones de temperatura y luz controladas (humedad relativa $55 \pm 10 \%$; temperatura $22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$; 15 ciclos de aire/por hora; ciclos de 12/12 horas de luz/oscuridad).

La fibrosis cutánea inducida por inyecciones intradérmicas de hipoclorito (HOCl) representa un modelo general de fibrosis cutánea asociada con el estrés oxidativo, un mediador importante en la patogénesis de la fibrosis cutánea. Los ratones BALB/c eran anestesiados con isoflurano (Aerrane®) (Fig. 28), un éter halogenado usado como anestésico inhalatorio, y sometidos a una inyección intradérmica diaria en la espalda de HOCl al 0,1mg/ml (disuelto en 100 μl de solución salina fisiológica), durante seis semanas. Los ratones control recibían un volumen idéntico de suero fisiológico en lugar de hipoclorito. Al final del protocolo, los ratones fueron sacrificados mediante una inyección letal de pentobarbital sódico, seguido de exanguinación (Fig. 29). La piel se procesó para estudios experimentales, histológicos o de biología molecular.



Figura 28. Vaporizador de anestesia y cámara estanca. Los animales fueron anestesiados con isoflurano. Se situaban dentro de una cámara estanca con entrada de oxígeno y una atmósfera de Isoflurano al 5% generada por un vaporizador (Harvard Apparatus). Tras unos minutos los animales quedaban dormidos. Fotografía tomada en el Dpto. Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia.

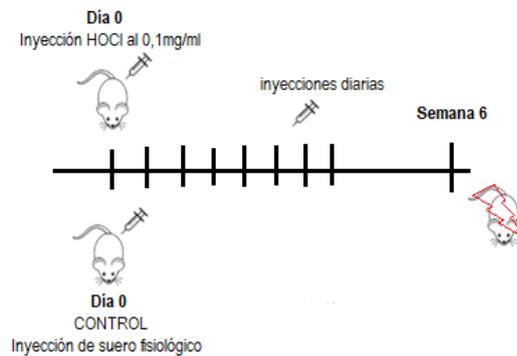


Figura 29. Los ratones BALB/c sometidos a una inyección intradérmica diaria en la espalda de HOCl al 0,1mg/ml (disuelto en 100 μ l de solución salina fisiológica), durante seis semanas. Los ratones control recibían un volumen idéntico de suero fisiológico en lugar de hipoclorito. Al final del protocolo, los ratones fueron sacrificados y la piel se procesó para estudios experimentales. Esquema de elaboración propia.

2.4. RT-PCR en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método utilizado para amplificar el ácido desoxirribonucleico (ADN). La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, del inglés *reverse transcription polymerase chain reaction*), utiliza la transcripción inversa para, a partir de una fuente de ácido ribonucleico (ARN), producir ADN complementario, que luego se puede amplificar. Se trata del método de elección para la cuantificación de ARN mensajero (ARNm) (159). La PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (en inglés, *quantitative polymerase chain reaction*; qPCR o Q-PCR) es una variante de la PCR de punto final tradicional, la cual permite amplificar y simultáneamente cuantificar el nivel de producto obtenido en cualquier momento de la amplificación (160) (Fig. 30).



Figura 30. Sistemas de PCR en tiempo real QuantStudio 5, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific. Fotografía tomada del laboratorio.

El análisis de RT-PCR en tiempo real se utilizó para detectar cambios en la expresión de ARNm en tejido cutáneo de ratones del modelo *in vivo* y en tejido humano sano y queloide. El ARN total se obtuvo con el reactivo de aislamiento TriPure® Isolation Reagent (Roche, Indianápolis, EE. UU.) y con el TissueLyser II (QIAGEN, Hilden, Alemania). La muestra de tejido se fraccionó mediante agitación a alta velocidad (30 Hz, 3 minutos) en tubos de plástico con reactivo de aislamiento TriPure®. La muestra se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. La integridad del ARN extraído se confirmó con Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, EE. UU.) (Fig. 31 y 32).



Figura 31. Thermo Scientific™ KingFisher™ Duo Prime Purification System. Instrumento de purificación ofrece una producción de alta calidad de ácidos nucleicos (ADN/ARN) y proteínas. Extrae ADN y ARN de las células para la realización de RT-PCR y otros. Fotografía tomada del laboratorio.



Figura 32. Espectrofotómetros NanoDrop™ 2000/2000c, Thermo Scientific™. Dispositivo diseñado para medir y analizar la luz en función de su longitud de onda, para medir cantidad de material genético de una muestra. Fotografía tomada del laboratorio.

La transcripción inversa se realizó en 300 ng de ARN total utilizando el kit de reactivos de transcripción inversa TaqMan® (*Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, EE. UU.*). Los reactivos TaqMan® utiliza una sonda fluorogénica para la detección en tiempo real únicamente de los productos de amplificación específicos, a medida que se acumula durante la reacción (Fig. 33).

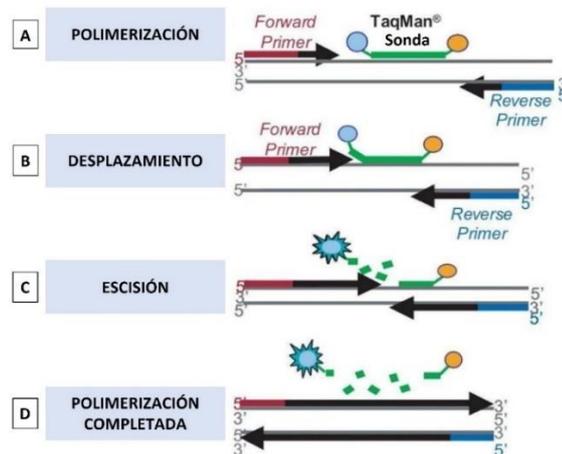


Figura 33. Sistema TaqMan® de cuantificación fluorométrica de la expresión génica. (A) La sonda contiene un fluoróforo en el extremo 5' y un inhibidor de fluorescencia (quencher) en el extremo 3'. Éste último absorbe la fluorescencia emitida por el fluoróforo mientras ambos permanecen unidos a la sonda próximos entre sí. (B, C) Durante los ciclos de la PCR, la sonda se hibrida con los productos de la PCR específicos para ella, y a medida que la polimerasa copia la cadena complementaria, el fluoróforo se escinde de la sonda. (D) La separación entre el fluoróforo y el quencher debido a la escisión de la sonda, provoca un aumento de la señal fluorescente que es proporcional a la cantidad de productos de amplificación que se genera en la mezcla de reacción. Esquema de elaboración propia.

El ADNc resultante se amplificó con sondas y cebadores específicos prediseñados por Applied Biosystems, **en ratones para α -SMA** (*Smooth muscle α -actin*) (*Mm00808218_g1*), **COL1** (colágeno 1) (*Mm00801666_g1*), **TGF β 1** (*Mm00441726_m1*) y **GAL-3** (*Mm00802901_m1*) y **en humanos α -SMA** (*Hs00559403_m1*), **COL1A1** (*Hs00164004_m1*), **CTGF** (*connective tissue growth factor*) (*Hs00170014_m1*), **E-cadherina** (*Hs01023894_m1*) y **GAL-3** (*Hs00173587_m1*), en un sistema de PCR en tiempo real rápido (7900HT, *Applied Biosystems*) usando *Applied Biosystems*™ TaqMan™ Gene Expression Master Mix. La expresión del gen diana se mostró como un aumento o disminución de la cantidad de fluorescencia en relación con la expresión de la β -actina de control endógena (*Applied Biosystems*; *Hs01060665* para humanos y *Mm02619580_g1* para ratones).

Para medir la expresión de un determinado gen se utilizó el ciclo umbral (Ct), ciclo en el que la fluorescencia supera el umbral determinado. Por encima de esta línea, el nivel de fluorescencia se considera significativamente superior a la fluorescencia basal (Fig. 34). A continuación, se calculó el nivel de expresión génica como la diferencia (Δ Ct) entre el valor de Ct del gen diana y el valor de Ct de la β -actina. Los cambios en los niveles de ARNm del gen diana se denominaron $2^{-\Delta$ Ct.

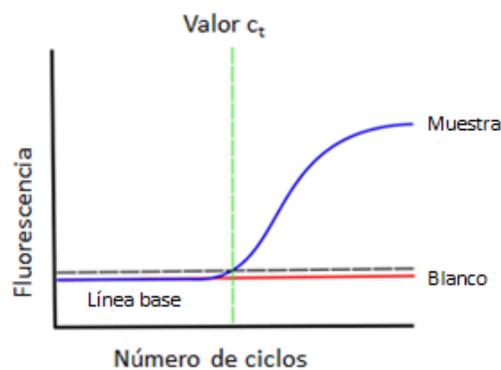


Figura 34. Valor del ciclo umbral (Ct) en una curva de amplificación por PCR a tiempo real. El instrumento de PCR recogerá datos de fluorescencia durante cada ciclo. Esto aparecerá en un principio como una línea recta a partir del punto del ciclo cero. El ciclo umbral estará justo por encima de esta línea, en el punto donde la fluorescencia comienza a pasar a la fase exponencial. Esquema de elaboración propia.

2.5. Estudios Histológicos, Inmunohistoquímicos e Inmunofluorescencia

El tejido de piel humana y murina se fijó en formaldehído al 3,7-4,0 % durante 48 horas (*PanReac, Ap-pliChem, Darmstadt, Alemania; número de catálogo 252931*). Las muestras se deshidrataron, se embebieron en parafina y se cortaron en secciones de 5 μ m de espesor.

La expresión de α -SMA y GAL-3 se evaluó mediante inmunohistoquímica en secciones incluidas en parafina de piel murina. Las secciones se desparafinaron mediante incubación con calor a 60 °C durante 15 minutos, con xileno por dos veces durante 5 minutos cada una, y con etanol al 100 % durante 2 minutos. Luego, las secciones se incubaron en metanol y peróxido de hidrógeno, 174: 6, durante 10 minutos y se incubaron en PBS por tres veces, 5 minutos cada vez. Luego, las secciones se incubaron en citrato 10 mM precalentado, que se colocó en agua hirviendo, durante 10

minutos, se lavó con agua Milli-Q (agua purificada) durante 5 minutos y se bloqueó mediante *Peroxidase Blocking Reagent* de *Master Polymer Plus Detection System* (un sistema de detección inmunohistoquímico que emplea un micropolímero marcado con peroxidas que detecta el complejo antígeno-anticuerpo amplificado) durante 10 minutos a temperatura ambiente y evitando la luz (*Master Diagnóstica, Granada, España; número de catálogo MAD-000237QK*). Después de la incubación, las secciones se lavaron en solución salina tamponada (PBS) con Tris (nombre abreviado del compuesto orgánico conocido como tris(hidroximetil)aminometano, que se utiliza ampliamente en bioquímica para preparar disoluciones tampón) por tres veces, 5 minutos cada una (*Tris 0,05 M, cloruro de sodio 0,15 M, pH 7,6, a 25 °C; PanReac, AppliChem*). Se incubaron durante la noche en una cámara húmeda a 4°C, con **anticuerpo α -SMA** (1/200) (*Sigma-Aldrich; número de catálogo A5228*) o **anticuerpo anti-GAL-3** (1/200) [A3A12] (*Abcam, Cambridge, Reino Unido; número de catálogo ab2785*) en albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1%, en PBS (*Sigma-Aldrich, número de catálogo A7906*). Después de la incubación durante la noche, las secciones se incubaron durante 30 minutos con el *Master Polymer Plus HRP* a temperatura ambiente y evitando la luz (*otro micropolímero del kit de inmunohistoquímica, constituido por la combinación de anticuerpos secundarios conjugados y moléculas de peroxidasa, que reconoce anticuerpos primarios de ratón y conejo*) (*Master Diagnóstica; catálogo número MAD-000237QK*). Las secciones se lavaron en PBS por tres veces, 5 minutos cada una, y se incubaron con un concentrado de cromógeno 3,3'-Diaminobenzidina (*DAB*) en un tampón de sustrato *DAB* (un sustrato de peroxidasa que produce un producto de color marrón) durante 5 minutos a temperatura ambiente y evitando la luz (*Master Diagnóstica; catalog número MAD-000237QK*). Las secciones se lavaron con agua tres veces, por 5 minutos cada vez, se tiñeron con hematoxilina (1/20), se lavaron con agua tres veces, 5 minutos cada vez y se deshidrataron con etanol al 90 % y al 100 % en agua, dos veces, durante 5 minutos cada vez. Después, se incubaron en xileno dos veces, 10 minutos cada una. Las secciones se montaron con DPX (un medio de montaje para histología) y las imágenes se adquirieron con un microscopio Leica DM6000B (Leica Microsystems) (Fig. 35).

- Se fija la piel en formaldehído al 3,7-4,0 % por 48 horas. Las muestras se deshidratan, se embeben en parafina y se cortan en secciones de 5 μm de espesor.
- Las secciones se desparafinan 1) incubación con calor a 60 $^{\circ}\text{C}$, 15 minutos; 2) con xileno (x2), 5 minutos cada una; 3) con etanol al 100 %, 2 minutos.
- Se incuban en metanol y peróxido de hidrógeno, 174: 6, 10 minutos.
- Se incuban en PBS (x3), 5 minutos cada vez.
- Se incuban en citrato 10 mM precalentado 10 minutos. Se lava con agua Milli-Q durante 5 minutos.
- Sistema polimérico para inmunohistoquímica: Se añade Peroxidase Blocking Reagent, 10 minutos a temperatura ambiente y evitando la luz.
- Las secciones se lavan en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (x3), 5 minutos cada vez.
- Se incuban durante la noche en una cámara húmeda a 4 $^{\circ}\text{C}$, con anticuerpo α -SMA (1/200) o anticuerpo anti-GAL-3 (1/200), en albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1% y PBS.
- Tras la noche, las secciones se incuban 30 minutos con el Master Polymer Plus HRP.
- Las secciones se lavan en TBS x3, 5 minutos cada una.
- Se incuban con cromógeno DAB en un tampón DAB, 5 minutos.
- Las secciones se lavan con agua x3, 5 minutos cada vez.
- Se tiñen con hematoxilina (1/20).
- Se lavan con agua x3, durante 5 minutos.
- Se deshidratan con etanol al 90 % y al 100 % en agua, x2, durante 5 minutos cada vez.
- Se incuban en Xileno x2, 10 minutos cada una.
- Se montan las secciones en DPX y ¡al microscopio!

Figura 35. Resumen protocolo de preparación de las muestras de piel para el análisis histológico e inmunohistoquímico para la expresión de α -SMA y GAL-3.

La expresión de α -SMA o GAL-3 se evaluó mediante inmunofluorescencia en fibrocitos, en tejido cutáneo murino y en tejido humano sano y queloide. **La expresión de α -SMA o GAL-3 se evaluó mediante inmunofluorescencia en fibrocitos.** Los fibrocitos se lavaron tres veces en la solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (*Biowest, L0615*) y se fijaron con metanol al 100% a -20 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos. Las células se permeabilizaron en Triton X-100 (0,1 % en PBS) (surfactante no iónico utilizado como componente de tampones de lisis celular) durante 8 minutos, y se bloquearon en BSA al 1 % en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Después, las secciones se incubaron durante la noche en una cámara húmeda a 4 $^{\circ}\text{C}$ con **anticuerpo anti-GAL-3 (1/200) [A3A12]** en BSA al 1% en PBS. Después de la incubación durante la noche, las secciones se lavaron tres veces con PBS, durante 5 minutos cada vez, y se incubaron durante una hora con un anticuerpo IgG de cabra anti-ratón, Alexa Fluor 488 (1/200) (*Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.; catálogo número A11001*) en BSA al 1% en PBS a temperatura ambiente y evitando la luz. Las secciones se lavaron con PBS tres veces, 10 minutos cada una, y se incubaron con DAPI (1/1000) (para tinción de ácidos nucleicos) (*Sigma-Aldrich; número de catálogo D9542*) en BSA al 1 % en PBS durante 2 minutos. Las secciones se lavaron de nuevo tres veces con PBS por 10 minutos cada vez y se montaron con DPX. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron con un microscopio Leica DM6000B (Leica Microsystems) (Fig. 36).

