



UST
FACULTAT DE CIÈNCIES
I TECNOLOGIA
UVIC-UCC

Treball de Fi de Grau

Determinació de la idoneïtat dels blocadors d'adrenoreceptors β en la curació de ferides

Carla Nieto Mármol

Grau en Biotecnologia

Tutor/a: Xavier Rovira

Vic, Maig del 2018



UST
FACULTAT DE CIÈNCIES
I TECNOLOGIA
UVIC-UCC

Vull agrair al grup de recerca del TR2Lab haver-me acollit per tal de realitzar aquest treball, així com a la seva coordinadora, Marta Otero. També agraeixo la col·laboració del grup QuBi, amb el Carlo Manzo com a coordinador. A en Xavier Rovira i a la Ester Goutan, pel seguiment i els consells al llarg de tot el treball, i a la Montse Masoliver, pel seu suport al laboratori.



ÍNDEX

RESUM	3
1. INTRODUCCIÓ	5
2. OBJECTIUS	5
3. CONTEXT	
3.1 ELS ADRENORECEPTORS	6
3.2 ELS AGONISTES	7
3.3 ELS ANTAGONISTES β -ADRENÈRGICS	8
3.3.1 CLASSIFICACIÓ	8
3.3.2 LIPOSOLUBILITAT I VIDA MITJANA	10
3.3.3 INDICACIONS EN DERMATOLOGIA	11
3.3.4 ELS BETABLOCANTS A LA CURACIÓ DE FERIDES	13
3.3.5 EFECTES SECUNDARIS CUTANIS I SISTÈMICS	13
3.4 LA PELL I EL SEU PROCÉS DE CURACIÓ	13
3.5 TIPUS DE FERIDA	16
4. RESULTATS BIBLIOGRÀFICS	18
4.1 TRACTAMENT DE LES ÚLCERES DE PEU DIABÈTIC AMB BLOCADORS D'ADRENORECEPTORS β	23
4.2 TRACTAMENT DE FERIDES PER CREMADES AMB BLOCADORS D'ADRENORECEPTORS β	24
4.3 TRACTAMENT DE LES ÚLCERES PER PRESSIÓ AMB BLOCADORS D'ADRENORECEPTORS β	25
4.4 TRACTAMENT DE FERIDES D'ALTRES ETIOLOGIES AMB BLOCADORS D'ADRENORECEPTORS β	27
5. PART EXPERIMENTAL	29
5.1 OBJECTIU DE L'EXPERIMENT	30
5.2 PROTOCOL	30
5.2.1 CULTIU CEL·LULAR	30
5.2.2 REALITZACIÓ DE "FERIDES"	31
5.2.3 SEGUIMENT DE L'EVOLUCIÓ DE LES "FERIDES" I ANÀLISI DE DADES	32
5.3 RESULTATS	32
5.4 CONCLUSIONS EXPERIMENTALS	38
6. DISCUSSIÓ	39
7. CONCLUSIONS FINALS	42
8. PERSPECTIVES	42
9. BIBLIOGRAFIA	43
ANNEX	



RESUM TREBALL FINAL DE GRAU GRAU EN BIOTECNOLOGIA

Títol: *Determinació de la idoneïtat dels blocadors d'adrenoreceptors β en la regeneració tissular*

Paraules clau: *blocadors d'adrenoreceptors β , regeneració de teixits, úlceres, receptors adrenèrgics*

Autora: *Carla Nieto Mármol*

Tutors: *Xavier Rovira*

Data: *Maig de 2018*

Els receptors acoblats a proteïna G, com els adrenoreceptors, juguen un paper clau en la comunicació cel·lular, permetent a les cèl·lules detectar senyals externes a través d'hormones o neurotransmissors. Els receptors adrenèrgics són la diana, principalment, de l'adrenalina i la noradrenalina, ambdues catecolamines. Els antagonistes dels beta-adrenoreceptors s'estan demostrant eficaços actualment en moltes alteracions dèrmiques, com per exemple hemangioma, a banda de moltes altres aplicacions terapèutiques ja demostrades, com afeccions cardíaques, glaucoma o la incontinència. Entre les aplicacions dermatològiques sota estudi, recentment s'ha observat que aquest tipus de fàrmacs poden demostrar una gran eficàcia en la curació de ferides cròniques.

Donat l'interès d'un grup de recerca multidisciplinari com el TR2Lab en la regeneració de teixits i, en particular, la curació de ferides cròniques, l'objectiu d'aquest treball és aportar evidències bibliogràfiques, basades en publicacions de recerca, assajos clínics i patents, dels efectes dels fàrmacs blocadors dels adrenoreceptors β per tal de determinar la idoneïtat d'aquests productes en la curació de ferides. Així doncs, aquest treball es basa en la recerca bibliogràfica d'evidències dels efectes dels fàrmacs blocadors dels adrenoreceptors beta tant a nivell cel·lular i molecular com a nivell fisiològic i clínic per tal de determinar quin és el paper i el mecanisme d'aquests productes en la curació de ferides. Tanmateix, es vol mostrar un dels procediments experimentals més utilitzats en l'àmbit de cultius cel·lulars, per tal de proposar-lo en aquest treball com a metodologia per la recerca bàsica pel descobriment del tractament més eficaç en la curació de ferides dintre de l'entorn del TR2Lab, mitjançant una petita part experimental.

En conclusió, s'ha evidenciat que l'administració dels blocadors d'adrenoreceptors β redueix tant la resposta inflamatòria local com els nivells de metal·loproteïnases, millora la contracció de les ferides, el desenvolupament del teixit de granulació, la deposició de col·lagen, l'angiogènesi resultant en un tractament innovador menys invasiu, dolorós i costós, i més segur i ràpid. Així doncs, aquest treball dona suport a l'ús dels antagonistes β adrenèrgics per al tractament de ferides de diferents etiologies. Tot i això, encara és necessària més recerca per a millorar i optimitzar l'eficàcia d'aquests tractaments i determinar els mecanismes moleculars que poden afavorir o disminuir l'efecte dels blocadors d'adrenoreceptors β a la curació de ferides, tant a nivell bàsic com a nivell clínic, sent ambdós aspectes un possible tòpic de recerca abordable en l'àmbit del grup de recerca del TR2Lab.



SUMMARY DEGREE FINAL PROJECT DEGREE IN BIOTECHNOLOGY

Title: *Determination of the suitability of beta-blockers in tissue regeneration*

Keywords: *beta-blockers, tissue regeneration, ulcers, adrenergic receptors*

Author: *Carla Nieto Mármol*

Tutors: *Xavier Rovira*

Date: *May 2018*

G-protein-coupled receptors, such as adrenoreceptors, play a key role in cell communication, allowing cells to detect external signals through hormones or neurotransmitters. Adrenergic receptors are the target, mainly of adrenaline and norepinephrine, both catecholamines. The beta-adrenoreceptor antagonists are currently being shown to be effective in many dermal alterations, such as the haemangioma, in addition to many other therapeutic applications already proven, such as heart afflictions, glaucoma or incontinence. Among dermatological applications under study, recently it has been observed that these types of drugs can prove to be very effective in healing chronic wounds.

Given the interest of a multidisciplinary research group such as TR2Lab in the regeneration of tissues and, in particular, the treatment of chronic injuries, the objective of this end-of-degree project is to provide bibliographic evidence, based on publications of research, clinical trials and patents, the effects of beta-blocking drugs in order to determine the suitability of these products in the treatment of wounds of different aetiologies. Thus, this work is based on the bibliographic research of evidence of the effects of beta-blocking drugs both at the cellular and molecular level and at the physiological and clinical level in order to determine the role and mechanism of these products in the wound healing. However, one of the most commonly used experimental procedures in the field of cell cultures is shown, in order to propose it in this work as a methodology for basic research for the discovery of the most effective treatment in wound healing within the environment of the TR2Lab, through a small experimental part.

In conclusion, it has been shown that beta-blocker administration reduces both local inflammatory response and metalloproteinase levels, improves wound contraction, granulation tissue development, collagen deposition and angiogenesis resulting in a less invasive, painful and costly innovative treatment, safer and faster. Therefore, this work supports the use of adrenergic β antagonists for the treatment of wounds of different aetiologies. However, more research is still needed to improve and optimize the effectiveness of these treatments and determine the molecular mechanisms that can favour or decrease the effect of β adrenoreceptor blockers on wound healing, both at the basic and clinical level, which are a possible topic of research that can be tackled in the field of the research group of the TR2Lab.



1. INTRODUCCIÓ

La funció principal de la pell és servir de barrera protectora contra el medi que ens envolta, per tant, la pèrdua de la integritat d'aquesta barrera, com a conseqüència d'una lesió o d'una malaltia, pot provocar conseqüències molt greus, i en alguns casos fins i tot la mort. Un dels problemes clínics principals en l'actualitat és la curació de ferides cròniques. Aquest tipus de ferida es caracteritza per no seguir un curs normal en l'evolució de la curació, donats diferents factors com la insuficiència venosa o arterial, el trauma repetitiu de la neuropatia o la pressió prolongada. Un clar exemple de ferida crònica podrien ser les úlceres per pressió i cisalla, incloses dins de la tipologia d'úlceres relacionades amb la dependència. Aquestes es caracteritzen per presentar una àrea de necrosi a la pell sobre una prominència òssia com a conseqüència de la compressió de teixits tous contra una superfície dura durant un temps suficientment llarg per induir isquèmia local. El tractament de les ferides cròniques pot arribar a ser molt costós econòmicament, a més a més de requerir temps i difícilment s'aconsegueixen els resultats desitjats. També s'ha de tenir en compte que la majoria de tractaments actualment resulten molt invasius i dolorosos. I aquest repte no només existeix en aquest tipus de ferides, sinó que també hi podem incloure les cremades. Aquestes, no només presenten dificultats a la cura, sinó que també són considerades lesions greus que estimulen una resposta inflamatòria sistèmica que causa complicacions sistèmiques en els pacients.

Els receptors acoblats a proteïna G (GPCRs) juguen un paper clau en la comunicació cel·lular, permetent a les cèl·lules detectar senyals externes a través d'hormones o neurotransmissors. Recentment, Robert J. Lefkowitz i Brian K. Kobilka van ser premiats amb el Premi Nobel de química (2012) pel seu treball pioner sobre un GPCR prototip, els beta-adrenèrgics (β ARs). Aquests receptors, àmpliament distribuïts per tot el cos, són la diana de certes catecolamines, principalment l'adrenalina i noradrenalina. Els agonistes adrenèrgics i, especialment, els antagonistes (blocadors d'adrenoreceptors β) dirigits als β -adrenoreceptors són actualment teràpies de primera línia per a moltes alteracions cardiovasculars i dermatològiques. No obstant, recentment s'ha observat que aquest tipus de fàrmacs poden demostrar una gran eficàcia en la curació de ferides, d'entre les quals s'inclouen ferides cròniques i cremades, que és on rau l'interès del grup de recerca TR2Lab.

2. OBJECTIUS

Donat l'interès d'un grup de recerca multidisciplinari com el TR2Lab en la regeneració de teixits i la curació de ferides cròniques, l'objectiu general d'aquest treball de fi de grau és aportar evidències bibliogràfiques i proposar noves línies de recerca basades en els efectes dels fàrmacs blocadors d'adrenoreceptors β per tal de determinar la idoneïtat d'aquests productes en la curació de ferides en el si de la recerca del TR2Lab. Amb aquest objectiu es realitzarà una recerca bibliogràfica d'evidències dels efectes dels fàrmacs blocadors d'adrenoreceptors β tant a nivell molecular com a nivell fisiològic i clínic, que permetrà determinar quin és el paper i el mecanisme d'acció d'aquests productes en la curació de ferides, així com les innovacions que es podrien desenvolupar a nivell científic per aportar

nou coneixement en l'àmbit d'una recerca bàsica i aplicada. Així doncs, els objectius específics d'aquest treball són:

1. Realitzar una recerca bibliogràfica per tal de trobar mecanismes moleculars i farmacològics que evidencin els efectes dels blocadors d'adrenoreceptors β a la curació de ferides.
2. Avaluar la utilització d'un mètode experimental on es mostri part de la metodologia per la recerca bàsica en la curació de ferides dintre de l'entorn del TR2Lab.
3. Aportar noves idees per millorar la recerca en l'àmbit de la curació de ferides utilitzant blocadors d'adrenoreceptors β .
4. Fer un treball que serveixi de guia informativa al TR2Lab per a la recerca dels efectes dels blocadors d'adrenoreceptors β i el seu ús.

3. CONTEXT

3.1 ELS ADRENORECEPTORS

Els adrenoreceptors són una classe de receptors associats a la proteïna G, els quals són activats per catecolamines com l'adrenalina (epinefrina) i noradrenalina (norepinefrina). La família del receptor adrenèrgic inclou nou subtipus gènics diferents: tres β (β_1 , β_2 , β_3), tres α_1 (α_{1a} , α_{1b} i α_{1d}) i tres α_2 (α_{2A} , α_{2B} i α_{2C}). Els receptors adrenèrgics, i en particular els β_2 AR, es troben entre els receptors que millor s'acoblen a la proteïna G. Els β -AR estimulats s'uneixen a la proteïna G, el que condueix a la producció d'AMPc, i això l'activació de la proteïna Quinasa A (PKA). PKA doncs, fosforil·la els canals de Ca^{++} , el que dona lloc a tota una cascada de reaccions a cèl·lules diana.^{1,2}

Catecolamines com l'adrenalina o la noradrenalina, s'uneixen amb els receptors adrenèrgics (α_1 , α_2 i β) i aquests, associats a les proteïnes G corresponents (Gq per a α_1 , Gi per a α_2 i Gs per a β) comencen una

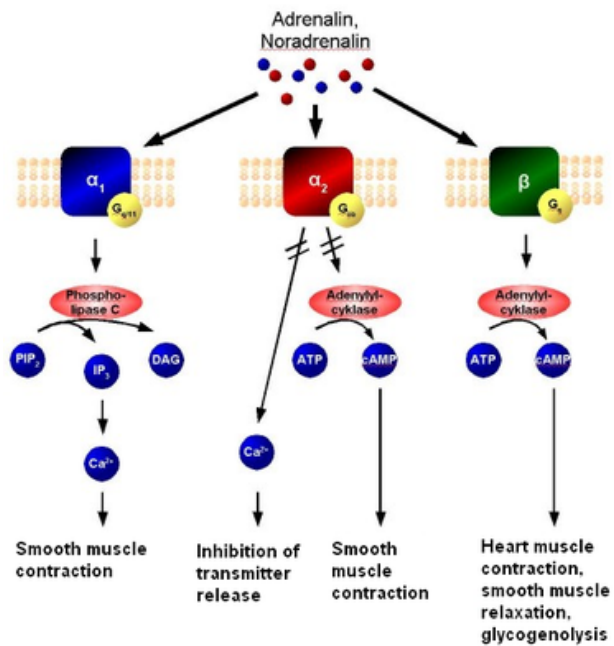


Figura 1. Esquema de l'activació de diferents adrenoreceptors per part de les catecolamines³



cascada de reaccions químiques que provoquen diferents efectes a nivell fisiològic. En el cas de la proteïna Gq (associada $\alpha 1$) provoca un augment del calci intracel·lular, el que dona lloc a la contracció del múscul llis. D'altra banda, la unió de les catecolamines a $\alpha 2$ provoca que Gi desenvolupi el bloqueig de l'augment de calci intracel·lular, el que desencadena una disminució de l'alliberament de neurotransmissors, així com una disminució de l'activitat de AMPc, que evita la contracció del múscul llis. Finalment, els receptors β , com ja s'ha comentat anteriorment, s'uneixen a Gs, augmenten la concentració intracel·lular de cAMP, resultant, en la contracció del múscul cardíac, relaxació del múscul llis i glicogenòlisi, d'entre altres funcions.³

3.2 ELS AGONISTES

Un agonista adrenèrgic és un tipus d'agent simpaticomimètic que estimula una resposta dels receptors adrenèrgics, és a dir, exerceix efectes similars o idèntics als de l'adrenalina (epinefrina). Alguns agonistes són utilitzats com a fàrmacs per a patologies respiratòries, com l'asma i la malaltia pulmonar obstructiva crònica. Els agonistes poden tenir activitat sobre els receptors alfa o els beta de forma selectiva o no selectiva i, en total, són cinc les subcategories principals dels receptors adrenèrgics: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, i $\beta 3$. Els agonistes varien en la seva especificitat entre els receptors i solen ser substàncies que tendeixen a tenir molta selectivitat. La següent taula resumeix els diferents tipus d'agonista segons la seva selectivitat i els exemples més coneguts³:

Tipus	Agonistes β -adrenèrgics
No selectiu	Isoproterenol ($\beta 1$ i $\beta 2$) Adrenalina (tots els receptors adrenèrgics) Noradrenalina ($\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\beta 1$) Isoprenalina ($\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 3$) Dopamina ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, D1 i D2)
Selectiu per a $\alpha 1$ Inactivació de l'adenilat ciclase, donant lloc a una disminució de cAMP. Afecta principalment a la contracció del múscul llis.	Fenilefrina Mefentermina Metaraminol Midodrina
Selectiu per a $\alpha 2$ Inactivació de l'adenilat ciclase, donant lloc a una disminució de cAMP. L'efecte d'aquesta inactivació és la disminució la degradació del glicogen.	Clonidina Apraclonidina Brimonidina Guanfacina Guanabenz Metildopa Tizanidina



Selectiu per a β_1 Estimulen l'activitat de l'adenilat ciclasa, obrint els canals de calci, produint estimulació cardíaca.	Dobutamina Prenalterol Xamoterol
Selectiu per a β_2 Estimulen l'activitat de l'adenilat ciclasa, obrint els canals de calci, produint relaxació del múscul llis.	Clenbuterol Fenoterol Formoterol Indacaterol Metaproterenol Olodaterol Salbutamol Salmeterol Terbutalina Vilanterol

Taula 2. Tipus d'agonistes i classificació (Taula de font pròpia)

3.3 ELS ANTAGONISTES β -ADRENÈRGICS

Els blocadors d'adrenoreceptors β són fàrmacs que bloquegen la unió de la norepinefrina i l'epinefrina als receptors beta-adrenèrgics, i els compostos on rau l'interès d'aquest treball. El 1962, James W. Black va desenvolupar per primera vegada els primers blocadors d'adrenoreceptors β clínicament importants: el propranolol i el pronetalol. Aquesta troballa va revolucionar la gestió mèdica de l'angina de pit, i va ser galardonada, posteriorment, amb el Premi Nobel l'any 1988. Així doncs, la creació de Black és considerada per molts com una de les contribucions més importants a la medicina clínica i la farmacologia del segle XX.

