

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE LOS VALLES



NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOPORTADAS EN MICROESFERAS DE ÓXIDO DE SILICIO (SiO_2) PARA REPARACIÓN DE HERIDAS DÉRMICAS EXPERIMENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS FISICO
MATEMÁTICAS ORIENTACIÓN NANOCIENCIAS

Presenta

M. en F. MARIA ISABEL MANZO RIOS

Director de Tesis

Dra. IRINEA YAÑEZ SÁNCHEZ

Ameca, Jal., Mayo 2018

AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), que a través del Programa Nacional de Posgrados de Calidad me fue otorgada la beca con número 293744, para la realización de mis estudios de posgrado.
- Al programa de Doctorado en Ciencias Físico Matemáticas, del Centro Universitario de los Valles, de la Universidad de Guadalajara inscrito en el PNPC-CONACyT, pues en sus aulas y laboratorios me forme con conocimientos y habilidades como futuro investigador.
- A la Red de Cuerpos Académicos “Diseño Nanoscópico y Textural de Materiales Avanzados” en especial al CA-UDG-583 “Ciencia de nanomateriales y materia condensada”, por el apoyo brindado para culminar con éxito esta meta.
- Al Centro de Investigación en Nanociencias y Nanotecnología del Centro Universitario de los Valles de la Universidad de Guadalajara, sede donde se llevó a cabo este trabajo.
- Al Laboratorio de Patología (Investigación) del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara, sede donde se llevó a cabo este trabajo.

...Hay un tiempo señalado para todo, un tiempo para cada suceso y para lo que hacemos a lo largo de la vida, por ejemplo tiempo de sembrar y después el tiempo de cosechar, y hoy es tiempo de agradecer y escribir estas líneas...

Agradezco a la Dra. Irinea Yañez Sánchez, por aceptar ser mi Directora de tesis y por su gran dedicación para la culminación de este proyecto y sobre todo por todas las enseñanzas académicas y profesionales.

Al Dr. Celso Velásquez Ordoñez por su apoyo incondicional como Coordinador del Programa del Posgrado, por su atención y sabiduría para direccionarme como estudiante de este programa.

A cada uno de mis sinodales por cada aportación realizada a este trabajo de tesis.

A la Dra. María Luisa Ojeda Martínez, por compartir sus conocimientos de síntesis y caracterización de materiales.

Especialmente agradezco el apoyo brindado profesionalmente y la amistad que ha surgido por este proyecto con Iris y Javier, agradezco cada palabra de aliento y de superación, así como por todos los consejos que me han dado como Doctores y como matrimonio, de verdad son un gran ejemplo a seguir en todos los sentidos.

Así mismo, agradezco a todo el personal del Laboratorio de Patología, en especial a L.N. Elda C. Villaseñor Tapia, por el apoyo técnico brindado para la culminación de los experimentos de este trabajo.

Por último, quiero agradecer:

... al tiempo y espacio que me dio la oportunidad de culminar este "*pendiente*" profesional, y que con ello pude conocer a gente maravillosa en este camino.

...a mi amada familia, por el apoyo brindado sobre todo en esta última etapa, a mis padres por caminar conmigo cada etapa de mi vida con amor y alegría; a mis hermanas por ser lindas, sencillas por escucharme y comprenderme.

...y a mis amigos, por esa fe que depositaron en mí !!

...Gracias a ese ser Omnipotente ...

Finalmente puedo decir, infinitas GRACIAS a esta hermosa vida que me ha dado muchas satisfacciones académicas, profesionales y personales.



INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	i
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE CUADROS	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
MARCO TEÓRICO	5
CICATRIZACIÓN	5
Generalidades	5
Etiología de las heridas	6
Epidemiología de cicatrización	7
Etapas de la cicatrización	10
Cicatrices patológicas.....	22
Moléculas de interés involucradas en las etapas en la reparación tisular....	24
NANOCIENCIAS, NANOTECNOLOGÍA Y NANOMEDICINA	27
Generalidades	27
Aplicaciones de nanomateriales	34
NANOMATERIALES EN REPARACIÓN DÉRMICA.	36
AgNPs.....	39
SiO ₂	43
Toxicidad de nanomateriales: AgNPs y MSiO ₂	46
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	49
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	49
JUSTIFICACIÓN	50



HIPÓTESIS	51
OBJETIVOS	51
General	51
Particulares	51
MÉTODOS EXPERIMENTALES	52
Diagrama experimental	52
Síntesis de nanopartículas de plata coloidal AgNPs	52
Síntesis del nanocompuesto de MSiO ₂ -AgNPs.....	53
Caracterización del nanocompuesto de MSiO ₂ -AgNPs.....	53
Diseño experimental en el modelo animal.....	54
Modelo experimental	54
Consideraciones éticas:	55
Evolución macroscópica de la lesión tisular	55
Valoración histológica.....	56
Determinación inmunohistoquímica	57
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
UV-VIS.....	60
HRTEM.....	61
FTIR.....	63
Evolución macroscópica de la lesión tisular	64
Valoración histológica.....	65
Determinación inmunohistoquímica	68
CONCLUSIONES	75
PERSPECTIVAS	76
BIBLIOGRAFIA	77
ANEXOS	89
ANEXO A: NANOPARTICULAS	89



Generalidades	89
Características particulares	90
Métodos de síntesis	92
Caracterización de nanopartículas	96
ANEXO B: Copa de Licurgo	104
ANEXO C: Preparación de soluciones	107
ANEXO D: Producción del trabajo	109



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferencias en los dos tipos de herida y su progreso hasta la cicatrización.	7
Figura 2. Incidencias de accidentes en México y Jalisco.	9
Figura 3. Gráfica de procesos fisiológicos en la cicatrización.	11
Figura 4. Etapas en la cicatrización: hemostasia	12
Figura 5. Etapas en la cicatrización: inflamación.....	14
Figura 6. Etapas en la cicatrización: formación de tejido de granulación.....	17
Figura 7. Etapas en la cicatrización: contracción	19
Figura 8. Etapas en la cicatrización: reparación.....	20
Figura 9. Cicatrices patológicas.....	23
Figura 10. Métrica de objetos.	28
Figura 11. Geometrías de la nanopartículas.	29
Figura 12. Reacción para la formación del ácido silícico.....	44
Figura 13. Esquema general de hidratación y deshidratación de los tejidos.....	56
Figura 14. Espectro de absorción de las nanoestructuras de MSiO ₂ -AgNPs.....	60
Figura 15. Gráfica con la distribución del tamaño de partícula de las AgNPs.....	61
Figura 16. Microfotografías por HRTEM.....	62
Figura 17. Espectro FTIR.	64
Figura 18. Progreso de la herida realizada, antes y después del tratamiento.....	65
Figura 19. Tinciones TM, H&E, RS.....	67
Figura 20. Inmunohistoquímica para IL-6.	68
Figura 21. Inmunohistoquímica para IL-6 (2).....	69
Figura 22. Inmunohistoquímica para TNF α	70
Figura 23. Inmunohistoquímica para PCNA.	71
Figura 24. Inmunohistoquímica para α SMA	72
Figura 25. Inmunohistoquímica para VEGF.	73
Figura 26. Relación superficie volumen.....	90



Figura 27. Variación del porcentaje átomos interiores/superficiales con respecto al tamaño de la nanopartícula.	91
Figura 28. Esquemas de procesos de síntesis de nanopartículas	92
Figura 29. Métodos físicos y químicos.	93
Figura 30. Principales técnicas de caracterización de materiales.	97
Figura 31. Técnicas de caracterización de nanopartículas.	98
Figura 32. Esquemas de un espectrofotómetro UV-Vis.	99
Figura 33. Esquema de un espectrofotómetro de doble haz de radiación infrarroja.....	101
Figura 34. Esquema y fotografía de un microscopio electrónico de transmisión (TEM).....	103
Figura 35. Copa de Licurgo	105
Figura 36. Línea del tiempo de la Nanotecnología.	106

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Incidencia de intervenciones quirúrgicas por cada 1000 pacientes.....	8
Cuadro 2. Células implicadas en la regeneración cutánea.	10
Cuadro 3. Factores de crecimiento y citocinas proinflamatorias y su actividad en la cicatrización cutánea.	21
Cuadro 4. Clasificación de cicatrices, de acuerdo a la escala de Vancouver.	22
Cuadro 5. Ejemplos de algunos campos donde está presente la nanociencia. ..	28
Cuadro 6. Clasificación de los materiales precursores de nanopartículas.	30
Cuadro 7. Productos a nivel nacional para el tratamiento de heridas.	38
Cuadro 8. Anticuerpos primarios utilizados en las inmunohistoquímicas.....	58
Cuadro 9. Kits de revelado para las inmunohistoquímicas.....	59



ABREVIATURAS

αSMA	α (alfa) actina de músculo liso del inglés <i>α-smooth muscle actin</i>
ABC	Complejo de avidina-biotina del inglés <i>avidin-biotine complex</i>
AFM	Microscopía de fuerza atómica del inglés <i>atomic force microscope</i>
ADN (DNA)	Ácido desoxirribonucleico
AgNPs	Nanopartículas de plata
ARN (RNA)	Ácido ribonucleico
bFGF	Factor de crecimiento básico de fibroblastos del inglés <i>basic fibroblast growth factor</i>
CVD	Depósito químico en fase vapor del inglés <i>chemical vapor deposition</i>
DAB	Diamino bencidina
DLS	Dispersión de luz dinámica del inglés <i>dynamic light scattering</i>
EDS	Espectrometría de dispersión de energía de rayos X, del inglés <i>energy dispersive spectroscopy</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico del inglés <i>epidermal growth factor</i>
FDA	Regulación para la administración de fármacos y alimentos del inglés <i>Food and Drugs Administration</i>
FTIR	Infrarrojo con transformada de Fourier del inglés <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
GP130	Glicoproteína 130
HDF	Fibroblastos dérmicos humanos del inglés <i>human dermal fibroblasts</i>
HRTEM	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución del inglés <i>high-resolution transmission electron microscopy</i>



H&E	Hematoxilina y eosina
IGF	Factor de crecimiento de tipo insulina del inglés <i>insulin-like growth factor</i>
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-6R	Receptor de IL-6
IMSS	Instituto mexicano del seguro social
INEGI	Instituto nacional de estadística y geografía
IR	Infrarrojo
kDa	Kilodaltones
keV	Kiloelectronvoltio
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos del inglés <i>keratinocyte growth factor</i>
LSPR	Resonancia del plasmón de superficie localizado del inglés <i>localized surface plasmon resonance</i>
MEC	Matriz extracelular
mM	Milimolar
MMP-1	Metaloproteinasa-1 (colagenasa)
MMP-2	Metaloproteinasa-2 (gelatinasa)
MMP-8	Metaloproteinasa-8 (estromelisina)
MMP-9	Metaloproteinasa-9 (colagenasa tipo IV)
MSiO ₂	Microesferas de óxido de silicio
MSiO ₂ -AgNPs	Nanopartículas de plata soportadas en microesferas de óxido de silicio
NCBI	Centro nacional de información biotecnológica del inglés <i>National Center of Biotechnology Information</i>
NEMS	Sistemas nanoelectromecánicos del inglés <i>nanoelectromechanical systems</i>



nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
NPs	Nanopartículas
NPSiO ₂	Nanopartículas de óxido de silicio
OMS	Organización mundial de la salud
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular del inglés <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas del inglés <i>platelet-derived growth factor</i>
PF-4	Factor plaquetario 4 del inglés <i>platelet factor 4</i>
PLM	Productos de laboratorios médicos: diccionario de especialidades médicas
PVP	Polivinil-pirrolidona
RS	Rojo sirio
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno del inglés <i>reactive oxygen species</i>
RX	Rayos X
SEM	Microscopía electrónica de barrido del inglés <i>scanning electron microscope</i>
sIL-6R	Receptor soluble de IL-6
Si-O	Enlace silóxido
Si-OH	Enlace silanol
Si-O-Si	Enlace siloxano
Smad	Del inglés <i>small mothers against decantaplegic</i>
SPR	Resonancia del plasmón de superficie del inglés <i>surface plasmon resonance</i>



STM	Microscopia de efecto túnel del inglés <i>scanning tunneling microscope</i> .
TBS	Buffer tris de fosfatos
TBST	Buffer tris de fosfatos con tween 20
TEM	Microscopia electrónica de transmisión del inglés <i>transmission electron microscope</i> .
TGF β	Factor de crecimiento transformante β (beta) del inglés <i>transforming growth factor-beta</i> .
TIMP	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas del inglés <i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i> .
TM	Tricrómica de Masson
TNF-R-I	Receptor I del factor de necrosis tumoral
TNF-R-II	Receptor II del factor de necrosis tumoral
TNF α	Factor de necrosis tumoral α (alfa) del inglés <i>tumor necrosis factor</i> .
UV-VIS	Espectroscopía de luz ultravioleta-visible
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular del inglés <i>vascular endothelial growth factor</i> .



RESUMEN

En la reparación del tejido, que ha sufrido una lesión, se ven involucradas diferentes etapas como hemostasia, inflamación, formación de tejido de granulación, contracción de la herida y reparación. En la respuesta fisiológica a este proceso, participan diferentes estirpes celulares, como: epiteliales, fibroblastos y queratinocitos, así mismo, intervienen citocinas proinflamatorias, proteínas relacionadas a la proliferación, algunas que actúan como marcadores de linaje celular específico de fibroblastos y/o miofibroblastos y otras más de la angiogénesis.

Por su parte, la Nanomedicina (aplicación de la Nanotecnología en las áreas médicas), ha tenido gran participación en los últimos años. Derivado de ello, el uso de nanopartículas de plata además de presentar propiedades antimicrobianas, se ha demostrado con estudios recientes, que tienen propiedades antiinflamatorias.

Se utilizaron AgNPs de 3 nm -en promedio- soportadas en microesferas de SiO₂ de 300 nm; la presencia de plata en la microesfera, se evidencio a través de espectroscopia UV-Vis con absorción a 426 nm. Estudios de FTIR mostraron la presencia de los grupos funcionales OH, Si-O-Si y Si-OH; por su parte en HRTEM se observó la formación del nanocompuesto.

Al analizar los resultados obtenidos después del uso del nanocompuesto en el modelo experimental del proceso de regeneración tisular, se visualizó una evidente mejoría en el grupo tratado con el nanocompuesto en comparación con el grupo sham, no solo macroscópicamente, sino también histológicamente, ya que se observó disminución del infiltrado inflamatorio (tinción hematoxilina-eosina); presencia de tejido sano (tinción tricrómica de Masson) e intensificación del colágeno denso (tinción de rojo sirio). Dentro de los aspectos moleculares analizados, se observó que la expresión de citocinas proinflamatorias



(interleucina 6 y factor de necrosis tumoral α) se vieron disminuidas, lo que indica que la etapa inflamatoria esta atenuada. Aunado a lo anterior, se identificó aumento en la expresión del antígeno de proliferación celular, el cual se hace presente durante la replicación celular, así como en la α -actina de músculo liso, la cual está presente en los miofibroblastos, éstos son importantes para que el proceso de cicatrización se lleve a cabo y ayudar al acercamiento de los bordes de la herida. Finalmente la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular señaló el progreso de la angiogénesis y se identificó la formación de vasos sanguíneos. Los resultados aquí reportados otorgan una perspectiva para la aplicación de nanocompuestos formados por AgNPs soportadas en microesferas de SiO₂ en la terapia de heridas dérmicas.



ABSTRACT

In wound healing process, different stages are involved such as hemostasia, inflammation, granulation tissue formation, wound contraction, epithelization and vascularization. In the physiological response to this process different cell lines participate, such as: epithelial, fibroblasts and keratinocytes, as well as proinflammatory cytokines, proteins related to cell proliferation, some of which act as markers of cell lineage, specific for fibroblasts/myofibroblasts, and other for angiogenesis.

For its part, nanomedicine (application of nanotechnology in medical areas), have had great participation in recent years. Derived from this the use of silver nanoparticles, in addition to presenting antimicrobial properties, recent studies have shown its anti-inflammatory properties.

AgNPs of 3 nm - on average - supported on SiO₂ microspheres of 300 nm were used in the experimental model; the presence of silver supported in the microsphere was evidenced by UV-Vis spectroscopy with absorption at 426 nm. FTIR studies showed the presence of the OH, Si-O-Si and Si-OH functional groups; for its part in HRTEM the formation of the nanocomposite was observed.

After the use of the nanocomposite in the experimental model of the tissue regeneration process, we observed an evident improvement in the group treated with the nanocomposite compared to the sham group, not only macroscopically, but also histologically, since observed decreased inflammatory infiltrate (hematoxylin-eosin staining); presence of healthy tissue (Masson's trichrome stain) and intensification of dense collagen (sirius red staining). Within the molecular aspects analyzed, it was observed that the expression of proinflammatory cytokines (interleukin 6 and tumor necrosis factor α) were diminished, which indicates that the inflammatory stage is attenuated. In addition to this, there was an increase in the expression of cell proliferation antigen, which



is present during cell replication, as well as in α -smooth muscle actin, which is present in myofibroblasts, these are important for the healing process is carried out and help the approach of the edges of the wound. Finally, the expression of vascular endothelial growth factor indicated the progress of angiogenesis and the formation of blood vessels was identified. The results reported here provide a perspective for the application of nanocomposites formed by AgNPs supported in SiO₂ microspheres in the therapy of dermal wounds.



MARCO TEÓRICO

CICATRIZACIÓN

Generalidades

La palabra cicatriz proviene del latín *cicatrix*, *-trix*, que indica herida, desgarro, escoriación y también vulgarmente hace referencia al "zurcido". La lengua española nos define este término como: señal que queda en los tejidos orgánicos después de curada una herida o una llaga. La medicina ha acuñado esta definición: señal que deja en la piel la formación de tejido que llena o reúne las soluciones de continuidad producidas por heridas (RAE, 2018).