- Los fibrocitos se lavan x3 en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco y se fijan con metanol al 100% a -20°C durante 5 minutos.
- Triton X-100 durante 8 minutos. BSA al 1 % en PBS durante una hora a temperatura ambiente.
- Las secciones se incuban durante la noche en una cámara húmeda a 4°C con anticuerpo anti-GAL-3 (1/200).
- Después de la incubación durante la noche, las secciones se lavan x3 con PBS, durante 5 minutos cada vez.
- Se incuban durante una hora con un anticuerpo IgG de cabra anti-ratón.
- Las secciones se lavan con PBS x3, 10 minutos cada una.
- Se incuban con DAPI (1/1000)
- Las secciones se lavan x3 con PBS, por 10 minutos cada vez.
- Se montan con DPX y ¡al microscopio!

Figura 36. Preparación de fibrocitos para evaluar la expresión de α -SMA y GAL-3 mediante inmunofluorescencia.

Las secciones de **tejido** (5 μ m) se desparafinaron mediante incubación con calor, a 60°C, por 15 minutos, con xileno por dos veces, 10 minutos cada una, y etanol al 100 %. Las secciones se permeabilizaron en Triton X-100 (0,1% en PBS) durante 10 minutos, se lavaron en PBS, tres veces, 5 minutos cada una y se bloquearon durante 10 minutos a temperatura ambiente y evitando la luz en Peroxidase Blocking Reagent de Master Polymer Plus Detection System (*Master Diagnóstica; número de catálogo MAD-000237QK*). Después de la incubación, las secciones se lavaron tres veces durante 5 minutos en PBS y se incubaron durante la noche en una cámara húmeda a 4°C con **anticuerpo α -SMA** (1/200) o **anticuerpo anti-GAL-3** (1/200) en 0,1 % de BSA en PBS. Después de la incubación durante la noche, las secciones se lavaron con PBS, tres veces durante 5 minutos cada una, y se incubaron durante una hora con un anticuerpo IgG anti-ratón de cabra, Alexa Fluor 488 (1/200) (*Invitrogen; n.º de catálogo A11001*) en BSA al 0,1 % en PBS, a temperatura ambiente y evitando la luz. Las secciones se lavaron tres veces durante 10 minutos en PBS y se incubaron con DAPI (1/1000) (*Sigma-Aldrich; número de catálogo D9542*) en BSA al 1 % en PBS durante 2 minutos. Las secciones se lavaron con PBS, tres veces durante 10 minutos cada vez y se montaron con DPX. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron con un microscopio Leica DM6000B (Leica Microsystems) (Fig. 37).

- Las secciones de tejido (5 μm) se desparafinan 1) incubación con calor a 60 $^{\circ}\text{C}$, 15 minutos; 2) con xileno (x2), 5 minutos cada una; 3) y con etanol al 100 %, 2 minutos.
- Las secciones se permeabilizan en Triton X-100 durante 10 minutos.
- Se lavan en PBS x3, 5 minutos.
- Peroxidase Blocking Reagent durante 10 minutos.
- Las secciones se lavan en TBS x3.
- Se incuban durante la noche en una cámara húmeda a 4 $^{\circ}\text{C}$ con anticuerpo α -SMA (1/200) o anticuerpo anti-GAL-3 (1/200) en 0,1 % de BSA en PBS.
- Se lavan en PBS x3, 5 minutos.
- Se incuban durante una hora con un anticuerpo IgG anti-ratón de cabra
- Las secciones se lavan 3x, durante 10 minutos en TBS.
- Se incubaron con DAPI (1/1000) en BSA al 1 % en PBS durante 2 minutos.
- Las secciones se lavan con PBS, x3 durante 10 minutos cada vez.
- Se montan con DPX y ¡al microscopio!

Figura 37. Preparación de secciones de tejido para evaluar la expresión de α -SMA y GAL-3 mediante inmunofluorescencia.

2.6. Western blot

El western blot, inmunoblot o electrotransferencia, es una técnica analítica usada en biología celular y molecular para identificar proteínas específicas, así como modificaciones postraduccionales en proteínas, y puede proporcionar datos semicuantitativos o cuantitativos sobre la proteína diana en muestras biológicas simples o complejas. Es un procedimiento que conlleva la realización de varios pasos que resumidamente implican la preparación de muestras, la extracción de proteínas y medición de su concentración a partir de lisados de células o tejidos, el sondeo de proteínas diana con anticuerpos primarios específicos, su incubación con anticuerpos secundarios conjugados con una molécula fluorescente, y la detección de señal que refleja unión antígeno/anticuerpo, para finalmente realizar el análisis densitométrico de las bandas de la proteína de interés (161). En este trabajo se utilizó el Western blot para detectar cambios en la expresión de proteínas en las muestras de piel de ratones del modelo *in vivo* y en NHDF humanos.

El tejido de la piel se homogeneizó mediante agitación a alta velocidad (30 Hz, 10 minutos) con el TissueLyser II (QIAGEN) utilizando un tampón de lisis (0.02 M HEPES, 0.001 M EDTA, 0.001M EGTA, 0.4M NaCl y glicerol 21.1%) con un cóctel inhibidor y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF 0,1 mM). La muestra se centrifugó y se recogió el sobrenadante. Las células se rasparon de una placa de Petri con el mismo tampón de lisis. Posteriormente, tanto las muestras de tejido como las de células se lisaron, siguiendo un protocolo de lisis térmica seguido de una incubación en hielo con el

detergente nonidet P-40 (1%). A continuación, las muestras se centrifugaron (10000 rpm) a 4°C, durante 20 minutos y se recogió el sobrenadante. Con el fin de garantizar la misma carga de proteína, se cuantificó el nivel de proteína en cada muestra mediante el *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher, Waltham, MA, EE. UU.; n.º de catálogo 23227).

Se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida para separar las proteínas según su peso molecular. Se cargaron 12 µg de proteínas desnaturalizadas, junto con un marcador de proteína de peso molecular (Fig. 38) (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*). (ThermoFisher Scientific; Waltham, MA, USA; catalog no. 26623) en un gel 4–15% Mini-PROTEAN® TGX™ (Biorad, Hercules, California, USA; catalog no. 4561086) o en un gel 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ (Biorad; catalog no.4561094), y corrieron por el gel aplicando 90 V durante 30 minutos y 300V durante 30 minutos.

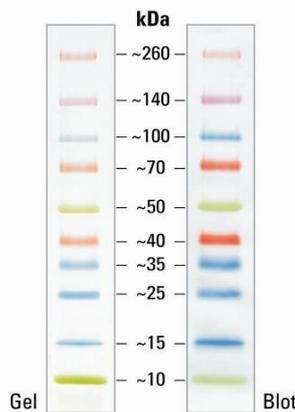


Figura 38. Thermo Scientific™ Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder. Estándar de proteína de cuatro colores que contiene 10 proteínas preteñidas (de 10 a 260 kDa) para el uso como patrones de tamaño en electroforesis en gel y la inmunotransferencia (Western blotting). ThermoFisher scientific [Internet]. [Citado 8 de agosto de 2023]. Recuperado a partir de: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-gel-electrophoresis/protein-standards-ladders>

Después de la separación de proteínas por electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de difluoruro de polivinilideno mediante un método de transferencia semihúmeda (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, BioRad). Las membranas se bloquearon (utilizando BSA al 5 % en PBS que contenía Tween20 al 0,1 % (PBS-T)) durante una hora a temperatura ambiente y se incubaron durante la noche a 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en BSA al 5 % en PBS-T: **Anticuerpo α-SMA** (1/1000) (42 KDa, monoclonal antibody; Sigma-Aldrich, catalog no. A5228), **anticuerpo colágeno tipo I** (1/1000) (139 KDa, polyclonal antibody; Novus

Biologicals, Centennial, USA; catalog no. NB600-408), anticuerpo factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) (1/200) (38 KDa, polyclonal antibody; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA; catalog no. sc-34772), anticuerpo fosforilado ERK1/2 [Thr202, Tyr204] (1/1000) (42-44 KDa, monoclonal antibody; Invitrogen; catalog no. 11372362); anticuerpo fibronectina (1/1000) (230-250 KDa, polyclonal antibody; Invitrogen; catalog no. PA5-29578), anticuerpo anti-Galectina 3 (GAL-3) [A3A12] (1/2000) (30 KDa, monoclonal antibody; Abcam; catalog no. ab2785) y anticuerpo anti β -actina (1/2000) – control de carga (40 KDa, monoclonal antibody; Sigma-Aldrich; catalog no. A5441). Las membranas se lavaron posteriormente (PBS-T) y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente con anticuerpo secundario de burro anti-ratón IgG-peroxidasa (HRP) (polyclonal antibody; Invitrogen; catalog no. SA1-100) o anticuerpo secundario de burro anti-conejo IgG-HRP (polyclonal antibody; Invitrogen; catalog no. SA1-200) diluido en BSA al 5 % en PBS-T. Las membranas se lavaron posteriormente (PBS-T) y la reactividad se visualizó usando el sistema de transferencia Western ECL™ Prime Western Blotting System (Fig. 39) (GE Healthcare; catalog no. RPN2232) y Hyperfilm™ ECL™ films (GE Healthcare; catalog no. GE28-9068-37). El análisis de densitometría se realizó con el software Image J 1.42q (<https://imagej.nih.gov/ij/>, USA.). Los resultados de la expresión de la proteína diana se expresaron como la proporción de la densitometría a partir del control endógeno de β -actina.

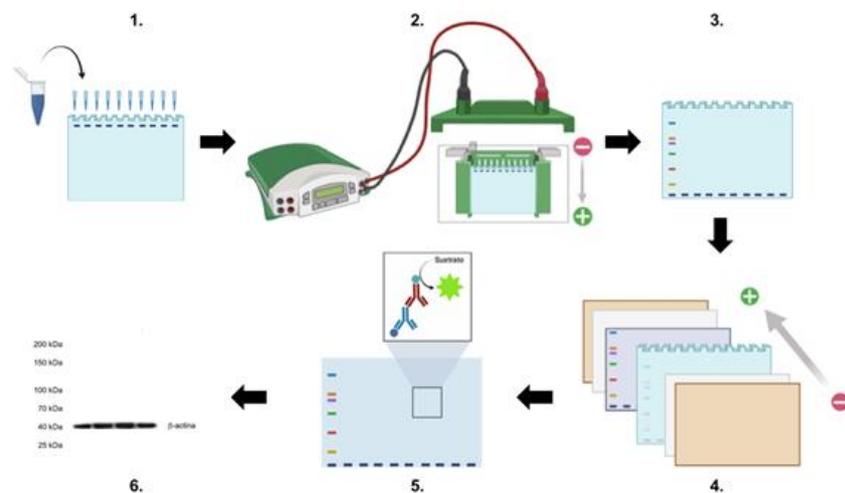


Figura 39. Esquema de la técnica Western Blot. 1. Carga de las muestras y del marcador de peso molecular. 2. Separación de las proteínas en gel de acrilamida. 3. Tras la electroforesis las muestras quedan separadas a lo largo del gel, incluido el marcador. 4. Transferencia de las proteínas desde el gel hacia una membrana. 5. Incubación de la membrana con anticuerpo primario, anticuerpo secundario y reacción de quimioluminiscencia. 6. Revelado de la quimioluminiscencia para visualizar la banda donde se encuentra la proteína de interés. Esquema de elaboración propia.

2.7. ELISA

Los niveles de **GAL-3** en el sobrenadante libre de células de NHDF cultivados se midieron utilizando el kit comercialmente disponible: *Galectin 3 Human ELISA kit* (Invitrogen; catalog no. BMS279-4), siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos kits permiten determinar cuantitativamente los niveles de proteínas en el sobrenadante y se basan en la técnica de ELISA cuantitativo en sándwich (Fig. 40). En este sistema los pocillos tienen adheridos a su base anticuerpos específicos contra nuestra proteína de interés.



Figura 40. Sistema para la realización de *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA). Fotografía tomada del laboratorio.

A los pocillos necesarios se añadieron 50 μ L de diluyente y posteriormente 50 μ L del estándar (en concentraciones seriadas para la recta patrón), las muestras por duplicado (Fig. 41-1) y el blanco (diluyente solo). Se incubó la placa durante 2 horas, durante las cuales la proteína de interés presente se unió al anticuerpo inmobilizado (Fig. 41-2). Se realizaron lavados, para eliminar uniones inespecíficas, y se añadieron 100 μ L del anticuerpo específico conjugado a una enzima, y se incubó durante 30 minutos más (Fig. 41-3). Se realizaron lavados, se añadieron 100 μ L de una solución de sustrato y se incubó 30 minutos en oscuridad. La enzima asociada al segundo anticuerpo modifica el sustrato produciendo un producto coloreado (Fig. 41-4), cuya intensidad será proporcional a la concentración de anticuerpo unido en el paso inicial, es decir, será proporcional a la concentración de la proteína de interés. Se detuvo la reacción y se midió la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer).

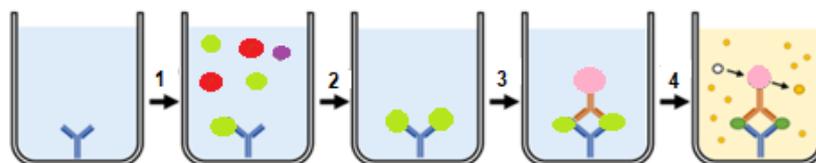


Figura 41. Esquema de la técnica de ELISA cuantitativo por inmunodetección indirecta de proteínas, o técnica en sándwich. Esquema de elaboración propia.

2.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante pruebas no paramétricas, en los estudios en células y humanos, y paramétricas en los estudios en animales. Se consideró estadísticamente significativo un P-valor $\leq 0,05$. En cuanto a las pruebas no paramétricas, el test de Man Whitney se utilizó para analizar las diferencias entre dos grupos. Además, la correlación entre GAL-3 y COL-1 se analizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman ($r=1$; $p < 0,0001$), así como la correlación entre la expresión de GAL-3 y E-Cadherina ($r=-1$; $p < 0,0001$). El análisis estadístico de los resultados de los experimentos con animales se llevó a cabo mediante análisis paramétricos, partiendo de una distribución normal para cada conjunto de datos, confirmado mediante el test de Shapiro-Wilk y el test de Kolmogorov–Smirnov. En estos experimentos, las comparaciones entre dos grupos se analizaron utilizando la prueba T de Student no pareada de dos colas para muestras independientes. Los datos se mostraron como media \pm SEM.

3. RESULTADOS

3. Resultados

3.1. Expresión de GAL-3 en modelos *in vitro* de fibrosis cutánea con estimulación TGF β 1

3.1.1. Modelo de transición fibroblasto a miofibroblasto

En cultivos de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF), el TGF β 1 aumentaba de forma significativa la expresión de la proteína de transición desde fibroblastos a miofibroblastos α -SMA, aumentaba el colágeno tipo 1 de la membrana extracelular, y el factor de crecimiento de tejido conectivo profibrótico (CRGF), evaluado mediante Western blot (Fig. 42A-F). De forma característica, el TGF β 1 también aumentaba la proteína de expresión de GAL-3 (Fig. 42 G, H) y su secreción en el sobrenadante del cultivo, medido por ELISA (Fig. 42 I).

