

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DEL PROCESO DE CICATRIZACIÓN DE HERIDAS TRATADAS
CON NANOCOMPÓSITOS A BASE DE QUITOSANO Y NANOPARTÍCULAS DE
ORO FUNCIONALIZADAS CON CALRETICULINA

Por

M.C. SARA PAOLA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

Como requisito para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

JUNIO, 2019

EVALUACIÓN DEL PROCESO DE CICATRIZACIÓN DE HERIDAS TRATADAS
CON NANOCOMPÓSITOS A BASE DE QUITOSANO Y NANOPARTÍCULAS DE
ORO FUNCIONALIZADAS CON CALRETICULINA

Comité de Tesis

Dra. Diana Ginette Zárate Triviño
Presidente

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario

Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal

Dr. Moisés Armides Franco Molina
Vocal

Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Vocal

Dr. Juan José Bollain y Goytia de la Rosa
Asesor externo

EVALUACIÓN DEL PROCESO DE CICATRIZACIÓN DE HERIDAS TRATADAS
CON NANOCOMPÓSITOS A BASE DE QUITOSANO Y NANOPARTÍCULAS DE
ORO FUNCIONALIZADAS CON CALRETICULINA

Dirección de tesis

Dra. Diana Ginette Zárate Triviño
Directora

Dr. Juan José Bollain y Goytia de la Rosa
Director Externo

I. AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la doctora Cristina Rodríguez Padilla jefa del departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas por la oportunidad de ingresar al posgrado.

A la doctora Diana Ginette Zárate Triviño por la oportunidad de formar parte del laboratorio de Nanobiotecnología y la confianza depositada en mí durante estos 5 años. Por sus enseñanzas y consejos para mi formación como investigadora, pero sobre todo por su amistad y apoyo incondicional tanto personal como académico.

A los doctores Pablo Zapata Benavides, Edgar Mendoza Gamboa, Moisés Franco Molina y Juan José Bollain y Goytia de la Rosa por la revisión y recomendaciones realizadas en el presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al personal académico, técnico y administrativo de los laboratorios de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por su ayuda en el desarrollo de este proyecto.

II. DEDICATORIA

A mi madre, hermanos y sobrinos por ser mi principal apoyo e inspiración para llevar a cabo y concluir esta etapa en mi vida.

A mis profesores por ser una parte integral en mi vida.

III. ÍNDICE

CONTENIDO

I.	AGRADECIMIENTOS.....	I
II.	DEDICATORIA.....	II
III.	ÍNDICE.....	III
IV.	ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
V.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
VI.	LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	IX
VII.	RESUMEN.....	XII
VIII.	ABSTRACT.....	XIII
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	ANTECEDENTES.....	3
2.1	Proceso de cicatrización.....	3
2.2	Proceso de cicatrización en heridas crónicas.....	5
2.3	Úlceras de pie diabético.....	6
2.4	Clasificación de úlceras de pie diabético.....	7
2.5	Tratamientos para úlceras de pie diabético.....	8
2.5.1	Desbridamiento.....	8
2.5.2	Factores de crecimiento.....	9
2.5.3	Insulina.....	10
2.6	Uso de nanomateriales en procesos de cicatrización.....	11
2.6.1	Nanopartículas de oro (AuNPs).....	12
2.6.2	Síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs).....	12
2.6.3	Funcionalización de nanopartículas de oro (AuNPs).....	13
2.6.4	Nanocompuestos.....	15
2.7	Calreticulina (CRT).....	15
2.7.1	Calreticulina (CRT) en procesos de cicatrización.....	16
3.	JUSTIFICACIÓN.....	18

4.	HIPÓTESIS	19
5.	OBJETIVO DEL TRABAJO	20
5.1	Objetivo general	20
5.2	Objetivos específicos	20
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	21
6.1	Síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs).....	21
6.2	Funcionalización de nanopartículas de oro (AuNPs) con calreticulina	21
6.3	Caracterización de nanopartículas de oro (AuNPs) y nanopartículas de oro funcionalizadas con calreticulina (AuNPs-CRT).....	21
6.4	Eficiencia de captura y porcentaje de liberación de CRT presente en AuNPs	22
6.5	Obtención y caracterización del nanocompósitos de AuNPs y AuNPs-CRT	22
6.6	Efecto citotóxico de calreticulina, AuNPs y AuNPs-CRT en queratinocitos fibroblastos y células endoteliales.....	23
6.7	Migración de fibroblastos (NIH/3T3) tratados con calreticulina, AuNPs y AuNP´s-CRT mediante ensayo de la herida.....	23
6.8	Producción de citocinas en fibroblastos (NIH/3T3) tratados con AuNPs-CRT	24
6.9	Activación del factor de transcripción nuclear NFκB en fibroblastos (NIH/3T3) tratados con AuNPs-CRT.....	25
6.10	Inducción de diabetes en ratones BALB/c	25
6.11	Inducción de la herida en ratones BALB/c	26
6.12	Análisis histológico del área de la herida.....	27
6.13	Expresión de proteínas relacionadas al proceso de cicatrización.....	28
6.14	Análisis estadístico.....	29
7.	RESULTADOS	30
7.1	Caracterización de nanopartículas de oro (AuNPs) y nanopartículas de oro funcionalizadas con calreticulina (AuNPs-CRT).....	30
7.2	Eficiencia de captura y porcentaje de liberación de calrticulina presente en AuNPs	32
7.3	Caracterización de nanocompósitos de AuNPs y AuNPs-CRT	33
7.4	Efecto citotóxico de calreticulina, AuNPs y AuNPs-CRT en queratinocitos fibroblastos y células endoteliales.....	35

7.5 Migración de células NIH/3T3 tratadas con calreticulina, AuNPs y AuNP's-CRT mediante ensayo de la herida	36
7.6 Producción de citocinas en fibroblastos (NIH/3T3) tratados con AuNPs-CRT	37
7.8 Activación del factor de transcripción nuclear NFκB en fibroblastos (NIH/3T3) tratados con AuNPs-CRT.....	40
7.9 Inducción de diabetes con estreptozotocina (STZ).....	40
7.10 Heridas tratadas con los nanocompuestos de AuNPs y AuNPs-CRT	42
7.11 Análisis histológico del área de la herida.....	44
7.12 Expresión de proteínas relacionadas al proceso de cicatrización.....	48
8. DISCUSIÓN	53
9. CONCLUSIONES.....	58
10. PERSPECTIVAS.....	59
11. REFERENCIAS	60
12. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO	67

IV. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de Wagner para úlceras de pie diabético.	7
Tabla 2. Tratamientos administrados en heridas del dorso de ratones	27
Tabla 3. Características de nanopartículas AuNPs y AuNPs-CRT sintetizadas.....	31
Tabla 4. Porcentaje de liberación de CRT presente en AuNPs	32
Tabla 5. Comparación del peso corporal y niveles de glucosa en sangre en grupo control y grupo diabético	41

V. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura de la piel humana.	3
Figura 2. Proceso de cicatrización.	5
Figura 3. Comparación del proceso de cicatrización en sujetos sanos contra pacientes diabéticos.	7
Figura 4. Clasificación de Wagner.	8
Figura 5. Efectos de la insulina tópica en la piel.	11
Figura 6. Obtención de quitosano por desacetilación de la quitina	13
Figura 7. Esquema representativo de la funcionalización de AuNPs.	14
Figura 8. Dominios estructurales de la calreticulina	16
Figura 9. Esquema de administración de estreptozotocina (STZ) para inducir diabetes.	26
Figura 10. Representación esquemática de recuperación y procesamiento de tejidos	28
Figura 11. Espectro UV-visibles de AuNPs y AuNPs-CRT.	30
Figura 12. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM).	31
Figura 13. Histogramas de distribución de tamaño de nanopartículas.	32
Figura 14. Curva de liberación de calreticulina.	33
Figura 15. Espectros IR del quitosano, AuNPs y AuNPs-CRT.	34
Figura 16. Patrón de difracción de rayos-X para nanocompuestos AuNPs y AuNPs- CRT.	35
Figura 17. Viabilidad de células HaCaT, NIH/3T3 y HUVEC.	36
Figura 18. Ensayo de migración en células NIH/3T3.	37
Figura 19. Expresión de citocinas TNF, INF- γ y MCP-1 en células NIH tratadas con AuNPs y AuNPs-CRT.	38
Figura 20. Expresión de citocinas IL-12p70, IL-10 y IL-6 en células NIH tratadas con AuNPs y AuNPs-CRT	39
Figura 21. Activación de NF κ B (p65) en células NIH tratadas con AuNPs-CRT.	40

Figura 22. Curva de tolerancia a la glucosa.....	41
Figura 23. Cicatrización de heridas en grupo control.....	42
Figura 24. Cicatrización de heridas en grupo diabético	43
Figura 25. Fotografías de heridas en dorso de ratones	43
Figura 26. Tinción de H&E de tejido del área de la herida	44
Figura 27. Tinción de H&E de tejido del área de la herida.	45
Figura 28. Tinción tricrómica de Masson de tejido del área de la herida.....	46
Figura 29. Tinción tricrómica de Masson de tejido del área de la herida.....	47
Figura 30. Expresión de Ang-1 en tejido del área de la herida por IFI	48
Figura 31. Expresión de VEGF en tejido del área de la herida por IFI.	49
Figura 32. Expresión de TGF- β_1 en tejido del área de la herida por IFI.	50
Figura 33. Expresión de CK-5 en tejido del área de la herida por IFI.....	51
Figura 34. Expresión de CRT en tejido del área de la herida por IFI.....	52

VI. LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ATR	Reflectancia total atenuada
AuNPs	Nanopartículas de oro
CK-5	Citoqueratina-5
CRT	Calreticulina
DAPI	4',6-Diamidino-2'fenilindol
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
ECM	Matriz extracelular
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EPCs	Células progenitoras endoteliales
ER	Retículo endoplásmico
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento derivado de fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de
Fourier	
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y

macrófagos	
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-12	Interleucina-12
INF- γ	Interferón gamma
IR	Receptor de insulina
IR	Infrarrojo
IRS1	Sustratos del receptor de insulina 1
IRS2	Sustratos del receptor de insulina 2
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
mL	mililitro
MMP	Metaloproteínasa de matriz
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)
NF κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
ng	nanogramos
NO	Óxido nítrico
PBS	Buffer fosfatos
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDI	Índice de polidispersidad
pg	picogramos
PI3K	Fosfatidil inositol-3 cinasa

rhVEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular humano
recombinante	
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
SDF-1 α	Factor derivado de células estromales
She	Proteína transformante 1
SPR	Plasmon de resonancia
STZ	Estreptozotocina
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
TGF β ₁	Factor de crecimiento transformante beta-1
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TR	Rojo Texas
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
ZP	Potencial zeta

VII. RESUMEN

El desarrollo de nuevos biomateriales para promover el proceso de cicatrización ha ido en aumento, debido a su administración tópica y fácil funcionalización con moléculas que pueden mejorar o acelerar el proceso. En este trabajo se sintetizó y evaluó un nanocompósito a base de quitosano y nanopartículas de oro (AuNPs) funcionalizadas con calreticulina (CRT). La capacidad del nanocompósito para promover la migración y proliferación celular se evaluó *in vitro*, y el proceso de cicatrización se evaluó *in vivo* en un modelo de diabetes inducida en ratones con estreptozotocina (STZ). *In vitro* el nanocompósito no afectó la viabilidad celular de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales, aceleró el proceso de migración en fibroblastos e incrementó la producción de citocinas inflamatorias por activación del factor NFκB, sin desencadenar un proceso inflamatorio crónico. *In vivo* las heridas en los ratones tratadas con el nanocompósito presentaron una regeneración tisular significativamente más rápida, la evaluación histológica demostró re-epitelización y formación de tejido granular, así como un aumento en la deposición de colágeno tipo I. Además, se incrementó la expresión de las principales proteínas involucradas en el proceso de cicatrización como angiopoyetina-1, VEGF, TGF-β₁ y CK-5.

VIII. ABSTRACT

The development of new nanomaterials to promote wound healing the rise, because of their topical administration and easy functionalization with molecules that can improve and accelerate the process. A nanocomposite of gold nanoparticles (AuNPs) functionalized with calreticulin (CRT) was synthesized and evaluated. The ability of the nanocomposite to promote proliferation and migration was determined *in vitro*, and the process of healing *in vivo* in a mice model of diabetes established with streptozotocin (STZ). *In vitro*, the nanocomposite did not affect the cell viability of keratinocytes, fibroblast, and endothelial cells, accelerates fibroblast migration and increased the production of cytokines by activation of the factor NF κ B without triggering a chronic inflammatory process. *In vivo* mice treated with the nanocomposite presented significantly faster tissue regeneration. The histological evaluation showed re-epithelization and the formation of granular tissue, as well as an increase of collagen deposition. On the other hand, the nanocomposite increased the expression of proteins involved in the process of healing as angiopoietin-1, VEGF, TGF- β_1 y CK-5.

1. INTRODUCCIÓN

La piel es el mayor órgano del cuerpo humano que actúa como una barrera protectora hacia el medio exterior (Sorg H. *et al.* 2017) ocasionando susceptibilidad a sufrir diversas lesiones o heridas, debido a esto el proceso de cicatrización es vital para la supervivencia de los organismos. Este proceso es conservado entre las especies y se identifica por 3 etapas: inflamación, proliferación celular y remodelación de la matriz extracelular (ECM) (Takeo M. *et al.* 2015).

Las heridas crónicas como las úlceras de pie diabético presentan alteraciones en las etapas del proceso de cicatrización, debido a un desequilibrio en la producción de citocinas proinflamatorias, disminución de factores de crecimiento, alteraciones en el depósito de colágeno, proliferación celular, síntesis de proteínas e incremento de apoptosis (Goldman R. 2004).

La incidencia de estas heridas ha alcanzado proporciones epidémicas y los resultados obtenidos con los diversos tratamientos no han proporcionado buenos resultados, por lo que surge la necesidad de investigar terapias eficientes (Hamdan S. *et al.* 2017).

El uso de nanopartículas de oro (AuNPs) ha desencadenado una gran área de estudio en la biomedicina, debido a sus propiedades únicas como tamaño, una gran área de superficie, alta reactividad con las células y penetración dentro de estas (Tiwari PM, *et al.* 2012). Además de la fácil funcionalización con biomoléculas como proteínas, anticuerpos y péptidos para promover el proceso de cicatrización (Leu J. *et al.* 2012, Regiel-Futyra A. *et al.* 2015). Es por esto que un nanocompuesto fue diseñado para aprovechar las propiedades bactericidas y anti-inflamatorias de las AuNPs y la modificación de su superficie mediante el anclaje o funcionalización con CRT

En este estudio se evaluó un nanocompósito a base de quitosano y nanopartículas de oro (AuNPs) funcionalizadas con calreticulina (CRT) para el tratamiento de heridas en un modelo murino de diabetes.

2. ANTECEDENTES

2.1 Proceso de cicatrización

La piel es el mayor órgano del cuerpo humano que actúa como una barrera protectora del medio exterior. Está compuesta por 3 capas: la epidermis formada por 6 estratos de queratinocitos, dermis formada por fibras de colágena, fibroblastos y macrófagos, e hipodermis integrada por adipocitos y vasos sanguíneos (figura 1) (Sorg H. *et al.* 2017).

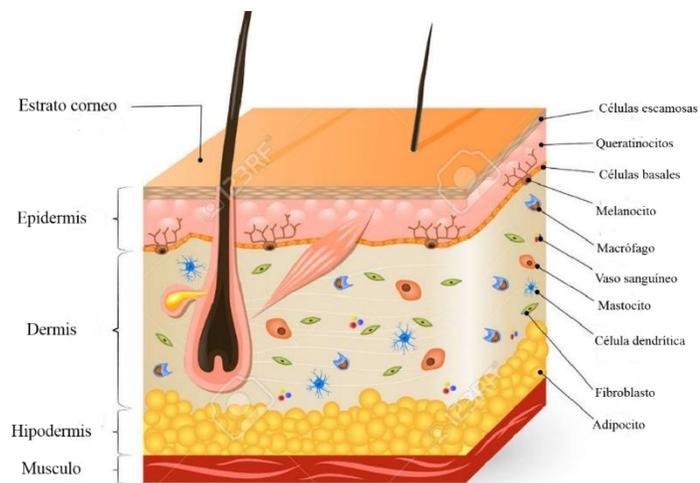


Figura 1 Estructura de la piel humana. Diagrama anatómico de la piel: epidermis, dermis, hipodermis y musculo. (Designua Professional Photography & Design Profile).

Debido a que la piel es susceptible a sufrir diversas lesiones o heridas, el proceso de cicatrización es vital para la supervivencia de los organismos. El proceso de cicatrización es conservado entre las especies y se identifica por 3 etapas: inflamación, proliferación celular y remodelación de la matriz extracelular (ECM) (Takeo M. *et al.* 2015).

La etapa de inflamación se presenta del día 1 al 5 posteriores a la lesión. Esta se caracteriza por una respuesta inflamatoria producida por neutrófilos y macrófagos, que generan citocinas inflamatorias como: interleucina-1 (IL-1 β), factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interferón gamma (INF- γ), factores de crecimiento como: factor transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y especies reactivas de oxígeno (ROS) (González ACO. *et al.* 2016).

La etapa de proliferación se observa del día 5 al 14 y se caracteriza por proliferación de células endoteliales que desencadenan la angiogénesis. Además, se observa proliferación de fibroblastos y biosíntesis de colágena para el desarrollo de ECM lo que propicia la formación del tejido granular. Finalmente, los queratinocitos a través de la acción de las citocinas y factores de crecimiento proliferan y migran desde los bordes de la herida para intentar cerrarla y generar la re-epitelización (González ACO. *et al.* 2016).

La última etapa consiste en la remodelación de la ECM que comienza después del día 14 y puede durar un año o más. El objetivo de esta etapa es recuperar la estructura tisular normal y la remodelación del tejido granular, formando tejido cicatricial que muestra un aumento en la concentración de fibras de colágeno (figura 2) (González ACO. *et al.* 2016).

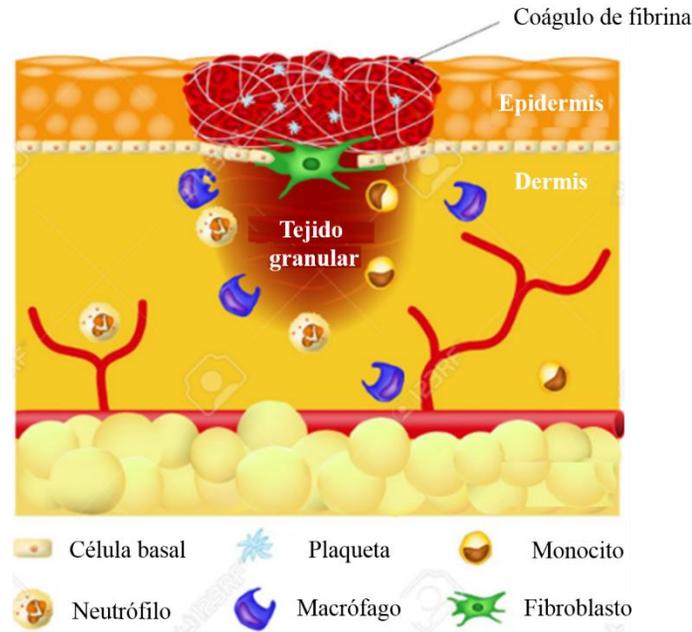


Figura 2. Proceso de cicatrización. Proceso de cicatrización en herida cutánea después de la lesión. (Designua Professional Photography & Design Profile).

2.2 Proceso de cicatrización en heridas crónicas

Las heridas crónicas son aquellas que presentan alteraciones en las etapas del proceso de cicatrización, debido a un desequilibrio en la producción de citocinas proinflamatorias, disminución de factores de crecimiento, alteraciones en el depósito de colágeno, proliferación celular, síntesis de proteínas e incremento de apoptosis (Goldman R. 2004).