Tot i anomenar-se blocadors d'adrenoreceptors β , la seva activitat pot arribar a ser més extensa. Alguns bloquegen l'activació de tots els tipus de receptors β -adrenèrgics, d'altres també bloquegen altres tipus de receptors, com els alfa, i n'hi ha d'altres que són selectius per a un dels tres tipus coneguts de receptors beta. Els receptors β_1 -adrenèrgics se situen principalment en el cor i en els ronyons. Els receptors β_2 -adrenèrgics es troben en els pulmons, el tracte gastrointestinal, el fetge, l'úter, el múscul llis vascular i el múscul esquelètic. Per últim, els receptors β_3 -adrenèrgics estan localitzats a les cèl·lules de greix i la bufeta, per això s'utilitzen fàrmacs per aquest receptor contra la incontinència^{4,5}

3.3.1 CLASSIFICACIÓ

Els primers anys després de que es desenvolupessin els primers blocadors d'adrenoreceptors β , aquests no eren selectius, és a dir, bloquejaven tant el receptor β_1 com el β_2 . No va ser fins uns anys després quan es van començar a desenvolupar fàrmacs selectius. Actualment, podem classificar-los en blocadors d'adrenoreceptors β selectius i blocadors d'adrenoreceptors β no



selectius. La següent taula resumeix la classificació d'alguns dels blocadors d'adrenoreceptors β més significatius^{5,6}:

Tipus	Antagonistes β -adrenèrgics
No selectiu (β_1 i β_2)	Propranolol
	Bucindolol Activitat α_1 -blocant
	Timolol
	Pindolol Efecte simpatomimètic intrínsec
	Nadolol
	Sotalol
	Alprenolol
	Clembuterol
	Carvedilol Activitat α_1 -blocant
	Carteolol
	Labetalol Activitat α_1 -blocant
	Oxoprenolol Efecte simpatomimètic intrínsec
	Penbutolol Efecte simpatomimètic intrínsec
Selectiu de β_1	Atenolol
	Bisoprolol
	Metoprolol
	Acebutolol Efecte simpatomimètic intrínsec
	Esmolol
	Bexalolol
	Betaxolol
	Celiprolol Efecte simpatomimètic intrínsec
	Nebivolol
Selectiu de β_2	ICI 118551
	Butamina

Taula 2. Tipus d'antagonistes i classificació. (Taula de font pròpia)

L'efecte simpatomimètic intrínsec és una característica d'alguns blocadors d'adrenoreceptors β que poden mostrar tant agonisme com antagonisme en un receptor beta determinat, depenent de la concentració de l'agent i la concentració de l'agent antagonitzat (generalment un compost endògen, com la noradrenalina). Alguns d'aquests beta blocants són l'oxprenolol, el pindolol, el penbutolol, el labetalol o acebutolol.

D'altra banda, alguns blocadors d'adrenoreceptors β , com són el labetalol i el carvedilol, presenten un antagonisme no selectiu de tots tres receptors.

Pel que fa als blocadors d'adrenoreceptors β , molts són acceptats per les agències estatals i internacionals com a tractament per a diverses malalties i són utilitzats actualment en medicina. Aquests fàrmacs (i el seu nom comercial) són⁸:



- Acebutolol (Sectral)
- Atenolol (Tenormin)
- Betaxolol (Kerlone, Betoptic S)
- Bisoprolol fumarate (Zebeta)
- Carteolol (Cartrol)
- Carvedilol (Coreg)
- Esmolol (Brevibloc)
- Labetalol (Trandate)
- Metoprolol (Lopressor, Toprol XL)
- Nadolol (Corgard)
- Nebivolol (Bystolic)
- Penbutolol (Levatol)
- Pindolol (Visken)
- Propranolol (Hemangeol, Inderal LA, Inderal XL, InnoPran XL)
- Sotalol (Betapace, Sorine)
- Timolol (Timoptic, Betimol, Istalol)

3.3.2 LIPOSOLUBILITAT I VIDA MITJANA

Els beta blocants lipídics, com són el labetalol, el metoprolol, el pindolol i el propranolol, depenen del metabolisme hepàtic, mentre que els beta blocants solubles en aigua, en aquest cas l'atenolol, són metabolitzats pel ronyó. La vida mitjana de la majoria de beta-bloquejadors és relativament curta, i aquells que són metabolitzats pel ronyó tendeixen a tenir una vida mitjana major al plasma.⁵ Aquests fets s'han de tenir en compte ja que alguns d'aquests fàrmacs es poden administrar sistèmicament i tenen la capacitat d'arribar a les ferides que es troben en curació sent una alternativa a l'aplicació directe per via tòpica. També dependent de la liposolubilitat tindran una capacitat major o menor de penetració en el teixit.

Antagonistes β-adrenèrgics	Solubilitat lipídica	Absorció (%)	Vida mitjana al plasma-t₂ (h)
Propranolol	Alta	<90	3-5
Nadolol	Baixa	30	20-24
Pindolol	Baixa	>95	3-4
Timolol	Baixa-moderada	90	4
Atenolol	Baixa	90	6-7



Metoprolol	Moderada	100	3-7
Carvedilol	Moderada	>90	7-10
Labetalol	Baixa	>90	3-4
Betaxolol	Moderada	>90	15
Celiprolol	Baixa	74	5

Taula 3. Alguns dels antagonistes més coneguts, amb la solubilitat, el percentatge d'absorció i la vida mitjana al plasma corresponents (Taula de font pròpia).

3.3.3 INDICACIONS EN DERMATOLOGIA

Al llarg dels anys, els blocadors d'adrenoreceptors β han estat indicats per al tractament de diverses malalties dermatològiques. Alguns dels exemples més rellevants són:

- **Hemangiomes infantils:** Els hemangiomes infantils són tumors vasculars benignes produïts per la proliferació de cèl·lules endotelials de vasos sanguinis.¹⁰ El primer cop que es van utilitzar blocadors d'adrenoreceptors β pel tractament de l'hemangioma infantil va ser l'any 2008, quan es va trobar que, després del tractament amb propranolol a causa de problemes cardíacs a dos nens amb hemangioma, aquests van tenir una millora visible dels seus hemangiomes greus.¹¹ Des de llavors, s'han publicat molts estudis que demostren l'eficàcia i la seguretat del propranolol per a hemangiomes, i actualment és un camp de recerca molt actiu.



Figura 2. Imatge d'un hemangioma infantil a la panxa⁶⁰



- **Granulomes piogènics:** Els granulomes piogènics són tumors benignes vasculars. Hi ha diverses opcions de tractament que inclouen l'eliminació quirúrgica, la cauterització o el làser; no obstant això, aquests tractaments estan associat amb dolor, cicatrius i efectes secundaris locals.¹² S'ha trobat que els blocadors d'adrenoreceptors β orals i tòpics són un tractament alternatiu eficaç i preferible per al tractament d'aquesta malaltia.⁵



Figura 3. Imatge d'un granuloma piogènic a la cella⁶¹

- **Rosàcia:** La rosàcia és una malaltia inflamatòria crònica que afecta normalment a la pell de la cara. Es caracteritza per un envermellament freqüent, eritema persistent, i telangiectasia, intercalades amb episodis d'inflamació durant els quals les pàpules i les pústules són evidents.⁵ Els blocadors d'adrenoreceptors β han semblat ser eficaços en casos aïllats, però no hi ha pautes basades en l'evidència sobre el seu ús en aquesta malaltia.¹⁵



Figura 4. Imatge de rosàcia al nas i galtes⁶²

- **Hiperplàsia angiolfoidea amb eosinofília:** La hiperplàsia angiolfoidea amb eosinofília és una malaltia poc freqüent i idiopàtica que es manifesta en forma de pàpules vermelles o marrons dèrmiques o subcutànies, més freqüentment al cap i el coll. Diversos estudis han demostrat que un tractament molt prometedori per a aquesta malaltia és el propranolol oral¹⁶ i el timolol tòpic.¹⁷



Figura 5. Imatge de nòduls erimatosos de hiperplasia angilofòidea amb eosinofília al cuir cabellut⁶³



- **Melanoma maligne:** El melanoma és un tumor maligne derivat de melanòcits epidèrmics i pot produir-se en qualsevol teixit que contingui aquestes cèl·lules, inclosos llocs no cutanis, com mucoses o el sistema nerviós central.¹⁸ Alguns estudis han suggerit un paper preventiu i protector dels blocadors d'adrenoreceptors β pel que fa al melanoma^{19, 20, 21}.



Figura 6. Imatge de melanoma maligne⁶⁴

3.3.4 ELS BLOCADORS D'ADRENORECEPTORS β A LA CURACIÓ DE FERIDES

Els blocadors d'adrenoreceptors β han demostrat resultats prometedors en la curació de ferides. Els diversos mecanismes que són modificats gràcies a la unió dels blocadors d'adrenoreceptors β als receptors de les cèl·lules dèrmiques han suposat una gran millora en situacions en què la ferida és crònica. Tot i això, hi ha molta contradicció en aquest àmbit, alguns dels articles defensen l'ús dels blocadors d'adrenoreceptors β per a la curació de ferides, mentre que n'hi ha d'altres que afirmen que aquests fàrmacs perjudiquen i endarrereixen el tancament de la ferida. En aquest informe, es farà una revisió dels articles que tracten la relació dels blocadors d'adrenoreceptors β amb la curació de les ferides per tal de poder fer una valoració global. D'altra banda, s'observaran els efectes de diferents antagonistes β -AR en comparació amb un agonista β -AR en el tancament d'una ferida.

3.3.5 EFECTES SECUNDARIS CUTANIS I SISTÈMICS

Tot i que els blocadors d'adrenoreceptors β són molt efectius en algunes malalties dermatològiques importants, també hi ha certes reaccions cutànies i no cutànies adverses associades amb el seu ús. Un exemple molt evidenciat és que els blocadors d'adrenoreceptors β es consideren un factor important en agudització de la psoriasi.²² El mecanisme pel qual els blocadors d'adrenoreceptors β causen aquesta exacerbació de la psoriasi es relaciona amb el bloqueig dels mecanismes que produeixen un augment del segon missatger AMPc, el que provoca concentracions reduïdes de calci intracel·lular, causant una proliferació accelerada de queratinòcits i leucòcits polimorfonuclears, els quals poden jugar un paper en l'empitjorament de la psoriasi.²³

Altres reaccions cutànies adverses i efectes secundaris sistèmics es resumeixen a les taules següents:



Òrgan, Sistema, Teixit	Efectes adversos
Cardiovascular	Bradicàrdia
	Insuficiència cardíaca
	Disminució de la conducció atrioventricular
	Intensificació de bloqueig atrioventricular existent
	Hipotensió postural
	Mans i peus freds
	Empitjorament de la malaltia vascular perifèrica
Pulmonar	Empitjorament de la malaltia bronqui-pulmonar obstructiva crònica
	Exacerbació de l'asma
Neurològic	Fatiga
	Trastorns de la son
	Depressió
	Hipotonia
Gastrointestinal	Nàusees, Vòmits, diarrea...
	Dolor d'estómac
Ocular	No freqüent: Ulls secs, trastorns visuals
Hematològic	No freqüent: Trombocitopènia
Metabòlic	Molt poc freqüent: hipoglucèmia en pacients de risc
	Nivells reduïts de HDL, colesterol i nivells elevats de triglicèrids.

Taula 4. Efectes adversos dels blocadors d'adrenoreceptors β classificats segons el sistema, teixit o òrgan afectat (Taula de Font pròpia)

Efecte advers	Beta-blocant
Lupus eritematós induït	Atenolol, acebutolol, labetalol, pindolol, oxprenolol, timolol
Reaccions liquenoides	Acebutolol, labetalol, pindolol, oxprenolol, propranolol
Reacció pseudolinfomatosa	Atenolol
Vasculitis	Atenolol, sotalol
Dermatitis periocular	Atenolol, metoprolol
Malaltia de La Peyronie	Propranolol, metoprolol, labetalol
Alopècia	Propranolol, timolol
Síndrome oculo-cutània	Oxprenolol
Eritema multiforme	Propranolol
Deformitat de la unglà de Pincer	Acebutolol, metoprolol

Taula 5. Efectes adversos cutanis dels blocadors d'adrenoreceptors β i malalties associades (Taula de font pròpia)



3.4 LA PELL I EL SEU PROCÉS DE CURACIÓ

La funció principal de la pell és servir de barrera protectora contra el medi que ens envolta. La pèrdua de la integritat de la pell com a conseqüència d'una lesió o d'una malaltia pot provocar conseqüències molt greus, i en alguns casos fins i tot la mort. La cicatrització de la pell comença immediatament després de la lesió i consta de tres fases principals: la inflamació, la proliferació i la maduració.²⁴

- Inflamació: una lesió en la barrera epidèrmica provoca que els queratinòcits alliberin interleucina-1 i factor de necrosi tumoral- α , els quals alerten a les cèl·lules del voltant. Les plaquetes també segreguen factors de creixement que afavoreixen el reclutament de leucòcits inflamatoris al lloc de la lesió. Els neutròfils eliminen els bacteris contaminants mentre que els macròfags inicien el desenvolupament del teixit de granulació i alliberen una varietat de citocines pro-inflamatòries (IL-1 i IL-6) i factors de creixement (factor de creixement del fibroblast, EGF, TGF- β i PDGF).
- Re-epitelització: passades unes hores després de la lesió, l'alliberament d'EGF, TGF- α i FGF estimulen la migració i la proliferació de cèl·lules epitelials, donant com a resultat l'inici de la re-epitelització. Aquest procés es basa en la migració dels queratinòcits per sobre de la matriu extracel·lular provisional. Després del tancament complet de la ferida, els queratinòcits experimenten estratificació i diferenciació per restaurar la barrera.
- Formació de teixit de granulació i neovascularització: 4 dies després de la lesió, un gran nombre de nous capil·lars donen lloc al nou estroma. Els macròfags, els fibroblasts i les cèl·lules endotelials es mouen al llit de la ferida, i els macròfags segreguen el factor de creixement endotelial vascular i el FGF, promovent l'angiogènesi. Sota la guia de TGF- β i PDGF, els fibroblasts es van convertint fenotípicament en miofibroblasts, amb una actina muscular llisa. Els miofibroblasts s'alineen al llarg de les vores de l'ECM.
- Remodelació del teixit: Un marc de fibres de col·lagen i elastina reemplaça el teixit de granulació. El producte final d'aquest procés és la cicatriu. La degradació del col·lagen en la ferida està regulada per diverses metal·loproteïnases matricials segregades per macròfags, cèl·lules epidèrmiques i cèl·lules endotelials, així com fibroblasts.

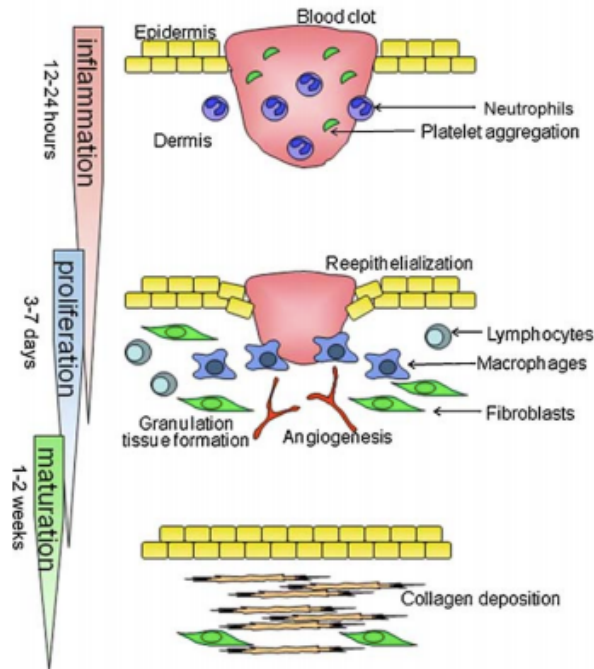


Figura 7. Esquema de les fases de curació de la pell²⁴

3.5 TIPUS DE FERIDA

El TR2Lab és un grup d'investigació que treballa, des de la cura del pacient, utilitzant el model d'úlceres cutànies cròniques per estudiar la resposta als tractaments que promouen la regeneració tissular. Donat l'interès del grup en la curació de ferides cròniques, en aquest treball m'he centrat en analitzar el progrés de ferides cròniques, agrupant-les en diferents tipus de ferida, ja que el procés de curació entre ferides de diferents etiologies és molt diferent i he cregut que l'efecte dels blocadors d'adrenoreceptors β en aquest tipus de lesions pot variar segons la tipologia d'aquestes. Així doncs, el treball agrupa les ferides en quatre classes: úlceres en persones diabètiques, cremades, úlceres per pressió i una agrupació d'altres ferides cròniques. A continuació, es fa una breu introducció de cadascun dels tipus esmentats:

Úlceres en persones diabètiques

La diabetis mellitus afecta aproximadament a 170 milions de persones a tot el món, i es preveu que a l'any 2030 el nombre de diabètics es duplicarà. La diabetis afecta la cicatrització de les ferides, resultant en lesions cròniques i úlceres, com són les úlceres diabètiques al peu (DFU). Les DFU, una de les principals causes d'amputació en diabètics, afecten el 15% de les persones amb aquesta malaltia. Una sèrie de mecanismes múltiples, inclosa la disminució de les respostes del factor de creixement i de la cèl·lula, condueixen a disminuir el flux sanguini perifèric, amb la conseqüent disminució de l'angiogènesi local, contribuint a la manca de curació d'aquestes ferides.²⁵ Per tant, cal explorar noves formes de tractar les DFU.



Lesions per cremada

Una cremada greu es caracteritza per una sobre-estimulació d'una resposta metabòlica sistèmica mitjançant l'augment dels nivells d'hormones de l'estrès com són, per exemple, les catecolamines i els glucocorticoides. Aquest procés consta de dues fases principals: primer, té lloc la fase inicial de "reflux", que es caracteritza per una disminució del cabal cardíac i la taxa metabòlica. Posteriorment, la fase de "flux" o fase hipermalúbrica, es caracteritza per una circulació hiperdinàmica i taxes metabòliques elevades.^{26,27} Les catecolamines endògenes són mediadors primaris de la resposta hipermalúbrica en cremades. L'augment de la seva concentració estimula la lipòlisi i el catabolisme de proteïnes musculars i augmenta la freqüència cardíaca. L'excés de catecolamines pot causar cardiomiopatia i necrosi focal de miocardi.^{28,29} Les cremades que cobreixen aproximadament el 10% de la superfície total del cos són considerades lesions greus i estimulen una resposta inflamatòria sistèmica que causa complicacions sistèmiques en els pacients.

Úlceres relacionades amb la dependència

Una úlcera relacionada amb la dependència (o úlceres per pressió) és una àrea de necrosi a la pell que sol presentar-se sobre una prominència òssia com a conseqüència de la compressió de teixits tous contra una superfície dura durant un temps suficientment llarg per induir isquèmia local. Les úlceres per pressió es desenvolupen amb més freqüència en individus que no es mouen, com els que es troben postrats en un llit o depenen d'una cadira de rodes. La taxa d'úlceres per pressió és alta; la prevalença en els hospitals europeus al 2013 oscil·lava entre el 8,3% i el 23%.³⁰ Tot i que l'etiologia de les úlceres per pressió és multifactorial i encara no està clar, la lesió induïda per isquèmia-reperfusió (IR) pot ser un factor en la formació d'aquestes lesions cròniques.³¹

Altres ferides cròniques

En aquest apartat s'inclouen les ferides causades per altres malalties dermatològiques, com és el càncer, o altres ferides recalcitrants. La cicatrització cutània és un procés biològic complex i ben ordenat i controlat que requereix la migració coordinada i la proliferació de queratinòcits i fibroblasts, així com altres tipus de cèl·lules, al llit de la ferida. La ferida a l'epidermis implica que les cèl·lules epidèrmiques i dèrmiques hagin de generar citocines, factors de creixement i proteases, i que sintetitzin els components de la matriu extracel·lular, tot això regulant els processos de migració i proliferació de queratinòcits, essencials per a la re-epitelització. Després de la lesió, les cèl·lules migren directament cap al centre del llit de la ferida per iniciar la reparació i restaurar la integritat epitelial. Tot i això, a



les ferides cròniques i a les recalcitrants els costa molt seguir les etapes normals curació de la ferida, i a més a més, la gestió de les ferides cròniques pot ser costosa i requereix molt de temps. Investigacions recents han suggerit que els receptors β -adrenèrgics poden ser uns innovadors targets per tal augmentar el procés de curació d'aquest tipus de ferida.

4. RESULTATS BIBLIOGRÀFICS

Aquest apartat del treball està basat en la recerca bibliogràfica d'evidències dels efectes dels fàrmacs blocadors d'adrenoreceptors β tant a nivell molecular com a nivell fisiològic i clínic, el que permetrà determinar quin és el paper i el mecanisme d'aquests productes en la curació de ferides. La revisió bibliogràfica permetrà relacionar conceptes i establir les bases per a la creació de nou coneixement. En les següents taules, un resum de les dades dels diferents articles que he tractat agrupats segons el tipus d'experiment. A les taules, els articles estan numerats i en faré referència utilitzant aquesta numeració en els següents apartats.