Después de presentarse una lesión dérmica se forma una herida y el proceso de curación se desencadena de manera inmediata. De acuerdo al tipo de herida, la epidermis y la dermis pueden quedar lastimadas y/o devastadas y tienen que ser restauradas por medio de la reparación de la herida. Esta reparación es un proceso complejo, en donde la curación de la herida es una cascada de eventos regulados rigurosamente, en los que se involucra una respuesta vascular y coagulación de la sangre, al que le sigue un proceso inflamatorio, la formación de tejido de granulación o de reparación de la dermis, seguida de la formación de una nueva epidermis conocido como epitelización y finalmente el remodelado del tejido cicatricial, el cual puede llevar un periodo de tiempo largo (Arenas, 2003).

Las heridas producidas sobre la piel interrumpen la continuidad anatómica y celular de los tejidos, al dañar las funciones fisiológicas. La reparación de las heridas es un proceso biológico complejo y de gran importancia, que tiene por objetivo restaurar la integridad del tejido y en consecuencia sus funciones corporales (Arenas, 2003).

Por otro lado, la falta de continuidad celular y tisular propicia regiones expuestas que son vulnerables a infecciones por microorganismos. La



finalización coordinada de los eventos bioquímicos presentes en la regeneración es necesaria para lograr la hemostasia, la reconstrucción exitosa del tejido, y la cicatrización de la piel (Arenas, 2003).

Etiología de las heridas

Las heridas dérmicas son de dos tipos, las que se realizan para llevar a cabo una cirugía se denominan de **primera intención**, y las que resultan por accidentes se llaman de **segunda intención**. La herida de primera intención, después de generarse premeditadamente, sus bordes son aproximados entre sí por diferentes medios como suturas, cintas o de algún otro dispositivo mecánico, y ocurre dentro de las 12-24 horas luego de haber realizado la incisión y generalmente se realiza por un médico al llevar a cabo una cirugía. Por otro lado, las heridas de segunda intención son aquellas donde la lesión se origina por un trauma severo o una quemadura, y que la recuperación en tiempo depende de la extensión de la lesión, dando lugar a una regeneración tisular en discordia, generada por la falta de aproximación de los bordes de la herida. A diferencia de las de primera intención en la que sus bordes son aproximados en un tiempo no mayor a 24 horas, en estas pueden tardar el acercar los anejos hasta 120 horas, ya que es difícil la proximidad de ellos por la falta de tejido continuo. La Figura 1, muestra las diferencias en una herida de primera intención y de segunda intención (Senet, 2007).

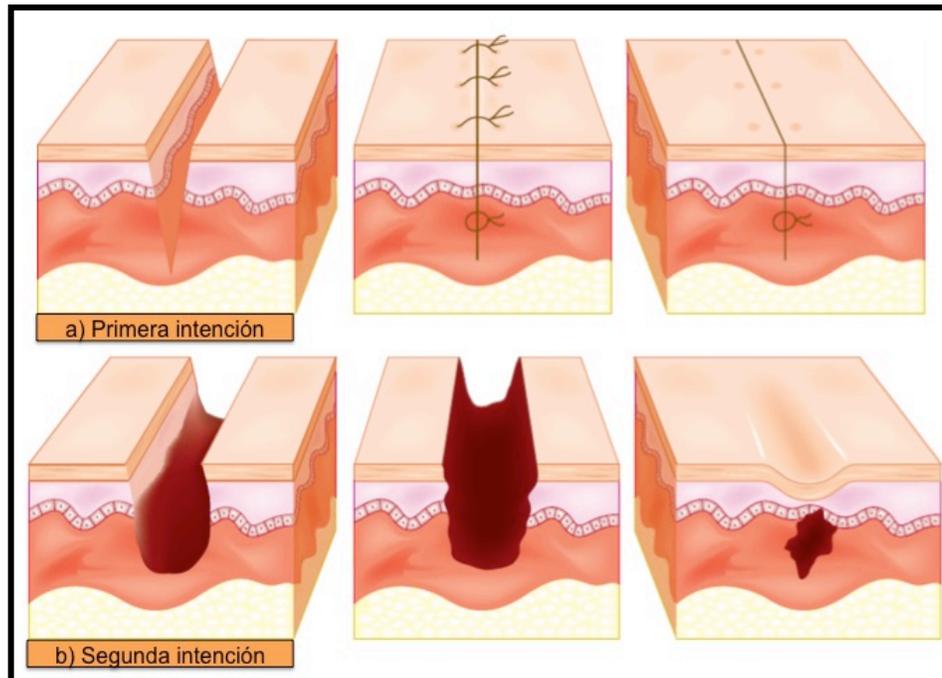


Figura 1. Diferencias en los dos tipos de herida y su progreso hasta la cicatrización.

Diferencias entre una herida de primera intención, donde los bordes son aproximados y se tiene una cicatrización homogénea; en la cicatriz de de heridas de segunda intención se observa pérdida de tejido por lo que al término del proceso observamos surcos en la piel. Imagen tomada de:

<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1537§ionid=99047265&jumpsectionID=99047270>

Epidemiología de cicatrización

Los datos reportados por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en el 2016, para heridas generadas como consecuencia de intervenciones quirúrgicas (de primera intención) de los derechohabientes en todo el país, fue de 1'105,000; de los cuales para el estado de Jalisco fue de 36,000; así mismo reportaron las cirugías ambulatorias en Jalisco son de 38,210 y para todo el país de 1'283,420 (IMSS, 2016).

El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó que para el 2016 la incidencia de cirugías en establecimientos particulares de todo el país las siguientes cifras: vasectomía (2,067 casos), cesárea (280,880 casos) y



salpingoclasia (26,440 casos); y sólo para Jalisco: 168 vasectomías, 31,128 cesáreas y 1,576 salpingoclasias (Cuadro 1) (INEGI, 2016).

Cuadro 1. Incidencia de intervenciones quirúrgicas por cada 1000 pacientes.

Tipos de Cirugías	México	Jalisco	Fuente
Intervenciones quirúrgicas *	1,105	36	IMSS, 2016
Intervenciones ambulatorias *	1,283.42	38.21	IMSS, 2016
Vasectomías **	2.067	0.168	INEGI, 2016
Cesáreas **	280.88	31.128	INEGI, 2016
Salpingoclasias **	26.44	1.576	INEGI, 2016

* Intervenciones realizadas en el IMSS, ** Intervenciones realizadas en instituciones privadas.

Para la incidencia de las heridas de segunda intención a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) las reporta como parte de las primeras 20 causas de muertes prematuras en hombres y mujeres, con el fin de dimensionar el problema que se suscita en defunciones precipitadas; por lo que enseguida se mencionan los porcentajes presentados en el 2012, (OMS, 2014):

- Lesiones causadas por el tránsito : 32%
- Lesiones autoinflingidas: 19%
- Violencia interpersonal: 16%

En el 2017 la Secretaría de Salud a nivel nacional reportó 485,862 casos de accidentes suscitados por diferentes causas: quemaduras 106,286; peatones lesionados en accidente de transporte 21,545; accidentes de transporte en vehículos con motor 113,225; mordedura de perro 115,894; heridas por violencia intrafamiliar 82,259 y heridas por arma de fuego y agentes punzocortantes 46,653. En particular, para el estado de Jalisco, los accidentes reportados por



esta misma secretaría fueron a 31,526 casos, con las siguientes cifras: quemaduras 9,752; peatones lesionados en accidente de transporte 1,022; accidentes de transporte en vehículos con motor 8,203; mordedura de perro 115,894; heridas por violencia intrafamiliar 82,259; heridas por arma de fuego y punzocortante 1,753. La Figura 2 muestra de manera gráfica los datos mencionados en términos de porcentaje, a nivel nacional (externa) y estatales (interna) respectivamente (SSA, 2018).

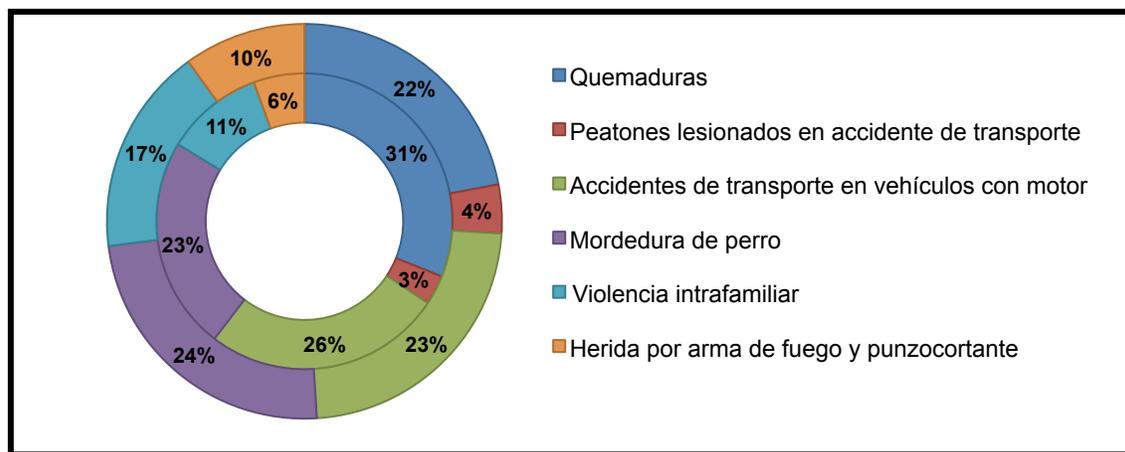


Figura 2. Incidencias de accidentes en México y Jalisco.

Los datos del disco exterior corresponden a los porcentajes a nivel nacional y el interno a los valores estatales. Se observa que a nivel nacional la mayor incidencia de accidentes fue por mordedura de perro, mientras que para Jalisco fueron las quemaduras; con la menor incidencia se presenta peatones lesionados en accidentes de transporte, para ambos niveles. Datos tomados del boletín epidemiológico 2017, SSA.

En el proceso fisiológico de herida-cicatriz se ven involucradas células sanguíneas, moléculas que favorecen la proliferación celular, citocinas y factores de crecimiento que inducen y estimulan las etapas de la reparación de tejido; todos finamente coordinados para llevar a cabo la restauración dérmica (Senet, 2007). En el Cuadro 2, se mencionan las principales células involucradas y su acción en la regeneración tisular.



Cuadro 2. Células implicadas en la regeneración cutánea.

Células	Acción en la regeneración
Células sanguíneas	<ul style="list-style-type: none">- Adherencia y activación plaquetaria- Migración y activación de los polimorfonucleares neutrófilos y los monocitos
Queratinocitos	<ul style="list-style-type: none">- Migración de las células epiteliales a partir de los bordes o de los anejos- Multiplicación y diferenciación de la epidermis- Síntesis concomitante de la unión dermoepidérmica- Colonización secundaria de la epidermis por las células de Langerhans y los melanocitos
Fibroblastos	<ul style="list-style-type: none">- Emigración precoz de los fibroblastos- Proliferación de los fibroblastos- Síntesis de una nueva matriz extracelular- Contracción de la herida debido a la transformación de algunos fibroblastos en miofibroblastos
Células endoteliales	<ul style="list-style-type: none">- Migración de las células endoteliales a partir de los vasos sanos más próximos a la herida- Formación de una red vascular indiferenciada (granulación carnosas).- Disminución progresiva de los vasos en el tejido de los vasos en el tejido de granulación de la cicatriz

Información tomada de Senet, 2007.

Etapas de la cicatrización

El proceso de cicatrización que es activado a partir del daño producido, se describe como una sucesión de eventos independientes, que en esencia se comprende un conjunto de cinco fases solapadas e interconectadas y dependientes de la activación y acción celular (Senet, 2007; Eming, 2014).

- a) Hemostasia
- b) Inflamación
- c) Formación del tejido de granulación
- d) Contracción de la herida
- e) Reparación

Las etapas de la cicatrización se superponen al paso del tiempo, siendo inmediata la respuesta en la etapa inicial para recobrar la hemostasia, las



siguientes etapas se pueden prolongar hasta 120 días o más. Dicha superposición es observada en la Figura 3 (Senet, 2007; Eming, 2014).

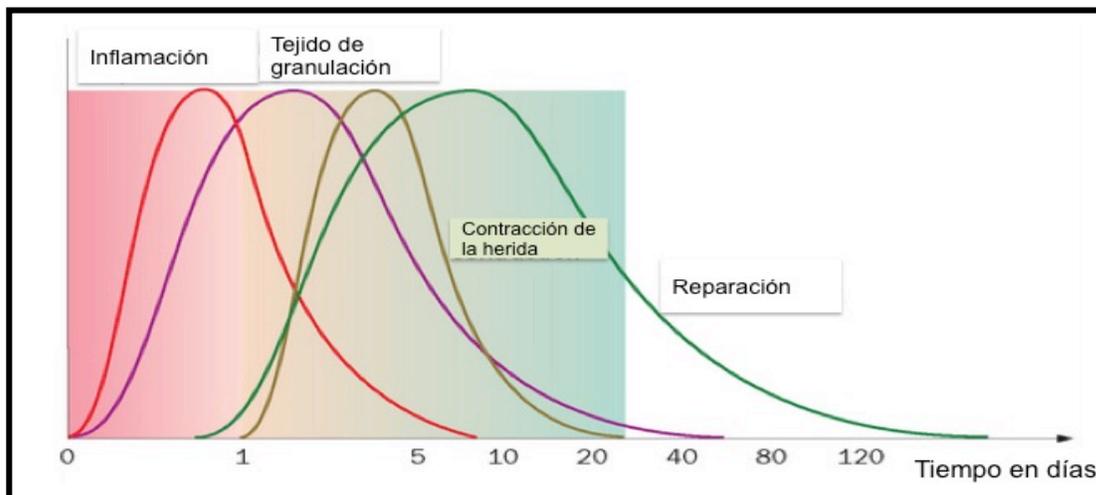


Figura 3. Gráfica de procesos fisiológicos en la cicatrización.

La hemostasia es un proceso súbito que se lleva inmediatamente después del daño (por lo que no aparece en la gráfica); la inflamación se prolonga hasta los 8-10 días, el tejido de granulación comienza a formarse desde el primer día de presentarse la herida llegando a prolongarse hasta después de los 40 días, la contracción de la herida es un proceso más rápido teniendo duración hasta de 20 días, la reparación puede llegar a durar hasta 120 días. Imagen tomada de <https://veteriankey.com/the-pathophysiology-of-wound-healing/>

a) Hemostasia

La hemostasia tiene por objetivo el mantenimiento de la integridad vascular, al evitar una pérdida excesiva de sangre cuando se produce la lesión, es rápida entre 30 segundos y 2 minutos, ya que al originarse una herida el componente vascular subendotelial queda expuesto, lo que implica una separación vascular que ocasiona la activación de la cascada de la coagulación y de la agregación plaquetaria. Las plaquetas secretan lisosomas, trombospondina, fibronectina, factor plaquetario 4 (PF-4), proteasas y metabolitos de ácido araquidónico, para la fijación de las plaquetas se requiere del factor Von Willebrand, una glucoproteína perteneciente a la familia de las integrinas; la trombina y el colágeno son piezas importantes para la agregación y activación de las plaquetas introducidas en el coágulo (Senet, 2007; Eming, 2014).



La formación de estos coágulos tiene dos objetivos, el primero de ellos es asegurar la homeostasia, y el segundo es servir como una matriz emergente que permita a través de ella la migración de células inflamatorias, dérmicas y epidérmicas sobre la lesión (Figura 4) (Senet, 2007; Eming, 2014).

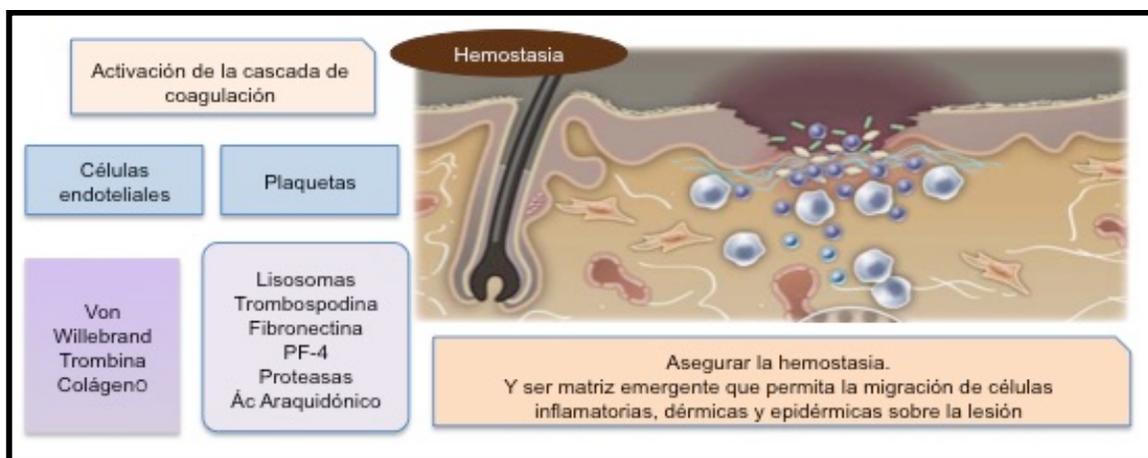


Figura 4. Etapas en la cicatrización: hemostasia.

La Figura muestra las principales células y mecanismos moleculares involucrados en la etapa de hemostasia. Imagen tomada y modificada de Eming, 2014.

b) Inflamación

La inflamación aparece a las pocas horas de haberse presentado la herida y puede prolongarse hasta 10 días, se presenta como respuesta protectora que intenta destruir o aislar aquello que representa peligro para el tejido ya que sin la remoción de células afectadas no se inicia la formación de nuevo tejido mediante activación de fibroblastos y macrófagos (Senet, 2007; Eming, 2014).