Esta clase de heridas se caracterizan por presencia de inflamación crónica, causada por la excesiva infiltración de neutrófilos, que son considerados como un marcador biológico significativo, ya que liberan grandes cantidades de metaloproteinasa de matriz (MMP) responsables de la destrucción del tejido conectivo, y de elastasa, que es capaz de afectar factores de crecimiento como TGF- β y PDGF, disminuyendo la proliferación de fibroblastos. Otro marcador a considerar es la excesiva presencia de ROS que dañan las células y los tejidos en curación (Diegelmann R. y Evans M. 2004).

2.3 Úlceras de pie diabético

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico caracterizado por altos niveles de glucosa en sangre y cambios en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, causado por alteraciones en la secreción y acción de la insulina (Moura LIF. *et al* 2013). Una de las complicaciones comunes en estos pacientes es el desarrollo de úlceras de pie diabético (Hoke GD. *et al.* 2016), una vez que desarrollan este tipo de lesión existe un mayor riesgo de progresión de la herida que en última instancia puede conducir a amputación del miembro comprometido. Más del 85% de amputaciones de pie, son causadas por este tipo de lesión (Moura LIF. *et al* 2013). La incapacidad de curación en estos pacientes es multifactorial y se caracteriza principalmente por una respuesta inflamatoria prolongada debido a la excesiva producción de IL-1 β , TNF- α e interleucina-6 (IL-6), además los altos niveles de glucosa en sangre producen una disminución en la proliferación y migración de fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales, en la producción de colágena y factores de crecimiento como VEGF y TGF-1 β (Tan WS. *et al* 2019).

En individuos sanos el proceso de cicatrización es guiado y mantenido por múltiples señales producidas por queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y plaquetas. La producción de VEGF induce la fosforilación y activación de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) resultando en un aumento de los niveles de óxido nítrico (NO), lo que desencadena la migración de células progenitoras endoteliales (EPCs) al sitio de lesión, donde participan en la neovascularización. En cambio, en un paciente diabético la fosforilación de eNOS se ve afectada, limitando la migración de EPCs. De igual manera, la expresión del factor derivado de células estromales-1 α (SDF-1 α) disminuye en células epiteliales y fibroblastos afectando la migración de las EPCs al sitio de lesión impidiendo el proceso de cicatrización (figura 3) (Brem H. y Tomic-Canic M. 2007).

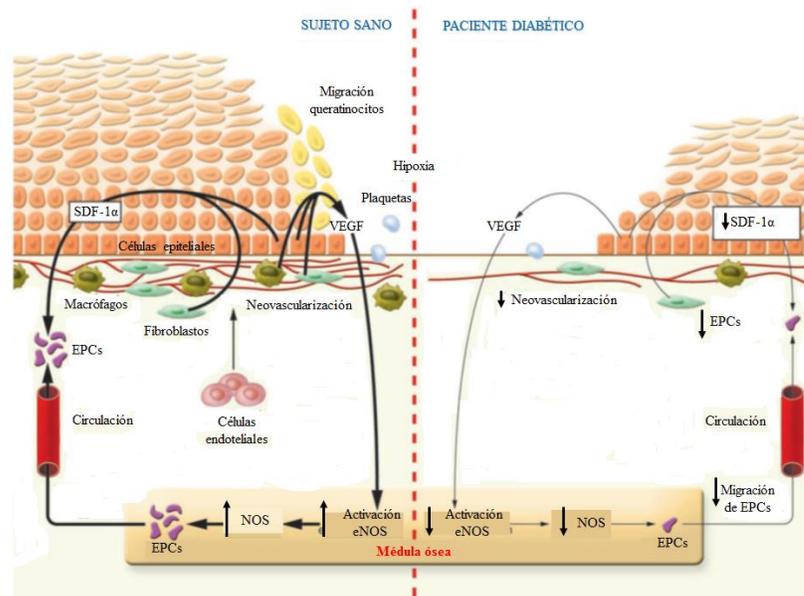


Figura 3. Comparación del proceso de cicatrización en sujetos sanos contra pacientes diabéticos. La expresión de VEGF y SDF-1 α se ve afectada en pacientes diabéticos, lo que retarda el proceso de cicatrización (Brem H. y Tomic-Canic M. 2007).

2.4 Clasificación de úlceras de pie diabético

La finalidad del manejo de las úlceras de pie diabético es prevenir la amputación y mantener una buena calidad de vida del paciente.

La existencia de isquemia, infección y la profundidad de la ulcera influye significativamente en la evolución de esta, ya sea hacia la curación o la amputación (del Castillo RA. *et al* 2014). Según su severidad, profundidad, grado de infección y necrosis, las úlceras se clasifican en 6 estadios (tabla 1 y figura 4) (Protocolos de cuidado de pie diabético 2005).

Tabla 1. Clasificación de Wagner para úlceras de pie diabético.

Grado	Lesión	Característica
0	Ninguna, pie de riesgo	Callos gruesos, cabezas metatarsianas prominentes, dedos en garra y deformidades óseas.
1	Úlceras superficiales	Destrucción total del espesor de la piel
2	Úlceras profundas	Penetra en la piel y ligamentos sin afectar hueso, con presencia de infección
3	Úlceras profundas más absceso	Extensa, profunda, con presencia de secreción y mal olor
4	Gangrena limitada	Necrosis de una parte del pie
5	Gangrena extensa	Necrosis en la totalidad del pie



Figura 4. Clasificación de Wagner. Representación de los estadios de la clasificación Wagner de para úlceras de pie diabético.

2.5 Tratamientos para úlceras de pie diabético

2.5.1 Desbridamiento

El estándar de oro para las úlceras de pie diabético es el desbridamiento de la herida y el lavado constante del área de lesión para evitar desarrollo de infecciones. El desbridamiento se lleva a cabo para eliminar los desechos de la superficie y los tejidos necróticos.

Este método mejora la cicatrización al promover la producción de tejido granular y se puede lograr de manera quirúrgica, enzimática y biológica.

El desbridamiento quirúrgico se realiza mediante el uso de escalpelos, eliminando la hiperqueratosis y el tejido necrótico hasta producir un lecho de úlcera sangrante. En caso de existir isquemia severa el examen debe posponerse hasta que se haya realizado un examen vascular (Alexiadou K. y Doupis J. 2012).

El desbridamiento enzimático consiste en la utilización de enzimas que degradan el tejido necrótico, las enzimas más utilizadas son: colagenasa, papaína, estreptoquinasa y tripsina. Previo a este tratamiento, la herida debe ser lavada con soluciones compatibles con el agente enzimático evitando el uso de productos con iones metálicos. (Alexiadou K. y Doupis J. 2012, Mengarelli RH, *et al* 2013).

El desbridamiento biológico es una técnica que utiliza larvas estériles de la mosca *Lucilia Sericata*. Estas larvas actúan produciendo enzimas que degradan el tejido necrótico y bacterias, dejando el tejido sano intacto.

Informes recientes sugieren que este método es eficaz en la eliminación de patógenos resistentes a fármacos como *Staphylococcus aureus* (Alexiadou K. y Doupis J. 2012, Mengarelli RH, *et al* 2013).

2.5.2 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento han constituido una nueva estrategia terapéutica en enfermedades vasculares, ya que existen diversos estudios que han demostrado que su aplicación local en heridas crónicas favorece el proceso de cicatrización, siendo beneficiadas las úlceras de pie diabético (Montequin J. *et al* 2010).

Dentro de los factores de crecimiento evaluados se encuentran el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el cual regula la proliferación y diferenciación de células madre, células hematopoyéticas, células endoteliales, fibroblastos y queratinocitos. De igual manera aumenta la angiogénesis y la formación de tejido granular, ligado a un incremento de VEGF (Ubillos N. *et al* 2018).

También el factor de crecimiento epidérmico (EGF) contribuye a la disminución de amputaciones de pie diabético en lesiones de grado 1 y 2 de Wagner, ya que estimula la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Este efecto puede deberse a la reducción del estrés oxidativo el cual retarda el proceso de cicatrización (Qi M. *et al* 2018).

Otro factor importante en este proceso es el VEGF, el cual incrementa la angiogénesis. En 2008 se utilizó VEGF humano recombinante (rhVEGF) en un ensayo clínico y se observó que tenía una tendencia a reducir el tiempo de curación, sin embargo, estos resultados no fueron significativos en comparación con el placebo. Esto puede deberse al complejo microambiente presente en el área de lesión (Qi M. *et al* 2018).

A pesar de los resultados observados la eficacia de los factores de crecimiento en la práctica clínica requiere de una mayor exploración (Qi M. *et al* 2018).

2.5.3 Insulina

La insulina se ha propuesto como agente terapéutico en heridas por quemaduras, en donde se ha observado que tiene efectos sobre las células endoteliales al estimular la liberación de NO, permitiendo la formación de nuevos vasos sanguíneos (Li Ch. *et al* 2015). En estudios clínicos con pacientes y animales diabéticos la insulina redujo el proceso inflamatorio y aumento la deposición de fibras de colágena acelerando el proceso de cicatrización (Zhang Z. y LV L. 2016), y en pacientes no diabéticos estimuló la proliferación y migración de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales mejorando la re-epitelización y angiogénesis (Yu T. *et al* 2017). Pelegrinelli F. y colaboradores en 2001 demostraron la presencia de receptores de insulina en los cuerpos celulares de la epidermis, dermis y folículos pilosos. El receptor de insulina (IR) es una glicoproteína transmembranal heterotetramérica que después de la unión con la insulina produce una autofosforilación promoviendo el reclutamiento de proteínas adaptadoras como los sustratos del receptor de insulina 1 y 2 (IRS1/2), lo que lleva a la activación de dos vías principales de señalización: fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y la de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Emanuelli T. *et al* 2016).

La vía de señalización de la insulina en el proceso de cicatrización juega un papel muy importante ya que se ha observado que las proteínas involucradas en la acción de la insulina (IR, IRS-1, IRS-2, proteína transformante-1 (Shc), ERK y PKB/Akt) aumentan en lesiones cutáneas (figura 5) (Emanuelli T. *et al* 2016).

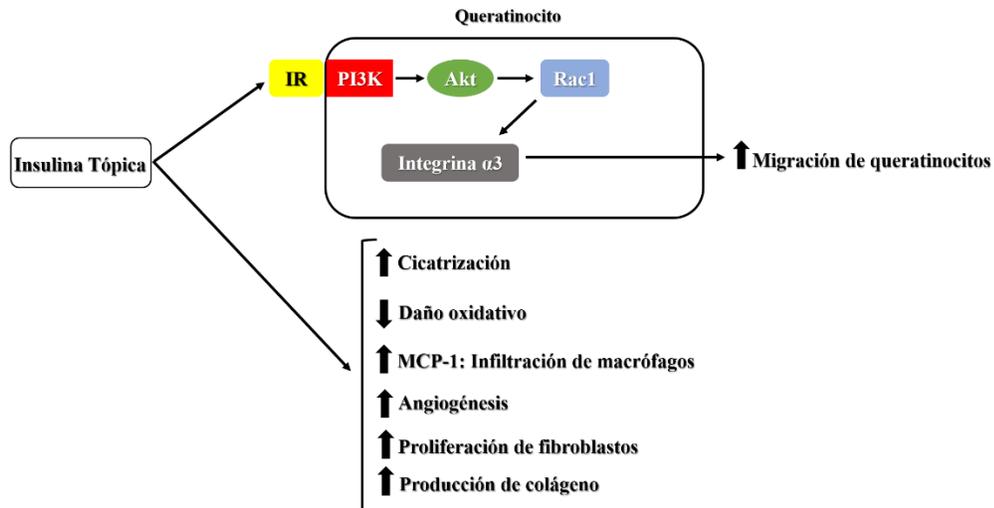


Figura 5. Efectos de la insulina tópica en la piel. Mecanismos celulares producidos por la insulina en heridas cutáneas (Emanuelli T. *et al* 2016).

Debido a la incidencia de heridas crónicas (venosas, pie diabético o úlceras por presión) va en aumento alcanzando proporciones epidémicas y que los resultados obtenidos con los diversos tratamientos no han proporcionado pruebas de la eficacia y la rentabilidad de estos métodos, surge la necesidad de encontrar terapias más eficientes mediante el uso de la nanotecnología (Hamdan S. *et al.* 2017).

2.6 Uso de nanomateriales en procesos de cicatrización

La nanotecnología es una rama de la tecnología que manipula la materia en rangos nanométricos entre 1-100 nm, manipulando sus propiedades mecánicas, térmicas y catalíticas al aumentar o disminuir la relación del volumen con el área de superficie. Estas nuevas propiedades permiten la aplicación de los nanomateriales en varias áreas biológicas como el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos, biosensores, imagenología, como terapia contra el cáncer, regeneración de tejidos, entre otros (Boisseau P y Loubaton B. 2011, Rajendran NK, *et al* 2018).

Debido a las diversas complicaciones asociadas con la diabetes, la búsqueda de un material adecuado que contribuya a acelerar el proceso de cicatrización continúa siendo un desafío.

Es por esto por lo que las investigaciones actuales se han enfocado en el desarrollo de nanomateriales poliméricos biocompatibles (alginato, colágeno, ácido hialurónico y quitosano) que ayuden a dicho proceso, además la introducción de nanopartículas (NPs) ha demostrado una notable mejora, ya que estas aceleran el proceso de curación (Rajendran NK. *et al.* 2018, Vijayakumar V. *et al.* 2019).

Entre las nanopartículas metálicas más estudiadas se encuentran las de oro, plata, óxido de titanio, hierro y cobre, siendo las de oro las más utilizadas debido a su baja citotoxicidad (Tiwari PM. *et al.* 2011).

2.6.1 Nanopartículas de oro (AuNPs)

Las nanopartículas de oro AuNPs, son estructuras esféricas con tamaños entre 1-100 nm, son las nanopartículas metálicas más estables y presentan grandes ventajas, además de que su síntesis es fácil, y su forma y tamaño puede controlarse mediante diferentes parámetros. Por otro lado, su gran área de superficie se utiliza como un excelente andamio para la unión de diversos grupos específicos lo que lleva a respuestas rápidas y a una alta sensibilidad, además de ser compatibles con los sistemas biológicos (Chen H, *et al.* 2018).

2.6.2 Síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs)

Las AuNPs son una suspensión coloidal de partículas de oro de tamaños nanométricos que se obtienen a partir de una reacción de reducción de ácido cloroáurico (HAuCl_4) en presencia de un agente estabilizante. El método más utilizado es el desarrollado por Turkevich en 1951, el cual usa citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) como agente reductor.

Este método ha sufrido diversas modificaciones en las condiciones de reacción y en los agentes reductores utilizados, la mayoría de los métodos reportados usan agentes químicos que son altamente reactivos y presentan grandes riesgos para la salud (Tiwari PM. *et al.* 2011).

Por lo que en los últimos años se ha desarrollado la síntesis verde, donde se utiliza como agentes reductores extractos de plantas o polímeros naturales con enlaces glucosídicos como el quitosano (Jeyasekaran E. y Venkatachalam S. 2016).

El quitosano es un polisacárido que se obtiene de la quitina, al someterse a una reacción de desacetilación y consiste en dos subunidades distribuidas aleatoriamente β -(1-4)-D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina (figura 6).

La presencia de abundantes grupos hidroxilo (OH) y grupos amino (NH_2) en su estructura potencializa sus características de reducción y estabilización, por lo que puede ser usado para la síntesis de AuNPs (Jeyasekaran E. y Venkatachalam S. 2016).

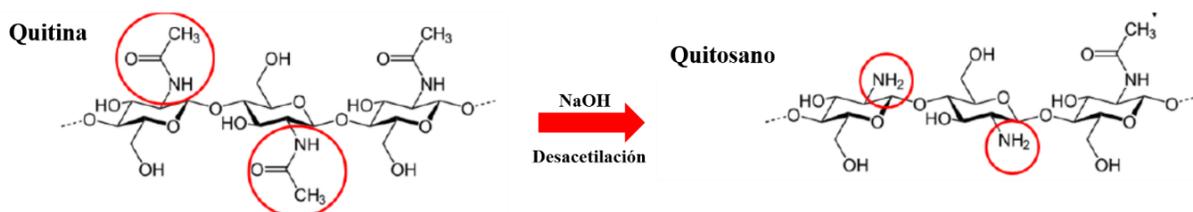


Figura 6. Obtención de quitosano por desacetilación de la quitina (Raftery R. *et al* 2013)

2.6.3 Funcionalización de nanopartículas de oro (AuNPs)

La funcionalización de las nanopartículas con moléculas les proporciona una alta estabilidad, sensibilidad y selectividad que puede facilitar una respuesta específica (Chen H, *et al.* 2018, Vedhanayagam M, *et al.* 2019).

La absorción electrostática, el enlace covalente y el reconocimiento específico son tres tipos de métodos generalmente utilizados para el anclaje de moléculas a la superficie de las AuNPs (figura 7). En el caso de la absorción electrostática se lleva a cabo una atracción entre moléculas con cargas opuestas. La estabilidad de la unión es dependiente del pH de la solución y de la concentración de sales, donde cualquier cambio puede desencadenar el desprendimiento del ligando.

El enlace covalente le confiere una gran estabilidad a la nanopartícula de modo que puede soportar altas concentraciones de sal, tratamiento térmico y ataque de otras moléculas. La principal característica se debe a la fuerte afinidad entre el grupo tiol (-SH) y el oro (Au), específicamente el átomo de azufre de un tiol contribuye con un par de electrones a los orbitales vacíos de los átomos de oro formando la conjugación de nanopartículas de oro con motivos tiol.

Actualmente, moléculas derivadas o modificadas de grupos tiol (-SH) como el glutatión, tioéteres péptidos de DNA y proteínas se han utilizado para la funcionalización de AuNPs.

El reconocimiento específico se basa en el principio de especificidad de la molécula ligando a la molécula analito, por ejemplo, las AuNPs funcionalizadas con anticuerpos como la estraptavidina son usadas para la detección de proteínas biotilinas (Chen H, *et al.* 2018).

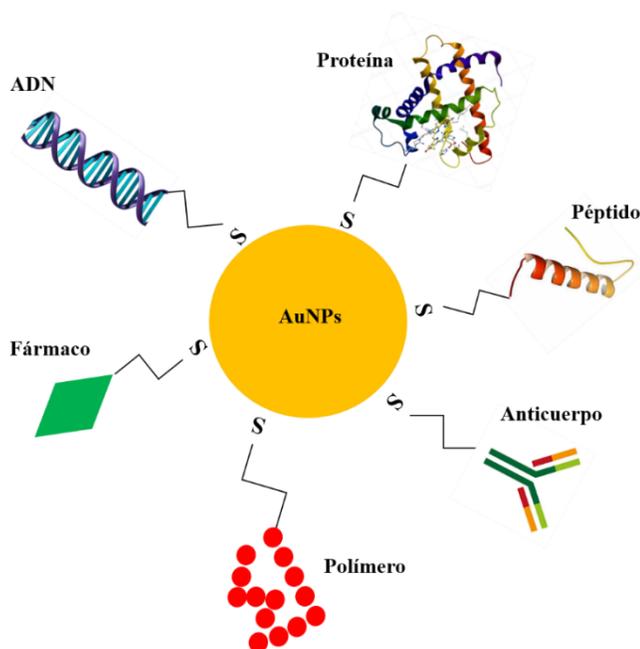


Figura 7. Esquema representativo de la funcionalización de nanopartículas de oro (modificado de Tiwari PM. *et al.* 2011).

El uso de AuNPs funcionalizadas con proteínas han demostrado buenos efectos en el proceso de cicatrización de heridas (figura 6) (Leu JG. *et al.* 2012, Regiel-Futyra A. *et al.* 2015), además de que se ha observado que las AuNPs funcionalizadas reducen la activación de mastocitos, macrófagos y células T afectando la liberación de citocinas, lo que disminuye el proceso inflamatorio (Al Enizi AM. *et al.* 2018).