Article/País	Objectiu	Tipus de cèl·lules	Tipus de fàrmac	Resultats	
Denda M, 2003 / Japó (Article 2)	Efecte de l'agonista/antagonista en la dinàmica del calci intracel·lular en queratinòcits humans.	Queratinòcits humans en cultiu	Hidroclorur de proclaterol sol, amb ICI-118551, verapamil, o amb nifedipin.	El clorhidrat de proclaterol augmenta calci intracel·lular. Pretractament amb ICI-118551, verapamil, nifedipino bloqueja augment, i nivells de calci intracel·lular disminueixen pels tractaments amb antagonista o bloquejador canal calci. Existència d'altres lligands de receptors adrenèrgics endògens.	
Pullar CE, 2012 / UK (Article 3)	L'antagonista del b2AR promou l'angiogènesi de la ferida	Determinar si un antagonista de b2AR alterava la migració de cèl·lules endotelials	Cèl·lules endotelials micovasculares dèrmiques humanes	ICI 118551	Cap efecte sobre la taxa de migració.
		Determinar si l'antagonista de b2AR altera el creixement cel·lular de la vora tallada de l'aorta de la rata	Seccions aòrtiques de rata		L'antagonista augmenta creixement aòrtic 66% en 5 dies.
		Determinar si l'antagonista augmenta la secreció de VEGF	Cèl·lules endotelials micovasculares dèrmiques humanes, queratinòcits humans, fibroblasts dèrmics humans, neutròfils i macròfags		VEGF no es detecta en SN de cèl·lules endotelials micovasculares dèrmiques humanes o fibroblasts dèrmics humans. VEGF es detecta en SN de neutròfils i macròfags, però el tractament amb antagonista no té cap efecte. Antagonistes augmenten VEGF en queratinòcits humans en 24 hores en un 23%.
	Determinar l'efecte de l'antagonista b2AR en la migració de fibroblast dèrmic humà	Fibroblast dèrmic humà i fibroblast dèrmic murí	ICI 118551	L'antagonista augmenta velocitat de migració del fibroblast dèrmic humà en un 27%, i un 49% la velocitat de migració dels fibroblasts dèrmics b2AR+/+ murins. La velocitat de fibroblasts dèrmics murins b2AR-/- augmenta 46% respecte b2AR+/+. Antagonista no té efectes en la velocitat de migració a b2AR-/. Antagonista augmenta fosforilació de quinases regulades per senyals extracel·lulars en b2AR+/+ en un 90%.	
	L'antagonista b2AR promou la migració del queratinòcit	Queratinòcits humans Queratinòcits murins	ICI 118551	Antagonista augmenta la migració de queratinòcits un 12% i millora migració de queratinòcits murins un 28%. Els queratinòcits murins B2AR-/- migren 16% més ràpid que B2AR+/+.	
Pullar CE, 2006 / USA (Article 16)	Determinar l'efecte dels antagonistes de B-AR en la migració de queratinòcits	Queratinòcits humans	ICI 118,551	Antagonista duplica la taxa de cicatrització de ferides. Les ferides no tractades curen 32±8,5% a 16 h, les ferides amb antagonista curen 62±2% a 16h.	
	Mesurar l'efecte dels antagonistes de B-AR sobre la motilitat dels queratinòcits	Queratinòcits humans	Timolol	L'antagonista augmenta significativament la taxa de migració del queratinòcit en un 30%.	
	L'antagonista de B-AR augmenta la fosforilació d'ERK en pocs minuts en queratinòcits	Queratinòcits humans	No ho especifica o ICI (Timolol 118,551)	Tractament antagonista augmenta fosforilació d'ERK x5 en 5 min, i es manté elevada 60 min, quan torna gradualment a nivells control.	
	Els antagonistes de B-AR milloren la direccionalitat de la migració mediada pel camp elèctric del queratinòcit	Queratinòcits humans	No ho especifica o ICI (Timolol 118,551)	El tractament antagonista augmenta 26% la direccionalitat de la migració i la taxa de migració 28%.	
	Els antagonistes de B-AR preserven l'arquitectura citoesquelètica promigratòria del queratinòcit	Queratinòcits humans	No ho especifica o ICI (Timolol 118,551)	La morfologia cel·lular, el citoesquelet d'actina i el nombre, mida i distribució d'adhesions focals són semblants als queratinòcits no tractats.	
	Els antagonistes de B-AR no tenen efectes sobre la proliferació de queratinòcits	Queratinòcits humans	No ho especifica o ICI (Timolol 118,551)	Els antagonistes de B-AR semblen no tenir efectes en la proliferació de queratinòcits in vitro	
	L'efecte dels antagonistes de B-AR sobre la re-epitelització de pell humana en un model ex vivo	Biòpsies de pell humana	No ho especifica o ICI (Timolol 118,551)	Antagonista augmenta la re-epitelització un 40, 63 i 72% en 3, 4 i 5 dies, respectivament. El bloqueig de 2-AR accelera la re-epitelització de ferides en pell humana.	
	Queratinòcits expressen enzims necessaris per convertir L-tirosina en epinefrina, localitzada als grànuls citoplasmàtics i sintetitza l'epinefrina endogenament	Queratinòcits humans	No ho especifica o ICI (Timolol 118,551)	Múltiples grànuls circulars amb TH i PNMT distribuïts pel citoplasma dels queratinòcits. 303, 468 i 888 pg d'epinefrina/mg de proteïna en extractes de queratinòcits de tres varietats de queratinòcits diferents. L'epinefrina és sintetitzada endogenament per queratinòcits.	
Le Provost GS, 2015 (Article 4)	Efectes de b2ARag en la diferenciació del fibroblast dèrmic humà i la funció contràctil via cAMP	Fibroblasts humans dèrmics	Salbutamol/Formoterol (10uM)	b2ARag redueix la diferenciació del fibroblast dèrmic humà i la funció contràctil via cAMP	
	Efectes de b2ARag en les adherències focals madures en la perifèria HDF i l'expressió gènica profibròtica	Fibroblasts humans dèrmics	Salbutamol/Formoterol (10 uM)	β2ARag redueix el nombre d'adherències focals madures en la perifèria HDF i l'expressió gènica profibròtica	

Taula 6. Taula-resum de les dades extretes dels experiments *in vitro* dels articles tractats. (Taula de font pròpia)



Article/País	Objectius	Espècie, nombre	Patologia/Tipus de ferida/ Mida ferida i situació. Tipus	Beta-blocant	Troballes
Romana-Souza B, 2009/Brasil (Article 1)	Avaluar macro-microscòpicament efectes del propranolol en la cicatrització en rates diabètiques	Rates mascles Control: 5 Propranolol: 5	Diabetis induïda per streptozotocina. Ferida excisional d'1 cm ² a nivell del múscul panniculus carnosus	C: aigua P: clorhidrat de propranolol, 50 mg / kg, en aigua. Administració 1 dia abans de ferir.	Administració de propranolol millora la cicatrització cutània de les rates diabètiques hiper glucèmiques, reduint tant la resposta inflamatòria local com els nivells MMP-9, millorant la contracció de les ferides, el desenvolupament del teixit de granulació, la deposició de col·lagen i l'angiogènesi i estímulant la síntesi de NO.
Denda M, 2003/Japó (Article 2)	Receptors adrenèrgics afecten l'homeòstasi de la pell. Efectes dels ago/antagonistes en la curació. Efecte de verapamil i nifedipin + agonista.	Ratolins sense pèl mascles	100 ml solució aquosa + reactiu (1mM) o aigua (control) a l'àrea tractada (2-3 cm ²). 100 ml solució aquosa + reactiu (1mM); aigua en control.	Xamoterol (agonista), Bexaxolol (antagonista), Alprenolol (agonista), Procaterol (agonista), Clenbuterol (antagonista), ICI118.551 (antagonista)	(b1) Ni xamoterol ni betaxolol afecten la taxa de recuperació. Procaterol i alprenolol retrassen reparació, ICI-118551 bloqueja el retard. ICI-118551 i clenbuterol acceleren la recuperació. 24 h després, no s'observa canvis entre els grups. Verapamil i nifedipin bloquegen el retard de la curació induïda per procaterol. Associació del canal de calci amb l'alteració de la velocitat de reparació induïda per agonista. L'antagonista redueix la resposta hiperproliferativa epidèrmica, l'agonista la augmenta, però el verapamil bloqueja l'augment.
Pullar CE, 2012/UK (Article 3)	L'antagonista del b2AR promou l'angiogènesi de la ferida	Ous de pollastre fecundats	Tractament membranes chorioalantoiques amb vehicle/vehicle + antagonista 100uM, del dia 5 a 9. Foto cada 24h.	ICI 118551	El tractament antagonista de B2AR va augmentar l'angiogènesi en un 48%.
	Determinar si l'antagonista b2AR podria modular l'angiogènesi de la ferida	Ratolins femella entre les 8 i les 12 setmanes d'edat	2 ferides 6mm dorsal de ratolins b2AR+/+ i b2AR-/- Seccions 7mm tractades amb parafina després de 5 dies, i immunomarcades amb anti-CD31.	Tractament tòpic diari de 100uL hidrogel sol o hidrogel + ICI 118551 al 0,1% 1mM	El tractament amb antagonista de B2AR va augmentar l'angiogènesi en un 26%. La quantitat d'angiogènesi en ferides b2AR-/- era igual a la observada en el control de ferides b2AR +/+, mentre que el tractament amb antagonista de b2AR en ferides b2AR-/- no tenia cap efecte.
	L'antagonista b2AR promou la funció de fibroblast dèrmic humà	Ratolins femella entre les 8 i les 12 setmanes d'edat	2 ferides de 6 mm al dorsal de ratolins b2AR+/+ i b2AR-/- Immunomarcatge de seccions de 7mm de ferida al dia 5, amb anti-a-smooth muscle actin i amb anti-col·lagen III, i tenyides amb picrosiri vermell per avaluar la deposició de col·lagen total a la neo-dermis.	Tractament tòpic diari de 100uL hidrogel sol o hidrogel + ICI 118551 al 0,1% 1mM	24 h: la contracció es va accelerar 4 vegades en ferides b2AR+/+ tractades amb antagonista i 5 vegades en les ferides control b2AR -/-. 48h: La contracció es va millorar per 2 vegades en ferides b2AR+/+ tractades amb antagonista i gairebé 3 vegades en les ferides control b2AR -/-. 3 dies: la contracció es va incrementar un 19% en ferides b2AR+/+ tractades amb antagonista i un 40% en les ferides control b2AR -/-. 4 dies: la contracció de les dues ferides es van produir al mateix ritme que el control b2AR +/+. Ferides b2AR-/- tractades amb antagonista mostren la mateixa taxa de contracció que la ferida control b2AR-/-. L'àrea de tinció de SMA es va incrementar en un 60% en ferides tractades amb antagonista en ratolins b2AR+/+. Àrea similar entre el control b2AR-/- i b2AR+/+. El tractament amb antagonista va augmentar l'àrea de tinció de collagen III un 20% en ferides b2AR +/+, mentre que les ferides de control b2AR-/- i b2AR+/+ tenen àrees similars. Amb el picrosiri vermell veiem que el tractament amb antagonista va augmentar l'àrea de tinció de collagen a la neo-dermis un 29% en ferides b2AR +/+, mentre que les ferides de control b2AR-/- i b2AR+/+ tenen àrees similars.
	L'antagonista b2AR no té efectes sobre la inflamació de la ferida El tractament amb antagonistes de b2AR altera la inflamació de una ferida	Peix zebra larvae (72 hores després de la fecundació) Ratolins femella entre les 8 i les 12 setmanes d'edat	Larves ferides (aleta caudal), no tractades o tractades amb antagonista i fotografia amb l'amplificació de senyal de fluorescència-tiramina Seccions de 7mm de ferida immunomarcades després de 3 dies, amb anticòs per a cèl·lules	500mM ICI 118551 durant 6 hores Tractament tòpic diari de 100uL hidrogel sol o hidrogel + ICI 118551 al 0,1% 1mM	Quan les larves de peix zebra estaven immerses en aigua que contenia l'antagonista, no hi va haver cap efecte sobre l'orientació de neutròfils a la ferida de la aleta caudal. El tractament amb antagonista i l'absència del receptor no van tenir efecte en el nombre de cèl·lules polimorfonuclears o macròfags reclutats al lloc de la ferida.



			polimorfonuclears i marcadors de macròfags		
	L'antagonista de b2AR promou la re-epitelització	Ratolins femella entre les 8 i les 12 setmanes d'edat	Seccions de 7mm de ferida tenyides als 3 i 5 dies (hematoxicilina-eosina). Distància lineal coberta per un nou epiteli.	Tractament tòpic diari de 100uL hidrogel sol o hidrogel + ICI 118551 al 0,1% 1mM	El tractament amb antagonista de b2AR va augmentar la re-epitelització en la ferida b2AR+/+ en un 60 i un 56% en 3 i 5 dies després de la ferida, respectivament. A més, la re-epitelització de les ferides b2AR-/- va augmentar un 64% 5 dies després de ferir.
Le Provost GS, 2015/UK (Article 4)	b2ARag redueix inflamació en peix zebra i l'angiogènesi embrionària en pollet. b2ARag redueix l'àrea de la cicatriu i millora la seva aparició en porcs Red Duroc. Immunohistoquímica revela reducció dels mecanismes profibròtics que sustenten la reducció de la cicatriu mediada per β2ARag	Peix zebra adult i ous de pollastre fecundats 10 porcs Red Duroc femella de 3 mesos d'edat (30-35 kg)	Ferida a la cua de peix zebra. Assaig de membrana chorioalantoica (CAM) al pollet. 20 ferides de 22 cm2 a l'esquena dels porcs.	B2ARag (no especifica quin) 500 ml de Granugel diluïts 2:1 en aigua estèril, sol (controls) o contenint salbutamol sulfat 5mM (1,2 mg/ml) a cada ferida després de la cirurgia i cada dia després.	b2ARag va reduir el reclutament de neutròfils un 60% a les 6 hores de la ferida a la cua del peix. b2ARag va reduir l'angiogènesi a l'assaig CAM en un 29%. b2ARag redueix la cicatriu un 34, 38 i 47%, 28, 42 i 56 dies després de ferir, respectivament, i redueix l'àrea de cicatrització un 50% en les àrees amb més tensió. b2ARag millora la pigmentació (48%), color match (44%), brillantor (53%), llargada (34%), textura (22%), i flexibilitat (22%). L'efecte de β2ARag sobre l'angiogènesi i la infiltració de macròfags sembla correlacionat. L'increment de β2ARag en macròfags que expressen CD163, 14 dies després de la ferida, facilita l'augment d'angiogènesi.
Zheng Z, 2017/Xina (Article 5)	Investigar els efectes de la crema de propranolol en la cicatrització de ferides diabètiques	Cinquanta-sis ratolins femella diabètics de 8 setmanes	Dues ferides dèrmiques de 0.283 cm2 (0,6 cm de diàmetre) a tots dos costats del tronc.	Grup tractat: Crema de propranolol 10% Control: Crema de propranolol 0%. Crema: monoestearat de glicerol (8,5%), àcid esteàric (8,5%), alcohol estearilic (8,5%), parafina líquida (11,75%), glicerol (11,75%) i aigua destil·lada (50%).	Ferides en propranolol menors dies 2, 5, 7, 10, 14, 17 i 21. Taxa de re-epitelització en propranolol superior. Dia 21, les ferides propranolol curades, i cap de les control. El gruix del teixit de granulació i la regeneració dèrmica i epidèrmica en propranolol superior dies 5, 10 i 21. EGF en cèl·lules epitelials normals. VEGF en cèl·lules endotelials vasculars. Menys tinció per VEGF en propranolol. NG2 invariable a estructures neovasculares del ratolí. Àrees més extenses positives per EGF i NG2 en propranolol. MMP-9 en tot tipus de teixits i fluids corporals. EGF i NG2 incrementen i VEGF disminueix en propranolol dies 2, 5, 7, 10, 14, 17 i 21. MMP-9 major en propranolol dies 2, 5, 7 i 10, i menor dies 14, 17 i 21.
Assis de Brito TL, 2014/Brasil (Article 6)	Efecte del bloqueig dels β1/β2-AR en la cicatrització d'UP utilitzant un model muri.	120 ratolins mascle de 8-12 setmanes	La pell dorsal es va aixecar i es va col·locar entre un parell de discs d'imants. Aquest procés va crear una compressió superior a 50 mmHg entre els imants. Es van realitzar dos cicles IR en cada ratolí per iniciar la formació d'ulcera crònica.	Es van tractar 60 ratolins diàriament amb 25 mg/kg d'hidroclorur de propranolol dissolt en aigua, i 60 més van ser tractats amb el vehicle.	Longitud de llengua migratòria menor en grup propranolol (dies 3 i 7). Proliferació epitelial major en propranolol (dies 14 i 21). Re-epitelització més ràpida en control (dies 7 i 14). Propranolol presenta més dies per perdre la pell necròtica. Propranolol augmenta els neutròfils MPO positius els dies 7, 14 i 21. Nivells d'elastases de neutròfils milloren en el grup tractat al dia 3. Propranolol augmenta els macròfags F4/80 positius els dies 7 i 21. MCP-1 es redueix al grup propranolol el dia 3. MMP-12 es redueix al grup propranolol el dia 7, però augmenta el dia 14. TGF-β 1/2/3 es redueix al grup tractat el dia 3. Propranolol augmenta les cèl·lules del teixit connectiu apoptòtic i proliferant al dia 7. La densitat dels vasos sanguinis augmenta en el grup propranolol els dies 14 i 21. L'expressió de VEGF augmenta en el grup propranolol en comparació amb el grup de control al dia 14. Propranolol retarda el tancament de les ferides als dies 3, 7, 14 i 21. Propranolol redueix la densitat de miofibroblasts el dia 3, però augmenta als dies 7 i 14. Propranolol augmenta el gruix de la neoepidermis i el número de cèl·lula fibril·làstica tenascin-C positiu 21 dies després de ferir. Les fibres de col·lagen eren vermelloses, allargades i gruixudes i tenen forma paral·lela i perpendicular a la superfície en els control. En el grup tractat aquestes fibres són de color groc-vermellós, curtes i fines i es disposen paral·lelament a la superfície.
Romana-Souza B, 2006/Brasil (Article 7)	Efectes del bloqueig β1- i β2-AR en la cicatrització, avaluant la contracció de la ferida, infiltrat inflamatori, desenvolupament de teixit de granulació i	30 rates mascle adultes (200-250 g).	El dia 0, el dorsal de les rates va ser ferit (4 cm2)	C: (n = 15) només aigua filtrada P: (n = 15) clorhidrat de propranolol (50mg/kg) diàriament en aigua. propranolol va	L'estudi ha demostrat que l'administració de propranolol retarda la contracció i la re-epitelització de la ferida, augmenta la migració polimorfonuclear, augmenta la migració de mastòcits, augmenta la proliferació de cèl·lules epitelials i connectives, augmenta l'angiogènesi i disminueix la densitat de col·lagen i els nivells d'hidroxi-prolina. Per tant, el



	formació de neopidermis, per comprendre millor el paper dels AR en els canvis causats per la denervació simpàtica en la cicatrització.				començar 1 dia abans de ferir.	bloqueig de b1 i b2-AR està implicat en les alteracions causades per la denervació simpàtica en la cicatrització de ferides cutànies.
Romana-Souza B, 2008/Brasil (Article 8)	Efectes de l'administració d'una dosi baixa de propranolol sobre la cicatrització cutània de rates amb cremades.	10 rates femella adultes (170-220 g).	El dors es submergeix en aigua a 95°C, 20 s, i s'obté cremada de 3r grau que ocupa 10% de la superfície total del cos.	C: Aigua P: Clorhidrat de propranolol, 6 mg/kg en 50 ml d'aigua. L'administració va començar 1 setmana després de la cremada.	L'administració d'una dosi baixa de propranolol millora la cicatrització de cremades en rates, reduint la resposta inflamatòria local. Millora de la contracció de la ferida, re-epitelització, desenvolupament de teixit de granulació, deposició de col·lagen i angiogènesi. A més, pot tenir efectes beneficiosos reduint la resposta hiperalúbrica.	

