

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO DE LOS EXOSOMAS AISLADOS DEL IMMUNEPOTENT CRP SOBRE
EL PROCESO DE CICATRIZACIÓN EN RATONES DIABÉTICOS HEMBRA
BALB/C.

POR

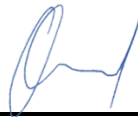
M.C. PAOLA LEONOR GARCÍA CORONADO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE: DOCTOR EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2024

EFFECTO DE LOS EXOSOMAS AISLADOS DEL IMMUNEPOTENT CRP
SOBRE EL PROCESO DE CICATRIZACIÓN EN
RATONES DIABÉTICOS HEMBRA BALB/C

Comité de tesis



Dr. Moisés Armides Franco Molina
Presidente



Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario



Dr. Santiago Saavedra Alonso
Vocal



Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal



Dra. Diana Ginette Zárate Triviño
Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirector de posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

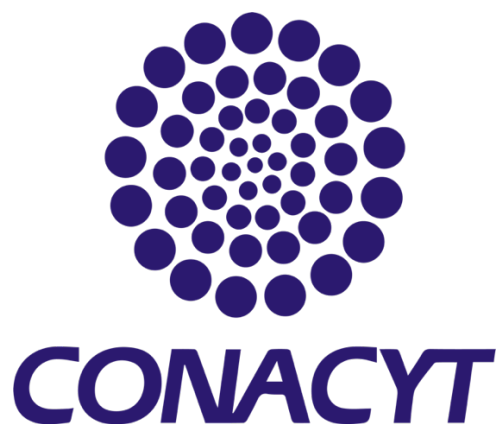
Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México; por LONGEVEDEN S.A. de C.V.

DEDICATORIA

Le dedico esta tesis a mis padres Juana María Coronado Tolentino y Jorge Arturo García González. Gracias por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS



El desarrollo de esta Tesis se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del Laboratorio de Inmunología y Virología y al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología.

Agradecimiento especial a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, Jefa del Laboratorio de Inmunología y Virología, por el apoyo brindado para la realización de este proyecto de Investigación.

Le agradezco principalmente mi familia, especialmente a mis padres, porque gracias a ellos soy la persona que soy. Por estar siempre para mí. Gracias a mi madre por su amor incondicional; a mi padre por sus clases desde pequeña. Gracias a mis hermanos, Katia y Jorge por su apoyo.

También le agradezco a los maestros que tuve a lo largo de la maestría. Por enseñarme no solo conocimientos, si no como obtenerlos.

Quiero agradecer también a mis compañeros de laboratorio, por ayudarme en el trayecto, a Kenia, Bety, Tony, David, Nato, Brandon, Rodrigo, Leo, y Gustavo. Gracias al Dr. Moisés Franco por darme la oportunidad de entrar al laboratorio, su amistad y consejos. Es muy importante para mí agradecerle, ya que se concluye una etapa importante en mi vida, usted me aceptó en su laboratorio cuando yo era una alumna de licenciatura de cuarto semestre y el día de hoy estoy a punto de concluir mis estudios doctorales,. También agradezco a mis otras amistades que directa o indirectamente han ayudado a concluir esta tesis, ¡gracias Dra. Sara, Dra. Yarellys!. Agradezco a los doctores que conforman mi comité de tesis, ya que a lo largo de mi formación académica me han ayudado a crecer como investigadora y como persona con sus consejos. Especialmente a la Dra. Diana Zárate por aconsejarme académica y personalmente.

Gracias a mis mascotas Cactus Jack, Panadera y Lagertha que alegran todos mis días, ¡Los amo!

Finalmente, gracias a los ratones que fueron empleados durante esta investigación. Descansen en paz. Realmente trate de hacerlo de la mejor manera posible, sin ustedes esta tesis no hubiera ocurrido.

ÍNDICE

<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	
<i>RESUMEN</i>	
<i>ABSTRACT</i>	
1.-INTRODUCCIÓN	1
2.-ANTECEDENTES	3
2.1.-Diabetes mellitus.....	3
2.2.-Complicaciones de la diabetes mellitus.....	5
2.3.- Heridas diabéticas	10
2.4.- Úlceras diabéticas y tratamientos convencionales para heridas diabéticas	14
2.5.- Exosomas como tratamiento de cicatrización.....	16
2.6.- IMMUNEPOTENT CRP, inmunomodulador antiinflamatorio y antioxidante	18
2.7.- Exosomas en dializados	18
2.8.- Inducción de un modelo de diabetes con estreptozotocina en animales.....	19
3.-JUSTIFICACIÓN	21
4.-HIPÓTESIS	22
5.-OBJETIVO GENERAL	23
6.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
7.-ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
8.- METODOLOGÍA	25
8.1.-Caracterización de los exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP.....	25
8.2.-Caracterización del proteoma del IMMUNEPOTENT CRP	25
8.3.-Caracterización de las proteínas exclusivas de exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP	26
8.4.-Evaluación de las funciones biológicas del IMMUNEPOTENT CRP <i>in silico</i>	26
8.5.-Aislamiento de exosomas del IMMUNEPOTENT CRP	26
8.6.-Prueba de potencia del IMMUNEPOTENT CRP	27
8.7.-Prueba de medio condicionado.....	28
8.8.-Encapsulación de la insulina en los exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP	28

8.9.-Prueba de viabilidad.....	29
8.10.-Prueba del scratch <i>in vitro</i>	30
8.11.-Inducción de diabetes tipo 1 en ratones balb/c.....	30
8.12.-Evaluación del cierre de herida en ratones.....	31
8.11.-Evaluación de la síntesis de colágeno en la herida.....	31
8.11.-Evaluación en el sitio de la herida de número de células, grueso y area del epitelio y tejido de granulación.....	32
8.11.-Evaluación de citocinas pro-inflamatorias.....	33
8.11.-Activación de marcadores de la via PI3K-AKT.....	33
8.11.-Análisis estadístico.....	34
9.-RESULTADOS.....	35
9.1.-El IMMUNEPOTENT CRP posee exosomas.....	35
9.2.-Exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP no poseen efecto sobre la viabilidad pero inducen apoptosis tardía en células 4t1 en una prueba de potencia.....	36
9.3.-Efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la línea celular HUVEC.....	39
9.3.-El IMMUNEPOTENT CRP promueve proliferación celular y migración en células de la dermis.....	40
9.3.-Efecto del IMMUNEPOTENT CRP y sus partes sobre la viabilidad de células HUVEC, NIH-3T3 Y HACAT.....	42
9.3.-Los exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP encapsulan insulina funcionando como nanovectores.....	44
9.3.-Los exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP promueven proliferación celular y migración en células de la dermis.....	46
9.3.-Los exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP cargados con insulina promueven el cierre de herida en modelo <i>in vivo</i>	47
9.3.-Evaluación del tejido de granulación, grueso de epitelio y número de células post-tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP y sus partes.....	52
9.3.-El tratamiento tópico con exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP modula la expresión de citocinas pro-inflamatorias en modelo murino.....	55
9.3.-Los exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP solos o cargados con insulina activan componentes de la vía PI3 AKT para promover cierre de herida.....	57
10.-DISCUSIÓN.....	59
11.-CONCLUSIONES.....	68
12.-PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.....	70
13.-REFERENCIAS.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Clasificación de Wagner (1987)</i>	15
<i>Tabla 2. Marcadores proteicos de exosomas de Bos taurus</i>	36
<i>Tabla 3. Viabilidad postratamiento con ICRP y sus partes (%)</i>	44
<i>Tabla 4. Encapsulación de insulina en exosomas aislados del ICRP</i>	45
<i>Table 5. Calificación del tejido cutáneo en sitios de herida post-tratamiento</i>	54

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Tasa de mortalidad por diabetes mellitus (2011-2020) por cada 10,000 habitantes</i>	<i>4</i>
<i>Figura 2. Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo por sexo en adultos de 20 años o más.....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 3. Efecto de las hormonas pancreáticas sobre la producción de glucosa por el hígado.....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 4. Hormonas contrarreguladores de la glucosa.</i>	<i>8</i>
<i>Figura 5. Complicaciones en pacientes diabéticos asociadas a la hiperglicemia</i>	<i>9</i>
<i>Figura 6. Prevalencia estimada de los factores de riesgo relacionados a complicaciones en pies (2012-2022).....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 7. Fases de la cicatrización.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 8. Estrategia experimental general.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 9. El IMMUNEPOTENT CRP contiene exosomas con un tamaño promedio de 60 nm.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 10. Efecto citotóxico del ICRP en la línea celular 4T1.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 11. Los exosomas aislados del ICRP promueven la apoptosis temprana en la línea celular 4T1.</i>	<i>38</i>
<i>Figura 12. El medio acondicionado de sangre tratada con ICRP promueve la proliferación de la línea celular HUVEC.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 13. Funciones biológicas inducidas por proteínas del ICRP en células de fibroblastos sanos.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 14. Los exosomas aislados del ICRP aumentan la viabilidad celular.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 15. Porcentaje de liberación de insulina.</i>	<i>45</i>
<i>Figura 16. Los exosomas solos y los exosomas-insulina estimulan la proliferación y migración celular.</i>	<i>47</i>
<i>Figura 17. Nivel de glucosa postprandial en ratones diabéticos hembra BALB/c.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 18. Los exosomas y exosomas-insulina favorecen un cierre acelerado de la herida.</i>	<i>49</i>
<i>Figura 19. Los tratamientos con exosomas y exosomas-insulina inducen una cicatrización acelerada de las heridas.</i>	<i>51</i>

<i>Figura 20. Inducción de la cicatrización / regeneración de la herida mediante ICRP y sus partes.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 21. Expresión de citoquinas inflamatorias en ratones diabéticos tratados tópicamente en el sitio de la herida.</i>	<i>56</i>
<i>Figura 22. Las heridas por escisión en ratones diabéticos tratados con exosomas y exosomas-insulina sanan más rápido mediante la activación de la vía AKT.....</i>	<i>58</i>

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Por ciento
UPD	Úlcera de pie diabético
miARN	microARN
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ICRP	IMMUNEPOTENT CRP
DM	Diabetes mellitus
FID	Federación Internacional de Diabetes
h	hora
gr	Gramos
INEGI	Instituto Nacional de Estadística
ECM	Matriz extracelular
RNA	Ácido ribonucleico
STZ	Estreptozotocina
m	metros
PBS	Buffer salino de fosfatos
Kg	kilogramo
min	minutos
mL	Mililitros
° C	Grados Celsius
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal Bovino
TA	Temperatura ambiente
V	volts
μF	microfaradio
μL	Microlitros
kDa	Kilo daltons
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
TGF	Factor de crecimiento transformante

IL	Interleucina
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo1
GIP	Polipéptido insulínico dependiente de glucosa
HIF	Factor de transcripción de hipoxia
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
MMP	Metaloproteinasas
ANG	Angiotensina
GLUT	Receptor de glucosa
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
MVB	Membranas del cuerpo multivesicular

RESUMEN

La diabetes mellitus es uno de los principales problemas de salud en México, caracterizada por hiperglicemia lo cual predispone a complicaciones como el desarrollo de úlceras de pie diabético que en muchas ocasiones termina en amputación del miembro, se dice que cada 30 segundos se amputa un miembro en el mundo a causa de la diabetes. El creciente riesgo de amputación por úlcera del pie diabético exige nuevas opciones terapéuticas; Para ello, determinamos el papel de IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) un dializado de bazo bovino y sus partes en el proceso de cicatrización de heridas superficiales en ratones diabéticos BALB/c. Se realizó una prueba de potencia para confirmar el lote de ICRP, y de sus partes (pellet, sobrenadante y exosomas); se agregó un grupo de exosomas cargados con insulina. La viabilidad y la curación de herida en monocapa se evaluó en las líneas celulares NIH-3T3, HUVEC y NIH-3T3. La diabetes se indujo con estreptozotocina en ratones hembra BALB/c y las heridas se realizaron mediante disección de la piel del lomo. Los tratamientos se aplicaron tópicamente y monitoreó el cierre; Las citocinas inflamatorias en el suero también se evaluaron mediante citometría de flujo y el análisis histológico se realizó mediante tinción de Masson e inmunohistoquímica para p-AKT, p-FOXO, p-P21 y p-TSC2 además del monitoreo del grueso del epitelio y tejido de granulación. El pellet y los exosomas de ICRP aumentaron la viabilidad celular, y los exosomas cargados con insulina aceleraron la curación de la herida en monocapa *in vitro*. Además los exosomas cargados con insulina la liberaron constantemente a lo largo del tiempo y en pH ácido o básico *in vitro*. *In vivo*, los tratamientos aceleraron el cierre de la herida respecto al control y se observó un mejor rendimiento en los tratamientos con pellets, exosomas y exosomas cargados con insulina. La mejor expresión de colágeno fue inducida por ICRP. P-AKT y p-FOXO se sobreexpresaron a la alza en tejidos en curación. Las citoquinas inflamatorias fueron reguladas negativamente por todos los tratamientos.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is one of the main health problems in Mexico, characterized by hyperglycemia which predisposes to complications such as the development of diabetic foot ulcers that often end in limb amputation. It is said that a limb is amputated every 30 seconds in the world because of diabetes. The increasing risk of amputation due to diabetic foot ulcers requires new therapeutic options; To this end, we determined the role of INMUNPOTENT-CRP (ICRP), a dialysate from bovine spleen and its parts, in the healing process of superficial wounds in diabetic BALB/c mice. A potency test was performed to confirm the ICRP batch, and the effect of its parts (pellet, supernatant, and exosomes); a group of insulin-loaded exosomes was added. The viability and healing of scratches in monolayer were evaluated in the NIH-3T3, HUVEC, and NIH-3T3 cell lines. Diabetes was induced with streptozotocin in female BALB/c mice and wounds were made by dissection of the skin from the back. Treatments were applied topically and wound closure was monitored; Inflammatory cytokines in serum were also evaluated by flow cytometry and histological analysis was performed by Masson staining and immunohistochemistry for p-AKT, p-FOXO, p-P21, and p-TSC2 in addition to monitoring the thickness of the epithelium and granulation tissue. ICRP pellet and exosomes increased cell viability, and insulin-loaded exosomes accelerated monolayer wound healing *in vitro*. Furthermore, exosomes loaded with insulin released it constantly over time and at acidic or basic pH *in vitro*. *In vivo*, the treatments accelerated wound closure compared to the control, and better performance was observed in treatments with pellets, exosomes, and exosomes loaded with insulin. The best collagen expression was induced by ICRP. P-AKT and p-FOXO were upregulated in healing tissues compared to control. Inflammatory cytokines were downregulated by all treatments.

1.-INTRODUCCIÓN

Aproximadamente 529 millones de personas en todo el mundo vivían con diabetes mellitus (DM) en 2021, y las predicciones para 2050 indican que más de 1.31 mil millones de personas tendrán DM (Ong et al. 2023). En el 2020, 151,019 personas fallecieron a causa de consecuencias de la diabetes mellitus (DM) en México lo que equivale al 14% de defunciones (INEGI, 2021). La neuropatía periférica es una de las principales causas de ulceración del pie diabético (UPD) que ocurre cuando los nervios periféricos de las extremidades están comprometidos (Gianino et al. 2018). Siendo el 85% de las amputaciones precedidas por UPD (Gianino et al. 2018) surgiendo como un problema de salud de importancia. Aproximadamente 415 millones de personas en todo el mundo viven actualmente con DM tipo 2, lo que representa alrededor del 8.3% de la población mundial en 2015. Las úlceras del pie diabético (UPD) se destacan como una preocupación destacada. Se proyecta que hasta el 13% de los residentes de América del Norte con diabetes tipo 2 tendrán una úlcera en el pie en algún momento de sus vidas. Existe un alto riesgo de amputaciones de miembros inferiores, ya que 85% de las amputaciones relacionadas con la diabetes están precedidas por el desarrollo de úlceras. El 44% de estos pacientes enfrentan la mortalidad dentro del primer año después del procedimiento de amputación (Gasca et al. 2017). Cada medio minuto, se amputa un miembro en todo el mundo debido a la UPD (Gasca et al 2017). El proceso de cicatrización de heridas se divide en 4 etapas de la siguiente manera: homeostasis (día 1), inflamación (día 1-4), proliferación y granulación (día 4-21) y remodelación/maduración (día 21-meses). En personas con DM se han observado fallas en cualquiera de esas etapas, induciendo el desarrollo de UPD caracterizado por un ambiente inflamatorio. Los tratamientos convencionales incluyen la aplicación tópica de factores de crecimiento, metformina, insulina entre otros fármacos, con la ayuda de vendajes no adherentes adicionados con colágeno y ácido hialurónico (Falanga, et al. 2004) que intentan acelerar la regeneración celular. Siendo la insulina el tratamiento más eficaz de los mencionados. Actualmente se están introduciendo en fase clínica el uso de sustitutos de la piel humana y la terapia con células madre mesenquimales obteniendo mayor éxito con terapias combinatorias.

Los exosomas son vesículas nanométricas extracelulares (50-150 nm) secretadas por células vegetales y animales (Gurunathan et al. 2021) que ejercen diversas funciones biológicas debido a su contenido, como ADN, ARNm, miARN y proteínas (Li et al. 2021). Poseen biomarcadores característicos, tales como, CD63⁺, HSP90, HSP70, TSG1 y HMGB1 (ExoCarta 2022; Gao et al. 2021). Son capaces de actuar como componentes en la comunicación celular además de usarse como vehículos de entrega, ya que pueden liberar compuestos bioactivos, poseer estabilidad, biocompatibilidad y bioreconocimiento (Kwok et al. 2021). Son considerados nanovectores, ya que pueden transportar contenido capaz de inducir la expresión de vías de señales similares a las de su origen celular parental (Gurunathan 2021; Li et al. 2021; Kwok et al. 2021). Se ha reportado que los exosomas derivados de células madre mesenquimales utilizadas en un modelo de ratones con úlceras de pie diabético inducen una cicatrización acelerada de heridas mediante la activación de la vía PI3K-PTEN-AKT (Li et al. 2020; Zhang et al. 2018). Además de exosomas derivados de células madre adiposas que activan la misma vía en heridas diabéticas (Wang et al. 2021).

El IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) es una mezcla de sustancias de bajo peso molecular (menores a 12 kDa provenientes de un extracto de leucocitos de bazo bovino dializado), que ha demostrado ser capaz de modificar la respuesta inmune regulando la inflamación e induciendo un efecto antioxidante en macrófagos humanos. (Franco et al. 2011); también se ha empleado en ensayos clínicos demostrando modular la inflamación después de su aplicación en la extracción de terceros molares (Franco et al. 2016). El bazo es un órgano en el cual se pueden encontrar células madre de adipocito/mesenquimales, destacando en las últimas la propiedad inmunomoduladora (Hoogduijn, et al. 2007), o en general células madre de bazo con potencial para tratar la DM tipo I al inducir el linaje Hox11 que se puede diferenciar cuando existen lesiones en el tejido en islotes pancreáticos (Faustman y Davis 2010). Por lo cual se sospecha que el ICRP pueda contener péptidos y exosomas que tengan la capacidad de estimular la regeneración células. El objetivo principal de la tesis fue determinar la capacidad del ICRP y sus partes para inducir el cierre de herida en condición de diabetes en ratones hembra BALB/c.

2.-ANTECEDENTES

2.1.-Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades metabólicas crónicas de mayor incidencia en todo el mundo, consecuencia de la obesidad. Se caracteriza por la hiperglicemia en sangre que con el tiempo conduce a daños graves en el corazón, los vasos sanguíneos, los ojos, los riñones y los nervios. Se puede clasificar en 2 tipos principales según su etiología (Cole y Florez 2020). La diabetes mellitus tipo 1 (DM1), se caracteriza por la deficiencia de insulina debido a la pérdida de células β pancreáticas, por lo cual no hay producción de insulina. La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se caracteriza principalmente por alteración de la secreción de insulina y su captación, induciendo resistencia a la insulina. Los factores ambientales (obesidad, dieta poco saludable e inactividad física) y factores genéticos contribuyen a las múltiples alteraciones fisiopatológicas que son responsables del deterioro de la homeostasis de la glucosa en la DM2 (DeFronzo et al. 2015), siendo representativo del 95% de las personas con DM.

En México la DM se ha convertido en uno de los principales problemas salud desde 1950s, reportando cifras alarmantes, ya que el 14% de la población adulta mayor de 20 años sufre de la enfermedad, y en el sector de 50 años o más, el 30% la padece (Shamah et al. 2020). Según estadísticas apartir del año 2000, la DM se ha convertido en la primera causa de muerte en mujeres y segunda en hombres (Shamah et al. 2020) (Figura 2), además es considerada como la primera causa de incapacidad prematura, ceguera y amputaciones (no causadas por traumatismo).

Estadísticas más recientes realizadas en el 2020 reportaron 151,019 defunciones por causa de esta enfermedad en el país (INEGI 2021), con el tiempo estas han ido en aumento (Figura 1). En el 2021 la Federación Internacional de Diabetes (FID) estimó una prevalencia de 537 millones de adultos con diabetes mellitus a nivel mundial (International Diabetes Federation, 2021) y se estima que el 20% pueden desarrollar heridas diabéticas (Patel et al. 2019).

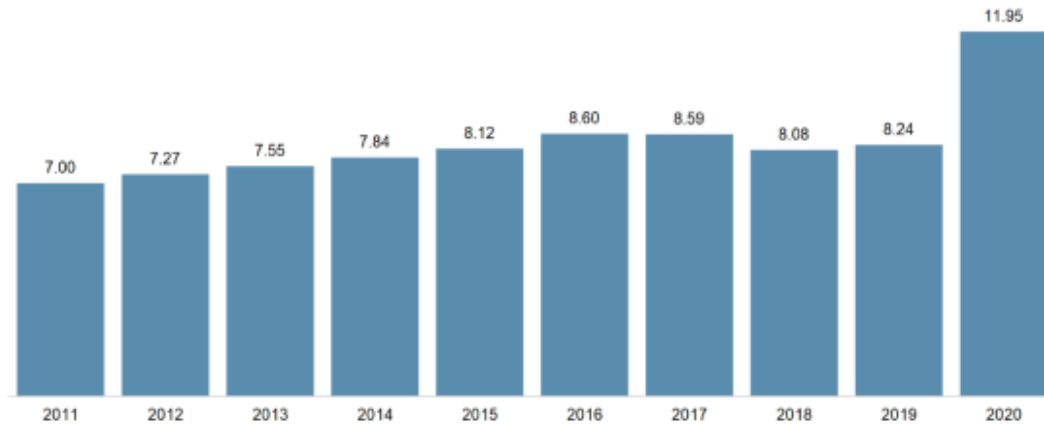


Figura 1. Tasa de mortalidad por diabetes mellitus (2011-2020) por cada 10,000 habitantes (INEGI 2021).

La diabetes representa una carga significativa para el sistema de salud mexicano y la economía en general, debido a los costos asociados con el tratamiento de la enfermedad y sus complicaciones, así como la pérdida de productividad laboral. México tiene una de las tasas más altas de diabetes en el mundo. Según datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Shamah et al. 2020), aproximadamente el 10.3% de la población adulta mexicana (entre 20 y 79 años) vive con diabetes.

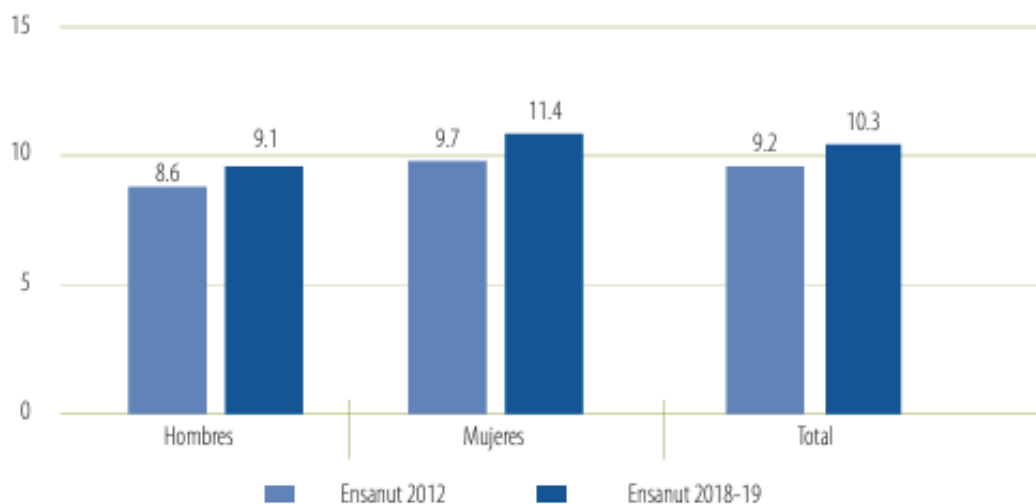


Figura 2. Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo por sexo en adultos de 20 años o más. México, Esanut 2012 y 2018-19 (Shamah et al. 2020).

2.2.-Complicaciones de la diabetes mellitus

La DM es una enfermedad que se caracteriza por condición de hiperglucemia en sangre, lo cual ocasiona que las células del cuerpo no obtengan suministro de energía como glucosa que es la principal forma de carbohidrato que se metaboliza. Mientras que la hipoxia es una condición originada por la privación de oxígeno, consecuencia del daño vascular a raíz de la hiperglicemia. En consecuencia las células se encuentran en un estado de hipoxia, que las lleva a un estrés secretando citocinas pro-inflamatorias (Han et al. 2021).