2.6.4 Nanocompósitos

Los nanocompósitos son matrices poliméricas que incorporan nanopartículas dentro de esta, generando nuevas propiedades, que son atribuidas a la naturaleza del polímero utilizado y al contenido y tamaño de las nanopartículas incorporadas (Zare Y. y Shabani I. 2016). En el área biomédica los polímeros naturales (alginato, quitosano y celulosa) y sintéticos (ácido poliláctico, policaprolactona, alcohol polivinílico y polihidroxibutirato) son utilizados debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad (Zare Y. y Shabani I. 2016), además de que estos sirven como un soporte para la organización celular y el desarrollo de tejidos (Zsedenyi A. *et al.* 2017).

En los últimos años el quitosano se ha vuelto un material muy innovador en la liberación de fármacos, regeneración de tejidos y como agente antiinflamatorio y antibacterial (Ahmed S. y Ikram S. 2016), es por esto por lo que su uso en procesos de cicatrización ha incrementado considerablemente debido a estudios clínicos *in vitro*, donde se ha demostrado que tanto la quitina como el quitosano presentan efectos benéficos en la cicatrización de heridas y la regeneración (Azuma *et al.* 2015), además estudios realizados por Muzzarelli demostraron que este polisacárido promueve la cicatrización y la re-epitelización, estimula la interacción integrina-célula, previene infecciones y puede controlar la liberación de citocinas, componentes de matriz extracelular y antibióticos (Muzzarelli R. 2009). Todo esto a su propiedad inmunomoduladora que deriva de la capacidad que tiene para activar a los macrófagos incrementando los niveles de interleucina 12 (IL-12), interferón- γ , la expresión de IL-1 β e induciendo la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Muzarrelli 2009).

2.7 Calreticulina (CRT)

La calreticulina es una proteína chaperona de unión al calcio (Ca^{+2}) localizada principalmente en el retículo endoplásmico (ER) de todas las células eucariotas. Está constituida por tres dominios estructurales y funcionales: el dominio N-terminal que está altamente conservado entre las especies y desempeña un papel en la actividad chaperona, el dominio P que es rico en prolina y actúa como un

componente estructural y en la actividad chaperona, y el dominio C-terminal que es responsable de la unión a Ca^{+2} (figura 8) (Wang WA, *et al.* 2012).

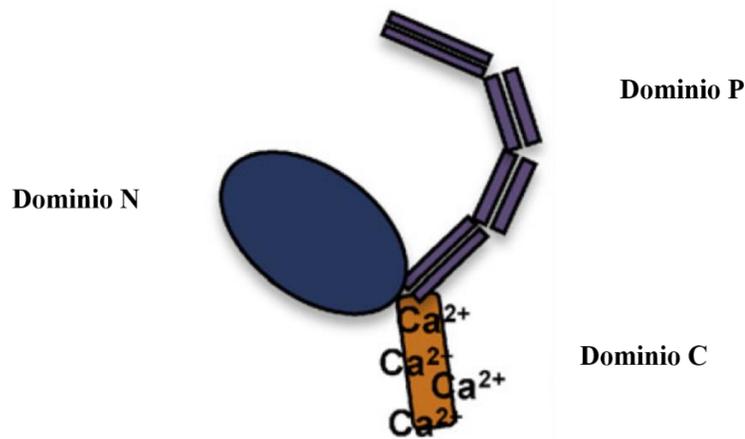


Figura 8. Dominios estructurales de la calreticulina

En los últimos 20 años la compleja funcionalidad de esta proteína dentro y fuera del ER se ha expandido exponencialmente ya que está implicada en casi todos los aspectos de la función celular fisiológica y patológica, incluyendo salud, enfermedad y regulación de muerte celular (Eggleton P, *et al* 2013).

La CRT por su naturaleza es capaz de unirse a varias proteínas glucosiladas y no glucosiladas en estado de plegamiento, pero debido a su carga negativa también se une a proteínas y lípidos catiónicos. Mediante ensayos de unión en fase sólida un gran número de características de unión de esta proteína fueron revelados. 1) La CRT se une preferentemente a péptidos hidrofóbicos, 2) no se une a péptidos de menos de 5 aminoácidos y 3) interactúa con los grupos tiol (-SH) y enlaces disulfuros (S-S). La capacidad de unión a diversas moléculas se debe a la naturaleza flexible de la cabeza globular y al dominio P de la proteína (Eggleton P, *et al* 2013).

2.7.1 Calreticulina (CRT) en procesos de cicatrización

La CRT además de estar presente en el ER, también se puede localizar en la superficie celular y en el espacio extracelular, donde regula una gran variedad de procesos biológicos.

Por ejemplo, se ha observado que la CRT está involucrada en el reconocimiento y procesamiento de antígenos en la respuesta inmune adaptativa, en el reconocimiento de células cancerosas por células dendríticas, en la fagocitosis de células apoptóticas y en la adhesión, migración y proliferación celular. Debido a esto la CRT está emergiendo como un mediador crítico en procesos fisiológicos y patológicos, como la curación de heridas, la respuesta inmune y el cáncer (Gold LI. *et al.* 2010).

Greives MR y colaboradores en 2012 reportaron que la aplicación exógena de CRT de manera tópica mejora notablemente la velocidad y la calidad de reparación de heridas parciales y de espesor total en un modelo porcino e *in vitro* estimula la proliferación de fibroblastos y queratinocitos, y media la migración de macrófagos al sitio de lesión. De igual manera, en un modelo murino observaron un incremento significativo en la proliferación de queratinocitos de la capa basal y suprabasal de la epidermis, y en fibroblastos de la dermis (Greives MR. *et al.* 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

La incidencia de heridas crónicas (venosa, por presión y diabéticas) ha alcanzado proporciones epidémicas, ya que del 44% al 77% de los pacientes con estas afecciones no presentan curación. En el caso de los pacientes con úlceras de pie diabético si no son tratados adecuadamente puede desencadenar con amputación del miembro comprometido.

Por esta razón surge la necesidad de buscar terapias más eficientes que no solo aceleren el proceso de cicatrización, si no que propicien un ambiente adecuado para la migración y proliferación de fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales, así como la producción de factores de crecimiento que permitan la producción de colágeno, la re-epitelización y la formación de tejido granular, manteniendo la integridad del tejido.

En el presente estudio se evaluó un nanocompósito a base de quitosano, nanopartículas de oro (AuNPs) y calreticulina, para el tratamiento de heridas en ratones diabéticos. Este nanocompósito fue diseñado tomando las ventajas antiinflamatorias y antibactericidas de las AuNPs, y su fácil funcionalización con biomoléculas.

4. HIPÓTESIS

El nanocompósito a base de quitosano y nanopartículas de oro funcionalizadas con calreticulina favorece el proceso de cicatrización en un modelo experimental de diabetes en ratones.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto del nanocompósito sintetizado a partir de quitosano y nanopartículas de oro funcionalizadas con calreticulina en el proceso de cicatrización en un modelo experimental de diabetes en ratones.

5.2 Objetivos específicos

1. Sintetiza y caracterizar AuNPs con y sin calreticulina.
2. Determinar la eficiencia de captura y el porcentaje de liberación de calreticulina anclada a las AuNPs.
3. Caracterizar nanocompósito a base de quitosano y AuNPs funcionalizadas con calreticulina.
4. Evaluar el efecto citotóxico de AuNPs-CRT en queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales.
5. Determinar el efecto de las AuNPs-CRT en la migración de fibroblastos.
6. Determinar la producción de citocinas y activación del factor de transcripción nuclear NF κ B en fibroblastos tratados con AuNPs-CRT.
7. Estandarizar un modelo de diabetes en ratones BALB/c y determinar los niveles de glucosa en sangre.
8. Evaluar el porcentaje de cicatrización y tiempo de cierre en heridas tratadas con el nanocompósito en ratones BALB/c diabéticos.
9. Evaluar la histología y la producción de proteínas relacionadas al proceso de cicatrización: angiopoyetina-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β 1), citoqueratina-5 y calreticulina.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs)

Las nanopartículas de oro (AuNPs) fueron sintetizadas mediante el método de Turkevich (Turkevich *et al* 1951) bajo modificaciones, utilizando quitosano como agente reductor, tal como se describe en la literatura (Jeyasekaran y Venkatachalam, 2017). La solución de sal de oro se obtuvo disolviendo 1 g de HAuCl₄ en agua desionizada para obtener una solución con una concentración 1 mM, en seguida 3 mL de esta solución se mantuvieron en agitación (130 rpm) a 100 ± 5 °C por 30 minutos en combinación con 1 mL de quitosano al 2% (p/v). La formación de las nanopartículas se confirmó con un cambio de coloración en la solución, de amarillo a color vino. Finalmente, la suspensión de AuNPs fue filtrada (filtro CELLTREAT 0.2 µm) para obtener una solución stock.

6.2 Funcionalización de nanopartículas de oro (AuNPs) con calreticulina

La calreticulina (calreticulin human recombinant protein, Raybiotech, Inc.) fue reconstituida con 5 µL de buffer de calcio (10 mmol/L de Tris, 3 mmol/L de calcio y pH 7), tal como se describe en la literatura (Nanney LB. *et al* 2008). Después la calreticulina (3.02 ng) fue agregada a la solución stock de AuNPs y la mezcla se mantuvo en agitación (130 rpm) durante 1 hora a 4 °C. Finalmente, la solución se ultracentrifugo a 20,000 rpm durante 20 minutos para separar las nanopartículas funcionalizadas (AuNPs-CRT), las cuales se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

6.3 Caracterización de nanopartículas de oro (AuNPs) y nanopartículas de oro funcionalizadas con calreticulina (AuNPs-CRT)

El plasmon de resonancia (SPR) de las AuNPs y AuNPs-CRT se midió por UV-visible usando un espectrofotómetro NANODROP 2000c (Thermo Scientific). El tamaño de partícula, el índice de polidispersidad (PDI) y potencial zeta (ZP) fueron determinados por dispersión de luz dinámica (DLS) en un Zetasizer ZS90-Nano

(Malvern Instruments). Todos los análisis se realizaron a una temperatura de 25 °C con un rango de pH de 6.5-7.5, y los resultados se reportaron como la media de tres mediciones.

La morfología y distribución de las AuNPs-CRT se caracterizó con un microscopio electrónico de transmisión (TEM) Titan-3000.

6.4 Eficiencia de captura y porcentaje de liberación de CRT presente en AuNPs

La solución de AuNPs-CRT se mantuvo en agitación (130 rpm) a 4 °C para permitir la liberación de la calreticulina, recolectando los sobrenadantes a las 0, 12, 24 y 48 horas. La calreticulina liberada se cuantificó mediante un kit de ELISA (Calreticulin BioAssay™ Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) con un rango de detección de 0.5-10 ng/mL. El porcentaje de eficiencia de captura (EC) y el porcentaje de liberación (L) se calculó mediante las siguientes ecuaciones:

$$EC (\%) = \frac{(\textit{calreticulina total}) - (\textit{calreticulina libre})}{(\textit{calreticulina total})} \times 100$$

$$L(\%) = \frac{(\textit{calreticulina libre})}{(\textit{calreticulina total})} \times 100$$

6.5 Obtención y caracterización del nanocompósito de AuNPs y AuNPs-CRT

Las soluciones de AuNPs y AuNPs-CRT fueron colocadas dentro de cajas Petri y se mantuvieron a 30 °C en un horno hasta que el solvente se evaporó completamente, para obtener los nanocompuestos. Posteriormente los nanocompuestos fueron caracterizados por difracción de rayos-X (XRD) en un Dmax2100 (Rigaku, Tokyo, Japón), y la radiación CuK α (1.5406Å) fue determinada a 20 mA y 30 kV.

El estudio de las interacciones de cada componente se llevó a cabo mediante reflectancia total atenuada (ATR) usada en conjunto con la técnica de espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).

Los nanocompósitos se colocaron en el cristal ATR de diamante utilizando una placa superior y un brazo de presión, y los espectros de infrarrojo fueron obtenidos por un accesorio de muestreo ATR Perkin Elmer por 16 barridos a una resolución de 4 cm⁻¹. Los datos obtenidos fueron analizados con el software PERKIN ELMER spectrum 10.

6.6 Efecto citotóxico de calreticulina, AuNPs y AuNPs-CRT en queratinocitos fibroblastos y células endoteliales

Las líneas celulares de queratinocitos (HaCaT), fibroblastos (NIH3T3) y células endoteliales (HUVEC) se mantuvieron en medio Dulbecco's Modified Eagle médium (DMEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS) y antibiótico-antimicótico, bajo una atmosfera húmeda de 5% de CO₂ y 95% de aire a 37°C. Posteriormente las células fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de 1x10⁴ células/pozo. Después de 24 horas de incubación, el medio fue remplazado con medio fresco y con los tratamientos: calreticulina (2.5, 5, 7, 10 y 15 pg), AuNPs (1.5, 3, 6 y 15 μM) y AuNPs-CRT (1.5, 3, 6 y 15 μM). Células con medio y sin tratamientos se tomaron como control y como control positivo se usó insulina a una concentración de 5μg/mL. La viabilidad celular se determinó a las 24 y 72 horas posteriores a la aplicación de los tratamientos utilizando la técnica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (MTT). Finalmente, la medición espectrofotométrica se realizó por triplicado a 570 nm en un lector de placa (Synergy HT, Biotek®) y el porcentaje de viabilidad (%) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad (\%)} = (\text{Abs de la muestra} \div \text{Abs del control}) \times 100$$

6.7 Migración de fibroblastos (NIH/3T3) tratados con calreticulina, AuNPs y AuNP's-CRT mediante ensayo de la herida

El ensayo de la herida fue usado para determinar la capacidad de migración de las células NIH/3T3 al ser tratadas con calreticulina, AuNPs y AuNPs-CRT.

Para este ensayo las células se mantuvieron en placas de 6 pozos con 1.5 mL de medio DMEM suplementado con 5% de FBS y antibiótico-antimicótico bajo una atmosfera húmeda de 5% de CO₂ y 95% de aire, a 37°C. Cuando las células alcanzaron un 80% de confluencia, se realizó un scratch o rasguño en el centro de cada pocillo y se lavaron 2 veces con buffer fosfatos (PBS) para remover las células despegadas. Posteriormente el medio fue remplazado con medio fresco y con los tratamientos: calreticulina (2.5, 5, 7, 10 y 15 pg), AuNPs (1.5, 3, 6 y 15 µM) y AuNPs-CRT (1.5, 3, 6 y 15 µM). Células con medio y sin tratamientos se tomaron como control y como control positivo se usó insulina a una concentración de 5µg/mL. El área del scratch o rasguño se evaluó observando en un microscopio invertido (Motic AE31 microscopio) y tomando fotografías a las 3, 6, 12 y 24 horas, calculando el área mediante el análisis de las fotografías en el software ImageJ versión 1.44, como se describe en la literatura (Yeom *et al* 2009). El rango de migración celular se expresó como porcentaje de cierre (%) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de cierre} = (A_0 - A_t) \div A_t \times 100$$

Donde A₀ es el área al tiempo cero y A_t es el área correspondiente a cada punto de tiempo.

6.8 Producción de citocinas en fibroblastos (NIH/3T3) tratados con AuNPs-CRT

Las células NIH/3T3 se sembraron en placas de 24 pozos a una densidad de 30,000 células/pozo con 1.5 mL de medio DMEM suplementado con SFB al 5% y antibiótico-antimicótico.

Después de 24 horas de incubación el medio fue remplazado por medio fresco y los tratamientos de AuNPs y AuNp's-CRT (1.5, 3, 6 y 15 µM). Como control positivo para la producción de citocinas, se utilizó LPS (*Escherichia coli* O127:B8) a una concentración de 1 mg/mL. Después el sobrenadante se recolecto a las 24 y 48 horas posteriores al tratamiento y se almaceno a -20°C hasta la realización del ensayo.

La producción de citocinas IL-12p70, TNF, INF- γ , MCP-1, IL-10 e IL-6 se realizó por medio de un citómetro de flujo BD Accuri (Becton Dickinson Holding) usando el kit comercial BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation (BD Bioscience, catalogo 552364).

6.9 Activación del factor de transcripción nuclear NF κ B en fibroblastos (NIH/3T3) tratados con AuNPs-CRT

Las células NIH/3T3 se sembraron en placa de 96 pozos a una densidad de 20,000 células/pozo con 100 μ L de medio DMEM suplementado con SFB al 5% y antibiótico-antimicótico. Después de 24 horas de incubación el medio fue remplazado por medio fresco y los tratamientos de AuNp's-CRT (1.5, 3, 6 y 15 μ M). LPS (1 μ g/mL) y TNF- α (4 μ g/mL) se utilizaron como activadores de NF κ B. Después de 15 minutos con el tratamiento las células fueron lisadas y se trabajaron de acuerdo con las especificaciones del kit de ELISA NF- κ B p65 (Total) Instantone (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Finalmente, la medición espectrofotométrica se realizó por triplicado a 450 nm en un lector de placa (Synergy HT, Biotek®)

6.10 Inducción de diabetes en ratones BALB/c

Treinta ratones machos de la cepa BALB/c con 6 semanas de edad y peso corporal entre 22 y 26 gramos, fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, estos ratones fueron divididos en dos grupos: sanos (15 ratones) y diabéticos (15 ratones).

Para la inducción de diabetes se aplicaron tres inyecciones intraperitoneales de estreptozotocina (STZ) disuelta en buffer citrato (pH 4.5) a una dosis de 65 mg/kg de peso corporal a ratones del grupo diabético, y tres inyecciones intraperitoneales de buffer citrato a ratones del grupo control.

Dos semanas después de la última inyección los niveles de glucosa en sangre se cuantificaron durante un mes usando un glucómetro (Accu-check Performa) mediante punción de la vena caudal, considerando diabéticos aquellos ratones que presentaron niveles de glucosa >160 mg/dL (figura 9).

Posterior al mes de evaluación de los niveles de glucosa en sangre, se realizó una curva de tolerancia a la glucosa. Para esto los ratones se dejaron en un periodo de ayuno de 12 horas y posteriormente recibieron dextrosa vía oral a una dosis de 2 mg/kg de peso corporal y los niveles de glucosa se midieron por 2 horas cada 30 minutos.

Todos los protocolos de experimentación fueron aprobados por el comité de ética y bienestar animal (N° CEIBA-2018-013) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y se realizaron de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, para la producción, cuidado y uso de animales de experimentación.

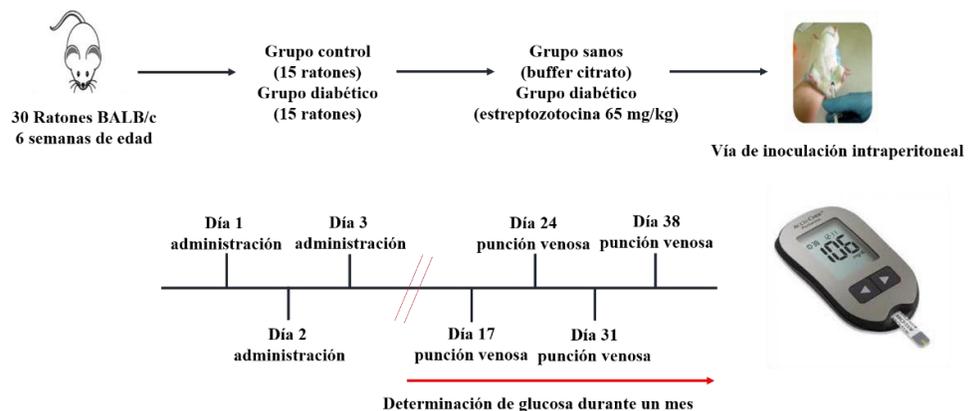


Figura 9. Esquema de administración de estreptozotocina (STZ) para inducir diabetes.