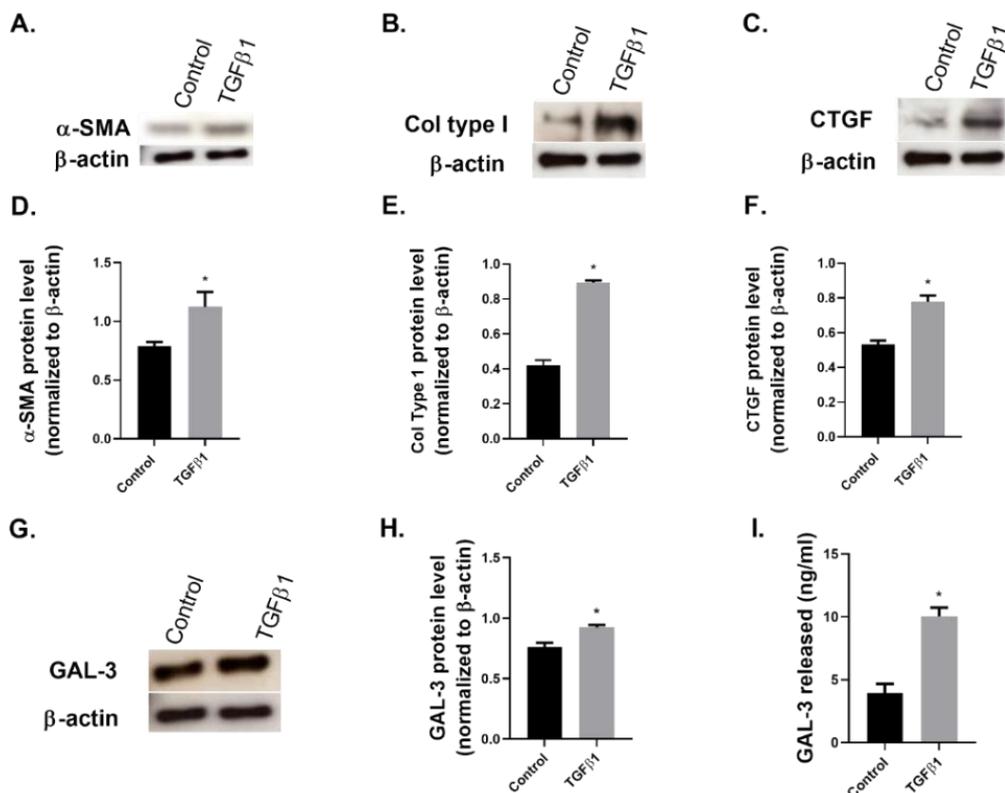


Figura 42. TGF β 1 induce la expresión de GAL-3 en la transición del fibroblasto a miofibroblasto. Los NHDF fueron estimulados con 10 ng/ml de TGF β 1 durante 48h. En la imagen se muestra los niveles de proteínas, evaluados mediante Western blot, respecto el control endógeno de β -actina. **A)** el TGF β 1 aumenta la expresión de α -SMA; **B)** el aumenta la expresión de Col-I; **C)** el TGF β 1 aumenta la expresión de CTGF. En las gráficas de barras se representa análisis desitométrico mediante Western blot:

D) se observa un aumento de nivel de α -SMA cuando se estimula con TGF β 1 (barra gris mayor respecto a barra negra control); **E)** se observa un aumento de nivel de Col-I cuando se estimula con TGF β 1 (barra gris mayor respecto a barra negra control); **F)** se observa un aumento de nivel de CTGF cuando se estimula con TGF β 1 (barra gris mayor respecto a barra negra control). **G)** Los niveles de GAL-3 fueron evaluados mediante Western Blot, se observa el aumento de intensidad de la marca de α -SMA, cuando se estimula con TGF β 1, comparado con el control endógeno de β -actina. **H)** En la gráfica se observa el aumento del nivel de GAL-3 por densitometría al estimular con TGF β 1. **I)** La liberación de GAL-3 en el sobrenadante se evaluó mediante ELISA. Se contempla un aumento de nivel de GAL-3 tras estimulación con TGF β 1. Los gráficos presentan datos representativos de 3 experimentos con $n=3$ por grupo. Los resultados se presentan como media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Mann-Whitney (unilateral) * $p \leq 0.05$ vs control.

3.1.2. Modelo de fibrocitos humanos

En un cultivo celular de fibrocitos humanos, el TGF β 1 inducía a la proteína de expresión GAL-3. Este aumento de la proteína GAL-3 era evidente en el citoplasma de los fibrocitos humanos estimulados por TGF β 1 evidenciado por inmunofluorescencia (Fig. 43).

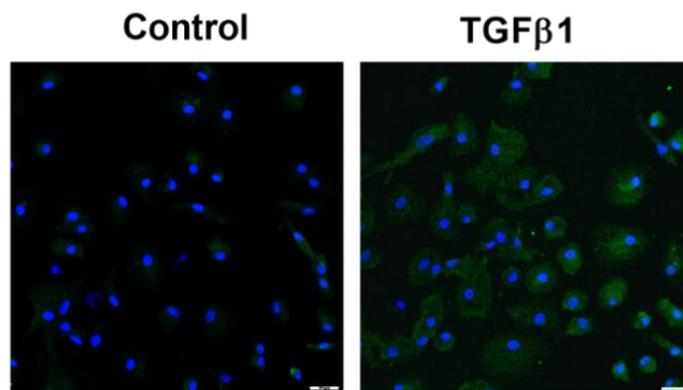


Figura 43. Los fibrocitos se estimularon con factor de crecimiento transformante β 1, 10 ng/ml durante 48 horas. Imágenes de microscopio de inmunofluorescencia representativas de control y fibrocitos estimulados con TGF β 1 para la inmunotinción de GAL-3. (DAPI, marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN); Núcleos azules. Escala 25 μ m.

3.2 Expresión de GAL-3 en modelos *in vivo*

3.2.1. Expresión de GAL-3 en modelos murinos de fibrosis cutánea

Se estudió la expresión de GAL-3 en un modelo murino debidamente caracterizado de fibrosis cutánea.

Se realizaron inyecciones intradérmicas seriadas de hipoclorito (HOCl) durante seis semanas y se evaluaron los niveles de marcadores de fibrosis en la piel lesionada. La expresión génica de los marcadores fibróticos **TGF β 1**, **α -SMA** y **Col-1** estaba **significativamente aumentada en el grupo tratado con HOCl** (Fig. 44 A-C). Particularmente, la expresión de α -SMA estaba aumentada en la dermis de los ratones tratados con hipoclorito, comparado con el grupo control (Fig. 45). Los ratones tratados con HOCl también mostraban un engrosamiento tanto de la dermis como de la epidermis, una característica definitoria de fibrosis cutánea.

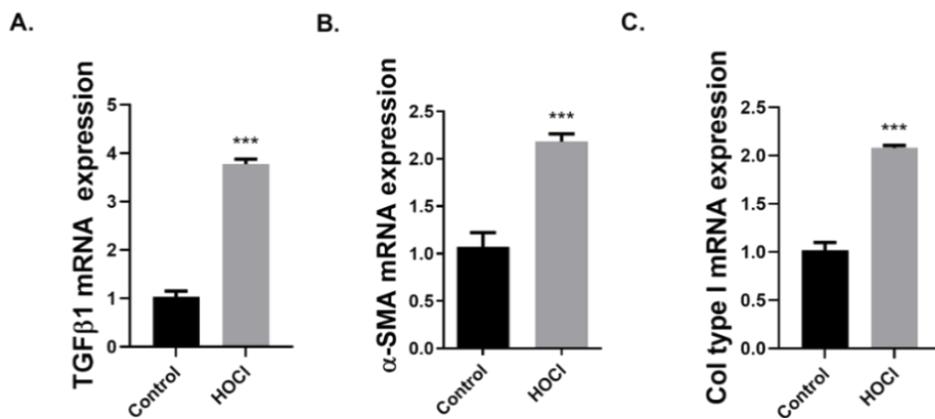


Figura 44. Modelo animal de fibrosis cutánea. A los ratones BALB/c se les administraron inyecciones intradérmicas de 100 μ l de hipoclorito (HOCl) diariamente durante 6 semanas y después fueron sacrificados. Se realizó RT-PCR a tiempo real para evaluar la expresión de ARN mensajero. **A)** En la gráfica de barras se representa un aumento de expresión de RNAm de TGF β 1 en las células tratadas con hipoclorito; **B)** Aumento de expresión de RNAm de α -SMA en ratones tratados con hipoclorito; **C)** Aumento de expresión de RNAm para Col-I en las células tratadas con hipoclorito. Los gráficos presentan datos de un experimento con n=7 (control) y n=8 (HOCl) ratones por grupo. Los resultados se presentan como media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student no pareada de dos colas para muestras independientes. ***p<0,001 frente al control.

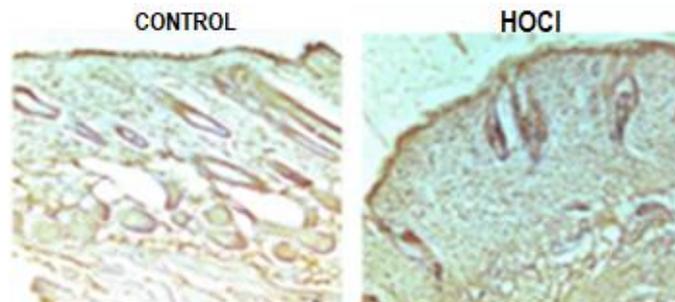


Figura 45. Modelo animal de fibrosis cutánea. Inmunohistoquímica de en el tejido fibrótico de la piel. La sección de piel de la derecha, muestra un aumento de α -SMA cuando se provoca la fibrosis cutánea con hipoclorito. Se observa un engrosamiento de la epidermis y la dermis, una disminución de la cantidad de vasos, aumento celular, miofibroblastos, y colágeno. Ampliación original: x10; Escala 200 μ m.

Asimismo, el marcador fibrótico **fibronectina se encontraba aumentado**, en comparación con el grupo control (Fig. 46 A, C). Además, la expresión de la proteína relacionada con TGF β , **pERK1/2, también aumentaba** tras la administración de hipoclorito (Fig. 46 B, D).

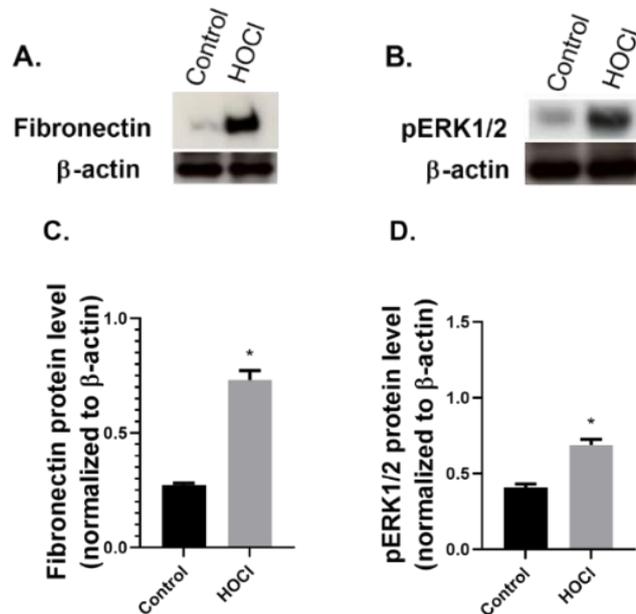


Figura 46. Aumento de marcadores moleculares de fibrosis en modelo animal de fibrosis cutánea. A los ratones BALB/c se les administraron inyecciones intradérmicas de 100 μ l de hipoclorito (HOCl) diariamente durante 6 semanas. Control endógeno β -actina. **A)** Western blot para fibronectina, se observa un aumento de la intensidad del marcador en los tratados con HOCl. **B)** El nivel de aumenta de intensidad en el Western blot en los ratones tratados con HOCl. **C)** El análisis densitométrico se representa en diagrama de barras: aumento del nivel de fibronectina en los tratados con HOCl. **D)** Nivel de proteína pERK1/2 mayor, con respecto al control, cuando se estimula con HOCl. Los gráficos presentan datos representativos de un experimento con $n=7$ (control) y $n=8$ (HOCL) ratones por grupo. Los resultados se presentan como media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney (una cola). * $p \leq 0.05$ vs control.

En este modelo murino de fibrosis cutánea, **tanto los genes como la expresión de la proteína GAL-3, estaban aumentadas de forma significativa**, comparado con el grupo control (Fig. 47). Se evaluó la localización de la proteína GAL-3 en el tejido cutáneo mediante el empleo de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Se observó que GAL-3 se expresa en la epidermis tanto del grupo control como del grupo de ratones tratados con hipoclorito. Sin embargo, **la expresión de GAL-3 está aumentada en la dermis de los ratones tratados con hipoclorito comparado con el grupo control** (Fig. 48).

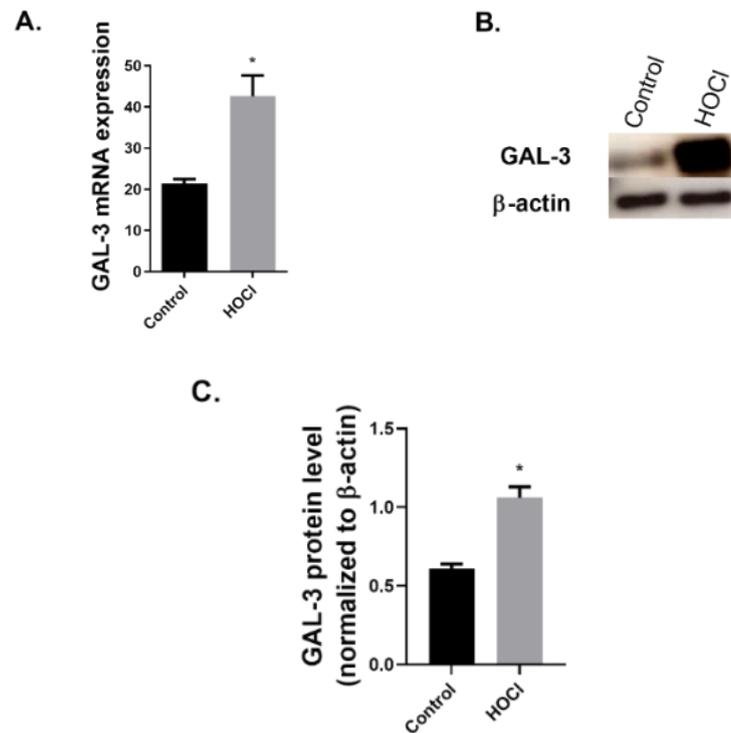


Figura 47. Expresión aumentada de Galectin-3 en un modelo animal de fibrosis cutánea. A los ratones BALB/c se les administraron inyecciones intradérmicas de 100 μ l de hipoclorito (HOCl) diariamente durante 6 semanas y después fueron sacrificados. Control de carga de β -actina. **A)** Se realizó RT-PCR a tiempo real para evaluar la expresión de ARN mensajero. En la gráfica un aumento de expresión de RNAm de GAL-3 en las células tratadas con hipoclorito, con respecto al control; **B)** Western blot: Aumento de nivel de GAL-3 en los estimulados con hipoclorito. **C)** un aumento de proteína GAL-3 cuando se estimula con HOCl. Los gráficos presentan datos representativos de (A) un experimento con $n=7$ (control) y $n=8$ (HOCl) ratones por grupo, (B, C) un experimento con $n=7$ (control) y $n=8$ (HOCl) ratones por grupo. Los resultados se presentan como media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney (una cola). * $p \leq 0.05$ vs control.

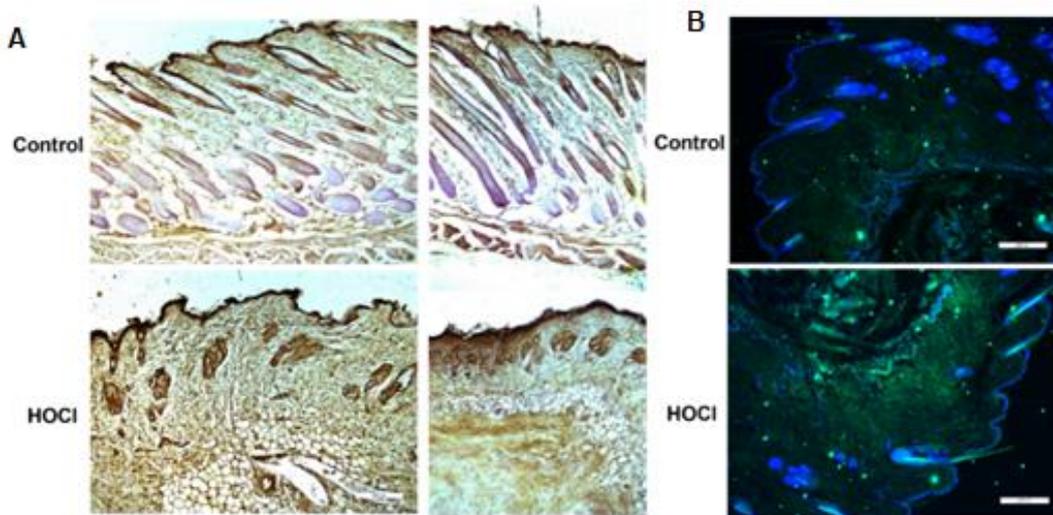


Figura 48. GAL-3 se expresa en la epidermis del grupo control y del grupo tratado con HOCl, pero la expresión de GAL-3 está aumentada en la dermis de los ratones tratados con hipoclorito comparado con el grupo control. **A)** Imágenes de microscopio de inmunohistoquímica de secciones de piel del control y piel de ratones estimulados con HOCl para la inmunotinción de GAL-3. Ampliación original: x10; Escala: 200 μm . Se observa un cambio en la dermis, característicamente engrosada y fibrótica, con menos vasos, con más tinción de GAL-3 en la piel tratada con HOCl, con respecto al control. **B)** Imágenes de microscopio de inmunofluorescencia de secciones de piel de control y HOCl para inmunotinción de GAL-3. DAPI, núcleos azules. Escala 200 μm . Se observa un aumento de fluorescencia en la dermis del grupo HOCl.