Las plaquetas y macrófagos producen las citocinas y factores quimiotácticos que se alojarán en la malla de fibrina y fibronectina (coágulo), en ella se encuentra una reserva de factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF) alfa y beta (α y β) que son los encargados de la migración y activación de los polimorfonucleares neutrófilos y de los macrófagos, dichas células son las responsables de purificar la herida



con ayuda de sus enzimas y con la creación de radicales libres (Senet, 2007; Eming, 2014).

Los polimorfonucleares neutrófilos son captados por las selectinas y moléculas de adherencia que son expresadas en las células endoteliales debido a las sustancias proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF α) y las interleucinas 1 y 6 (IL-1 e IL-6) (Senet, 2007; Eming, 2014).

La expresión de las integrinas $\beta 2$ por los leucocitos fortalece las interacciones con las células endoteliales y se incrementa la diapédesis hacia la herida. Los neutrófilos son los primeros que atraviesan las barreras y llegan al sitio de la lesión donde liberan elastasa y colagenasa favoreciendo la penetración de las células en ella, así mismo se garantiza la limpieza de la zona ejerciendo una actividad antiinfecciosa, además producen citocinas proinflamatorias involucradas en la atracción y proliferación de fibroblastos y queratinocitos (Senet, 2007; Eming, 2014).

Por otro lado, los monocitos que migraron a la herida se diferencian a macrófagos y se fijan a las proteínas de la matriz extracelular con ayuda de las integrinas; llevando a cabo la acción de limpieza y antiinfecciosa debido a su capacidad fagocítica, así mismo participan en la regeneración de la matriz, resaltando que son un aporte esencial de citocinas proinflamatorias: TNF α , IL-1 e IL-6, así como de factores de crecimiento como el factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1), PDGF y TGF β . Estas proteínas intensifican la respuesta inflamatoria y dan lugar a la proliferación de los fibroblastos, producción de colágeno, y la formación de tejido de granulación (Figura 5). Haciendo un recuento al paso del tiempo se pueden observar en la lesión en las primeras 72 horas un elevado número de macrófagos seguido de neutrófilos en menor proporción, y al cabo del quinto o séptimo día el recuento de células inflamatorias disminuye, convirtiéndose los fibroblastos en el tipo celular



predominante dando lugar a la siguiente etapa de la cicatrización: la formación del tejido de granulación (Senet, 2007; Eming, 2014).

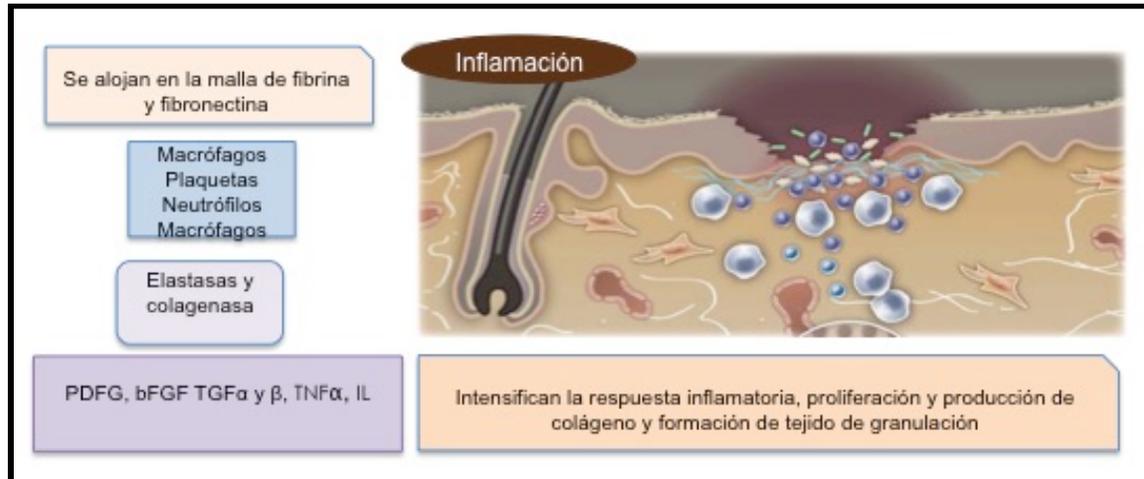


Figura 5. Etapas en la cicatrización: inflamación.

La Figura muestra las principales células y mecanismos moleculares involucrados en la etapa de inflamación. Imagen tomada y modificada de Eming, 2014.

c) Formación de tejido de granulación.

Esta etapa tiene una duración de 10 a 40 días aproximadamente, tiene por objetivo generar una barrera protectora. El tejido de granulación se requiere para llenar de tegumento la lesión, se hace presente durante la inflamación y crece hasta que la herida esté cubierta. El tejido de granulación se conforma por nuevos vasos sanguíneos, fibroblastos, células inflamatorias, células endoteliales, miofibroblastos y la matriz extracelular (MEC) que incluye fibronectina, colágeno, glicosaminoglicanos y proteoglicanos; esta matriz es provisional y en composición es diferente a la del tejido sano, y que finalmente será reemplazada por otra matriz que da origen al tejido normal. Esta fase comprende tres etapas: proliferación de fibroblastos, angiogénesis y síntesis de MEC (Senet, 2007; Eming, 2014).



Proliferación de fibroblastos.

A partir de que se origina la lesión, a las 48 horas se observa ya la migración de los fibroblastos hacia la herida, la cual depende de las citocinas producidas por los macrófagos y las plaquetas, en especial el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el IGF-1, el TNF α , el TGF β y el PDGF, sin embargo también es importante la estimulación autocrina dada por los propios fibroblastos (Senet, 2007; Eming, 2014).

La proliferación de las estirpes celulares es un proceso regulado finamente, el cual responde a las necesidades específicas del organismo. Las células crecen conforme avanzan sus etapas del ciclo celular. En la primer fase del ciclo, llamada fase de crecimiento o fase G₁ las células aumentan de tamaño, seguido a ello replican sus cromosomas en la fase de síntesis o fase S, se da una segunda fase de crecimiento G₂ donde las células se organizan para la división celular y finalmente se dividen en la fase M de mitosis para posteriormente dar lugar a una bifurcación tras la división del citoplasma (citocinesis). Así mismo, las células hijas que resultaron de la división celular vuelven a entrar en el ciclo para dividirse nuevamente (Martínez, 1991).

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína auxiliar de la ADN polimerasa δ y está involucrada en el control de la replicación del ADN eucariota aumentando la procesabilidad de la polimerasa durante el alargamiento (Tan, 1986; Bravo, 1987; Prelich, 1987). Sin embargo, además de la replicación de ADN, las funciones de PCNA están asociadas con otros procesos celulares vitales como la remodelación de la cromatina, la reparación del ADN, cohesión de la cromatida y control del ciclo celular (Maga y Hubscher, 2003).

El control de la replicación del ADN es un elemento clave en el funcionamiento de una célula, y puede influir en la estabilidad del genoma.



La duplicación del material genético que ocurre en la fase S del ciclo celular debe coordinarse con otros procesos celulares, por ejemplo la mitosis. La replicación del ADN está regulada principalmente en el paso de iniciación como resultado de la cooperación entre diferentes vías de señalización que controlan el ciclo celular (Waga y Stillman, 1998).

Angiogénesis.

Para que se lleve a cabo la angiogénesis es necesaria la expresión de receptores de las integrinas. Una vez que se lleva a cabo la angiogénesis se da lugar a la construcción de la red vascular indiferenciada llamada granulación carnosa, la cual es aparente a partir del 5º día de presentarse la herida, con ello se reduce el tejido de granulación y conforme se va dando lugar a la síntesis del colágeno la lesión progresa a la formación de la cicatriz (Senet, 2007; Eming, 2014).

Las citocinas con actividad angiogénica son bFGF, TGFβ y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) teniendo está última una mayor presencia. El VEGF es un factor de crecimiento activo en el proceso de angiogénesis, vasculogénesis y crecimiento de células endoteliales. Su regulación es fundamental para la neovascularización de tejidos, modera la angiogénesis dando lugar a nuevos vasos sanguíneos por medio de la expansión de nichos vasculares existentes, induce la proliferación de células endoteliales, promueve la migración celular, inhibe la apoptosis e induce la permeabilización de los vasos sanguíneos (Vempati, 2014).

Síntesis de matriz extracelular

Los macrófagos, linfocitos y fibroblastos secretan TGFβ (1, 2 y 3) que aumentan la síntesis de la matriz extracelular (MEC) y disminuyen la degradación de ella. Los fibroblastos además de participar en la formación de la matriz, se encargan de su remodelación con la ayuda de la



producción de enzimas proteolíticas llamadas metaloproteinasas (Figura 6) (Senet, 2007; Eming, 2014).

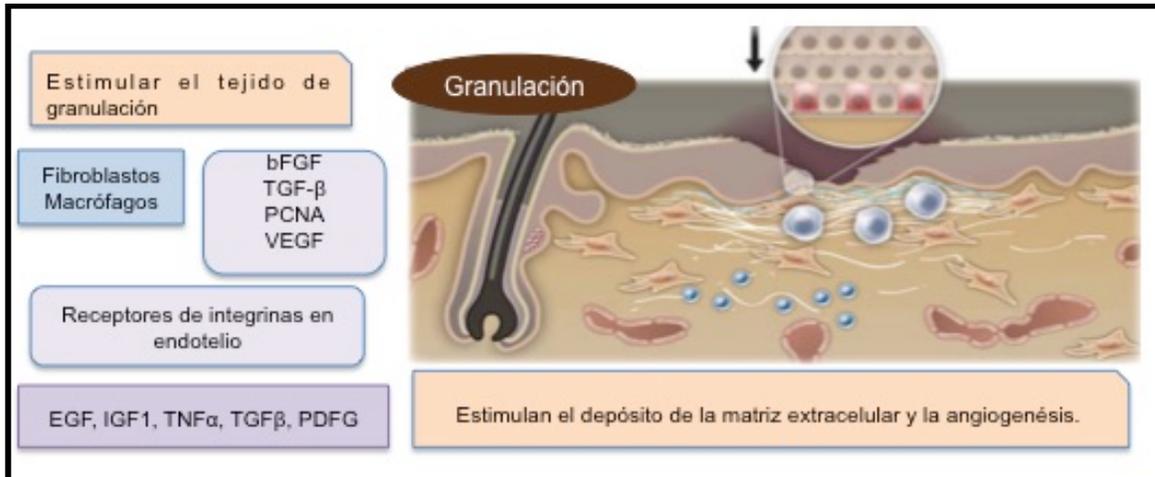


Figura 6. Etapas en la cicatrización: formación de tejido de granulación.

La Figura muestra las principales células y mecanismos moleculares involucrados en la etapa de formación de tejido de granulación. Imagen tomada y modificada de Eming, 2014.

d) Contracción de la herida

Se caracteriza por la formación, organización y resistencia que obtiene el tejido al formar la cicatriz, lo cual se obtiene al contraerse la herida, producto de los miofibroblastos. Se presenta desde las 24 horas después de la lesión y puede extenderse hasta más de 120 días (Senet, 2007; Eming, 2014).

La vía de señalización $\text{TGF}\beta/\text{Smad}$ es esencial en la regulación de los procesos de contracción y de fibrosis, ayudando a los fibroblastos a su conversión a miofibroblastos los cuales adquieren la capacidad de contraerse y transferir la función contráctil a los tejidos cercanos, debido a la interacción de las proteínas de su citoesqueleto y de la MEC (Senet, 2007; Eming, 2014).

Los miofibroblastos se definen mediante aspectos morfológicos e inmunológicos, siendo fundamental en su fenotipo los filamentos proteicos presentes en su citoesqueleto. Los miofibroblastos son semejantes a células del músculo liso, principalmente por expresar en el citoesqueleto prominentes



microfilamentos de α -actina de músculo liso (α SMA), los cuales pueden estructurarse como fibras de estrés que se ubican en diversos planos intracelulares, así mismo se interconectan a través de uniones intercelulares tipo adherente, poseen un fenotipo de célula excretora activa, mostrando abundancia en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi, mitocondrias, vacuolas y ribosomas, además interactúan con la matriz extracelular a través de contactos membranales focales por medio de las integrinas con la formación del fibronexus, el cual es un complejo de microfilamentos transmembranales que se compone de fibras altamente contráctiles intracelulares y de fibras de fibronectina en la matriz extracelular. Así también, se observa una lámina basal incompleta alrededor de ciertos miofibroblastos maduros. La función del fibronexus consiste en interconectar las fibras constituidas por α SMA a través de un complejo de integrinas transmembranales con las fibras de fibronectina en la matriz extracelular. La activación del fenotipo de células expresando α SMA puede requerir además del TGF β -1 la interacción específica célula-matriz y con otros factores de crecimiento y estímulos, dependiendo de que sea necesario mantener el fenotipo de fibroblasto o bien, que fuera necesaria la transdiferenciación hacia miofibroblasto (Ramos, 2004).

Los miofibroblastos son pieza importante en esta etapa ya que por su alta capacidad contráctil, contribuyen a la reducción del área del tejido en remodelación. Así mismo ayudan en la síntesis, remodelación y reparación de la matriz extracelular con la producción de diversas moléculas como colágeno tipo I y III, fibras elásticas, glicosaminoglicanos, integrinas, tenascina y fibronectina a un nivel intersticial tanto en las membranas basales epiteliales y endoteliales (Figura 7) (Ramos, 2004).



Figura 7. Etapas en la cicatrización: contracción

La Figura muestra las principales células y mecanismos moleculares involucrados en la etapa de contracción de la herida. Imagen tomada y modificada de Eming, 2014.

e) Reparación.

La fase de reparación sigue a la formación del tejido de granulación, a medida que las células epiteliales migran a través del tejido recién formado, construyen una barrera entre la herida y el medio ambiente. Los queratinocitos del borde de la piel lacerada y los apéndices dérmicos como son los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas y sebáceas son los principales responsables de la fase de epitelización. La migración de las células epiteliales desde los bordes cesa una vez que se encuentran en la mitad de la herida, dicha migración es variable ya que depende de la formación del tejido (Senet, 2007; Eming, 2014).

La reparación se presenta a las 24 horas de que se hizo la herida y puede prolongarse hasta 4 meses o más, consta de dos fases:

- Migración de las células epiteliales,
- Proliferación y diferenciación en la epidermis formada,

Ambas se presentan en forma simultánea con varias interacciones entre la dermis y la epidermis originando la unión dermoepidérmica. En presencia de fibroblastos, se da la síntesis de colágeno tipo IV y VII y la diferenciación



epidérmica. La epitelización que se da por un patrón llamado “guía por contacto” en la que los queratinocitos viajan sobre la matriz y se posicionan sobre las fibras de colágeno; durante este viaje inhiben la expresión de ciertas integrinas como la $\alpha 6\beta 4$, la cual facilita su fijación a la laminina 5 de la membrana basal, al verse inhibida dicha integrina se expresan receptores de colágeno I y fibronectina, estos complejos se unen al citoesqueleto de actina de los queratinocitos permitiendo así la migración de las células (Senet, 2007; Eming, 2014).

En la etapa final de la cicatrización (aproximadamente 40 días aunque puede prolongarse hasta meses o años) los fibroblastos, los polimorfonucleares y los macrófagos sintetizan colagenasas (MMP 1 y 8), las gelatinasas (MMP 2 y 9), los inhibidores tisulares de las metaloproteínas (TIMP), que se ven involucrados en la remodelación de la matriz, favoreciendo las lisis y la síntesis de nuevas moléculas mejor orientadas (Figura 8) (Senet, 2007; Eming, 2014).

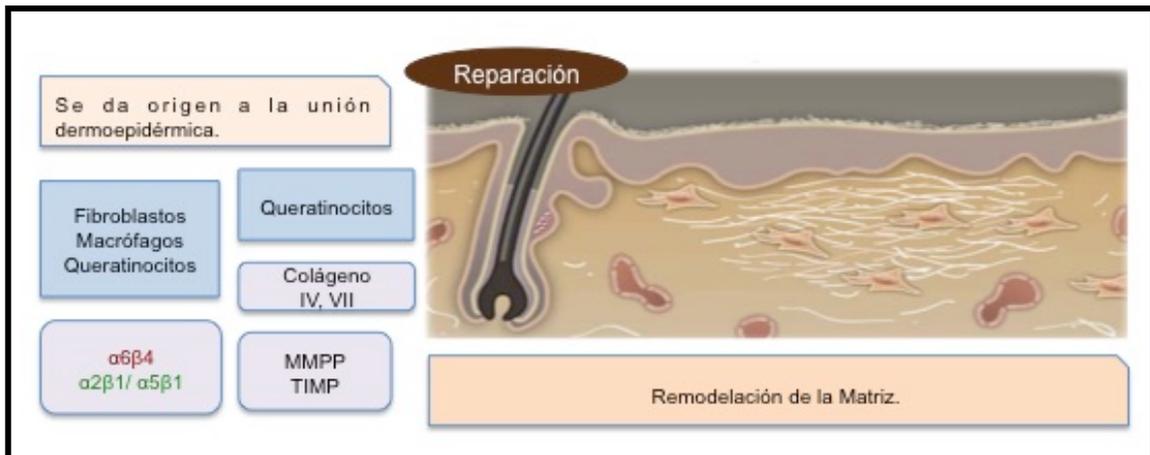


Figura 8. Etapas en la cicatrización: reparación.

La Figura muestra las principales células y mecanismos moleculares involucrados en la etapa de reparación, que a su finalización resulta en la formación de la cicatriz. Imagen tomada y modificada de Eming, 2014.



En el Cuadro 3, se describen las biomoléculas involucradas en la regeneración así como sus células productoras.

Cuadro 3. Factores de crecimiento y citocinas proinflamatorias y su actividad en la cicatrización cutánea.