6.11 Inducción de la herida en ratones BALB/c

Los ratones de ambos grupos fueron anestesiados con una inyección intramuscular de ketamina (80 mg/Kg) y xilazina (5 mg/Kg). Posteriormente se depilo y desinfecto el dorso de los ratones y se extrajo un fragmento de piel (0.5x0.5 mm) y se administraron los diferentes tratamientos de acuerdo con la tabla 2.

Finalmente se realizó una inspección clínica diaria de los animales durante 30 días y se documentó el cierre de la herida mediante fotografías. Las heridas fueron medidas y el cierre de la herida se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Cierre de la herida (\%)} = (A0 - At) \div A0 \times 100$$

Donde A0 es el área al tiempo cero y At es el área correspondiente a cada punto de tiempo.

Tabla 2. Tratamientos administrados en heridas del dorso de ratones

Grupos de estudio	Tratamientos	Número de individuos
Sanos	PBS	3
	Insulina	3
	Quitosano	3
	AuNPs	3
	AuNPs-CRT	3
Diabéticos	PBS	3
	Insulina	3
	Quitosano	3
	AuNPs	3
	AuNPs-CRT	3

6.12 Análisis histológico del área de la herida

A los ratones se les practico eutanasia con altas dosis de ketamina (80 mg/Kg) y xilazina (5 mg/Kg) para recuperar el tejido del área de la herida. La recuperación del tejido se realizó a los 15 y 30 días después de la creación de la lesión. Los tejidos se fijaron en una solución de formaldehido al 10% durante 24 horas a temperatura ambiente, se lavaron y se deshidrataron en una serie graduada de alcoholes para ser embebidos en bloques de parafina.

Finalmente se cortaron en secciones de 5µm para ser desparafinados y rehidratados, las secciones se contratiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para observar re-epitelización y formación de tejido granular, y con la tinción tricrómica de Masson para observar depósitos de colágena (figura 10).

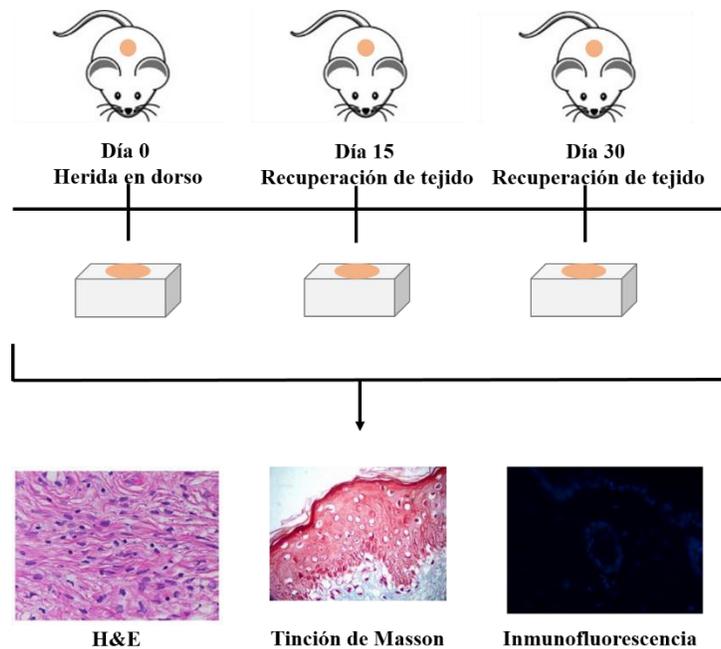


Figura 10. Representación esquemática de recuperación y procesamiento de tejidos

6.13 Expresión de proteínas relacionadas al proceso de cicatrización

La expresión de angiopoyetina-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante beta-1 ($TGF-\beta_1$), citoqueatina-5 (CK-5) y calreticulina (CRT) se identificó por inmunofluorescencia indirecta (IFI). Los tejidos fueron desparafinados a 60 °C durante 18 horas y posteriormente fueron hidratados en el tren de alcoholes (absoluto, 96°, 70° y 50°). Enseguida se permeabilizaron con Tritón 1X (Tritón al 0.1% con citrato de sodio al 0.1% en PBS 1X) por 2 minutos. Luego del lavado se bloquearon los sitios inespecíficos con Tris-HCl 0.1M pH 7.5, BSA 3% y 20% de suero fetal bovino por 10 minutos. Para determinar la expresión de las proteínas de interés, se incubó toda la noche con los anticuerpos $TGF-\beta_1$ (mouse monoclonal IgG₁), VEGF (mouse monoclonal IgG₁) y citoqueratina-5 (rabbit polyclonal IgG SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY), seguido de los anticuerpos secundarios anti-IgG₁ de ratón (anti-mouse IgG₁ conjugado con PE) y anti-IgG de conejo (goat anti-rabbit IgG conjugado con TR SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) por 6 horas.

Posteriormente se incubó con calreticulina (mouse monoclonal IgG_{2b}) y angiopoyetina-1 (goat polyclonal IgG) toda la noche, seguido del anticuerpo secundario anti-IgG de cabra (donkey anti-goat IgG conjugado con FITC SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) por 6 horas. Todos los anticuerpos fueron diluidos 1:100 en PBS y las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después del lavado se incubó por 30 minutos con DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro ROCHE), posteriormente del lavado con metanol y metanol-PBS se montaron en PBS/Glicerol (3:7) para ser fotografiadas a 40x en un microscopio Olympus DP-71. Las imágenes fueron analizadas en el programa Image-Pro-Plus Version 7.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) y la intensidad de la señal se expresó en píxeles. La expresión de TGF- β_1 , VEGF y citoqueratina-5 se identificó por emitir fluorescencia en color rojo (TR), y calreticulina y angiopoyetina-1 en color verde (FITC), determinando la localización celular con el contraste de DAPI.

6.14 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graph Pad Prism versión 6 y los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar (SD).

La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de contraste Tukey y todos los experimentos se realizaron por triplicado.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de nanopartículas de oro (AuNPs) y nanopartículas de oro funcionalizadas con calreticulina (AuNPs-CRT)

El espectro UV-visible de las AuNPs mostro un SPR a 524 nm, mientras que las AuNPs-CRT presentaron un SPR a 525 nm (Figura 11). Este incremento de 1 nm se le conoce como efecto batocrómico, el cual consiste en el desplazamiento del espectro de absorción hacia longitudes de onda mayores, esto se atribuye a cambios estructurales a nivel molecular ya sea por sustitución o adición de moléculas. Es por esto que nosotros atribuimos este efecto a la presencia de la calreticulina sobre la superficie de las AuNPs.

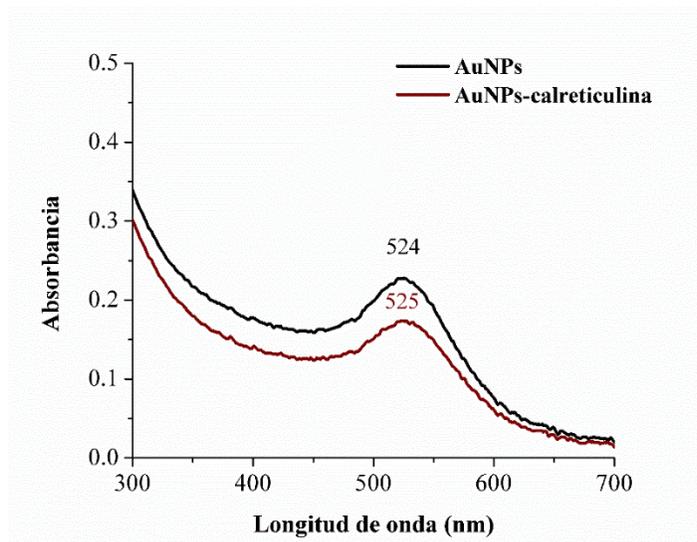


Figura 11. Espectro UV-visibles de AuNPs y AuNPs-CRT. El plasmon de resonancia (SPR) de las AuNPs-CRT presento una longitud de onda mayor (525 nm) en contraste con las AuNPs (524nm), debido a la funcionalización de la nanopartícula con la calreticulina.

El análisis de DLS mostro un incremento en el tamaño de partícula después de la funcionalización con calreticulina.

Las AuNPs presentaron un tamaño promedio de 5.7 ± 1.07 nm con un ZP de +23.9 y un PDI de 0.3, en contraste con las AuNPs-CRT que presentaron tamaños promedios de 92.39 ± 0.94 nm, un ZP de +33.6 y un PDI de 0.5 (tabla 3).

El resultado de los tamaños obtenidos concuerda con el incremento en la longitud de onda de absorción observado en el análisis de UV-visible.

Tabla 3. Características de nanopartículas AuNPs y AuNPs-CRT sintetizadas

Nanopartículas	Tamaño promedio (nm)	Índice de polidispersidad (PDI)	Potencial zeta (mV)
AuNPs	5.7 ± 1.07	0.3	$+23.9 \pm 0.002$
AuNPs-CRT	92.39 ± 0.94	0.5	$+33.6 \pm 0.004$

Las imágenes del TEM muestran una morfología esférica para ambas nanopartículas (AuNPs- y AuNPs-CRT) (figura 12a y 12b) sin presencia de aglomeración, y los histogramas de distribución de tamaño de las nanopartículas muestran tamaños de 2-10 nm para AuNPs y de 60-100 nm para AuNPs-CRT (figura 13a y 13b).

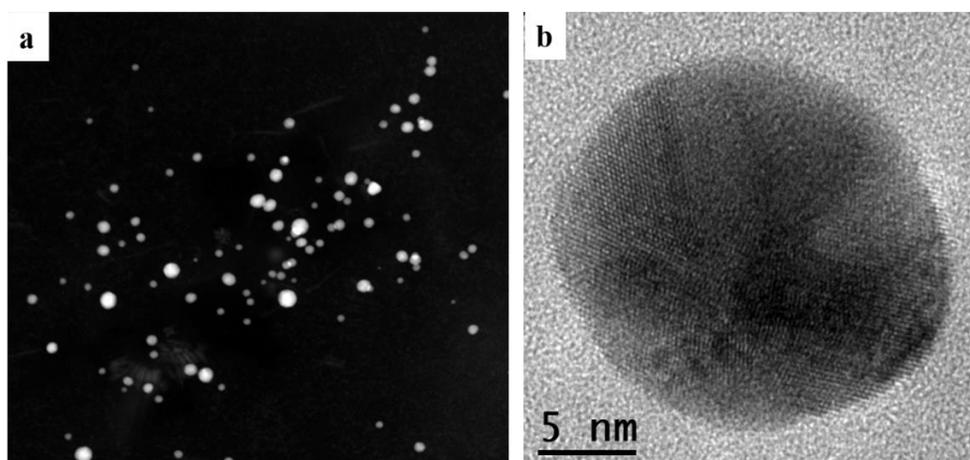


Figura 12. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM). a) y b) Morfología de nanopartículas de AuNPs y AuNPs-CRT sintetizadas.

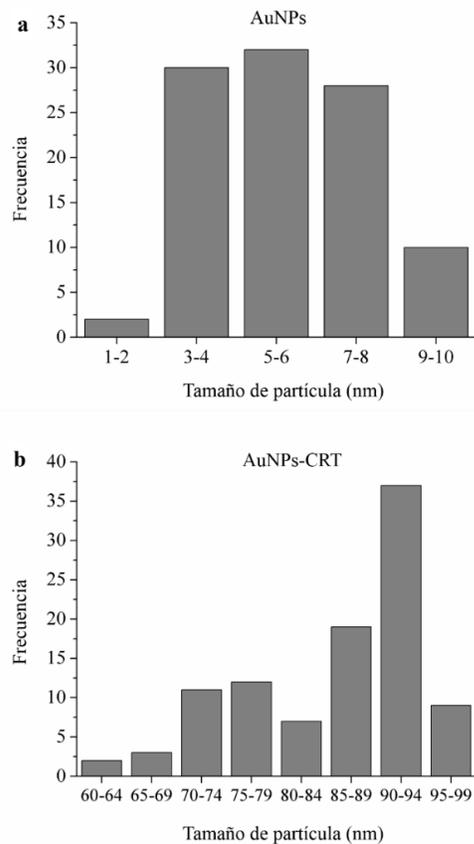


Figura 13. Histogramas de distribución de tamaño de nanopartículas. a) Tamaños de AuNPs entre 2-10 nm. b) Tamaños de AuNPs-CRT entre 60-100 nm.

7.2 Eficiencia de captura y porcentaje de liberación de calreticulina presente en AuNPs

La eficiencia de captura de la calreticulina por parte de las AuNPs fue de 92.78% (2.8 ng) y la liberación se caracterizó por una fase rápida y constante (tabla 4 y figura 14). Destacando que a las 24 horas se observó una liberación del por encima del 50% 53.64% y a las 48 horas del 71.52%.

Tabla 4. Porcentaje de liberación de CRT presente en AuNPs

Tiempo (horas)	Concentración (ng/mL)	Porcentaje (%)
0	0.218	7.21
12	0.59	19.53
24	1.62	53.64
48	2.16	71.52

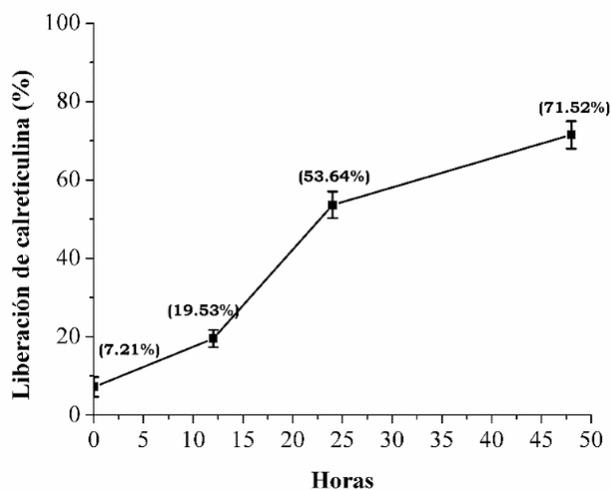


Figura 14. Curva de liberación de calreticulina. La calreticulina presente en las AuNPs demuestra una liberación constante por 48 horas.

7.3 Caracterización de nanocompuestos de AuNPs y AuNPs-CRT

Los espectros IR de los nanocompuestos de AuNPs, AuNPs-CRT y quitosano fueron obtenidos en una región de $4000-500\text{ cm}^{-1}$, donde se puede observar un pico de absorción a 3215 cm^{-1} el cual es característico del grupo amino (N-H) del quitosano y a su vez se observa un corrimiento en los espectros de AuNPs y AuNPs-CRT a ese mismo número de onda, lo que indica una interacción de las AuNPs y la calreticulina. Además, las AuNPs y AuNPs-CRT presentan tres bandas de absorción localizadas a 1635 , 1544 y 1336 cm^{-1} atribuidas a la amida I (extensión de C=O), amida II (extensión de C-N y a un modo vibracional de tensión de N-H) y a un grupo O=C-N (modo de vibración) (figura 15).

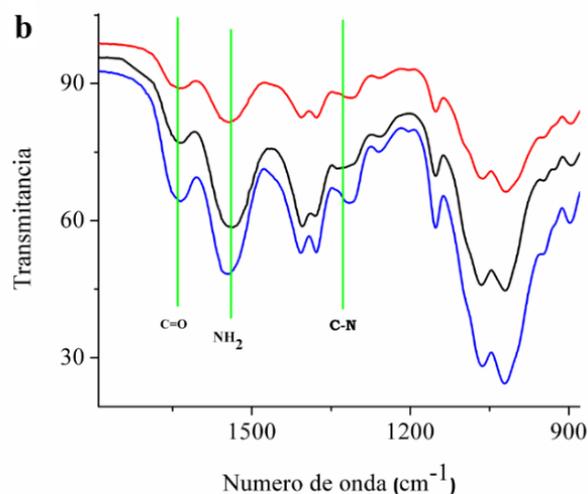
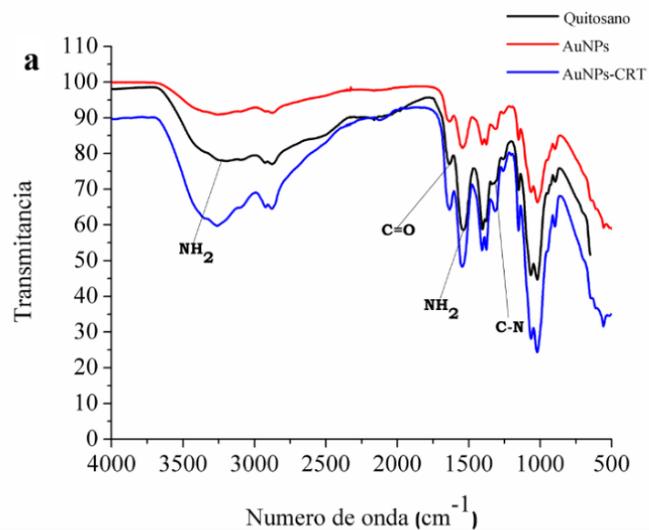


Figura 15. Espectros IR del quitosano, AuNPs y AuNPs-CRT. a) picos característicos de los grupos funcionales del quitosano. b) espectros IR entre 1600 y 900 cm^{-1} donde se observan los picos de las interacciones entre el oro y la calreticulina con el quitosano.

El patrón de difracción de rayos-X de los nanocompuestos de AuNPs y AuNPs-CRT se muestran en la figura 16, donde se puede observar los picos de difracción de 2θ con valores de 43.2° (111) y 50.34° (200) confirmando la pureza de los nanocompuestos sintetizados de acuerdo con lo establecido por Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS- 04-0784). La intensidad de los picos disminuye en el nanocompuesto de AuNPs-CRT, lo que indica una disminución en la cristalinidad debido a la funcionalización con la calreticulina.

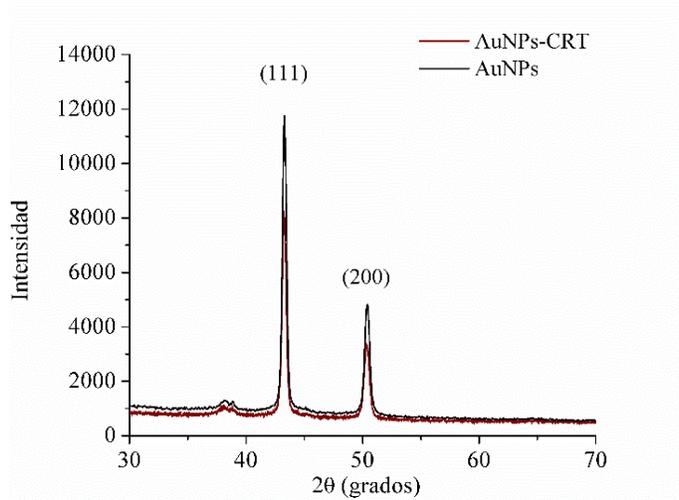


Figura 16. Patrón de difracción de rayos-X para nanocompuestos AuNPs y AuNPs-CRT. Se observan los picos característicos (111) y (200) para el oro establecidos por JCPDS en ambos nanocompuestos.

7.4 Efecto citotóxico de calreticulina, AuNPs y AuNPs-CRT en queratinocitos fibroblastos y células endoteliales

La calreticulina no afectó la viabilidad en células HaCaT a ningún tiempo de evaluación (figura 17a). Sin embargo, en células NIH/3T3 la viabilidad disminuyó significativamente a las 72 horas a concentraciones de 2.5, 5, 7 y 10 pg, en comparación con el control positivo (figura 17b). En células HUVEC solo se vio afectada la viabilidad significativamente a una concentración de 7 pg, a 24 y 72 horas con respecto al control (figura 17c). Por otro lado, las AuNPs no afectaron la viabilidad de HaCaT, NIH/3T3 y HUVEC, incluso se observó un incremento significativo a las 72 horas con las concentraciones de 3 μM y 6 μM en HaCaT (132.9% y 158.9%) y NIH/3T3 (127.1% y 132.2%) (figura 17d y 17e), y en células HUVEC con la concentración de 3 μM (124.3%) (figura 17f) en comparación con el control. Del mismo modo las AuNPs-CRT incrementaron significativamente la viabilidad en células HaCaT a 24 horas con una concentración de 1.5 μM (123.8%) y a 72 horas con concentraciones de 1.5 μM (134.5%), 3 μM (150.4%) y 6 μM (123%) (figura 17g). En células NIH/3T3 la viabilidad incrementó a las 24 con concentraciones de 1.5 μM (111.1%), 3 μM (137%), 6 μM (111.3%) y 15 μM (111%) (figura 17h).