3.3 Expresión de GAL-3 en muestras de cicatrices queloides de humanos

3.3.1. Expresión de marcadores fibróticos en queloides humanos

Se realizó el análisis de la expresión de los marcadores fibróticos en queloides humanos y se comparó con tejido cutáneo humano sano. **La inmunofluorescencia del marcador mesenquimal α -SMA evidenció su aumento de expresión en los queloides, tanto en la epidermis como la dermis, comparado con el tejido sano (Fig. 49 A).** Además, **la expresión de los genes del colágeno tipo-1 de la ECM estaba también aumentada en los queloides, comparado con el tejido cutáneo sano (Fig. 49 B).**

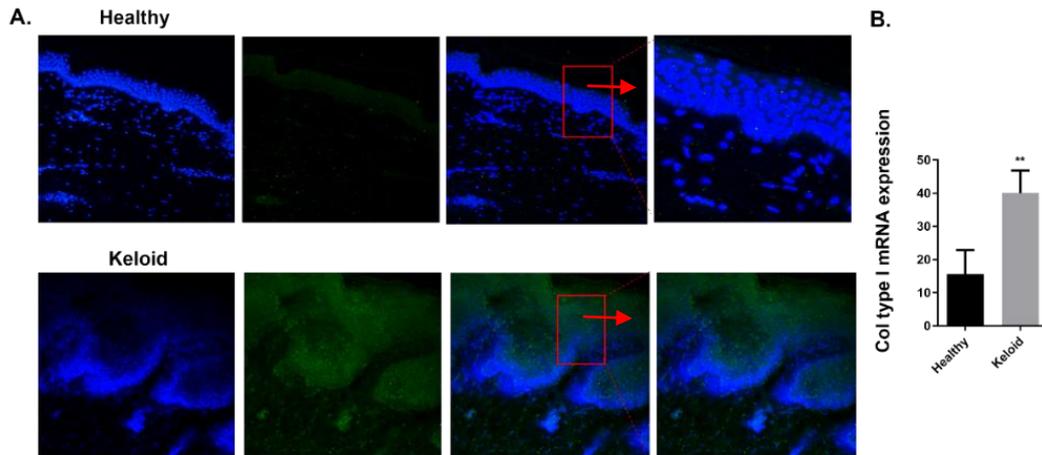


Figura 49. Aumento de marcadores moleculares de fibrosis en biopsias de piel de queloides humanos. Se obtuvo tejido cutáneo humano de controles sanos y queloides. **A)** Imágenes de microscopio de inmunofluorescencia de secciones de piel de muestras sanas y queloides para la inmunotinción de α -SMA. DAPI, núcleos azules. Ampliación original: $\times 20$; Escala $100 \mu\text{m}$. Se observa un marcado marcado de fluorescencia del marcador α -SMA en la piel de los queloides. **B)** Se realizó RT-PCR a tiempo real para evaluar la expresión de ARN mensajero. En la gráfica de barras se representa un aumento de expresión de RNAm de Col-I en los queloides, en comparación con el tejido sano. Los gráficos presentan datos de muestras $n=8$ (piel sana) y $n=8$ (queloides). Los resultados se presentan como media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney (una cola). $**p<0,01$ frente al control sano.

3.3.2. Expresión de GAL-3 en muestras de queloides humanos

Se analizó la expresión del gen GAL-3, y se encontró aumentada en el tejido que loide, comparado con el grupo control sano (Fig. 50A). La expresión de GAL-3 mostró una fuerte correlación positiva con el colágeno tipo-1, y una fuerte correlación negativa con la expresión génica de E-cadherina (Fig. 50B).

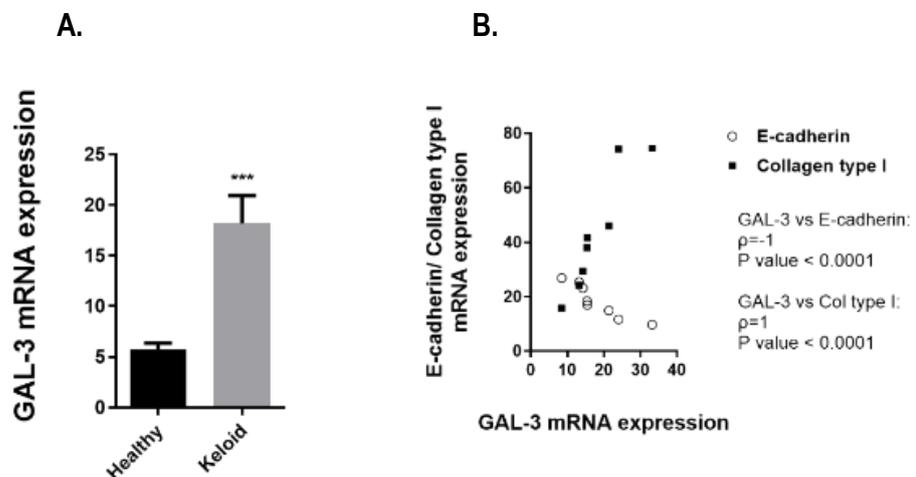


Figura 50. La expresión Galectina-3 se encuentra aumentada en biopsias de queloides humanas, en comparación con controles de muestras de piel sana. **A)** Se observa un aumento de la expresión de los niveles de ARN mensajero de GAL-3, evaluado mediante PCR en tiempo

real, en los queloides. **B)** Correlación entre los niveles de ARN mensajero de GAL-3 y ARN mensajero de E-cadherina o ARN mensajero de colágeno tipo I. Correlación positiva Col-I y GAL-3 $\rho=1$, $p<0,0001$; Correlación negativa E-cadherina y GAL-3 $\rho=-1$, $p<0,0001$. Los gráficos presentan datos de $n=8$ (piel sana) y $n=8$ (queloides) muestras. Los resultados se presentan como media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney (unilateral) y con correlación de Spearman. * $p<0,001$ frente a control sano; ρ indica el coeficiente de correlación de rangos de Spearman.

La inmunofluorescencia evidenció el aumento de expresión de GAL-3, tanto en la epidermis como la dermis de las muestras de queloides (Fig. 51).

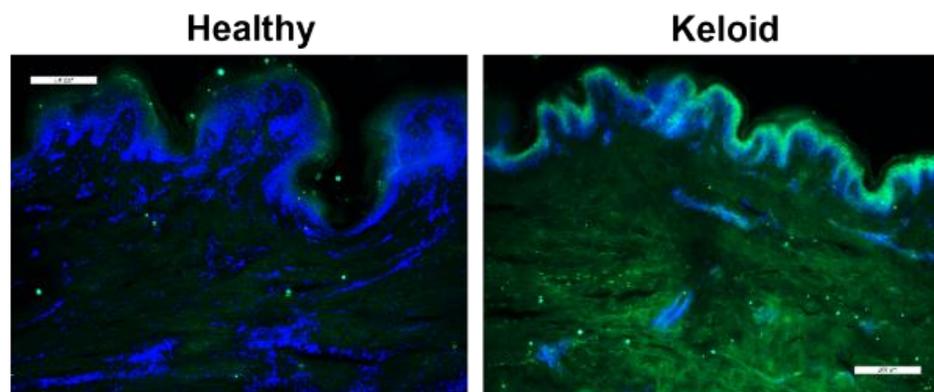


Figura 51. Imágenes de microscopio de inmunofluorescencia representativas de secciones de piel de muestras sanas y queloides para la inmunotinción de GAL-3. DAPI, núcleos azules. Escala 200 μm . (A, B). La dermis y epidermis del queloide brilla de forma intensa por un aumento de GAL-3.

4.DISCUSIÓN

4. Discusión

Con el propósito de determinar la implicación de la Galectina-3 en la fibrosis cutánea y en condiciones patológicas que implican fibrosis, como suponen las cicatrices queloides, se han realizado análisis de la expresión de GAL-3 en modelos representativos para fibrosis cutánea *in vitro* e *in vivo*, mediante el empleo de cultivos de fibroblastos dérmicos humanos normales y de fibrocitos, en un modelo animal de fibrosis cutánea, en piel humana sana y en biopsias de cicatrices queloides. El objetivo de este trabajo es analizar la presencia de la proteína Galectina-3 en modelos *in vitro* e *in vivo* de fibrosis cutánea. Se reporta un aumento de la expresión de GAL-3 en los modelos empleados y en queloides, afirmando su implicación en la fibrosis cutánea. Secundariamente, también se evalúa la expresión de otros marcadores fibróticos como TGF β 1, α -SMA, Col-I o fibronectina, que también se encuentran aumentados en los modelos fibróticos y queloides humanos.

Como se ha mencionado anteriormente en este texto, **el factor profibrótico TGF β 1** es un regulador definido de fibrosis en múltiples órganos (22) (23). La transición de fibroblastos a miofibroblastos es clave en la iniciación y perpetuación de la fibrogénesis, transformación particularmente inducida por el TGF β 1 (162) (18). En la patogénesis de algunas enfermedades fibróticas de la piel, como la esclerodermia, se ha descrito una disfunción de los fibroblastos, con un excesivo número de miofibroblastos (18). El TGF β 1 ha sido identificado como un regulador de la fibrogénesis patológica en estas enfermedades, en las cuales la acumulación del colágeno es una de las características más definitorias (163). En las cicatrices patológicas, hipertróficas o queloides, también se estimula de forma anómala la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno (13). **En el presente estudio, la estimulación de NHDF con TGF β 1 aumentó la expresión de un marcador de miofibroblasto α -SMA, así como el colágeno tipo-1 y CTGF.** En este entorno fibrótico, **la expresión de la proteína GAL-3 se encontraba también aumentada de forma significativa.**

Las propiedades de GAL-3 como un mitógeno de fibroblastos *in vitro* han sido previamente descritas en la literatura, mediante la estimulación de la síntesis de ADN y la proliferación de fibroblastos en múltiples cultivos y tejidos (164). Más recientemente, se ha reportado que la GAL-3 revierte la deposición de ECM, la cual está mediada por el TGF β 1 entre otros, en los fibroblastos de la arteria pulmonar (165). Por otra parte, en

otro estudio se ha descrito la inhibición de la activación de miofibroblastos y una disminución de la expresión de colágeno tipo-1, *in vitro* y *en vivo*, mediante el bloqueo de GAL-3 y, en consecuencia, se ha conseguido una disminución de la fibrosis hepática (166). En esta línea, GAL-3 ha sido descrita como un mediador crítico en la fibrosis hepática inducida por TGF β 1, de igual forma en el pulmón, mediante el empleo de un ratón GAL-3 *knockout* (KO) (un ratón modificado por ingeniería genética para que uno o más de sus genes, en este caso el gen de la Galectina-3, estén inactivados), los cuales mostraban menos fibrosis y una disminución de la síntesis y participación de TGF β 1 (166) (167) (168). Del mismo modo, fibroblastos del pulmón del ratón Gal-3 KO *in vitro*, mostraban una menor diferenciación a miofibroblastos y una reducción de la síntesis de colágeno tipo-1 en respuesta al TGF β 1. Sin embargo, existe un estudio que describe una reepitelización dañada en un ratón GAL-3 KO después de una lesión intencionada al tejido dérmico, lo cual sugirió una inesperada regulación a la baja de GAL-3 por el TGF β 1 *in vitro*, en fibroblastos dérmicos y en fibroblastos dérmicos de heridas crónicas humanas, en comparación con fibroblastos del mismo paciente de otras localizaciones no relacionadas con esas heridas (169). Estos autores sugirieron un rol celular y tisular específico de GAL-3 en la fisiopatología de la fibrosis. Por el contrario, en un trabajo reciente, se midió la expresión de GAL-1 y GAL-3 en fibroblastos de piel afecta de pacientes con esclerodermia, y se reportó una expresión menor de esta proteína, comparado con el grupo control (109). Las conclusiones de estos estudios contrastan con los resultados obtenidos en este trabajo en NHDF sometidos a condiciones fibróticas *in vitro*. Esta última discrepancia podría ser causa de nuevas y futuras investigaciones.

Los fibrocitos, versión relativamente inactiva de los fibroblastos, cumplen la función principal de producir proteínas que componen la matriz extracelular, como el colágeno. Éstos han sido relacionados con la etiopatogenia de enfermedades que causan fibrosis en la piel, en pulmones, e incluso de algunos tumores (170). Es por ello, por lo que en este trabajo se han estimulado fibrocitos humanos cultivados con el factor TGF β 1. **Se ha expuesto que el resultado de esta estimulación con TGF β 1 produce un aumento de la expresión del marcador α -SMA del miofibroblasto (171) (172). Se ha encontrado que TGF β 1 también induce la expresión de la proteína GAL-3 en el citoplasma de fibrocitos humanos cultivados. Este sería el primer estudio que señala la expresión de GAL-3 en fibrocitos humanos estimulados mediante TGF β 1.**

Además de realizar los estudios en cultivos celulares, se ha llevado a cabo el estudio de la expresión de GAL-3 en un modelo murino de fibrosis cutánea, que representaría el modelo de una persona humana con esclerodermia sistémica, pues es un modelo que recapitula inflamación y fibrosis cutánea y pulmonar, otorgándole un rol directo a las especies reactivas de oxígeno (ROS), causantes de tales procesos (173). Las vías de estrés oxidativo han sido bien definidas en la SSc, así como en otros desórdenes fibróticos de la piel, como cicatrices hipertróficas y queloides, entre otros (22). **En este estudio, las inyecciones intradérmicas de HOCl durante seis semanas aumentaron la expresión génica de los marcadores fibróticos TGF β 1, α -SMA y Colágeno tipo I.** Estos resultados corroboran la expresión aumentada del marcador del miofibroblasto α -SMA y el col-1 de la ECM, como previamente había sido descrito en este modelo (173) (174) (175) (176). En trabajos anteriores de esta línea de investigación, no se habían encontrado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de TGF β 1 en ratones expuestos a HOCl Vs el grupo control de ratones (173) (174). Sin embargo, en el presente estudio se han hallado diferencias estadísticamente significativas en cuanto al aumento de la expresión génica de TGF β 1 en ratones tratados con HOCl, comparado con el grupo control. En recientes estudios, se ha pretendido caracterizar el proceso molecular y el *timing* de la fibrosis en este modelo, y autores han descrito una expresión fuerte de TGF β 1 en ratones tratados con HOCl a los días 21 y 42 postinyección (175) (175). Evidencias de varios estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que el TGF β 1 juega un rol clave en el desarrollo de la fibrosis de los tejidos en la SSc (163), pero todavía se necesitan más estudios para corroborar el rol del TGF β 1 en este modelo murino.

Por otra parte, en este estudio **se encontraron niveles aumentados de fibronectina**, la glucoproteína de la ECM, en comparación con el grupo control. Además, **la expresión de pERK1/2, marcador molecular relacionado con TGF β , también se encontraba aumentada** después de la administración de HOCl. pERK1/2 también ha sido implicado en las vías fibróticas inducida por TGF β 1 en la SSc (22) (163) (177).