Células Productoras	Factor	Actividad
Plaquetas, macrófagos, linfocitos y fibroblastos	TGFβ	Proliferación de fibroblastos y de células endoteliales Síntesis de matriz extracelular
Plaquetas, queratinocitos, células endoteliales, fibroblastos	PDGF	Migración y proliferación de los fibroblastos Síntesis de colágeno Quimiotáctico para neutrófilos y monocitos
Queratinocitos, fibroblastos y plaquetas	bFGF	Angiogénesis y epitelización
Queratinocitos, macrófagos y plaquetas	VEGF	Angiogénesis
Fibroblastos	KGF	Migración y proliferación de los queratinocitos
Plaquetas, queratinocitos y macrófagos	EGF	Migración y proliferación de los queratinocitos Proliferación de las células endoteliales y de los fibroblastos.
Macrófagos, monocitos y linfocitos	IL-1 IL-6	Migración y proliferación de fibroblastos
Macrófagos, plaquetas, fibroblastos, monocitos y linfocitos	TNFα	Migración y proliferación de fibroblastos
Fibroblastos	PCNA	Proliferación de fibroblastos
Miofibroblastos	αSMA	Formación de tejido de granulación

TGF: factor de crecimiento transformante; PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas; bFGF: factor de crecimiento básico de fibroblastos; VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular. KGF: factor de crecimiento de queratinocitos; EGF: factor de crecimiento epidérmico; IL: Interleucina, TNF: factor de necrosis tumoral, PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular; αSMA: α-actina de músculo liso. Información tomada de Senet, 2007.



Cicatrices patológicas

La reparación no siempre se lleva a cabo con resultados satisfactorios, en cuestión de funcionalidad y apariencia. Alteraciones en los procesos normales de la reparación pueden dar origen a la presencia de cicatrices patológicas, como la presencia de cicatrices retráctiles, cicatrices hipertróficas o queloides. En el Cuadro 4, se muestra la clasificación de las cicatrices, de acuerdo a sus características visuales y a la escala Vancouver (Arosemena, 2007).

Cuadro 4. Clasificación de cicatrices, de acuerdo a la escala de Vancouver

Clasificación de las cicatrices	
Cicatriz madura	Plana, ligeramente coloreada.
Cicatriz inmadura	Ligeramente elevada, rojiza, asocia prurito y dolor.
Cicatriz hipertrófica lineal	Elevada, asocia prurito y se limita al borde de la incisión. Aparece semanas después de la cirugía. La maduración completa es a los dos años.
Cicatriz hipertrófica	Abarca toda la extensión de la lesión, es elevada, rojiza y asocia prurito. Cicatriz de quemadura.
Queloides menor	Una elevación focal, pruriginosa que se extiende sobre tejido normal, no tiene regresión. Si se reseca, asocia alto porcentaje de recidiva.
Queloides mayor	De gran tamaño, elevado (> 0.5 cm), asocia dolor y prurito, se extiende sobre tejido normal.

Información tomada de Arosemena, 2007.

Las cicatrices retráctiles se forman debido a la falta de orientación entre la herida y las líneas de tracción fisiológica de la región, se presenta con frecuencia en quemaduras profundas o en lesiones donde se tiene un daño vascular como, por ejemplo, en las úlceras varicosas o en pie diabético. En este tipo de cicatrices, se tienen anomalías funcionales en especial sobre la movilidad y contracción del tejido (Eming, 2014).

La presencia de fibroblastos procedentes de la aponeurosis en el tejido de



granulación y las tracciones mecánicas a las que están sometidos, son un gran estímulo para la síntesis de colágeno y aumentan la relación inhibitoria de las colagenasas. Los fibroblastos se muestran senescentes por lo que no responden a los estímulos de proliferación (Senet, 2007; Eming, 2014).

Por otro lado en las cicatrices hipertróficas se limitan a la zona traumatizada donde se manifiesta como una cicatriz gruesa y eritematosa, debido a una producción excesiva de colágeno y a la disminución en la hidrólisis de esta proteína. Los fibroblastos tienen una respuesta anormal a la estimulación de TGF β dando una producción autocrina excesiva, quizás por la baja regulación del sistema TGF β /Smad, el cual regula la producción de proteínas Smad, el equilibrio de las proteasas inhibitorias y de la producción de colágeno (Senet, 2007; Eming, 2014).



Figura 9. Cicatrices patológicas.

En la primera fotografía se aprecia una cicatriz retráctil donde la herida se prolonga y fácilmente vuelve a ser expuesta, en la segunda fotografía se tiene una cicatriz hipertrófica, la cual se caracteriza por presentar colágeno denso en abundancia y la tercera fotografía muestra un abultamiento queloides. Imagen tomada de Eming, 2014.

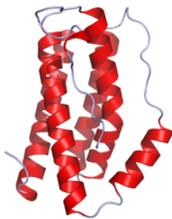
La perspectiva de los tratamientos de heridas gira en torno a mejorar las cicatrices patológicas, el futuro entonces, está en encontrar tratamientos que permitan controlar el tamaño, la forma y las propiedades del tejido, y surgiría así una nueva era en el tratamiento de las heridas con lo que se evitarían eventos patológicos dados en la formación de cicatrices.



Moléculas de interés involucradas en las etapas en la reparación tisular.

En este trabajo, haremos énfasis en algunas proteínas involucradas en las diferentes etapas de la reparación tisular debido a su importancia y que servirán de monitoreo de cada uno de los procesos ya mencionados.

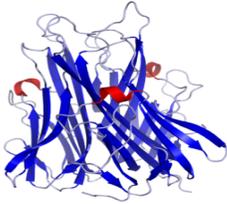
a) Interleucina 6 (IL-6)



Es una citocina con peso molecular de 21-25 kDa. Se sintetiza en diversos tipos celulares, entre los que destacan macrófagos, monocitos, fibroblastos y células endoteliales. Dentro de sus funciones destaca su intervención en la regulación de la respuesta inmune, en la hematopoyesis y en las reacciones de fase aguda, sin embargo de manera especial tiene participación como citocina proinflamatoria. Sus efectos biológicos, se manifiestan a través de su receptor, presente en la membrana de las células blanco, el cual esta compuesto por dos subunidades IL-6R acoplada a una glicoproteína (GP130), que actúa como señal transductora. El receptor una vez que se ha unido a su ligando (la IL-6), se solubiliza (sIL-6R) y puede actuar como agonista de la IL-6; entonces, por su parte el GP130 soluble actúa como antagonista de la citocina (Filella, 2002). Su principal función está en el proceso inflamatorio, pero también se ve involucrada en la maduración de las células B. Esta proteína ha demostrado ser un pirógeno endógeno capaz de inducir fiebre en personas con enfermedades autoinmunes o en infecciones. Se produce principalmente en zonas donde se secreta suero, producto de la inflamación en el proceso de reparación y en enfermedades agudas y crónicas (*National Center of Biotechnology: NCBI, 2017, No. Acceso NP_000591*).

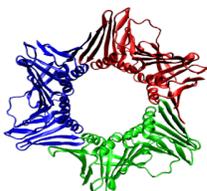


b) Factor de necrosis tumoral (TNF α)



Esta citocina con masa molecular de 17 kDa. Es sintetizada por monocitos, macrófagos y linfocitos, se encuentra en la membrana celular. Dentro de sus funciones destaca la regulación de procesos biológicos como: proliferación celular, diferenciación, apoptosis, metabolismo lipídico y la coagulación. Así mismo, ejerce un efecto antitumoral a través de un doble mecanismo que incluye la inhibición de la angiogénesis, que produce la necrosis hemorrágica del tumor, y el aumento de la respuesta inmunitaria antitumoral, también actúa como mediador en el desarrollo del shock séptico y en la caquexia, estado catabólico asociado a las enfermedades crónicas y que cursa con pérdida de peso, anorexia y anemia. Ha sido implicada en una variedad de enfermedades incluidas enfermedades autoinmunes, resistencia a la insulina y en cáncer. Los estudios en ratones *Knockout* (a los cuales se les suprimen ciertos genes involucrados en una determinada respuesta) también sugirieron que tiene función neuroprotectora. Para ejercer su función se une a dos receptores: TNF-R-I (55 kDa) y TNF-R-II (75 kDa). En el proceso de reparación, se comporta como mediador de la inflamación local y generalizada. El incremento de la concentración local de TNF provoca los signos característicos de calor, rubor, tumor y dolor (Filella, 2002), (NCBI, 2017, No. Acceso NP_000585).

c) Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

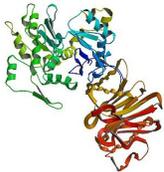


Esta proteína tiene un peso molecular de 36 kDa, se encuentra en el núcleo y es un cofactor de la ADN-polimerasa δ , actúa como un homotrímero y ayuda a aumentar la capacidad de procesamiento de la síntesis de la cadena principal durante la replicación del ADN. En la reparación dérmica se encuentra con mayor frecuencia en la formación de tejido de granulación y en etapa de epitelización, principalmente localizada en los fibroblastos (Strzalka, 2011) (NCBI, 2017, No.



Acceso CAG38740). Esta proteína, ha sido descrita mayormente en el apartado de proliferación.

d) α -Actina de músculo liso (α SMA)



La α -actina tiene un peso molecular de 190 kDa, pertenece a las actinas las cuales son una familia de proteínas altamente conservadas involucradas en la movilidad en la estructura y en la integridad celular. Se encuentran en el citoplasma de las células y forman parte del sistema de microfilamentos del citoesqueleto. La α -actina es un componente principal del aparato contráctil, ya que se encuentra en el músculo esquelético, así mismo se encuentra en paredes vasculares, en la mucosa muscular intestinal y la musculatura propia y en el estroma de varios tejidos. En el proceso de la reparación de heridas dérmicas se encuentra presente en los miofibroblastos que ayudan al acercamiento de los bordes de la lesión (NCBI, 2017, No de acceso: NP_001091).

e) Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)



Es una molécula secretada como un homodímero de peso molecular entre 34 y 46 kDa. Este factor de crecimiento induce la proliferación y migración de células endoteliales vasculares, y es esencial para la angiogénesis fisiológica y patológica. Se expresa en la membrana de la célula y se encuentra aumentada en tumores, su expresión se correlaciona con la etapa del tumor y su progresión. Este factor de crecimiento se hace presente en la reparación en la etapa de formación del tejido de granulación para llevar a cabo la formación de nuevos vasos sanguíneos (Bates, 2010) (NCBI, 2017, No. de acceso: NP_001303939).



NANOCIENCIAS, NANOTECNOLOGÍA Y NANOMEDICINA

Generalidades

La Nanociencia y la Nanotecnología se desarrollaron de manera relativamente silenciosa hasta la década de los noventa, treinta años después de que Feynman predijera la posibilidad de manipular y controlar la materia en la nanoescala. El término Nanotecnología fue acuñado por el profesor Norio Tanguchi en 1974, argumentando que la Nanotecnología comprende el procesamiento, separación y manipulación de materiales átomo por átomo (Webster, 2007). Así mismo, se tienen otras definiciones como pueden ser: el estudio y fabricación de estructuras y dispositivos en una dimensión de nanómetros (nm), donde el prefijo “nano” se asocia a la escala de 10^{-9} , es decir la que mejor opera para las dimensiones de los átomos y moléculas más pequeñas. Este término comprende la representación gráfica, la medición, el modelado y la manipulación de la materia en una escala nanométrica (Villafuerte-Robles, 2007).

De la Nanotecnología podemos desprender el término Nanociencia, el cual surge como una nueva ciencia centralizada a los aspectos naturales de las condiciones a un nanonivel. La nanociencia es el estudio del fenómeno y la manipulación de la materia a escala nanométrica, mientras que la Nanotecnología se trata del diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas a través del control del tamaño y la forma a nanoescala (Bushan, 2004).

La Figura 10, nos muestra una escala métrica, con algunos ejemplos que abarcan el nivel nanométrico como son átomos, a escala micrométrica donde encontramos el diámetro de algunas células, y estructuras a nivel milimétrico, totalmente perceptibles por el ojo humano.

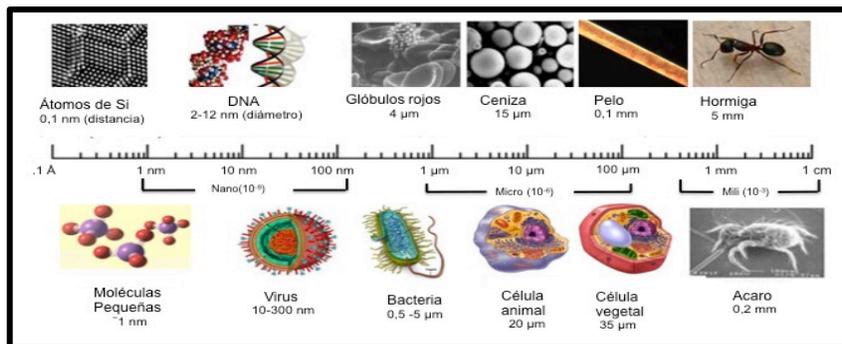


Figura 10. Métrica de objetos.

Escala métrica que incluye desde nanómetros hasta milímetros; se observan átomos a nivel nanométrico y a nivel milimétrico seres que se alcanzan a percibir con el ojo humano. Imagen tomada de: <http://muyinteresantespain.blogspot.mx/2014/01/el-mundo-microscopico-y-la.html#.WrqRSHdDnUo>

La Nanociencia abarca principalmente tres áreas del conocimiento: Física, Química y Biología. En la Nanociencia, la longitud es un aspecto unidimensional importante, la medida en nm es usualmente empleada en Nanociencias y abarca el intervalo entre 1 y 100 nm (Villafuerte-Robles, 2007). En la actualidad la Nanotecnología se utiliza en varios campos como son Comunicación, Energía, Ingeniería, Electrónica, Óptica, Transporte, Agricultura y Biomedicina. El Cuadro 5 muestra un resumen de algunos campos de aplicación con diferentes nanomateriales:

Cuadro 5. Ejemplos de algunos campos donde está presente la nanociencia.

Campo de aplicación	Nanomaterial	Objetivo	Referencias
Energía solar	CdTe/CdSe Quantum dots	Eficacia y fotoestabilidad	Bang J & Kamat P, 2009
Medio ambiente	Nanopartículas Au/TiO ₂	Remoción de contaminantes	Ayati A y col, 2014
Energía	Películas de SiO ₂ /Er	Simplificación de procesos industriales	Sopinsky y col, 2015
Biología	Nanopartículas de Au	Mediadores de <i>microarrays</i>	Jung C y col, 2008
Catálisis química	Nanotubos de Carbono	Acelerar procesos industriales-nucleares	Álvarez y col, 2010



Los materiales con que son fabricadas las nanoestructuras se clasifican de acuerdo a su fuente de obtención, y son:

- Naturales
- Polímeros artificiales
- Biocerámicas
- Metálico

La combinación en una estructura con dos o más componentes de diferente origen se denomina compuesto, constructo o compuesto es decir, se pueden tener combinaciones de polímeros artificiales con sustancias naturales, biocerámicas con agentes metálicos, o metales con sustancias naturales, entre otras. En este caso al estar en un intervalo nanométrico, estas estructuras reciben el nombre de nanocompuesto. En el Cuadro 6 se muestra la clasificación de los materiales precursores de nanoestructura de acuerdo a su origen y algunos ejemplos (Vallet-Regí, 2013).

Las formas geométricas de las NPs son también muy variadas: vesículas, anillos, nanotubos, esferas, nanoagujas, etc. (Gareth, 2005; Barbuci, 2002). En la Figura 11 se muestran algunas morfologías de NPs.

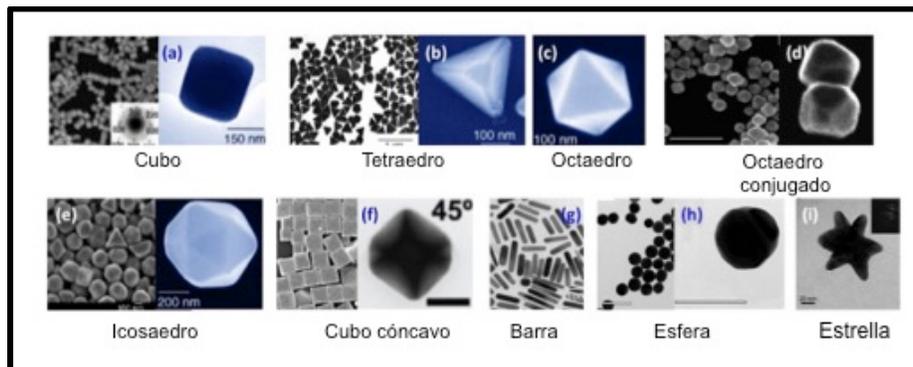


Figura 11. Geometrías de la nanopartículas.

Las geometrías sintetizadas hoy en día son diversas, y presentan diferencias fisicoquímicas de acuerdo a su objetivo de elaboración. Imagen tomada y modificada de Zaleska, 2016.



Cuadro 6. Clasificación de los materiales precursores de nanopartículas.