También se ha asociado a la DM con una mayor incidencia a desarrollar neuropatía,. Diferentes tipos de daños en los nervios causan diferentes síntomas. Los síntomas pueden variar desde dolor y entumecimiento en los pies hasta problemas con las funciones de los órganos internos, como el corazón y la vejiga (NIDDK 2011). El no metabolizar la glucosa va acompañada en una alza de lípidos en sangre, lo cual también está reportado daña los nervios, bajando la sensibilidad de los tejidos. Dependiendo de la localización de los nervios afectados es su clasificación y síntomas.

- Neuropatía periférica: se caracteriza por presentar daño en los nervios localizados en extremidades, como lo son pies, piernas, manos y brazos. Es la más común, hasta un 50% de los pacientes con DM.
- Neuropatía autonómica: se caracteriza por presentar daño en los nervios localizados en órganos internos. En consecuencia promueve problemas de presión arterial, frecuencia cardíaca, sistema digestivo, vejiga, órganos sexuales, glándulas sudoríparas y ojos. Generalmente va acompañada de hipoglucemia inadvertida.
- Neuropatías focales: nervios individuales sufren daño, como atrapamiento, frecuentemente en mano, cabeza, y pierna. Asociado al síndrome del túnel carpiano.
- Neuropatía proximal: es menos frecuente, incapacita en cadera, glúteo y muslo por el daño a nervios. Generalmente afecta un lado del cuerpo y sus síntomas avanzan en un periodo de meses a años. (NIDDK 2011)

El páncreas esta compuesto por células alfa y beta entre otras, cada una tiene diferentes funciones, por parte de las células alfa del pancreas esta el secretar glucagón; con esto se controla la producción de glucosa y cetonas por el hígado (durante la noche y después de la ingesta de comida), al descomponer los depósitos de almidón o glucógeno, creando unidades de glucosa y cuerpos cetónicos (también promueve la descomposición de la grasas) (Figura 3) (UCSF 2012). En pacientes con diabetes hay desregulación en el tiempo, ya que se libera glucagón durante la ingesta de comida, teniendo como consecuencia la elevación de glucemia en sangre después de comer (UCSF 2012).

Por otro lado estan las células beta del páncreas, quienes liberan insulina en conjunto con amilina. Ambas poseen el mismo efecto que el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), disminuyen los niveles del glucagón, disminuye la velocidad de vaciado de la comida del estómago, promoviendo sensación de saciedad (UCSF 2012). En conjunto provocan la reducción en la producción de glucosa por parte del hígado. Se ha reportado que paciente con DM tipo 2 poseen altos niveles de polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP). Por lo cual no se suprimen los niveles de glucagón durante la ingesta de comida (UCSF 2012).

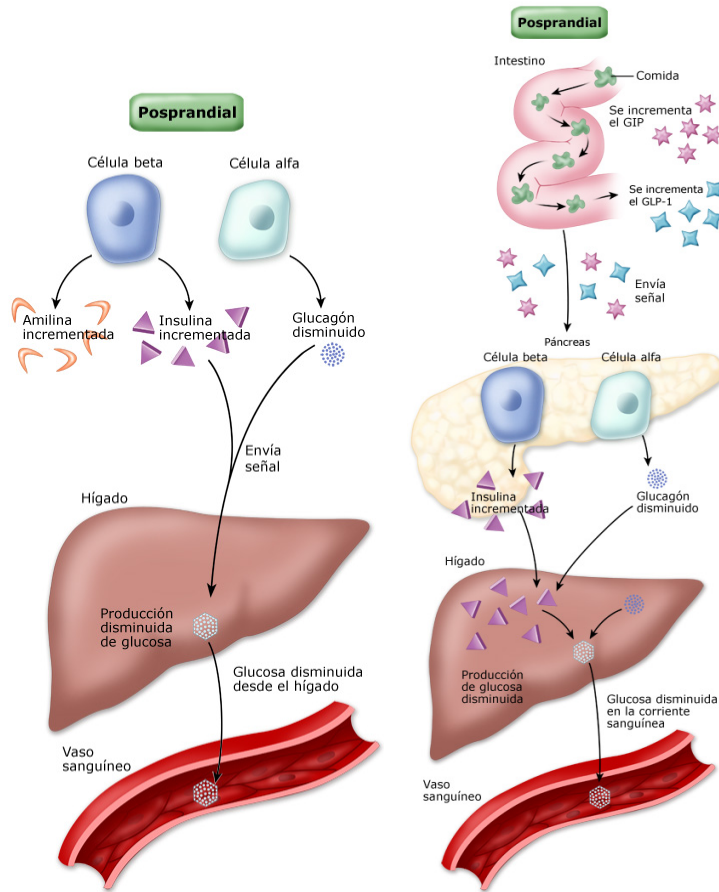


Figura 3. Efecto de las hormonas pancreáticas sobre la producción de glucosa por el hígado. En conjunto la amilina, insulina a la alza a la par de glucagon a la baja, disminuyen la producción de glucosa por el hígado posprandrial (UCSF 2012).

Al mantenerse un estado de estrés crónico (debido a la hipoxia e inflamación crónica), en el paciente con DM se comienzan a secretar hormonas asociadas al estrés. La epinefrina, el cortisol y la hormona de crecimiento se consideran contrareguladores de la glucosa, elevando los niveles de glucosa en sangre (UCSF 2012). La epinefrina y cortisol actúan en compás en un paciente sano, la primera promueve en hígado la glucogenólisis, el segundo actúa sobre células grasas y músculos, promoviendo resistencia a la insulina, optimizando la producción de glucosa por el hígado (UCSF 2012). En un paciente con DM 2 los niveles de cortisol se elevan a la par de la insulinoresistencia (Figura 4).

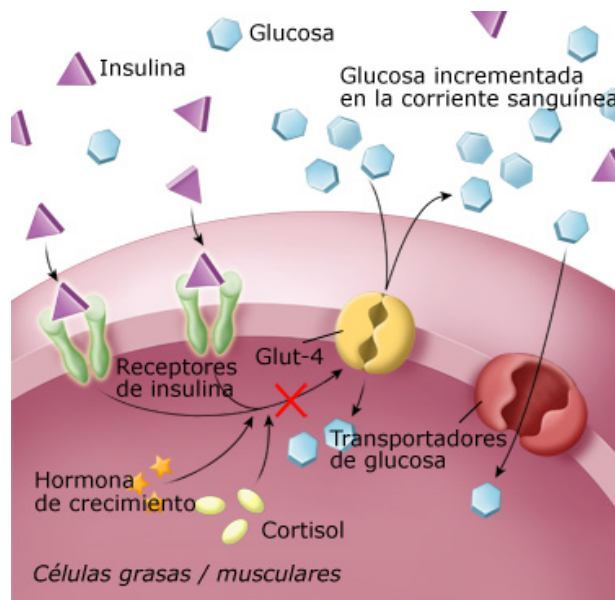


Figura 4. Hormonas contrarreguladoras de la glucosa. Efecto sobre las células grasas y musculares (UCSF, 2012).

Se ha reportado que la hormona del crecimiento compensa en las células grasas y músculos el efecto de la insulina. Por lo cual altos niveles de esta promueven insulinoresistencia (Figura 4).

Los pacientes con DM1 se caracterizan por no tener producción de insulina o insuficiente, se trata como un trastorno autoinmune por predisposición genética. Por lo tanto son pacientes a los que se le administra insulina (hasta 4 veces al día), bomba de insulina o infusión de insulina continua subcutánea (UCSF 2012), acompañando de una dieta equilibrada y ejercicio. Se clasifica como una enfermedad autoinmune, ya que el cuerpo crea autoanticuerpos en contra de las células beta del páncreas (UCSF 2012). Provocando todas las disfunciones previamente mencionadas derivado al daño al tejido. Las complicaciones se pueden clasificar en agudas y crónicas. Las primeras van directamente en relación a los niveles de glucosa, como la hipoglicemia, hiperglicemia y quetoacidosis. Las complicaciones crónicas surgen a los años de manifestarse los signos de la enfermedad, incluyendo pérdida de la vista, daño renal, daño nervioso como se mencionó anteriormente en diferentes zonas, enfermedad de vasos sanguíneos y corazón, hipertensión, problemas dentales, y en

extremidades (UCSF 2012) (Figura 5). Mayoritariamente presentándose complicaciones en extremidades por úlceras de pie diabético con infección, promovidas por la neuropatía, lo que lleva a casos de amputación, México se encuentra entre los primeros países a nivel mundial con complicaciones en pies debido a la neuropatía (Figura 6) (IDF 2022).

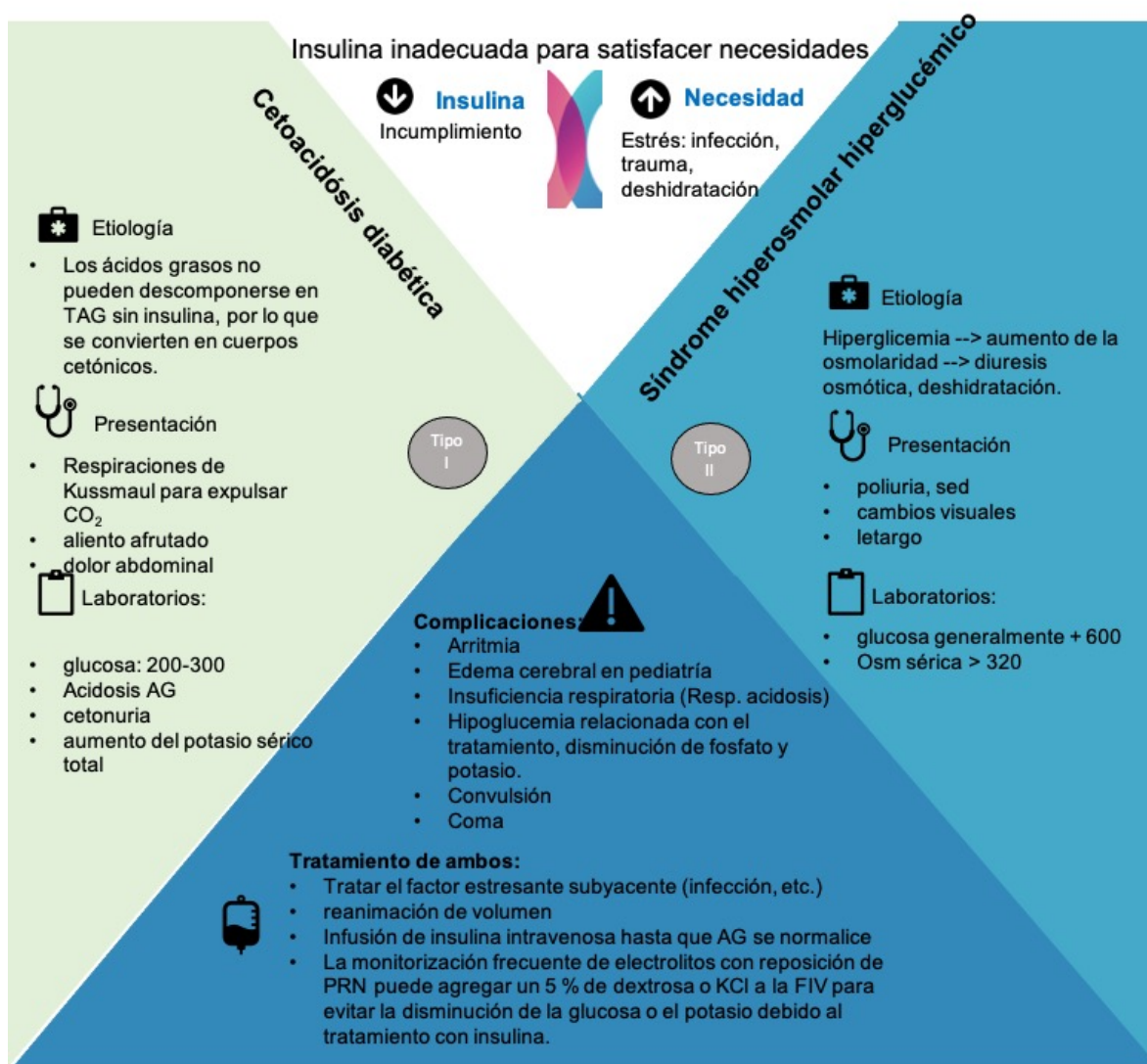


Figura 5. Complicaciones en pacientes diabéticos asociadas a la hiperglicemia. (Le y Bhushan 2016)

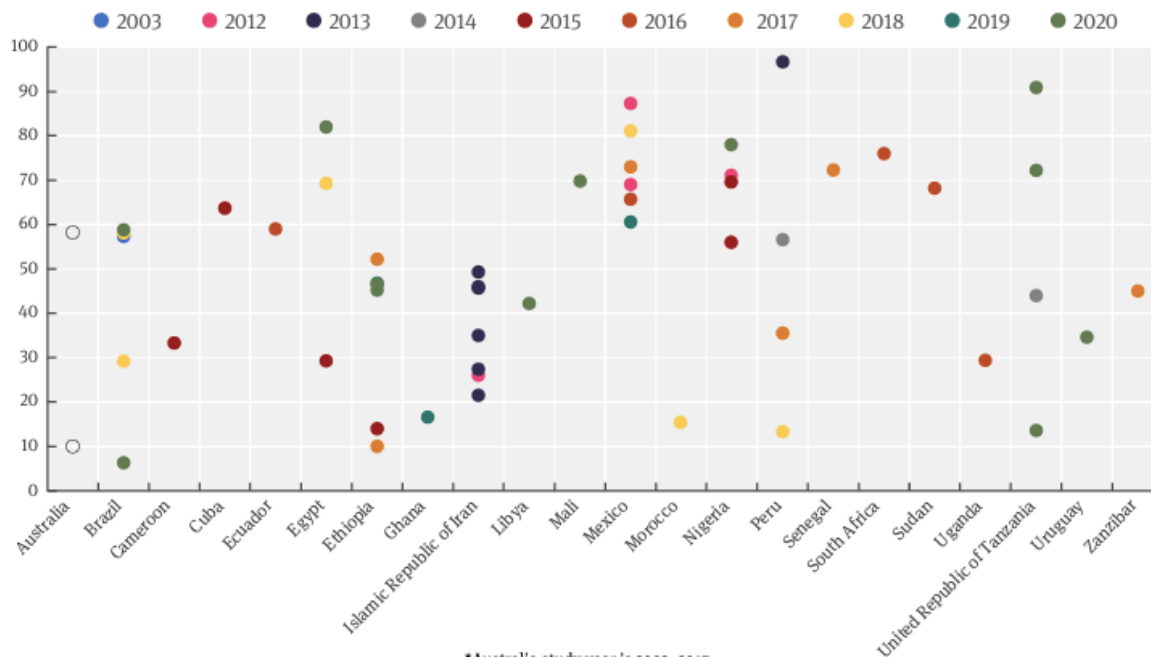


Figura 6. Prevalencia estimada de los factores de riesgo relacionados a complicaciones en pies (2012-2022). (IDF 2022)

2.3.- Heridas diabéticas

Cuando se disrumpe el tejido, se crea una herida, siendo más común que ocurra en tejidos cutáneos. Este es uno de los tejidos con mayor regeneración celular y en rango de tiempo rápido. Las heridas que se encuentran en regeneración pasan por 4 fases para cicatrizar: que son la homeostasis que ocurre en el primer día de la herida, la inflamación que ocurre en los primeros 4 días, la proliferación y granulación en los siguientes 4-21 días, y la última fase donde ocurre la remodelación y maduración desde el día 21 hasta meses (Figura 7). En el mejor de los casos de regeneración celular, no quedando cicatriz en el sitio afectado. En una persona con diabetes se pueden observar fallas en cualquiera de estas fases, las cuales no terminan de cicatrizar surgiendo las heridas crónicas (cuando tarda 3 meses más en cicatrizar) y en algunas ocasiones úlceras que tienden a infectarse. Cuando la reparación es ineficaz, se promueven daños ulcerativos en la piel, extremidades y venas (Eming et al. 2014). Si un paciente con DM está en senescencia y/o tiene enfermedades cardiovasculares (por complicación de la DM) incrementa el riesgo de desarrollar heridas crónicas.

Los pacientes diabéticos tienen un 15-25% de riesgo de desarrollar úlceras en pies, de los cuales 40-80% se infectan gravemente hasta comprometer el hueso llevando a osteomielitis. Una vez habiéndose presentado una úlcera, tienen un 50% de probabilidad de recurrencia a los 3 años del primer episodio (Vijayakumar et al. 2019). Siendo alarmante que el 50%-70% de todas las amputaciones de extremidades se deben a úlcera de pie diabético. Y aún más que cada 30 segundos, se amputa una pierna debido a UPD en el mundo (Vijayakumar et al. 2019; Jere et al. 2022).

A continuación, se abordarán los defectos reportados en pacientes con DM por cada una de las fases de cicatrización.

Durante la fase de homeostasis, al presentarse la herida, se rompe el tejido y vasos sanguíneos, lo que ocasiona un estado de hipoxia, que promueve la proliferación celular y la migración de células, con un alza en la expresión del Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); mientras que en pacientes con DM se han reportado bajos niveles de este, por lo cual se han probado cremas adicionadas con PDGF reportando el acelerado cierre de herida (Cohen y Eaglstein 2001) (Figura 7). Posteriormente ocurre la etapa de inflamación, donde en pacientes sanos se incrementa la expresión de TGF- β , IL-1 β y factores de transcripción, promoviendo también la migración de queratinocitos, y proliferación en fibroblastos (Roberts y Simon 1995; Beer et al. 1997; Wetzler et al. 2000; Falanga et al., 2004); mientras que en pacientes con DM si bien si hay inflamación, es de manera crónica con niveles altos de IL-1 β , IL-6 y TNF α (Barrientos et al. 2008), también hay altos niveles de quimiocinas quimiotácticas, con niveles bajos de expresión de transportadores GLUT-1; se ha reportado la presencia de macrófagos disfuncionales o con fenotipo M1 en pacientes con DM (Roberts y Simon 1995; Beer et al. 1997; Wetzler et al. 2000; Falanga et al. 2004) (Figura 7). La inflamación constante promueve las heridas crónicas, en consecuencia, hay alteración de la angiogénesis, pobre re-epitelización, desregulando los niveles de citocinas o factores de crecimiento con mayor actividad de metaloproteinasas; esto en conjunto provoca la prolongación del tiempo de cicatrización (Eming et al. 2014; Martin y Nunan 2015; Zubair y Ahmad 2019). También en pacientes con DM se ha reportado baja infiltración de

neutrófilos al sitio de la herida (Las Heras et al. 2020). En DM, las lesiones crónicas se distinguen por una inflamación persistente, un proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos alterados, una regeneración débil de la piel, niveles irregulares de citocinas o factores de crecimiento, y un aumento en la actividad de las enzimas proteolíticas. Como consecuencia, el proceso de cicatrización en las heridas crónicas requiere más tiempo que en las heridas convencionales (Eming et al., 2014; Martin y Nunan, 2015). Además, pueden ser originadas por una deficiencia en la producción adecuada de las proteínas de la matriz extracelular (Zubair y Ahmad 2019) (Figura 7).

Durante la etapa de proliferación y granulación (4 a 21 días post herida) debido al estado de hipoxia se aumenta la traslocación a núcleo del factor de transcripción de hipoxia 1alfa ($HIF1\alpha$), por lo cual también se activa el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) promoviendo neoangiogénesis, a la par del relleno del sitio de la herida, hay deposición de matriz extracelular, los fibroblastos proliferan (y secretan colágeno tipo III que tiende a ser más frágil y elástico que el resto de tipos de colágeno) y los queratinocitos migran a la par de la formación de tejido de granulación (Roberts y Simon 1995; Beer et al. 1997; Wetzler et al. 2000; Falanga et al. 2004). En un paciente con DM, debido a la hiperglicemia el $HIF1\alpha$ pierde estabilidad (Roberts y Simon 1995; Beer et al. 1997; Wetzler et al. 2000; Falanga et al. 2004), los fibroblastos no pueden reaccionar ante los agentes inflamatorios y los factores de crecimiento, lo que conduce a una reducción en su habilidad para reproducirse. Estas irregularidades a nivel molecular y celular interfieren con la producción de matriz extracelular y la creación de tejido de granulación, provocando la aparición de heridas crónicas (Cha et al. 2008; Las Heras et al. 2020; Roberts y Simon 1995; Beer et al. 1997; Wetzler et al. 2000; Falanga et al. 2004) (Figura 7). En contraste con las heridas agudas, las heridas crónicas exhiben una elevada presencia de metaloproteinasas de matriz (MMP) y enzimas proteolíticas (Zubair y Ahmad 2019). Las MMP desempeñan funciones vitales en la conducta celular, participando en procesos como la proliferación, migración, diferenciación, formación de nuevos vasos sanguíneos, adhesión celular, apoptosis y respuesta inmunitaria del huésped. En condiciones adecuadas, las MMP son beneficiosas para la cicatrización de heridas, especialmente en la eliminación de la matriz extracelular dañada durante la fase inflamatoria y en la remodelación tisular. Sin embargo, niveles elevados de MMP tienen un

efecto perjudicial en la reparación del tejido y contribuyen al proceso deficiente de cicatrización en úlceras de pie diabético (Zubair y Ahmad 2019).

La última fase de la cicatrización es la remodelación y maduración y es la que más toma tiempo (21 días a 2 meses). Durante esta, ocurre la maduración vascular, los fibroblastos ahora comienzan a sintetizar y secretar colágeno tipo I (el cuál es más rígido, resistente y aporta las propiedades tensiles a la piel); hay contracción del borde de la herida con continua migración de queratinocitos y fibroblastos (Figura 7) (Roberts y Simon 1995; Beer et al. 1997; Wetzler et al. 2000; Falanga et al. 2004). Mientras que en un paciente con DM el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1), el Factor de crecimiento transformante (TGF), la angiotensina 1 / 2 y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) se expresan a la baja. Además de que disminuye la función de los pericitos, maduración vascular y el fortalecimiento de la herida (Figura 7) (Roberts y Simon 1995; Beer et al. 1997; Wetzler et al. 2000; Falanga et al. 2004).

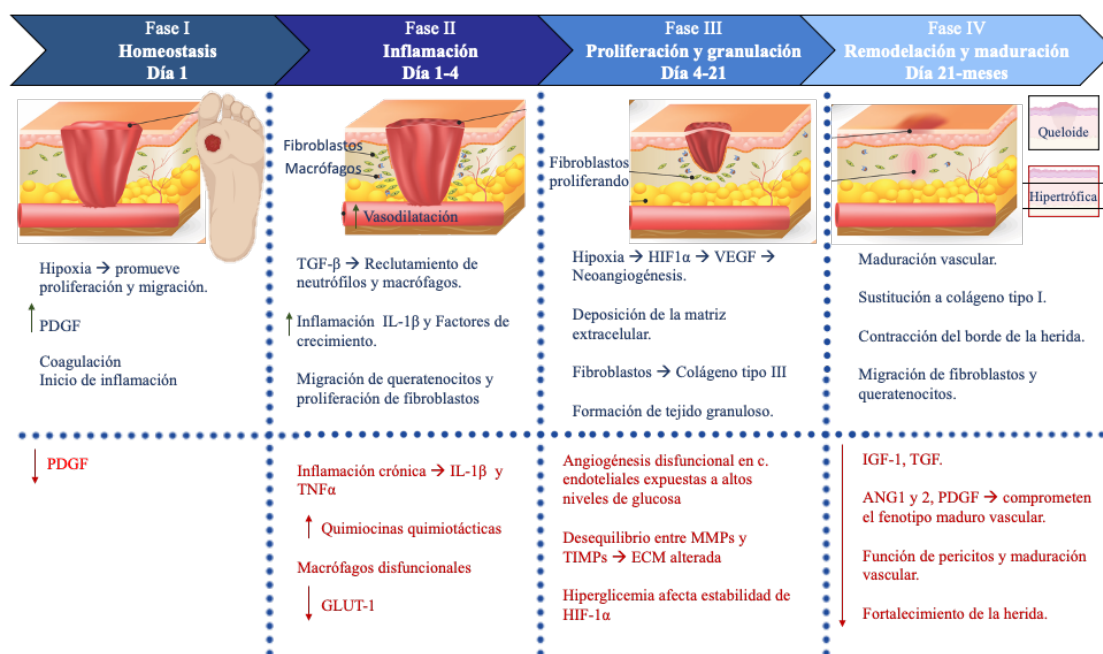


Figura 7. Fases de la cicatrización. En color azul se observa el proceso normal de cicatrización en un paciente sano y en rojo lo que ocurre en un paciente con diabetes que presenta cicatrización crónica. Información obtenida de (Roberts y Simon 1995; Beer et al. 1997; Wetzler et al. 2000; Falanga et al. 2004)

2.4.- Úlceras diabéticas y tratamientos convencionales para heridas diabéticas

Las úlceras en los pies o las piernas representan las lesiones más frecuentes en individuos con diabetes. La capacidad de metabolizar la glucosa se ve reducida en pacientes diabéticos, lo que resulta en niveles elevados de azúcar en la sangre, complicando así el proceso de cicatrización de heridas y llevando a la formación de heridas crónicas que no sanan. La incidencia de retraso de la cicatrización en pacientes diabéticos está aumentando en todo el mundo debido a la falta de medidas preventivas y de control adecuadas (Patel et al. 2019). La recuperación de estas úlceras depende en gran medida de la calidad de la atención proporcionada y de la adherencia del paciente al tratamiento de curación. Sin embargo, las posibilidades de infección y lesiones accidentales son altas cuando la hiperglucemia no se puede controlar por diversas razones (Zubair y Ahmad 2019).