En este modelo murino de fibrosis cutánea, tanto los genes como la expresión de la proteína GAL-3 estaban significativamente aumentados, comparado con el grupo control. Además, la expresión de la proteína GAL-3, evaluada mediante las técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, se encontraba aumentada en la dermis de los ratones tratados con HOCl, Este sería el

primer trabajo que reporta la expresión de GAL-3 en un modelo murino de SSc, y podría suponer un punto de inicio importante para continuar con las investigaciones de los mecanismos moleculares por los cuales GAL-3 juega un papel activo en la fibrosis de la piel. Varios estudios han reportado un aumento de los niveles séricos de GAL-3 en pacientes con esclerodermia cutánea, comparado con sujetos sanos (156) (178). Aunque, en contra, otro estudio ha reportado niveles séricos de GAL-3 significativamente menores en pacientes con esclerodermia cutánea difusa, comparado con sujetos con esclerodermia cutánea limitada (157). Un estudio reciente ha descrito una expresión disminuida de GAL-3 en piel lesionada de pacientes con SSc, comparada con piel sana, aunque los autores sí reportan una correlación positiva entre una expresión aumentada de GAL-3 en los fibroblastos de piel lesionada en pacientes con esclerodermia y enfermedad severa (109). Por tanto, aunque los estudios están señalando el involucramiento de GAL-3 en la fibrosis cutánea en la esclerodermia, todavía se necesitan futuras investigaciones con modelos de enfermedad para definir su rol, y explicar los mecanismos moleculares interrelacionados.

En lo que respecta a las enfermedades fibróticas de piel humana, también se han estudiado biopsias de cicatrices queloides. **Se ha hallado una expresión aumentada del marcador fibrótico α -SMA en queloides**, comparado con tejido cutáneo sano, en sintonía con la presencia de miofibroblastos α -SMA+ (179) (180). **También se ha encontrado una expresión génica aumentada de Col tipo-1**, el principal componente de la matriz extracelular del tejido del queloide.

En este contexto fibrótico que caracteriza la patogenia de las cicatrices patológicas, se ha descubierto un **aumento de la expresión génica de GAL-3, tanto en la epidermis como en la dermis de la biopsia del queloide**, comparado con tejido sano. Además, se describe una fuerte correlación entre GAL-3 y la expresión del colágeno tipo 1.

Se ha reportado una correlación negativa entre GAL-3 y la expresión génica de E-cadherina. La E-cadherina es una glucoproteína transmembrana, responsable de la adhesión celular, cuya región intracelular, que se encuentra en el citoplasma, conecta el citoesqueleto de actina. Se han realizado trabajos experimentales en animales sobre la plasticidad de las células epiteliales, demostrado al estudiar el proceso de transición epitelial-mesenquimatosa (EMT) (49) (181). Una característica distintiva de este proceso es la alteración de los marcadores de la superficie celular desde un fenotipo epitelial a

una regulación al alza de marcadores mesenquimales. Una expresión disminuida de E-cadherina es considerada una característica de la EMT. Acorde a los resultados obtenidos en este trabajo, otros estudios previamente publicados han descrito una disminución de los niveles de E-cadherina en tejido queloide (178) (182) (183).

Los resultados de este estudio también corroboran los resultados de otro estudio reciente que ha descrito la presencia de GAL-3 en biopsias de queloides por inmunotinción (110). Los autores de ese estudio consideran que GAL-3, junto con GAL-1 y otras moléculas de la ECM producidas por los fibroblastos y las células inmunitarias, contrarrestan la respuesta inflamatoria en queloides. Sin embargo, se necesitan futuros estudios para investigar las vías relacionadas con GAL-3 para poder dilucidar realmente su papel en la formación de estas cicatrices.

El presente estudio describe la expresión de GAL-3 en diferentes tipos celulares y en relevantes modelos de fibrosis cutánea, *in vivo e in vitro*, para poder subrayar la importancia de esta molécula en la fisiopatología de la fibrosis, y con el objetivo de ser la base de futuros estudios para evaluar los mecanismos por los cuales GAL-3 se relaciona con la fibrosis de la piel. Además, este modelo de fibrosis cutánea representa una herramienta útil para continuar estudios específicos sobre GAL-3, pues podría convertirse en un *target* antifibrótico útil para tratamiento de enfermedades fibróticas de la piel y queloides.

5.CONCLUSIONES

5. Conclusiones

Como conclusiones de este trabajo, a partir de los resultados del estudio, se puede afirmar que:

- La expresión de GAL-3 aumenta en modelos *in vitro* de fibrosis cutánea, en cultivos de NHDF y en cultivos de fibrocitos humanos, tras la estimulación de TGF β 1. En el modelo *in vivo*, modelo murino de fibrosis cutánea, tanto los genes como la expresión de la proteína GAL-3, aumenta de forma significativa. La expresión de GAL-3 está aumentada en la dermis de los ratones tratados con hipoclorito comparado con el grupo control.
- La expresión del gen GAL-3 y los niveles de proteína GAL-3 están aumentadas en el tejido queloide. GAL-3 tiene una correlación positiva con el colágeno tipo 1.
- El TGF β 1 aumenta la expresión de la proteína α -SMA, del colágeno tipo 1 y del factor de crecimiento de tejido conectivo en cultivos de NHDF.
- En modelos murinos de fibrosis cutánea, la expresión génica de los marcadores TGF β 1, α -SMA, Col-1, fibronectina y pERK1/2 está aumentada en el grupo de ratones tratados con hipoclorito. α -SMA y la expresión de los genes del colágeno tipo-1 aumenta también en los queloides.

6.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referencias bibliográficas

1. Pawlina W, Ross MH. Ross. Histología: Texto y atlas: Correlación con biología molecular y celular. 8a ed. Barcelona, España: Lippincott Williams & Wilkins; 2020.
2. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol EJD*. 2002;12(4):390-9; quiz 400-1.
3. Sobotta J. Atlas and epitome of human histology and microscopic anatomy. Huber GC, editor. Whitefish, MT, Estados Unidos de América: Kessinger Publishing; 2010.
4. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Y Cotran. Patología Estructural Y Funcional. 10a ed. Abbas AK, Aster JC, editores. Elsevier; 2021.
5. Gurtner G, Neligan P. Plastic Surgery: Volume 1: Principles. 4a ed. Filadelfia, PA, Estados Unidos de América: Elsevier - Health Sciences Division; 2017.
6. Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, Zamri-Saad M, Taufiq-Yap YH, Hezmee MNM. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet World*. 2018 May;11(5):627-635. doi: 10.14202/vetworld.2018.627-635. Epub 2018 May 15. PMID: 29915501; PMCID: PMC5993766.
7. Hira K, Sajeli Begum A. Methods for Evaluation of TNF- α Inhibition Effect. *Methods Mol Biol*. 2021;2248:271-279. doi: 10.1007/978-1-0716-1130-2_21. PMID: 33185884.
8. Fioranelli M, Rocchia MG, Flavin D, Cota L. Regulation of Inflammatory Reaction in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2021 May 17;22(10):5277. doi: 10.3390/ijms22105277. PMID: 34067872; PMCID: PMC8157220.
9. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008 Sep-Oct;16(5):585-601. doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x. PMID: 19128254.
10. Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov*. octubre de 2012;11(10):790-811.
11. Ramirez H, Patel SB, Pastar I. The Role of TGF β Signaling in Wound Epithelialization. *Adv Wound Care*. 1 de julio de 2014;3(7):482-91.

12. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors* Chur Switz. 2011;29(5):196-202.
13. Andrews JP, Marttala J, Macarak E, Rosenbloom J, Uitto J. Keloids: The paradigm of skin fibrosis - Pathomechanisms and treatment. *Matrix Biol.* 2016; 51:37-46. DOI: 10.1016/j.matbio.2016.01.013.
14. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 13 de junio de 2003;113(6):685-700.
15. Smith GP, Chan ESL. Molecular pathogenesis of skin fibrosis: insight from animal models. *Curr Rheumatol Rep.* febrero de 2010;12(1):26-33.
16. Megías Pacheco M, Molist García P, Pombal Diego MA. Atlas de histología vegetal y animal [Internet]. Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Facultad de Biología, Universidad de Vigo, España. [Citado 27 de julio de 2023]. Recuperado a partir de: <https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/fibroblasto.php>.
17. Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids.* 2011 Jul;41(2):271-90. doi: 10.1007/s00726-010-0689-x. Epub 2010 Jul 18. PMID: 20640864; PMCID: PMC3102199.
18. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol.* 2003;200(4):500-3. DOI: 10.1002/path.1427.
19. Pedroza M, To S, Assassi S, Wu M, Tweardy D, Agarwal SK. Role of STAT3 in skin fibrosis and transforming growth factor beta signalling. *Rheumatol Oxf Engl.* 01 de 2018;57(10):1838-50.
20. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* mayo de 2007;127(5):998-1008.
21. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev.* 01 de 2019;99(1):665-706.
22. Shroff A, Mamalis A, Jagdeo J. Oxidative Stress and Skin Fibrosis. *Curr Pathobiol Rep.* 2014;2(4):257-67. DOI: 10.1007/s40139-014-0062-y.

23. Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins PJ. TGF-beta signaling in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities. *Cell Signal*. 2013;25(1):264-8. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.10.003.
24. Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Perspective Article: Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen*. 2005;13(1):7-12.
25. Chin GS, Liu W, Peled Z, Lee TY, Steinbrech DS, Hsu M, et al. Differential Expression of Transforming Growth Factor- β Receptors I and II and Activation of Smad 3 in Keloid Fibroblasts. *Plast Reconstr Surg*. agosto de 2001;108(2):423-9.
26. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci*. marzo de 1995;108 (Pt 3):985-1002.
27. Järvinen TAH, Ruoslahti E. Target-seeking antifibrotic compound enhances wound healing and suppresses scar formation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14 de diciembre de 2010;107(50):21671-6.
28. Canady J, Arndt S, Karrer S, Bosserhoff AK. Increased KGF Expression Promotes Fibroblast Activation in a Double Paracrine Manner Resulting in Cutaneous Fibrosis. *J Invest Dermatol*. 1 de marzo de 2013;133(3):647-57.
29. Daoussis D, Lioussis S-N. Treatment of systemic sclerosis associated fibrotic manifestations: Current options and future directions. *Mediterr J Rheumatol*. 28 de marzo de 2019;30(1):33-7.
30. Sobolewski P, Maślińska M, Wieczorek M, Łagun Z, Malewska A, Roszkiewicz M, et al. Systemic sclerosis – multidisciplinary disease: clinical features and treatment. *Reumatologia*. 2019;57(4):221-33.
31. Bock O, Yu H, Zitron S, Bayat A, Ferguson MW, Mrowietz U. Studies of transforming growth factors beta 1–3 and their receptors I and II in fibroblast of keloids and hypertrophic scars. *Acta Derm. Venereol*. 2005;85:216–220.
32. Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith E, LeRoy C, Trojanowska M. Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. *J Invest Dermatol*. enero de 1998;110(1):47-51.

33. Nikitorowicz-Buniak J, Denton CP, Abraham D, Stratton R. Partially Evoked Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Is Associated with Increased TGF β Signaling within Lesional Scleroderma Skin. *PLoS ONE*. 28 de julio de 2015;10(7):e0134092.
34. Hamaguchi Y, Fujimoto M, Matsushita T, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Elevated Serum Insulin-like Growth Factor (IGF-1) and IGF Binding Protein-3 Levels in Patients with Systemic Sclerosis: Possible Role in Development of Fibrosis. *J Rheumatol*. 1 de diciembre de 2008;35(12):2363-71.
35. Zhao H, Yang K, Liu Q, Hu J, Wu W, Wang J. Expression of calponin-1 and its pathogenic role in systemic sclerosis. *J South Med Univ*. 20 de marzo de 2019;39(3):279-85.
36. Asano Y. Recent advances in the treatment of skin involvement in systemic sclerosis. *Inflamm Regen*. 2017 Jun 12;37:12. doi: 10.1186/s41232-017-0047-4. PMID: 29259711; PMCID: PMC5725888.
37. Jordan S, Distler JHW, Maurer B, Huscher D, van Laar JM, Allanore Y, et al. Effects and safety of rituximab in systemic sclerosis: an analysis from the European Scleroderma Trial and Research (EUSTAR) group. *Ann Rheum Dis*. junio de 2015;74(6):1188-94.
38. Rice LM, Padilla CM, McLaughlin SR, Mathes A, Ziemek J, Goummih S, et al. Fresolimumab treatment decreases biomarkers and improves clinical symptoms in systemic sclerosis patients. *J Clin Invest*. 2015 Jul 1;125(7):2795-807. doi: 10.1172/JCI77958. Epub 2015 Jun 22. PMID: 26098215; PMCID: PMC4563675.
39. Sullivan KM, Goldmuntz EA, Keyes-Elstein L, McSweeney PA, Pinckney A, Welch B, et al. Myeloablative Autologous Stem-Cell Transplantation for Severe Scleroderma. *N Engl J Med*. 2018 Jan 4;378(1):35-47. doi: 10.1056/nejmoa1703327. PMID: 29298160; PMCID: PMC5846574.
40. Mokos ZB, Jović A, Grgurević L, Dumić-Čule I, Kostović K, Čeović R, et al. Current Therapeutic Approach to Hypertrophic Scars. *Front Med (Lausanne)*. 2017 Jun 20;4:83. doi: 10.3389/fmed.2017.00083. PMID: 28676850; PMCID: PMC5476971.
41. Ogawa R. The Most Current Algorithms for the Treatment and Prevention of Hypertrophic Scars and Keloids: A 2020 Update of the Algorithms Published 10 Years Ago. *Plast Reconstr*

- Surg. 2022 Jan 1;149(1):79e-94e. doi: 10.1097/PRS.00000000000008667. PMID: 34813576; PMCID: PMC8687618.
42. Jagadeesan J, Bayat A. Transforming growth factor beta (TGFbeta) and keloid disease. *Int J Surg.* 2007 Aug;5(4):278-85. doi: 10.1016/j.ijisu.2006.04.007. Epub 2006 Jun 15. PMID: 17660136.
 43. Niessen FB, Spauwen PH, Schalkwijk J, Kon M. On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review. *Plast. Reconstr. Surg.* 1999;104:1435–1458.
 44. Al-Attar A, Mess S, Thomassen JM, Kauffman CL, Davison SP. Keloid pathogenesis and treatment. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006;117:286–300.
 45. Bran GM, Goessler UR, Hormann K, Riedel F, Sadick H. Keloids: current concepts of pathogenesis (review) *Int. J. Mol. Med.* 2009;24:283–293.
 46. Supp DM, Hahn JM, Glaser K, McFarland KL, Boyce ST. Deep and superficial keloid fibroblasts contribute differentially to tissue phenotype in a novel in vivo model of keloid scar. *Plast. Reconstr. Surg.* 2012;129:1259–1271.
 47. Har-Shai Y, Mettanes I, Zilberstein Y, Genin O, Spector I, Pines M. Keloid histopathology after intralesional cryosurgery treatment. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2011;25:1027–1036.
 48. Slemp AE, Kirschner RE. Keloids and scars: a review of keloids and scars, their pathogenesis, risk factors, and management. *Curr. Opin. Pediatr.* 2006;18:396–402.
 49. Krieg T, Abraham D, Lafyatis R. Fibrosis in connective tissue disease: the role of the myofibroblast and fibroblast-epithelial cell interactions. *Arthritis Res Ther.* 2007;9 Suppl 2:S4. DOI: 10.1186/ar2188.
 50. Hahn JM, Glaser K, McFarland KL, Aronow BJ, Boyce ST, Supp DM. Keloid-derived keratinocytes exhibit an abnormal gene expression profile consistent with a distinct causal role in keloid pathology. *Wound Repair Regen.* 2013;21:530–544.
 51. Ma X, Chen J, Xu B, Long X, Qin H, Zhao RC, et al. Keloid-derived keratinocytes acquire a fibroblast-like appearance and an enhanced invasive capacity in a hypoxic microenvironment in vitro. *Int. J. Mol. Med.* 2015;35:1246–1256.