Finalmente, en células HUVEC la viabilidad incremento a las 72 horas con una concentración de 1.5 μM (130.9%) (figura 17i), con respecto al control.

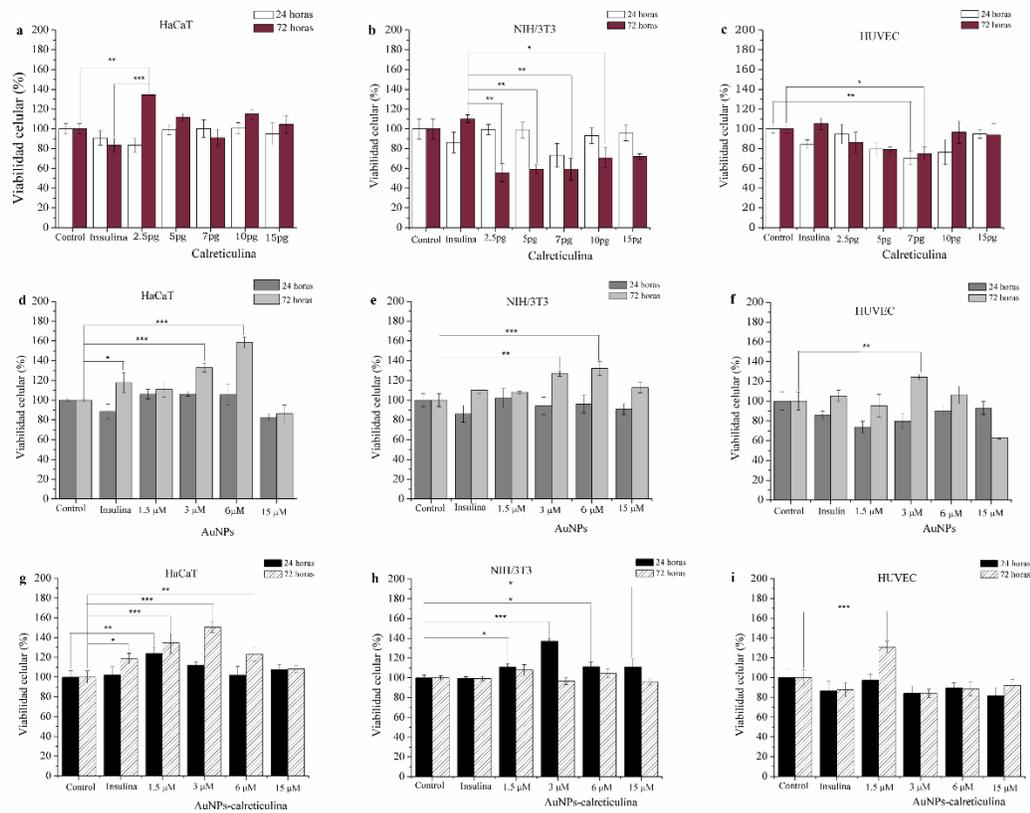


Figura 17. Viabilidad de células HaCaT, NIH/3T3 y HUVEC. a, b y c) células tratadas con calreticulina. d, e y f) células tratadas con AuNPs. g, h e i) células tratadas con AuNPs-CRT. Diferencia significativa * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.0001$

7.5 Migración de células NIH/3T3 tratadas con calreticulina, AuNPs y AuNP's-CRT mediante ensayo de la herida

Los tratamientos de calreticulina presentaron variaciones en el porcentaje de cierre, siendo las concentraciones de 2.5 pg y 7 pg las más eficientes. Sin embargo, a partir de las 12 horas el control (células sin tratamiento) presento un cierre mayor (figura 18a). Por otro lado, las células tratadas con AuNPs mostraron un porcentaje de cierre dependiente de concentración, siendo la de 1.5 μM la que mejores resultados presento, sin embargo, se observó el mismo efecto mencionado con anterioridad (figura 18b).

Del mismo modo las AuNP-CRT presentaron un porcentaje de cierre dependiente de concentración, observándose un porcentaje de cierre de 80% a las 6 horas y 100% a las 12 horas con una concentración de 1.5 μM , en contraste con los otros tratamientos (figura 18c).

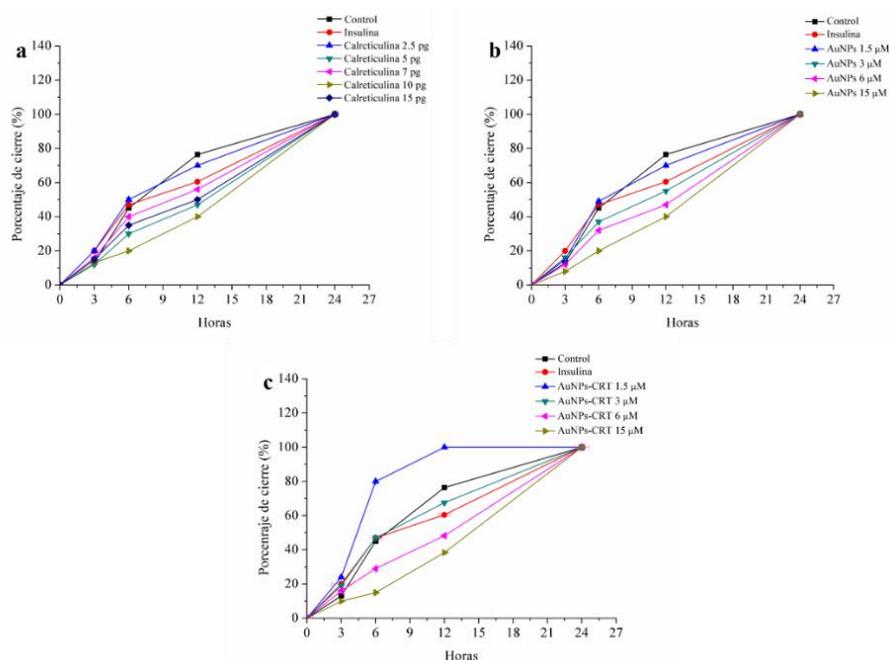


Figura 18. Ensayo de migración en células NIH/3T3. a) Porcentaje de cierre de la herida en células tratadas con calreticulina, b) Porcentaje de cierre de la herida en células tratadas con AuNPs y c) porcentaje de cierre de la herida en células tratadas con AuNPs-CRT.

7.6 Producción de citocinas en fibroblastos (NIH/3T3) tratados con AuNPs-CRT

La expresión de TNF, INF- γ y MCP-1 fue menor en NIH/3T3 tratados con AuNPs, en contraste con el control, LPS e insulina (figura 19a, 19c y 19e). Se observó un incremento en la expresión de INF- γ a las 24 y 48 horas en el control (0.94 pg/mL) en comparación con células tratadas con AuNPs (figura 19c).

De igual manera la expresión de MCP-1 incremento significativamente en el control a las 24 horas (23.48 pg/mL) con respecto a células tratadas con AuNPs a una concentración de 3 μM (15.49 pg/mL).

A las 48 horas se presentó un incremento significativo en células estimuladas con LPS (22.96 pg/mL) en contraste con células tratadas con AuNPs a concentraciones de 3 μ M (14.43 pg/mL), 6 μ M (16.71 pg/mL) y 15 μ M (16.73 pg/mL) (figura 19e). Por otro lado, cuando las células NIH/3T3 se trataron con AuNPs-CRT, la expresión de TNF e INF- γ incremento a las 24 y 48 horas (figura 19b, 19d) en contraste con el control, células estimuladas con LPS y células tratadas con insulina, aunque este incremento no fue significativo. En cambio, la expresión de MCP-1 a las 24 y 48 horas (figura 19f) fue similar con todos los tratamientos utilizados.

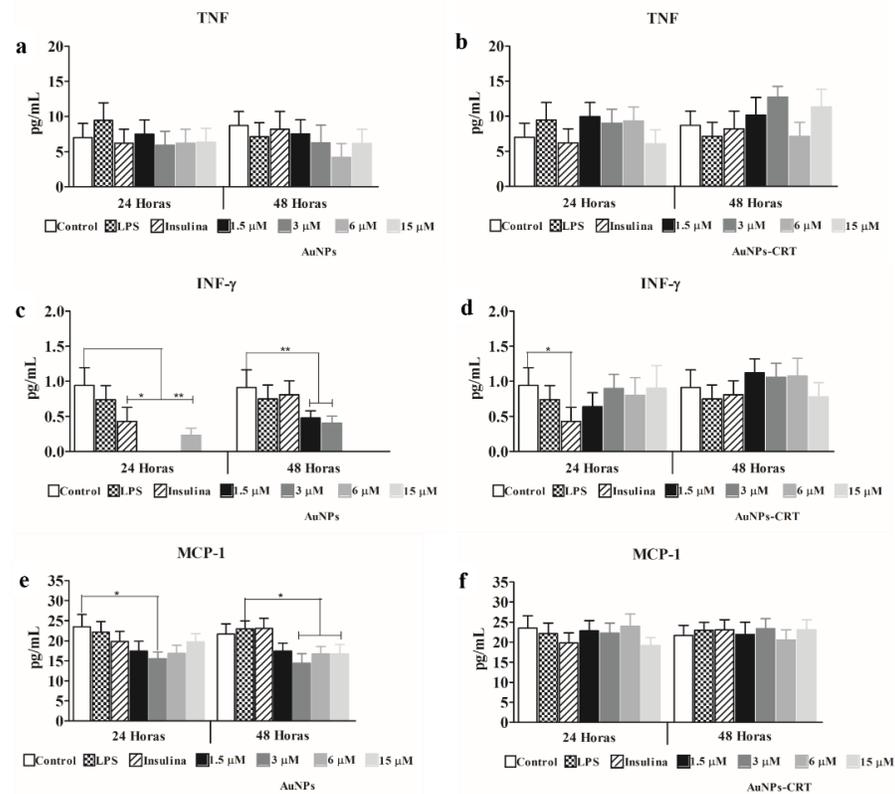


Figura 19. Expresión de citocinas TNF, INF- γ y MCP-1 en células NIH tratadas con AuNPs y AuNPs-CRT. La expresión de TNF, INF- γ y MCP se incrementa a las 24 y 48 horas en células tratadas con AuNPs-CRT. Diferencia significativa * p <0.05 y ** p <0.001.

La expresión de IL-12p70 en NIH/3T3 tratadas con AuNPs es significativamente menor en contraste con LPS (19.62 pg/mL) e insulina (18.27 pg/mL) a las 24 y 48 horas, respectivamente (figura 20a).

Con los tratamientos de AuNPs-CRT se observó un incremento significativo de IL-12p70 a las 24 horas con una concentración de 1.5 μ M (22.37 pg/mL), en contraste con el control (13.85 pg/mL) y concentraciones 3 μ M (14.88 pg/mL) y 15 μ M (13.23 pg/mL) (figura 20b).

La expresión de IL-10 no presentó diferencias con los distintos tratamientos (control, LPS, insulina, AuNPs y AuNPs-CRT) a ningún tiempo de evaluación. Finalmente, la expresión de IL-6 incrementó significativamente a las 24 horas en células tratadas con AuNPs a concentraciones de 1.5 μ M (5.56 pg/mL) y 15 μ M (5.62 pg/mL), en contraste con LPS (3.22 pg/mL) (figura 20e), y en células tratadas con AuNPs-CRT su expresión a las 24 y 48 horas fue menor en contraste con los otros tratamientos (figura 20f).

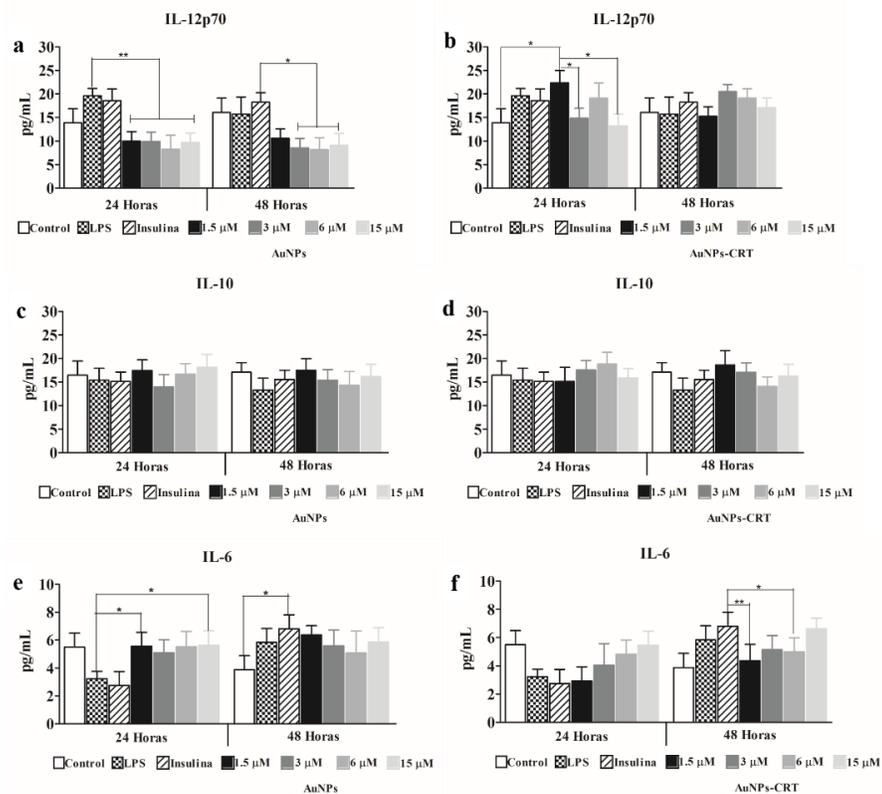


Figura 20. Expresión de citocinas IL-12p70, IL-10 y IL-6 en células NIH tratadas con AuNPs y AuNPs-CRT. La expresión de IL-12p70 es menor en células tratadas con AuNPs. Diferencia significativa * p <0.05 y ** p <0.001.

7.8 Activación del factor de transcripción nuclear NFκB en fibroblastos (NIH/3T3) tratados con AuNPs-CRT

La determinación de NFκB (p65) endógeno se muestra en la figura 21, donde se observa una menor absorbancia en células tratadas con insulina en contraste con los otros tratamientos utilizados, lo que indica una activación de NFκB (p65). El incremento en la activación se muestra de manera significativa en comparación con el control y con células tratadas con AuNP's-CRT a concentraciones de 6 y 15 μM.

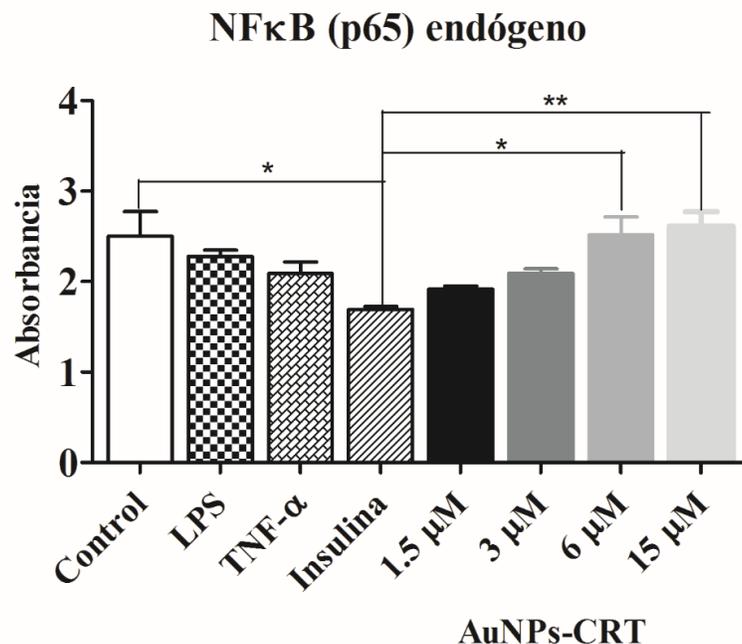


Figura 21. Activación de NFκB (p65) en células NIH tratadas con AuNPs-CRT. La activación de NFκB (p65) es mayor en células tratadas con insulina en contraste con los otros tratamientos utilizados. Diferencia significativa * $p=0.005$ y ** $p=0.001$.

7.9 Inducción de diabetes con estreptozotocina (STZ)

La inducción de diabetes en los murinos se evidencio por hiperglicemia a las 4 semanas después de la última administración de STZ. Los niveles de glucosa en sangre en un periodo de ayuno de 12 horas incrementaron significativamente a 221.46 ± 7.51 mg/dL en murinos que recibieron STZ, en contraste con los que recibieron buffer citrato los cuales presentaron niveles de 100.32 ± 5.06 mg/dL.

Del mismo modo el peso corporal incremento significativamente de 24.30 ± 0.66 g (grupo sano) a 25.44 ± 0.94 (grupo diabético) (tabla 5).

Tabla 5. Comparación del peso corporal y niveles de glucosa en sangre en grupo control y grupo diabético. Diferencia significativa $***p < 0.0001$.

Grupos	Peso corporal (gramos)		Glucosa en sangre (mg/dL)	
	Antes de la administración	Después de la administración	Antes de la administración	Después de la administración
Grupo control	23.73 ± 1.5	24.30 ± 0.66	90 ± 7.48	100.32 ± 5.06
Grupo diabético	24.39 ± 0.31	$25.44 \pm 0.94^{**}$	92 ± 8.03	$221.46 \pm 7.51^{***}$

Una curva de tolerancia a la glucosa se realizó para determinar la hiperglicemia en el grupo diabético durante el periodo de experimentación. La curva de tolerancia mostro un incremento en los niveles de glucosa en el grupo diabético con un pico máximo de 515 ± 19.31 mg/dL a los 60 minutos, en contraste con el grupo control (133.66 ± 7.47 mg/dL) presentando una diferencia significativa (figura 22).

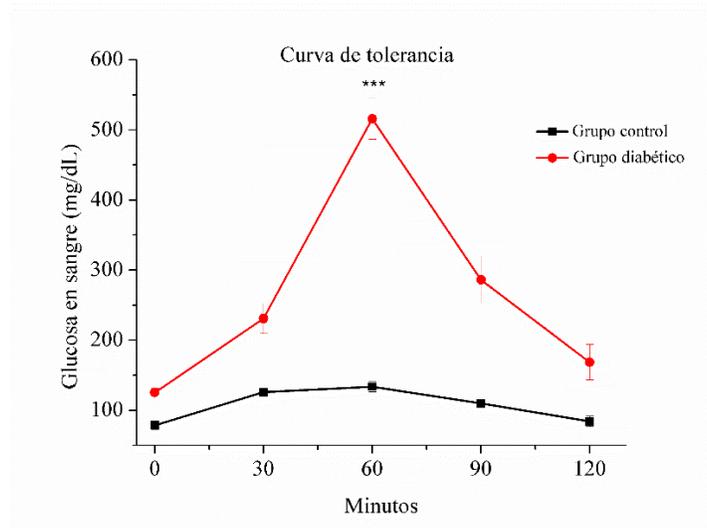


Figura 22. Curva de tolerancia a la glucosa. Concentración de glucosa en sangre en grupo control y grupo diabético después de una administración oral de dextrosa. Diferencia significativa $***p < 0.0001$.