Sustancias Naturales				
<i>Origen proteico</i>	Colágeno	Gelatina	Elastina	Fibrinógeno
	Actina	Miosina	Albúmina	Seda
	Queratina			
<i>Polisacáridos</i>	Almidón	Celulosa	Dextrano	Alginatos
	Quitina	Quitosano	Ácido Hialurónico	Glucosamino glucanos
	Amilosa			
<i>Polinucleótidos</i>	ADN	ARN		
Polímeros Artificiales				
<i>Degradables</i>	Ácido Poliláctico	Ácido glicólico	Policaprolactona	Polidioxanona
	Polihidroxivalerato	Polihidroxitirato	Anhídrido sebáceo	Poliortoésteres
	Poliamioácidos	Policianoacrilatos	Polifosfacenos	
<i>No degradables</i>	Polimetilmetacrilato	Poliétileno	Polipropileno	Politetrafluoretileno
	Siliconas (polidimetilsiloxano)	Policarbonato	Nylon (poliamidas)	Poliuretanos
	Poliestireno	Policloruro de vinilo	Polipropilenglicol	
<i>Hidrogeles</i>	Polihidroximetil metacrilato	Poliacrilamidas	Alcohol polivinílico	Polivinil-pirrolidona
	Poliétilenglicol	Poliacilonitrilo		
Biocerámicas				
<i>Inertes</i>	Al ₂ O ₃	ZrO ₂	CaAl ₂ O ₄	Si ₃ N ₄
	SiC	Hidroxiapatitas sintéticas	Carbonos	
<i>Bioactivas</i>	Hidroxiapatita	Hidroxi carbonato apatitas	Biovidrios	Vidrios cerámicos A-W
	Apatita-Wollastonita			
<i>Degradables</i>	CaSO ₄	Coral-CaCO ₃	Aragonita	Fosfatos de calcio
	α/β TCP: fosfato tricálcico	OCP: fosfato octacálcico	DCPA: fosfato dicálcico anhidro	DCPD: fosfato dicálcico dihidratado
	TetCP: Fosfato tetracálcico monóxido	Hidroxiapatita con ZnO ₃ , Al ₂ O ₃ , Fe ₂ O ₃ .		
Metales				
<i>Puros</i>	Oro	Plata	Platino	Titanio
	Plomo (ya no se utiliza)			
<i>Aleaciones</i>	Titanio	Co-Cr	Aceros inoxidables	Mg
	Ti-6Al-4V	CoCrMo	Fe-18Cr-14Ni-3Mo	Nitinol
	Ti-3Al-2.5V	CoCrNiMo	Fe-21Cr-9Ni-4Mn-3Mo-Nb-N	Ni-Ti

Información tomada de Vallet-Regí, 2013.



Existen varios métodos de síntesis para obtener NPs (se pueden consultar en el anexo A) y es de especial interés en este trabajo de tesis mencionar el método de Stöber; en el cual se utilizan precursores metálicos, generalmente alcóxidos o cloruros, se someten a reacciones de hidrólisis y policondensación para formar un compuesto inorgánico, por lo general un oxi-hidróxido metálico que al alcanzar el tamaño de micras origina una dispersión coloidal, que luego, al proseguir la polimerización lenta produce un gel (Stöber, 1968).

Se cuenta con varios métodos para la síntesis de nanocompuestos conformados por nanopartículas de plata (AgNPs), las cuales pueden ser recubiertas (Dhanalekshmi, 2014) o bien colocadas en soportes de diversos materiales como son de quitosán (He, 2014; Roy, 2016), nanotubos de carbono (Karumuri, 2016), de aluminosilicato (Li, 2014) así mismo en estructuras de SiO₂ (Yordanova, 2014; Liu, 2014; Xu, 2016). La síntesis de nanocompuestos de AgNPs soportadas en SiO₂ se obtienen con el método de Stöber, y la reducción química de sales de plata con el uso de AgNO₃, y la posición de las AgNPs dependerá del método de síntesis, para el caso descrito la formación de AgNPs se da simultáneamente con la formación de las estructuras de SiO₂, dando como producto esferas de SiO₂ decoradas con AgNPs. En el caso de este trabajo, se han adicionado las AgNPs al sistema de reacción para obtener las microesferas de SiO₂, dando por resultado que las AgNPs se difundan por toda la red del óxido de silicio para formar partículas coloidales de plata y no sólo en la superficie (Angelito Baños, 2004). Estos nanocompuestos se han utilizado con diferentes fines como la optimización de sistemas catalíticos (Jiang, 2005; Zhai, 2006) y para remediación de aguas con el fin de recuperar mercurio de mantos acuíferos (He, 2014; Yordanova, 2014; Ganzagh, 2016). Los estudios de nanocompuestos de AgNPs con SiO₂ afirman las propiedades antimicrobianas de la plata (Hwan, 2007; Akhavan, 2009; Gu, 2011), sin embargo, se tienen pocos reportes del conjunto de estos nanomateriales en terapias reconstructivas.

Como se mencionó anteriormente son varios los usos de la Nanotecnología



en diversas áreas, y es de suma importancia mencionar su aplicación en la biomedicina, a la cual se le llama nanomedicina y es una rama de la Nanotecnología que se proyecta con un gran potencial especialmente en el campo diagnóstico y terapéutico (Villafuerte-Robles, 2007).

La Fundación Europea de la Ciencia (European Science Foundation) define a la Nanomedicina como la ciencia y la tecnología del diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades y lesiones traumáticas, alivio del dolor, conservación y mejora de la salud humana, todo ello utilizando conocimientos moleculares del cuerpo humano (Vallet-Regí, 2013).

La nanomedicina agrupa tres áreas principales (González, 2006):

1. El **Nanodiagnóstico** que consiste en el desarrollo de sistemas de análisis y de imagen para la detección de enfermedades en los estadios más tempranos posibles, tanto *in vivo* como *in vitro*.

2. La **Medicina regenerativa** tiene como objetivo la reparación o sustitución de tejidos y órganos dañados usando herramientas nanotecnológicas. La interacción entre la Nanotecnología y la Medicina constituye una oportunidad para llevar a cabo nuevos tratamientos o mejorar los ya existentes.

3. La **Nanoterapia** que pretende dirigir nanosistemas activos que contengan elementos de reconocimiento para actuar o transportar y liberar medicamentos exclusivamente en las células o zonas afectadas, a fin de conseguir un tratamiento más efectivo, minimizando los efectos secundarios.

El futuro de esta rama, con respecto al desarrollo de productos terapéuticos, sistemas de suministro de fármacos o sistemas nanofuncionalizados con anticuerpos específicos, estaría ligado a diseñar materiales estructurados con una multifuncionalidad que les permita ser capaces de atacar ciertas enfermedades específicas; que contengan funciones que les facilite atravesar las barreras biológicas, y sea posible una administración local de productos terapéuticos, así mismo es importante el diseño de plataformas nanoestructuradas para la ingeniería de tejidos y el diseño de dispositivos



sensibles a estímulos para la liberación de fármacos (González, 2006).

El porvenir de la nanomedicina incluye varias líneas de investigación como son transporte y sistemas de liberación de fármacos, genes o moléculas autoensamblables; diseño de nanocápsulas, nanocristales, nanopartículas (Fornaguera, 2015), liposomas (Shade, 2016), dendrímeros (Jose, 2016), conjugación de polímeros, fármacos y anticuerpos (Yang, 2007), entre otros.

Una de las aplicaciones de la nanoterapia que más promete es la encapsulación de fármacos para dar dirección o localización al sistema de suministro de fármacos. Para muchos casos el uso de medicamentos se requiere obtener cantidades efectivas del fármaco en un tejido en particular, dentro del organismo. Las nanocápsulas cargadas con el fármaco se podrían recubrir con anticuerpos o receptores de la superficie celular que se unen a ciertas células para liberar su carga de fármacos al contacto con ellas (González, 2006).

Las nanocápsulas podrían ser funcionalizadas para adherirse o unirse a ciertas partes del organismo. Más aún, podrían diseñarse de tal manera que fueran activadas por un disparador externo, por ejemplo, un pulso magnético o ultrasonido (Villafuerte-Robles, 2007).

Se han publicado artículos que hablan acerca del acoplamiento de NPs con fierro llamadas nanopartículas magnéticas lo cual es útil para dirigir las, en el interior del organismo, a través de un campo magnético externo hacia el sitio donde tendrán su efecto (Johannsen, 2007; Lechuga, 2009).

Por otro lado, se han reportado resultados de experimentos, *in vitro* e *in vivo*, de terapia fototérmica basado en silicio poroso en combinación con el láser cercano al infrarrojo, mostrando resultados de una terapia eficaz para destruir selectivamente las células cancerosas sin dañar las células sanas circundantes (Hong, 2011). Así mismo, se ha reportado la obtención de nanotubos de silicio a las cuales se les incorporó γ -Fe₂O₃, los cuales fueron caracterizados por microscopía electrónica de transmisión, difracción de rayos X, magnetización y con estudios de sorción y desorción. Los resultados muestran que los nanotubos



magnéticos de silicio pueden ser sintetizados sin trabajo y tienen un gran potencial como sistema de soporte de fármacos, también se ha reportado su utilización en terapias de hipertermia (Chen, 2012). Otro término importante que se debe mencionar cuando se habla de nanomedicina y NPs es el de hipertermia, la cual consiste en el calentamiento de ciertos órganos o tejidos a temperaturas entre 41 y 46°C, utilizado principalmente para el tratamiento de cáncer. El objetivo principal de esta terapia es inducir la apoptosis en la célula (Jordan, 1999).

Hoy en día se tienen varios reportes que indican la síntesis y caracterización de NPs y micropartículas que pueden administrarse a modelos *in vivo* o incluso a modelos humanos que ya se tienen en fase clínica, las cuales pueden entrar al organismo sin dañarlo ni producir una respuesta tóxica, al llegar hasta su sitio de acción (Hu, 2012).

Aplicaciones de nanomateriales

Varios materiales se han utilizado en el campo biomédico teniendo en cuenta su propiedad de ser biocompatible, desde materiales poliméricos, materiales biológicos, materiales cerámicos, semiconductores y materiales hibridados; las formas de las nanoestructuras también son muy diversas: vesículas, anillos, nanotubos, esferas, micelas, dendrímeros, nanoporos, nanoagujas, fullerenos, etc. (Gareth, 2005; Barbuçi, 2002). Dependiendo de la aplicación a la cual vaya destinado el nanomaterial, se deben cuidar las características y propiedades del mismo, por ejemplo, para la administración de medicamentos son importantes las cinéticas de reabsorción del material nanoestructurado y la adsorción/liberación del medicamento (Vallet-Regí, 2013; Bushan, 2004). A grandes rasgos se puede decir que las principales aplicaciones de los materiales nanoestructurados en medicina pueden clasificarse dentro de 5 grandes grupos:

1. Implantes de dispositivos para detección o tratamiento: las aplicaciones en biosensores y en otros dispositivos médicos alojados en el



cuerpo vivo (implantes) es una de las áreas más desarrolladas. Los materiales nanoestructurados pueden utilizarse también para ayuda sensorial, por ejemplo, en implantes de retina y cocleares a base de siliconas.

2. Reconstrucción y/o sustitución de tejidos: las aplicaciones pueden ir desde el recubrimiento de implantes, la construcción de la estructura para regeneración de tejido, la reparación de huesos o la utilización de materiales bioreabsorbibles que puedan ser sustituidos por tejido natural hasta la utilización de materiales o dispositivos inteligentes, capaces de dar una respuestas a las señales creadas por el medio biológico (Vallet-Regí, 2013).

3. Administración de fármacos: El uso de la nanomedicina es una solución para la protección de fármacos que son fácilmente degradables en los fluidos biológicos, pueden ser nanoencapsulados o microencapsulado y facilitar su transporte a la célula diana, este hecho ya ha sido reportado (Hu, 2012; Fornaguera, 2015).

4. Asistencia en cirugía: Cuando los nanomateriales son funcionalizados con ligandos específicos como anticuerpos monoclonales y agentes fluorescentes se pueden direccionar a células malignas y microambientes tumorales con alta especificidad y afinidad, entonces en su extirpación sería más fácil a la vista de los médicos cirujanos. Los materiales que han sido utilizados *in vivo* son los puntos cuánticos (Qdots) y nanopartículas de silicio poroso luminiscentes (Jaimes, 2012; Park, 2009).

5. Apoyo para diagnósticos: Dentro del diagnóstico se utilizan nanosistemas para imagenología y nanobiosensores. En los primeros se utilizan NPs con propiedades fluorescentes o luminiscentes que sirven como agentes de contraste para marcajes *in vivo*, como pueden ser semiconductores, metálicas o magnéticas. Estos permiten aumentar la sensibilidad y dan mayor contraste en las técnicas de imagen (Díaz, 2012).



NANOMATERIALES EN REPARACIÓN DÉRMICA.

Las heridas dérmicas propician daño en la integridad de la piel, esta pérdida del ambiente estéril del interior hace que pueda producirse una contaminación, para evitar lo anterior se utilizan antisépticos o apósitos para cubrir la lesión. Anteriormente, la curación se realizaba en un ambiente seco, es decir sólo se cubría con gasas, como consecuencia las células epidérmicas se desplazaban al interior de la herida, las células sanas se deshidrataban y se necrosaban lo que impedía la aparición de tejido nuevo; con este ambiente se prolongaba la cicatrización debido a la ausencia de humedad. Hoy en día los apósitos propician ambientes húmedos; una curación con ambiente húmedo permite un equilibrio en la humedad que impide la desecación y la maceración lo que favorece la correcta curación de la lesión, además se disminuye el dolor, se evita la fricción del área lesionada, y se obtiene una barrera ante los microorganismos, con ello se reduce el tiempo de cicatrización (Esteva, 2006).

Los tratamientos naturales en la reparación dérmica, son utilizados desde la antigüedad, sin embargo hoy en día se conocen más a detalle sus componentes y los efectos terapéuticos localizados que se tienen en la medicación para el proceso de cicatrización. Por ejemplo, la más común y utilizada es la caléndula (*Calendula officinalis*), contiene saponinas triterpénicas, triterpenos, flavonoides, hidroxycumarinas, aceites esenciales, mucílagos y políinos de manera que el efecto cicatrizante con el que cuenta esta planta se debe a que sus componentes potencian las etapas de granulación y epitelización del tejido dañado y estimula la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (glucoproteínas, nucleoproteínas y colágeno); aunado a lo anterior, hay reportes que mencionan que estimula la angiogénesis en el tejido dañado; por estos efectos terapéuticos está clasificada como una planta con propiedades cicatrizantes. Otro ejemplo, lo encontramos en tronco de *Myroxylon* del cual se extrae el bálsamo de Perú que posee un alto contenido de ácido benzoico, ácido



cinámico y cinnameína, dando un efecto cicatrizante, antiséptico y bactericida.

La sábila (*Aloe vera*), se clasifica como un demulcente (sustancia oleosa con acción protectora), también se utiliza como cicatrizante y antiinflamatorio ya que contiene aloína un glucósido antraquinónico. Otros extractos de plantas astringentes son utilizados en el tratamiento para la reparación de heridas como la hamamelis (*Hamamelis virginiana*) que debido a su contenido de taninos ayuda a la recuperación de lesiones cutáneas y quemaduras, y algunos extractos de plantas emolientes son menos utilizados, sin embargo también presentan un efecto terapéutico frente a la reparación dérmica como el almendro (*Prunus amygdalus*) presentando una actividad antiinflamatoria y el trigo (*Triticum aestivum L.*) con acción reepitelizante (López, 2003).

Recientemente se reportó la propiedad antiinflamatoria involucrada en el proceso de cicatrización de la planta *Artocarpus communis*, por medio del flavonoide artocarpina, éste mejoró la cicatrización de heridas en piel por medio de una activación rápida y acelerada de la fase inflamatoria, aumento la proliferación de fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos, incrementó la síntesis de colágeno y su maduración, así como una rápida reepitelización y angiogénesis (Yeh, 2017).

Se cuenta con varios productos de manera comercial que están encaminados a "cerrar" de manera rápida la herida dérmica, con el fin de evitar su contaminación y en algunos casos ayudar a la proliferación celular. Estos son elaborados con diferentes materiales como algodón, polímeros, y sus formas farmacéuticas son diversas, como geles, pomadas, apósitos, talcos. En el Cuadro 7, se enlistan algunos productos comercializados en territorio nacional (Diccionario de especialidades farmacéuticas: productos de laboratorios médicos PLM, 2017).



Cuadro 7. Productos a nivel nacional para el tratamiento de heridas.

Marca	Principios activos	Forma farmacéutica	Laboratorio	Propiedades farmacéuticas
Cicactive P.I.	Agua termal, Biabolol, cobre	Crema	Grupo venta internacional	Restauración del tejido epidérmico
Debrisan	Dextranómero	Polvo	Glaxosmith kline	Limpieza de heridas
Fibroquel	Colágeno	Esponja /Solución inyectable	Aspid	Agente hemostático y estimulador de la cicatrización
Hipoglos	Alantoína, ácido bórico, vitamina A (retinol) óxido de zinc	Pomada	Andrómaco	Quemaduras y heridas leves
Microdacyn	Ácido hipocloroso, cloro libre, litio, magnesio, sodio, hipoclorito de sodio.	Solución antiséptica	More Pharma	Limpieza de heridas
Nebapol	Bacitracina, neomicina, Polimixina B	Ungüento	Armstrong	Profilaxis de heridas
Cicafarm quemaduras	Caléndula, extracto proteico de caracol, rosa mosqueta, aceite de vitamina E (Tocoferol) y óxido de zinc	Crema	Farmapiel	Angiogénesis, deposición de hialuronano
Cutisorb sorbac	Sin información	Apósito	BSN Medical	Absorbente de líquido y cuidado de heridas
Dermabond	2-octalcianoacrilato de alta viscosidad	Pegamento	Johnson & Johnson	Cierre de heridas

Información tomada de PLM, 2017.

Por otro lado, el óxido de titanio (TiO₂) es un nanomaterial que ha sido investigado y reportado como auxiliar en la regeneración dérmica con la



disminución en la formación de cicatrices y las anomalías melanocíticas en piel, así mismo, se ha observado como un agente antiinfeccioso y antiinflamatorio dando como resultado la reducción del área de la herida expuesta ya sea por quemadura (Seisenbaeva, 2017) o por heridas crónicas como las de pie diabético (López, 2015). El TiO₂ también ha sido colocado en soportes formados por colágeno y quitosán potenciando las propiedades de estos para la reparación de heridas (Fan, 2016). Similar a ello, se investigaron las propiedades de un apósito nanocompuesto con quitosán, polivinil pirrolidona (PVP) y TiO₂, demostrando la biocompatibilidad con células fibroblásticas, eficacia antimicrobiana, aceleramiento en la cicatrización de heridas convirtiéndolo en un buen candidato para aplicación de curación de heridas (Archana, 2013).