52. Zhang LX, Guo SZ, Wang Z. Biological effects of supernatant from melanocytes culture on proliferation of hypertrophic scar fibroblasts. *J Fourth Mil Med Univ.* 2000;21:669–670.
53. Gao FL, Jin R, Zhang L, Zhang YG. The contribution of melanocytes to pathological scar formation during wound healing. *Int J Clin Exp Med.* 2013;6:609–613.
54. Pakyari M, Farrokhi A, Maharlooei MK, Ghahary A. Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013;2:215–224.
55. Hinz B. The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: Tale of a strained relationship. *Mat. Bio.* 2015;47:54–65.
56. Dong X, Zhang C, Ma S, Wen H. Mast cell chymase in keloid induces profibrotic response via transforming growth factor-beta1/Smad activation in keloid fibroblasts. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7:3596–3607.
57. Wang P-H, Huang B-S, Horng H-C, Yeh C-C, Chen Y-J. Wound healing. *J Chin Med Assoc JCMA.* 2018;81(2):94-101.
58. Kischer CW, Wagner HN, Pindur J, Holubec H, Jones M, Ulreich JB, et al. Increased fibronectin production by cell lines from hypertrophic scar and keloid. *Connect Tissue Res.* 1989;23(4):279-88.
59. Friedman DW, Boyd CD, Mackenzie JW, Norton P, Olson RM, Deak SB. Regulation of Collagen Gene Expression in Keloids and Hypertrophic Scars. *J Surg Res.* 1 de agosto de 1993;55(2):214-22.
60. Oliveira GV, Hawkins HK, Chinkes D, Burke A, Tavares ALP, Ramos-e-Silva M, et al. Hypertrophic versus non hypertrophic scars compared by immunohistochemistry and laser confocal microscopy: type I and III collagens†. *Int Wound J.* 2009;6(6):445-52.
61. McCauley RL, Chopra V, Li YY, Herndon DN, Robson MC. Altered cytokine production in black patients with keloids. *J. Clin. Immunol.* 1992;12:300–308.
62. Rohani M, Parks W. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Mat. Bio.* 2015;44–46:113–121.

63. Sadick H, Herberger A, Riedel K, Bran G, Goessler U, Hoermann K, et al. TGF-beta1 antisense therapy modulates expression of matrix metalloproteinases in keloid-derived fibroblasts. *Int. J. Mol. Med.* 2008;22:55–60.
64. Li C, Zhu H-Y, Bai W-D, Su L-L, Liu J-Q, Cai W-X, et al. MiR-10a and miR-181c regulate collagen type I generation in hypertrophic scars by targeting PAI-1 and uPA. *FEBS Lett.* 2015;589(3):380-9.
65. Bran GM, Sommer UJ, Goessler UR, Hormann K, Riedel F, Sadick H. TGF-ss1 antisense impacts the SMAD signalling system in fibroblasts from keloid scars. *Anticancer Res.* 2010;30:3459–3463.
66. Chen J, Zeng B, Yao H, Xu J. The effect of TLR4/7 on the TGF-beta-induced Smad signal transduction pathway in human keloid. *Burns.* 2013;39:465–472.
67. Wang Z, Gao Z, Shi Y, Sun Y, Lin Z, Jiang H, et al. Inhibition of Smad3 expression decreases collagen synthesis in keloid disease fibroblasts. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 1 de noviembre de 2007;60(11):1193-9.
68. Andrews JP, Marttala J, Macarak E, Rosenbloom J, Uitto J. Keloid Pathogenesis: Potential Role of Cellular Fibronectin with the EDA Domain. *J Invest Dermatol.* 2015 Jul;135(7):1921-1924. doi: 10.1038/jid.2015.50. Epub 2015 Feb 16. PMID: 25685931; PMCID: PMC4466014.
69. Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, et al. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J. Cell Biol.* 1998;142:873–881.
70. Bhattacharyya S, Tamaki Z, Wang W, Hinchcliff M, Hoover P, Getsios S, et al. Fibronectin EDA promotes chronic cutaneous fibrosis through Toll-like receptor signaling. *Sci Transl Med.* 2014;6:232ra250.
71. Shinde AV, Kelsh R, Peters JH, Sekiguchi K, Van De Water L, McKeown-Longo PJ. The alpha4beta1 integrin and the EDA domain of fibronectin regulate a profibrotic phenotype in dermal fibroblasts. *Matrix Biol.* 2015;41:26–35.
72. Regulski MJ. Cellular Senescence: What, Why, and How. *Wounds Compend Clin Res Pract.* junio de 2017;29(6):168-74.

73. Wang AS, Dreesen O. Biomarkers of Cellular Senescence and Skin Aging. *Front Genet.* 2018 Aug 23;9:247. doi: 10.3389/fgene.2018.00247. PMID: 30190724; PMCID: PMC6115505.
74. Barnes PJ, Baker J, Donnelly LE. Cellular Senescence as a Mechanism and Target in Chronic Lung Diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 de septiembre de 2019;200(5):556-64.
75. Lee YI, Choi S, Roh WS, Lee JH, Kim TG. Cellular Senescence and Inflammaging in the Skin Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 8;22(8):3849. doi: 10.3390/ijms22083849. PMID: 33917737; PMCID: PMC8068194.
76. Varmeh S, Egia A, McGrouther D, Tahan SR, Bayat A, Pandolfi PP. Cellular Senescence as a Possible Mechanism for Halting Progression of Keloid Lesions. *Genes Cancer.* noviembre de 2011;2(11):1061-6.
77. De Felice B, Wilson RR, Nacca M. Telomere shortening may be associated with human keloids. *BMC Med Genet.* 2009 Oct 28;10:110. doi: 10.1186/1471-2350-10-110. PMID: 19863817; PMCID: PMC2774319.
78. Darzi MA, Chowdri NA, Kaul SK, Khan M. Evaluation of various methods of treating keloids and hypertrophic scars: a 10-year follow-up study. *Br J Plast Surg.* 1 de enero de 1992;45(5):374-9.
79. Mustoe TA, Cooter RD, Gold MH, Hobbs FDR, Ramelet A-A, Shakespeare PG, et al. International clinical recommendations on scar management. *Plast Reconstr Surg.* agosto de 2002;110(2):560-71.
80. Roviroso A, Samper P, Villafranca E. Braquiterapia 3D guiada por la imagen. Sant Cugat del Vallès (Barcelona): Pulso ediciones, S.L.; 2022.
81. Trisliana Perdanasari A, Lazzeri D, Su W, Xi W, Zheng Z, Ke L, et al. Recent developments in the use of intralesional injections keloid treatment. *Arch Plast Surg.* 2014 Nov;41(6):620-9. doi: 10.5999/aps.2014.41.6.620. Epub 2014 Nov 3. PMID: 25396172; PMCID: PMC4228202.
82. Poetschke J, Gauglitz GG. Current options for the treatment of pathological scarring. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2016 May;14(5):467-77. doi: 10.1111/ddg.13027. PMID: 27119465.

83. Nio-Kobayashi J. Tissue- and cell-specific localization of galectins, β -galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease. *Anat Sci Int*. 2017;92:25-36.
84. Arthur CM, Cummings RD, Stowell SR. Evaluation of the bactericidal activity of galectins. *Methods Mol Biol*. 2015;1207:421-30.
85. Hirabayashi J, Kasai K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*. 1993 Aug;3(4):297-304. doi: 10.1093/glycob/3.4.297. PMID: 8400545.
86. Dong R, Zhang M, Hu Q, Zheng S, Soh A, Zheng Y, et al. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *Int J Mol Med*. 2018 Feb;41(2):599-614. doi: 10.3892/ijmm.2017.3311. Epub 2017 Dec 5. PMID: 29207027; PMCID: PMC5752178.
87. Nio-Kobayashi J. Tissue- and cell-specific localization of galectins, β -galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease. *Anat Sci Int*. 2017 Jan;92(1):25-36. doi: 10.1007/s12565-016-0366-6. Epub 2016 Sep 2. PMID: 27590897.
88. McLeod K, Walker JT, Hamilton DW. Galectin-3 regulation of wound healing and fibrotic processes: insights for chronic skin wound therapeutics. *J Cell Commun Signal*. 2018 Mar;12(1):281-287. doi: 10.1007/s12079-018-0453-7. Epub 2018 Jan 25. PMID: 29372416; PMCID: PMC5842207.
89. de Oliveira FL, Gatto M, Bassi N, Luisetto R, Ghirardello A, Punzi L, et al. Galectin-3 in autoimmunity and autoimmune diseases. *Exp Biol Med (Maywood)* 2015;240:1019–1028. doi: 10.1177/1535370215593826.
90. Domic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: An open-ended story. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1760:616–635. doi: 10.1016/j.bbagen.2005.12.020.
91. Nangia-Makker P, Hogan V, Balan V, Raz A. Chimeric galectin-3 and collagens: Biomarkers and potential therapeutic targets in fibroproliferative diseases. *J Biol Chem*. 2022 Dec;298(12):102622. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102622. Epub 2022 Oct 20. PMID: 36272642; PMCID: PMC9706532.

92. Pasmatzis E, Papadionysiou C, Monastirli A, Badavanis G, Tsambaos D. Galectin 3: an extraordinary multifunctional protein in dermatology. Current knowledge and perspectives. *An Bras Dermatol*. 2019;94(3):348-54. DOI: 10.1590/abd1806-4841.20198426.
93. Tan Y, Zheng Y, Xu D, Sun Z, Yang H, Yin Q. Galectin-3: a key player in microglia-mediated neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Cell Biosci*. 2021 Apr 27;11(1):78. doi: 10.1186/s13578-021-00592-7. PMID: 33906678; PMCID: PMC8077955.
94. Song L, Mao J, Zhang J, Ibrahim MM, Li LH, Tang JW. Annexin A7 and its binding protein galectin-3 influence mouse hepatocellular carcinoma cell line in vitro. *Biomed Pharmacother*. 2014 Apr;68(3):377-84. doi: 10.1016/j.biopha.2013.10.011. Epub 2013 Dec 2. PMID: 24373698..
95. Liu L, Takashi S, Sano N, Fukui K. Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor kappaB signalling. *Biochem J*. 2004;380(Pt 1):31-41. doi: 10.1042/bj20031300.
96. Fukumori T, Yukinori F, Oka N, Yoshii T, Hogan V, Inohara H, et al. Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways. *Cancer Res*. 2004;64(10):3376-3379. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0336.
97. Coppin L, Jannin A, Yahya EA, Thuillier C, Villenet C, Tardivel M, et al. Galectin-3 modulates epithelial cell adaptation to stress at the ER-mitochondria interface. *Cell Death Dis*. 2020;11(5):360. doi: 10.1038/s41419-020-2556-3.
98. Jia J, Claude-Taupin A, Gu Y, Choi SW, Peters R, Bissa B, et al. Galectin-3 Coordinates a Cellular System for Lysosomal Repair and Removal. *Dev Cell*. 2020 Jan 6;52(1):69-87.e8. doi: 10.1016/j.devcel.2019.10.025. Epub 2019 Dec 5. PMID: 31813797; PMCID: PMC6997950.
99. Haudek KC, Spronk KJ, Voss PG, Patterson RJ, Wang JL, Arnoys EJ. Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Feb;1800(2):181-9. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.07.005. Epub 2009 Jul 16. PMID: 19616076; PMCID: PMC2815258.
100. Ochieng J, Vyacheslav F, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J*. 2002;19(7-9):527-535. doi: 10.1023/B:GLYC.0000014082.99675.2f.

101. Bouffette S, Botez I, De Ceuninck F. Targeting galectin-3 in inflammatory and fibrotic diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2023 Aug;44(8):519-531. doi: 10.1016/j.tips.2023.06.001. Epub 2023 Jun 28. PMID: 37391294.
102. Nangia-Makker P, Hogan V, Raz A. Galectin-3 and cancer stemness. *Glycobiology.* 2018 Apr 1;28(4):172-181. doi: 10.1093/glycob/cwy001. PMID: 29315388; PMCID: PMC6279147.
103. Nakajima K, Heilbrun LK, Hogan V, Smith D, Heath E, Raz A. Positive associations between galectin-3 and PSA levels in prostate cancer patients: a prospective clinical study-I. *Oncotarget.* 2016 Dec 13;7(50):82266-82272. doi: 10.18632/oncotarget.12619. PMID: 27741512; PMCID: PMC5347690.
104. Liu Y, Zhao C, Meng J, Li N, Xu Z, Liu X, et al. Galectin-3 regulates microglial activation and promotes inflammation through TLR4/MyD88/NF- κ B in experimental autoimmune uveitis. *Clin Immunol.* 2022 Mar;236:108939. doi: 10.1016/j.clim.2022.108939. Epub 2022 Feb 1. PMID: 35121106.
105. Srejavic I, Selakovic D, Jovicic N, Jakovljević V, Lukic ML, Rosic G. Galectin-3: Roles in Neurodevelopment, Neuroinflammation, and Behavior. *Biomolecules.* 2020 May 21;10(5):798. doi: 10.3390/biom10050798. PMID: 32455781; PMCID: PMC7277476.
106. Suthahar N, Meijers WC, Silljé HHW, Ho JE, Liu FT, de Boer RA. Galectin-3 Activation and Inhibition in Heart Failure and Cardiovascular Disease: An Update. *Theranostics.* 2018 Jan 1;8(3):593-609. doi: 10.7150/thno.22196. PMID: 29344292; PMCID: PMC5771079.
107. Desmedt V, Desmedt S, Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM. Galectin-3 in Renal Pathology: More Than Just an Innocent Bystander. *Am J Nephrol.* 2016;43(5):305-17. doi: 10.1159/000446376. Epub 2016 May 12. PMID: 27166158.
108. Larsen L, Chen HY, Saegusa J, Liu FT. Galectin-3 and the skin. *J Dermatol Sci.* 2011 Nov;64(2):85-91. doi: 10.1016/j.jdermsci.2011.07.008. Epub 2011 Aug 11. PMID: 21889881; PMCID: PMC3192432.
109. Mora GF, Zubieta MR. Galectin-1 and Galectin-3 Expression in Lesional Skin of Patients With Systemic Sclerosis-Association With Disease Severity. *J Clin Rheumatol.* 2020. 27(8):317-323. DOI: 10.1097/RHU.0000000000001367.

110. Arciniegas E, Carrillo LM, Rojas H, Ramírez R, Chopite M. Galectin-1 and Galectin-3 and Their Potential Binding Partners in the Dermal Thickening of Keloid Tissues. *Am J Dermatopathol*. 2019 Mar;41(3):193-204. doi: 10.1097/DAD.0000000000001284. PMID: 30801341.
111. Ritchie S, Neal D, Shlevin H, Allgood A, Traber P. A phase 2a, open-label pilot study of the galectin-3 inhibitor GR-MD-02 for the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 2017;77(4):753-5. DOI: 10.1016/j.jaad.2017.05.055.
112. Saegusa J, Hsu DK, Chen HY, Yu L, Fermin A, Fung MA, et al. Galectin-3 is critical for the development of the allergic inflammatory response in a mouse model of atopic dermatitis. *Am J Pathol*. 2009;174(3):922-31. DOI: 10.2353/ajpath.2009.080500.
113. Leica Biosystems. Histología, IHQ, Patología Digital y Citogenética. Barcelona. [Internet]. [Citado 27 de julio de 2023]. Recuperado a partir de: <https://shop.leicabiosystems.com/en-es/en-es/pid-PA0238>.
114. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE Jr, Colvin MM, et al. 2017 ACC/AHA/HFSA Focused Update of the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America. *Circulation*. 2017 Aug 8;136(6):e137-e161. doi: 10.1161/CIR.0000000000000509. Epub 2017 Apr 28. PMID: 28455343.
115. Horiuchi YU, Wettersten N, VAN Veldhuisen DJ, Mueller C, Filippatos G, Nowak R, et al. Galectin-3, Acute Kidney Injury and Myocardial Damage in Patients With Acute Heart Failure. *J Card Fail*. 2023 Mar;29(3):269-277. doi: 10.1016/j.cardfail.2022.09.017. Epub 2022 Nov 1. PMID: 36332898.
116. Ibarrola J, Matilla L, Martínez-Martínez E, Gueret A, Fernández-Celis A, Henry JP, et al. Myocardial Injury After Ischemia/Reperfusion Is Attenuated By Pharmacological Galectin-3 Inhibition. *Sci Rep*. 2019 Jul 3;9(1):9607. doi: 10.1038/s41598-019-46119-6. PMID: 31270370; PMCID: PMC6610618.
117. Al-Salam S, Hashmi S. Myocardial Ischemia Reperfusion Injury: Apoptotic, Inflammatory and Oxidative Stress Role of Galectin-3. *Cell Physiol Biochem*. 2018;50(3):1123-1139. doi: 10.1159/000494539. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30355930.