El desarrollo del pie diabético resulta de una interacción entre diversos factores como la neuropatía, la isquemia, la inmunosupresión y la ulceración, que hacen que los miembros inferiores sean propensos a que pequeñas lesiones evolucionen hacia úlceras extensas, comprometiendo tanto la extremidad como la vida del individuo (Cruz et al. 2013). Las neuropatías, que afectan hasta el 50 % de los pacientes diabéticos, son la complicación más común a largo plazo de la enfermedad, involucrando tanto las fibras nerviosas motoras como sensoriales y autónomas. Esta disfunción nerviosa puede provocar deformidades en el pie, alteraciones en el soporte de peso y formación de callosidades. La falta de sensibilidad al dolor debido a la neuropatía sensorial puede llevar a la aparición de úlceras debido a traumas o presión excesiva en pies deformados, con la consiguiente demora en la detección y tratamiento de infecciones, lo que aumenta el riesgo de amputación (Korzon y Dziemidok 2011).

Por otro lado, la isquemia resulta de la enfermedad vascular periférica asociada con la diabetes, lo que también contribuye a la patogénesis de las complicaciones del pie diabético. Esta disminución en el flujo sanguíneo dificulta la cicatrización de las heridas y aumenta el riesgo de infección. Además, la combinación de isquemia y la falta de sensibilidad

provocada por la neuropatía puede acelerar el desarrollo de infecciones graves (Roberts y Simons 2012).

La inmunosupresión, inducida por la hiperglucemia, afecta la función de células del sistema inmune, lo que disminuye la capacidad de respuesta ante infecciones. La migración de células inmunes a los sitios de infección se ve comprometida, lo que dificulta la curación efectiva de las heridas. Esta inmunosupresión, junto con la presencia de tejido necrótico en el área de la herida, puede convertir organismos de baja virulencia en patógenos potenciales (Cruz et al. 2013).

Para tratar de manera eficiente, se debe conocer su clasificación, la más popular es la Clasificación de Wagner que se puede observar en la Tabla 1. La cual se basa en la profundidad de la penetración de la herida, la presencia de osteomielitis o gangrena y la extensión de la necrosis (Frykberg 2002).

Tabla 1. Clasificación de Greenhalgh (1990).

Grado	Lesión	Características
0	Ninguna, pie de riesgo	Callos gruesos, cabezas de metatarsianos prominentes, dedos en garra, deformidades óseas
I	Úlceras superficiales	Destrucción del espesor total de la piel
II	Úlceras profundas	Penetra la piel grasa y ligamentos, pero sin afectar hueso, infectada
III	Úlcera profunda más absceso (osteomielitis)	Extensa y profunda, secreción, mal olor
IV	Gangrena limitada	Necrosis de una parte del pie o de los dedos, talón o planta
V	Gangrena extensa	Todo el pie afectado, efectos sistémicos

Una de las principales medidas de curación es el envolver / cubrir la herida para evitar infecciones o evitar que la infección empeore en caso de ya presentarse. Se colocan gasas no adherentes que en algunos casos se les puede adicionar colágeno y ácido hialurónico (Lee et al. 2016; Park et al. 2019). También se puede tratar tópicamente con insulina (que es el tratamiento más empleado), metformina, sulfonilureas y tiazolidinedionas, además de otros

fármacos como los siguientes factores PDGF, VEGF, EGF, FGF, TGF 1β . También esta la opción de aplicar injertos de piel o injertos de piel sustituta (Roberts y Simon 1995; Beer et al. 1997; Wetzler et al. 2000; Falanga et al. 2004).

2.5.- Exosomas como tratamiento de cicatrización

Las células secretan vesículas extracelulares que conforme a su tamaño son clasificadas, dentro de estas encontramos a los exosomas, las cuales miden entre 50 y 150 nm, producidas en endosomas por mecanismos dependientes o independientes de clatrin. Estas contienen proteínas, DNA, RNA y lípidos; la primera función descrita de los exosomas fue el transporte de desechos celulares, pero se ha reportado recientemente que también están implicados en la comunicación intercelular y se pueden considerar como biomarcadores circulantes de enfermedades como el cáncer (Gurunathan et al. 2020; Li et al. 2021). Dependiendo la célula de origen, los exosomas llevan un cargo de moléculas y estas biomoléculas conservan algunas de sus funciones biológicas, por ello se les consideran como nanovectores ya que pueden ejercer funciones similares a su célula de origen parental (Gurunathan et al. 2020; Li et al. 2019).

Su formación puede provenir de dos vías, la vía dependiente de clatrina que es la vía principal en la que se incorporarán proteínas y lípidos integrales presentes en la membrana plasmática y también es la vía principal de entrada para los receptores de superficie y sus ligandos (Bruna-Gauchoux y Montagnac 2022). Por otro lado, la vía independiente de clatrina; la excreción de estos puede ocurrir tanto en células viables como en células sometidas a estrés o muerte, por lo que tendrán diferentes características y funciones (Bruna-Gauchoux y Montagnac 2022).

La biogénesis de los exosomas implica varias etapas: 1) comienza con la gemación de la membrana plasmática para formar endosomas tempranos; 2) de los endosomas tempranos emergen los endosomas tardíos y las membranas del cuerpo multivesicular (MVB) que contienen vesículas intraluminales, también conocidos como exosomas; 3) hay dos vías posibles: si los MVB tardíos se fusionan con la membrana plasmática, se denominan

exosomas cuando se excretan, mientras que si los MVB se fusionan con los lisosomas, se degradan (Zhang y Yu 2019).

Existen diferentes metodologías para su aislamiento, el estándar de oro actualmente se realiza mediante ultracentrifugación (Doyle y Wang 2019). Esta técnica requiere mucho tiempo y grandes volúmenes de muestra inicial, lo que dificulta procesar varias muestras al mismo tiempo, en tiempos de 1 o 1.5 días (Doyle y Wang 2019). Otras metodologías incluyen el aislamiento por tamaño, la captura por inmunoafinidad, la precipitación y los microfluidos debido a su eficiencia para purificar los exosomas evitando posibles daños a los mismos (Wang 2022). La ultracentrifugación es la mejor metodología para aislar las poblaciones totales de una muestra, mientras que los métodos posteriores mencionados anteriormente aíslan exosomas con características de un subconjunto de la población total de la muestra (Rashidi et al. 2022).

Se ha probado la terapia de exosomas derivados de células madre de adipositos sobre heridas en ratones BALB/c , y se observó que se aceleraba el cierre de herida al activar la vía de señalización celular PI3K/Akt (Zhang et al. 2018). También se ha probado el efecto de exosomas derivados de esas mismas células pero ratones en condición de diabetes, obteniendo resultados similares acelerando el cierre de herida comparando contra el control negativo (Wang et al. 2021). A nivel clínico, también se ha probado el efecto de los exosomas derivados de células madre mesenquimales en úlceras de pie diabético obteniendo resultados favorables (Li et al. 2020). Cabe recalcar la importancia de la vía PI3K/AKT, ya que esta contribuye al metabolismo de la glucosa y a los procesos de cicatrización de heridas asociados con la DM (Wang et al. 2022).

Se han reportado cuales son los marcadores moleculares de exosomas, incluso por especie. En el caso de exosomas bovinos deben presentar las siguientes moléculas: HSP90AA1, HSP90AB1, HSPA1A, HSPA2, TLN1, HMGB1 (ExoCarta, n.d.).

2.6.- IMMUNEPOTENT CRP, inmunomodulador antiinflamatorio y antioxidante

El IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) es un extracto dializado de leucocitos bovinos. Este producto se obtiene a partir del bazo, por lo cual este producto podría contener actividad específica de factor de transferencia. El extracto consiste en una mezcla de sustancias inmunomoduladoras de bajo peso molecular (≤ 12 kDa), entre sus componentes se encuentran péptidos libres y exosomas. Este producto es fabricado y distribuido en México por LONGEVEDEN S.A de C.V. El IMMUNEPOTENT CRP es una marca registrada recetada como suplemento alimenticio administrado oralmente poseyendo la propiedad de coadyuvar al sistema inmunológico fortaleciéndolo.

Se ha reportado su actividad antioxidante total, ya que fue probado en macrófagos humanos estimulados con LPS en los cuales disminuyó significativamente la producción de óxido nítrico y TNF- α , las actividades de COX-2 y PGD2, la fosforilación de I κ B, y la actividad de la unión al ADN de las subunidades p50 y p65 de NF- κ B. El ICRP juega un papel importante en la modulación de los efectos antioxidantes y antiinflamatorios a través de la vía I κ B/NF- κ B, lo que sugiere que es un agente terapéutico eficaz en el proceso relacionado con el daño celular oxidativo y la inflamación (Franco et al. 2011). En un ensayo clínico de extracción de terceros molares en humanos, los pacientes fueron tratados con ICRP en el sitio post-extracción, se observó expresión de INF- γ , IL-10, IL-4 e IL-6 elevadas, las cuales podrían desempeñar un papel en el proceso de reparación de tejidos, quimiotaxis y control de la inflamación. De esta manera demostraron que el uso de ICRP es efectivo para controlar la inflamación a través de la modulación de citoquinas sin efectos secundarios en cirugías de terceros molares (Franco et al. 2016). El ICRP regula la producción de IL-1 β , IL6, IL-10, TNF- α , IL-12, IFN- γ y la expresión de citoquinas proinflamatorias a nivel transcripcionalmente comprobado (Franco et al. 2005, Franco et al. 2021).

2.7.- Exosomas en dializados

Según la escala los exosomas miden entre 50 y 150 nm, entre lo cual se comparte tamaño con nanocristales, micelas, nanopartículas y algunos liposomas, por lo cual se pueden integrar

anticuerpos (12 nm), incluso compartir tamaño con partículas virales como el virus de la influenza (130 nm) (Oslo University Hospital, n.d.) que por ejemplo posee en su cápside la proteína hemaglutinina que pesa 75 kDa (McCraw et al., 2016). Estableciendo una clara diferencia entre peso y tamaño, siendo posible que atraviesen capsides virales por membranas de dializado de diferente punto de corte. Se ha reportado la presencia de vesículas extracelulares en diversos dializados. Además de que debido a la naturaleza de membrana de bicapa lipídica de los exosomas de en comparación con las células también pueden moldearse, pero de una mejor manera ya que no poseen citoesqueleto, así que por fuerzas de atracción en favor del gradiente se pueden mover a través de un poro de una membrana de dializado. Incluso se ha reportado el aislamiento de exosomas aparti de cultivo celular por filtrado de flujo tangencial con una membrana de corte de 10 kDa (Liangsupree, et al, 2020). Los exosomas están a la par de las proteínas de muy baja densidad en el aislamiento por exclusión de tamaño, las cuales miden 850 g/mol aproximadamente (la equivalencia 1 g/mol = kDa) (Liangsupree, et al, 2020).

2.8.- Inducción de un modelo de diabetes con estreptozotocina en animales

Los pacientes con DM manifiestan el síndrome años después de presentar desregulaciones del metabolismo, como concentraciones anormales de colesterol, triglicéridos, colesterol HDL y ácido úrico, lo que compone el síndrome metabólico (Shamah et al. 2020). En el momento en que se obtienen valores de glucosa en sangre en ayuno mayor o igual a 126 mg / dL se considera que se ha superado el síndrome metabólico y se manifiesta la DM (Le 2016).

Los modelos animales de daño renal diabético son una herramienta valiosa para identificar los mecanismos moleculares responsables de esta enfermedad y para el desarrollo de nuevos tratamientos y estrategias terapéuticas (Tesch y Allen 2007). Por lo cual se intenta asemejar a la DM en el aspecto de la hiperglicemia, esperando que conlleve a los síntomas del síndrome metabólico previamente explicado.

Agentes químicos, como la estreptozotocina, pueden dañar selectivamente las células β productoras de insulina en el páncreas y provocar hiperglucemia. Es una herramienta importante para desarrollar modelos animales de complicaciones diabéticas. Estos reactivos se pueden utilizar para estudiar la lesión del tejido diabético en la mayoría de las cepas de roedores, aunque la gravedad de la lesión depende en parte de los antecedentes genéticos (Tesch y Allen 2007).

Su creciente popularidad se debe al hecho de que la patología resultante se parece a la DM1 humana con inflamación crónica de los islotes pancreáticos, insulinitis y deficiencia de insulina; su menor costo en comparación con otros modelos animales también es una atracción (Tesch y Allen 2007; Furman 2015).

Empleando diferentes modelos de DM en roedores, se considera que el punto de corte de glucosa para que un animal sea considerado diabético, en el caso de ratas el nivel es >200 mg/dL, pero en ratones hay una discrepancia. Por lo cual el nivel de glucosa para ser considerado diabético depende de la especie. El protocolo mayormente empleado para inducir DM tipo I mediante farmacos es el publicado por Diacomp (Brosius 2019.), para ratones se indica que con niveles de glucosa >160 mg/dL los animales son considerados diabéticos (Ayala et al. 2006). Se ha informado en otras fuentes que ratones sanos no diabéticos muestran un nivel de glucosa de 80-100 mg/dL después de 4-6 horas de ayuno, en el caso de una hora se obtienen valores mayores, otros, reportan que los animales que presentan >150 mg/dl son considerados diabéticos (Furman 2021).

3.-JUSTIFICACIÓN

En México la incidencia de todos los tipos de diabetes mellitus ha sido a la alza en los últimos años, con una especial incidencia en el género femenino. A la par está el alto riesgo de desarrollar heridas crónicas en estos pacientes desde el momento de su diagnóstico, ya que existen desregulaciones en el metabolismo. Estas heridas si no se tratan correctamente y prevalecen después de los tres meses y se pueden convertir en úlceras especialmente en las extremidades, denominándose úlceras de pie diabético. Por lo cual surge la necesidad de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para acelerar la cicatrización. Por lo cual se propone evaluar la capacidad del IMMUNEPOTENT CRP y sus partes para inducir un proceso de cicatrización, al provenir de un dializado de leucocitos de bazo bovino ya probado con efecto antiinflamatorio y antioxidante en macrófagos. Además de evaluar los exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP como nanovectores en un sistema de entrega de insulina para acelerar el cierre de herida en ratones diabéticos hembra BALB/c.

4.-HIPÓTESIS

El tratamiento con exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP promueve cicatrización en un modelo de ratones diabéticos BALB/c hembra.

5.-OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP sobre el proceso de cicatrización en un modelo de ratones diabéticos BALB/c hembra.

6.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la viabilidad de células HUVEC, NIH-3T3 y HACAT tratadas con exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP.
2. Evaluar el efecto migratorio de las células HUVEC, NIH-3T3 y HACAT tratadas con exosomas.
3. Evaluar el cierre de herida en ratones BALB/c en condición de diabetes tratados con exosomas.
4. Evaluar la síntesis de colágeno en heridas de ratones BALB/c en condición de diabetes tratados con exosomas.
5. Evaluar la activación de componentes de la vía PI3K-AKT en ratones BALB/c hembra en condición de diabetes tratados con exosomas.

7.-ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

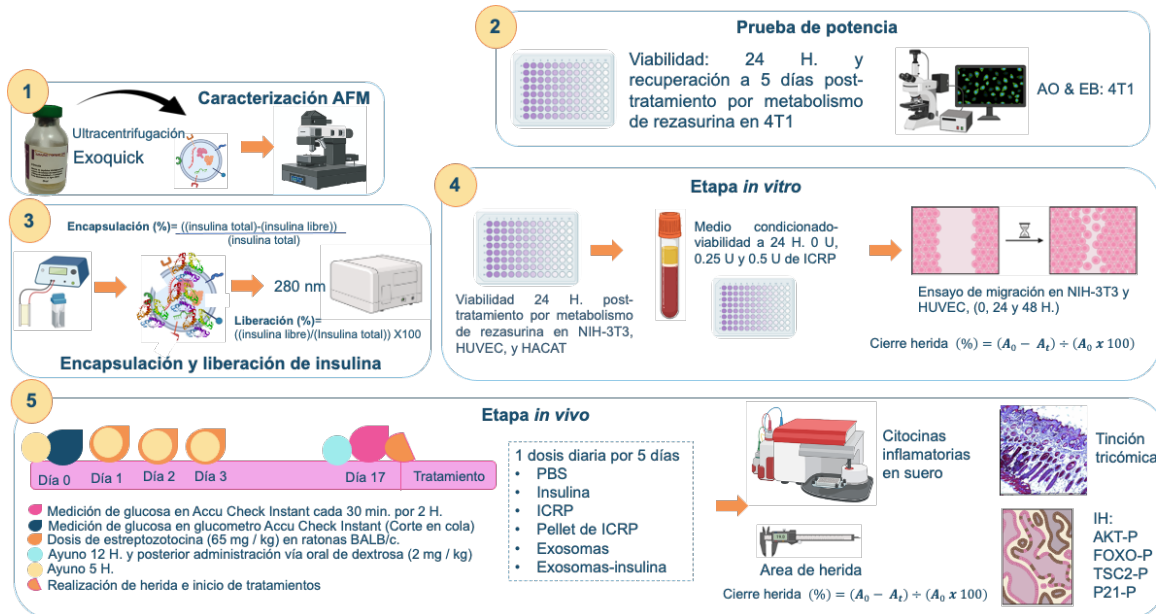


Figura 8. Estrategia experimental general. 1. Aislamiento de exosomas con kit exoquick. 2. Prueba de potencia de ICRP en células 4T1. 3. Encapsulación de insulina en exosomas aislados del ICRP. 4. Efecto del ICRP y sus partes en células HACAT, NIH-3T3 y HUVEC. 5. Evaluación del cierre de herida en ratones diabéticos hembra BALB/c tratados con ICRP y sus partes.

8.- METODOLOGÍA

8.1.-Caracterización de los exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP

Los exosomas se aislaron de un conjunto de diferentes lotes de ICRP liofilizado empleando el kit Exoquick (Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU.) que separa vesículas extracelulares mediante ultracentrifugación. Después de eso, el sedimento se resuspendió en PBS 1X estéril y se analizó con microscopía de fuerza atómica (AFM). Las muestras se observaron utilizando un NT-MDT Spectrum, NTEGRA Prima AFM a temperatura ambiente, con una sonda RTESPA (Bruker, Billerica, MA, EE. UU.) de constante de resorte $k = 40 \text{ N/m}$ en modo de contacto intermitente. Se obtuvieron imágenes de altura, deflexión y fase; Se capturaron sistemáticamente tamaños de imágenes de 20×20 , 10×10 y $5 \times 5 \text{ m}^2$ para cada muestra en al menos tres regiones diferentes. Las muestras se analizaron con el software Gwyddion versión 1.6 para observar el aspecto morfológico del exosoma y tamaño. Se realizó el promedio de los tamaños de los exosomas observados en todos los campos fotografiados.

8.2.-Caracterización del proteoma del IMMUNEPOTENT CRP

El IMMUNEPOTENT CRP es un producto registrado compuesto por una mezcla de sustancias de $<12 \text{ kDa}$ provenientes de extracto de bazo bovino, fue fabricado por LONGEVEDEN SA de CV, es comercializado en presentación liofilizada en México. Para el análisis proteómico, se creó un pool de diferentes frascos de liofilizado a partir de diferentes lotes para asegurar homología y datos representativos del producto. Luego, este conjunto se analizó por la empresa Tymora Analytics Operations (West Lafayette, IN, EE. UU.) para identificar las proteínas preparando una muestra para cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas acoplada en tándem (LC-MS/MS). La empresa envió la lista de proteínas presentes en el extracto, que fue considerada como la lista de antecedente / background para el análisis bioinformático.

8.3.-Caracterización de las proteínas exclusivas de exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP

Del pool compuesto de liofilizado del ICRP de diferentes lotes enviado a Tymora Analytical Operations Company (West Lafayette, IN, EE. UU.) explicado anteriormente, se separó una parte de esta mezcla para aislar los exosomas mediante la metodología EVtrap con separación automática de perlas magnéticas por parte de Tymora Analytical Operations Company. Después de eso, se lisaron para liberar el contenido de proteínas. Luego, las proteínas se extrajeron y digirieron en un tampón SDC, y posteriormente las proteínas se identificaron mediante análisis LC-MS/MS. Esta lista de proteínas se consideró como una lista objetivo / target para el análisis bioinformático. Con base en las listas de antecedente y objetivo, la compañía proporcionó la abundancia relativa (%) de cada proteína en la lista de objetivo en comparación con la lista de antecedente.

8.4.-Evaluación de las funciones biológicas del IMMUNEPOTENT CRP *in silico*

Se construyó una lista de proteínas (lista compuesta), incluyendo una lista de proteínas comúnmente expresadas en fibroblastos humanos que se descargó de la base de datos Human Protein Atlas y la lista de proteínas del ICRP. Luego, en el software en línea STRING: de redes de asociación de proteínas funcionales, la lista compuesta se analizó en la opción “múltiples proteínas” seleccionando como organismo *Bos taurus*. El parámetro de filtración de MCL se empleó ingresando el número 2. El criterio que se usó para resaltar las funciones biológicas en el interactoma fueron aquellas relacionadas con la mejora del proceso de curación con un valor de fuerza superior a 0.5 (Bozhilova et al. 2019).

8.5.-Aislamiento de exosomas del IMMUNEPOTENT CRP

Los exosomas del ICRP se aislaron mediante el método de ultracentrifugación empleando el kit Exoquick (Invitrogen) durante 1 h 10.000 X g a 4 °C. Resuspendiendo el contenido en PBS estéril 1X.

8.6.-Prueba de potencia del IMMUNEPOTENT CRP

Se empleó la línea celular de cáncer de mama murino 4T1 (ATCC) como modelo para corroborar la identidad de ICRP en una prueba de potencia. Se sembraron células 4T1 en una placa de 96 pocillos (5×10^3 células por pocillo) y se incubaron durante 24 h a 37 °C y 5% de CO₂. Luego se aplicaron los siguientes tratamientos: ICRP a diferentes concentraciones (1 U, 0.75 U, 0.5 U y 0.25 U diluidos en medio DMEM 1 % antibiótico y antimicótico), ICRP pellet (en adelante denominado tratamiento pellet) y sobrenadante del ICRP (de ahora en el tratamiento de sobrenadante nombrado), ambos obtenidos de centrifugación ICRP a 10.000 X g durante 60 min a 4 °C a partir de 1 U, 0.75 U, 0.5 U y 0.25 U diluidos en medio DMEM, y los exosomas (aislados de 5 U, 0.75 U , 0.5 U y 0.25 U diluidos en medio DMEM) incubando por 24 h a las mismas condiciones. La viabilidad se evaluó mediante el método del metabolismo de la resazurina (10% (v/v) de resazurina); Después de un período de incubación de 1 h, la placa se leyó a longitudes de onda de excitación de 530 nm / emisión de 590 nm.

Posteriormente se realizó un ensayo de de recuperación, se trataron las células durante 24 h con los mismos tratamientos y concentraciones mencionadas anteriormente, retirando el medio con tratamiento transcurrido este período y reemplazándolo por nuevo medio DMEM, evaluándose la viabilidad por el método del metabolismo de la resazurina a los 5 días post-tratamiento.

Como parte de la prueba de potencia, se sembraron células 4T1 (3×10^5 /pocillo) en cubreobjetos ubicados uno por pocillo en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 24 h. Luego, las células se trataron con los tratamientos ICRP, pellet, sobrenadante y exosomas a una concentración de 0.5 U/mL en medio DMEM durante 24 h. Posteriormente, se evaluó la apoptosis mediante tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio en una proporción de 1:1 por pocillo con un período de incubación de 30 segundos. Después de eso, las células se visualizaron bajo un microscopio confocal de fluorescencia Zeiss a 10X. Las imágenes se procesaron utilizando el software Image J para fusionarlas e interpretarlas según la apariencia

de los colores de manera cualitativa. El núcleo sólido verde indicó células viables, el núcleo verde fragmentado indicó apoptosis temprana, las células naranjas indicaron apoptosis tardía y el rojo indicó células necróticas. Se tomaron al azar 5 fotografías de diferentes campos por tratamiento y se eligió una foto representativa por grupo para la figura. De las 5 fotografías se contó el número de celular pertenecientes a cada proceso de muerte por campo visual y se representó como porcentaje. Células verde indican estado de viabilidad, células verdes con núcleo fragmentado indican apoptosis temprana, células naranjas indican apoptosis tardía y células rojas indican apoptosis. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

8.7.-Prueba de medio condicionado.

Se incubaron 3 mL de sangre venosa periférica humana (de un donante sano) en tubos (con heparinizada) con ICRP a 0.5 U, 0.25 U y 0 U durante 24 h a 37 °C y 5% de CO₂. Después de este período, la sangre se centrifugó a 3500 rpm durante 30 min y se separó el suero. Medio DMEM se suplementó con los sueros obtenidos previamente al 10% para tratar células HUVEC (5 x 10³ células/pocillo) en placa de 96 pocillos, durante 24 h. Se evaluó la viabilidad mediante el método de resazurina en pocillos triplicados por dosis mediante la metodología mencionada previamente. El experimento se realizó por triplicado.