7.10 Heridas tratadas con los nanocompuestos de AuNPs y AuNPs-CRT

En el grupo control hasta el día 8 se observó un porcentaje de cierre de las heridas similar con los diferentes tratamientos, sin embargo, a partir del día 10 se presentó un mayor cierre con los tratamientos de insulina y AuNPs-CRT. Estos 2 tratamientos fueron los más efectivos, ya que a los días 12 y 14 presentaron diferencias significativas en el cierre en comparación con PBS, quitosano y AuNPs, y un cierre completo al día 18 (figura 23).

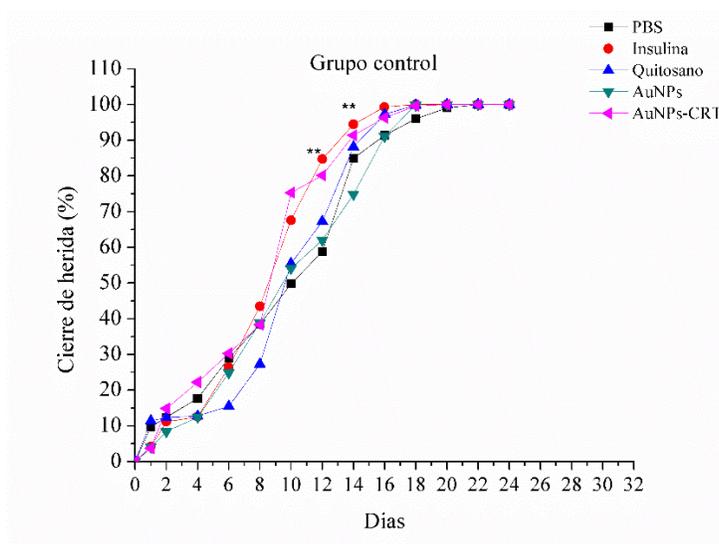


Figura 23. Cicatrización de heridas en grupo control. El porcentaje de cierre de las heridas en el dorso de los ratones es mayor con los tratamientos de insulina y AuNPs-CRT. Diferencia significativa $**p < 0.001$

En el grupo diabético desde el día 2 hasta el día 10 se observó un mayor cierre de la herida con el tratamiento de AuNPs-CRT, en comparación con PBS, insulina y AuNPs, siendo significativo hasta el día 8. Del día 10 al día 16 se observaron variaciones en el cierre de las heridas con los distintos tratamientos y a partir del día 18 el cierre fue mayor con AuNPs-CRT, presentando un cierre completo al día 20 (figura 24).

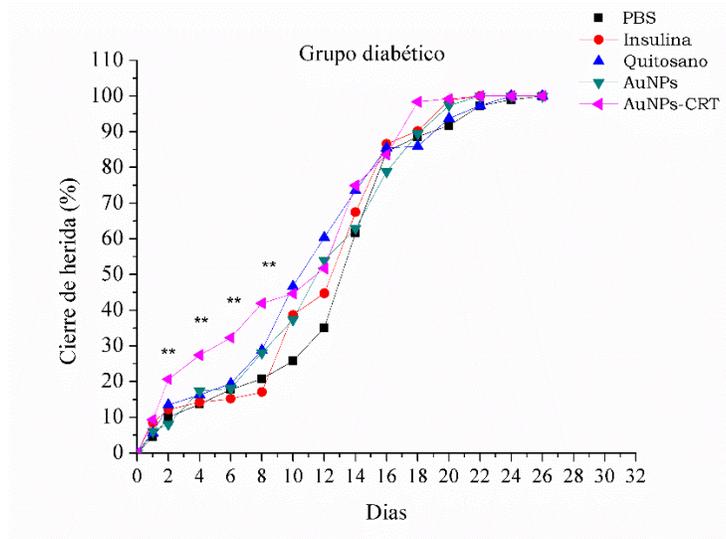


Figura 24. Cicatrización de heridas en grupo diabético. El porcentaje de cierre de las heridas en el dorso de los ratones es mayor con el tratamiento de AuNPs-CRT. Diferencia significativa $**p < 0.001$

La figura 25a y 25b corresponde a fotografías del área de las heridas con los diferentes tratamientos y a los distintos días de evaluación que sirvieron como referencia para determinar el porcentaje de cicatrización.

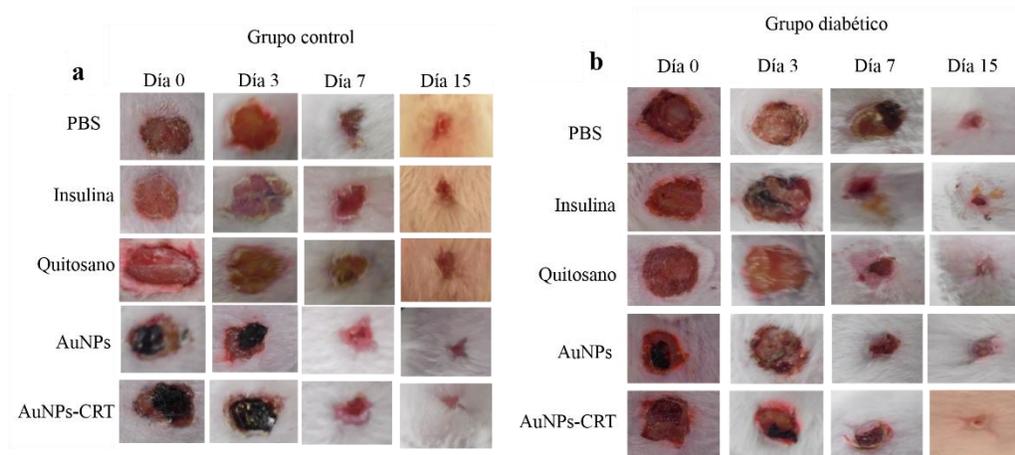


Figura 25. Fotografías de heridas en dorso de ratones. a) imágenes representativas de las heridas con los distintos tratamientos en grupo control. b) imágenes representativas de las heridas con los distintos tratamientos en grupo diabético.

7.11 Análisis histológico del área de la herida

La tinción de hematoxilina y eosina al día 15 mostro proliferación en epidermis con los distintos tratamientos en ambos grupos, pero esta fue mayor en heridas tratadas con quitosano.

Sin embargo, la formación de nuevos vasos sanguíneos y folículos pilosos se incrementó en heridas tratadas con insulina, AuNPs y AuNPs-CRT (figura 26).

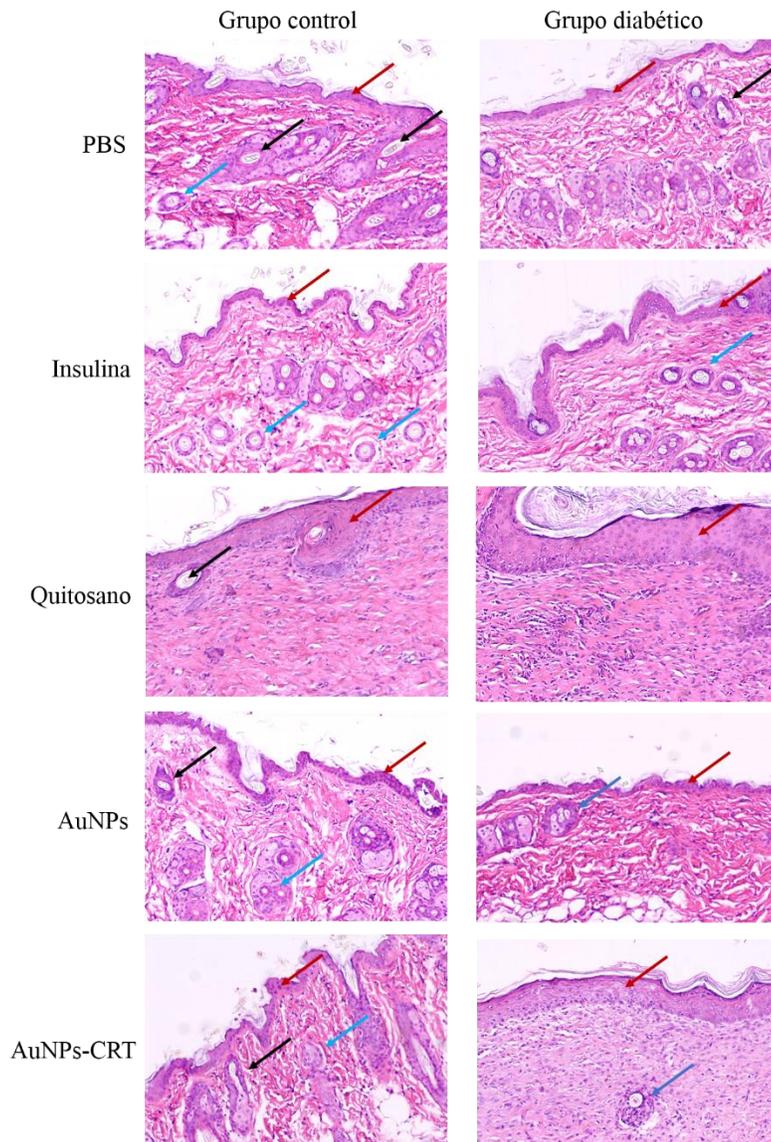


Figura 26. Tinción de H&E de tejido del área de la herida. Tejidos correspondientes a murinos del grupo control y grupo diabético a los 15 días posteriores a la cirugía. Las flechas en color rojo indica la epidermis, las negras la formación de folículos pilosos y las azules la formación de nuevos vasos sanguíneos. (Fotografías tomadas a 10x)

Para el día 30 se continuó observando la epidermis, nuevos vasos sanguíneos y folículos pilosos, además de la formación del estrato corneo en la mayoría de los tejidos, debido al proceso de cicatrización avanzado de las heridas (figura 27).

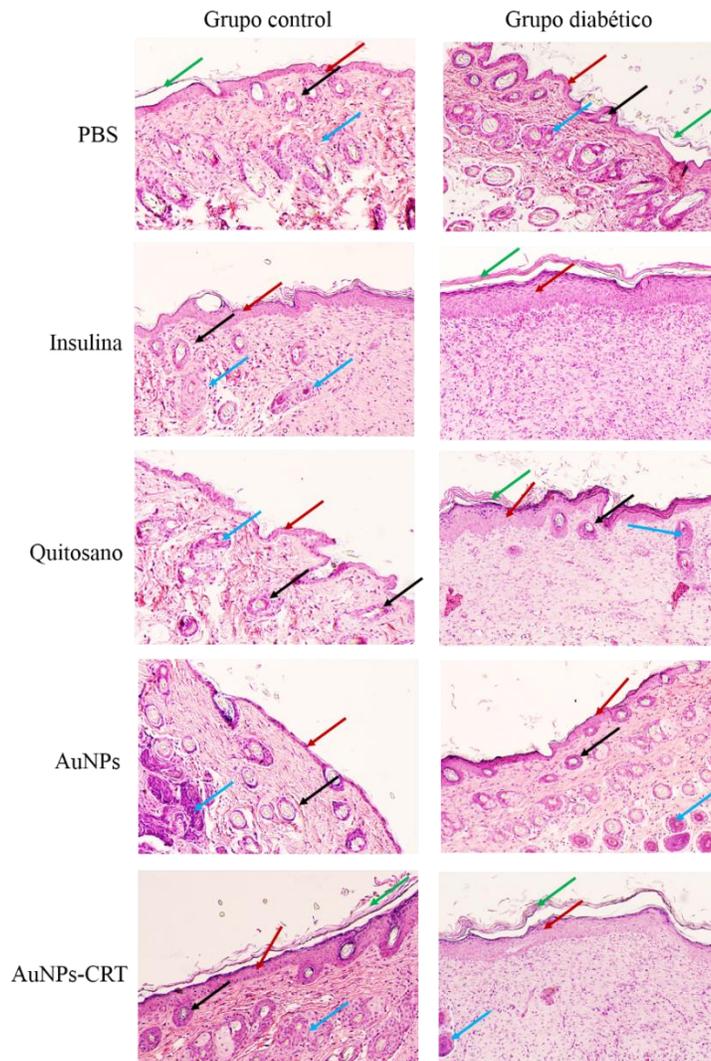


Figura 27. Tinción de H&E de tejido del área de la herida. Tejidos correspondientes a murinos del grupo control y grupo diabético a los 30 días posteriores a la cirugía. Las flechas en color rojo indica la epidermis, las negras la formación de folículos pilosos, las azules la formación de nuevos vasos sanguíneos y las verdes el estrato corneo. (Fotografías tomadas a 10x)

La tinción tricrómica de Masson se utilizó para determinar la producción de colágeno tipo I en el área de la herida del grupo control y grupo diabético con los distintos tratamientos utilizados.

Al día 15 se observó un mayor número de fibras de colágeno con los tratamientos de AuNPs-CRT e insulina en ambos grupos, en contraste con los tratamientos de PBS, quitosano y AuNPs (figura 28).

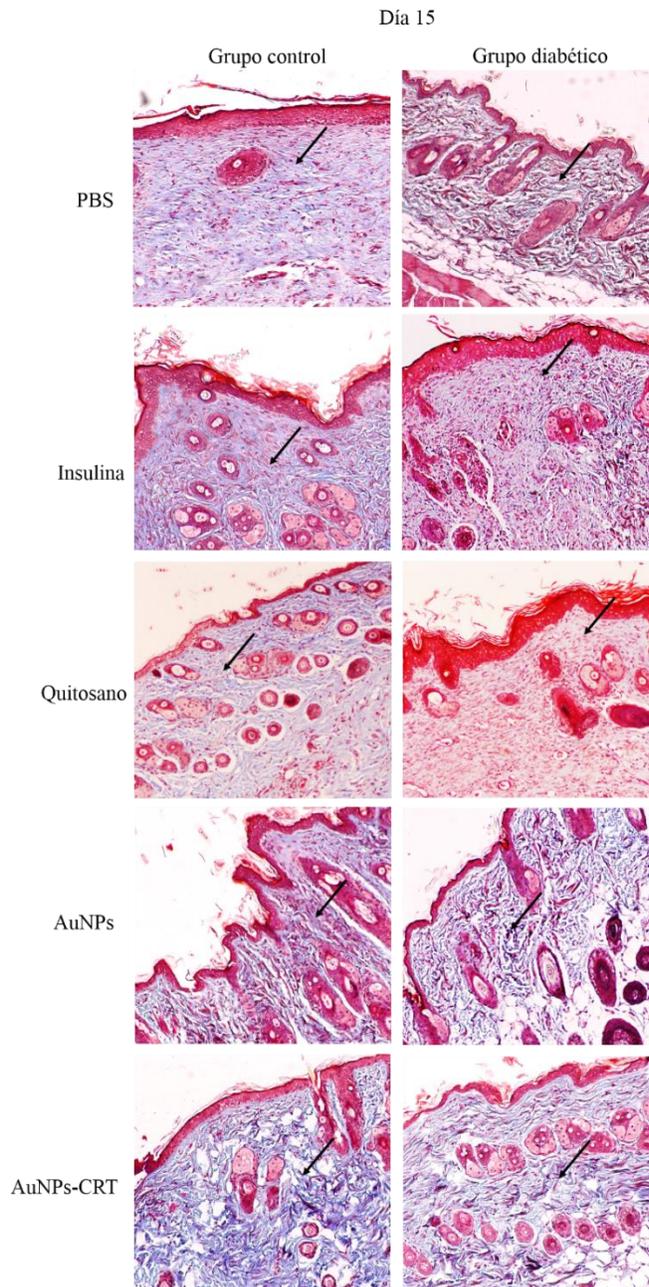


Figura 28. Tinción tricrómica de Masson de tejido del área de la herida. Tejidos correspondientes a murinos del grupo control y grupo diabético a los 15 días posteriores a la cirugía. Las flechas en color negro indican las fibras de colágeno tipo I producidas en el área de lesión. (Fotografías tomadas a 10x)

Al día 30 la producción de colágeno tipo I se observó en ambos grupos (control y diabético) con todos los tratamientos utilizados (figura 29).

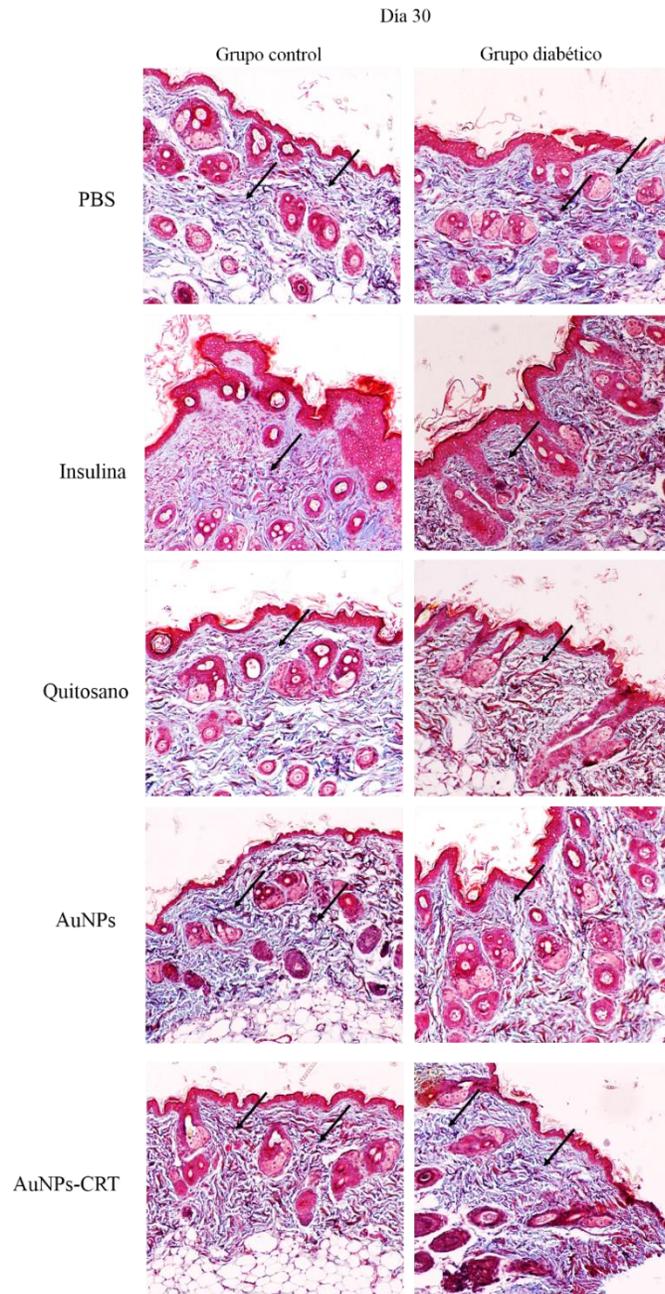


Figura 29. Tinción tricrómica de Masson de tejido del área de la herida. Tejidos correspondientes a murinos del grupo control y grupo diabético a los 15 días posteriores a la cirugía. Las flechas en color negro indican las fibras de colágeno tipo I producidas en el área de lesión. (Fotografías tomadas a 10x)

7.12 Expresión de proteínas relacionadas al proceso de cicatrización

La expresión de Ang-1 se incrementó de manera significativa a los 15 días en el grupo control con el tratamiento de AuNPs-CRT, en contraste con los tratamientos PBS, insulina y quitosano. Para el día 30 la expresión de Ang-1 se vio disminuida con todos los tratamientos (figura 30a). En el grupo diabético la expresión de Ang-1 se incrementó significativamente a los 15 y 30 días con el tratamiento de AuNPs-CRT, en contraste con los tratamientos PBS, insulina y quitosano (figura 30b). La figura 30c corresponde a las fotografías de IFI de los cortes histológicos del área de la herida tratada con AuNPs-CRT, donde la expresión de Ang-1 se identificó con fluorescencia en color verde (FITC) y el DNA se tiñó en color azul (DAPI). La expresión de Ang-1 se observó en la epidermis y dermis de ambos grupos (Figura 30c (i) y (iv)).