118. Di Gregoli K, Somerville M, Bianco R, Thomas AC, Frankow A, Newby AC, et al. Galectin-3 Identifies a Subset of Macrophages With a Potential Beneficial Role in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020 Jun;40(6):1491-1509. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314252. Epub 2020 Apr 16. PMID: 32295421; PMCID: PMC7253188.
119. Sherpa MD, Sonkawade SD, Jonnala V, Pokharel S, Khazaeli M, Yatsynovich Y, et al. Galectin-3 Is Associated with Cardiac Fibrosis and an Increased Risk of Sudden Death. *Cells.* 2023 Apr 23;12(9):1218. doi: 10.3390/cells12091218. PMID: 37174619; PMCID: PMC10177039.
120. Sharma U.C, Mosleh W, Chaudhari M.R, Katkar R, Weil B, Evelo C, et al. Myocardial and Serum Galectin-3 Expression Dynamics Marks Post-Myocardial Infarction Cardiac Remodelling. *Heart Lung Circ.* 2017, 26, 736–745.
121. Mohtasham Kia Y, Cannavo A, Bahiraie P, Alilou S, Saeedian B, Babajani N, et al. Insights into the Role of Galectin-3 as a Diagnostic and Prognostic Biomarker of Atrial Fibrillation. *Dis Markers.* 2023 Oct 9;2023:2097012. doi: 10.1155/2023/2097012. PMID: 37849915; PMCID: PMC10578984.
122. Clementy N, Piver E, Bisson A, Andre C, Bernard A, Pierre B, et al. Galectin-3 in Atrial Fibrillation: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar 25;19(4):976. doi: 10.3390/ijms19040976. PMID: 29587379; PMCID: PMC5979515.
123. Iacobini C, Menini S, Ricci C, Blasetti Fantauzzi C, Scipioni A, Salvi L, et al. Galectin-3 ablation protects mice from diet-induced NASH: a major scavenging role for galectin-3 in liver. *J Hepatol.* 2011 May;54(5):975-83. doi: 10.1016/j.jhep.2010.09.020. Epub 2010 Oct 29. PMID: 21145823.
124. Cyr B, Keane RW, de Rivero Vaccari JP. ASC, IL-18 and Galectin-3 as Biomarkers of Non-Alcoholic Steatohepatitis: A Proof of Concept Study. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 13;21(22):8580. doi: 10.3390/ijms21228580. PMID: 33203036; PMCID: PMC7698245.
125. Tacke F, Puengel T, Loomba R, Friedman SL. An integrated view of anti-inflammatory and antifibrotic targets for the treatment of NASH. *J Hepatol.* 2023 Aug;79(2):552-566. doi: 10.1016/j.jhep.2023.03.038. Epub 2023 Apr 14. PMID: 37061196.

126. Li H, Cao Z, Wang L, Li J, Cheng X, Tang Y, et al. Chronic high-fat diet induces galectin-3 and TLR4 to activate NLRP3 inflammasome in NASH. *J Nutr Biochem*. 2023 Feb;112:109217. doi: 10.1016/j.jnutbio.2022.109217. Epub 2022 Nov 17. PMID: 36402251.
127. Simovic Markovic B, Nikolic A, Gazdic M, Bojic S, Vucicevic L, Kosic M, et al. Galectin-3 Plays an Important Pro-inflammatory Role in the Induction Phase of Acute Colitis by Promoting Activation of NLRP3 Inflammasome and Production of IL-1 β in Macrophages. *J Crohns Colitis*. 2016 May;10(5):593-606. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw013. Epub 2016 Jan 19. PMID: 26786981; PMCID: PMC4957458.
128. Tian J, Yang G, Chen HY, Hsu DK, Tomilov A, Olson KA, et al. Galectin-3 regulates inflammasome activation in cholestatic liver injury. *FASEB J*. 2016 Dec;30(12):4202-4213. doi: 10.1096/fj.201600392RR. Epub 2016 Sep 14. PMID: 27630169; PMCID: PMC5102125.
129. Mackinnon AC, Tonev D, Jacoby B, Pinzani M, Slack RJ. Galectin-3: therapeutic targeting in liver disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2023 Jul-Dec;27(9):779-791. doi: 10.1080/14728222.2023.2258280. Epub 2023 Sep 15. PMID: 37705214.
130. Ou SM, Tsai MT, Chen HY, Li FA, Lee KH, Tseng WC, et al. Urinary Galectin-3 as a Novel Biomarker for the Prediction of Renal Fibrosis and Kidney Disease Progression. *Biomedicines*. 2022 Mar 2;10(3):585. doi: 10.3390/biomedicines10030585. PMID: 35327386; PMCID: PMC8945118.
131. Nishi Y, Sano H, Kawashima T, Okada T, Kuroda T, Kikkawa K, et al. Role of galectin-3 in human pulmonary fibrosis. *Allergol Int*. 2007 Mar;56(1):57-65. doi: 10.2332/allergolint.O-06-449. Epub 2007 Jan 29. PMID: 17259811.
132. Jia W, Wang Z, Gao C, Wu J, Wu Q. Trajectory modeling of endothelial-to-mesenchymal transition reveals galectin-3 as a mediator in pulmonary fibrosis. *Cell Death Dis*. 2021 Mar 26;12(4):327. doi: 10.1038/s41419-021-03603-0. PMID: 33771973; PMCID: PMC7998015.
133. Gajovic N, Markovic SS, Jurisevic M, Jovanovic M, Arsenijevic N, Mijailovic Z, et al. Galectin-3 as an important prognostic marker for COVID-19 severity. *Sci Rep*. 2023 Jan 26;13(1):1460. doi: 10.1038/s41598-023-28797-5. PMID: 36702907; PMCID: PMC9878495.

134. Karsli E, Anabarli Metin D, Canacik O, Sabirli R, Kaymaz B, Kurt O, et al. Galectin-3 as a Potential Prognostic Biomarker for COVID-19 Disease: A Case-Control Study. *Cureus*. 2022 Sep 5;14(9):e28805. doi: 10.7759/cureus.28805. PMID: 36225452; PMCID: PMC9534518.
135. Portacci A, Diaferia F, Santomasi C, Dragonieri S, Boniello E, Di Serio F, et al. Galectin-3 as prognostic biomarker in patients with COVID-19 acute respiratory failure. *Respir Med*. 2021 Oct;187:106556. doi: 10.1016/j.rmed.2021.106556. Epub 2021 Aug 4. PMID: 34375925; PMCID: PMC8332745.
136. Caniglia JL, Asuthkar S, Tsung AJ, Guda MR, Velpula KK. Immunopathology of galectin-3: an increasingly promising target in COVID-19. *F1000Res*. 2020 Sep 1;9:1078. doi: 10.12688/f1000research.25979.2. PMID: 33082935; PMCID: PMC7536583.
137. Garcia-Revilla J, Deierborg T, Venero JL, Boza-Serrano A. Hyperinflammation and Fibrosis in Severe COVID-19 Patients: Galectin-3, a Target Molecule to Consider. *Front Immunol*. 2020 Aug 18;11:2069. doi: 10.3389/fimmu.2020.02069. PMID: 32973815; PMCID: PMC7461806.
138. Ge MM, Chen N, Zhou YQ, Yang H, Tian YK, Ye DW. Galectin-3 in Microglia-Mediated Neuroinflammation: Implications for Central Nervous System Diseases. *Curr Neuropharmacol*. 2022;20(11):2066-2080. doi: 10.2174/1570159X20666220201094547. PMID: 35105290; PMCID: PMC9886847.
139. Burguillos MA, Svensson M, Schulte T, Boza-Serrano A, Garcia-Quintanilla A, Kavanagh E, et al. Microglia-Secreted Galectin-3 Acts as a Toll-like Receptor 4 Ligand and Contributes to Microglial Activation. *Cell Rep*. 2015 Mar 10;10(9):1626-1638. doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.012. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25753426.
140. Zhuang JJ, Zhou L, Zheng YH, Ding YS. The serum galectin-3 levels are associated with the severity and prognosis of ischemic stroke. *Aging (Albany NY)*. 2021 Mar 3;13(5):7454-7464. doi: 10.18632/aging.202610. Epub 2021 Mar 3. PMID: 33686023; PMCID: PMC7993705.
141. Yip PK, Carrillo-Jimenez A, King P, Vilalta A, Nomura K, Chau CC, et al. Galectin-3 released in response to traumatic brain injury acts as an alarmin orchestrating brain immune response and promoting neurodegeneration. *Sci Rep*. 2017 Jan 27;7:41689. doi: 10.1038/srep41689. PMID: 28128358; PMCID: PMC5269662.

- 142.Boza-Serrano A, Vrillon A, Minta K, Paulus A, Camprubí-Ferrer L, Garcia M, et al. Galectin-3 is elevated in CSF and is associated with A β deposits and tau aggregates in brain tissue in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2022 Nov;144(5):843-859. doi: 10.1007/s00401-022-02469-6. Epub 2022 Jul 27. PMID: 35895141; PMCID: PMC9547798.
- 143.Ren Z, Liang W, Sheng J, Xun C, Xu T, Cao R, et al. Gal-3 is a potential biomarker for spinal cord injury and Gal-3 deficiency attenuates neuroinflammation through ROS/TXNIP/NLRP3 signaling pathway. *Biosci Rep.* 2019 Dec 20;39(12):BSR20192368. doi: 10.1042/BSR20192368. PMID: 31763668; PMCID: PMC6923351.
- 144.Radziejewska I. Galectin-3 and Epithelial MUC1 Mucin-Interactions Supporting Cancer Development. *Cancers (Basel).* 2023 May 9;15(10):2680. doi: 10.3390/cancers15102680. PMID: 37345016; PMCID: PMC10216753.
- 145.Elad-Sfadia G, Haklai R, Balan E, Kloog Y. Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *J Biol Chem.* 2004 Aug 13;279(33):34922-30. doi: 10.1074/jbc.M312697200. Epub 2004 Jun 17. PMID: 15205467.
- 146.Ko FCF, Yan S, Lee KW, Lam SK, Ho JCM. Chimera and Tandem-Repeat Type Galectins: The New Targets for Cancer Immunotherapy. *Biomolecules.* 2023 May 29;13(6):902. doi: 10.3390/biom13060902. PMID: 37371482; PMCID: PMC10296743.
- 147.Dings RPM, Miller MC, Griffin RJ, Mayo KH. Galectins as Molecular Targets for Therapeutic Intervention. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar 19;19(3):905. doi: 10.3390/ijms19030905. PMID: 29562695; PMCID: PMC5877766.
- 148.Fuselier C, Dumoulin A, Paré A, Nehmé R, Ajarrag S, Granger Joly de Boissel P, et al. Placental Galectins in Cancer: Why We Should Pay More Attention. *Cells.* 2023 Jan 29;12(3):437. doi: 10.3390/cells12030437. PMID: 36766779; PMCID: PMC9914345.
- 149.Yamaoka A, Kuwabara I, Frigeri LG, Liu FT. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *J Immunol.* 1995 Apr 1;154(7):3479-87. PMID: 7897228.
- 150.Bhaumik P, St-Pierre G, Milot V, St-Pierre C, Sato S. Galectin-3 facilitates neutrophil recruitment as an innate immune response to a parasitic protozoa cutaneous infection. *J*

- Immunol. 2013 Jan 15;190(2):630-40. doi: 10.4049/jimmunol.1103197. Epub 2012 Dec 14. PMID: 23241887.
151. Danella Polli C, Alves Toledo K, Franco LH, Sammartino Mariano V, de Oliveira LL, Soares Bernardes E, et al. Monocyte Migration Driven by Galectin-3 Occurs through Distinct Mechanisms Involving Selective Interactions with the Extracellular Matrix. *ISRN Inflamm.* 2013 Feb 25;2013:259256. doi: 10.1155/2013/259256. PMID: 24049657; PMCID: PMC3767352.
152. Karlsson A, Follin P, Leffler H, Dahlgren C. Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. *Blood.* 1998 May 1;91(9):3430-8. PMID: 9558402.
153. Markowska AI, Liu FT, Panjwani N. Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. *J Exp Med.* 2010 Aug 30;207(9):1981-93. doi: 10.1084/jem.20090121. Epub 2010 Aug 16. PMID: 20713592; PMCID: PMC2931172.
154. Saravanan C, Liu FT, Gipson IK, Panjwani N. Galectin-3 promotes lamellipodia formation in epithelial cells by interacting with complex N-glycans on alpha3beta1 integrin. *J Cell Sci.* 2009 Oct 15;122(Pt 20):3684-93. doi: 10.1242/jcs.045674. Epub 2009 Sep 15. PMID: 19755493; PMCID: PMC2758802.
155. Liu W, Hsu DK, Chen HY, Yang RY, Carraway KL 3rd, Isseroff RR, et al. Galectin-3 regulates intracellular trafficking of EGFR through Alix and promotes keratinocyte migration. *J Invest Dermatol.* 2012 Dec;132(12):2828-37. doi: 10.1038/jid.2012.211. Epub 2012 Jul 12. PMID: 22785133; PMCID: PMC3496033.
156. Koca SS, Akbas F, Ozgen M, Yolbas S, Ilhan N, Gundogdu B, et al. Serum galectin-3 level in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* 2014;33(2):215-20. DOI: 10.1007/s10067-013-2346-8.
157. Taniguchi T, Asano Y, Akamata K, Noda S, Masui Y, Yamada D, et al. Serum levels of galectin-3: possible association with fibrosis, aberrant angiogenesis, and immune activation in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2012;39(3):539-44. DOI: 10.3899/jrheum.110755.

158. Faludi R, Nagy G, Tokes-Fuzesi M, Kovacs K, Czirjak L, Komocsi A. Galectin-3 is an independent predictor of survival in systemic sclerosis. *Int J Cardiol.* 2017;233:118-24. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.12.140.
159. Bachman J. Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol.* 2013;530:67-74. doi: 10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6. PMID: 24034314.
160. Singh C, Roy-Chowdhuri S. Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. *Methods Mol Biol.* 2016;1392:161-76. doi: 10.1007/978-1-4939-3360-0_15. PMID: 26843055.
161. Mishra M, Tiwari S, Gomes AV. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Rev Proteomics.* 2017 Nov;14(11):1037-1053. doi: 10.1080/14789450.2017.1388167. Epub 2017 Oct 13. PMID: 28974114; PMCID: PMC6810642.
162. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993;122(1):103-11. DOI: 10.1083/jcb.122.1.103.
163. Korman B. Evolving insights into the cellular and molecular pathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis. *Transl Res.* 2019;209:77-89. DOI: 10.1016/j.trsl.2019.02.010.
164. Inohara H, Akahani S, Raz A. Galectin-3 stimulates cell proliferation. *Exp Cell Res.* 1998;245(2):294-302. DOI: 10.1006/excr.1998.4253.
165. Wang X, Wang Y, Zhang J, Guan X, Chen M, Li Y, et al. Galectin-3 contributes to vascular fibrosis in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension rat model. *J Biochem Mol Toxicol.* 2017;31(5). DOI: 10.1002/jbt.21879.
166. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(13):5060-5. DOI: 10.1073/pnas.0511167103.
167. Mackinnon AC, Gibbons MA, Farnworth SL, Leffler H, Nilsson UJ, Delaine T, et al. Regulation of transforming growth factor-beta1-driven lung fibrosis by galectin-3. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(5):537-46. DOI: 10.1164/rccm.201106-0965OC.