8.8.-Encapsulación de la insulina en los exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP

Para la encapsulación, se mezclaron 100 µL (422.98 µg) de exosomas con 100 µL (450 µg, insulina) de insulina comercial (AMSA, México) y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Luego se realizó la electroporación en una cubeta de electroporación desechable a 250 V y 125 µF (en tampón de sacarosa 600 mM) en un electroporador (micropulsor BioRad). Después de eso, el período de recuperación de la membrana exosomal fue de 45 minutos a 37 °C. Posteriormente, se recuperaron los exosomas mediante ultracentrifugación. El sedimento (exosomas cargados) se resuspendió en 1 ml de PBS 1X y luego se incubó en tampón de lisis (Triton 1X, 1:1 v/v) durante 45 min y se centrifugó a 10.000 X g durante 10 min. Se recogió el sobrenadante, mientras que el sedimento se resuspendió en 1 ml de PBS. El sedimento y el sobrenadante se colocaron en una placa nueva de 96 pocillos para leer la

absorbancia a 280 nm. Previamente se estableció una curva de calibración con insulina (sin carga) y se calculó el porcentaje de encapsulación mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Encapsulación (\%)} = \frac{(\text{insulina total}) - (\text{insulina libre})}{(\text{insulina total})} \times 100$$

Para determinar la liberación de insulina, se incubaron exosomas cargados en una placa de 96 pocillos con tampón pH 2 y pH 8 (por triplicado, 1:1 por pH) en diferentes períodos de incubación (0, 10, 30, 60 y 90 min). Posteriormente se leyó la absorbancia a 280 nm y se calculó el porcentaje de liberación con la siguiente fórmula:

$$\text{Liberación (\%)} = (\text{insulina libre}) / (\text{insulina total}) \times 100$$

8.9.-Prueba de viabilidad.

Se sembraron células HUVEC, NIH-3T3 y HACAT en placas de 96 pocillos (5×10^3 células/pocillo) y se incubaron durante 24 h a 37 °C y 5% de CO₂. Luego las células fueron tratadas con los siguientes tratamientos: ICRP (1U, 0.75 U, 0.5 U y 0.25 U diluidos en medio DMEM 1 % antibiótico y antimicótico), pellet (de 1U, 0.75 U, 0.5 U y 0.25 U diluidos en DMEM) medio 1 % antibiótico y antimicótico), sobrenadante (de 1 U, 0.75 U, 0.5 U y 0.25 U diluidos en medio DMEM 1 % antibiótico y antimicótico) y exosomas (de 1 U, 0.75 U, 0.5 U y 0.25 U diluidos en Medio DMEM 1 % antibiótico y antimicótico), siendo la insulina el control positivo(100%, 75%, 50% y 25% diluida en medio DMEM 1% antibiótico y antimicótico) durante 24 h a 37 °C y 5% CO₂. La viabilidad se evaluó mediante el método del metabolismo de la resazurina mencionado anteriormente. Los valores del experimento se presentan como el valor medio de triplicados.

8.10.-Prueba del scratch *in vitro*.

Se sembraron células HUVEC, NIH-3T3 y HACAT en placas de 24 pocillos (5×10^4 células/pocillo diluidas en medio DMEM) y se incubaron durante 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂ hasta alcanzar el 80% de confluencia, luego se sincronizó la proliferación celular incubando las células durante 5 h con medio DMEM sin suero fetal bovino (SFB). Luego se realizó una herida en la monocapa celular con una punta amarilla estéril en el centro del pocillo y a lo largo para simular una herida. A los pocillos se les agregaron los tratamientos: ICRP, pellet, sobrenadante, exosomas y exosomas cargados con insulina (en adelante exosomas-insulina) (todos a una concentración de 5 U en medio DMEM sin SFB). Posteriormente se monitoreó la area de la zona del scratch con fotografías a las 0, 24 y 48 h utilizando el software ImageJ y la siguiente fórmula:

$$\text{cierre de herida en monocapa (\%)} = (A_0 - A_t) \div (A_0 \times 100)$$

Donde A₀ es el área de la herida en el momento 0 y A_t es el área de la herida correspondiente a cada punto temporal.

8.11.-Inducción de diabetes tipo 1 en ratones balb/c.

Se seleccionaron ratones hembras BALB/c de 36 semanas de edad (22 a 26 gr), y se mantuvieron en jaulas a temperatura constante de 28°C en el bioterio, con ciclos de luz / oscuridad controlados cada 12 h con dieta *ad libitum*. La diabetes se indujo con el protocolo de 3 dosis (diarias) de estreptozotocina por vía intraperitoneal (65 mg/kg de peso corporal disueltos en tampón citrato pH 4.5) después de un ayuno de 4 h. Dos semanas después de la última inyección se realizó una curva de tolerancia a la glucosa (12 h post ayuno y posterior a una dosis de dextrosa oral, 2 mg/kg de peso corporal). Los niveles de glucosa en sangre se cuantificaron utilizando un glucómetro (Accu-check Instant) cada 30 min durante 2 h mediante punción de la vena caudal. Los ratones con niveles de glucosa >160 mg/dL se consideraron diabéticos (Brosius 2019). Todos los protocolos experimentales fueron sometidos a evaluación por el comité de ética y bienestar animal de la Facultad de Ciencias

Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y se llevaron a cabo de conformidad con la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, para el producción, cuidado y uso de animales de experimentación.

8.12.-Evaluación del cierre de herida en ratones.

Los ratones fueron anestesiados con una inyección intramuscular de anestesia (ketamina 80 mg/kg, xilazina 5 mg/kg). Posteriormente se depiló el lomo y se desinfectó con etanol al 70%. Posteriormente se realizó una herida dorsal extrayendo un fragmento de piel (0.5 x 0.5 cm). Los siguientes tratamientos tópicos se diluyeron en agua inyectable y se aplicaron en el sitio de la herida: ICRP, pellet, exosomas, exosomas-insulina, insulina (100 µL como control positivo) y 1X PBS (como control negativo); se aplicó 1 dosis diaria durante 5 días (la dosis de ICRP fue de 1U por ratón y los demás tratamientos derivados también de 1U). Los animales fueron inspeccionados clínicamente diariamente durante 21 días y el cierre de la herida se documentó mediante fotografías. El área de la herida se midió con un vernier y el cierre de la herida se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Cierre de herida (\%)} = (A_0 - A_t) \div (A_0 \times 100)$$

Donde A0 es el área de la herida en el momento 0 y At es el área de la herida correspondiente a cada punto temporal.

8.11.-Evaluación de la síntesis de colágeno en la herida.

Los ratones se anestesiaron como se mencionó anteriormente y se sacrificaron mediante dislocación cervical los días 7, 14 y 21. Los tejidos dérmicos del área de la herida se recuperaron quirúrgicamente y se fijaron en una solución de formaldehído al 10% durante 24 h y se almacenaron en bloques de parafina. Posteriormente se realizaron cortes en secciones de 5µm y se colocaron en portaobjetos para ser desparafinados y rehidratados. Para observar la presencia de fibras de colágeno se realizó una tinción tricrómica de Masson. Las

fotografías se tomaron a 10X en un microscopio confocal Zeiss acoplado a una cámara axiocam. Las imágenes se procesaron en el software ImageJ con el complemento FIJI (v. 1.54f, <http://imagej.org>) para determinar el porcentaje de expresión de cada marcador, los valores de expresión se graficaron en Prism 9V mediante porcentaje de coloración azul por fotografía. Se tomaron 3 fotografías al azar de diferentes campos por tratamiento y se eligió una foto representativa por grupo para construir la figura.

8.11.-Evaluación en el sitio de la herida de número de células, grueso y area del epitelio y tejido de granulación.

De los ratones tratados, en los días 0, 7, 14 y 21 después del tratamiento, se obtuvo tejido cutáneo ubicado en el sitio de la cicatriz y se realizó tinción con hematoxilina y eosina. Las células se contaron en relación al número de núcleos por campo. Esto se realizó en el plug in de ImageJ, FIJI. Separando el color púrpura (correspondiente a la señal de hematoxilina) con la función de deconvolución de color, luego se generó una imagen de máscara binaria empleando la función de cuenca hidrográfica para separar los núcleos que estaban ubicados cercanos. Luego se contaron los núcleos (Los núcleos en los bordes de la imagen fueron excluidos de la cuantificación). El número de células representa el valor medio de 3 fotografías (en campos aleatorios) ubicadas desde la epidermis hasta el tejido subcutáneo con un objetivo de 40X (microscopio confocal Zeiss acoplado a una cámara axiocam). Los valores se representaron gráficamente en Prism 9V.

Las fotografías utilizadas para el análisis de la expresión de colágeno (tinción tricrómica de Masson) se utilizaron para calcular el espesor y el área epitelial. Luego, las imágenes se analizaron utilizando el software ImageJ Fiji (v. 1.54f, [//imagej.org](http://imagej.org)). Para mediciones discretas del espesor de los epitelios, se abrió el archivo de cada imagen mediante el software y se establecieron las escalas adecuadas según el aumento previo (2000 píxeles = 1 μ m). El grosor de cada epitelio se midió seleccionando la opción "Recta" y se trazó una línea que atravesara el epitelio. Esto se hizo con cinco secciones aleatorias del epitelio para cada muestra analizada. Los datos se recuperaron después de seleccionar el comando

"Medición" en la pestaña "Analizar" y se analizaron más a fondo utilizando Graphpad Prism (v. 9.0.0.).

Para medir el área total de cada epitelio, se abrió el archivo de cada imagen mediante el software FIJI y se establecieron las escalas adecuadas según el aumento previo. Se habilitó la opción "Selecciones de polígonos" para delinear el area del epitelio y se analizó el área que comprende todo el epitelio para cada muestra. Los datos se recuperaron después de seleccionar el comando "Medición" en la pestaña "Analizar" y los datos se analizaron más a fondo utilizando Graphpad Prism (v. 9.0.0.).

El tejido de granulación se analizó por medios de espesor. Para ello se identificó el tejido de granulación para luego seleccionar la opción "Recta" y trazar una línea que atravesara el grueso. Esto se realizó con cinco secciones aleatorias para cada muestra analizada. Los datos se recuperaron después de seleccionar el comando "Medición" en la pestaña "Analizar" y se analizaron más a fondo utilizando Graphpad Prism (v. 9.0.0.). La puntuación del tejido cutáneo en el sitio de la herida después del tratamiento se estableció de acuerdo con los criterios de Greenhalg et al. (1990).

8.11.-Evaluación de citocinas pro-inflamatorias.

La sangre se obtuvo mediante punción cardíaca de ratones (en los días 7, 14 y 21) y el suero se separó (condiciones previamente mencionadas) para determinar la expresión de citocinas inflamatorias utilizando el kit de inflamación de ratones BD Cytometric Bead Array (CBA) (Cat. 552364) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los valores fueron analizados en el programa FlowJo para posteriormente graficar los datos en Prism (v. 9.0.0.).

8.11.-Activación de marcadores de la vía PI3K-AKT.

A las muestras del día 7 se les evaluó la expresión de componentes proteicos (en estado de fosforilación) de la vía de señalización PI3K-AKT mediante inmunohistoquímica empleando el kit VECTASTAIN Elite HRP (Vector Laboratories, PK-6100) de acuerdo con

las instrucciones del fabricante. Utilizando los siguientes anticuerpos primarios de Thermofisher: AKT-P (PA5-39725), FOXO-P (PA5-118528), P21-P (PA5-99373) y TSC2-P (PA5-104916), y luego revelando la presencia de marcadores a través de la producción de coloración marrón, por el metabolismo del sustrato DAB por la enzima peroxidasa (kit de sustrato DAB, peroxidasa (HRP) Vector Laboratories). Las fotografías se tomaron en un microscopio confocal Zeiss acoplado a axiocam a 40X y se procesaron en el software ImageJ con el complemento FIJI para determinar el porcentaje de expresión de cada marcador a partir de 5 fotografías tomadas al azar en diferentes campos por cada grupo de tratamiento. Una foto representativa por tratamiento fue seleccionada para construir la figura.

8.11.-Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Graph Pad Prism versión 9 y los datos se expresarán como la media \pm desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante una prueba ANOVA unidireccional, seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey post hoc o la prueba T y Wilcoxon (según corresponda) con una diferencia significativa de $p < 0.05$.

9.-RESULTADOS

9.1.-EI IMMUNEPOTENT CRP posee exosomas.

El ICRP contiene exosomas capaces de sobrevivir al proceso de liofilización del producto comercial. Mantienen una forma semiesférica de aproximadamente 60 nm (Figura 9). Debido a la naturaleza de la técnica AFM, se puede suponer que el método de extracción de exosomas da como resultado una muestra pura, como se puede ver en la Figura 9 ya que se observaron únicamente exosomas y exómeros (igual o menor de 30 nm). Los análisis de AFM confirmaron la presencia de exosomas, por lo cual siguió evaluar sus posibles funciones biológicas. También poseen marcadores proteicos característicos de exosomas provenientes de *Bos taurus* (Tabla 2).

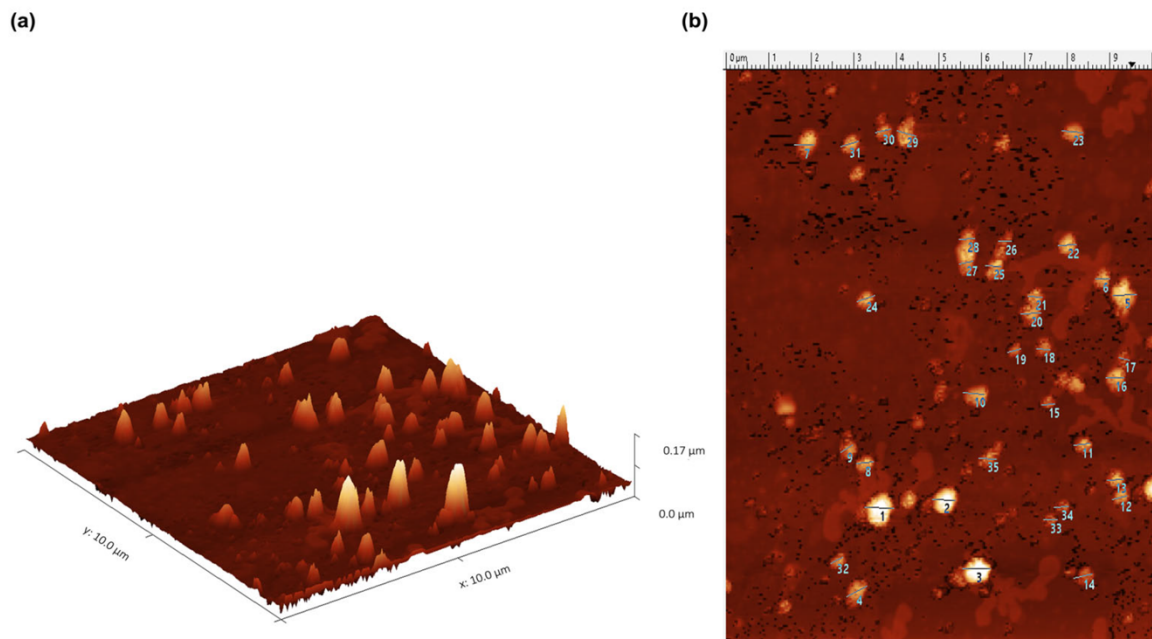


Figura 9. El IMMUNEPOTENT CRP contiene exosomas con un tamaño promedio de 60 nm. Los exosomas se aislaron con el kit ExoQuick y se caracterizaron porque AFM presentaba una forma semiesferoide. También se observaron exómeros de 30 nm. a. Distribución de exosomas en 3 ejes. b. Distribución bidimensional de exosomas.

Tabla 2. Marcadores proteicos de exosomas de *Bos taurus*.

Proteína	Nombre	Cobertura (%)	# de péptidos	Abundancia de sobreexpresión en exosomas
HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Bos taurus OX=9913 GN=HSP90AA1 PE=1 SV=3	18	13	6.216
HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Bos taurus OX=9913 GN=HSP90AB1 PE=2 SV=3	23	19	4.501
HSPA1A	Heat shock 70 kDa protein 1A OS=Bos taurus OX=9913 GN=HSPA1A PE=1 SV=2	22	12	4.223
HSPA2	Heat shock 70kDa protein 1A OS=Bos taurus OX=9913 GN=HSPA2 PE=2 SV=1	14	7	2.196
TLN1	Talin 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=TLN1 PE=1 SV=1	25	55	4.165
HMGB1	High mobility group protein B1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=HMGB1 PE=1 SV=3	29	8	27.193

9.2.-Exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP no poseen efecto sobre la viabilidad pero inducen apoptosis tardía en células 4t1 en una prueba de potencia.

Se ha informado que el ICRP tiene un efecto citotóxico sobre líneas celulares cancerosas. Por lo cual se realizó una prueba de potencia que nos permitió confirmar la identidad del producto como prueba de control y que los exosomas aislados provienen efectivamente del ICRP. En esta prueba de potencia se evaluó el efecto que tiene cada una de sus partes sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer de mama murino 4T1. Después de 24 h de tratamiento (Figura 10 a), el ICRP y el sobrenadante de ICRP disminuyeron la viabilidad con diferencia significativa contra el control, obteniendo porcentajes de viabilidad de 12.76% y 13.26% respectivamente ($p < 0.05$), y también indujeron un efecto citotóxico en un ensayo de recuperación (Figura 10 b). Mientras que los tratamientos de exosomas y el pellet del ICRP no afectaron significativamente la viabilidad celular (70.94% y 99.5% respectivamente).

Si bien, el efecto citotóxico deficiente se reflejó a las 24 h de tratamiento en los tratamientos con exosomas y pellets, en un ensayo de recuperación (Figura 10b) la citotoxicidad aumentó de manera dependiente de la dosis y el tratamiento ($p < 0.05$). Los exosomas (a partir de 1U) mostraron una citotoxicidad del 34.1% y el pellet del 41.08%. El efecto citotóxico de la ICRP en la línea celular 4T1 se debe a la mezcla de todas sus partes y no a sus componentes aislados.

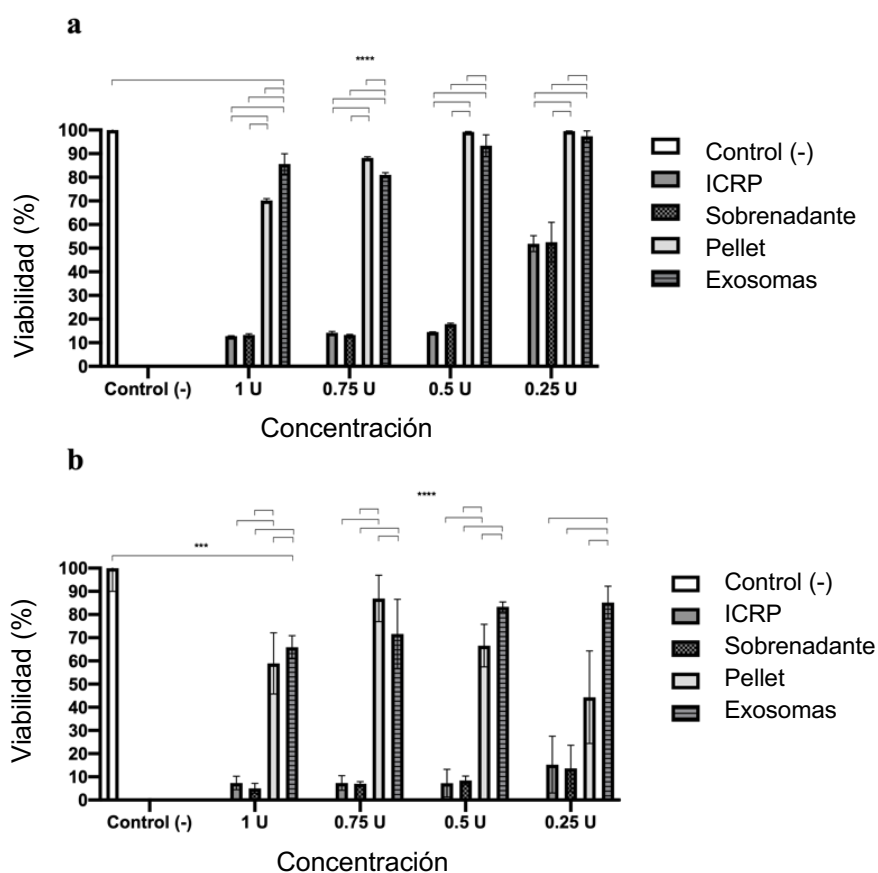


Figura 10. Efecto citotóxico del ICRP en la línea celular 4T1. a. Después de 24 h de tratamiento, se midió la viabilidad celular mediante el metabolismo de la resazurina. b. Después de 24 h de tratamiento, este se eliminó y reemplazó con medio DMEM, 5 días después se midió la viabilidad mediante el metabolismo de la resazurina. Los exosomas no poseen efecto citotóxico en las células 4T1. Prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Los hallazgos se corroboraron mediante tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio, además de confirmar la identidad del producto y sus derivados evaluando los procesos inducidos por este previamente reportados en la literatura. Se determinó que el tratamiento de

ICRP induce apoptosis temprana, tardía y necrosis, con mayor proporción de la primera (Figura 11). Se observaron efectos similares con el tratamiento de sobrenadante, mientras que en el tratamiento con exosomas y pellet se observó apoptosis temprana a las 24 h después del tratamiento a una dosis que en la prueba de recuperación indujo un efecto citotóxico deficiente (Figura 10 b). Se pudo observar que los exosomas no son el componente del ICRP a cargo de inducir efecto citotóxico en la línea celular 4T1.

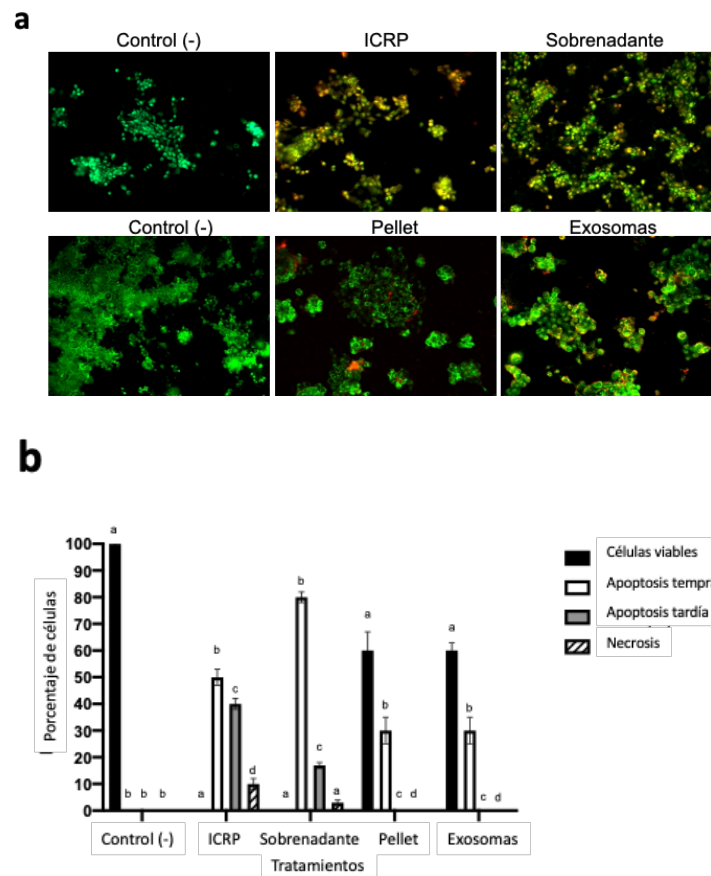


Figura 11. Los exosomas aislados del ICRP promueven la apoptosis temprana en la línea celular 4T1. La evaluación de muerte se realizó mediante la tinción de las células 4T1 tratadas 24 h con los tratamientos del ICRP y sus partes derivadas de 0.5 U. Posteriormente las células se tiñeron con naranja de acridina y bromuro de etidio.a. El núcleo sólido verde indica células viables, el núcleo verde fragmentado indica apoptosis temprana, las células naranjas indican apoptosis tardía y el rojo indica células necróticas. Fotografías representativas, tomadas con microscopio de fluorescencia Zeiss 10X. b. porcentaje de células que pertenecen a cada proceso de muerte, el número de células se calculó como porcentaje por campo de vista, las letras representan diferencias significativas dentro de los grupos, prueba de Tukey ($p < 0.05$).

9.3.-Efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la línea celular HUVEC.

El IMMUNEPOTENT CRP es una mezcla compleja de sustancias, con exosomas incluidos dentro del extracto; al provenir de un extracto de bazo bovino se asume la presencia de exosomas derivados de células madre mesenquimales o de células madre de adipocitos. Por lo cuál surgió la pregunta de si el ICRP como tratamiento en células proveniente de sangre venosa periférica podría inducir la liberación de factores y moléculas que podrían promover la proliferación celular y especialmente de células involucradas en el proceso de curación de heridas. El medio condicional indujo la proliferación de forma dosis dependiente a las 24 h post tratamiento (Figura 12) con diferencia significativa respecto al control negativo en las células HUVEC. El medio condicional derivado de sangre tratada con ICRP 0.5 U indujo viabilidad hasta 140% (Fig. 3), y el tratamiento con ICRP 0.25 U no mostró diferencia significativamente contra el control ($p < 0.05$). Otro hecho plausible es que las células cultivadas con medio DMEM sin suero no mostraron diferencia contra las células cultivadas con DMEM que contenían 10% de suero humano derivado de sangre no tratada con ICRP ($p < 0.05$).