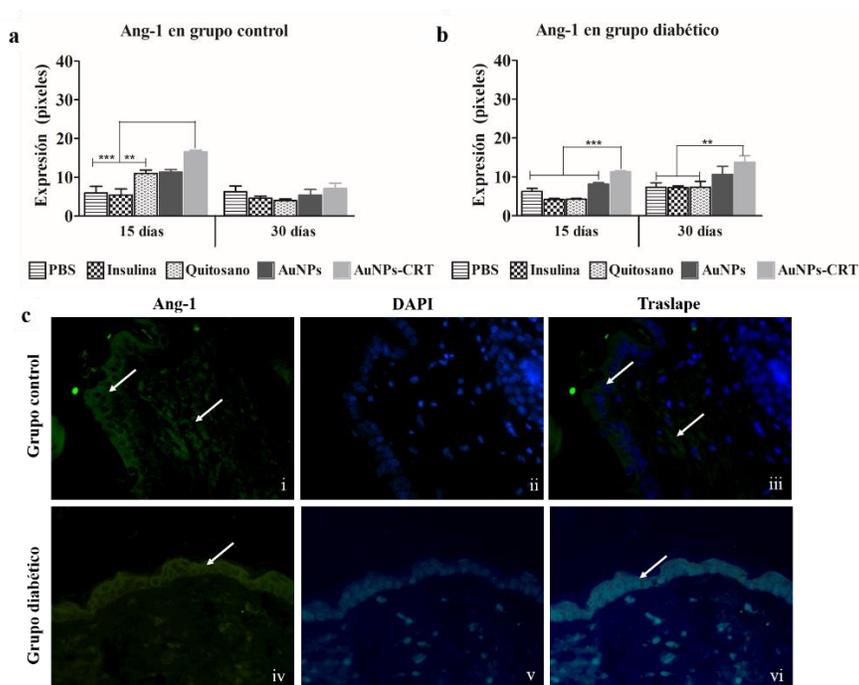


Figura 30. Expresión de Ang-1 en tejido del área de la herida por IFI. a) Intensidad de la expresión de Ang-1 en grupo control, b) intensidad de la expresión de Ang-1 en grupo diabético. c) fotografías de IFI grupo control (i-iii) y grupo diabético (iv-vi) (Fotografías tomadas a 40x). Diferencia significativa ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.0001$.

La expresión de VEGF incremento significativamente a los 15 días en el grupo control con el tratamiento de AuNPs-CRT, en contraste con los tratamientos de PBS, insulina, quitosano y AuNPs. A los 30 días el incremento fue significativo con los tratamientos de insulina y quitosano (figura 31a). En el grupo diabético la expresión de VEGF se incrementó significativamente a los 15 y 30 días con el tratamiento de AuNPs-CRT en contraste con los tratamientos de PBS, insulina y quitosano (figura 31b). La figura 31c corresponde a las fotografías de IFI de los cortes histológicos del área de la herida tratada con AuNPs-CRT, donde la expresión de VEGF se identificó con fluorescencia en color rojo (TR) y el DNA se tiñó en color azul (DAPI). La expresión de VEGF se observó en la epidermis y vasos sanguíneos en ambos grupos (Figura 31c (i) y (iv)).

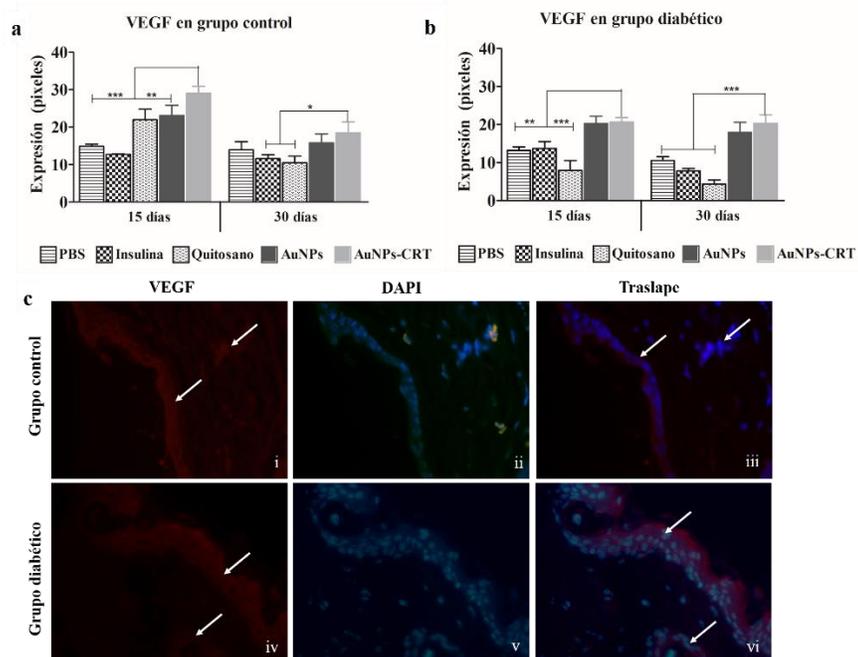


Figura 31. Expresión de VEGF en tejido del área de la herida por IFI. a) Intensidad de la expresión de VEGF en grupo control, b) intensidad de la expresión de VEGF en grupo diabético. c) fotografías de IFI grupo control (i-iii) y grupo diabético (iv-vi) (Fotografías tomadas a 40x). Diferencia significativa ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.0001$.

La expresión de TGF- β_1 se incrementó significativamente a los 15 días en el grupo control con el tratamiento de AuNPs-CRT, en contraste con los tratamientos PBS e insulina. A los 30 días la expresión de TGF- β_1 fue menor, pero mostro diferencia significativa con el tratamiento de AuNPs en contraste con PBS, insulina y quitosano (figura 32a). En el grupo diabético la expresión de TGF- β_1 se incrementó significativamente a los 15 días con el tratamiento de AuNPs en contraste con los tratamientos PBS, insulina y quitosano. A los 30 días la expresión incremento significativamente con el tratamiento de AuNPs-CRT, en contraste con PBS, insulina y quitosano (figura 32b). La figura 32c corresponde a las fotografías de IFI de los cortes histológicos del área de la herida tratada con AuNPs-CRT, donde la expresión de TGF- β_1 se identificó con fluorescencia en color rojo (TR) y el DNA se tiñó en color azul (DAPI). La expresión de TGF- β_1 se observó principalmente en la epidermis y en células de la dermis en ambos grupos (Figura 32c (i) y (iv)).

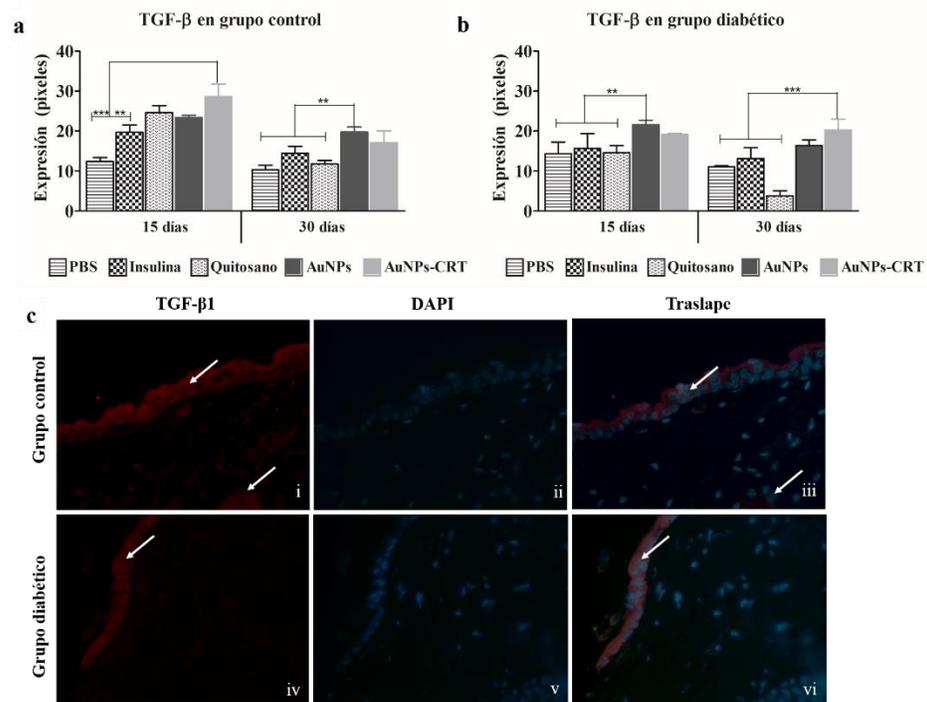


Figura 32. Expresión de TGF- β_1 en tejido del área de la herida por IFI. a) Intensidad de la expresión de TGF- β_1 en grupo control, b) intensidad de la expresión de TGF- β_1 en grupo diabético. c) fotografías de IFI grupo control (i-iii) y grupo diabético (iv-vi) (Fotografías tomadas a 40x). Diferencia significativa ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.0001$.

La expresión de CK-5 a los 15 días mostro un incremento significativo en el grupo control con el tratamiento de AuNPs-CRT en contraste con el tratamiento de insulina, y a los 30 días la expresión incremento con los tratamientos PBS, insulina, quitosano y AuNPs (figura 33a). En el grupo diabético la expresión fue similar a los 15 y 30 días con todos los tratamientos utilizados (figura 33b). La figura 33c corresponde a las fotografías de IFI de los cortes histológicos del área de la herida tratada con AuNPs-CRT, donde la expresión de CK-5 se identificó con fluorescencia en color rojo (TR) y el DNA se tiño en color azul (DAPI). La expresión de CK-5 en el grupo control se observó principalmente en la epidermis y en el grupo diabético en la epidermis y dermis (figura 33c (i) y (iv)).

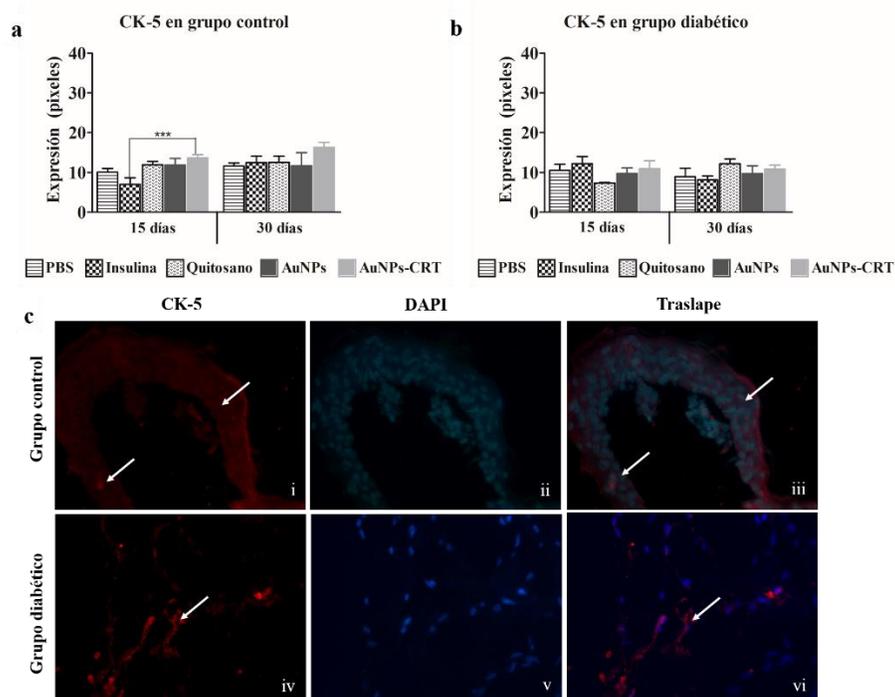


Figura 33. Expresión de CK-5 en tejido del área de la herida por IFI. a) Intensidad de la expresión de CK-5 en grupo control, b) intensidad de la expresión de CK-5 en grupo diabético. c) fotografías de IFI grupo control (i-iii) y grupo diabético (iv-vi) (Fotografías tomadas a 40x). Diferencia significativa *** $p < 0.0001$.

La expresión de CRT solamente se incrementó significativamente a los 15 días con el tratamiento de AuNPs-CRT en contraste con PBS, insulina y quitosano el grupo control y con quitosano en el grupo diabético.

Al día 30 la expresión fue muy similar (figura 34a y 34b). La figura 34c corresponde a las fotografías de IFI de los cortes histológicos del área de la herida tratada con AuNPs-CRT, donde la expresión de CK-5 se identificó con fluorescencia en color rojo (TR) y el DNA se tiñó en color azul (DAPI). La expresión de CK-5 se observó principalmente en la epidermis en ambos grupos (figura 34c (i) y (iv)).

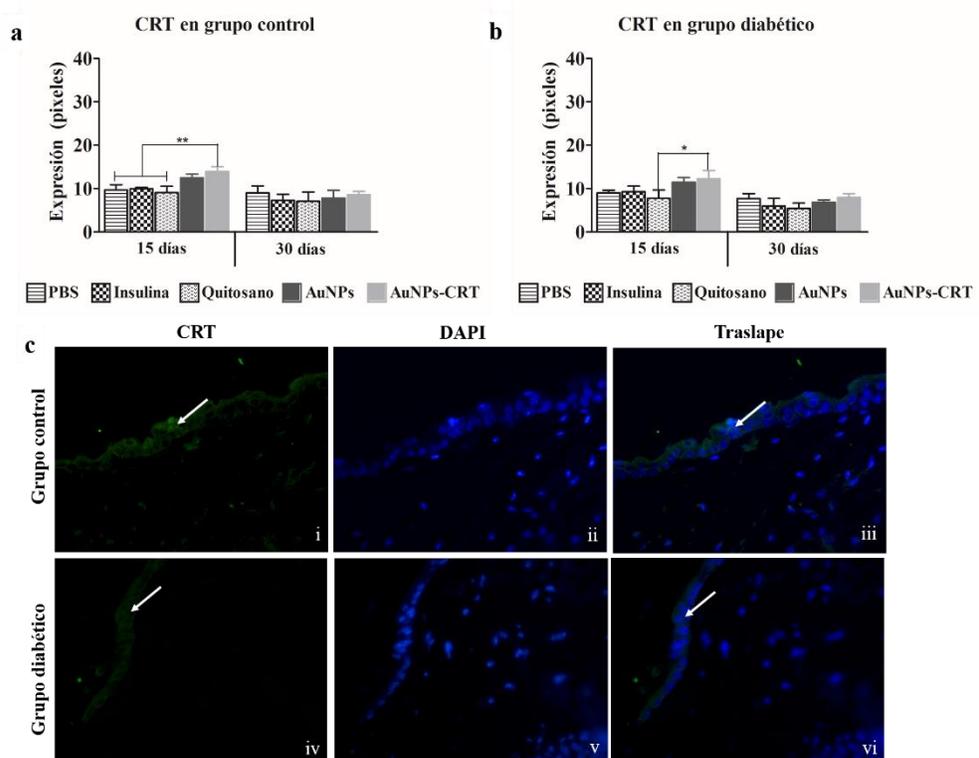


Figura 34. Expresión de CRT en tejido del área de la herida por IFI. a) Intensidad de la expresión de CRT en grupo control, b) intensidad de la expresión de CRT en grupo diabético. c) fotografías de IFI grupo control (i-iii) y grupo diabético (iv-vi) (Fotografías tomadas a 40x). Diferencia significativa * $p < 0.01$ y ** $p < 0.001$.

8. DISCUSIÓN

El proceso de cicatrización en úlceras de pie diabético aun no es muy claro pero la búsqueda de materiales y métodos que puedan ayudar a remodelar las heridas se está llevando a cabo, tal es el caso de las nanopartículas metálicas que están siendo utilizadas en diversas aplicaciones biológicas (Naraginti S. *et al* 2016).

En este trabajo se sintetizó un nanocompuesto a base de quitosano y nanopartículas de oro (AuNPs) funcionalizadas con calreticulina (CRT), el cual fue evaluado *in vitro* para determinar su efecto en la viabilidad celular, el proceso de migración, producción de citocinas y activación del factor NFκB, y en un modelo *in vivo* de diabetes se evaluó en el proceso de cicatrización.

La obtención de nanopartículas de oro (AuNPs) y nanopartículas de oro funcionalizadas con calreticulina (AuNPs-CRT) se confirmó por medición de la difracción de rayos-X que corresponde con los planos (200) y (111) del oro como lo reportado por Venkatachalam M. *et al* 2013. La caracterización de las AuNPs de acuerdo con los datos obtenidos del plasmon de resonancia (SPR), el tamaño de distribución por DLS y el espectro de infrarrojo (FTIR) demuestran una funcionalización con la calreticulina de acuerdo con lo observado por Mocan I. *et al.* 2016. Además, las bandas observadas en el FTIR de las AuNPs-CRT a 1635, 1544 y 1336 cm^{-1} sugieren una interacción química entre las AuNPs y la calreticulina (Mocan I. *et al.* 2016).

El tamaño de la calreticulina es dependiente de la variación fisiológica de calcio (Ca^{+2}). El tamaño promedio de la calreticulina con diferentes concentraciones de Ca^{+2} fue de 10 a 60 nm y una carga positiva (Villamil G. *et al.* 2010). Las nanopartículas sintetizadas mostraron tamaños promedio de 5.2 nm (AuNPs) y 92 nm (AuNPs-CRT) estos resultados concuerdan con el rango de medición obtenido por Villamil G. *et al.* 2010.

La liberación de calreticulina fue constante por un periodo de 48 horas (71.52%).

Este resultado es de relevancia debido a que la calreticulina es requerida para la proliferación de fibroblastos y la producción de factores de crecimiento en la primera etapa del proceso de cicatrización (Gold LI. *et al* 2010).

Otro resultado obtenido es que las AuNPs-CRT no afectan la viabilidad celular de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales, lo que sugiere que estas promueven el proceso de cicatrización de manera más efectiva.

Los fibroblastos son una población heterogénea de células estructurales que están distribuidas en el tejido conectivo con un importante papel en la deposición de componentes de la ECM, como colágeno tipo I, III y V, así como la formación de membranas basales por la secreción de colágeno tipo IV y laminina. Además, los fibroblastos son fundamentales en mantener la homeostasis a través de la secreción de factores de crecimiento, liberación de MMP y su participación en la reparación en el proceso de cicatrización (Vieira L. *et al* .2017)

El ensayo de migración se utilizó para imitar las circunstancias y condiciones de una herida y su reparación, en donde observamos que la migración celular fue dependiente de la concentración de AuNPs-CRT utilizada y que a bajas concentraciones el proceso es más rápido en comparación con el control. La migración celular es un evento clave en el proceso de cicatrización, especialmente la migración de fibroblastos durante la segunda etapa cuando el tejido granular es formado (Borges GA. *et al* .2017).

La vía de señalización del factor NFκB es la principal vía de regulación de la producción de citocinas proinflamatorias y de la expresión de varios genes involucrados en diversas funciones celulares como: migración, diferenciación, adhesión y supervivencia (Park Y.R. *et al* 2017, Qin R. *et al* 2019).

La cicatrización adecuada de las heridas se logra mediante la activación e infiltración de neutrófilos y macrófagos, que producen citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , INF- γ , MCP-1 e IL-6. Estas citocinas inflamatorias dan lugar a la activación de factores de crecimiento como el TGF, VEGF y factores que resultan en la proliferación y migración de fibroblastos al sitio de lesión (Shah A. y Amini-Nik S. 2017).

La activación del factor NFκB (p65) en células NIH/3T3 fue mayor a concentraciones bajas de AuNPs-CRT (1.5 y 3 μM) en contraste con los tratamientos estimulantes LPS y TNF-α, por lo tanto, el incremento en la expresión de TNF-α, INF-γ, proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), IL-12p70, IL-10 e IL-6 en células tratadas con AuNPs-CRT está relacionado con este proceso. Estos resultados sugieren que las AuNPs-CRT favorecen la migración y proliferación de células NIH/3T3 a través de la activación de la ruta canónica de NFκB.