168. Jiang JX, Chen X, Hsu DK, Baghy K, Serizawa N, Scott F, et al. Galectin-3 modulates phagocytosis-induced stellate cell activation and liver fibrosis in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302(4):G439-46. DOI: 10.1152/ajpgi.00257.2011.
169. Walker JT, Elliott CG, Forbes TL, Hamilton DW. Genetic Deletion of Galectin-3 Does Not Impair Full-Thickness Excisional Skin Healing. *J Invest Dermatol*. 2016;136(5):1042-50. DOI: 10.1016/j.jid.2016.01.014.
170. Quan TE, Cowper SE, Bucala R. The role of circulating fibrocytes in fibrosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2006;8(2):145-50. DOI: 10.1007/s11926-006-0055-x.
171. Schmidt M, Sun G, Stacey MA, Mori L, Mattoli S. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *J Immunol*. 2003;171(1):380-9. DOI: 10.4049/jimmunol.171.1.380.
172. Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol*. 2001;166(12):7556-62. DOI: 10.4049/jimmunol.166.12.7556.
173. Servettaz A, Goulvestre C, Kaviani N, Nicco C, Guilpain P, Chereau C, et al. Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. *J Immunol*. 2009;182(9):5855-64. DOI: 10.4049/jimmunol.0803705.
174. Bagnato G, Bitto A, Pizzino G, Irrera N, Sangari D, Cinquegrani M, et al. Simvastatin attenuates the development of pulmonary and cutaneous fibrosis in a murine model of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2013;52(8):1377-86. DOI: 10.1093/rheumatology/ket144.
175. Maria ATJ, Toupet K, Maumus M, Rozier P, Vozenin MC, Le Quellec A, et al. Fibrosis Development in HOCl-Induced Systemic Sclerosis: A Multistage Process Hampered by Mesenchymal Stem Cells. *Front Immunol*. 2018;9:2571. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02571.
176. Maria AT, Toupet K, Bony C, Pirot N, Vozenin MC, Petit B, et al. Antifibrotic, Antioxidant, and Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells in HOCl-Induced Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(4):1013-25. DOI: 10.1002/art.39477.

177. Bonniaud P, Margetts PJ, Ask K, Flanders K, Gauldie J, Kolb M. TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *J Immunol.* 2005;175(8):5390-5. DOI: 10.4049/jimmunol.175.8.5390.
178. Stochmal A, Czuwara J, Zaremba M, Rudnicka L. Altered serum level of metabolic and endothelial factors in patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res.* 2020;312(6):453-8. DOI: 10.1007/s00403-019-01993-y.
179. Nirodi CS, Devalaraja R, Nanney LB, Arrindell S, Russell S, Trupin J, et al. Chemokine and chemokine receptor expression in keloid and normal fibroblasts. *Wound Repair Regen.* 2000;8(5):371-82. DOI: 10.1111/j.1524-475x.2000.00371.x.
180. Luo LF, Shi Y, Zhou Q, Xu SZ, Lei TC. Insufficient expression of the melanocortin-1 receptor by human dermal fibroblasts contributes to excess collagen synthesis in keloid scars. *Exp Dermatol.* 2013;22(11):764-6. DOI: 10.1111/exd.12250.
181. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1429-37. DOI: 10.1172/JCI36183.
182. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med.* 2008;10:e17. DOI: 10.1017/S1462399408000719.
183. Hahn JM, McFarland KL, Combs KA, Supp DM. Partial epithelial-mesenchymal transition in keloid scars: regulation of keloid keratinocyte gene expression by transforming growth factor-beta1. *Burns Trauma.* 2016;4(1):30. DOI: 10.1186/s41038-016-0055-7.

7.ANEXO

ANEXO 1- Documento de autorización del procedimiento original “Modelo murino de fibrosis cutánea (HOCL model): estudio comparativo de IPD4, corticoides y combinaciones”. Responsable del proyecto Dr. Julio Cortijo Gimeno.



AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2017/VSC/PEA/00062

Vista la solicitud realizada en fecha **24/03/17** con nº reg. entrada **14264** por D/D^a. **Pilar Campins Falcó**, Vicerrectora de Investigación y Política Científica, centro usuario **ES462500001003**, para realizar el procedimiento:

“Modelo murino de fibrosis cutánea (HOCL model): estudio comparativo de IPD4, corticoides y combinaciones”

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2017/VSC/PEA/00062** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat de Valencia**

Responsable del proyecto: **Julio Cortijo Gimeno**

Establecimiento: **Animalario Facultad de Medicina – Campus Blasco Ibañez**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Firmado por Rogelio Illanes Ribas el
03/03/2017 11:57:40
GENERALITAT
VALENCIANA

ANEXO 2- Documento de aceptación del proyecto por parte del Comité Ético de Investigación con medicamentos (CEIm) del Consorci Hospital General Universitari de València.



Consorci Hospital General Universitari de València
Comité Ético de Investigación con medicamentos

APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN
- ANEXO 11 -

Este CEIm tras evaluar en su reunión de 8 de abril de 2022 el Proyecto de Investigación:

Título:	Mecanismos implicados en la regulación de la fibrosis cutánea: Galectina-3 y senescencia celular		
I.P.:	Severiano Marin Bertolin	Servicio/Unidad	Cirugía Plástica y Reparadora

Acuerda respecto a esta documentación:

REGISTRO:23/2022
 Protocolo: versión 1; 28/02/2022
 HIP+CI muestras biológicas UV
 Que se cumplen los requisitos éticos y metodológicos y la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado presentado reúnen las condiciones exigidas por este CEIC, por tanto se decide su APROBACIÓN.

COMPOSICIÓN DEL CEIm

Presidente: Dr. LOPEZ ALCINA, EMILIO (Especialista en Urología)
Vicepresidente: Dr. GARCIA DEL TORO, MIGUEL (Especialista en Enf.Infecciosas)
Vocales:
 Dr., ALVAREZ PITI, JULIO (Especialista en Pediatría)
 Dr. ANTON GARCIA, FRANCISCO (Especialista en M.Familia Atención Primaria)
 Dra. LOPEZ ALARCON, DOLORES (Especialista Anestesia y Reanimación)
 Dra. MARCAIDA BENITO, GOITZANE (Especialista en Análisis Clínicos)
 Dr. MARTORELL ARAGONES, ANTONIO (Especialista en Pediatría)
 Dra. MIR SANCHEZ CAROLINA (Especialista en M.Familia Atención Primaria)
 Dra. OCETE MOCHON DOLORES (Especialista en Microbiología)
 Dr. QUESADA DORADOR, AURELIO (Especialista en Cardiología)
 Dra SAFONT AGUILERA, Mª JOSE (Especialista en Oncología)
 Dr. VALDERRAMA ZURIAN JUAN CARLOS (Especialista en Historia de la ciencia y documentación)
 Dr. SANCHEZ CARAZO, JOSÉ LUIS (Especialista en Dermatología)
 Dr. SANCHEZ JUAN, CARLOS (Especialista en Endocrinología)
 Dr. RUIZ ROJO, ELIAS (Farmacéutico de Atención Primaria)
 Dra. PEDROS CHOLVI, CONSUELO (Especialista en Farmacología clínica)
 Dra. OISHI KONARI, MIRIAM NATSUKI (Especialista en Otorrinolaringología)
 Dr. PEREZ SILVESTRE, JOSE (Especialista en Medicina Interna)
 Don GRACIA PEREZ FRANCISCO JAVIER (Enfermero)
 Dña. MARTÍ MONROS, ANNA (Enfermera)
 Doña SARMIENTO CABAÑES, Mª DEL CARMEN (Miembro independiente del centro)
 Doña DOMINGUEZ GARCIA, CONCEPCION (Licenciado en derecho)
 Dr. CORTIJO GIMENO, JULIO (Especialista en Farmacia)
Secretaría Técnica: BERNALTE SESE, ALEJANDRO (Especialista en Farmacia Hospitalaria)

Anexo II 1 CEIm - CHGUV



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación con medicamentos

El CEIm del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) tanto en su composición como en sus procedimientos y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el ensayo o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del ensayo clínico

Lo que comunico a efectos oportunos:

Fdo. Dr. Emilio Lopez Alcina
(Presidente CEIm CHGUV)

ANEXO 2- Documento de consentimiento informado para la utilización de muestras biológicas.



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA UTILIZACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS



IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Durante la intervencióna la que va a ser sometido/a se tomarán muestras de PIEL. El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente fragmentos de piel de espesor total, que se vayan a desechar en la propia cirugía, sin que se vaya a tomar más muestra de piel para ello, ni que suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. Dichas muestras de piel podrán ser utilizadas para la investigación titulada:

“Mecanismos implicados en la regulación de la fibrosis cutánea: Galectina-3”

Dicha investigación se realizará en el departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universitat de València. Las muestras que done se almacenarán con los requisitos adecuados para su posterior uso en investigación, cumpliendo los requerimientos establecidos en la normativa vigente. Las muestras serán almacenadas durante 5 años, en previsión de que fuera necesario algún análisis adicional relacionado con los objetivos del estudio. Durante este proceso el responsable de las muestras será el promotor del estudio. Al término de la investigación, sus muestras serán destruidas siguiendo el mismo procedimiento de destrucción del Consorci Hospital General Universitari de València para el resto de las muestras.

Sus muestras sólo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación avalados científicamente y aprobados por un Comité de Ética para la Investigación. En ocasiones dichos estudios se realizarán fuera del centro en el que ha sido tratado/a. Se podrán incorporar datos de su historia clínica que serán identificados con un número idéntico al que se utilizará para identificar la muestra, que no guardará relación con el número de historia, nombre u otros datos que puedan identificarle. Tanto las muestras como los datos asociados a las mismas serán custodiados y en su caso cedidos a terceros con fines de investigación biomédica en los términos previstos en la Ley 14/2007, de 3 de julio, y en el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre.

OBJETIVO

El objetivo del estudio es estudiar la senescencia celular (el envejecimiento de las células hasta que dejan de dividirse) en los fibroblastos de la piel humana.

GRATUIDAD POR LA PARTICIPACIÓN

Por la donación de las muestras biológicas, usted no percibirá ninguna compensación económica. La donación implica, la renuncia por parte de los donantes a cualquier derecho de naturaleza económica o de otro tipo sobre los resultados que pudieran derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con las muestras biológicas.

BENEFICIOS ESPERADOS

La investigación que se realizará utilizando las muestras de piel que usted dona voluntariamente, podrían ayudar en el futuro a mejorar los procedimientos de diagnóstico y tratamiento de diferentes enfermedades.

CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE LA DONACIÓN

Sólo si usted lo desea, existe la posibilidad de que pueda ser contactado/a en el futuro para completar o actualizar la información de la que contamos en este momento y/o de tomar una nueva muestra que pudiera ser interesante en el desarrollo de la investigación biomédica, en cuyo caso volverá a ser informado/a de la situación y tendrá la libertad de participar o declinar dicha participación.

CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU NO REALIZACIÓN Y DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

La decisión de donar sus muestras es totalmente voluntaria, pudiendo negarse a donarlas e incluso pudiendo revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe. Si decidiera revocar el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se haya utilizado en la investigación, será destruida. Tales efectos, no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo con anterioridad.

RIESGOS

El procedimiento que se le propone no supone ningún riesgo añadido para su salud ni compromete el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad.

PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD

El promotor y los investigadores se comprometen a que sus datos personales serán tratados de manera confidencial y se procesarán conforme a la normativa vigente sobre protección de datos personales (Ley Orgánica 3/2018, de Protección de Datos Personales y Garantía de los Derechos Digitales, y Reglamento [UE] 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos).

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de manera que no incluya información que pueda identificarle, y sólo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones en caso de urgencia

médica o requerimiento legal. El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los participantes se ajustarán a lo dispuesto en la ley.

El acceso a su información personal identificada quedará restringido al médico/a del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias, al Comité de Ética de la Investigación y personal autorizado por el promotor (monitores del estudio, auditores), cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de estos de acuerdo con la legislación vigente. Los datos se recogerán en un fichero de investigación responsabilidad del promotor y se tratarán en el marco de su participación en este estudio.

De conformidad con lo establecido en el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016, relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos y la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, le informamos que sus datos personales serán gestionados de acuerdo con dicha legislación, pudiendo ejercer sus derechos de acceso, rectificación, supresión, derecho a la limitación del tratamiento de sus datos, así como a la portabilidad y oposición, siempre que el ejercicio de estos derechos no afecte a los fines de investigación para el cual fueron recogidos.

El responsable del tratamiento de los datos del centro del estudio es: Dr. Severiano Marín Bertolín, jefe de Servicio de Cirugía Plástica, Reparadora y Estética del Consorci Hospital General Universitari de València; semaber@uv.es. La información de contacto del Delegado de Protección de Datos del centro del estudio es: dpd_chguv@gva.es

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos, pero sí se utilizarán los que ya se hayan recogido. Los datos codificados pueden ser transmitidos a terceros pero en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, número de historia clínica, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito o para su uso en publicaciones científicas, pero siempre manteniendo la confidencialidad de estos de acuerdo con la legislación vigente.

INFORMACIÓN DE CONTACTO

Si tienen alguna pregunta sobre este proyecto de investigación, puede consultar en cualquier momento al Investigador responsable del estudio: Doña Miriam Alonso Carpio.

Email: acarmi@alumni.uv.es

Si deciden participar en este proyecto, rellenen y firmen el formulario de consentimiento que aparece a continuación.

Declaración Investigador:

He informado debidamente al representante legal y/o y al paciente anteriormente mencionado.

Fdo.: DNI

En Valencia, a de de 20...

REVOCACION DEL CONSENTIMIENTO

Yo,(nombre y apellidos del paciente),
revoco el consentimiento prestado y no deseo continuar participando en el estudio.

Firma del participante
Fecha:/...../.....

Firma del investigador
Fecha:/...../.....

Firma del representante:
Fecha:/...../.....

En Valencia, a..... de de 20...

EJEMPLAR PARA EL CENTRO

D./Dña. _____ mayor de edad, titular del DNI: _____, por el presente documento manifiesto los siguientes consentimientos:

Si la persona es menor de edad o está incapacitada legalmente, se recomienda utilizar esta fórmula:

D./Dña. _____, mayor de edad, titular del DNI: _____, [padre, madre o tutor legal de _____], por el presente documento manifiesto los siguientes consentimientos:

DECLARO

- Que he leído la hoja de información que se me ha entregado.
- Que he comprendido las explicaciones que se me han facilitado.
- Que he podido realizar observaciones y me han sido aclaradas las dudas que he planteado.
- Que puedo revocar el consentimiento en cualquier momento sin tener que dar explicaciones y sin que esto tenga ninguna repercusión negativa.
- Que de forma libre y voluntaria cedo las muestras biológicas que se me han propuesto y los datos de información que sean necesarios para el estudio.
- Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas.

CONSIENTO

- Que se utilicen las muestras biológicas obtenidas y los datos que se hallan recopilados en mi historia clínica para el mencionado estudio.
- Que el investigador/a pueda acceder a mis datos en la medida en que sea necesario y manteniendo siempre su confidencialidad.
- Que el personal del centro me contacte en el futuro en caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos y/o tomar nuevas muestras. Sí
 No

Deseo incluir la siguiente restricción al uso de mis datos:

.....

Nombre y apellidos	Nombre y apellidos
Firma PADRE / MADRE / TUTOR	Firma
<i>Sólo utilizar en caso de que sea menor o tenga declaración de incapacidad</i>	

Si el sujeto del estudio es un adolescente capaz intelectual y emocionalmente de entre 12 y 16 años debe de ser oída su opinión y autorizar su participación en el estudio firmando también este consentimiento. Cuando se trate de menores no incapaces ni incapacitados, pero emancipados o con 16 años cumplidos, no cabe prestar el consentimiento por representación y será el propio sujeto del estudio quien firmará el consentimiento (Ley 41/2002).

Declaración Investigador:

He informado debidamente al representante legal y al paciente anteriormente mencionado.

Fdo.: DNI

En Valencia, a de de 20...

REVOCACION DEL CONSENTIMIENTO

Yo,(nombre y apellidos del paciente),
revoco el consentimiento prestado y no deseo continuar participando en el estudio.

Firma del participante

Fecha:/...../.....

Firma del investigador

Fecha:/...../.....

Firma del representante:

Fecha:/...../.....

En Valencia, a..... de de 20...