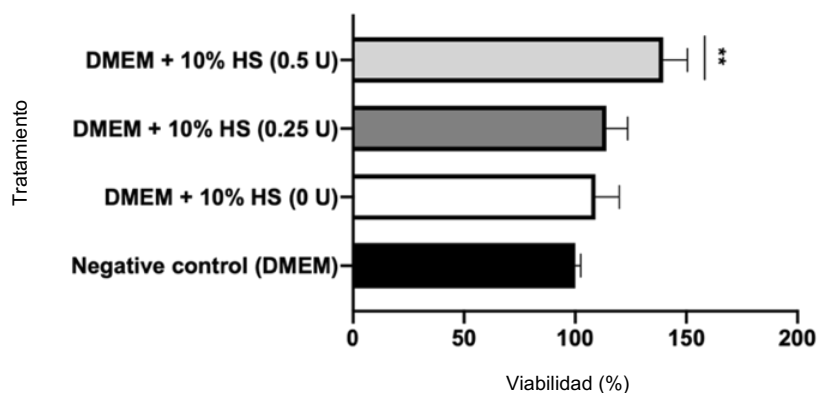
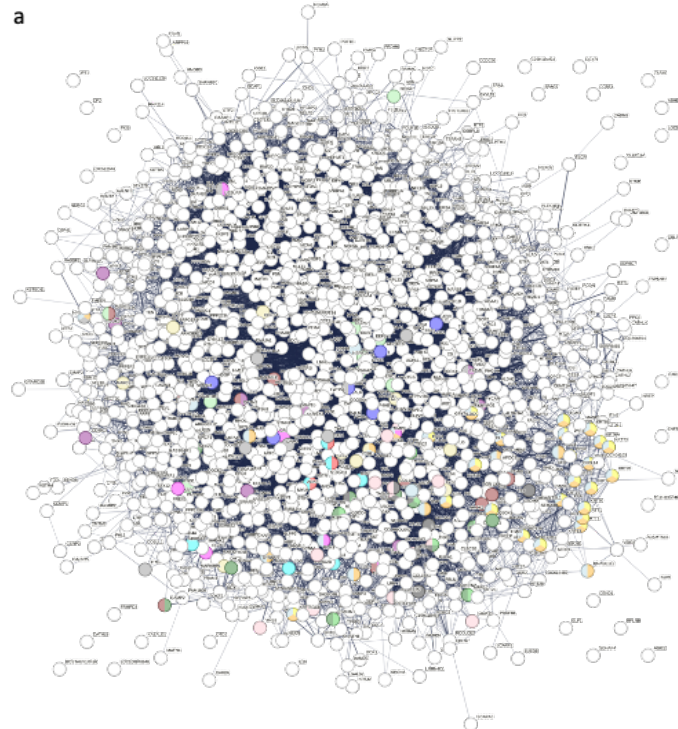


Figura 12. El medio acondicionado de sangre tratada con ICRP promueve la proliferación de la línea celular HUVEC. La sangre periférica se trató con ICRP (0 U, 0.25 U y 0.5 U) durante 24 h, luego de eso, los sueros se separaron y se convirtieron en suplemento del medio DMEM (al 10%), para cultivar células HUVEC. La viabilidad se midió a las 24 h. HS. Sueros humanos. Se realizaron pruebas de T y prueba de Wilcoxon ($p < 0.001$).

9.3.-El IMMUNEPOTENT CRP promueve proliferación celular y migración en células de la dermis.

El extracto completo de ICRP tiene un efecto citotóxico sobre las líneas celulares cancerosas, pero los medios condicionados indujeron la proliferación en la línea celular HUVEC. Las siguientes preguntas fueron: ¿este efecto se atribuyó a una parte del extracto o al producto en su conjunto? ¿Podrían las partes del ICRP inducir la proliferación en líneas celulares que forman parte de las capas de la dermis, para futuros procesos de cicatrización de heridas? Las predicciones *in silico* indicaron la activación de funciones biológicas por las proteínas presentes en el ICRP relacionadas con la cicatrización de heridas con un alto nivel de confianza basado en un valor de fuerza superior a 0.5 en las redes de asociación de proteínas funcionales STRING para células de fibroblastos (Figura 13), destacando la fragmentación del filamento de actina, la respuesta celular a la IL-7, ensamblaje de fibras elásticas, ensamblaje de fibras de colágeno, corte de filamentos de actina y queratinización (Figura 13 b). Para ello, se midió la viabilidad post-tratamiento en líneas celulares HUVEC, NIH-3T3 y HACAT.



b

Biological Process (Gene Ontology)				
GO-term	description	count in network	strength	false discovery rate
GO:0030043	Actin filament fragmentation	4 of 4	1.15	0.0247
GO:0098761	Cellular response to interleukin-7	6 of 8	1.02	0.0051
GO:0048251	Elastic fiber assembly	7 of 11	0.95	0.0032
GO:0051014	Actin filament severing	7 of 12	0.91	0.0045
GO:0031424	Keratinization	23 of 50	0.81	1.96e-08
GO:0010761	Fibroblast migration	7 of 17	0.76	0.0177
GO:0085029	Extracellular matrix assembly	13 of 35	0.72	0.00048
GO:0030216	Keratinocyte differentiation	33 of 96	0.68	1.67e-09
GO:2000406	Positive regulation of T cell migration	9 of 29	0.64	0.0173
GO:0030199	Collagen fibril organization	12 of 43	0.59	0.0065
GO:0032963	Collagen metabolic process	14 of 51	0.58	0.0028
GO:0009913	Epidermal cell differentiation	37 of 149	0.54	1.71e-07
GO:1903036	Positive regulation of response to wounding	11 of 45	0.53	0.0234

Figura 13. Funciones biológicas inducidas por proteínas del ICRP en células de fibroblastos sanos. Las funciones biológicas resaltadas mostraron un valor de fuerza superior a 0.5 en las redes de asociación de proteínas funcionales STRING. a. Interactoma. b. Funciones biológicas destacadas relacionadas con la cicatrización de heridas.

9.3.-Efecto del IMMUNEPOTENT CRP y sus partes sobre la viabilidad de células HUVEC, NIH-3T3 Y HACAT.

En la Figura 14 se muestra que el tratamiento con exosomas aumentó la viabilidad en todas las líneas celulares con tendencia dosis dependiente con una diferencia significativa frente al control ($p < 0.05$). Las células HUVEC tratadas con pellet o exosomas mostraron un aumento en la viabilidad (144% y 139% respectivamente) con una diferencia significativa contra el control negativo en todas las concentraciones de los tratamientos, pero no contra el control positivo que es insulina ($p < 0.05$) (Figura 14a). El tratamiento ICRP disminuyó la viabilidad y con diferencia significativa ($p < 0.05$) frente a los exosomas.

Las células NIH-3T3 (Figura 14b) tratadas con exosomas aumentaron la viabilidad hasta un 193% en la dosis de 1 U con una diferencia significativa contra el control positivo y negativo; además, en todas las dosis se pudieron observar diferencias ($p < 0.05$) entre los tratamientos. Además, en la línea celular HACAT, el porcentaje de viabilidad más alto se observó en el tratamiento con exosomas con un valor de 244% 24 h después del tratamiento (dosis de 1 U, Figura 14c). Se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) frente al control negativo y positivo de manera dosis dependiente.

Otro tratamiento notable en la inducción de la proliferación es el tratamiento con pellet, en la línea HUVEC indujo una viabilidad de hasta 144.9% con una dosis de 1 U de tratamiento con diferencia significativa ($p < 0.05$) frente al control positivo y negativo. En la línea celular NIH-3T3 a 0.75 U se indujo un 136.5% de viabilidad con una diferencia significativa frente a los controles. En la línea celular HACAT a 0.75 U se indujo un 271.69% de viabilidad con una diferencia significativa frente a los controles. A dosis medianas induce un mejor efecto de proliferación ($p < 0.05$) (Figura 14). Se observa una tendencia en las tres líneas celulares, los dos mejores tratamientos fueron pellet y exosomas.

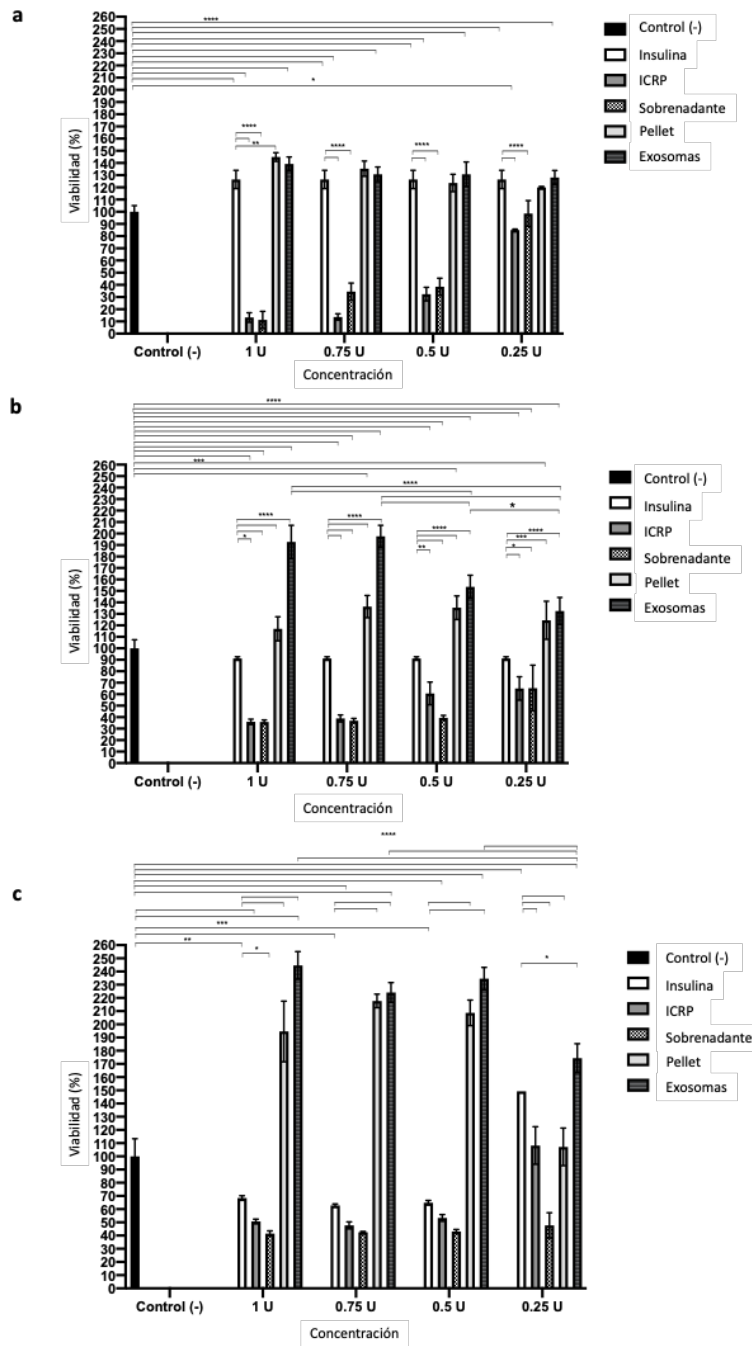


Figura 14. Los exosomas aislados del ICRP aumentan la viabilidad celular. Se sembraron y trataron 5×10^3 células, después de 24 h se midió la viabilidad mediante el metabolismo de la resazurina. a. El tratamiento con exosomas aislados de 1U de ICRP promueve la proliferación hasta un 139% en la línea celular HUVEC. b. El tratamiento con exosomas aislados de 1U de ICRP promueve la proliferación hasta un 193% en la línea celular NIH-3T3. C. El tratamiento con exosomas aislados de 1U de ICRP promueve la proliferación hasta un 244% en la línea celular HACAT. Prueba de Tukey ($p < 0.05$) ($n=3$).

Tabla 3. Viabilidad postratamiento con ICRP y sus partes (%).

Tratamiento (24 h post- tratamiento)	1 U				0.75 U				0.5 U				0.25 U				Insulina
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
4T1	12.79	13.26	70.24	85.66	14.17	13.31	88.23	81.00	14.54	17.89	99.2	93.35	51.91	52.56	99.5	97.35	NA
4T1 recu.	7.36	5.02	58.92	65.91	7.32	7.05	86.94	71.59	7.27	8.42	66.59	83.31	15.27	13.64	44.34	85.14	NA
NIH-3T3	35.95	35.90	117.06	192.68	38.89	36.97	136.35	197.55	60.71	39.43	135.40	153.62	65.02	65.35	124.43	132.56	91.19
HUVEC	13.23	11.25	144.92	139.24	13.69	34.46	135.32	130.77	32.45	38.51	123.61	130.81	85.11	98.54	120.05	128.17	126.49
HACAT	50.76	41.53	194.61	244.61	47.69	42.56	217.69	224.10	53.33	43.07	208.71	234.61	108.20	47.69	107.17	174.35	149.23

Nota: Se consideró control negativo el 100% de viabilidad, los números indican el tratamiento derivado de 1 U, 0.75 U, 0.5 U y 0.25 U de ICRP, considerando como control positivo la Insulina. 1. ICRP, 2. sobrenadante, 3. pellet y 4. exosomas.

El mayor efecto citotóxico en las células 4T1 se observó en el tratamiento del sobrenadante de 1U en el ensayo de recuperación, con un 5.02% de células viables. En las células dérmicas (líneas celulares HUVEC, NIH-3T3 y HACAT) tratadas con 1U de diferentes tratamientos derivados mostraron viabilidad, pero el de mayores valores fue el tratamiento con exosomas, excepto el tratamiento con pellet en la línea celular HUVEC. El ICRP contiene exosomas, estos últimos en las tres líneas celulares mencionadas indujo una proliferación mayor que la insulina que es el control positivo (Tabla 3).

9.3.-Los exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP encapsulan insulina funcionando como nanovectores.

Los exosomas son considerados nano vectores que pueden transportar sustancias, por esta razón se cargó insulina mediante electroporación. Se empleó una metodología reportada en la literatura para incorporar o incrustar fármacos en exosomas de diferentes orígenes. Se evaluó la capacidad del exosoma para encapsular insulina y la capacidad de liberarla de forma controlable. Se logró una eficiencia de encapsulación del 86.08% (Tabla 4). La mayoría de los exosomas liberaron insulina a pH 8 con valores similares a pH 2, ambos con una tasa de liberación constante y estable a lo largo del tiempo (Figura 15). Sólo a pH 2 se observó un

pico de liberación equivalente a un 7.27% en el minuto 0. A partir de estos resultados los exosomas cargados se denominaron exosomas-insulina.

Tabla 4. Encapsulación de insulina en exosomas aislados del ICRP

Ecuación de la línea	$y = 415.12x - 1123.3$
Absorbancia del sobrenadante a 280 nm	3.0635
Substitución de la ecuación de la línea	148.42012
Porcentaje de encapsulación	86.08%

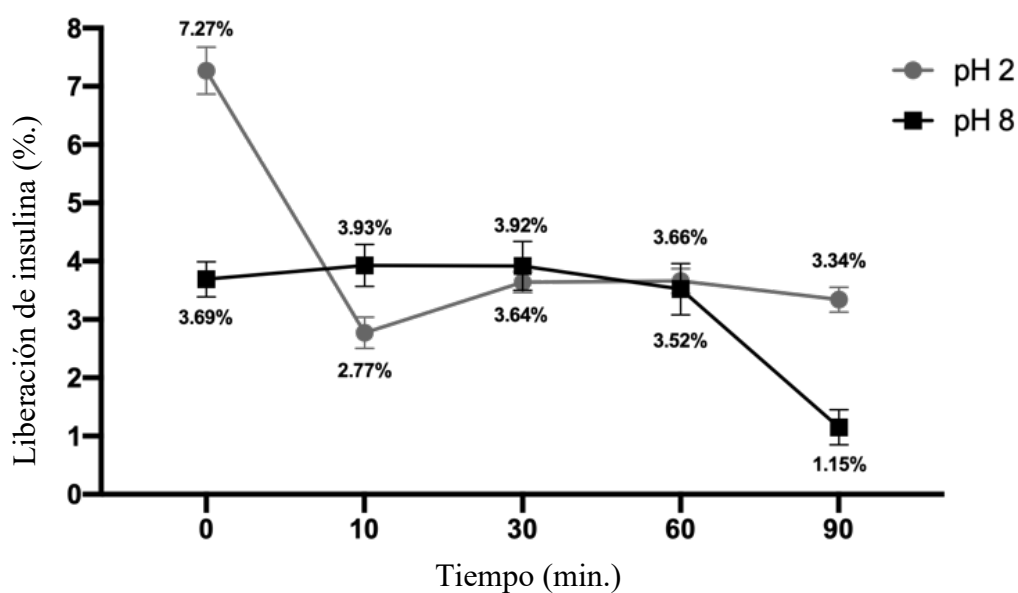


Figura 15. Porcentaje de liberación de insulina. Los exosomas cargados se sometieron a tampón con pH ácido (pH 2) o pH básico (pH 8) y se controló la liberación de insulina a lo largo del tiempo midiendo la absorbancia a 280 nm.

9.3.-Los exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP promueven proliferación celular y migración en células de la dermis.

Se realizó un ensayo de cierre de herida para evaluar si una parte del ICRP o el producto completo era capaz de acelerar el cierre de herida en monocapa. El ICRP y el sobrenadante aumentaron el área del herida en tres líneas celulares (HUVEC, NIH-3T3, y HACAT), mientras que los tratamientos con exosomas y exosomas-insulina no mostraron diferencias significativas frente al control positivo (insulina), acelerando así el cierre de la herida. En la línea celular HUVEC, los tratamientos con insulina y exosomas-insulina cerraron la herida más rápido con una diferencia significativa ($p < 0.05$) frente al control negativo a las 48 h (Figura 16a). En la línea celular NIH-3T3, el tratamiento con exosomas-insulina no mostró un mejor rendimiento que los tratamientos de exosomas o la insulina (los mejores tratamientos), comparando con la línea celular HUVEC que mostró una diferencia significativa con respecto al control (Figura 16b). El tratamiento con pellet en todas las líneas celulares también demostró ser un buen inductor de proliferación y migración, similar a los exosomas y exosomas-insulina a las 24 h. No hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre exosomas y exosomas-insulina en comparación con insulina (control positivo). En esta etapa, basados en los resultados de las pruebas de medio condicionado, viabilidad y ensayo de herida en monocapa, los mejores tratamientos propuestos para utilizar en la fase *in vivo* fueron ICRP, pellet, exosomas y exosomas-insulina.

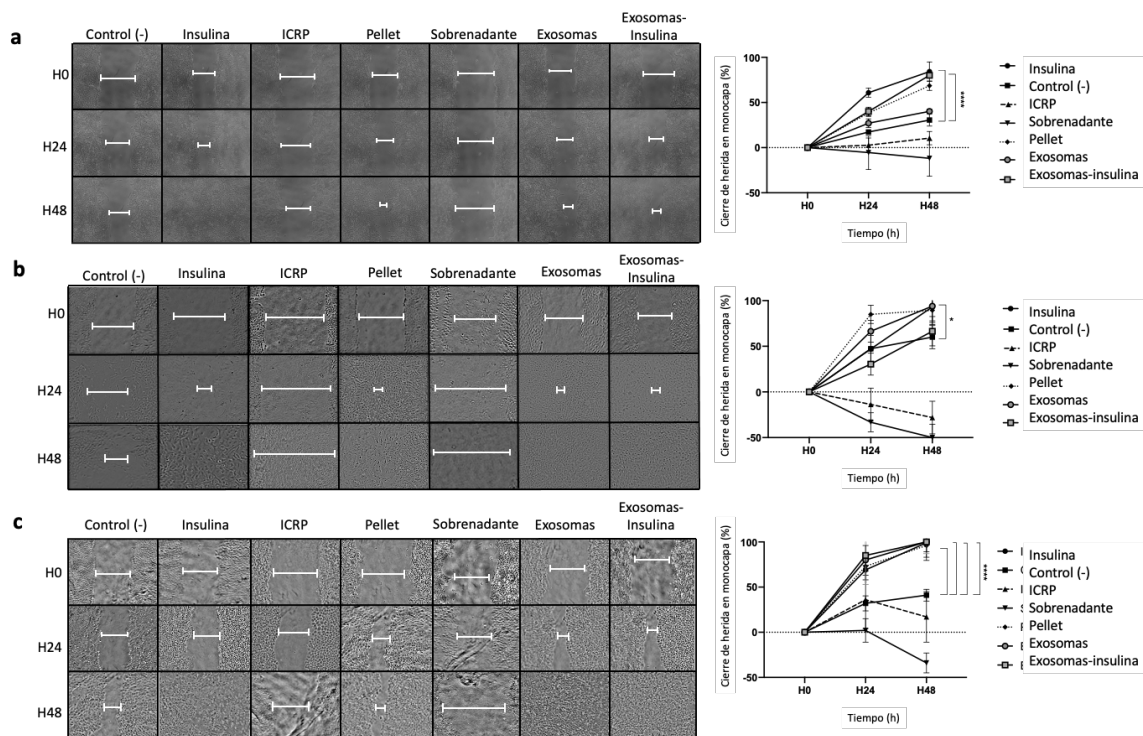


Figura 16. Los exosomas solos y los exosomas-insulina estimulan la proliferación y migración celular. Se realizó scratch / herida en monocapa celular y luego se aplicaron tratamientos; El área de herida se monitoreó mediante fotografías a las 0, 24 y 48 h. a. Los exosomas y los exosomas-insulina inducen la curación en la línea celular HUVEC. b. Los exosomas y los exosomas-insulina inducen la curación en la línea celular NIH-3T3. C. Los exosomas y los exosomas-insulina inducen la curación en la línea celular HACAT. Las fotografías fueron analizadas en Image-J y el análisis estadístico mediante la Prueba de Tukey ($p < 0.05$) $n=5$.

9.3.-Los exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP cargados con insulina promueven el cierre de herida en modelo *in vivo*.

Se logró inducir el modelo de diabetes tipo I en los ratones hembra BALB/c, ya que post-pandrial se observaron lecturas de glucosa mayores a 160 mg/dL (Figura 17). En pruebas *in vivo*, se pudo observar clínicamente que los ratones tratados con exosomas exhibieron el cierre de herida más rápido con un mayor crecimiento de cabello en la piel del sitio de la herida (Figura 18a), en comparación con el control negativo (PBS) o el control positivo (insulina). Se pudo observar en las imágenes representativas que la piel aparece cerrada pero con coloración rosada indicando el cierre de la herida pero no su cicatrización en algunos tratamientos, debido a la contracción del músculo *panniculus carnosus* no implicando

regeneración celular. Otros tratamientos destacados fueron el ICRP y pellet que al día 4 alcanzaron al tratamiento de exosoma-insulina (el segundo mejor tratamiento); el hecho de que el cierre ocurriera durante los primeros días de cicatrización, implica modular la regeneración de la herida probablemente activando procesos celulares. Todas las heridas cicatrizaron al día 12, pero las diferencias entre tratamientos resaltan en los primeros 5 días; al día 3 estadísticamente todos los tratamientos tuvieron diferencias. Los tratamientos con exosomas y exosomas-insulina mostraron un mayor porcentaje de cierre de la herida, 67% y 54% respectivamente, además, el tratamiento ICRP mostró un 50% y Pellet un 52% de cierre de la herida con un buen desempeño, en comparación con PBS e insulina (47% y 42%) al mismo día. A medida que el tiempo transcurría, las diferencias entre tratamientos disminuyeron, pero se observó una tendencia en la que los exosomas mostraron el mejor desempeño (Figura 18b); en el resto de días no se observó diferencia significativa entre los tratamientos con exosomas y exosomas-insulina.

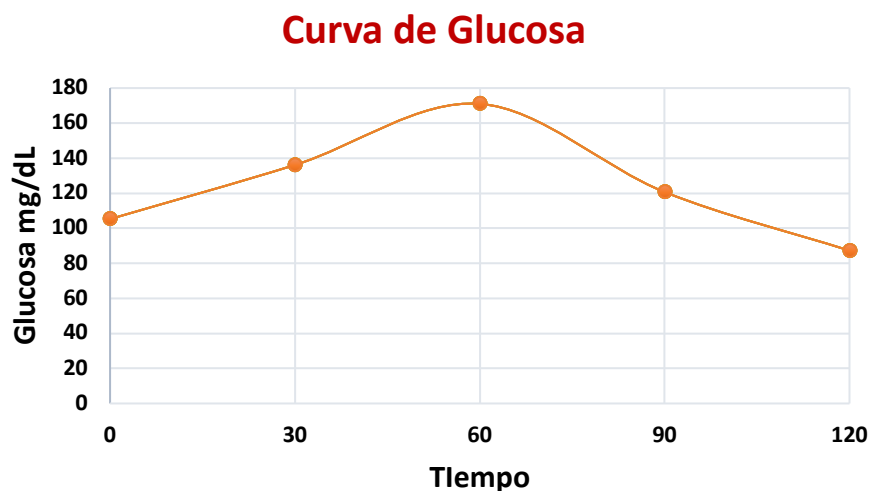


Figura 17. Nivel de glucosa postpandrial en ratones diabéticos hembra BALB/c.