Taula 7. Taula-resum de les dades extretes dels experiments *in vivo* dels articles tractats. (Taula de font pròpia)

Article	País	Nombre de pacients i gènere	Edat	Tipus de ferida	Mida ferida i situació	Blocant beta, dosi	Outcome positiva? En què es basen?	Efectes adversos	Altres
Ali A, 2015 (Article 9)	EUA	34 control (30h, 4d) 35 propranolol (29h, 6d)	Mitjana de 38 control i 41 propranolol	Cremades	59% cos cremat en control i 49% en propranolol.	Propranolol, mitjana de 3,3mg/kg/dia durant mitjana de 40 dies	SI. Freq cardíaca, temps de curació total.	NO	
Tang JC, 2012 (Article 10)	EUA	1 dona	43 anys	Ferida refractària	26 cm2 d'àrea i de 3,5 cm profunditat. Esquena.	3-4 gotes de timolol tòpic 0,5%/dia	SI. Epitelització total.	NO	
Braun LR, 2013 (Article 11)	EUA	5 pacients (4d, 1h)	70-80 anys (3 pacients no especifica)	Úlceres venoses cròniques, per pressió, refractària traumàtica.	Entre 1cm2 i 4,8cm2. Cames i peus.	Timolol tòpic 0.5% setmanalment, 1 gota cada 2cm	SI. Àrea de reducció i %.	NO	
Beroukhim K, 2014 (Article 12)	EUA	1 home	76 anys	Carcinoma de cèl·lules escamoses	10 x 11 cm i es veu l'os. Cuir cabellut frontal.	3-4 gotes de timolol tòpic 0,5% 2 vegades/dia	SI. Teixit de granulació, re-epitelització completa.	Dermatitis irritant lleu	Es baixa la dosi a 1 vegada al dia, i després 1 cada 3 dies donada la dermatitis presentada.
Vestita, Michelangelo & Bonamonte, 2016 (Article 13)	Italy	1 home	68 anys	Úlcera profunda	2x1 cm a la sola dreta	Tòpica 3 vegades/dia. 1% d'hidroclorur de propranolol.	SI. Curació completa.	NO	Es va triar propranolol en comptes de timolol per obtenir un perfil de seguretat excel·lent i una menor absorció sistèmica.
Lev-Tov H, 2013 (Article 14)	EUA	1 home	67 anys	Úlcera (pacient diabètic amb insuficiència venosa crònica)	1,7cm x 2,5 cm (4,25cm2) inicialment. Arriba fins als 9 cm2.	Timolol al 0.5%, 3-4 gotes aplicades tòpicament amb gel de cadèmer iodi cada dos dies, i Gel SilvaSorb en dies alterns.	SI. Curació completa.	NO	
Chiaverini C, 2016 (Article 15)	France	2 nens (no especifica gènere)	1 any	Ferides cròniques provocades per epidermolísi bullosa juntural	A les ungles i al plec del coll	2 i 3 gotes de timolol al 0.5% aplicades tòpicament cada dia dos cops al dia	SI. Curació del 100% i 80%	NO	Absorció sistèmica → només es poden tractar petites superfícies

Taula 8. Taula-resum de les dades extretes dels casos clínics i assajos amb humans dels articles tractats. (Taula de font pròpia)



4.1 Tractament de les úlceres de peu diabètic amb blocadors d'adrenoreceptors β

Treballs anteriors han demostrat que la diabetis redueix significativament la síntesi d'Òxid Nítric (NO), la qual cosa causa una proliferació de fibroblast i una deposició de col·lagen alterades, i una inflamació prolongada.^{32,33} A l'article 1³⁴, l'administració de propranolol, un β -blocant no selectiu, millora la cicatrització cutània en rates diabètiques hiperglucèmiques, reduint tant la resposta inflamatòria local com els nivells MMP-9, millorant la contracció de les ferides, el desenvolupament del teixit de granulació, la deposició de col·lagen i l'angiogènesi, gràcies a l'estimulació de la síntesi de NO. D'altra banda, l'article 5³⁵ també afirma que l'administració intralesional de crema al 1% de propranolol regula l'angiogènesi anormal en les ferides diabètiques.

La reconstrucció dèrmica es caracteritza per la formació del teixit de granulació, que inclou la proliferació cel·lular, la deposició de matriu extracel·lular, la contracció de la ferida i l'angiogènesi. Inicialment, els fibroblasts proliferen i posteriorment migren a l'àrea de la ferida, per després dipositar i organitzar la matriu extracel·lular.³⁶ A l'article 1³⁴ s'especula que el propranolol estimula la síntesi de NO mitjançant el seu efecte en els adrenoreceptors β_3 , el que provoca una millora en la proliferació cel·lular, la deposició de col·lagen i la contracció de la ferida, així com l'augment de la densitat dels vasos sanguinis i el nombre de mastòcits en ferides de rates diabètiques hiperglucèmiques quan es compara amb els controls. L'efecte beneficiós del NO estimulat pel propranolol sobre l'angiogènesi és perquè s'ha demostrat que NO augmenta la secreció de VEGF i TGF- β_1 , que estimulen la angiogènesi i la proliferació de queratinòcits^{33,37}. A més, l'aplicació tòpica de NO augmenta la quantitat de mastòcits, que poden estimular la formació de nous vasos sanguinis^{38,39,40}. Per tant, suggereixen que el tractament amb propranolol pot resultar en una major angiogènesi i mobilització de mastòcits a través dels seus efectes estimulants sobre la síntesi de NO que condueix a una formació millorada del teixit de granulació.

Gràcies a l'estimulació de la síntesi de NO, també es va observar una millora de la cicatrització cutània de les rates diabètiques hiperglucèmiques a causa de la reducció de la resposta inflamatòria local. En la ferida, la resposta inflamatòria ha de produir-se ràpidament per permetre el desenvolupament de fases subsegüents de cicatrització. El NO redueix l'infiltrat inflamatori en lesions cutànies³⁸, accelerant el desenvolupament de les fases posteriors de la cicatrització. Les altes concentracions de citocines inflamatòries estimulen la persistència d'un augment en els nivells de proteases (com el MMP-9) que destrueixen tant els factors de creixement com la matriu extracel·lular, cosa que provoca una disminució de la proliferació cel·lular i la contracció de les ferides^{41,42,43}. Per tal d'avaluar els nivells de proteasa a la zona de la ferida, a l'article 1 s'estudia l'activitat de la gelatinasa de la metaloproteïna-2 i -9 de la matriu. El nivell de MMP-9 actiu va ser un 27% menor en el grup tractat amb propranolol que en el grup control. Els nivells de MMP-2 eren similars



entre grups. Malgrat aquestes dades, hi ha articles que defensen que MMP-9, per exemple, pot degradar el col·lagen tipus I danyat i facilitar la migració de queratina i la re-epitelització en ferides diabètiques³⁵. De fet, després del tancament de la ferida, el teixit de granulació, que és ric en col·lagen de tipus III i vasos sanguinis, es reemplaça progressivament per una cicatriu col·lagenosa, que consisteix principalment en col·lagen de tipus I amb pocs vasos sanguinis. Aquesta canvi gradual dels components de la matriu extracel·lular està controlada principalment per metal·loproteïnases de matriu⁴⁵. A l'article 5³⁵ també van trobar que l'expressió de la proteïna MMP-9 va ser significativament més alta en el grup experimental que en el control durant les etapes inicials de curació de la ferida (dies 2, 5, 7 i 10). En la curació tardana (dies 14, 17 i 21), MMP-9 va augmentar en el grup control i va superar el nivell del grup experimental. Per tant, l'augment primerenc de MMP-9 pot explicar l'augment de la re-epitelització en la curació inicial de la ferida en el grup propranolol.

En l'article 5³⁵, les ferides del grup propranolol van tenir una àrea menor que les del grup control els dies 2, 5, 7, 10, 14, 17 i 21. I a l'article 1, l'àrea de la ferida va ser significativament menor en el grup tractat amb propranolol que en el grup de control 7 i 14 dies després de la ferida. De fet, 14 dies després de fer la ferida, les fibres de col·lagen eren principalment verdes, fragmentades i primes, i disposades paral·lelament al control. En canvi, en el grup tractat amb propranolol, les fibres eren grogues, espesses, fragmentades i primes, i disposades de manera similar a les de la pell normal. Així, les fibres de col·lagen eren més organitzades i denses en el grup tractat amb propranolol que en el grup de control. Per confirmar aquestes observacions histològiques, es van mesurar els nivells d'hidroxirolina (aminoàcid principalment present al col·lagen) a les lesions 14 dies després de la ferida. Els nivells d'hidroxirolina van ser 103% més grans en els tractats amb propranolol que en el grup control.

Per últim, els blocadors d'adrenoreceptors β s'han trobat molt efectius en la curació de ferides en pacients diabètics. Un home de 67 anys amb diabetis mellitus i insuficiència venosa crònica presentava una úlcera a la cama. El pacient havia rebut cures estàndards prèviament, però la ferida no havia avançat al llarg de la seva trajectòria curativa. El pacient va ser tractat amb timolol tòpic i, després de quatre setmanes, es va observar una lleu millora de la ferida. A partir d'aquell moment, la ferida va curar ràpidament fins a la re-epitelització total.⁴⁶

4.2 Tractament de ferides per cremades amb blocadors d'adrenoreceptors β

Estudis previs han demostrat que el propranolol, un bloquejador β no selectiu, té efectes sistèmics generalitzats positius a l'hora de curar una cremada. L'administració de propranolol en nens amb una greu cremada durant un any va millorar significativament la composició corporal, el catabolisme de



proteïnes musculars, la lipòlisi, la despesa energètica en repòs i la funció cardíaca, reduint les taxes de mortalitat.⁴⁷

A l'article 8⁴⁵, l'administració d'una dosi baixa de propranolol va millorar la cicatrització cutània de les cremades de rates, reduint la resposta inflamatòria local i millorant les fases posteriors de cicatrització. El nombre de cèl·lules inflamatòries va ser major en el grup control que en el grup tractat amb propranolol 63 dies després de la cremada. D'altra banda, el propranolol també va millorar la contracció de la ferida, la re-epitelització, desenvolupament del teixit de granulació, deposició de col·lagen i angiogènesi; estimulant així la reparació del teixit. L'àrea de les ferides va ser menor en el grup propranolol que en el grup control 21, 53 i 63 dies després de la cremada. També es va mesurar els nivells de MMP-2 i es va detectar que eren un 25% més petits en el grup control que en el grup tractat amb propranolol. En aquest estudi, els animals tractats amb propranolol van presentar un bastiment de col·lagen més madur i organitzat, una disminució de la densitat de vasos sanguinis i nivells elevats de MMP-2, el que indica que el tractament amb propranolol podria haver estimulat el desenvolupament d'un teixit de granulació col·laginós menys vascularitzat i més organitzat, mitjançant l'activació de MMP-2. De fet, 63 dies després de la cremada, les fibres de col·lagen eren de color vermell-groc, fragmentades, primes i disposades paral·lelament al grup control. No obstant això, en el grup tractat amb propranolol, aquestes fibres eren vermelloses, allargades, gruixudes i disposades paral·lelament a la superfície. Així, les fibres de col·lagen eren menys organitzades i denses en el grup de control que en el grup tractat amb propranolol. A més, els nivells d'hidroxi prolina eren 33% menors en el grup control que en el grup tractat amb propranolol. A més a més, l'administració d'una dosi baixa de propranolol també va millorar l'angiogènesi mitjançant l'estimulació de la síntesi de l'òxid nítric, el qual activa la producció del factor de creixement endotelial vascular, que es relaciona directament amb l'angiogènesi.

La utilitat dels antagonistes β en el tractament de les ferides es va demostrar inicialment amb la seva administració sistèmica per tractar cremades. Seixanta-nou pacients adults amb cremades que cobrien $\geq 30\%$ de la superfície total del cos van rebre cures estàndard amb o sense propranolol. L'administració de propranolol durant el període d'hospitalització va disminuir la pèrdua de sang durant els procediments d'empelt de la pell i va millorar notablement la cicatrització de les ferides en adults amb cremades severes.

4.3 Tractament de les úlceres per pressió amb blocadors d'adrenoreceptors β

Malgrat els bons resultats que s'obtenen en la curació de ferides d'altres etiologies, s'ha trobat que el bloqueig dels receptors beta adrenèrgics perjudica la cicatrització cutània en lesions del tipus isquèmia-reperfusió en ratolins, fent que el tancament de la ferida sigui més lent amb l'aplicació de propranolol. El fàrmac causa retard en la migració dels queratinòcits, en la re-epitelització, en



l'angiogènesi i en la pèrdua del teixit necròtic. La permanència prolongada del teixit necròtic induït pels blocadors d'adrenoreceptors β afecta a la resposta inflamatòria i a la reconstrucció dèrmica donant lloc a una cicatriu de mala qualitat.³¹

Durant la formació de la neo-epidermis, el gruix de la neo-epidermis augmenta i es redueix a poc a poc a les etapes finals de curació²⁴. El grup tractat amb propranolol va presentar una capa massa gruixuda de neo-epidermis al final de la curació del teixit. D'aquesta manera, el bloqueig de l'adrenoreceptor $\beta 1$ - / $\beta 2$ pot haver afectat el procés de formació de la neo-epidermis al final de la curació, retardant la restauració de la barrera cutània i aconseguint una cicatriu de menor qualitat. A més a més, en la cicatrització normal de la ferida, la tenascina regula les interaccions de la matriu cel·lular i estimula el tancament de la ferida, però desapareix poc després de la re-epitelització⁴⁸. Les troballes a aquest article van demostrar que el bloqueig de l'adrenoreceptor $\beta 1/\beta 2$ va augmentar fortament l'expressió de tenascina-C, el que podria haver contribuït al desenvolupament d'una cicatriu de col·lagen immadura i desorganitzada. De fet, les fibres de col·lagen eren vermelloses, allargades i gruixudes, disposades paral·lelament i perpendicularment a la superfície del grup control, 21 dies després de la ferida. En el grup tractat amb propranolol, en canvi, les fibres de col·lagen eren groc-vermells, curtes i primes i es disposaven paral·lelament a la superfície 21 dies després de la ferida. Per tant, les fibres de col·lagen eren menys organitzades i denses en el grup tractat amb propranolol que en el grup de control. Per confirmar aquesta observació histològica, es van mesurar els nivells d'hidroxi prolina (aminoàcid present principalment en el col·lagen) en les lesions. Els nivells d'hidroxi prolina van ser més petits en el grup tractat amb propranolol que en el grup control 21 dies després de la ferida.

Una característica de les úlceres per pressió és la inflamació crònica. El microambient de l'úlcerà mostra una destrucció massiva de la matriu extracel·lular i factors de creixement a causa de la invasió d'un gran nombre de neutròfils i els seus enzims destructius, com la elastasa i la MMP-8. A més, l'augment dels nivells de proteasa derivada de neutròfils (com la elastasa) durant la fase inicial de la reparació del teixit pot contribuir al retard en la migració del queratinòcit i la pèrdua del teixit necròtic. En el grup propranolol es va incrementar l'expressió d'elastasa de neutròfils quan es compara amb el grup control. A més a més, els nivells elevats de proteases induïts per bloqueig $\beta 1$ -/ $\beta 2$ -AR poden disminuir els nivells de TGF- β , que condueixen a la deficiència de la diferenciació miofibroblàstica, el que contribueix al retard del tancament, ja que les taxes de tancament són proporcionals al nombre de miofibroblasts. La densitat de miofibroblast era menor en el grup tractat amb propranolol quan es va comparar amb el grup control 3 dies després de la ferida. Tot i això 7 i 14 dies després de la ferida va augmentar la densitat al grup propranolol, el que significa que el procés anava endarrerit.

Finalment, la expressió de MMP-12 a (Assis de Brito TL et al., 2014)³¹ era més baixa al grup tractat amb propranolol 7 dies després de la ferida, però va



augmentar 14 dies després de la ferida. El retard en l'activació de macròfags induït pel bloqueig de $\beta 1$ - / $\beta 2$ -AR pot haver perjudicat l'expressió de MMP-12. Per tant, es va observar un desplaçament de la màxima expressió de MMP-12 en animals tractats amb propranolol de 7 dies a 14 dies després de la ferida. D'aquesta manera, suggereixen que el bloqueig de l'adrenoreceptor $\beta 1$ - / $\beta 2$ perjudica a la mobilització i activació de macròfags i retarda la construcció dèrmica.

Tot i que (Assis de Brito TL et al., 2014)³¹ afirma que el bloqueig dels adrenoreceptors beta és perjudicial per a la curació d'úlceres per pressió, [Braun LR, et al, 2013]⁴⁹ afirma que una pacient d'edat avançada amb una úlcera per pressió a la part superior de la cuixa dreta, després de rebre cures amb timolol tòpic va presentar un èxit curatiu molt elevat. D'una ferida crònica de 2cm² es va aconseguir una reducció del 70% en 7 setmanes.

4.4 Tractament de ferides d'altres etiologies amb blocadors d'adrenoreceptors β

Estudis previs han suggerit que la gradació iònica en l'epidermis està molt relacionada amb la curació d'una ferida⁵⁰. L'augment de la concentració de calci intracel·lular en el queratinòcit humà és provocat per la unió de catecolamines (epinefrina, norepinefrina i isoproterenol) als receptors adrenèrgics. L'activació del receptor β augmenta l'adenosina cíclica monofosfat a través de la proteïna G i obre el canal de calci.⁵¹ van demostrar que els blocadors de canals de calci eviten el retard en la reparació de barrera induïda per l'augment de la concentració de calci. Així doncs, el flux de calci en els queratinòcits perjudica la curació de la ferida. De fet, en l'article 2⁵⁰ es demostra l'efecte beneficiós dels antagonistes de $\beta 2$ -AR en la curació de la barrera cutània i afirma que amb l'aplicació tòpica de verapamil o nifedipino, tots dos antagonistes del canal de calci, es va bloquejar el retard de la reparació de la pell induït per l'hidroclorur de procaterol, un agonista $\beta 2$ -adrenèrgic. Això suggereix una associació del canal de calci amb l'alteració de la velocitat de reparació induïda per l'agonista $\beta 2$ -adrenèrgic. A més, l'ICI-118551 o el clenbuterol (antagonista $\beta 1,2$) van accelerar la recuperació de la barrera de forma significativa. En aquest article, els agonistes i antagonistes de $\beta 1$ -AR no afecten a la velocitat de la reparació de la ferida. D'altra banda, el procaterol i l'alprenol (agonistes $\beta 2$ -AR) retardaven la reparació mentre que ICI-118551, un antagonista de $\beta 2$ -AR, bloquejava aquest retard. De fet, l'aplicació tòpica d'ICI-118551 o clenbuterol, un antagonista de $\beta 1$ i $\beta 2$ -AR, accelerava la reparació.

Definitivament, els queratinòcits expressen un alt nivell de receptors $\beta 2$ -adrenèrgics que semblen tenir un paper en l'homeòstasi cutània i, com ja hem vist anteriorment, després de la lesió, migren directament al llit de la ferida per iniciar la re-epitelització, essencial per a la reparació de la ferida i la restauració de la integritat de la barrera. A l'article 16⁵², els antagonistes de β -AR milloren



la capacitat dels queratinòcits per curar una ratllada feta a un cultiu, a més d'augmentar la taxa de migració de cèl·lules individuals. A més a més, a l'article 16 s'afirma que es antagonistes de β -AR també promouen i acceleren la re-epitelització mitjançant la direccionalitat mediada pel camp elèctric del queratinòcit. El camp elèctric, generat immediatament després de la ferida, és el primer senyal que reben les cèl·lules per dirigir la seva migració al llit de la ferida. Com que el centre de la ferida és negatiu pel que fa a les vores de la ferida, els queratinòcits migren cap al pol negatiu. El tractament de l'antagonista β -AR augmenta significativament la direccionalitat de la migració.