AgNPs

Las propiedades ópticas de las nanoestructuras de plata resultan de su interacción única con la luz, lo que provoca una oscilación colectiva de sus electrones libres de la banda de conducción o de la llamada resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR) (Al-Ghamdi, 2014). El plasmón de resonancia de superficie tiene un papel importante en los espectros de absorción óptica en la caracterización de las nanopartículas metálicas, que cambian a una longitud de onda más larga con un aumento en el tamaño de partícula (Rai, 2009). El descenso de la oscilación de los electrones libres resulta en una fuerte dispersión de luz visible o en un decaimiento no radiativo que causa la conversión de la energía del fotón en energía térmica. Estos dos mecanismos de descomposición se han utilizado en herramientas para diagnóstico y formación de imágenes (Austin, 2014). El comportamiento de la resonancia del plasmón de superficie (SPR) de las nanopartículas de plata (AgNPs) depende del tamaño, de la forma, del entorno dieléctrico y de las interacciones electromagnéticas con las partículas que tienen en proximidad (Ren, 2007). Estos parámetros se pueden usar para sintonizar el pico de AgNPs en el intervalo de 393-738 nm o



de 500-1000 nm (Huang, 2010; Mahmoud, 2013). Por lo tanto, el SPR de las AgNPs resulta en una fuerte dispersión visible y absorción al infrarrojo cercano, lo que permite contar con terapias de láser fototérmicas y termolíticas (Braun, 2014; Wu, 2013; Shi, 2014). Además, las AgNPs podrían mejorar el efecto de la muerte de células cancerosas en la radioterapia (Zhao, 2012).

La propiedad microbicida de la plata en estado coloidal es conocida ampliamente, por lo que en la actualidad es utilizado como un antimicrobiano en diversas terapias, ya que presenta mayor eficacia antimicrobiana contra bacterias, virus y otros microorganismos eucariotas (Gong, 2007), en comparación con otros materiales como cobre, zinc, titanio, magnesio, oro, alginato de calcio (Retchkiman-Schabes, 2006; Gu, 2003; Ahmad, 2005).

El mecanismo de acción de la plata (Ag⁺) está relacionado con la interacción con los compuestos tioles que se encuentran en las enzimas respiratorias de las bacterias, y la afinidad que presentan a la pared celular, inhibiendo el proceso de la respiración bacteriana y la inactivación de sus proteínas (Liau, 1997; Feng, 2000; Klasen, 2000; Rosenkranz y Carr, 1972; Bragg y Rainnie, 1974; Schreurs, 1982). La propiedad antimicrobiana de este metal está relacionada con la cantidad y la tasa de liberación de la plata. La plata en su estado metálico es inerte pero reacciona con la humedad y los fluidos biológicos cambiando a un estado ionizado (Ojeda, 2013). La plata ionizada (Ag⁺) es altamente reactiva, y al unirse a las proteínas de la membrana nuclear de los microorganismos se facilita su internalización. Estudios sugieren que la plata se une tanto al ARN como al ADN, en este último produce su desnaturalización evitando la replicación. Cuando las moléculas de ADN están en estado relajado, la replicación puede realizarse de manera efectiva, pero cuando el ADN está en forma condensada pierde su capacidad de replicación por lo tanto, cuando los iones de plata penetran la bacteria el ADN se convierte en su forma condensada y pierde su capacidad de replicación que le conduce a



su muerte (Feng, 2000; Sondi y Salopek-Sondi, 2007; Morones, 2005; Song, 2006, Rai, 2009).

Cabe mencionar que la eficacia antimicrobiana de las AgNPs es por su gran área superficial lo que proporciona un mejor contacto con los microorganismos (Feng, 2000). Las NPs con diámetros menores a 10 nm interactúan con las bacterias y producen efectos electrónicos que mejoran la reactividad de las NPs. Así se comprueba que el efecto bactericida de las AgNPs es dependiente del tamaño (Kreibig y Vollmer, 1995; Mulvaney, 1996; Morones, 2005; Raimondi, 2005; Pal, 2007).

Otro factor importante para la eficacia antimicrobiana es la morfología de las AgNPs; las formas triangulares muestran inhibición bacteriana a una concentración de 1 µg, mientras que para las formas esféricas la concentración de plata efectiva es de 12.5 µg, las AgNPs en forma de varilla para tener un efecto deben manejarse en concentraciones en intervalos entre 50 y 100 µg. Por lo tanto, AgNPs con diferentes formas, tienen diferentes efectos sobre los microorganismos (Pal, 2007; Johnston, 2010).

En el campo biomédico las nanoestructuras de plata más utilizadas son esferas, hilos, varillas, placas y cubos (Rycenga, 2011). Las AgNPs dependen de las diferentes cargas superficiales de sus recubrimientos que puede afectar la interacción con los sistemas vivos con los que están en contacto (Chaloupka, 2010; Wei, 2015). La utilización de polivinil pirrolidona (PVP) en la síntesis de las AgNPs ayuda a controlar el tamaño de partícula, la tasa de nucleación es mucho más alta al aumentar la concentración de PVP. El PVP puede prevenir la aglomeración de las AgNPs, la concentración es crucial para el control del tamaño, observando una síntesis óptima con la concentración de 3 mM, ayudando a la producción de partículas pequeñas y evitando su aglomeración (Dung, 2012).

Se han reportado efectos perjudiciales a microorganismos después del



contacto con las AgNPs, y recientemente, se ha informado que son útiles para suprimir la replicación en células tumorales. Nuestro grupo, evaluó la actividad de estas frente a líneas celulares de linfoma L5178Y y de cáncer de mama con diferentes perfiles moleculares (MCF7, HCC1954, y HCC70), para el primero de los casos las líneas celulares se sometieron a diferentes concentraciones de AgNPs; observándose una concentración letal efectiva de 9 µg/mL, y para las líneas de cáncer de mama fue 12.5 µg/mL. En ambos casos se vio comprometida la proliferación celular, al dar un aumento en los porcentajes de apoptosis, inducida por un posible mecanismo de los efectos que podrían generar las lipoperoxidasas, así mismo, las AgNPs estimularon la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Yañez, 2014); al verse comprometida la viabilidad de la líneas celulares de cáncer de mama se puso de manifiesto un efecto proapoptótico que disminuyó su proliferación. Con lo observado, se puede concluir que las AgNPs son capaces de disminuir la proliferación y adhesión al aumentar el porcentaje de apoptosis (Rodríguez, 2018).

Apósitos de diferentes materiales como colágeno, silicón y seda han sido suplementados con AgNPs para el tratamiento de diversas patologías dérmicas como dermatitis de contacto y cicatrización de heridas infectadas; los resultados para el primer de los casos sugirieron que la plata tiene actividad antiinflamatoria que podría estar mediada por la reducción de la liberación de citocinas (Castillo, 2008; Nadworny, 2008; Tian, 2007) la disminución de la presencia de linfocitos y mastocitos (Boucher, 2008), ya que se observó la presencia de citocinas proinflamatorias como TGFβ y TNFα, similar al grupo control negativo en los grupos tratados con la plata nanocristalina. Por otro lado, en las investigaciones del uso de apósitos con AgNPs para la cicatrización se reportó la aceleración significativa en la tasa de cicatrización de heridas infectadas, el examen histológico reveló que se dio lugar a la reconstrucción exitosa de la epidermis (Yu, 2017), se redujeron los niveles de MMP-9 (Wright, 2002). En un estudio clínico en humanos los apósitos promovieron la curación de úlceras crónicas en piernas (Sibbald, 2007), esto podría deberse por la actividad antimicrobiana en



conjunto con la respuesta antiinflamatoria que ya se mencionó (Chaloupka, 2010).

Estudios *in vitro* con AgNPs y células implicadas en la regeneración de heridas dérmicas como fibroblastos y queratinocitos, han demostrado que no se afecta la proliferación celular, se redujo el crecimiento bacteriano y la inflamación, así mismo se demostró su atoxicidad (Lin, 2013; Wu, 2014; Zieger, 2017).

En nuestro grupo de investigación (Ojeda y cols.), se diseñó un compuesto de quitosano con AgNPs usado para el tratamiento de quemaduras, donde se demostró un efecto sinérgico de los materiales, y se observó un incremento en la síntesis de la matriz extracelular principalmente colágeno, al mejorar notablemente la cicatrización en quemadura. La elección de estos materiales fue por la biocompatibilidad del quitosano que ayuda a la reepitelización y a la regeneración del tejido y por la capacidad antimicrobiana de la plata (Ojeda, 2015).

Para poder llevar a las AgNPs al sitio de acción donde es requerida como principio farmacológico es necesario el uso de vectores, y aunque se han comentado algunos como el quitosán (Ojeda, 2015), colágeno (Fan, 2016), nanoplacas de silicato (Lin, 2013), con este activo, existen otros vectores como los liposomas, nanopartículas y nanoemulsiones poliméricas, nanopartículas de óxido de silicio con o sin poros, nanopartículas de óxido de hierro (Hu, 2012), nanotubos de carbono (Xia, 2009) o los dendrímeros carbosilano (Fuentes, 2015) entre otros, que se funcionalizan o son cargados con los agentes terapéuticos para llevar a cabo su acción.

SiO₂

Las cerámicas a base de óxido de silicio (SiO₂) se prepararon por primera vez por Hench en 1969 (Hench, 1971). Desde entonces se han proporcionado investigaciones en el área biomédica, con diferentes vertientes de estudio.



Desde el punto de vista biológico y químico las cerámicas de óxido de silicio exhiben muchas propiedades asociadas con un material ideal para injertos y para el diseño de soportes. Esta característica ha promovido nuevas perspectivas para cerámicas basadas en SiO₂ como biomateriales de 3ra. generación para la regeneración en especial del tejido óseo. A principios de los años noventa, fueron preparados por el proceso de sol-gel (Li, 1991), hoy en día se tiene una amplia gama de preparación por diversos métodos como hidrólisis y polimerización de hidróxidos metálicos, alcóxidos, sales inorgánicas y métodos electroquímicos (Arcos, 2013).

El SiO₂ tiene varias particularidades que cada día hace que sea más interesante para ser utilizado como biomaterial. A partir del año de 1995, se han incrementado las publicaciones que demuestran que en función de su tamaño puede ser bioactivo, bionerte o biodegradable. Así mismo, se tienen diversas investigaciones que apuntan a la velocidad de la disolución de este material en fluidos biológicos (Canham, 1997; Park, 2009; Sailor, 2012; Santos, 2014; Quin, 2014).

El SiO₂ se degrada en todos los fluidos corporales, a excepción de los jugos gástricos, por tanto, es biodegradable. Esta propiedad es primordial ya que éste se disuelve y los productos de desecho se aclaran vía renal, por lo tanto el cuerpo no lo acumula. La degradación del SiO₂ libera ácido silícico, Si(OH)₄, que se difunde libremente por los tejidos (Figura 12). Además es la forma natural del silicio en nuestra dieta y nuestro cuerpo; la ingesta media diaria de silicio en los países occidentales es de 20-50 mg/día (Park, 2009; Sailor, 2012).

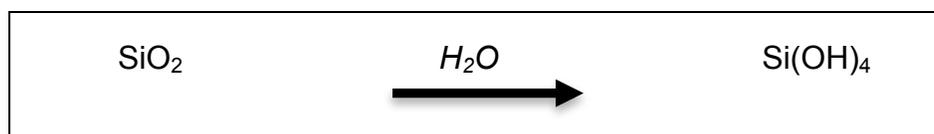


Figura 12. Reacción para la formación del ácido silícico.

El SiO₂ al reaccionar con el agua de los fluidos biológicos produce el ácido silícico

Las principales aplicaciones del SiO₂ en medicina se dan en las áreas de



administración de fármacos, sustitución ósea e ingeniería de tejido y dispositivos implantables para detección o tratamiento de enfermedades. Hoy en día se sabe de diversos productos con SiO₂ con aplicaciones médicas o biológicas, los cuales son elaborados por empresas vinculadas a centros de investigación y universidades de prestigio en el campo científico por mencionar algunas tenemos a PsiVida, Siemens Ag, Bosch, Biosante, Nutrelase y Orthovita entre otras. La FDA en el año 2005 aprobó algunos medicamentos que contienen el óxido de silicio modificado o tratado convenientemente para lograr su biocompatibilidad como puede ser el tratamiento con Retisert[®] o Vitrasert[®] para enfermedades oculares (Sailor, 2012).

El SiO₂ en los últimos años ha tenido una función importante en la vectorización de fármacos principalmente quimioterapéuticos (Wang, 2008; Park, 2009) por su elevada biocompatibilidad.

En la terapia de regeneración dérmica recientemente se han reportado efectos benéficos cuando se utilizan NPs con este material, se observó que al estar en contacto los fibroblastos con pequeñas cantidades de NPs de SiO₂ (NPSiO₂) (hasta 0.5 µg/mL), se tuvieron efectos beneficiosos ya que aumenta su proliferación y actividad metabólica, se mejoró su capacidad de curación de heridas *in vitro*. Se ralentizó el envejecimiento, lo que indica que a bajas dosis las NPSiO₂ pueden ser hormetinas potenciales, que ejercen efectos horméticos benéficos inducidos por el estrés a través de una mejor supervivencia, mantenimiento, reparación y mejor desempeño funcional (Mytych, 2016).

Así mismo, estudios en un modelo experimental con ratones, demostraron una aceleración en el proceso de cicatrización, se observó una rápida mejoría en la disminución de la herida mediante mecanismos de contracción y de reepitelización; así mismo se mostró una mejor diferenciación y estructura de las capas multiestratificadas en los tejidos de los animales tratados con un composito de SiO₂-PVP, con respecto al grupo control (Ferenc, 2017). En un modelo *in vitro* de fibrogénesis, las NPSiO₂ porosas con un diámetro de 50 nm



mostraron un efecto antioxidante reduciendo las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Morry, 2015).

Toxicidad de nanomateriales: AgNPs y MSiO₂

La propiedad antimicrobiana de la plata hoy en día es bien conocida, y está relacionada la citotoxicidad por la elevación del estrés oxidativo al disminuir el glutatión (GSH), el superóxido dismutasa (SOD), aumento de la peroxidación lipídica y radicales libres y fragmentación del ADN (Zhang, 2014). Sin embargo aun es controversial este tema con respecto a las NPs y las células sanas eucariotes, por un lado se tienen reportes de ser citotóxicas, al involucrar disfunción mitocondrial, inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), causando daño en el ADN y aberraciones cromosómicas en fibroblastos (AshRani, 2012). Por otro lado, en células como macrófagos, se observó que la toxicidad depende del tamaño de partícula a diámetros mayores de 10 nm disminuye la toxicidad (Pratsinis, 2013), así mismo conforme a su morfología y a los diferentes mecanismos de internalización de la célula se manifiesta la toxicidad, por ejemplo, las nanovarillas ejercen efectos citotóxicos a diferencia de las esferas, ya que las primeras llegan a tener contacto con las células y es difícil su internalización debido a su estructura y pueden atravesar de manera cortante la membrana, por otro lado, con las esferas se da el mecanismo de internalización con efectos insignificantes para la célula (Zhang, 2014). Otros reportes indican efectos antiinflamatorios al verse disminuida la expresión de citocinas proinflamatorias como TGFβ y TNFα (Boucher, 2008; Lara, 2010)

Por otra parte con respecto al SiO₂, son varios los reportes que indican que son inertes y no causan daño a las células (Park 2009; Mohamed, 2011) sin embargo, recientes reportes apuntan un grado de toxicidad con este material.

Se observó que las NPSiO₂ con un diámetro de 70 nm penetraron el estrato córneo de la piel y estas fueron captadas por queratinocitos y las células de Langerhans, en 2010 el grupo que observó lo anterior, realizó investigaciones



para aclarar la relación entre el tamaño de partícula, la distribución y la respuesta celular en la línea de células de Langerhans epidérmica de ratón XS52, con tratamientos de partículas con diámetros de 70, 300 y 1000 nm. Los resultados sugieren que a menor tamaño inducen una mayor toxicidad contra las células de Langerhans, lo cual se correlacionó con la cantidad de captación de partículas en las células (Nabeshi, 2010). Por otro lado, se reportó que las partículas de tamaño de 10 nm tienen un fuerte impacto en la viabilidad celular y pueden ser observados efectos genotóxicos; las partículas con tamaños más grandes no afectan la actividad celular (Quignard, 2012). Recientemente se publicó un estudio enfocado a la administración dérmica de fármacos analizando el perfil toxicológico *in vitro*, la captación celular y la localización intracelular de las NPSiO₂ de diferentes tamaños (20-500 nm) en queratinocitos humanos (K17) y en fibroblastos dérmicos humanos (HDF); los resultados apuntan a diferentes perfiles toxicológicos entre las dos líneas celulares de acuerdo a la captación que realizan de la NPSiO₂, es decir la fagocitosis se presenta para K17 y la endocitosis para HDF. Se observó que el tamaño de partícula fue relevante para considerarlas tóxicas sobre toda a las que poseen un diámetro de 20 nm, por lo tanto, si su tamaño de partícula es relativamente grande decrece su toxicidad dependiendo del mecanismo de internalización que se presente (Vicente, 2017). La disminución del tamaño de partícula aumenta la permeabilidad de la piel del NPs de SiO₂, pero notablemente poco se observa irritación de la piel (Matsuo, 2016).

Aunque se busca que las NPs sean vectores localizados de fármacos también es una realidad que en la actualidad se busca la reducción en el uso de antibióticos debido al brote de enfermedades infecciosas causadas por diferentes bacterias patógenas y el desarrollo de resistencia a los antibióticos, la industria farmacéutica está en la búsqueda de agentes antimicrobianos más efectivos.