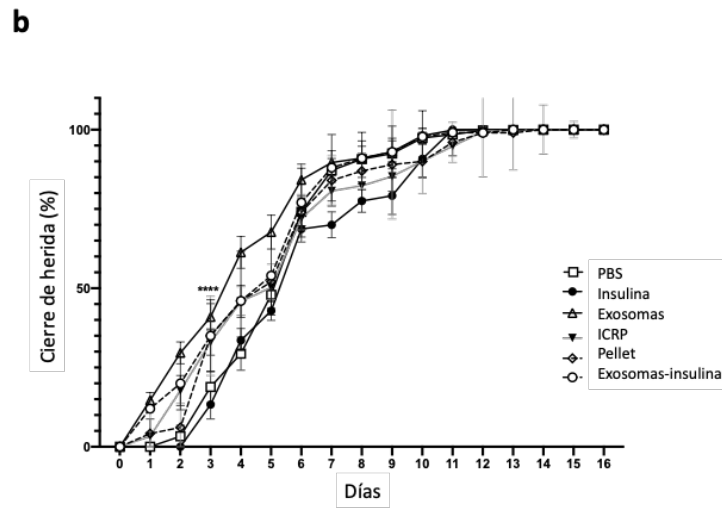
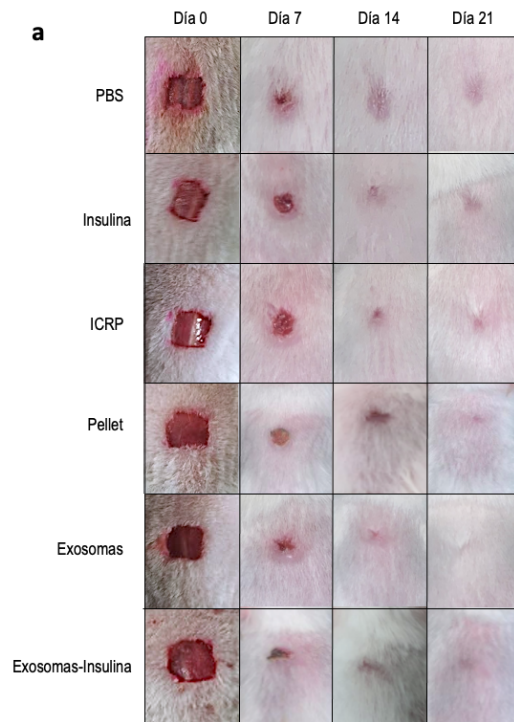


Figura 18. Los exosomas y exosomas-insulina favorecen un cierre acelerado de la herida. a. Fotografías representativas de ratones durante el proceso de cicatrización de heridas después de 5 dosis de su respectivo tratamiento. b. Los tratamientos con exosomas y exosomas-insulina aceleran el cierre de la herida, diferencia significativa entre todos los tratamientos en el día 3. Herida cicatrizada en el día 12. Prueba de Tukey ($p < 0,05$) $n= 5$.

9.3.-El IMMUNEPOTENT CRP y sus partes estimulan la expresión de colágeno en el sitio de la herida.

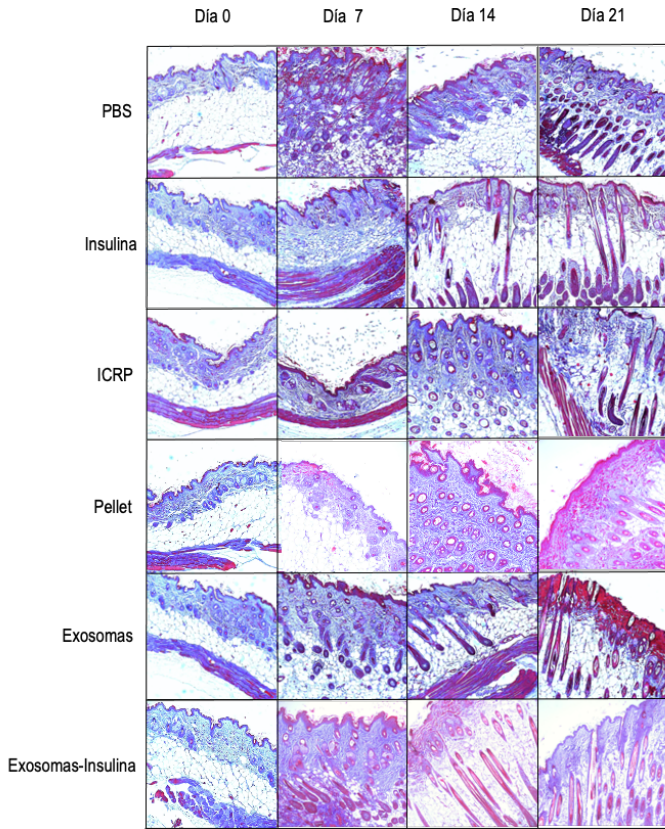
Los tratamientos de exosomas y exosomas-insulina indujeron un proceso de curación acelerado de la herida, pero queda la siguiente pregunta: si debajo de esta capa, se organizaron las capas dérmicas como estructuradas, siendo interpretado como otro signo de una curación adecuada de la herida. Para evaluar eso, se realizó una tinción tricómica en la piel proveniente de la herida, se observó una coloración azul que indica la expresión de colágeno en todos los días en todos los tratamientos (Figura 19a).

En el día 21 se observó la mayor expresión de fibras de colágeno, con mayor producción en ratones tratados con ICRP (29.329%), siguiendo los ratones tratados con exosomas y exosomas-insulina con 27.199% y 25.126% respectivamente con diferencia significativa frente al control negativo (Figura 19b). Con el tiempo se pudo observar un aumento en la expresión de colágeno en todos los tratamientos, excepto en el tratamiento con pellet, en el día 0 con 12.175% de expresión, 12.134% en el día 7, 14.643% en el día 14 y 15.9% en el día 21.

Las capas dérmicas de ratones tratados con ICRP, exosomas y exosomas-insulina parecían más organizadas con respecto al control negativo y comparables al control positivo (Figura 19a). Especialmente en ratones tratados con exosomas y exosomas-insulina que otorgan una apariencia más estética en el sitio de la herida (Figura 19a).

Por otro lado, al día 7 se observó mayor presencia de fibrina (rosa) en todos los tratamientos respecto al resto de días indicando fase de inflamación; el tratamiento que exhibió la capa rosada más fina en la parte superior de la piel fue el de pellet, lo que indica que los ratones tratados con pellet modularon mejor la inflamación en el día 7. Se pudo observar la presencia de folículos capilares como indicador de cierre, especialmente en ratones tratados con exosomas y exosomas-insulina el día 7. Para el día 14, se pudieron observar folículos pilosos en ratones tratados con insulina. Los ratones tratados con exosomas presentaron células más grandes que rodeaban el folículo piloso (Figura 19a).

a



b

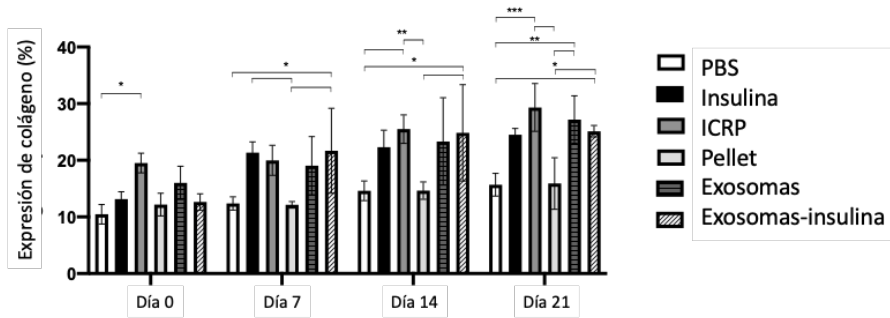


Figura 19. Los tratamientos con exosomas y exosomas-insulina inducen una cicatrización acelerada de las heridas. a. La tinción tricrómica de Masson se realizó en secciones histológicas de ratones sometidos a los diferentes tratamientos. Fotos tomadas a 10X. Rojo: Músculo/eritrocitos, azul: colágeno, rosa: fibrina, azul/negro: núcleos. b. Expresión de colágeno cuantificada en Imagen J, prueba de Tukey ($p < 0.05$) $n = 3$.

9.3.-Evaluación del tejido de granulación, grueso de epitelio y número de células post-tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP y sus partes.

Se observó que el número de células en el sitio de la herida/cicatriz aumentaba según el tratamiento y el día (Figura 20A). Se observaron diferencias significativas dentro de los grupos en los días 7, 14 y 21 (Figura 20A). En el día 7 se observó que los ratones tratados con insulina (control positivo) tenían un mayor número de células en comparación con los otros tratamientos (Figura 20A). En el día 14, los ratones tratados con PBS tuvieron el menor número de células en comparación con los otros tratamientos (Figura 20A). Al día 21, los ratones tratados con insulina o exosomas tenían un mayor número de células respecto al control negativo, mientras que los ratones tratados con exosomas tenían un mayor número de células en comparación con el control positivo (Figura 20A). No se observaron diferencias entre grupos, los tratamientos no aumentaron ni disminuyeron el número de células en comparación con el tejido de piel sin herida (Figura 20A) ($p < 0.05$).

Un indicador de la fase de curación es la formación del tejido de granulación para las fases de inflamación y proliferación. Por tanto, se midió el espesor del tejido de granulación en términos de grosor. Se observó que al día 0 no existen diferencias dentro del grupo, mientras que en los días 7 y 14 sí existen diferencias dentro del grupo (Figura 20b) ($p < 0.05$). Al día 7, se observó tejido de granulación de mayor grosor en ratones tratados con PBS, exosomas y exosomas-insulina (Figura 20b). En el día 14, no hay diferencia entre los ratones tratados con PBS, insulina y pellet, pero sí hay un aumento en el grosor del tejido granular en los ratones tratados con ICRP, exosomas y exosomas-insulina (Figura 20b) ($p < 0.05$). Al día 21 no existen diferencias en el grosor del tejido de granulación (Figura 20b). Por otro lado, se observaron diferencias entre grupos en comparación con el día 0 (Figura 20b) ($p < 0.05$). Al día 7, se observó que los ratones tratados con exosomas o exosomas-insulina presentaron un aumento del grosor del tejido granular respecto al día 0; mientras que en el día 14 los ratones tratados con ICRP, exosomas o exosomas-insulinas también mostraron un aumento en el espesor del tejido granular respecto al día 0 sin diferencias respecto al día 7 (Figura 20b) ($p < 0.05$).

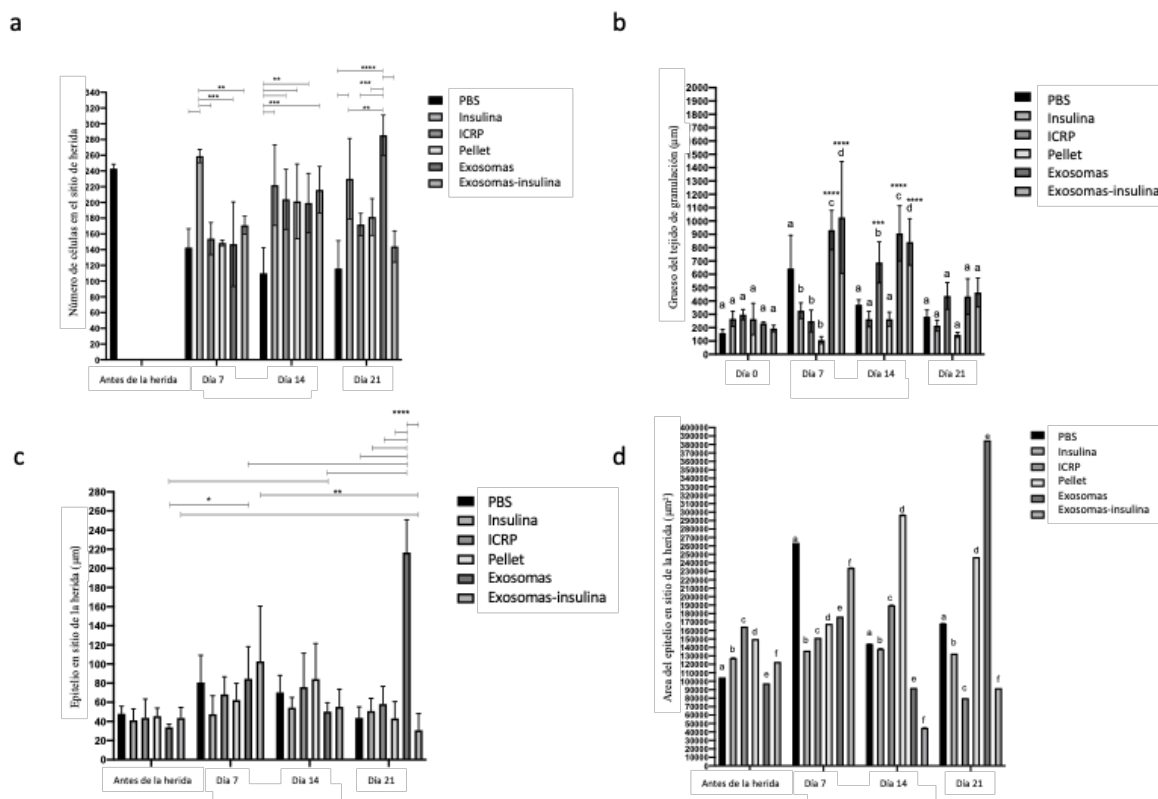


Figura 20. Inducción de la cicatrización / regeneración de la herida mediante ICRP y sus partes. a. Número de células en el sitio de la herida, el número de núcleos se analizó en ImageJ, los asteriscos muestran diferencias significativas dentro del grupo (prueba de Tukey $p < 0.05$ $n=3$). b. El espesor / grueso del tejido de granulación en μm , se analizó utilizando la línea poligonal en ImageJ, las letras muestran diferencias significativas dentro de los grupos y los asteriscos diferentes entre los grupos (prueba de Tukey $p < 0.05$, 5 medidas por fotografía, $n=3$). c. El espesor / grueso del epitelio en el sitio de la herida se analizó en μm utilizando la línea poligonal en ImageJ; los asteriscos muestran diferencias significativas dentro de los grupos y entre grupos (prueba de Tukey $p < 0.05$, 5 medidas por fotografía $n = 3$). d. Área del epitelio en el sitio de la herida en μm^2 , el epitelio se delineó y su área se midió en ImageJ, las letras representan diferencias significativas dentro y entre los grupos (prueba de Tukey $p < 0.05$, $n=3$)

Se observó que durante los primeros días no existen diferencias en cuanto al espesor del epitelio entre el grupo, hasta el día 21, donde los grupos de ratones tratados sí presentaron diferencias contra control negativo (PBS), indicando un mayor espesor del epitelio. Esto puede ser interpretado como indicios de una cicatriz en remodelación, presentando un mayor espesor en el tratamiento de exosomas. También se observó que el tratamiento con exosomas

aumentó el grosor del epitelio con una diferencia significativa en los días 7 y 14 en la herida en comparación con el día 0 (Figura 20c).

En cuanto al área del epitelio, se observan diferencias significativas dentro y entre grupos ($p < 0.05$). Al día 7, el tratamiento que presentó mayor área en el epitelio fue PBS, siguiendo el tratamiento con exosoma-insulina (Figura 20d). En el día 14, los tratamientos que presentaron epitelio con menor área fueron exosomas y exosomas-insulina, siendo el tratamiento con pellet el que tuvo mayor área (Figura 20d). Al día 21, los tratamientos que presentaron epitelio con mayor área fueron pellets y exosomas (Figura 20d). Según los criterios de curación (Tabla 5), los ratones tratados con exosomas o exosomas-insulina mostraron el mejor proceso de curación, con regeneración del epitelio.

Table 5. Calificación del tejido cutáneo en sitios de herida post-tratamiento

Tratamiento	Calificación día 7	Calificación día 14	Calificación día 21
PBS	3	4	7
Insulina	4	8	9
ICRP	5	7	8
Pellet	4	6	7
Exosomas	7	10	11
Exosomas-insulina	7	10	11

1-3. Ninguna a mínima acumulación de células. Sin tejido de granulación ni recorrido epitelial. 4-6. Granulación fina e inmadura dominada por células inflamatorias pero con pocos fibroblastos, capilares o depósitos de colágeno. Migración epitelial mínima. 7-9. El tejido de granulación moderadamente grueso puede variar desde estar dominado por células inflamatorias hasta más fibroblastos y depósitos de colágeno. Neovascularización extensa. El epitelio puede variar desde una migración mínima a moderada. 10-12. Tejido de granulación vascular grueso dominado por fibroblastos y depósito extenso de colágeno. Epitelio que cubre parcial o completamente la herida.

9.3.-El tratamiento tópico con exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP modula la expresión de citocinas pro-inflamatorias en modelo murino.

El ICRP puede modular el sistema inmunológico, por lo que este y sus partes podrían modular la expresión de citocinas sistémicamente después de aplicarse tópicamente en el sitio de la herida, ya que pudiese modificar a las células de las capas de la dermis para presentar un fenotipo secretor determinado. La expresión de IL-12 P70, después de 5 días de tratamiento disminuyó en los días 7 y 14; para el día 21, todos los tratamientos aumentaron la expresión de IL-12 P70, excepto la insulina, que todos los días se mantuvo por encima de 28.23 pg/ml (Figura 21a). Los tratamientos con menor expresión de IL-12 P70 fueron PBS con 10.46 pg/mL, exosomas y exosomas-insulina con 11.79 pg/mL, significativamente se observaron diferencias entre todos los tratamientos excepto entre exosomas y exosomas-insulina al día 14 (Figura 21a). La citocina proinflamatoria TNF aumentó significativamente en los ratones tratados con ICRP, con la concentración más alta de 31.86 pg/mL en el día 21. A diferencia de los ratones tratados con exosomas con estadísticamente la expresión más baja de TNF (0.49 pg/mL) (Figura 21b) al día 14. En cuanto a la expresión de IFN- γ , al día 7 no se observó diferencia significativa contra el control entre los tratamientos del día 7 (Figura 21c), en el día 14 los ratones tratados con exosomas mostraron una expresión más baja, mientras que el tratamiento con ICRP mostró una expresión aún más baja en el día 21 (6.73 pg/ml) (Figura 21c).

La expresión de la quimiocina MCP-1 en sueros se reguló negativamente mediante los tratamientos de exosomas-insulina al día 7 (24.52 pg/ml), y después del tratamiento con ICRP (33.56 pg/ml), con respecto al tratamiento con PBS (39.18 pg/ml) (Figura 21d); en el día 14 no se observó expresión en ratones tratados con exosomas, pero los ratones tratados con ICRP sí mostraron expresión (29.37 pg/ml) (Figura 21d) con diferencia significativa frente al control. La citocina antiinflamatoria IL-10 se mostró sobreexpresada en todos los tratamientos al día 7 con diferencia significativa frente a los controles; el tratamiento con mayor expresión fue ICRP con 55.94 pg/mL, en segundo lugar exosomas-insulina con 43.08 pg/mL (Figura 21e). La citocina IL-6 se expresó en un rango de 10.91 a 12.07 pg/ml (Figura 20f). En el día 7, todos los tratamientos fueron significativamente diferentes, los ratones

tratados con pellet y exosomas-insulina mostraron niveles de expresión más bajos, con 9.57 pg/ml (Figura 21f). Al día 14, el tratamiento con PBS disminuyó la expresión hasta 4.75 pg/mL y no se observó expresión en el tratamiento con exosomas. Siendo el tratamiento con ICRP el más alto (16.03 pg/mL) (Figura 21f). En el día 21 los tratamientos con menor expresión fueron pellet con 9.19 pg/mL y exosomas-insulina con 10.14 pg/mL (Figura 21f).

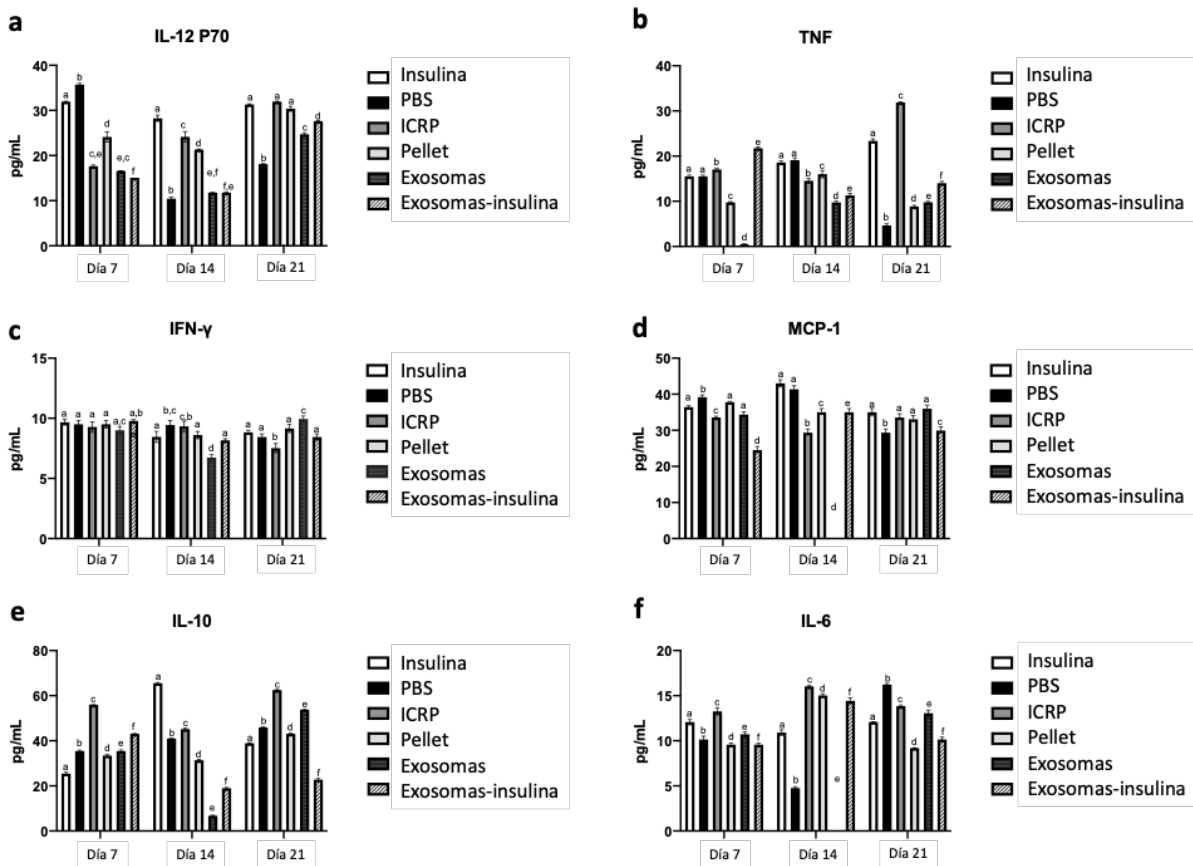


Figura 21. Expresión de citoquinas inflamatorias en ratones diabéticos tratados tópicamente en el sitio de la herida. Se obtuvo sangre los días 7, 14 y 21, los sueros se separaron y evaluaron mediante citometría de flujo. Prueba de Tukey ($p < 0.05$) $n = 3$. a. IL-12 p70. b. TNF. c. IFN- γ . d. MCP-1. e. IL-10. f. IL-6.

9.3.-Los exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP solos o cargados con insulina activan componentes de la vía PI3 AKT para promover cierre de herida.

Los ratones diabéticos tratados tópicamente con exosomas-insulina mostraron una mayor expresión de p-AKT con un 24.36% en comparación con la insulina con un 18.05% con diferencia significativa ($p < 0.05$) (Figura 22b). El control negativo mostró la expresión más baja con 8.7%. El ICRP que contiene exosomas mostró una expresión del 11.22% mientras que los exosomas mostraron expresión del 20.07% (Figura 22b). La expresión de p-FOXO verifica la activación de la vía, el control negativo y el ICRP mostraron la misma expresión (12%), mientras que la insulina mostró una expresión del 22.24%, el tratamiento con exosomas-insulina mostró la mayor expresión (28.55%) con diferencia significativa frente a la insulina ($p < 0.05$) (Figura 22b). Los ratones tratados con PBS y exosomas mostraron una baja expresión de p-P21 (de 9%), mientras que los ratones tratados con insulina mostraron una expresión de 19.27%, en comparación con la expresión más alta con diferencia significativa en el tratamiento exosoma-insulina (20.21%) ($p < 0.05$) (Figura 22b); Los ratones tratados con ICRP y pellet también mostraron diferencias significativas frente a la insulina, con 12.2% y 13.07% (Figura 22b). El otro marcador negativo de activación de la vía, p-TSC2, apareció inferior al control negativo PBS (por debajo de 13.36%) excepto para el tratamiento con exosomas-insulina con un 16.28%, siendo el único tratamiento con diferencia significativa ($p < 0.05$) frente al tratamiento con insulina con un 10.83% de expresión (Figura 22b). El análisis inmunohistoquímico indicó la activación de componentes de la vía PI3-AKT mediante fosforilación de AKT y FOXO (Figura 22a).