L'article 3⁵³ també defensa l'ús dels antagonistes de β 2-AR, i afirma que augmenta la funció dels dermofibroblasts i la re-epitelització, així com promou l'angiogènesi de la ferida mitjançant l'estimulació de la secreció de VEGF per part dels queratinòcits. L'article 7⁵⁴ també demostra que l'administració de propranolol augmenta l'angiogènesi mitjançant l'augment del nombre de mastòcits en rates tractades amb propranolol, els quals faciliten la formació de nous vasos mitjançant interaccions cel·lulars complexes. Malgrat aquests resultats, l'article 4⁵⁵ afirma que encara que l'angiogènesi és essencial per a la reparació de la ferida, la disminució de l'angiogènesi està relacionada amb una millora de la cicatriu. De fet, defensa l'ús dels β 2ARag, els quals van reduir significativament l'angiogènesi en l'assaig de membrana chorioalantoica (CAM) en un 29%, aconseguint consegüentment una cicatriu un 47% més reduïda, 56 dies després de la ferida. La hiperpigmentació també es va reduir gairebé a la meitat, i l'aparença de la cicatriu va millorar significativament, així com la brillantor, la mida, la textura i la flexibilitat. Conclouen que el salbutamol tòpic va millorar significativament la cicatriu de ferides in vivo. D'altra banda, l'article 4 va confirmar que l'activació del receptor β 2AR mitjançant l'agonista inicialment reduïa la inflamació: Va reduir la direcció de les cèl·lules inflamatòries cap a les ferides en la pell de peix zebra in vivo a les poques hores després de la ferida i va reduir l'àrea infiltrada per macròfags en biòpsies de ferida porcina de set dies. Tanmateix, l'àrea infiltrada de macròfags era en realitat un 28% més gran en ferides tractades amb β 2ARag, 14 dies després de fer-les, en comparació amb els controls, mentre que no hi va haver diferències a partir del dia 21.

L'efecte positiu dels blocadors d'adrenoreceptors β a les ferides també és notori en molts casos clínics, com per exemple⁴⁴, on una dona de 43 anys presentava una gran ferida refractària a l'esquena, la qual havia estat tractada amb diverses tècniques per tal de curar la lesió, i totes elles havien estat rebutjades. Es va utilitzar timolol tòpic com a nou tractament per a la re-epitelització ràpida. La pacient va presentar una curació ràpida, exemplificant el potencial dels antagonistes β 2-AR per a la curació de les ferides cròniques. El tractament va ser ben tolerat, sense esdeveniments adversos significatius. També, a [Braun LR, et al, 2013]⁴⁹ quatre pacients en edat avançada amb úlceres de diferents etiologies (venoses cròniques i refractàries traumàtiques) van rebre cures amb timolol tòpic. Cada pacient va tenir un èxit curatiu limitat



amb altres cures alternatives, abans de canviar al timolol tòpic. Tots els pacients van millorar amb el timolol tòpic, i d'aquests, 3 pacients van curar-se completament.

D'altra banda, a (Beroukhim K et al, 2014)⁵⁶ un home de 76 anys presentava un carcinoma de cèl·lules escamoses al cuir cabellut, amb una història de 5 anys i una recurrència de 3 vegades. El pacient va ser tractat amb timolol tòpic. La ferida sencera es va re-epitelitzar completament després de 4 mesos. Sense cap altre canvi en la cura de ferides, tret de l'addició de timolol, la curació completa de la ferida es va atribuir a la medicació. Pel que fa a (Vestita, M. Et al, 2016)⁵⁷ un pacient de 68 anys presentava una profunda lesió ulcerosa al taló dret. La lesió s'havia tractat abans amb una varietat de fàrmacs tòpics i sistèmics sense cap tipus de resposta clínica significativa. El pacient va ser tractat amb propranolol tòpic. Després de 3 setmanes, l'úlcer va millorar i, després d'una setmana, la lesió es va curar completament. No es van detectar irritacions o altres efectes adversos locals o sistèmics.

Per últim, a (Chiaverini C et al, 2016)⁵⁸ dos nens d'1 any d'edat amb epidermòlisi bullosa juntural presentaven ferides cròniques a les ungles i al plec del coll, respectivament. Tractaments previs, com l'aplicació diària d'esteroides tòxics potents, no havien tingut efecte en la curació d'aquestes ferides. Després de 3 i 8 setmanes d'aplicació tòpica de timolol, les ferides es van curar al 100% i al 80%, respectivament, i sense efectes adversos.

En conclusió, els blocadors d'adrenoreceptors β són uns medicaments amb un gran potencial per a la curació de ferides. No obstant això, altres investigadors consideren que el propranolol oral pot retardar la cicatrització de la ferida. Per exemple, l'article 7 afirma que el bloqueig de β_1/β_2 -AR retarda la curació de les ferides, així com que també redueix la densitat de fibres de col·lagen i els nivells d'hidroxi prolina 7 i 14 dies després de ferir. La formació de la neo-epidermis comença just després de la lesió. Al principi, els queratinòcits migren, en lloc de proliferar, des de la vora de la ferida fins a la superfície de la ferida; quan es completa la neo-epidermis, els queratinòcits proliferen per reconstruir totes les capes epidèrmiques. El bloqueig dels adrenoreceptors β_1 i β_2 retarda la formació de la neo-epidermis principalment inhibint la migració de queratinòcits. En els animals tractats amb propranolol, es va observar una disminució del gruix de la neo-epidermis.

5. PART EXPERIMENTAL

Amb aquesta part experimental, la idea és proposar un tipus d'experiments que poden portar a terme al grup de recerca TR2Lab i que permeten estudiar diferents aspectes de l'acció dels blocadors d'adrenoreceptors β sobre les cèl·lules que estan implicades en la curació de ferides. Això permetrà realitzar una recerca translacional al TR2Lab on els resultats i conclusions de la seva recerca bàsica es podran traslladar a la pràctica clínica. L'objectiu d'aquest experiment és servir com a model per exemplificar una de les proves que



s'haurien de fer a nivell experimental per tal de comprovar l'efectivitat dels blocadors d'adrenoreceptors β pel que fa a la migració de cèl·lules dèrmiques, com són els dermofibroblasts. Gràcies a la recerca bibliogràfica, s'han pogut detectar diverses llacunes de coneixement que podrien ser molt rellevants per a l'aplicació dels blocadors beta en l'àmbit clínic. Així, un dels aspectes que a mi em sembla més prometedors es l'anàlisi de l'efecte dels blocadors beta-adrenèrgics que s'utilitzen amb els blocadors beta-adrenèrgics amb una selectivitat pels receptors diferent. Amb la metodologia que es proposa en aquest treball, es poden respondre aquest tipus de preguntes que tenen un alt valor afegit per a la recerca que es realitza en aquest camp.

Per poder mostrar amb seguretat els efectes dels blocadors d'adrenoreceptors β sobre les ferides, s'hauria de fer una comparació entre fàrmacs de diferents tipus, i d'aquí l'objectiu d'aquest model de treball experimental.

L'assaig de tancament de "ferida" (wound healing assay) té com a objectiu l'estudi de la migració dels fibroblasts. És un assaig que es basa en l'observació del comportament d'una monocapa confluent de cèl·lules a la que prèviament se li ha realitzat una "ferida". Les cèl·lules de la vora de la bretxa es mouran cap al centre fins a establir nous contactes cèl·lula-cèl·lula, tancant així la "ferida". A mesura que les cèl·lules avancen, es van captant imatges de manera periòdica durant l'experiment per tal de, posteriorment, poder-les comparar per a determinar la velocitat de migració de les cèl·lules.⁹

5.1 OBJECTIU DE L'EXPERIMENT

La idea és realitzar un assaig de tancament de ferida amb dermofibroblasts humans en cultiu amb 4 condicions diferents: una placa control, una amb un agonista β -adrenèrgic (cimaterol) i dos antagonistes β -adrenèrgics, el propranolol (antagonista beta-adrenèrgic no selectiu) i el carvediol (antagonista β -adrenèrgic no selectiu amb activitat α 1-blocant), amb la finalitat d'observar les diferències que provoquen cadascun d'aquests compostos en el temps de tancament de la "ferida".

5.2 PROTOCOL

5.2.1 Cultiu cel·lular.

Les cèl·lules utilitzades per l'experiment són dermofibroblasts humans. Aquestes són cèl·lules situades a la capa de la dermis que són responsables de generar el teixit conjuntiu i permeten la reparació de la pell després d'una ferida. A més, aquestes cèl·lules segreguen proteïnes participants en la formació de la matriu extracel·lular. Resulten ser un bon model de cèl·lula dèrmica per a fer aquest tipus d'experiments, ja que són agents clau per mantenir l'homeòstasi de la pell i per a la reparació tissular fisiològica.¹⁴



A més a més, s'ha observat que els antagonistes de β 2-AR augmenten la funció dels dermofibroblasts.⁵³

Primer de tot es va fer una base de fibronectina a la placa (4 plaques), per tal de simular una matriu extracel·lular i promoure l'adhesió cel·lular al substrat. Es van introduir 4 μ g/placa de fibronectina diluïda en PBS, fent un total de 300 μ l/placa. Es va deixar incubant 45' a 37°C. Seguidament, es va retirar la fibronectina sobrant de les plaques i es va addicionar albúmina a 2mg/ml (1ml a cada placa). Es va deixar 1h a 37°C. Vam treure el sobrant i vam rentar amb PBS. Tot seguit, es va introduir 0,5 ml de cèl·lules (provinents d'un cultiu anterior en T25 amb una confluència de 80%) + 2 ml de medi 15% a cada placa, i es va incubar a 37° fins que es va obtenir un cultiu monocapa de dermofibroblasts humans d'una confluència de 90% aproximadament.

5.2.2 Realització de “ferides”

Un cop obtingut el cultiu, es va retirar el medi i es van fer, en cada placa, 4 carrils rectes a la base amb un retolador permanent, i, perpendicularment a aquests carrils, dues “ferides” a la monocapa utilitzant una punta estèril de pipeta p200. Per fer les ferides, s'arrossega la punta de la pipeta per la monocapa amb un angle d'inclinació de 45° aproximadament, vigilant de no prémer excessivament per tal de no danyar la matriu de fibronectina. Un cop fetes les “ferides” és molt important rentar un parell de vegades les plaques amb PBS per descartar les restes cel·lulars despreses.

Finalment, afegim medi al 0,15% de sèrum+10 μ M de cadascun dels fàrmacs que volem observar, tenint en total 4 condicions (control, cimaterol, propranolol, carvedilol). L'assaig es fa en condicions de baix sèrum, ja que això permet a les cèl·lules migrar però que minimitza la proliferació cel·lular, per així no apantallar la migració cel·lular.

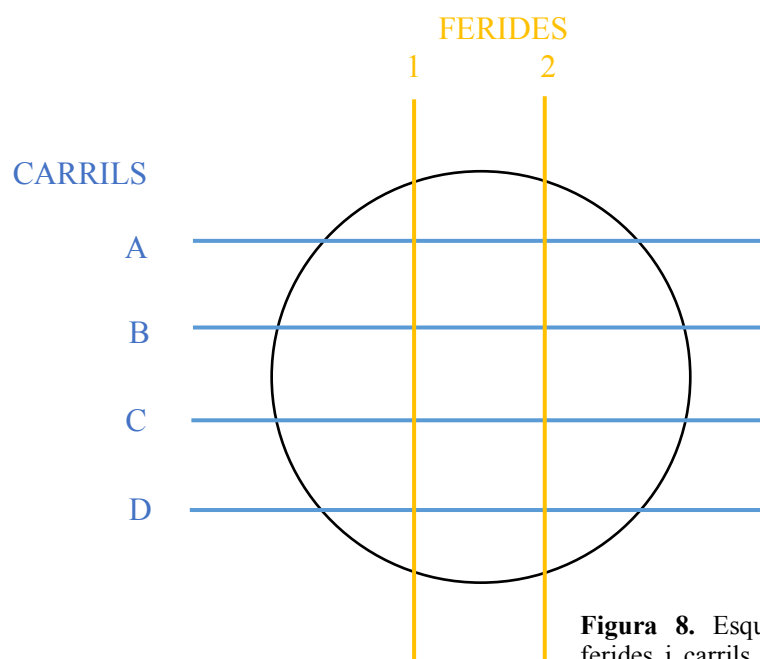


Figura 8. Esquema de la distribució de ferides i carrils a la placa. (Imatge de font pròpia)

5.2.3 Seguiment de l'evolució de les "ferides" i anàlisi de dades

Es va fer una fotografia per àrea seleccionada cada hora aproximadament (fins al tancament de la ferida o fins al T₁₂), a quatre augments (4X), obtenint així un curtmetratge de fotos que ens va permetre observar el tancament progressiu de la ferida. Durant la nit va haver un període llarg en el que no es va fer fotografies, per això. Al acabar l'experiment, les fotografies es van analitzar amb el l'eina *MRI Wound Healing Tool*, del programa ImageJ. Amb aquest programa es van poder calcular les àrees buides de les diferents imatges, de manera que, posteriorment, es va poder calcular el % d'àrea poblada per cèl·lules respecte al total. L'objectiu final és poder graficar els resultats i calcular el pendent de la recta. Com més gran el pendent, més velocitat de tancament presentaran les cèl·lules.

5.3 RESULTATS

Per determinar l'efecte dels antagonistes i agonistes sobre la migració de dermofibroblasts humans, es va mesurar la capacitat d'aquestes cèl·lules per curar una "ferida" d'una monocapa confluent de cèl·lules.

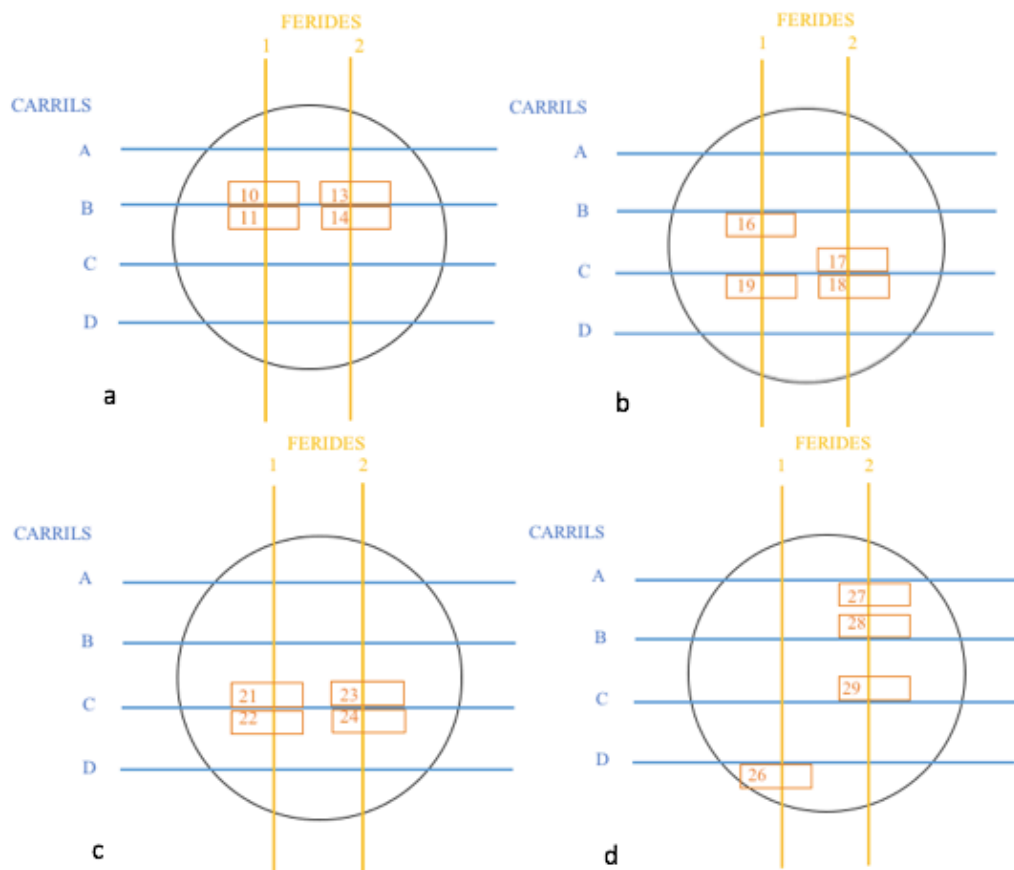


Figura 9. L'esquema que es va seguir per tal de determinar les àrees per a cada condició. Per cada condició es van seleccionar 4 àrees representatives i es va fotografiar cada hora aproximadament (menys a la nit, que hi ha un interval molt més gran de temps). A) Control. B) Cimaterol. C) Carvedilol. D)Propranolol. (Imatge de font pròpia)



A les fotografies següents es mostra l'evolució en el temps de les ferides (un representant per cada condició). Es pot observar clarament com, a mesura que passa el temps, els dermofibroblasts humans van migrant poc a poc i tancant la ferida. En tots casos, a partir de la fotografia K podem veure un canvi molt gran i sobtat en la confluència, donat perquè entre la fotografia K i la L ha passat el període de nit, on no s'ha pogut fotografiar. L'evolució de cada representant, a més a més, es representa a una gràfica on es veuen clarament les diferències entre condicions.

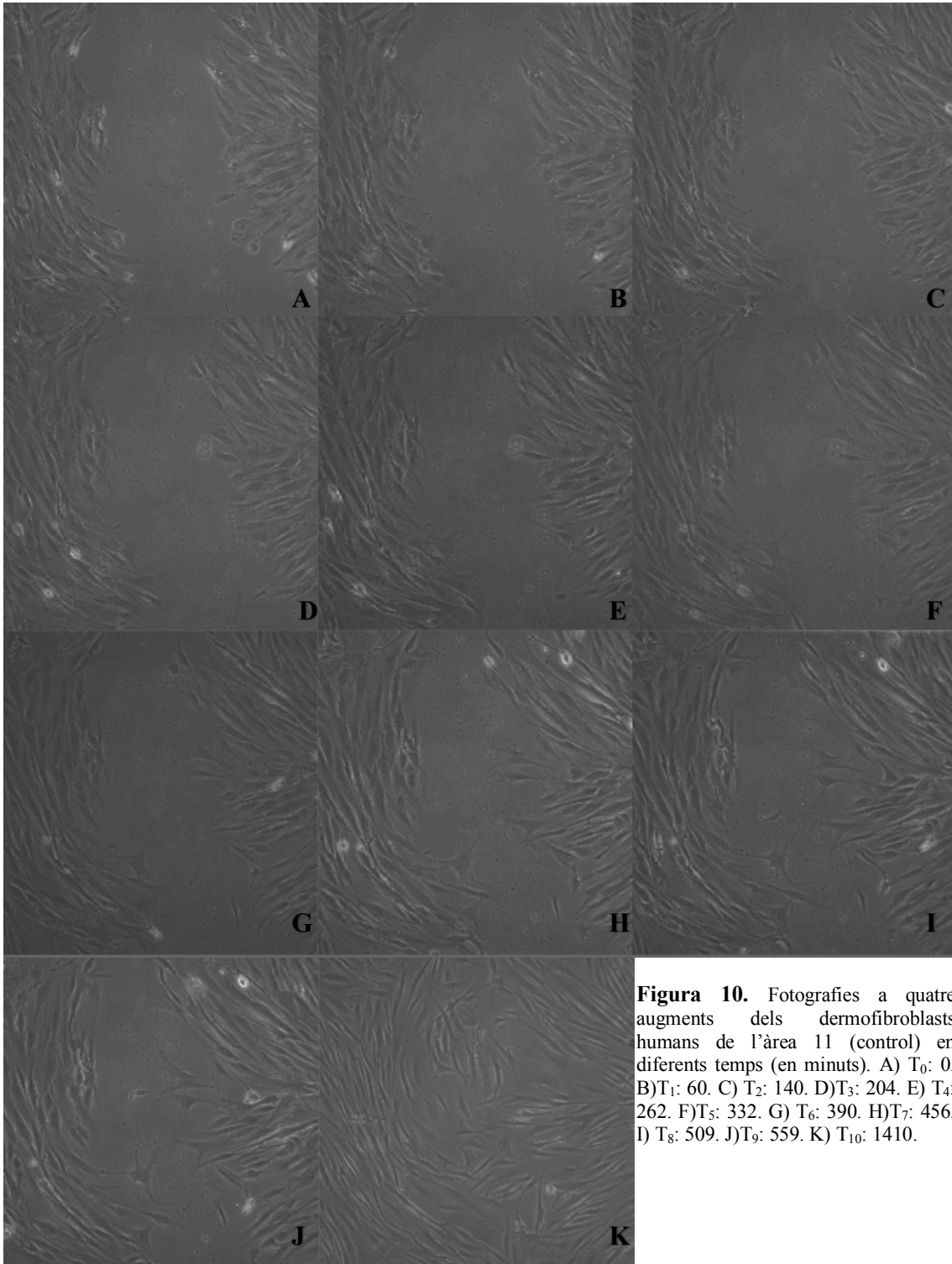


Figura 10. Fotografies a quatre augments dels dermofibroblasts humans de l'àrea 11 (control) en diferents temps (en minuts). A) T_0 : 0. B) T_1 : 60. C) T_2 : 140. D) T_3 : 204. E) T_4 : 262. F) T_5 : 332. G) T_6 : 390. H) T_7 : 456. I) T_8 : 509. J) T_9 : 559. K) T_{10} : 1410.