Para el tratamiento de heridas dérmicas, el uso compartido de un metal



como lo es la plata y un cerámica como el SiO₂, supondría un efecto sinérgico ya que como se ha mencionado la plata con sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, su capacidad de incrementar la producción de MEC principalmente colágeno, su atoxicidad en células dérmicas y su respuesta proapoptótica frente a células tumorales. Por otro lado, el SiO₂ aumenta la proliferación y actividad metabólica celular y es auxiliar en la contracción de la herida y en su reepitelización, sin embargo, con este material debería cuidarse su diámetro ya que a menor tamaño resultan tóxicas, contrariamente a los efectos observados en las nanopartículas de plata. Su uso compartido podría beneficiar el proceso de cicatrización, al utilizar el SiO₂ a un nivel micrométrico y de la plata en un intervalo nanométrico.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las heridas dérmicas de primera intención representan una alta incidencia epidemiológica superando los 2'600,000 al año en México. La regeneración dérmica óptima de la lesión depende de varios factores como son edad, género, genética, presencia de enfermedades crónicas-degenerativas, hábitos alimenticios y sociales del paciente; así como la intensidad, profundidad y extensión de la lesión. Las cicatrizaciones anómalas se pueden suscitar por influencia nociva de los factores anteriores al desencadenar por un lado una cicatrización retráctil o bien una cicatrización hipertrófica, esta última puede desencadenar las llamadas cicatrices queloides.

La Nanomedicina nos brinda direccionar terapias para el tratamiento específico de enfermedades y patologías localizadas; el uso de ella nos da la oportunidad de utilizar agentes terapéuticos localizados que puedan moderar de forma benéfica los procesos fisiológicos de la regeneración tisular como son: inflamación, formación del tejido de granulación, contracción de la herida y reparación.

Así mismo es importante que estos agentes terapéuticos sean capaces de permanecer en la herida de manera prolongada y efectiva hasta lograr una reparación apropiada y sería de gran utilidad que tuvieran actividad antibiótica para evitar infecciones localizadas, daño séptico y resistencia a antibióticos sintéticos. Adicionalmente se busca que los vectores sean de sencilla fabricación, estables, esterilizables y de fácil aplicación por el médico.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El uso del nanocompuesto de MSiO₂-AgNPs induce una regeneración dérmica dinámica, debido a la estimulación de la producción de matriz extracelular, producción de vasos sanguíneos y por la disminución de la inflamación y cicatrización en la piel?



JUSTIFICACIÓN

La piel es un órgano de protección que recubre toda la superficie corporal. Cuando se sufre una lesión en este tejido se inicia con un proceso de regeneración tisular llevada a cabo por varias etapas que involucran: inflamación, formación de tejido de granulación, contracción de la herida y reparación; en este proceso pueden presentarse fallas que den anomalías en la cicatrización.

Las heridas dérmicas en su mayoría son de primera intención originadas por cirugías, sin embargo no debe descartarse la cifra que surge de heridas causadas por accidentes o quemaduras, denominadas como de segunda intención, a nivel nacional se obtuvo una cifra de 485,862 casos en 2017, y para Jalisco ascendió la cifra en 2017 a 31,526 casos.

Se buscan tratamientos que se puedan dirigir de forma selectiva y segura al tejido dañado con el objetivo de reparar la herida proporcionando una rápida recuperación, minimizando su cicatrización y maximizando la funcionalidad del tejido reparado.

En la búsqueda de biomateriales que puedan acelerar el proceso de cicatrización destacan los polímeros, aunque recientemente se tienen reportes de materiales metálicos como la plata que puede mediar el proceso de reparación celular y su propiedad antimicrobiana ya conocida, por otro lado también existen nuevas investigaciones en las que se destaca el uso de SiO₂ observando efectos benignos que ayudan a la proliferación celular.

Con el uso de un nanocompuesto formado con MSiO₂ y con AgNPs se aspira a producir efectos benéficos en los procesos de inflamación, formación de tejido de granulación, contracción de la herida y reparación.



HIPÓTESIS

El nanocompuesto formado por MSiO₂-AgNPs modulará la inflamación, estimulará la producción de matriz extracelular (colágeno), y aumentará la proliferación de fibroblastos y de vasos sanguíneos en la reparación de heridas dérmicas experimentales.

OBJETIVOS

General

Estudiar los efectos en la reparación de heridas experimentales en piel tratadas con un nanocompuesto a base de AgNPs depositadas en microesferas de SiO₂.

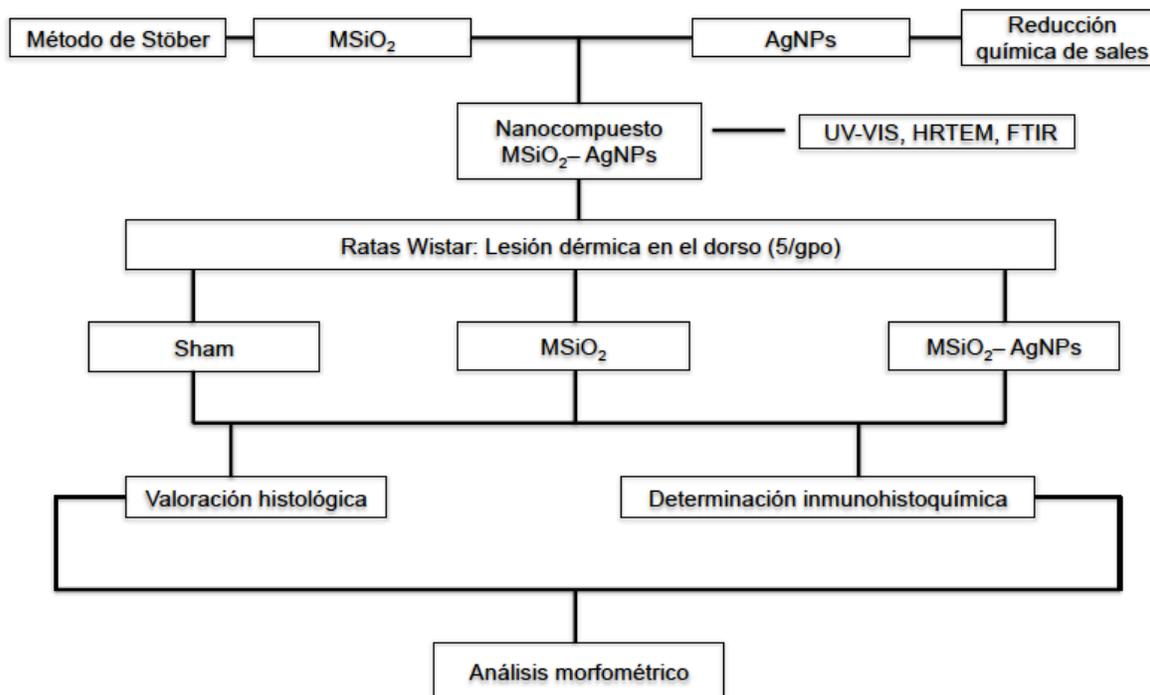
Particulares

1. Sintetizar y caracterizar el nanocompuesto de MSiO₂-AgNPs.
2. Determinar la evolución macroscópica de la lesión en los animales experimentales antes y después del tratamiento.
3. Describir la citoarquitectura dérmica durante la reparación tisular en los animales experimentales antes y después del tratamiento.
4. Determinar la presencia de IL-6, TNF α , PCNA α SMA y VEGF en el proceso de reparación tisular experimental con y sin tratamiento con el nanocompuesto de MSiO₂-AgNPs.



MÉTODOS EXPERIMENTALES

Diagrama experimental



Síntesis de nanopartículas de plata coloidal AgNPs

Las nanopartículas de plata (AgNPs) fueron proporcionadas por el Centro de Investigación en Nanociencias y Nanotecnología del Centro Universitario de los Valles (CUValles). Las cuales fueron sintetizadas por reducción química de sales y el uso de polivinil pirrolidona (PVP) como agente estabilizante. La formación de las nanopartículas (NPs) se pudo observar mediante el cambio de color en la mezcla a color amarillo-ámbar. Su formación se verificó por espectroscopía UV-VIS (Ayyapan 1997; Creighton 1979; Kerker 1984).



Síntesis del nanocompuesto de MSiO₂-AgNPs

Las MSiO₂-AgNPs se prepararon por el método de Stöber (Stöber 1968, Ung 1998), el cual se basa en la hidrólisis del tetraetil ortosilicato (TEOS). Para llevar a cabo la síntesis, se colocó NH₃ a 11.9 M, etanol (88.1 mL) y 0.5 mL de AgNPs a concentración 5.224×10^{-3} M, una vez mezcladas a 20 °C de temperatura, se agregó 3.6 mL de TEOS, el sistema en conjunto se mantuvo en agitación. Llevada a cabo la reacción, la mezcla se mantuvo en agitación por 15 horas. El resultado de la dispersión sólido-líquido fue centrifugado 30 minutos a 3000 rpm, y se secaron a 60 °C por 4 horas. Así mismo, se prepararon MSiO₂ sin las AgNPs, como se describió previamente (Stöber 1968, Ung 1998).

Caracterización del nanocompuesto de MSiO₂-AgNPs.

Una vez obtenidas las nanoestructuras de MSiO₂-AgNPs y MSiO₂ se caracterizaron por técnicas adecuadas.

a) UV-VIS

El espectro UV-VIS de la muestra se obtuvo en una cubeta de cuarzo de 1 mL, utilizando un espectrofotómetro de UV-Vis Cary 300 (Agilent®) en el intervalo de 200-800 nm. Se utilizó BaSO₄ como referencia. Con esta técnica se buscó determinar la presencia de las AgNPs sobre el soporte de MSiO₂, debido al plasmón de resonancia que presenta la plata.

b) HRTEM

El análisis de HRTEM se llevó a cabo en un microscopio electrónico JEM-2010FF FASTEM operado a 200 kV (Marca Thermo®). Las muestras se disolvieron en isopropanol y fueron depositadas en una celda de cobre, malla 300 y se secaron con aire y fueron analizadas por HRTEM.

c) FTIR

Las muestras fueron mezcladas con bromuro de potasio y examinadas directamente en su estado sólido pulverizado sin otro tratamiento. Los



compuestos fueron caracterizados en un espectrofotómetro FTIR-Varian 660 (Agilent®). El espectro puso en evidencia los grupos funcionales presentes en el enlace que se da entre las AgNPs y el soporte de MSiO_2 , con ello se determinó el anclaje de los componentes del nanocompuesto.

Diseño experimental en el modelo animal

El modelo experimental y ensayos subsecuentes se realizaron en el Laboratorio de Patología (Investigación) del Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS).

- **Diseño del estudio:** prospectivo experimental
- **Unidad de observación:** todos los análisis fueron realizados en muestras de piel de los especímenes.
- **Universo de trabajo:** se utilizaron un total de 15 ratas macho ($n=15$) de la cepa Wistar con un peso entre 180 y 200 g, proporcionadas por el bioterio del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara

Los animales fueron aleatoriamente asignados a los grupos experimentales con 5 individuos por grupo:

- Solo cirugía, sin tratamiento (sham)
- Tratadas con las MSiO_2
- Tratadas con el nanocompuesto de MSiO_2 -AgNPs.

Modelo experimental

Un total de 15 ratas de la cepa Wistar, machos, entre 180-200 g de peso, se mantuvieron en jaulas individuales con comida cotidiana y agua *ad libitum*. Los animales se resguardaron en las instalaciones del bioterio de la Universidad de Guadalajara, todos ellos fueron tratados bajo los principios éticos, a la NOM-062-ZOO-1999 y al manual de manipulación de animales de experimentación y enseñanza de Falconi de La Fuente y col., 2010. Para realizar la herida dérmica, bajo condiciones estériles, las ratas fueron anestesiadas con 120 mg de



ketamina por kg de peso del animal. Se rasuró la piel del área dorsal se delimitó con un marcador especial el área de la incisión, la cual fue desinfectada con una solución de etanol al 70%, luego se realizó una incisión paravertebral longitudinal de 1 cm de longitud a través de la piel en la parte posterior descrita por Ehrlich & Hunt y cols. (Ehlich, 1968). Las heridas no fueron cubiertas con apósitos. Los animales fueron aleatorizados y divididos dentro de los tres grupos de tratamiento con 5 individuos cada uno. Dos de los grupos de ratas recibió 1.6 µg aproximadamente y fueron evaluados después de 12 días post-cirugía. Un grupo control sin tratamiento fue incluido en el estudio. Después de transcurridos los 12 días de tratamiento los animales fueron sacrificados previamente anestesiados con una sobredosis de ketamina.

Consideraciones éticas:

Todos los animales recibieron alimento y agua *ad libitum* y se mantuvieron bajo condiciones controladas de bioterio, con una temperatura de 23 ± 2 °C, humedad relativa del $50\% \pm 10\%$, controlando los periodos de luz y oscuridad. El manejo de los animales fue de acuerdo a la *NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.*

Evolución macroscópica de la lesión tisular

La evolución de la herida se verificó al observar el acercamiento de los bordes, el proceso inflamatorio a nivel macroscópico en la etapa de ruborización, así mismo se observó la presencia de pelo en el animal, finalmente se midió la marca de la herida con ayuda de un vernier (Mitutoyo®, modelo 500-784) en cada grupo experimental para determinar la recuperación del tejido durante el estudio.



Valoración histológica

Para los análisis histológicos, se obtuvo una porción de tejido cutáneo dañado para análisis histológico e inmunohistoquímico. El tejido se sumergió en paraformaldehído (4%, pH 7.4) durante aproximadamente 5 minutos. Después de eso, los especímenes biológicos se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes de 5 µm de espesor.

Los cortes histológicos se colorearon con tinciones de hematoxilina y eosina (H&E), tricrómica de Masson (TM) y rojo sirio (RS). Con el fin de visualizar la microarquitectura tisular, identificar el infiltrado inflamatorio, amplitud y profundidad de la lesión (H&E), formación de matriz extracelular (TM) y presencia de fibras de colágena (RS).

Las muestras se desparafinaron en horno (Caisa®, modelo 12-27) a temperatura de 56 °C durante 30 min, enseguida la deshidratación se llevó a cabo en baños de xilol, alcohol y agua de acuerdo al siguiente esquema:

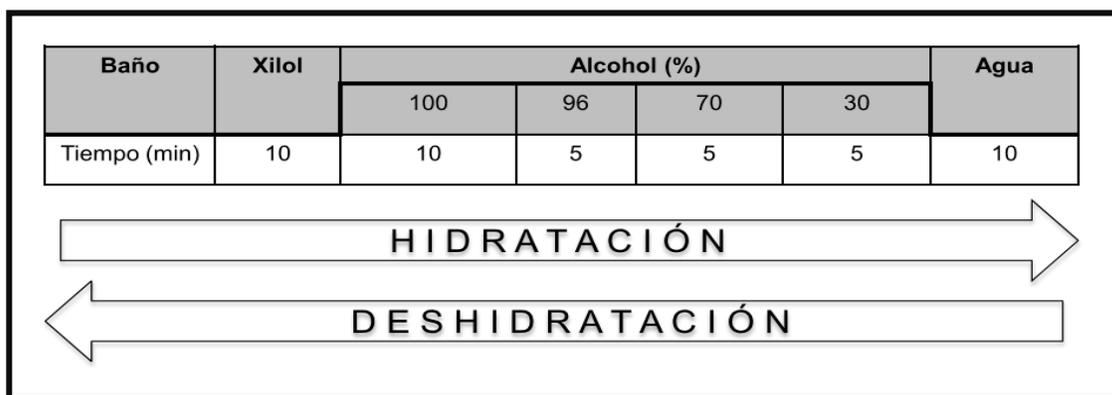


Figura 13. Esquema general de hidratación y deshidratación de los tejidos. Técnica de hidratación-deshidratación para los tejidos previo a sus tinciones y tratamientos por inmunohistoquímicas.

Posterior a ello se procedió a la tinción con los diferentes colorantes, con los esquemas:



a) Hematoxilina & eosina:

Baño	Hematoxilina	Agua	Solución alcohólica de HCl (0.5% HCl/etanol absoluto)	Agua	Eosina	Agua
Tiempo (min)	3-5	0.5	0.5/3 veces	2	3-5	2

b) Tricrómica de Masson

Baño	Hematoxilina	L	Agua	Fucsina de Ponceau	L	Ácido Fosfo - molibdico 1%	L	Azul de anilina	L
Tiempo (min)	3-5	0.5	0.5	5	0.5	5	0.5	10	0.5

L: Lavado, consiste en sumergir la laminilla en agua acética al 1% y después en agua corriente por 5 s, cada uno.

c) Rojo sirio

Baño	Rojo sirio	Agua
Tiempo (min)	60	1

Los cortes para H&E y TM fueron nuevamente deshidratados en los baños de solventes mencionados en la Figura 13. El montaje se realizó con una resina (Merck-Millipore, cat:107961)

Determinación inmunohistoquímica

Se realizaron varias inmunohistoquímicas para determinar la presencia en el tejido de las principales proteínas involucradas en el proceso de cicatrización (IL-6, TNF α , PCNA, α SMA y VEGF), de manera general los cortes fueron tratados con el siguiente procedimiento:

Las muestras se desparafinaron en un horno (Caisa®, modelo:12-27) a una



temperatura de 56 °C durante 30 min, después los cortes fueron hidratados en los solventes de acuerdo a la Figura 13.

En una vaporera (Euroline®, mod: Vida sanaeuro) con agua destilada se colocaron la laminillas con buffer citrato en un vaso coplin, y se dejó evaporar durante 35 min. Una vez recuperado el corte se lavó con PBS o TBST (PBS: IL-6, α SMA, PCNA; TBST: TNF α , VEGF) durante 5 min y se dejaron secar al aire.

El bloqueo se realizó con peroxidasa al 3% durante 10 min, se realizó un lavado con PBS o TBST, se secó y se colocó suero al 2% (de acuerdo al kit del proveedor) durante 5 min, posterior a ello se secaron las laminillas.

Se incubaron con el anticuerpo primario (correspondiente a cada proteína) a 4°C *overnight* (ON), en un recipiente hermético con el fin de cubrir el corte. Transcurrido el tiempo se realizó un lavado con PBS o TBST por goteo y luego por inmersión en vaso de coplin. En el Cuadro 8 se muestran los anticuerpos utilizados y las diluciones correspondientes en PBS-Albúmina.