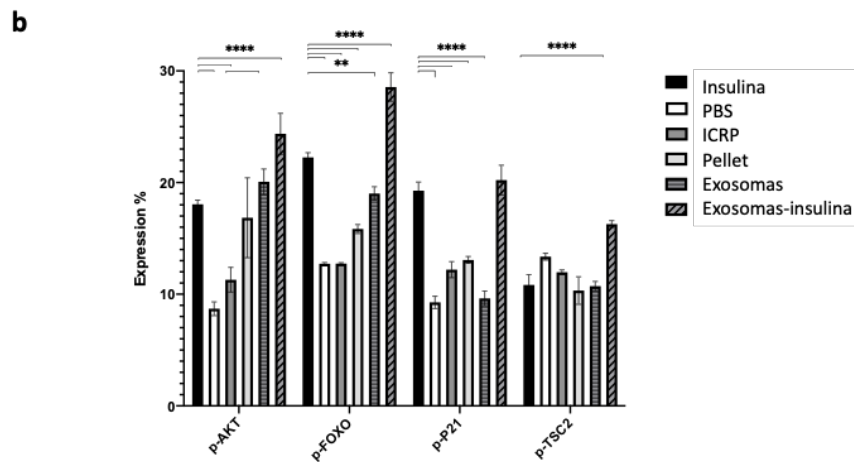
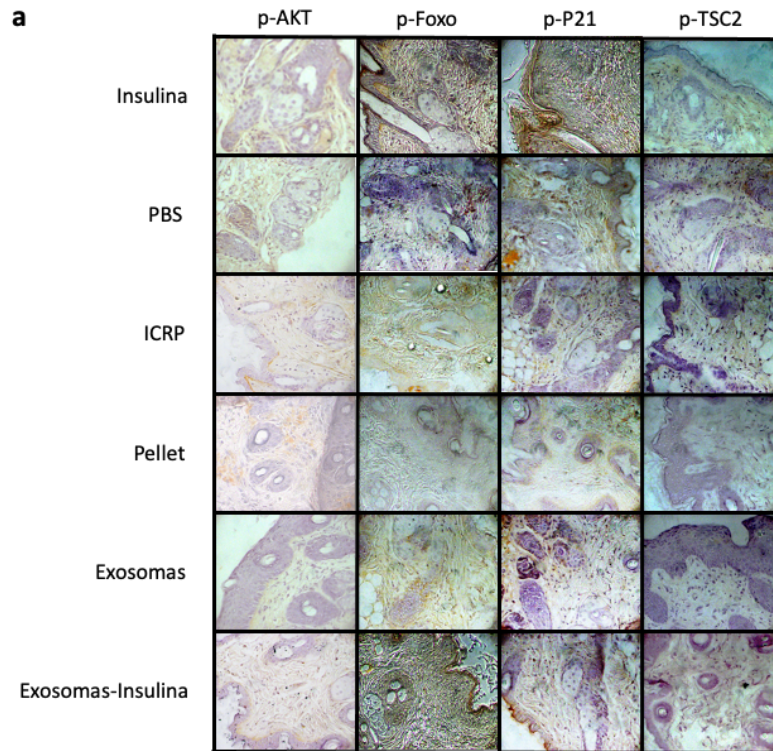


Figura 22. Las heridas por escisión en ratones diabéticos tratados con exosomas y exosomas-insulina sanan más rápido mediante la activación de la vía AKT. a. Las heridas se trataron tópicamente durante 5 días, el día 7 se cortaron trozos de piel en el sitio de la herida y se fijaron con formaldehído al 10%, luego se realizó inmunohistoquímica y se contrastó con hematoxilina. Se muestran fotografías representativas a 10X tomadas con un microscopio óptico Zeiss conectado a una cámara. b. Las fotografías fueron analizadas en el programa ImageJ para calcular el porcentaje de expresión de cada marcador, los valores medios se presentaron en el gráfico. Prueba de Tukey ($p < 0,05$) $n= 5$.

10.-DISCUSIÓN

El punto central de la discusión gira en torno a la cicatrización de heridas en la diabetes y los componentes del IMMUNEPOTENT CRP. Las úlceras de pie diabético presentan un desafío importante dentro del sector de la salud debido a posibles complicaciones, incluida la amputación de extremidades. Si bien existen opciones terapéuticas, a menudo son insuficientes para casos avanzados de ulceración. Se propuso explorar al IMMUNEPOTENT CRP para acelerar la curación. Para ello se demostró por primera vez la presencia de los exosomas en el extracto, los cuales poseen un tamaño promedio de 60 nm de diámetro, coincidiendo con los marcadores protéicos característicos de un exosomas proveniente de *Bos taurus* (Gazze et al. 2021; Exocarta n.d.).

Antes de este estudio no estaba claro si los efectos citotóxicos del IMMUNEPOTENT CRP se atribuían a sus exosomas o a alguna de sus diferentes partes obtenidas por centrifugación (sobrenadante o pellet), fue por esto que se empleó la prueba de citotoxicidad en la línea celular de cáncer de mama 4T1, como prueba de potencia para evaluar si el lote de IMMUNEPOTENT CRP fue procesado correctamente confirmando su identidad y que las partes (pellet, sobrenadante, exosomas) evaluadas provenían efectivamente del ICRP. para después determinar el efecto de cada una de las partes por separado. Se observó curiosamente que los exosomas no son el bioactivo principal encargado del efecto citotóxico sobre las células cancerosas.

Se confirmó la validez del producto (un pool de diferentes lotes) para ser utilizado en el estudio. El ICRP tuvo un efecto citotóxico en la línea celular 4T1, como se informó previamente tanto *in vitro* como *in vivo* (Reyes et al. 2021; Santana et al. 2020), observándose este efecto tanto en la prueba de viabilidad a 24 h y ensayo de recuperación 5 días después del tratamiento. Se observó citotoxicidad (87.21%) al tratar 5×10^3 células 4T1 con 1 U de ICRP, correlacionándose con Reyes et al. observándose un 86% de citotoxicidad al tratar células 4T1 con ICRP. Por lo tanto, se verificó mediante la prueba de potencia que estábamos trabajando con el producto registrado. También se observaron algunos efectos interesantes al separar los componentes del ICRP. Al probar la fracción sobrenadante se observa un mayor

efecto citotóxico en la concentración de 1U de tratamiento en comparación con el ICRP como extracto completo, ya que es bien conocido que los componentes de un extracto cuando se aíslan pueden en algunos casos aumentar su efecto funcional (Juncan et al. 2021). Otro componente del ICRP son los exosomas, no existen reportes sobre el uso de exosomas aislados de un hemoderivado como es el caso de un extracto de leucocitos el ICRP, pero sí hay reportes de exosomas aislados de macrófagos, células abundantes en el bazo; aquellos exosomas mencionados han sido probados en células 4T1, no mostrando efecto tóxico, pero sí proliferación, excepto cuando se cargan con paclitaxel monitoreado mediante metodología MTT (Wang et al. 2019). Por otro lado, se ha reportado que los exosomas aislados de la hemolinfa del cangrejo se probaron en células 4T1 monitoreando la viabilidad a través del metabolismo de la resazurina, disminuida un 20% después de 48 horas de tratamiento con 0.1 mg/mL (Rezakhani et al. 2021); para observar el equivalente efecto sobre la viabilidad pero con nuestros exosomas se tuvieron que administrar 542.92 mg/mL (0.75 U), lo que demuestra que se necesita una dosis mayor para observar el mismo efecto citotóxico, lo que da una idea del pobre efecto citotóxico de nuestros exosomas sobre las células 4T1. Dicho efecto fue verificado mediante el ensayo de recuperación 5 días post tratamiento al disminuir la viabilidad hasta un 70%, una diferencia de sólo el 10% con los resultados de 24 h post tratamiento. Se pudo observar en la tinción de naranja de acridina y bromuro de etidio en células 4T1 tratadas con 0.5 U de cada tratamiento, que las células tratadas con exosomas o pellet mostraron núcleos fragmentados. Mientras tanto, las células 4T1 tratadas con ICRP y el sobrenadante mostraron necrosis y apoptosis, un efecto similar se observó previamente al tratar células MCF-7 con 0.66 U de ICRP, presentando la mayoría de las células apoptosis temprana y tardía (naranja o verde con fragmentos de núcleos celulares) pero también presencia de células necróticas (glóbulos rojos) (Franco et al. 2006).

Aunque los efectos de los exosomas varían según el origen celular, su papel potencial en la cicatrización de heridas es novedoso, especialmente de un hemoderivado como el IMMUNEPOTENT CRP. El estudio incluyó evaluaciones tanto *in vitro* como *in vivo*, que revelaron distintas respuestas celulares conforme los diferentes componentes del ICRP. Primero se creó un medio condicionado para células HUVEC obtenidas de sangre venosa periférica humana previamente tratada con 0.5 U de ICRP, con lo cual se indujo una mayor

proliferación en células HUVEC en comparación con el control. Esta técnica se basa en las moléculas que una célula puede secretar bajo un tratamiento, con la potencial actividad de inducción de proliferación, se ha informado que las células mononucleares de la sangre del cordón umbilical cuando se someten a estímulos como la irradiación tienen un efecto proangiogénico sobre las células endoteliales progenitoras *in vitro* (Cervio et al. 2013), diferentes tipos de estímulos pueden promover la activación de funciones biológicas relacionadas con la supervivencia. Un estudio que empleó exosomas derivados de plasma de rata sobre macrófagos irradiados indujeron la angiogénesis en células HUVEC al estimular el microambiente (Li et al. 2021). Las células mesenquimales están presentes en el estroma de varios tejidos y órganos, por ejemplo el bazo y el cordón umbilical; de este último, esas células secretan factores que pueden usarse como medio condicionado para cultivar células HUVEC privadas de glucosa en condiciones de hipoxia, induciendo proliferación y efecto antiapoptótico; estas condiciones de estrés e hipoxia están presentes en una úlcera del pie diabético, en la que se reporta la malformación de los vasos sanguíneos (Bader et al. 2014). Asimismo, se ha demostrado que el plasma rico en plaquetas en modelo *ex vivo* en fibroblastos y queratinocitos induce proliferación y acelera el cierre de heridas en monocapa, debido a la presencia de factores de crecimiento y citocinas (Stessuk et al. 2016; Bakadia et al. 2023). Probablemente los exosomas derivados de las células del bazo bovino contienen las moléculas mencionadas, ya que la ICRP tuvo efecto sobre células HUVEC en un medio condicionado, por lo que luego se probó su efecto sobre fibroblastos y queratinocitos.

En experimentos de proliferación *in vitro* se observó que los exosomas potenciaron la proliferación, medida indirectamente a través del metabolismo de la resazurina, lo que indica una mayor actividad mitocondrial, con una viabilidad de hasta un máximo de 244% a las 24 h después del tratamiento. Se ha informado que los exosomas derivados de células madre mesenquimales adiposas son internalizados por los fibroblastos para aumentar su proliferación y migración con una sobreexpresión de colágeno I y III (Hu et al. 2016) también en fibroblastos dérmicos humanos (Zhang et al. 2018), lo que se correlaciona con nuestros resultados en los que la proliferación aumentó en la línea celular NIH-3T3 tratada con exosomas hasta 193% viabilidad post-tratamiento además de promover mayor expresión de colágeno como se discutirá más adelante. También se ha informado que los exosomas de las

células madre adiposas inducen la proliferación en la línea celular HUVEC inducida por niveles altos de glucosa (Liang et al. 2022); en nuestro experimento, las células mencionadas mostraron un 139% de viabilidad 24 h después del tratamiento. Además, se ha informado que los exosomas derivados de células madre de adipositos aceleran la proliferación en la línea celular HACAT a través de microARN altamente expresados al activar la vía PI3K/AKT (Liang et al. 2022), esta línea celular en la que se observó una viabilidad del 244% 24 h después del tratamiento. Todas las líneas celulares en esta investigación cerraron la herida por raspado en monocapa más rápido que el control y estadísticamente igual que la insulina utilizada como control positivo, esto se correlaciona con diferentes autores que utilizan fibroblastos, células endoteliales vasculares y queratinocitos (Hu et al. 2016; Liang et al. 2022; Yang-C et al. 2020). Además, cuando se utilizan exosomas de células madre de adipositos que atravesaron un proceso de hipoxia, se acelera el cierre del herida a un ritmo más rápido que cuando se emplean los exosomas de células madre adipositos sin hipoxia (Wang et al. 2021); el IMMUNEPOTENT CRP debido al proceso de fabricación, somete al bazo a un proceso de hipoxia ya que desde el momento en que es retirado del bovino sufre este proceso, por lo que probablemente los exosomas del ICRP son producto de células hipóxicas coincidiendo con los resultados de Wang con un efecto similar de curación del herida a las 24 h con los tratamientos de exosomas y exosomas-insulina. Además, las úlceras de pie diabético se caracterizan por presentar un ambiente hipóxico, por lo que es importante considerar un tratamiento que pueda funcionar en estas condiciones para inducir la curación.

Como se utilizó insulina como control positivo el cual se ha reportado tiene una vida media pobre en piel, se decidió encapsularla en los exosomas, obteniendo un 86.08% de encapsulación y un pico en la liberación de insulina (7%) a pH 2, pero aún estable a ambos pH ácido como básico. Por lo cual se propuso los exosomas aislados del ICRP como un buen vector para la liberación de insulina, para aumentar su vida media en la piel, asegurando la liberación de insulina ya que las úlceras de pie diabético comúnmente presentan un pH alcalino (Yang-C et al. 2020; McArdle et al. 2015). Para ello se utilizó el tratamiento con exosomas e insulina en los experimentos posteriores.

Otro signo de buena cicatrización es la producción de colágeno, para ello se indujo hiperglucemia en ratones hembra BALB/c con estreptozotocina para la simulación del modelo de diabetes tipo 1, para luego tratar heridas tópicas, en las cuales se observó que el grupo tratado con exosomas cicatrizaba más rápido con buena producción de colágeno, pero no fue el tratamiento con mayor expresión de colágeno, ese fue el tratamiento ICRP al día 21 con 29.32% de expresión de colágeno. En segundo lugar, se observaron a los ratones tratados con exosomas (27.19%), y exosomas-insulina (25%), siguiendo el grupo de control positivo (24.5%). Esto se correlaciona con los exosomas derivados de células madre mesenquimales como tratamiento de heridas en ratas no diabéticas, en los que los exosomas aceleraron el cierre más rápido que su control positivo (medio MesenGro hMSC), y también una mayor expresión de colágeno I y III (Zhang et al. 2015). Otro hecho interesante de los exosomas es que cuando provienen de células perivasculares, los cuales inducen una mayor expresión de colágeno en el sitio de la herida en el modelo de rata (Kim et al. 2021), por lo que los exosomas aislados del ICRP al originarse a partir de un órgano están mostrando tales resultados. Incluso también coincide con las funciones predichas de manera *in silico* las cuales indicaban ensamblaje de fibras de colágeno.

Con base en el análisis histológico, el número de células se mantuvo durante las fases de curación, pero dentro de los grupos (entre tratamientos comparados en el mismo día) se pudieron observar diferencias, ya que en el día 21 donde los ratones tratados con exosomas exhibieron un mayor número de células en comparación con los controles, esto podría implicar una mayor remodelación de la herida. El tejido de granulación es importante ya que es uno de los componentes de la fase de proliferación (días 4-21); por eso se midió el espesor en lugar del número de tejidos de granulación, ya que se ha informado que es un mejor parámetro de curación (Van de Vyeveer et al. 2021). Se puede observar que al día 7 los ratones que presentaron mayor espesor de tejido de granulación fueron los tratados con exosomas y exosomas-insulina, en un tiempo más rápido que el resto de tratamientos, al día 14 el tratamiento de ICRP fue otro que indujo un mayor espesor del tejido de granulación; al día 21 no se observó diferencia respecto al día 0, lo que implica que el tejido se encontraba en fase de remodelación y maduración; Se ha informado que los exosomas derivados de células madre mesenquimales aisladas del cordón umbilical estimulan la regeneración de la piel al

mejorar la regeneración del tejido de granulación y la regulación positiva del VEGF (Yan-J et al. 2020), lo que coincide con nuestros resultados en los que los grupos tratados presentaron formación vascular (tabla 5). Además, esto podría explicarse con el hecho de que las células endoteliales y fibroblastos son componentes del bazo, estas fueron estimuladas por el ICRP y sus partes. Otro parámetro de la adecuada cicatrización de heridas es el desarrollo del epitelio; observamos que los exosomas y exosomas-insulina mostraron un mayor espesor en el epitelio que indica la inducción de la curación en el día 21, mayor en comparación con el grosor del epitelio antes de la herida, lo que conduce a la formación de cicatrices. Se ha informado que los exosomas derivados de las células madre mesenquimales del cordón umbilical pueden mejorar el espesor epitelial en ratas ovariectomizadas (Zhang et al. 2023). Basándose en estos análisis histológicos se pudo observar que el tratamiento con exosomas presentó mayor número de células en el sitio de herida al día 21, correlacionando con mayor área y grosor del epitelio al mismo día. Los tratamientos de exosomas y exosomas-insulina presentaron antes mayor grosor del tejido de granulación correlacionando esto con un avance más acelerado por las fases de proliferación.

Una vía comúnmente activada en heridas diabéticas tratadas con exosomas es la PI3/AKT. En ratones diabéticos tratados en el sitio de la herida con exosomas y exosomas-insulina se observó una activación de PI3/AKT, asumiéndose por la presencia de AKT fosforilada y una consecuente fosforilación de FOXO, mientras que en ratones tratados con ICRP la expresión de los marcadores mencionados fue menor que el control positivo pero superior al control negativo, respondiéndonos que el componente activo que induce la curación de la herida diabética según nuestros resultados *in silico* corresponde a exosomas que confirman nuestras predicciones y se correlacionan con otros estudios con el mismo modelo de ratones hiperglucémicos (Zhang et al. 2018; Wang et al. 2021).

Además, una consecuencia de la vía de proliferación PI3/AKT es la modulación de la inflamación; observamos que los exosomas modulan las citocinas inflamatorias de manera similar al ICRP como extracto completo sobre macrófagos humanos (Franco et al. 2005). La IL-12 p70 es secretada por células presentadoras de antígeno polarizando a los macrófagos al fenotipo M1, no deseado en la herida; ratones tratados con ICRP, exosomas y exosomas-

insulina disminuyeron la expresión en suero de IL-12 p70 en los días 7 y 14 mostrando la expresión más baja en exosomas-insulina coincidiendo con una curación más rápida y una mejor organización en las capas dérmicas, esto se correlaciona con un estudio que emplea ratones IL-12 KO que mostraron una curación acelerada de las heridas (Matias et al. 2011). El TNF comúnmente se sobreexpresa en heridas que no cicatrizan (Dhamodharan et al. 2019), se observó que los ratones tratados con exosomas en el día 7 mostraron niveles disminuidos de TNF y en el día 14 los ratones tratados con ICRP, exosomas y exosomas-insulina también mostraron niveles disminuidos, esto se correlaciona con un estudio en el cual a los macrófagos peritoneales murinos se estimularon *in vitro* con LPS al emplear una dosis de 0.5 U/mL de ICRP también se disminuyó la expresión de TNF (Franco et al. 2005). También se correlaciona con un estudio en el que úlceras de pie diabético fueron tratadas con oxigenoterapia hiperbárica, mostrando niveles reducidos de TNF con un tiempo de sanación más rápido que el control (Semadi, 2019). No se observaron diferencias significativas en la expresión de IFN- γ el día 7; se ha informado que la expresión de IFN- γ no influye en el proceso de curación (Kämpfer et al. 2000), pero en ratones KO de IFN- γ se demostró que los defectos en IFN- γ alteraron la cicatrización de heridas volviéndola más lenta, esto podría correlacionarse con lo observado, al presentarse una disminución de la expresión de IFN- γ en ratones tratados con exosomas (Kanno et al. 2019), siendo uno de los tratamientos con mejor respuesta clínica.

La expresión aumentada de MCP-1/CCL2 se correlaciona con una cicatrización acelerada de heridas en el modelo de ratones diabéticos al restaurar la respuesta de los macrófagos (Wood et al. 2014). Por el contrario, observamos en ratones tratados con ICRP o exosomas-insulina una disminución de la expresión de MCP-1, mientras que esos ratones formaban parte de los tratamientos con curación acelerada. Por otro lado, un estudio observacional indicó que el genotipo 2518 A/G es más frecuente en pacientes humanos con DFU DM tipo 2 con una forma mutante de MCP-1 que se expresa altamente en suero y se correlaciona con una baja expresión de VEGF y un retraso en la cicatrización de heridas (Li et al. 2018). Por eso el hecho de que los exosomas y los exosomas-insulina regulen negativamente la expresión de MCP-1 no es un mal efecto, debido a la probabilidad de que los pacientes puedan expresar este otro genotipo reportado, esto significa una limitante del

presente estudio debido a la genética del modelo murino. Se ha propuesto como biomarcador de riesgo de desarrollo de úlceras de pie diabético la baja expresión de ApoA1 e IL-10 (Nanda et al. 2022). En un modelo murino de infarto de miocardio con KO en IL-10, los exosomas derivados de células progenitoras endoteliales no exhibieron reparación del miocardio (Yue et al. 2020). Además, otro estudio de exosomas derivados de las mismas células informó que la sobreexpresión inducida de IL-10 promueve la reparación regenerativa del tejido en ratones diabéticos a través de STAT3 mediante la regulación de la síntesis de hialuronano específica de fibroblastos (Short et al. 2022). Esto se correlaciona con el aumento de la expresión que observamos en ratones tratados con ICRP, exosomas-insulina y exosomas (en ese orden), también con la regulación negativa de IL-10 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS y luego tratados con ICRP (Franco et al. 2005). Se debe considerar que la IL-6 se reporta con un comportamiento dual, en el presente estudio se considera proinflamatoria, una de las características en pacientes con DM es la inflamación crónica; Los pacientes con úlcera de pie diabético expresan altos niveles de IL-6 (Galicia et al. 2020), siendo un obstáculo en la cicatrización de estas úlceras ya que bloquea la polarización de los macrófagos. Se ha reportado que los exosomas derivados de fibroblastos dérmicos autólogos aceleran la cicatrización de heridas cutáneas diabética mediante la activación de la vía AKT-beta catenina, regulando negativamente la inflamación al reducir la expresión de IL-6 en el sitio de la herida en ratas diabéticas (Han et al. 2021). En el presente estudio, los ratones tratados con pellet y exosomas-insulina mostraron una disminución de la expresión de IL-6 en el día 7, lo que se correlaciona con una cicatrización acelerada de las heridas debido al control del entorno proinflamatorio.

Los péptidos presentes en el ICRP y/o exosomas modulan la activación de células del sistema inmune innato, infiriéndose esto como consecuencia de la modulación de citocinas. Estimula a las células para liberar mediadores que promueven procesos de curación como la cornificación mencionada en estudios previos (García Coronado et al., 2023). Se ha demostrado que mediante el uso de péptidos unidos a matrices como los hidrogeles se puede potenciar la activación de estas células (Griffin et al., 2021). En nuestro estudio se utilizaron exosomas como nanovectores ya que, por su tamaño, pueden entrar en las células. Se observó modulación de citocinas, como la expresión de citocinas por macrófagos. El ICRP y sus parte

regulan a la baja la IL-12 p70 y la IL-6, promoviendo un fenotipo M2 de macrófagos, que promueven la curación al secretar TGF- β , la cual es clave en la regulación de la síntesis de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular. El PDGF es factor de crecimiento que estimula la proliferación y migración de fibroblastos (García Coronado et al., 2023). Los péptidos y exosomas de la ICRP también inducen directamente la proliferación de células endoteliales para la formación de vasos sanguíneos, punto clave en la nutrición de la piel, e inducen el mismo efecto en los fibroblastos aumentando la síntesis de colágeno y aportando propiedades tensoras a la piel. También estimula los queratinocitos, componente principal de las capas externas de la piel (cornificación y queratinización), aportando resistencia, impermeabilidad y protección. Estos últimos resultados coinciden con las predicciones *in silico* mostradas en esta investigación.

11.-CONCLUSIONES

Este trabajo destaca el papel prometedor de los componentes del IMMUNEPOTENT CRP, especialmente los exosomas y exosomas cargados con insulina para acelerar la cicatrización de heridas diabéticas, mejorar la proliferación, la producción de colágeno y modular la inflamación a través de la fosforilación de componentes de la vía PI3/AKT. A continuación se enlistan los principales hallazgos del estudio.

- El IMMUNEPOTENT CRP contiene exosomas con un tamaño promedio de 60 nm de diámetro.
- Los exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP no poseen efecto citotóxico en la línea celular de cáncer de mama 4T1.
- El suero sanguíneo derivado del tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP empleado para suplementar medio DMEM para incubar células vascular-endoteliales HUVEC promueve proliferación de estas células endoteliales vasculares.
- Las partes del IMMUNEPOTENT CRP, pellet y exosomas promueven proliferación en células HUVEC, HACAT y NIH-3T3.
- Los exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP pueden ser empleados como nanovectores de entrega de fármacos, ya que encapsulan insulina y la liberan controladamente en pH ácido o básico.
- Los exosomas y exosomas-insulina estimulan células HUVEC, NIH-3T3 Y HACAT para cerrar una herida en monocapa.
- El IMMUNEPOTENT CRP o sus partes aceleran el cierre de herida en ratones diabéticos hembra BALB/c.
- El IMMUNEPOTENT CRP o sus partes promueven la expresión de colágeno en el sitio de la herida en ratones diabéticos hembra BALB/c.
- Los exosomas aislados del IMMUNEPOTENT CRP aumentan el número de células en el sitio de herida.
- Los exosomas y exosomas-insulina aumentan el grueso del tejido de granulación, indicando un proceso de regeneración de herida.

- Los exosomas y exosomas-insulina presentan un aumento en el grueso de tejido epitelial en heridas de ratones diabético hembra BALB/c.
- El IMMUNEPOTENT CRP o sus partes aumentan el area del epitelio en heridas de ratones diabéticos hembra BALB/c.
- El IMMUNEPOTENT CRP o sus partes al aplicarse tópicamente en heridas diabéticas murinas modulan la expresión de citocinas pro-inflamatorias a la baja.
- El tejido perteneciente a las heridas tratadas con IMMUNEPOTENT CRP o sus partes promueven la fosforilación de AKT y FOXO con indicadores de la vía de proliferación, supervivencia y crecimiento celular PI3-AKT.

12.-PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

Se demostró que el IMMUNEPOTENT CRP y sus partes promueven el cierre de herida. Sin embargo, son necesarios más estudios para evaluar la angiogénesis inducida por los exosomas y corroborar estos resultados en úlceras de pie diabético humanas. Una de las limitaciones del estudio es la falta de aislamiento de los compuestos pertenecientes a cada una de las partes de la ICRP en términos de caracterización de cada una de los péptidos presentes. La perspectiva surge de aislar los péptidos y comprobar si los péptidos determinados *in silico* son responsables del efecto de cicatrización de las heridas cuando se administran. La alineación de la investigación con estudios anteriores refuerza los hallazgos y sugiere vías para una mayor exploración y posibles aplicaciones clínicas del producto.