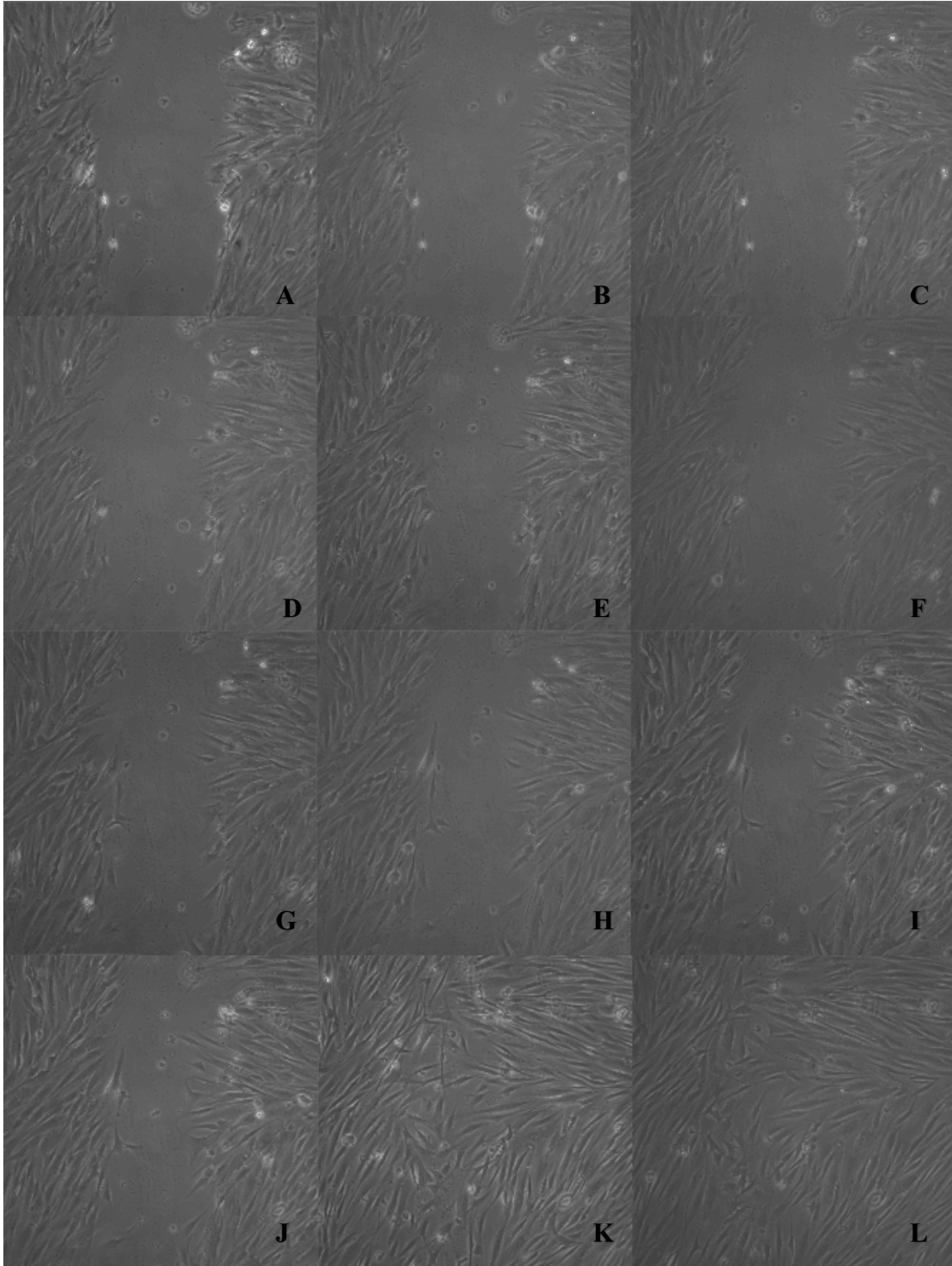


Figura 11. Fotografies a quatre augments dels dermofibroblasts humans de l'àrea 17 (cimaterol, agonista) en diferents temps (en minuts). A) T₀: 0. B) T₁: 50. C) T₂: 115. D) T₃: 180. E) T₄: 240. F) T₅: 309. G) T₆: 366. H) T₇: 435. I) T₈: 487. J) T₉: 535. K) T₁₀: 1412. L) T₁₁: 1630.

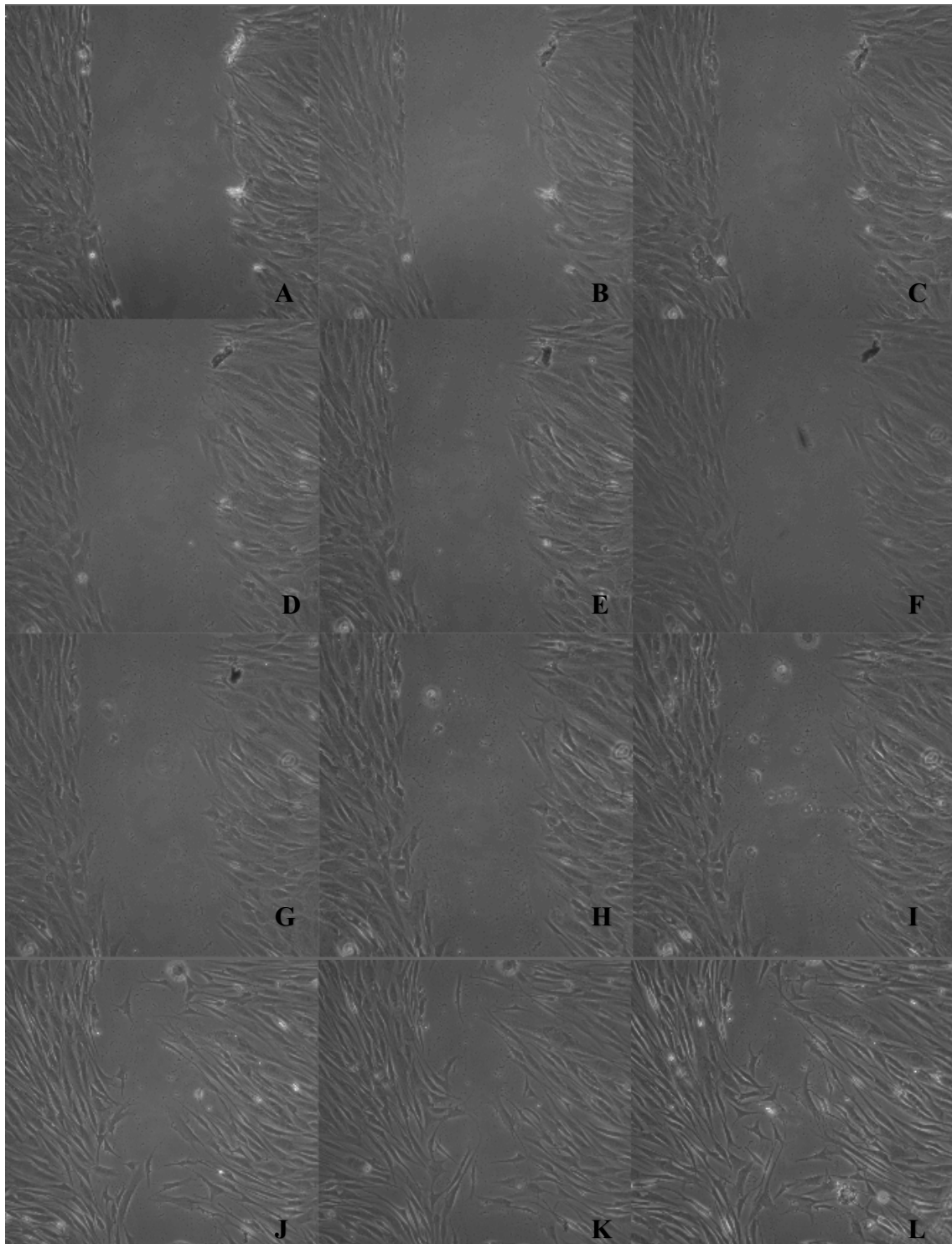


Figura 12. Fotografies a quatre augments dels dermofibroblasts humans de l'àrea 21 (carvedilol, antagonista) en diferents temps (en minuts). A) T₀: 0. B) T₁: 48. C) T₂: 114. D) T₃: 178. E) T₄: 237. F) T₅: 365. G) T₆: 432. H) T₇: 485. I) T₈: 534. J) T₉: 1292. K) T₁₀: 1509. L) T₁₁: 1771.

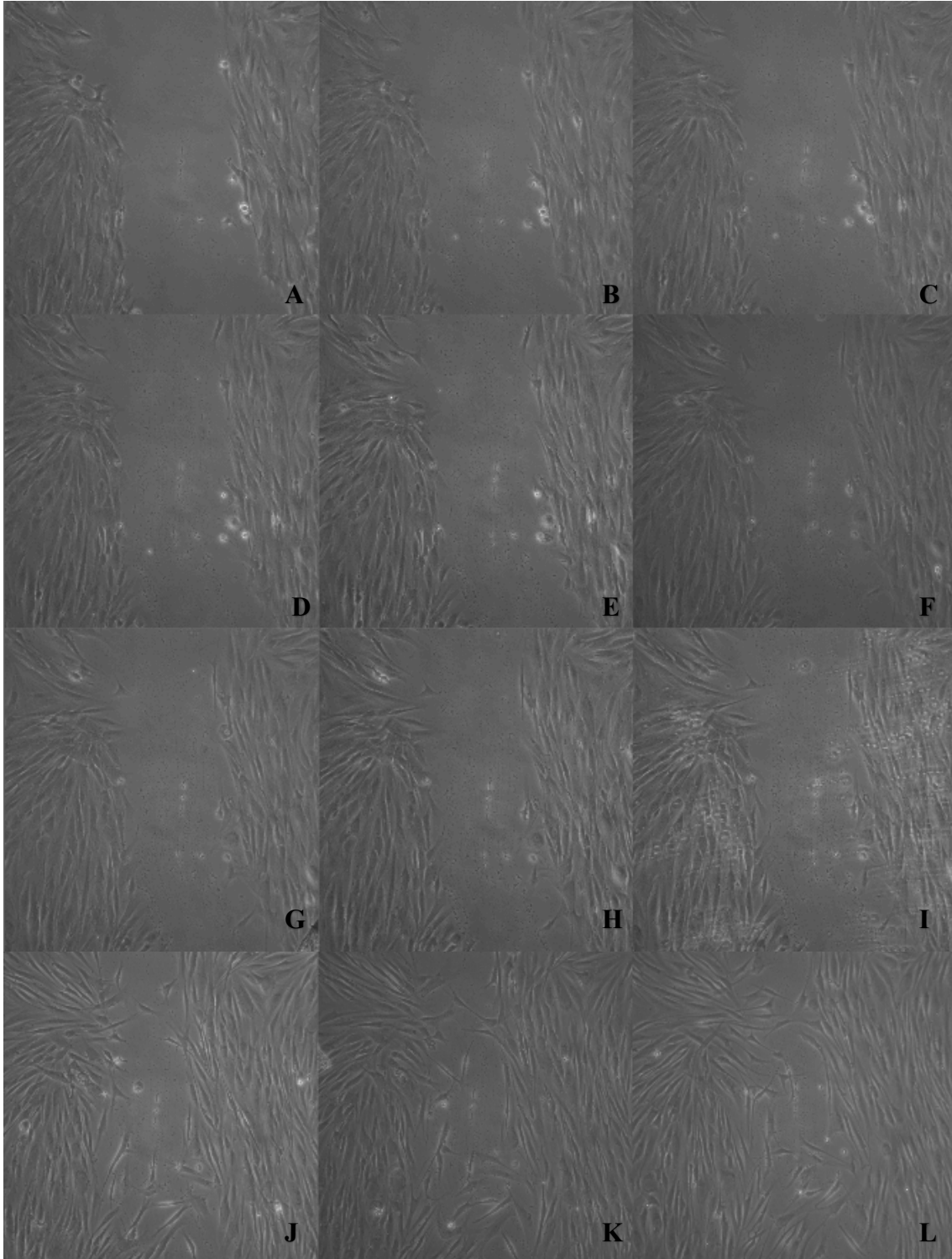


Figura 13. Fotografies a quatre augments dels dermofibroblasts humans de l'àrea 28 (propranolol, antagonista) en diferents temps (en minuts). A) T₀: 0. B) T₁: 46. C) T₂: 110. D) T₃: 173. E) T₄: 233. F) T₅: 373. G) T₆: 438. H) T₇: 492. I) T₈: 541. J) T₉: 1422. K) T₁₀: 1635. L) T₁₁: 1909.

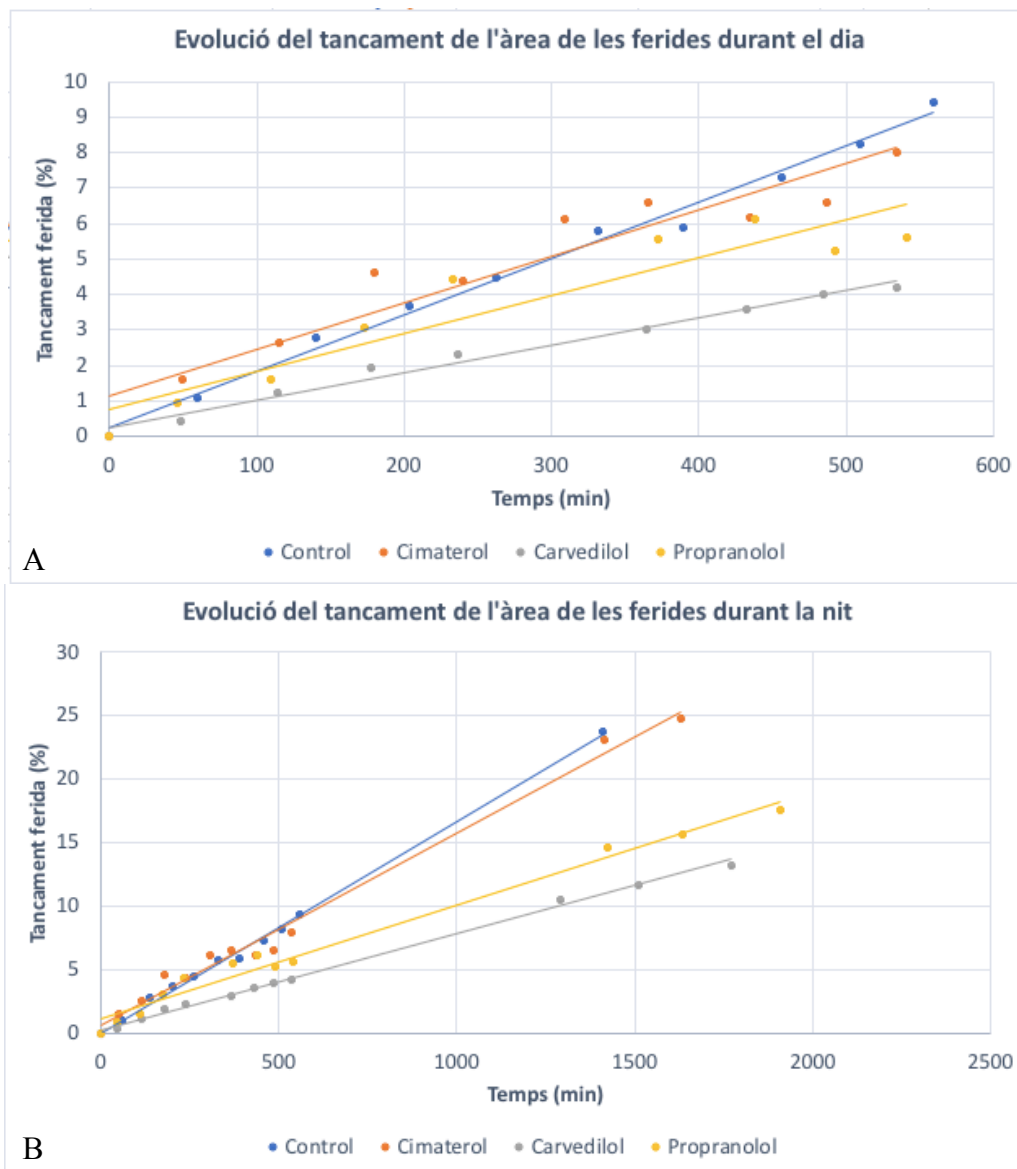


Figura 14. Gràfiques amb un representant de cada condició. En blau, l'àrea 11 corresponent a Control. En taronja, àrea 17, que correspon a l'agonista (cimaterol). Finalment, en gris i groc, àrees 21 i 28, els dos antagonistes, carvedilol i propranolol, respectivament. A l'eix de les ordenades es representa l'àrea (en percentatge) de la superfície que s'ha tancat, començant pel 0% a T=0, mentre que en l'eix d'ordenades es representa els diversos temps. A) Es mostra la fracció de temps que passa durant el dia. B) Es mostra la fracció de temps que passa durant la nit. No hi va haver seguiment durant la nit, així que el progrés està basat en la última foto realitzada el dia anterior i la primera del dia següent.