Para elucidar el efecto biológico del nanocompósito en el proceso de cicatrización establecimos un modelo de diabetes en ratones, ya que a pesar de todas las herramientas diagnósticas y terapéuticas disponibles el tratamiento de úlceras de pie diabético sigue siendo deficiente (Tecilazich F. *et al* 2013).

Los resultados obtenidos de la evaluación del nanocompósito AuNP-CRT en el proceso de cicatrización en el modelo *in vivo* demostraron un cierre más rápido de la herida en ambos grupos (control: 18 días y diabético: 20 días), en comparación con los otros tratamientos (PBS, insulina, quitosano, AuNPs). El uso de nanocompósitos de quitosano y AuNPs han presentado buenos resultados en el proceso de cicatrización, como lo reportado por Lu B. *et al* 2018 que observaron un 100% de cierre de la herida a los 19 días de evaluación. Correlacionando con estos resultados la evaluación histológica de los tejidos mostro re-epitelización y formación de tejido granular en heridas tratadas con AuNP-CRT, así como formación de vasos sanguíneos y folículos pilosos, y un mayor depósito de fibras de colágeno tipo I, comparado con los otros tratamientos.

La patogenia de las úlceras de pie diabético está estrechamente relacionada con trastornos vasculares periféricos. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es uno de los mitógenos de las células endoteliales más potentes que desempeñan un papel crucial en la angiogénesis, ya que es un regulador de las vías vasculares mediadas por integrinas que participan en la curación de heridas, por lo que el incrementar su expresión puede reducir el riesgo de desarrollar úlcera de pie diabético y acelerar el proceso de cicatrización (Li X. *et al* 2018).

El tratamiento de AuNPs-CRT incremento la expresión de VEGF en el tejido de ambos grupos (control y diabético) en contraste con los otros tratamientos. De igual manera este tratamiento incremento la expresión de Ang-1 en ambos grupos.

La Ang-1 tiene efectos sobre la protección vascular al suprimir la fuga de plasma, inhibir la inflamación vascular y prevenir la muerte endotelial, además está relacionada con la remodelación de vasos sanguíneos y la inducción de angiogénesis, lo que destaca su potencial terapéutico en la curación de heridas (Brinde N. *et al* 2008). El incremento en la expresión de ambas proteínas favorece el proceso de cicatrización Tal como lo reportado por Alter A, *et al* 2008, donde la combinación de VEGF y Ang-1 aumenta la proliferación y migración de células endoteliales en un modelo *in vitro*, además de que la Ang-1 actúa como un agente quimiotáctico puede aumentar la velocidad de cierre de la lesión.

El TGF- β es una familia de proteínas multifuncionales que juega un papel central en la curación de heridas influyendo en la respuesta inflamatoria, en la angiogénesis, en la formación del tejido granular, re-epitelización y deposición de proteínas de matriz extracelular (El Gzaerly H. *et al* 2013).

El incremento en la expresión de TFG- β_1 con el tratamiento de AuNPs-CRT en ambos grupos se correlaciona con los resultados del porcentaje de cierre de la herida y la evaluación histológica, este mismo efecto fue observado por El Gzaerly H. *et al* 2013, donde heridas tratadas con TGF- β_1 al día 14 presentaron una completa regeneración epitelial y remodelación del tejido caracterizado por abundantes depósitos de colágeno tipo I.

Cuando se produce una lesión los queratinocitos se activan a través de una serie de factores de crecimiento y otras moléculas de señalización, lo que conduce a la activación de vías de traducción que desencadenan la expresión de citoqueratinas CK5, CK6, CK16 y CK17 favoreciendo la migración y proliferación (Luo S. *et al.* 2011). La expresión de CK5 con los distintos tratamientos fue similar en ambos grupos a los 15 y 30 días. Cabe mencionar que la proliferación de queratinocitos se da en las dos primeras etapas del proceso de cicatrización: inflamación (1-5 días posteriores a la lesión) y proliferación (6-14 días posteriores a la lesión) por lo que tal vez al evaluar la expresión de CK5 no se observaron diferencias.

La (CRT) intracelular se expresa durante la cicatrización de heridas y aumenta en respuesta al estrés durante lesión celular. A pesar de que no existe una ruta bien estudiada de salida de la CRT de las células, esta podría haber evolucionado y presentar efectos favorables en el proceso de cicatrización y la liberación de células muertas (Pandya U. y Gold I. 2016).

La expresión de CRT fue significativa a los 15 días con el tratamiento de AuNPs-CRT en ambos grupos, disminuyendo al día 30. Se ha observado que la aplicación tópica de CRT proporciona una cantidad adicional de proteína para la curación de heridas, este efecto fue observado en heridas en un modelo porcino y un modelo murino (Nanney LB. *et al* 2008).

9. CONCLUSIONES

Los ensayos *in vitro* mostraron que el nanocompósito de AuNPs-CRT no afecta la viabilidad de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales. Además, favorece la migración de fibroblastos y la producción de algunas citocinas inflamatorias las cuales son de vital importancia para el proceso de cicatrización.

En el modelo *in vivo* las heridas tratadas con el nanocompósito de AuNPs-CRT presentaron un cierre más rápido, aumento de la deposición de fibras de colágeno tipo I y una rápida re-epitelización y formación de tejido granular. Aunado a esto se observó un incremento en las principales proteínas involucradas en el proceso de cicatrización como angiopoyetina-1, VEGF, TGF- β_1 y CK-5.

Con estos resultados obtenidos se comprobó la hipótesis establecida al inicio de la investigación lo que abre la posibilidad de utilizar el nanocompósito de AuNPs-CRT en el tratamiento de las úlceras de pie diabético y realizar evaluaciones en un entorno clínico.

10.PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis abren la posibilidad de establecer el uso del nanocompósito a base de quitosano y nanopartículas de oro funcionalizadas con calreticulina en el tratamiento de úlceras de pie diabético y heridas cutáneas en general.

11.REFERENCIAS

Ahmed S, Ikram S. 2016. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. *Achievements in the Life Science* 10:27-37.

Al Enizi AM, Zagho MM, Elzatahry AA. 2018. Polymer-Based Electrospun Nanofibers for Biomedical Applications. *Nanomaterials* 8, 259: 1-22.

Alexiadou K, Doupis J. 2012. Management of Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Ther* 3(4): 1-15.

Alter A, Schmiedeck D, Fussnegger MR, Pries AR, Freesmeyer WB, Zakrzewicz A. 2008. La angiopoyetina-1, pero no el factor de crecimiento derivado de las plaquetas-AB, es un estimulador coadyuvante del factor de crecimiento endotelial vascular-A en el cierre de lesiones endoteliales en un modelo *in vitro*. *Annals of Vascular Surgery Inc.* 23 (2). 263-269.

Azuma K, Izumi R, Osaki T, Ifuku S, Morimoto M, Saimoto H, Minami S, Okamoto Y. 2015. Chitin, Chitosan, and Its Derivatives for Wound Healing: Old and New Materials. *Journal of Functional Biomaterials* 6: 104-142.

Boisseau P, Loubaton B. 2011. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Physique* 12: 620-636.

Borges G.Á, Elias S.T, da Silva S.M, Magalhães P.O, Macedo S.B, Ribeiro A.P, Guerra E.N. 2017. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. *J. Craniomaxillofac Surg.* 45,364–370.

Brem H, Tomic-Canic M. 2007. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* 117: 1219-1222.

Brinde N, Saharine P, Alitalo K. 2008. Signalling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Cir. Res.* 98 (8): 1014-1023.

Cancer Care of Western New York. (imagen). 2014. Disponible en: <https://www.cancercarewny.com/content.aspx?chunkid=103883>

Chen H, Zhou K, Zhao G. 2018. Gold nanoparticles: From synthesis, properties to their potential application as colorimetric sensors in food safety screening. *Trends in Food Science & Technology* 78: 83-94.

Diegelmann R, Evans M. 2004. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience* 9, 283-289.

Del Castillo RA, Fernández JA, del Castillo FJ. 2014. Guía práctica clínica en el pie diabético. *Archivos de Medicina* 10(2):1-17.

Designua Professional Photography & Design Profile. (imágenes). 2006. Disponible en <https://es.123rf.com/products/>

Eggleton P, Michalak M. 2013. Calreticulin for better or for worse, in sickness and in health, until death do us part. *Cell calcium* 54: 126-131.

El Gzaerly H, Elbardisey DM, Eltokhy HM, Teaama D. 2013. Effect of Transforming Growth Factor Beta 1 on Wound Healing in Induced Diabetic Rats. *International Journal of Health Sciences*. 7 (2):160-172.

Emanuelli T, Burgeiro A, Carvalho E. 2016. Effects of Insulin on the Skin: Possible Healing Benefits for Diabetic Foot Ulcers. *Arch Dermatol Res* 308:677-694.

Greives MR, Samra F, Pavlides SC, Blechman KM, Naylor SM, Woodrell CD, Cadacio C, Levine JP, Bancroft TA, Michalak M, Warren SW, Gold LI. 2012. Exogenous calreticulin improves diabetic wound healing. *Wound Repair and Regeneration* 20:715-730.

Gold LI, Eggleton P, Sweetwyne MT, Van Duyn LB, Greives MR, Naylor SM, Michalak M, Murphy-Ulrich JE. 2010. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *The FASEB Journal* 24: 665-683.

Goldman R. 2004. Growth Factors and Chronic Wound Healing: Past, Present, and Future. *Clinical Review* 17:24-35.

González ACO, Costa TF, Andrade ZA, Medrado ARAP. 2016. Wound healing-A literature review. *An Bras Dermatol* 91(5):614-620.

Hamdan S, Pastar I, Drakulich S, Dikici E, Canic-Tomic M, Deo S, Daunert S. 2017. Nanotechnology-Driven Therapeutic Interventions in Wound Healing: Potential Uses and Applications. *American Chemical Society* 3: 163-175.

Hoke GD, Ramos C, Hoke NN, Crossland MC, Shawler LG, Boykin JV. 2016. Atypical diabetic foot ulcer keratinocyte protein signal correlates with impaired wound healing. *Journal of Diabetes Research* 1-10.

Jeyasekaran E, Venkatachalam S. 2017. Synthesis and characterization of chitosan-stabilized gold nanoparticles through a facile and green approach. *Gold Bull* 50:1-5.

Leu JG, Chen SA, Chen HM, Wu WM, Hung ChF, Yao YD, Tu ChS, Liang YJ. 2012. The effects of gold nanoparticles in wound healing with antioxidant epigallocatechin gallate and α -lipoic acid. 8:767-775.

Li Ch, Yu T, Liu Y, Chen X, Zhang X. 2015. Topical Application of Insulin Accelerates Vessel Maturation of Wounds by Regulating Angiopoietin-I in Diabetic Mice. *Basic and Experimental Research* 14(4):353-364.

Li X, Lu Y, Wei P. 2018. Association between VEGF genetics variants and diabetic foot ulcer in Chinese Han population. 97(20): 1-4.

Lu B, Ye H, Shang S, Xiong Q, Yu K, Li Q, Xiao Y, Dai F, Lan G. 2018. Novel wound dressing with chitosan gold nanoparticles capped with a small molecule for effective treatment of multiantibiotic-resistant bacterial infections. *Nanotechnology*. 29: 425603.

Luo S, Yufit T, Carson P, Fiore D, Falanga J, Lin X, Mamakos L, Falanga V. 2011. Differential keratin expression during epiboly in a wound model of bioengineered skin and in human chronic wounds. *In J Low Extrem Wounds* 10(3): 122-129.

Mengarelli HR, Belati A, Bilevich E, Gorosito S, Fernández P. 2013. La importancia del desbridamiento en heridas crónicas. *Flebología y Linfología- Lecturas Vasculares* 8(20): 1253-1260.

Mocan L, Matea C, Tabaran F.A., Mosteanu O, Pop T, Puia C, Agoston-Coldea L, Gonciar D, Kalman E, Zaharie G. 2016. Selective *in vitro* photothermal nano-therapy of MRSA infections mediated by IgG conjugated gold nanoparticles. *Sci. Rep.* 6, 1–9.

Montequin FJ, Mena G, Santiesteban L. 2010. Tratamiento y recuperación del pie diabético grado 5 de la clasificación de Wagner tras aplicar el Heberprot-P. *Biotecnología aplicada* 27: 110-112.

Moura LIF, Dias AMA, Carvalho E, de Sousa HC. 2013. Recent advances on the development of wound dressing for diabetic foot ulcer treatment-A review. *Acta Biomaterialia* 9: 7093-7114.

Muzarrelli R. 2009. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers* 76: 167-182.

Nanney LB, Woodrell CD, Greives MR, Cardwell NL, Pollins AC, Bancroft TA, Chesser A, Michalak M, Rahman M, Siebert JW, Gold LI. 2008. Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects. *Am. J. Pathol* 173: 611–630.

Naraginti S, Lakshmi Kumari P, Kumar Das R, Sivakumar A, Hindurao Patil S, Vilas Andhalkan V. 2016. Amelioration of excision wounds by topical application of green synthesized, formulated silver and gold nanoparticles in albino Wistar rats. *Mater. Sci. Eng.* 62:293-300.

Pandya UM, Gold IL. 2016. The Novel Biotherapeutic Calreticulin (CRT) Corrects Multiple Defects of Non-Healing Diabetic Wounds. *Journal of Dermatology and Clinical Research.* 4(5):1-9.

Park YR, Sultan dT, Park HJ, Min Lee J, Ju HW, Lee OJ, Lee DJ, Kaplan DL, Park CH, 2017 NF- κ B signaling is key in the wound healing processes of silk fibroin. *Acta Biomaterialia* 1-42.

Pelegrinelli F, Thirone A, Gasparetti A, Araujo G, Velloso L, Saad M. 2001. Early Steps of Insulin Action in the Skin of Intact Rats. *Journal of Investigative Dermatology* 117(4):971-976.

Protocolos de cuidado de pie diabético. 2005. Hospital Universitario Ramón y Cajal: Dirección de enfermería 1-7.

Qi M, Zhou Q, Zeng W, Wu L, Zhao S, Chen W, Luo Ch, Shen M, Zhang J, Tang C. 2018. Growth factors in the pathogenesis of diabetic foot ulcers. *Frontiers In Bioscience, Landmarck* 23: 310-317.

Qin R, Wang Y, Wang S, Xia B, Xin R, Li Ch, Wu Y. 2019. Nickel-refining dust regulates the expression of inflammatory factors in NIH/3T3 cells. *Toxicology and Industrial Health* 35 (3): 239-247.

Raftery R, O'Brien F, Cryan S. 2013. Chitosan for Gene Delivery and Orthopedic Tissue Engineering Applications. *Molecules*; 18: 5611-5647.

Rajendram NK, Kumar SSD, Houreld NN, Abrahamse H. 2018. A review on nanoparticle-based treatment for wound healing. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 44: 421-430.

Regiel-Futyra, A.; Kus-Liskiewicz, M.; Sebastian, V.; Irusta, S.; Arruebo, M.; Stochel, G.; Kyziol, A. 2015. Development of noncytotoxic chitosan-gold nanocomposites as efficient antibacterial materials. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7: 1087–1099.

Shah A, Amini-Nik S. 2017. The role of phytochemicals in the inflammatory phase of wound healing. *International Journal of Molecular Science*. 18: 1-17.

Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. 2017. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research* 58: 81-94.

Takeo M, Lee W, Ito M. 2015. Wound Healing and Skin Regeneration. Cold Spring Harbor Perspective in Medicine 5: a023267.

Tan WS, Arulselvan P, Ng SF, Taib NM, Sarian NM, Fakurazi S. 2019. Improvement of diabetic wound healing by topical application of Vicenin-2 hydrocolloid film on Sprague Dawley rats. BMC Complementary and Alternative Medicine 19 (20): 1-16.

Tecilazich F, Dinh T.L, Veves A. 2013. Emerging drugs for the treatment of diabetic ulcers. Expert Opin. Emerg. Drugs 18, 207–217.

Tiwari PM, Vig K, Dennis VA, Singh SR, 2011. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. Nanomaterials 1: 31-63.

Turkevich J, Cooper Stevenson P, Hillier J. 1951. A study of nucleation and grown processes in the synthesis of colloidal gold. Discuss Faraday Soc 11:55-75

Ubillos N, Valdes B, Echarte L, Sujanov A, Agorio C, Touriño C, Díaz L, Otero G. 2018. Tratamiento complementario de heridas crónicas con factor de crecimiento estimulante de colonias de granulocitos. A propósito de dos casos clínicos. Rev. urug. med. Interna. 1:30-38.

Vedhanayagam M, Nair BU, Sreeram KJ. 2019. Effect of functionalized gold nanoparticles on collagen stabilization for tissue engineering application. International Journal of Biological Macromolecules 123: 1211-1220.

Venkatachalam M, Govindaraju K, Mohamed Sadiq A, Tamilselvan V, Singaravelu G. 2013. Functionalization of gold nanoparticles as antidiabetic nanomaterial. Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 116, 331–338.

Vieira L, Lins M, Viana I, dos Santos J, Smaniotto S, Reis M. 2017. Metallic nanoparticles reduce the migration of human fibroblast *in vitro*. Nanoscale Research Letter 12 (200), 1-9.

Vijayakumar V, Samal SK, Mohanty S, Nayak SK. 2019. Recent advancements in biopolymer and metal nanoparticle-based materials in diabetic wound healing management. International Journal of Biological Macromolecules 122 (1):137-148.

Villamil Giraldo A.M, Lopez Medus M, Gonzalez Lebrero M, Pagano R, Labiola C, Landolfo L, Delfino J, Parodi A, Caramelo J. 2010. The structure of calreticulin C-terminal domain is modulated by physiological variations of calcium concentrations. *J. Biol. Chem.* 285, 4544–4553.

Wang WA, Groenendyk J, Michalak M. 2012. Calreticulin signaling in health and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44:842-846.

Yeom C-H, Lee G, Park GL, Park J-H, Yu J, Park S, Yi S.-Y, Lee HR, Hong YS, Yang J, Lee S. 2009. High dose concentration administration of ascorbic acid inhibits tumor growth in BALB/C mice implanted with sarcoma 180 cancer cells via the restriction of angiogenesis. *J. Transl. Med* 7(70):1-9.

Yu T, Gao M, Yang P, Pei Q, Liu D, Wang D, Zhang X, Liu Y. 2017. Topical insulin accelerates cutaneous wound healing in insulin-resistant diabetic rats. *Am J Transl Res* 9(10):4682-4693.

Zhang Z, LV L. 2016. Effect of local insulin injection on wound vascularization in patients with diabetic foot ulcer. *Experimental and Therapeutic Medicine* 11: 397-402.

Zare Y, Shabani I. 2016. Polymer/metal nanocomposite for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C* 60: 195-203.

Zsedenyi A, Farkas B, Abdelrasoul GN, Romano I, Gyukity-Sebestyen E, Nagy K, Harmati M, Dobra G, Kormondi S, Decsi G, Nemeth IB, Diaspro B, Brandi F, Beke S, Buzas K. 2017. Gold nanoparticle-filled biodegradable photopolymer scaffolds induced muscle remodeling: *in vitro* and *in vivo* findings. *Materials Science and Engineering C* 72:625-630.

12.RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Sara Paola Hernández Martínez

Candidato para el grado de

Doctora en Ciencias con orientación en Inmunobiología

Tesis: EVALUACIÓN DEL PROCESO DE CICATRIZACIÓN DE HERIDAS TRATADAS CON NANOCOMPÓSITOS A BASE DE QUITOSANO Y NANOPARTÍCULAS DE ORO FUNCIONALIZADAS CON CALRETICULINA

Campo de estudio: Ciencias Biológicas

Datos personales: Nacida en Zacatecas, Zacatecas el 13 de enero de 1986, hija de Silvia Martínez Carrillo.

Licenciatura: Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Zacatecas. Grado obtenido: Título Químico Farmacéutico Biólogo.

Maestría: Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Grado obtenido: Título Maestra en Ciencias con orientación en Inmunobiología.