13.-REFERENCIAS

1. Ayala JE, Bracy DP, McGuinness OP, Wasserman DH. 2006. Considerations in the design of hyperinsulinemic-euglycemic clamps in the conscious mouse. *Diabetes* 55(2), 390–397. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.02.06.db05-0686>
2. Bader AM, Brodarac A, Klose K, Bieback K, Choi YH, Kang KS, Kurtz A, Stamm C. 2014. Cord blood mesenchymal stromal cell-conditioned medium protects endothelial cells via STAT3 signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry* 34(3), 646–657. <https://doi.org/10.1159/000363030>
3. Bakadia BM, Qaed AA, Lamboni L, Shi Z, Mutu B, Zheng R, Pierre M, Zhang B, Gauthier M, Yang G. 2023. Engineering homologous platelet-rich plasma, platelet-rich plasma-derived exosomes, and mesenchymal stem cell-derived exosomes-based dual-crosslinked hydrogels as bioactive diabetic wound dressings. *Bioactive Materials* 28, 74–94. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.05.002>
4. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration* 16(5), 585-601.
5. Beer HD, Longaker MT, Werner S. 1997. Reduced expression of PDGF and PDGF receptors during impaired wound healing. *Journal of Investigative Dermatology* 109(2), 132–138. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12319188>
6. Bozhilova LV, Whitmore AV, Wray J, Reinert G, Deane CM. 2019. Measuring rank robustness in scored protein interaction networks. *BMC Bioinformatics* 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3036-6>
7. Brosius F. 2019. Low-Dose Streptozotocin Induction Protocol (Mouse) V2. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.8izhuf6>
8. Bruna-Gauchoux J, Montagnac G. 2022. Constraints and frustration in the clathrin-dependent endocytosis pathway. *Comptes Rendus. Biologies* 345(2), 43–56. <https://doi.org/10.5802/crbio1.88>
9. Cervio M, Del Fante C, Scudeller L, Viarengo G, Perotti C. 2013. Conditioned medium originated from lethally irradiated umbilical cord blood-derived mononuclear cells has different pro-angiogenic effects over mature and progenitor

- endothelial cells in vitro. *Blood* 122(21), 1068–1068.
<https://doi.org/10.1182/blood.v122.21.1068.1068>
10. Cha J, Kwak T, Butmarc J, Kim TA, Yufit T, Carson P, ..., Falanga V. 2008. Fibroblasts from non-healing human chronic wounds show decreased expression of β ig-h3, a TGF- β inducible protein. *Journal of dermatological science* 50(1), 15-23.
 11. Cohen MA, Eaglstein WH. 2001. Recombinant human platelet-derived growth factor gel speeds healing of acute full-thickness punch biopsy wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology* 45(6), 857–862.
<https://doi.org/10.1067/mjd.2001.117721>
 12. Cole JB, Florez JC. 2020. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nature reviews nephrology* 16(7), 377-390.
 13. Cruz-Pulido WL, Bladinieres-Cámara E, Alcalá-Durán R, Rivera-Sánchez G, Reyes-López MÁ, Bocanegra-García V. 2013. Infecciones en pie diabético: conceptos y consensos generales. *CienciaUAT* 8(1),11-17.
 14. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, Hu FB, Kahn CR, Raz I, Shulman GI, Simonson DC, Testa MA, Weiss R. 2015. Type 2 diabetes mellitus. *Nature reviews Disease primers* 1(1), 1-22.
 15. Dhamodharan U, Teena R, Vimal R, Changam SS, Ramkumar KM, Rajesh K. 2019. Circulatory levels of b-cell activating factor of the TNF family in patients with diabetic foot ulcer: Association with disease progression. *Wound Repair and Regeneration* 27(5), 442–449. <https://doi.org/10.1111/wrr.12720>
 16. Doyle L, Wang M. 2019. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells* 8(7), 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
 17. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. 2014. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine* 6(265), 265sr6-265sr6.
 18. ExoCarta. (n.d.). [Online]. Disponible en: http://exocarta.org/browse_results?org_name=Bos+taurus&cont_type=&tissue=&gene_symbol=

19. Falanga V. 2004. The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation. *Blood cells, Molecules, and Diseases* 32(1), 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2003.09.020>
20. Faustman DL, Davis M. (2010). Stem Cells in the spleen: Therapeutic potential for Sjogren's syndrome, type I diabetes, and other disorders. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42(10), 1576–1579. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.06.012>
21. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Castillo-León L, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2005. Bovine dialyzable leukocyte extract modulates the nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated murine peritoneal macrophages in vitro. *Journal of Medicinal Food* 8(1), 20–26. <https://doi.org/10.1089/jmf.2005.8.20>
22. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Coronado-Cerda EE, Zarate-Triviño D, Arizpe-Coronado JE, Zapata-Benavides P, Ramos-Zayas Y, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C. 2016. Clinical trial evaluating the effectiveness of biocompound immunepotent CRP in the third-molar extraction. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 31(1), 182–186. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1249408>
23. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Mir DF, Sierra-Rivera CA, Zapata-Benavides P, Vera-García ME, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C. 2011. Anti-inflammatory and antioxidant effects of IMMUNEPOTENT CRP in Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages. *African Journal of Microbiology Research* 5(22), 3726-3736.
24. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Miranda-Hernández D, Zapata-Benavides P, Castillo-León L, Isaza-Brando C, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2006. In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract (BDLE) in cancer cells. *Cytotherapy* 8(4), 408–414. <https://doi.org/10.1080/14653240600847266>
25. Franco-Molina MA, Santana-Krímskaya SE, Zarate-Triviño DG, Zapata-Benavides P, Hernández-Martínez SP, Cervante-Wong F, Rodríguez-Padilla C. 2021. Bovine Dialyzable Leukocyte Extract IMMUNEPOTENT CRP: Evaluation of Biological Activity of the Modified Product 11, 1-15. <https://doi.org/10.3390/app11083505>

26. Frykberg RG. 2002. Diabetic foot ulcers: pathogenesis and management. *American family physician* 66(9), 1655.
27. Furman BL. 2021. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current Protocols* 1(4). <https://doi.org/10.1002/cpz1.78>
28. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, Ostolaza H, Martín C. 2020. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences* 21(17), 6275. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
29. Gao W, He R, Ren J, Zhang W, Wang K, Zhu L, Liang T. 2021. Exosomal HMGB1 derived from hypoxia-conditioned bone marrow mesenchymal stem cells increases angiogenesis via the JNK/hif-1 α pathway. *FEBS Open Bio* 11(5), 1364–1373. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13142>
30. García Coronado, P. L., Franco Molina, M. A., Zárate Triviño, D. G., Menchaca Arredondo, J. L., Zapata Benavides, P., & Rodriguez Padilla, C. 2023. Putative wound healing induction functions of exosomes isolated from IMMUNEPOTENT CRP. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8971. <https://doi.org/10.3390/ijms24108971>
31. Gasca-Lozano LE, Lucano-Landeros S, Ruiz-Mercado H, Salazar-Montes A, Sandoval-Rodríguez A, Garcia-Bañuelos J, Santos-Garcia A, Davila-Rodriguez JR, Navarro-Partida J, Bojórquez-Sepúlveda H, Castañeda-Gomez J, Domínguez-Rosales J, Ruiz-Arcos MA, Sánchez-Parada MG, Armendariz-Borunda J. 2017. Pirfenidone accelerates wound healing in chronic diabetic foot ulcers: A randomized, double-blind controlled trial. *Journal of Diabetes Research* 1–12. <https://doi.org/10.1155/2017/3159798>
32. Gazze SA, Thomas SJ, Garcia-Parra J, James DW, Rees P, Marsh-Durban V, Corteling R, Gonzalez D, Conlan RS, Francis LW. 2021. High content, quantitative AFM analysis of the scalable biomechanical properties of extracellular vesicles. *Nanoscale* 13, 6129–6141.
33. Gianino E, Miller C, Gilmore J. 2018. Smart wound dressings for diabetic chronic wounds. *Bioengineering* 5(3), 51. <https://doi.org/10.3390/bioengineering5030051>

34. Greenhalgh DG, Sprugel KH, Murray MJ, Ross R. 1990. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *Am J Pathol Jun*;136(6):1235-46. PMID: 2356856; PMCID: PMC1877595.
35. Griffin, D. R., Archang, M. M., Kuan, C. H., Weaver, W. M., Weinstein, J. S., Feng, A. C., et al. 2021. Activating an adaptive immune response from a hydrogel scaffold imparts regenerative wound healing. *Nat. Mat.* 20, 560–569. doi:10.1038/s41563-020-00844-w
36. Gurunathan S, Kang MH, Kim JH. 2021. A comprehensive review on factors influences biogenesis, functions, therapeutic and clinical implications of exosomes. *International Journal of Nanomedicine Volume 16*, 1281–1312. <https://doi.org/10.2147/ijn.s291956>
37. Han X, Wu P, Li L, Sahal HM, Ji C, Zhang J, Wang Y, Wang Q, Qian H, Shi H, Xu W. 2021. Exosomes derived from autologous dermal fibroblasts promote diabetic cutaneous wound healing through the AKT/ β -catenin pathway. *Cell Cycle* 20(5–6), 616–629. <https://doi.org/10.1080/15384101.2021.1894813>
38. Hoogduijn MJ, Crop MJ, Peeters AMA, Van Osch GJVM, Balk AHMM, Ijzermans JNM, Weimar W, Baan CC. 2007. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells and Development* 16(4), 597–604. <https://doi.org/10.1089/scd.2006.0110>
39. Hu L, Wang J, Zhou X, Xiong Z, Zhao J, Yu R, Huang F, Zhang H, Chen L. 2016. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Scientific Reports* 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep32993>
40. IDF. International Diabetes Federation. (2024, February 7). *Datos y cifras*. [Online] Disponible en: <https://idf.org/es/about-diabetes/diabetes-facts-figures/>
41. INEGI. (2021, November 12). Estadísticas a propósito del Día Mundial de la Diabetes (14 ... - INEGI. [Online] Retrieved November 13, 2022, Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/EAP_Diabetes2021.pdf

42. Jere SW, Houreld NN, Abrahamse H. 2022. Photobiomodulation activates the PI3K/Akt pathway in diabetic fibroblast cells in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 237, 112590. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112590>
43. Juncan AM, Moisă DG, Santini A, Morgovan C, Rus LL, Vonica-Țincu AL, Loghin F. 2021. Advantages of hyaluronic acid and its combination with other bioactive ingredients in cosmeceuticals. *Molecules* 26(15), 4429. <https://doi.org/10.3390/molecules26154429>
44. Kämpfer H, Paulukat J, Mühl H, Wetzler C, Pfeilschifter J, Frank S. 2000. Lack of interferon- γ production despite the presence of interleukin-18 during cutaneous wound healing. *Molecular Medicine* 6(12), 1016–1027. <https://doi.org/10.1007/bf03402053>
45. Kanno E, Tanno H, Masaki A, Sasaki A, Sato N, Goto M, Shisai M, Yamaguchi K, Takagi N, Shoji M, Kitai Y, Sato K, Kasamatsu J, Ishii K, Miyasaka T, Kawakami K, Imai Y, Iwakura Y, Maruyama R, ... Kawakami K. 2019. Defect of interferon γ leads to impaired wound healing through prolonged neutrophilic inflammatory response and enhanced MMP-2 activation. *International Journal of Molecular Sciences* 20(22), 5657. <https://doi.org/10.3390/ijms20225657>
46. Kim MH, Chung C, Oh MH, Jun JH, Ko Y, Lee JH. 2021. Extracellular vesicles from a three-dimensional culture of perivascular cells accelerate skin wound healing in a rat. *Aesthetic Plastic Surgery* 45(5), 2437–2446. <https://doi.org/10.1007/s00266-021-02254-y>
47. Korzon-Burakowska A, Dziemidok P. 2011. Diabetic foot - the need for comprehensive multidisciplinary approach. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 18(2):314
48. Kwok ZH, Wang C, Jin Y. 2021. Extracellular vesicle transportation and uptake by recipient cells: A critical process to regulate human diseases. *Processes* 9(2), 273. <https://doi.org/10.3390/pr9020273>
49. Las Heras K, Igartua M, Santos-Vizcaino E, Hernandez RM. 2020. Chronic wounds: Current status, available strategies and emerging therapeutic solutions. *Journal of Controlled Release* 328, 532-550.

50. Le T, Bhushan V. 2016. First Aid for the USMLE Step 1 2016. New York, NY: McGraw Hill; 2016
51. Lee M, Han SH, Choi WJ, Chung KH, Lee JW. 2016. Hyaluronic acid dressing (Healoderm) in the treatment of diabetic foot ulcer: A prospective, randomized, placebo-controlled, single-center study. *The International Journal of Tissue Repair and Regeneration* 24(3), 581-588. <https://doi.org/10.1111/wrr.12428>
52. Li B, Luan S, Chen J, Zhou Y, Wang T, Li Z, Fu Y, Zhai A, Bi C. 2020. The MSC-derived exosomal lncRNA H19 promotes wound healing in diabetic foot ulcers by upregulating pten via MicroRNA-152-3p. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 19, 814–826. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.11.034>
53. Li B, Luan S, Chen J, Zhou Y, Wang T, Li Z, Fu Y, Zhai A, Bi C. 2019. The MSC-Derived Exosomal lncRNA H19 Promotes Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers by Upregulating PTEN via MicroRNA-152-3p. *American Society of Gene & Cell Therapy* 19, 814-826. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.11.034>
54. Li X. 2018. The association between MCP-1, VEGF polymorphisms and their serum levels in patients with diabetic foot ulcer. *Medicine* 97(24). <https://doi.org/10.1097/md.0000000000010959>
55. Li Y, Lyu P, Ze Y, Li P, Zeng X, Shi Y, Qiu B, Gong P, Yao Y. 2021. Exosomes derived from plasma: Promising immunomodulatory agents for promoting angiogenesis to treat radiation-induced vascular dysfunction *PeerJ*, 9. <https://doi.org/10.7717/peerj.11147>
56. Liang ZH, Pan NF, Lin SS, Qiu ZY, Liang P, Wang J, Zhang Z, Pan YC. 2022. Exosomes from MMU_CIRC_0001052-modified adipose-derived stem cells promote angiogenesis of DFU via mir-106a-5p and FGF4/p38mapk pathway. *Stem Cell Research & Therapy* 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03015-7>
57. Liangsupree, T., Multia, E., & Riekkola, M.-L. 2021. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. *Journal of Chromatography A*, 1636, 461773. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461773>
58. Martin P, Nunan R. 2015. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *British Journal of Dermatology* 173(2), 370-378.

59. Matias MA, Saunus JM, Ivanovski S, Walsh LJ, Farah CS. 2011. Accelerated wound healing phenotype in Interleukin 12/23 deficient mice. *J Inflamm (Lond)* 20;8:39. doi: 10.1186/1476-9255-8-39. PMID: 22185520; PMCID: PMC3296624.
60. McArdle C, Lagan K, Spence S, McDowell D. 2015. Diabetic foot ulcer wound fluid: The effects of ph on DFU bacteria and infection. *Journal of Foot and Ankle Research* 8(S1). <https://doi.org/10.1186/1757-1146-8-s1-a8>
61. McCraw, D. M., Gallagher, J. R., & Harris, A. K. 2016. Characterization of influenza vaccine hemagglutinin complexes by Cryo-electron microscopy and image analyses reveals structural polymorphisms. *Clinical and Vaccine Immunology*, 23(6), 483–495. <https://doi.org/10.1128/cvi.00085-16>
62. Nanda R, Patel S, Ghosh A, KS A, Mohapatra E. 2022. A study of Apolipoprotein A1(APOA1) and interleukin-10(il-10) in diabetes with foot ulcers. *BioMedicine* 12(1), 30–38. <https://doi.org/10.37796/2211-8039.1279>
63. NIDDK. (2011, September). *Neuropatías Diabéticas: El Daño de los nervios en español - NIDDK*. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. [Online] Disponible en: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/diabetes/informacion-general/prevenir-problemas/neuropatias-diabeticas>
64. Ong KL, Stafford LK, McLaughlin SA, Boyko EJ, Vollset SE, Smith AE, Dalton BE, Duprey J, Cruz JA, Hagins H, Lindstedt PA, Aali A, Abate YH, Abate MD, Abbasian M, Abbasi-Kangevari Z, Abbasi-Kangevari M, Abd ElHafeez S, Abd-Rabu R, ... Vos T. 2023. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: A systematic analysis for the global burden of disease study 2021. *The Lancet* 402(10397), 203–234. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(23\)01301-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(23)01301-6)
65. Oslo University Hospital. n.d.. Ouh - cancer genome variation. <https://ous-research.no/kristensen/>
66. Park KH, Kwin JB, Park JH, Shin JC, Han SH, Lee JW. 2019. Collagen dressing in the treatment of diabetic foot ulcer: A prospective, randomized, placebo-controlled, single-center study. *Diabetes Research and Clinical Practice* DOI: [10.1016/j.diabres.2019.107861](https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107861)

67. Patel S, Srivastava S, Singh MR, Singh D. 2019. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 112, 108615.
68. Rashidi M, Bijari S, Khazaei AH, Shojaei-Ghahrizjani F, Rezakhani L. 2022. The role of milk-derived exosomes in the treatment of diseases. *Frontiers in Genetics* 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1009338>
69. Reyes-Ruiz A, Calvillo-Rodriguez KM, Martínez-Torres AC, Rodríguez-Padilla C. 2021. The bovine dialysable leukocyte extract immunepotent CRP induces immunogenic cell death in breast cancer cells leading to long-term antitumour memory. *British Journal of Cancer* 124(8), 1398–1410. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01256-y>
70. Rezakhani L, Alizadeh M, Sharifi E, Soleimannejad M, Alizadeh A. 2021. Isolation and characterization of crab haemolymph exosomes and its effects on breast cancer cells (4T1). *Cell J.* 23(6): 658-664. doi: 10.22074/cellj.2021.7595
71. Roberts AD, Simon GL. 2012. Diabetic foot infections: the role of microbiology and antibiotic treatment. In *Seminars in vascular surgery* 25, 2, pp. 75-81. WB.
72. Santana-Krímiskaya SE, Franco-Molina MA, Zárate-Triviño DG, Prado-García H, Zapata-Benavides P, Torres-del-Muro F, Rodríguez-Padilla C. 2020. IMMUNEPOTENT CRP Plus doxorubicin/cyclophosphamide chemotherapy remodel the tumor microenvironment in an air pouch triple-negative breast cancer murine model. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 126, 110062. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110062>
73. Semadi NI. 2019. The Role of VEGF and TNF-Alpha on Epithelialization of Diabetic Foot Ulcers after Hyperbaric Oxygen Therapy. *Open Access Maced J Med Sci* 7(19):3177-3183. doi: 10.3889/oamjms.2019.297. PMID: 31949512; PMCID: PMC6953952.
74. Shamah-Levy T, Vielma-Orozco E, Heredia-Hernández O, Romero-Martínez M, Mojica-Cuevas J, Cuevas-Nasu L, Santaella-Castell JA, Rivera-Dommarco J. 2020. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2020.

75. Short WD, Steen E, Kaul A, Wang X, Olutoye OO, Vangapandu HV, Templeman N, Blum AJ, Moles CM, Narmoneva DA, Crombleholme TM, Butte MJ, Bollyky PL, Keswani SG, Balaji S. 2022. IL-10 promotes endothelial progenitor cell infiltration and wound healing via STAT3. *The FASEB Journal* 36(7). <https://doi.org/10.1096/fj.201901024rr>
76. Stessuk T, Puzzi MB, Chaim EA, Alves PC, de Paula EV, Forte A, Izumizawa JM, Oliveira CC, Frei F, Ribeiro-Paes JT. 2016. Platelet-rich plasma (PRP) and adipose-derived mesenchymal stem cells: Stimulatory effects on proliferation and migration of fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Archives of Dermatological Research* 308(7), 511–520. <https://doi.org/10.1007/s00403-016-1676-1>
77. Tesch GH, Allen TJ. 2007. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy (Methods in Renal Research). *Nephrology* 12(3), 261-266.
78. UCSF. (2012, July 4). El azúcar en sangre y otras hormonas. *Diabetes Education* [Online]. Disponible en: <https://dte.ucsf.edu/es/tipos-de-diabetes/diabetes-tipo-2/compreension-de-la-diabetes-tipo-2/como-procesa-el-azucar-el-cuerpo/el-azucar-en-sangre-y-otras-hormonas/>
79. Van de Vyver M, Boodhoo K, Frazier T, Hamel K, Kopcewicz M, Levi B, Maartens M, Machcinska S, Nunez J, Pagani C, Rogers E, Walendzik K, Wisniewska J, Gawronska-Kozak B, Gimble JM. 2021. Histology scoring system for murine cutaneous wounds. *Stem Cells and Development* 30(23), 1141–1152. <https://doi.org/10.1089/scd.2021.0124>
80. 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, 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.120>
81. Wang J, Wu H, Peng Y, Zhao Y, Qin Y, Zhang Y, Xiao Z. 2021. Hypoxia adipose stem cell-derived exosomes promote high-quality healing of diabetic wound involves activation of PI3K/AKT PATHWAYS. *Journal of Nanobiotechnology* 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00942-0>
82. Wang P, Wang H, Huang Q, Peng C, Yao L, Chen H, Qiu Z, Wu Y, Wang L, Chen W. 2019. Exosomes from M1-polarized macrophages enhance paclitaxel antitumor

- activity by activating macrophages-mediated inflammation. *Theranostics* 9(6), 1714–1727. <https://doi.org/10.7150/thno.30716>
83. Wang X. (2022, December 1). [Online] Aplicaciones terapéuticas Y diagnósticas de los exosomas: El Camino Para Llegar a Ser Gigantes clínicos. CAS. Disponible en: [https://www.cas.org/es-es/resources/cas-insights/drug-discovery/exosome-therapy-and-diagnostics-path-becoming-clinical-giants#:~:text=Los%20exosomas%20tienen%20adem%C3%A1s%20un,se%20representan%20\(figura%204\)](https://www.cas.org/es-es/resources/cas-insights/drug-discovery/exosome-therapy-and-diagnostics-path-becoming-clinical-giants#:~:text=Los%20exosomas%20tienen%20adem%C3%A1s%20un,se%20representan%20(figura%204)).
84. Wang Y, Zhu J, Chen J, Xu R, Groth T, Wan H, Zhou G. 2022. The signaling pathways induced by exosomes in promoting diabetic wound healing: A mini-review. *Current Issues in Molecular Biology* 44(10), 4960–4976. <https://doi.org/10.3390/cimb44100337>
85. Wetzler C, Kämpfer H, Stallmeyer B, Pfeilschifter J, Frank S. 2000. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: Prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *Journal of Investigative Dermatology* 115(2), 245–253. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00029.x>
86. Wood S, Jayaraman V, Huelsmann EJ, Bonish B, Burgad D, Sivaramakrishnan G, Qin S, DiPietro LA, Zloza A, Zhang C, Shafikhani SH. 2014. Pro-inflammatory chemokine CCL2 (MCP-1) promotes healing in diabetic wounds by restoring the macrophage response. *PLoS ONE* 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091574>
87. Yang C, Luo L, Bai X, Shen K, Liu K, Wang J, Hu D. 2020. Highly-expressed microrna-21 in adipose derived stem cell exosomes can enhance the migration and proliferation of the HACAT cells by increasing the MMP-9 expression through the PI3K/akt pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 681 108259. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108259>
88. Yang J, Chen Z, Pan D, Li H, Shen J. 2020. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-derived exosomes combined pluronic F127 hydrogel promote chronic diabetic wound healing and complete skin regeneration. *International Journal of Nanomedicine* Volume 15, 5911–5926. <https://doi.org/10.2147/ijn.s249129>

89. Yue Y, Wang C, Benedict C, Huang G, Truongcao M, Roy R, Cimini M, Garikipati VN, Cheng Z, Koch WJ, Kishore R. 2020. Interleukin-10 deficiency alters endothelial progenitor cell–derived exosome reparative effect on myocardial repair via integrin-linked kinase enrichment. *Circulation Research* 126(3), 315–329. <https://doi.org/10.1161/circresaha.119.315829>
90. Zhang J, Guan J, Niu X, Hu G, Guo S, Li Q, Xie Z, Zhang C, Wang Y. 2015. Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived mscs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis. *Journal of Translational Medicine* 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0417-0>
91. Zhang L, Yu D. 2019. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1871(2):455-468. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.04.004. PMID: 31047959; PMCID: PMC6542596.
92. Zhang T, Li D, Wang Y, Zhang C, Yang W, Gao G. 2023. Delivering umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes through hydrogel ameliorates vaginal atrophy in ovariectomized rats. *Aging* 15(23), 14292–14305. <https://doi.org/10.18632/aging.205302>
93. Zhang W, Bai X, Zhao B, Li Y, Zhang Y, Li Z, Wang X, Luo L, Han F, Zhang J, Han S, Cai W, Su L, Tao K, Shi J, Hu D. 2018. Cell-free therapy based on adipose tissue stem cell-derived exosomes promotes wound healing via the PI3K/akt signaling pathway. *Experimental Cell Research* 370(2), 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.06.035>
94. Zubair M, Ahmad J. 2019. Role of growth factors and cytokines in diabetic foot ulcer healing: a detailed review. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 20(2), 207-217.