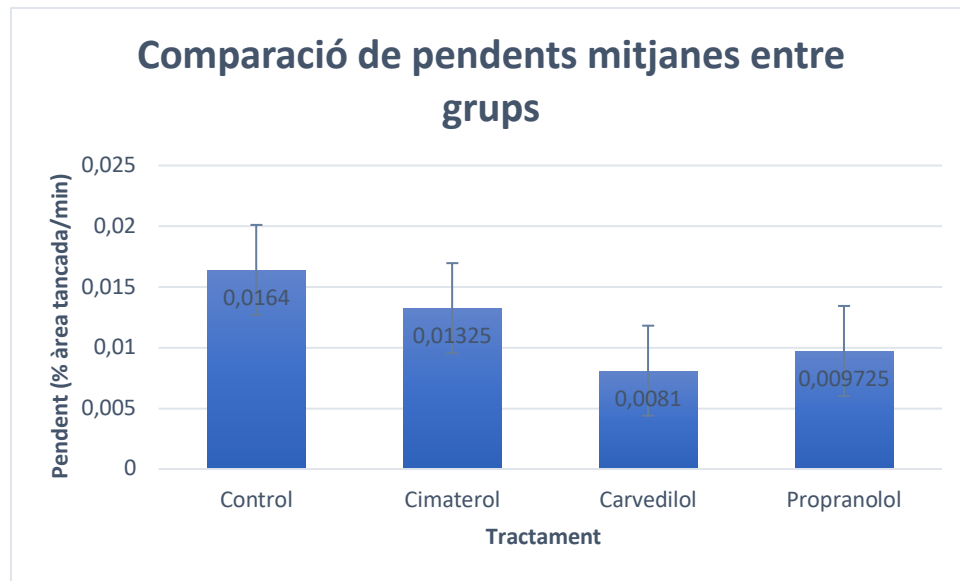


Figura 15. Representació gràfica de les pendents mitjanes de cada condició. SD= 0,00370761

5.4 CONCLUSIONS EXPERIMENTALS

Per l'agonista (cimaterol) i el control (no fàrmac), a diferència del que havia estat reportat, s'ha obtingut el pendent més elevat ($0,01325 \pm 0,00212525$ i $0,0164 \pm 0,00151217$ respectivament). Pel que fa al propranolol i el carvedilol (antagonistes), els quals, segons la informació extreta de la part bibliogràfica del treball, haurien de presentar una velocitat de tancament més elevada, és a dir, un pendent més gran, el seu pendent és de $0,009725 \pm 0,00097425$ i $0,0081 \pm 0,00282017$ respectivament. No he obtingut els resultats que esperava, però el motiu plausible pel qual es dona aquesta situació és per la dosi de fàrmacs usada. En el nostre cas, la dosi que es va utilitzar per fer cadascuna de les condicions va ser de 10uM de cada compost, respectivament. Sí que hi ha alguns experiments que utilitzen aquesta concentració, però no resulten ser el mateix experiment que el nostre, ja que observen coses diferents, o són assajos diferents als nostres. Per exemple, per fer un assaig d'anell aòrtic de rata, per observar si hi ha variacions en el creixement endotelial aòrtic segons l'aplicació o no aplicació d'un blocador d'adrenoreceptors β .⁵³ O també s'ha utilitzat aquesta dosi per observar la relació de l'aplicació d'un agonista amb el nombre d'adhesions focals madures en dermofibroblasts humans i l'expressió gènica profibròtica.⁵⁵ Pel que he pogut observar, en la majoria d'experiments similars que he tractat bibliogràficament^{7,53,54,55} utilitzen una dosi molt més baixa, de 10nM, pel que es podria dir que la dosi massa elevada ha afectat de manera negativa al tancament de la ferida. Aquest fet podria ser donat perquè a aquestes dosis tant elevades, els blocadors dels receptors beta adrenèrgics no són selectius respecte a altres receptors diferents dels adrenèrgics. Una altra possibilitat podria ser que a aquestes dosis poden tenir efectes sobre la fluïdesa de la membrana si són molt hidrofòbics. Així, s'hauria



d'ajustar la concentració de fàrmac per poder extreure conclusions més esclaridores sobre l'efecte d'aquests compostos sobre les ferides. Però, com s'ha indicat anteriorment, aquests resultats no són conclouents estadísticament, ja que amb el baix nombre de mostres de les que disposem per condició no podem fer cap test estadístic per decidir si les diferències que observem són significatives o no, pel que, per treure unes conclusions finals, aquest experiment s'hauria de portar a terme novament, amb la correcta dosi i procediments. Tanmateix, l'objectiu d'aquest treball no és extreure conclusions estadístiques, sinó mostrar un tipus d'experiment i d'anàlisi que permeti avaluar l'activitat dels blocadors beta en el si del grup de recerca TR2Lab. També cal dir que el temps que passa durant la nit també podria ser important per obtenir un seguiment més detallat de la curació de la ferida, pel que en propers experiments també s'hauria de tenir en compte aquest factor i ajustar els temps correctament per a que no hi hagi una diferència de temps entre fotografies tan elevada. Seria convenient realitzar aquests assaigs de tal manera que es poguessin obtenir aquests punts amb millores tècniques com la gravació automatitzada, per exemple.

6. DISCUSSIÓ

Com he pogut observar mitjançant l'estudi de diferents articles i casos clínics, l'ús dels blocants beta per a la curació de ferides encara roman amb molta controvèrsia i contradiccions. Per una banda, hi ha articles que defensen el bloqueig dels adrenoreceptors per tal d'accelerar la curació de ferides, com és el cas de (Romana-Souza B et al, 2009). Aquí, en rates diabètiques, l'administració de propranolol va millorar la curació de les ferides mitjançant la reducció de la resposta inflammatòria local, així com els nivells d'MMP-9. També va millorar la contracció de la ferida, el desenvolupament del teixit de granulació, la deposició de col·lagen i l'angiogènesi, tot gràcies a la estimulació de la síntesi de NO. Però d'altra banda, en rates normoglucèmiques, l'administració de propranolol va retardar la contracció de la ferida i la re-epitelització. També, va reduir la densitat de col·lagen i els nivells d'hidroxi-prolina. Tanmateix, va augmentar l'infiltrat inflamatori i l'angiogènesi en les lesions cutànies. Estudis previs han pogut demostrar que un dels factors característics de la diabetis és la reducció de la síntesi d'NO, el que provoca diverses conseqüències que afecten a la bona curació de la ferida, com per exemple l'empitjorament de la deposició del col·lagen, el retard en la proliferació de fibroblasts o la inflamació prolongada^{32, 33}. Com ja s'ha comentat anteriorment, una de les vies d'actuació del propranolol, segons (Romana-Souza B, 2009), és l'estimulació de la síntesi de NO, pel que en cas de ferides del tipus úlceres diabètiques, l'efecte positiu d'un antagonista com el propranolol pot accelerar el desenvolupament de la curació de ferides. A més a més, a Zheng Z et al., 2017, l'aplicació tòpica de propranolol també va promoure la curació de ferides en ratolins diabètics. El tractament amb l'antagonista va suposar d'entre altres coses l'augment de la re-epitelització i de l'angiogènesi funcional. A més a més, s'ha comprovat en casos clínics la efectivitat d'aquests tipus de fàrmacs, després de tractar amb timolol tòpic un pacient amb diabetis i una ferida crònica i



aconseguir el tancament ràpid fins a la re-epitelització total⁴⁶. Per tant, considero que aquests estudis proporcionen certes bases sòlides per a afirmar que l'aplicació de propranolol en úlceres diabètiques és molt eficient a l'hora de tractar ferides de pacients diabètics i pot convertir-se en un fàrmac molt novedós.

No només s'ha comprovat l'efectivitat dels antagonistes en ferides diabètiques sinó que també (Romana-Souza B et al., 2008) afirmava que l'administració d'una dosi baixa de propranolol millora la curació de ferides de rates provocades per cremades, reduint la resposta inflamatòria local, així com millorant la contracció de la ferida, la re-epitelització, el desenvolupament del teixit de granulació, la deposició de col·lagen i l'angiogènesi. A més a més es va comprovar l'eficàcia del propranolol en seixanta-nou pacients adults amb cremades que cobrien $\geq 30\%$ de la superfície total del cos. L'administració va millorar notablement la cicatrització de les ferides. Així doncs, podem afirmar que els blocadors d'adrenoreceptors β poden arribar a ser també una bona alternativa per a la ràpida curació de ferides provocades per cremades, així com ser un tractament menys invasiu, més segur i menys indolor per als pacients.

S'ha observat que l'antagonisme per als adrenoreceptors beta també promou la curació ferides d'altres etiologies, com les úlceres per pressió (Braun LR, et al, 2013), on s'afirma la curació d'una ferida crònica per pressió a una pacient d'edat avançada després de rebre un tractament timolol. Tot i això, s'ha trobat que el bloqueig dels receptors beta adrenèrgics perjudica la cicatrització cutània en lesions del tipus isquèmia-reperfusió en ratolins, fent que el tancament de la ferida sigui més lent amb l'aplicació de propranolol³¹. En aquest cas, es necessari investigar més sobre l'efecte dels blocants beta en aquest tipus de ferida, ja que amb tan poques evidències no podem extreure una conclusió segura. El que sí que podem dir és que en el cas de Braun LR, et al, 2013, hi ha evidències de que ha funcionat en humans, i s'ha pogut observar una millora significativa, cosa que no podem dir de Assis de Brito, 2014, que només va observar els efectes en ratolins. A més a més, l'efecte positiu dels blocadors d'adrenoreceptors β a altres ferides també és notori en Pullar CE et. Al, 2012, on promouen l'angiogènesi de la ferida, la funció del dermofibroblast i la re-epitelització, cosa que revela una possible nova via d'intervenció terapèutica. Molts casos clínics també confirmen aquest efecte positiu dels antagonistes en diversos tipus de ferida^{49,44,56,57,58}. Així doncs, donada la gran varietat de ferides amb les que els antagonistes són efectius i observant l'èxit d'aquests en tants casos clínics afirmo que els blocadors d'adrenoreceptors β són uns medicaments amb un gran potencial per a la curació de ferides.

D'altra banda, Le Provost GS et al., 2015 destaca que el Salbutamol tòpic, un agonista dels adrenoreceptors, va millorar significativament l'aspecte de la cicatriu, evitant la cicatriu hipertròfica i la formació de queloides. Això ens fa veure que els agonistes també tenen un paper en la cicatrització de ferides. Millora l'aparença de la cicatriu, però alguns estudis han observat que l'aplicació dels agonistes perjudica la curació de la ferida⁵⁹. Això ens fa pensar que potser una combinació d'antagonista per accelerar la curació en fases inicials i l'agonista per la bona cicatrització en fases més tardanes de la curació podria arribar a ser un tractament potencial de les ferides cutànies. Aquest fet s'hauria d'investigar més a fons.



Amb tots els resultats que he obtingut puc concloure que, en tots els tipus de ferida que s'han estudiat, l'administració dels blocadors d'adrenoreceptors β podria arribar a ser un nou tractament potencial per a la curació d'aquestes, reduint tant la resposta inflamatòria local com els nivells de metal·loproteïnases, millorant la contracció de les ferides, el desenvolupament del teixit de granulació, la deposició de col·lagen, l'angiogènesi resultant en un tractament innovador menys invasiu, dolorós i costós, i més segur i ràpid. Però també he pogut observar que, en general, l'administració dels blocadors d'adrenoreceptors β per a la curació de la ferida continuen sent debatuts, donat que molts dels articles es contradueixen. Això podria ser degut a que els diversos estudis no es centren en el mateix objectiu o observen coses diferents. Per exemple, hi ha molta varietat de tipus cel·lulars utilitzats com a model d'estudi entre articles, així com l'observació dels efectes de diversos antagonistes, amb activitats i selectivitats diferents. Així, s'ha de tenir cura d'estandarditzar els experiments per tal de poder treure conclusions fiables, ja que actualment s'utilitzen tècniques, cèl·lules o dosis diferents entre experiments, el que provoca molta variació.

També, hem de tenir en compte que cada etiologia de ferida és diferent, i que la curació d'úlceres i lesions passa per diferents fases, com ja hem vist. Sembla que els agonistes i els antagonistes podrien actuar de manera diferent durant el transcurs de la curació de la ferida. Pel que he pogut observar, els antagonistes tenen un efecte molt positiu durant el tancament de la ferida, quan es dona la migració de queratinòcits, el desenvolupament de teixit de granulació i la deposició de col·lagen, mentre que els agonistes podrien tenir un efecte beneficiós en etapes més tardanes de la ferida, a l'hora de formar la cicatriu. També he observat que pocs articles fan una comparació entre diferents blocadors d'adrenoreceptors β . Es proposen més estudis que facin aquesta relació entre aquests fàrmacs ja que, com he pogut observar, tenen diferents mecanismes d'actuació i el seu efecte sobre les ferides podria variar considerablement.

També s'han observat discrepàncies entre els assajos en humans i els models de laboratori utilitzats, ja siguin cultius cel·lulars o animals. Sembla doncs, que hi podria haver diferències que s'haurien de tenir en compte a l'hora d'interpretar els resultats provinents de la recerca bàsica que intenta acotar els paràmetres d'estudi per tant de poder ser interpretats. Així, pot ser caldria fer un esforç per tal de trobar un model que inclogués els factors més determinants de la curació de ferides per tal de poder traslladar els resultats a l'ús d'aquests tractaments en humans.

Per últim, i pel que he vist en el laboratori, és molt necessari posar a punt els experiments i fer un protocol estandarditzat per tal de poder extreure conclusions que ens ajudin a entendre millor el mecanisme d'aquests fàrmacs i poder observar l'efecte que tenen en les cèl·lules dèrmiques.



7. CONCLUSIONS FINALS

Amb aquest treball s'ha trobat que els blocadors d'adrenoreceptors β tenen un efecte positiu en la curació de ferides, reduint tant la resposta inflamatòria local com els nivells de metal·loproteïnases, millorant la contracció de les ferides, el desenvolupament del teixit de granulació, la deposició de col·lagen, l'angiogènesi resultant en un tractament innovador menys invasiu, dolorós i costós, i més segur i ràpid. Però, tot i la evidència que demostra la possible utilitat d'aquest tipus de fàrmacs, fa falta més recerca per tal de determinar els mecanismes exactes pels quals aquests tipus de fàrmacs són efectius.

En conclusió, aquest treball dona suport a l'ús dels antagonistes β adrenèrgics per al tractament de ferides de diferents etiologies. Aquests fàrmacs tenen un potencial molt gran com a teràpia coadjuvant o única. Tot i això, cal profunditzar més en la seva recerca i definir millor la seva utilitat. Així, es proposa al grup de recerca TR2Lab, que disposa de l'equip i els medis necessaris, per desenvolupar una nova línia de recerca transversal i translacional tant a nivell clínic com a nivell bàsic amb experiments i metodologies com les que es proposen en aquest treball.

8. PERSPECTIVES

Gràcies als recursos i a l'equip d'investigadors dels que disposa el grup de recerca TR2Lab, s'hauria de considerar el fet de fer experiments com l'assaig de ferida que s'ha realitzat en aquest treball, comparant diversos beta-blocants de diferents classes, ja que no tots els blocadors beta són iguals. Com ja s'ha esmentat anteriorment, cada blocador beta té la seva selectivitat, liposubilitat o percentatge d'absorció, d'entre altres propietats fisicoquímiques i farmacològiques, i aquestes comparacions entre blocadors encara no ha estat explorada. També es proposa observar les diferències dels seus efectes en cèl·lules de diferents fisiologies, a nivell experimental, i comparar els efectes dels blocadors beta en diferents etiologies de ferides, a nivell clínic, per tal de determinar quins són els tractaments més efectius. A més, el TR2Lab podria explorar noves vies de tractament innovadores que podrien millorar aquestes teràpies, basades en la fotofarmacologia⁶⁵ (fàrmacs que només són actius quan són il·luminats), obrint la porta a la disminució d'efectes adversos o, fins i tot, efectes sinèrgics amb altres tractaments fotodermatològics¹³. D'altra banda, i des del punt de vista clínic, es podria utilitzar la informació obtinguda a nivell de recerca bàsica per la investigació amb casos clínics dels tractaments que hagin sorgit més efectius i que podrien aplicar-se en casos reals a la Unitat de ferides de l'Hospital de Santa Creu de Vic, a la qual diversos membres del grup de recerca TR2Lab hi treballen.



9. BIBLIOGRAFIA

1. Scanzano A, Cosentino M. Adrenergic regulation of innate immunity: a review. *Frontiers in Pharmacology*. 2015;6:171. doi:10.3389/fphar.2015.00171.
2. Cotecchia S, Stanasila L, Diviani D. Protein-Protein Interactions at the Adrenergic Receptors. *Current Drug Targets*. 2012;13(1):15-27. doi:10.2174/138945012798868489.
3. WIKIPEDIA. *Adrenergic Agonist*. 2018 https://en.wikipedia.org/wiki/Adrenergic_receptor [accedit el 23 d'Abril de 2018]
4. HOSSAM A. SHOUIP. Beta blocker. 2015. https://www.researchgate.net/publication/271827069_Beta_blocker [accedit el 23 d'Abril de 2018]
5. NEEL PRABHA. Beta Blockers in dermatology. 2017. <http://www.ijdv1.com/article.asp?issn=0378-6323;year=2017;volume=83;issue=3;spage=399;epage=407;aulast=Prabha#ft2> [accedit el 28 de Maig de 2018]
6. Westfall TC, Westfall DP. Adrenergic agonists and antagonists. In: Brunton LL, editor. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12th ed. New York: McGraw-Hill; 2011. p. 277-333.
7. Pullar CE, Chen J, Isseroff RR. PP2A activation by beta2-adrenergic receptor agonists: novel regulatory mechanism of keratinocyte migration. *J Biol Chem*. 2003;278(25):22555-62
8. JAY W. MARKS. Beta Blockers (Drug Class, List of Brand and Generic Names). https://www.medicinenet.com/beta_blockers/article.htm#list_of_examples_of_brand_and_generic_names_for_beta_blockers_available [accedit el 28 de Maig de 2018]
9. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID. Protocolo de ensayo de herida. 2013. <https://www.iib.uam.es/portal/documents/75233/75263/rev+Lucia+Ensayo+herida+final+4+formato.pdf/003270e1-8139-4a58-b77f-bd29b967cf77> [accedit el 16 de Maig 2018].
10. Baselga Torres E, Bernabéu Wittel J, van Esso Arbolave DL, et al. [Spanish consensus on infantile haemangioma]. *An Pediatr (Barc)*. 2016;85(5):256-265.
11. Léauté-Labrèze C, Dumas de la Roque E, Hubiche T, Boralevi F, Thambo JB, Taïeb A. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N Engl J Med*. 2008;358(24):2649-51
12. Wollina U, Langner D, França K, Gianfaldoni S, Lotti T, Tchernev G. Pyogenic Granuloma – A Common Benign Vascular Tumor with Variable Clinical Presentation: New Findings and Treatment Options. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2017;5(4):423-426. doi:10.3889/oamjms.2017.111
13. Baron ED, Suggs AK. Introduction to photobiology. *Dermatol Clin*. 2014 Jul;32(3):255-66, vii. doi: 10.1016/j.det.2014.03.002
14. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2014;7:301-311. doi:10.2147/CCID.S50046.



15. Mikkelsen CS, Holmgren HR, Kjellman P, et al. Rosacea: a Clinical Review. *Dermatology Reports*. 2016;8(1):6387. doi:10.4081/dr.2016.6387.
16. Horst C, Kapur N. Propranolol: a novel treatment for angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia. *Clin Exp Dermatol*. 2014;39(7):810-2
17. Chacon A, Mercer J. Successful management of angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia in a split-face trial of topical tacrolimus and timolol solution. *G Ital Dermatol Venereol*. 2016;151(4):436-40
18. Cummins DL, Cummins JM, Pantle H, Silverman MA, Leonard AL, Chanmugam A. Cutaneous malignant melanoma. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(4):500-7
19. De Giorgi V, Grazzini M, Gandini S, et al. Treatment With β -Blockers and Reduced Disease Progression in Patients With Thick Melanoma. *Arch Intern Med*. 2011;171(8):779–781. doi:10.1001/archinternmed.2011.131
20. Lemeshow S, Sørensen HT, Phillips G, et al. β -Blockers and survival among Danish patients with malignant melanoma: a population-based cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20(10):2273-9
21. De Giorgi V, Gandini S, Grazzini M, Benemei S, Marchionni N, Geppetti P. Effect of β -blockers and other antihypertensive drugs on the risk of melanoma recurrence and death. *Mayo Clin Proc*. 2013;88(11):1196-203
22. Gold MH, Holy AK, Roenigk HH Jr. Beta-blocking drugs and psoriasis. A review of cutaneous side effects and retrospective analysis of their effects on psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 1988;19(5 Pt 1):837-41
23. O'Brien M, Koo J. The mechanism of lithium and beta-blocking agents in inducing and exacerbating psoriasis. *J Drugs Dermatol*. 2006;5(5):426-32
24. Kondo T, Ishida Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Sci Int*. 2010;203(1-3):93-8
25. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1219-22
26. Pereira, C. T., Murphy, K. D., and Herndon, D. N. Altering metabolism. *J. Burn Care Rehabil*. 26: 194, 2005
27. Wilmore, D. W., Long, J. M., Mason, A. D., Jr., Skreen, R. W., and Pruitt, B. A., Jr. Catecholamines: Mediator of the hypermetabolic response to thermal injury. *Ann. Surg*. 180: 653, 1974
28. Wolfe, R. R., Herndon, D. N., Peters, E. J., Jahoor, F., Desai, M. H., and Holland, O. B. Regulation of lipolysis in severely burned children. *Ann. Surg*. 206: 214, 1987
29. Herndon, D. N., and Tompkins, R. G. Support of the metabolic response to burn injury. *Lancet* 363: 1895, 2004
30. McInnes, Elizabeth; Jammali-Blasi, Asmara; Bell-Syer, Sally E. M.; Dumville, Jo C.; Middleton, Victoria; Cullum, Nicky (2015-09-03). "Support surfaces for pressure ulcer prevention". *The Cochrane Database of Systematic Reviews* (9): CD001735
31. Assis de Brito TL, Monte-Alto-Costa A, Romana-Souza B. Propranolol impairs the closure of pressure ulcers in mice. *Life Sci*. 2014;100(2):138-46
32. Schäffer MR, Tantry U, Efron PA, Ahrendt GM, Thornton FJ, Barbul A. Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: a possible pathophysiologic correlation. *Surgery*. 1997;121(5):513-9



33. Schwentker A, Vodovotz Y, Weller R, Billiar TR. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines?. *Nitric Oxide*. 2002;7(1):1-10
34. Romana-Souza B, Nascimento AP, Monte-Alto-Costa A. Propranolol improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2009;611(1-3):77-84
35. Zheng Z, Liu Y, Yang Y, Tang J, Cheng B. Topical 1% propranolol cream promotes cutaneous wound healing in spontaneously diabetic mice. *Wound Repair Regen*. 2017;25(3):389-397
36. Li, J., Chen, J., Kirsner, R., 2007. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin. Dermatol*. 25, 9–18
37. Frank, S., Kampfer, H., Podda, M., Kaufmann, R., Pfeilschifter, J., 2000. Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) keratinocytes: implications for keratinocyte proliferation. *Biochem. J*. 346, 719–728
38. Amadeu, T.P., Seabra, A.B., de Oliveira, M.G., Costa, A.M.A., 2007. S-nitrosoglutathione-containing hydrogel accelerates rat cutaneous wound repair. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol*. 21, 629–637
39. Azizkhan, R.G., Azizkhan, J.C., Zetter, B.R., Folkman, J., 1980. Mast cell heparin stimulates migration of capillary endothelial cells in vitro. *J. Exp. Med*. 152, 931–944
40. Meininger, C.J., Zetter, B.R., 1992. Mast cells and angiogenesis. *Semin. Cancer Biol*. 3, 73–79
41. Bitar, M.S., Labbad, Z.N., 1996. Transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I in relation to diabetes-induced impairment of wound healing. *J. Surg. Res*. 61, 113–119
42. Darby, I.A., Bisucci, T., Hewitson, T.D., MacLellan, D.G., 1997. Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 29, 191–200
43. Lobmann, R., Ambrosch, A., Schultz, G., Waldmann, K., Schiweck, S., Lehnert, H., 2002. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia* 45, 1011–1016
44. Tang JC, Dosal J, Kirsner RS. Topical timolol for a refractory wound. *Dermatol Surg*. 2012;38(1):135-8
45. Romana-Souza B, Nascimento AP, Monte-Alto-Costa A. Low-dose propranolol improves cutaneous wound healing of burn-injured rats. *Plast Reconstr Surg*. 2008;122(6):1690-9
46. Lev-Tov H, Dahle S, Moss J, Isseroff RR. Successful treatment of a chronic venous leg ulcer using a topical beta-blocker. *J Am Acad Dermatol*. 2013;69(4):e204-5
47. Herndon DN, Rodriguez NA, Diaz EC, Hegde S, Jennings K, Mlcak RP, et al. Long-term propranolol use in severely burned pediatric patients: a randomized controlled study. *Ann Surg*. 2012;256:402–11
48. Mackie EJ, Halfter W, Liverani D. Induction of tenascin in healing wounds. *J Cell Biol*. 1988;107(6 Pt 2):2757-67
49. Braun LR, Lamel SA, Richmond NA, Kirsner RS. Topical timolol for recalcitrant wounds. *JAMA Dermatol*. 2013;149(12):1400-2



50. Denda M, Hosoi J, Asida Y. Visual imaging of ion distribution in human epidermis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;272(1):134-7
51. Lee SH, Elias PM, Feingold KR, Mauro T. A role for ions in barrier recovery after acute perturbation. *J Invest Dermatol*. 1994;102(6):976-9
52. Pullar CE, Rizzo A, Isseroff RR. beta-Adrenergic receptor antagonists accelerate skin wound healing: evidence for a catecholamine synthesis network in the epidermis. *J Biol Chem*. 2006;281(30):21225-35
53. Pullar CE, Le Provost GS, O'Leary AP, Evans SE, Baier BS, Isseroff RR. β 2AR antagonists and β 2AR gene deletion both promote skin wound repair processes. *The Journal of investigative dermatology*. 2012;132(8):2076-2084. doi:10.1038/jid.2012.108
54. Souza B, Santos JS, Monte Alto Costa A. Blockade of β 1 and β 2 Adrenoceptors delays wound contraction and re-epithelialization in rats. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2006; 421:30. doi:10.1111/jid.1440-1681.2006.04383
55. Le Provost GS, Pullar CE. β 2-Adrenoceptor Activation Modulates Skin Wound Healing Processes to Reduce Scarring. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2015;135(1):279-288. doi:10.1038/jid.2014.312.
56. Beroukhi K, Rotunda AM. Topical 0.5% timolol heals a recalcitrant irradiated surgical scalp wound. *Dermatol Surg*. 2014;40(8):924-6
57. Vestita, M. , Bonamonte, D. and Filoni, A. (2016), Topical propranolol for a chronic recalcitrant wound. *Dermatologic Therapy*, 29: 148-149. doi:10.1111/dth.12328
58. Chiaverini C, Passeron T, Lacour JP. Topical timolol for chronic wounds in patients with junctional epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol*. 2016;75(6):e223-e224
59. Denda M, Fuziwara S, Inoue K. Beta2-adrenergic receptor antagonist accelerates skin barrier recovery and reduces epidermal hyperplasia induced by barrier disruption. *J Invest Dermatol*. 2003;121(1):142-8
60. LUND, OB. Hemangiomas infantiles. 2018. <https://sepeap.org/tag/hemangiomas-infantiles/> [accedit el 3 de Juny de 2018]
61. Granuloma piógeno: causas, complicaciones, extirpación y tratamiento alternativo. https://es.iliveok.com/health/granuloma-piogeno-causas-complicaciones-extirpacion-y-tratamiento-alternativo_125107i15941.html [accedit el 3 de Juny de 2018]
62. JONETTE E KERI. Rosacea. <https://www.msmanuals.com/home/skin-disorders/acne-and-related-disorders/rosacea> [accedit el 3 de Juny de 2018]
63. HORST C. Tratamiento para la hiperplasia angiolofoide con eosinofilia. 2015. <http://www.intramed.net/contenido.asp?contenidoID=85804> [accedit el 3 de Juny de 2018]
64. Melanoma maligno. <http://www.dermatologia.cat/es/melanomamaligne.html> [accedit el 3 de Juny de 2018]
65. Lerch MM, Hansen MJ, van Dam GM, Szymanski W, Feringa BL. Emerging Targets in Photopharmacology. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016 Sep 5;55(37):10978-99.



ANNEX

Als gràfics següents es mostra, en l'eix d'ordenades, el percentatge de cèl·lules respecte al total de la imatge, i a l'eix d'abscisses, el temps transcorregut (en minuts). En el gràfic es mostra la equació de la recta i el valor R^2 . Tenint en compte totes les pendents obtingudes de cada condició, es va calcular la mitjana per condició, i la desviació estàndard.

CONTROL

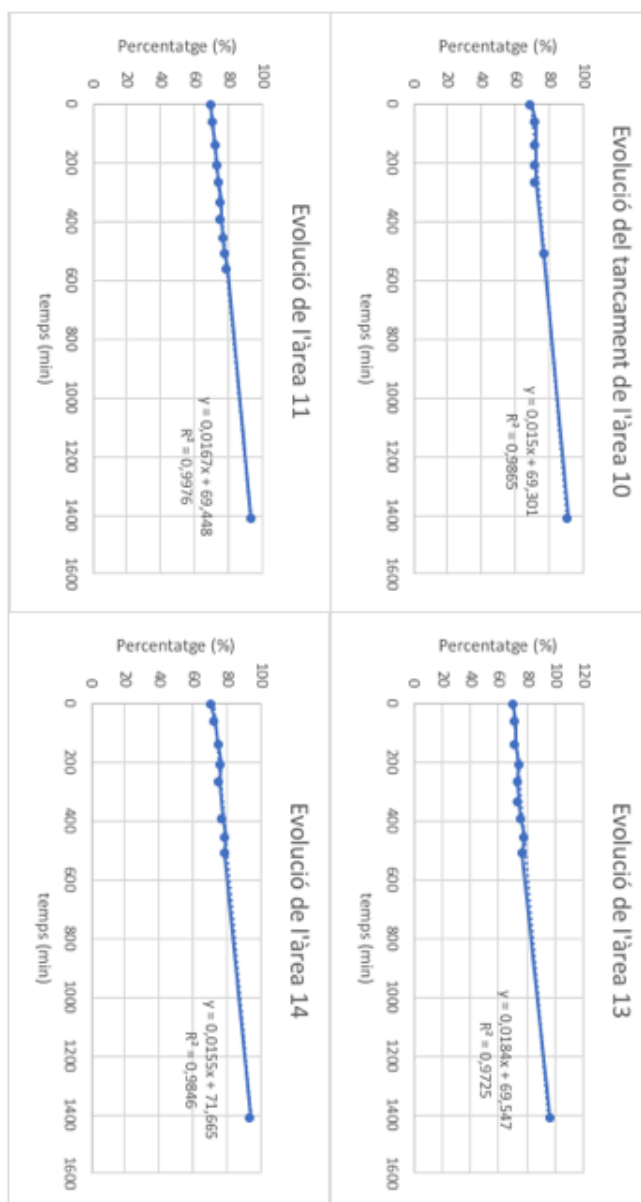


Figura 15. Gràfics de l'evolució de la condició Control (sense cap fàrmac). Consta de 4 àrees mesurades: 10, 11, 13 i 14. El resultat d'aquesta condició és una pendent de $0,0164 \pm 0,00151217$ ($\bar{x} \pm SD$)



CIMATEROL

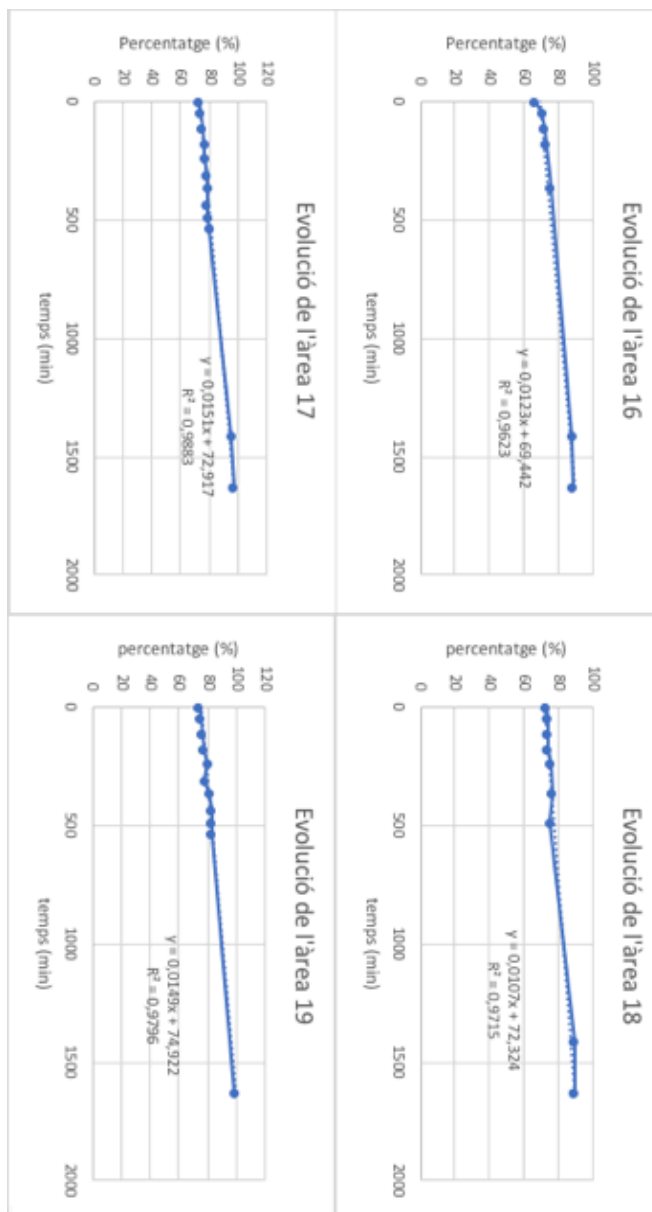


Figura 16. Gràfics de l'evolució de la condició Cimaterol (agonista, 10 μ M). Consta de 4 àrees mesurades: 16, 17, 18 i 19. El resultat d'aquesta condició és una pendent de $0,01325 \pm 0,00212525$ ($\bar{x} \pm SD$)



CARVEDIOL

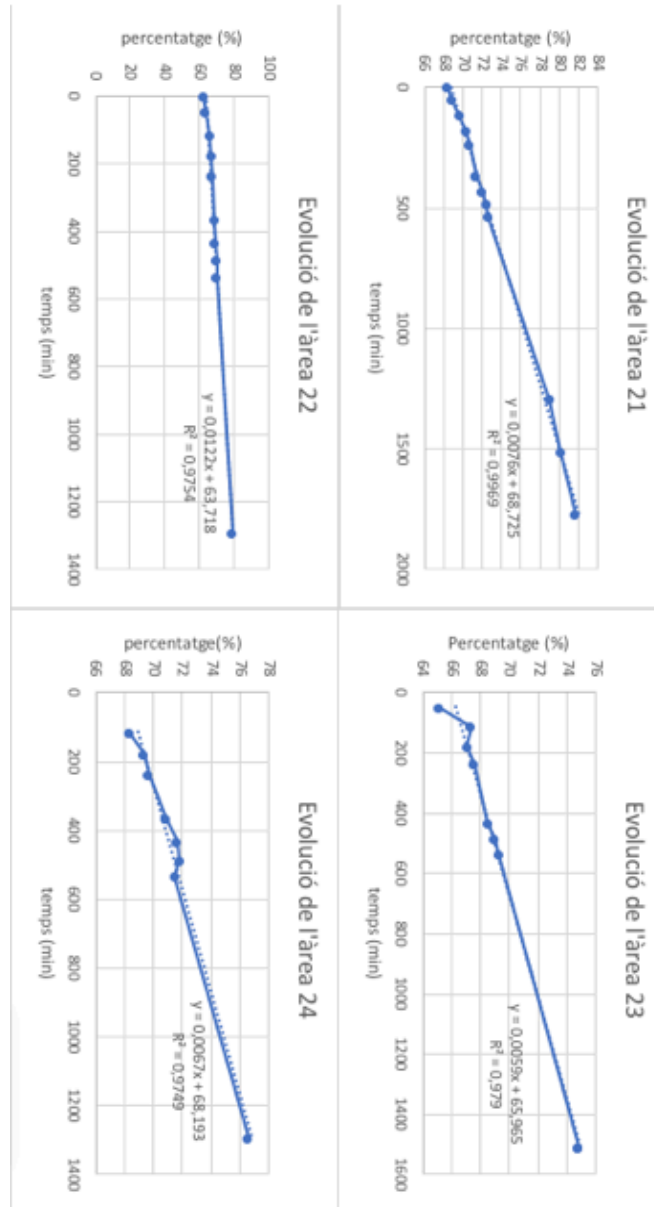


Figura 17. Gràfics de l'evolució de la condició Carvedilol (antagonista, 10uM). Consta de 4 àrees mesurades: 21, 22, 23 i 24. El resultat d'aquesta condició és una pendent de $0,0081 \pm 0,00282017$ ($\bar{x} \pm SD$)



PROPRANOLOL

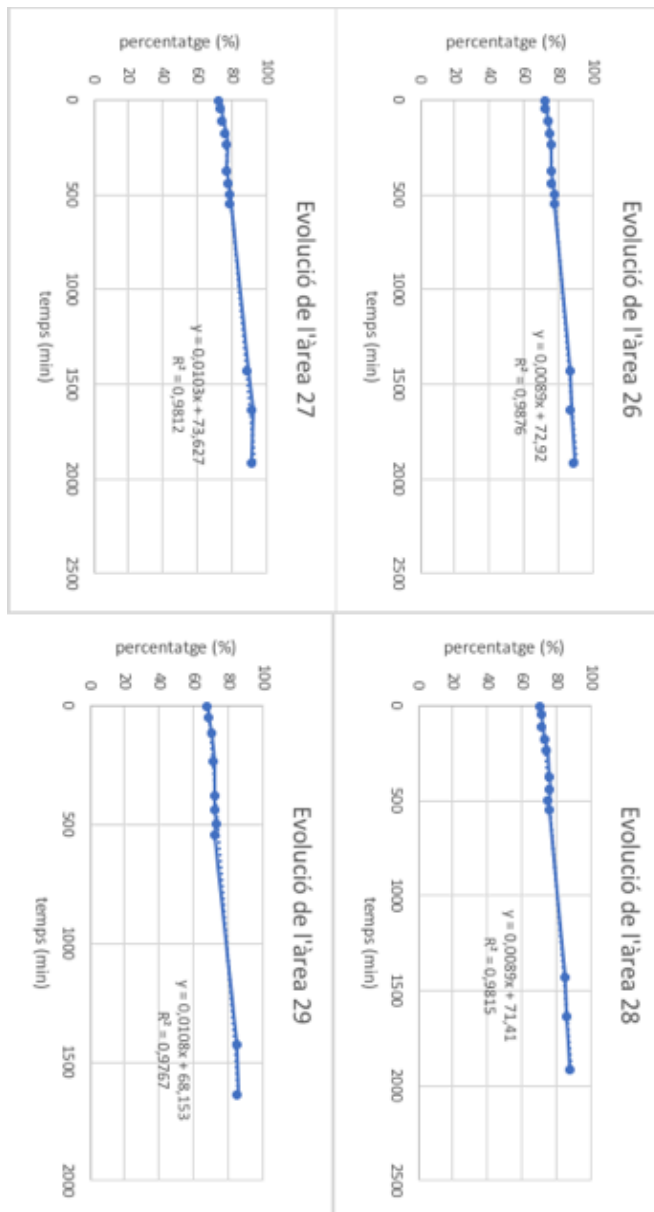


Figura 18. Gràfics de l'evolució de la condició Propranolol (antagonista, 10uM). Consta de 4 àrees mesurades: 26, 27, 28 i 29. El resultat d'aquesta condició és una pendent de $0,009725 \pm 0,00097425$ ($\bar{x} \pm SD$)