Cuadro 8. Anticuerpos primarios utilizados en las inmunohistoquímicas.

Anticuerpo	No. de catálogo Abcam	Buffer de lavado	Dilución	Especie
IL-6	ab6672	PBS	1:100	Rabbit
TNF α	ab9739	TBST	1:125	Rabbit
PCNA	ab92552	PBS	1:100	Rabbit
α SMA	ab7817	PBS	1:100	Mouse
VEGF	ab1316	TBST	1:100	Mouse

Los cortes se incubaron con su correspondiente anticuerpo secundario (de acuerdo a la especie) durante 20 min. En el Cuadro 9 se muestran los números de catálogo de los kits utilizados para el revelado de la inmunohistoquímica, con base a la especie en la que están desarrollados los anticuerpos primarios usados, posterior a ello los cortes fueron lavaron con PBS o TBST.



Cuadro 9. Kits de revelado para las inmunohistoquímicas.

Especie	No. de catálogo Vectastain	Especie anticuerpo secundario
Rabbit	PK-6101	Goat
Mouse	PK-6102	Horse

Se cubrieron los cortes por 15 min con el complejo de avidina-biotina (ABC) de acuerdo a las indicaciones del proveedor de los kits mencionados anteriormente para generar la reacción con la Diamino bencidina (DAB) (Sigma®, cat: D4293) con la cual se dejó reaccionar durante 10 min, previo lavados con PBS o TBST. Una vez evidente la marca se procedió al lavado con agua destilada de los cortes, por goteo y en vaso coplin.

Se realizó contratinción con hematoxilina durante 1 min, se lavó el corte con agua corriente y después en vaso coplin durante 3 min.

Se deshidrató el tejido en la cadena de solventes de la Figura 13. Se montó con una resina (Merck-Milliporer,cat:107961) y se dejó secar a temperatura ambiente.

El análisis morfométrico se llevó a cabo mediante la fotodocumentación de 10 campos por tejido por animal, para cada tinción e inmunohistoquímica realizada, al observar en el primer caso el área positiva al marcaje, y para las inmunohistoquímicas se realizó se manera semi-cuantitativa. Se utilizó un microscopio de luz clara a un aumento de 4X, 10X o 40X. (Labomed®) con ayuda de una cámara adaptada al microscopio (OPTISUM®, mod: DCM-900 de 9.0 Mpx)



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

UV-VIS

Las espectroscopías UV-VIS de las AgNPs, MSiO_2 y MSiO_2 -AgNPs se muestran en la Figura 14, las bandas de absorbancia que se observan se deben a la resonancia del plasmón de superficie (SPR) de las AgNPs soportadas en las MSiO_2 . De manera inicial se realizó la caracterización de las AgNPs (Figura 14a), en la cual se observó una señal en 412 nm; en el nanocompuesto se presenta un cambio en dicha señal (shifting) y la señal apareció a 426 nm, se asocia a la emisión del SPR de la plata (Figura 14b) (Creighton, 1979; Kerker 1984). Esta banda se debe por el acoplamiento entre la oscilación de la nube electrónica en la superficie de las AgNPs y la incidencia electromagnética en el régimen cuasiestático. Las MSiO_2 no mostraron este pico característico de absorción, ya que carece de la presencia de AgNPs en una longitud de onda de 200-800 nm.

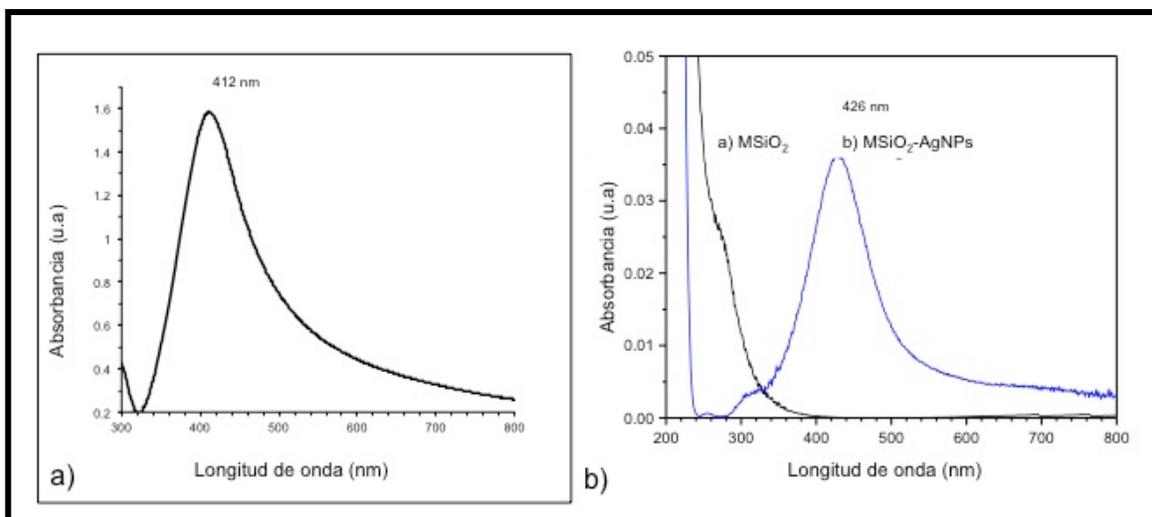


Figura 14. Espectro de absorción de las nanoestructuras de MSiO_2 -AgNPs

a) Espectro UV-Vis de AgNPs y b) Espectro de absorción del nanoconstructo de MSiO_2 -AgNPs mostró una banda a 426 nm debido al plasmón de la plata (b), en comparación con las MSiO_2 . (a).



HRTEM

El análisis estadístico del tamaño de las AgNPs reveló un diámetro promedio de 3 nm, como se puede ver en el histograma de distribución del tamaño de partículas mostrado en la Figura 15, la distribución del tamaño de la muestra no sigue el comportamiento predicho por el ancho de banda del plasmón. El tamaño y la forma final de las partículas metálicas dependen del grado de nucleación, crecimiento e interacción con el agente estabilizador de PVP.

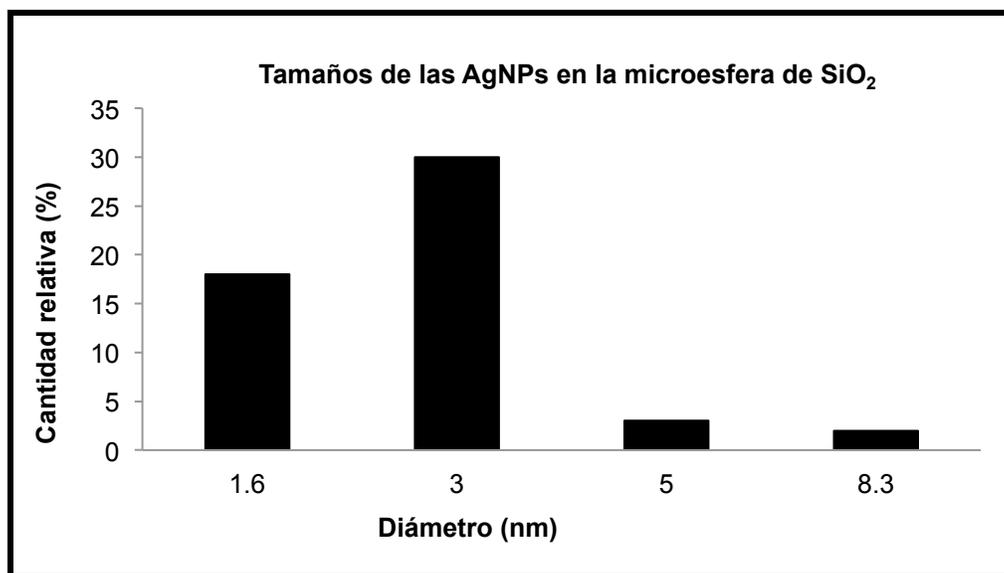


Figura 15. Gráfica con la distribución del tamaño de partícula de las AgNPs.

Se observó un diámetro representativo de 1.6 a 3 nm, con baja incidencia poblacional de tamaños entre 5 y 8.3 nm. Cabe mencionar que sólo se tomaron en cuenta nanopartículas de plata depositadas sobre las microesferas de SiO_2 , y las poblaciones por abajo de 1.6 y por arriba de 8.3 nm fueron descartadas.

En las imágenes del HRTEM mostradas en la Figura 16 se observan algunas de las esferas con un diámetro aproximado de 300 nm que componen la matriz amorfa de SiO_2 , de baja cristalinidad que soportan las AgNPs como evidencia por las correspondientes imágenes de campo brillante y oscuro. En todas las muestras, se produjo una agregación parcial de las partículas de SiO_2 , para lo cual la especie de Ag formó inicialmente agregados de forma irregular



compuestos de nanocristales individuales (de 2-8 nm) soportados sobre la superficie del óxido de silicio.

Estos agregados se mantienen juntos a lo largo de una red porosa irregular. Debe señalarse que la descomposición de la sal precursora de AgNO₃ y la sucesiva formación y depósito de AgNPs sobre la superficie del óxido de silicio es inmediata. Las partículas se encontraron dispuestas de manera uniforme en la superficie de las MSiO₂, con una forma casi esférica. Sin cambios en el tamaño medio de partícula y la cobertura de la superficie de óxido de silicio de una muestra a otra. El confinamiento de las AgNPs se dió en la matriz del óxido de silicio junto con su adsorción en la superficie externa de las esferas del SiO₂.

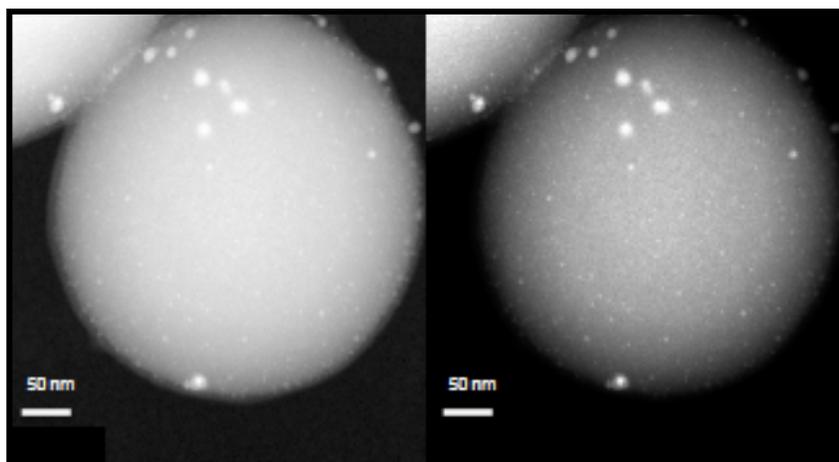


Figura 16. Microfotografías por HRTEM.

Las imágenes de HRTEM exhibieron microesferas de SiO₂ de aproximadamente 300 nm decoradas con las AgNPs.

Las imágenes capturadas en el HRTEM fueron analizadas por mediciones de densidad óptica (procesamiento de imagen binaria de blanco y negro), al calcular el área de cada nanopartícula de plata se obtuvo su tamaño promedio con ayuda del programa Image J (Figura 15).

Es importante hacer notar que el tamaño de las MSiO₂ supondría una baja toxicidad en el sistema vivo, debido a diversos reportes donde se observó que a



menor tamaño de partícula resultan ser tóxicas con tamaños de 10 y 70 nm, a mayor tamaño como 300 y 1000 nm no se observa toxicidad a las células de los sistemas vivos. Para el caso de las MSiO₂ utilizadas en este trabajo, debido a que presentaron un tamaño aproximado de 300 nm y de acuerdo a publicaciones recientes se pudieran considerar como no tóxicas o de toxicidad baja (Nabeshi 2010, Quignard, 2012; Matsuo, 2016; Vicente, 2017). Sin embargo, aún es necesario estudios de nanocompuestos, con estructuras de SiO₂ unidos a otros materiales, como en este caso con AgNPs, donde se demuestre su interacción con los mecanismos celulares relacionados a la regulación del ciclo celular, apoptosis, identificación molecular, expresión de proteínas y vías de señalización que participen en el daño celular.

FTIR

En los espectros de FTIR de las muestras de MSiO₂ y MSiO₂-AgNPs (Figura 17) se observaron bandas expresadas en porcentaje de transmitancia a 1630, 3400 y 3600 cm⁻¹ debido a las vibraciones del grupo funcional O-H, las cuales pueden ser asociadas al remanente de los grupos de superficie Si-OH, solos o en interacción con las moléculas de agua fisisorbida en las paredes de los poros de estos materiales. La banda correspondiente a la vibración de estiramiento Si-O de los enlaces Si-OH aparece entre 954 y 810 cm⁻¹, la banda del Si-O-Si aparece de 1000 a 1130 cm⁻¹ (McDonald, 1958). Así mismo, las bandas de extensión de Ag-Ag aparecieron de 500 a 550 cm⁻¹ (Al-Ghamdi, 2014). Sin embargo, aunque no se observan enlaces Ag-O-Si, la división y el desplazamiento de las bandas observadas para las MSiO₂-AgNPs indican la formación de este tipo de enlaces (Karunagaran 2009, Angelito-Baños, 2004).

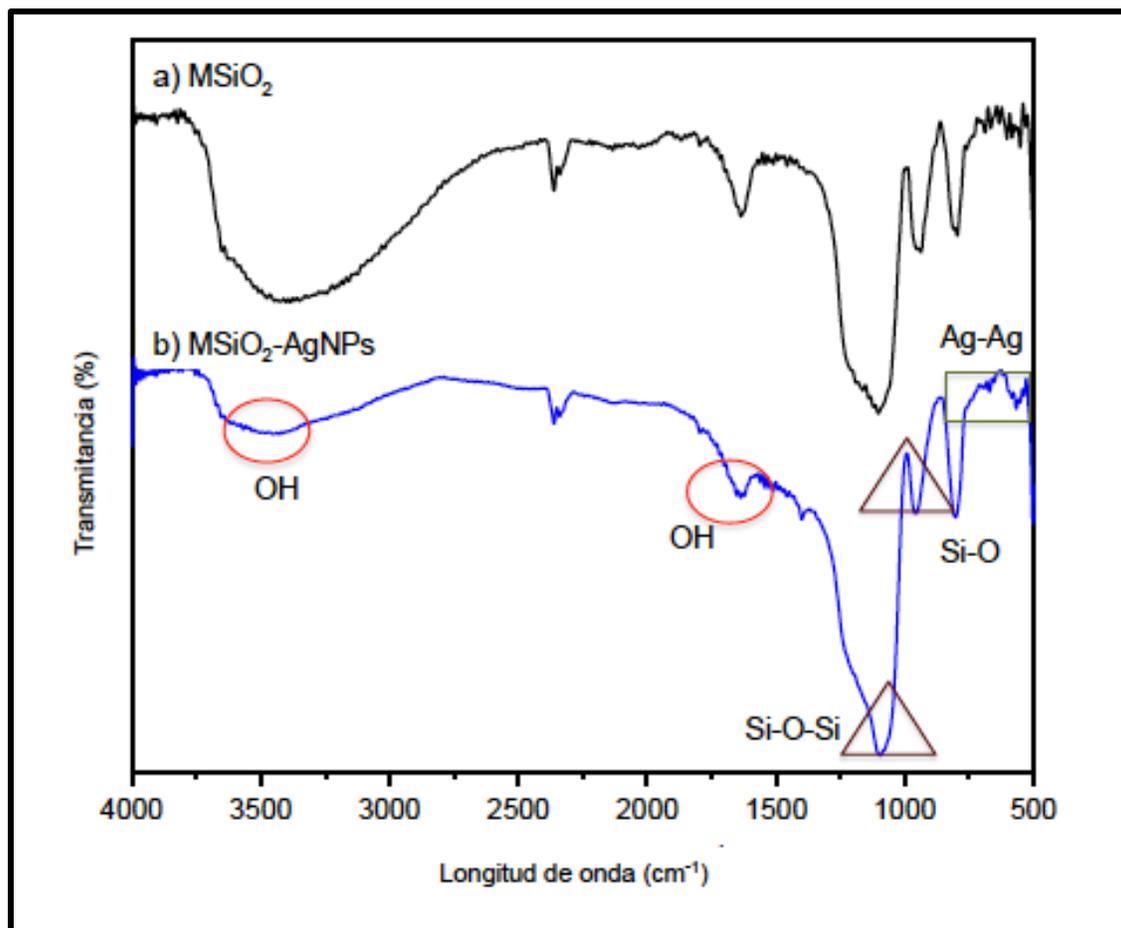


Figura 17. Espectro FTIR.

La línea negra muestra el FTIR de las MSiO_2 , la línea azul muestra el nanocompuesto de MSiO_2 -AgNPs. A 1630 , 3400 y 3600 cm^{-1} se observó el grupo funcional OH (círculos); a 954 y 810 cm^{-1} , a 1000 y 1130 cm^{-1} el grupo funcional de Si-OH (triángulos), a 500 - 550 cm^{-1} se puede atribuir el enlace de extensión de Ag-Ag (cuadro).

Evolución macroscópica de la lesión tisular

Después de la herida y tras la exposición al tratamiento con las MSiO_2 y el nanocompuesto de MSiO_2 -AgNPs se evaluó al término del tiempo de exposición la lesión, se observó que en los tres grupos la herida cerró adecuadamente, sin embargo para el grupo sham se obtuvo una cicatriz de mayor grosor con respecto a los otros dos grupos, la lesión se observó de un color rosado lo cual podría ser efecto aún del proceso inflamatorio y en algunas zonas se observa todavía la escara. En el grupo tratado con las MSiO_2 se observó con menor coloración, y con una cicatriz ya con presencia de algo de pelaje, para el grupo



tratado con el nanocompuesto de MSiO₂-AgNPs se observó una absoluta recuperación, la regeneración tisular fue aparente en la herida y la zona donde se realizó el daño no se observó inflamada, y el pelaje cubrió gran parte de la zona afectada (Figura 18).

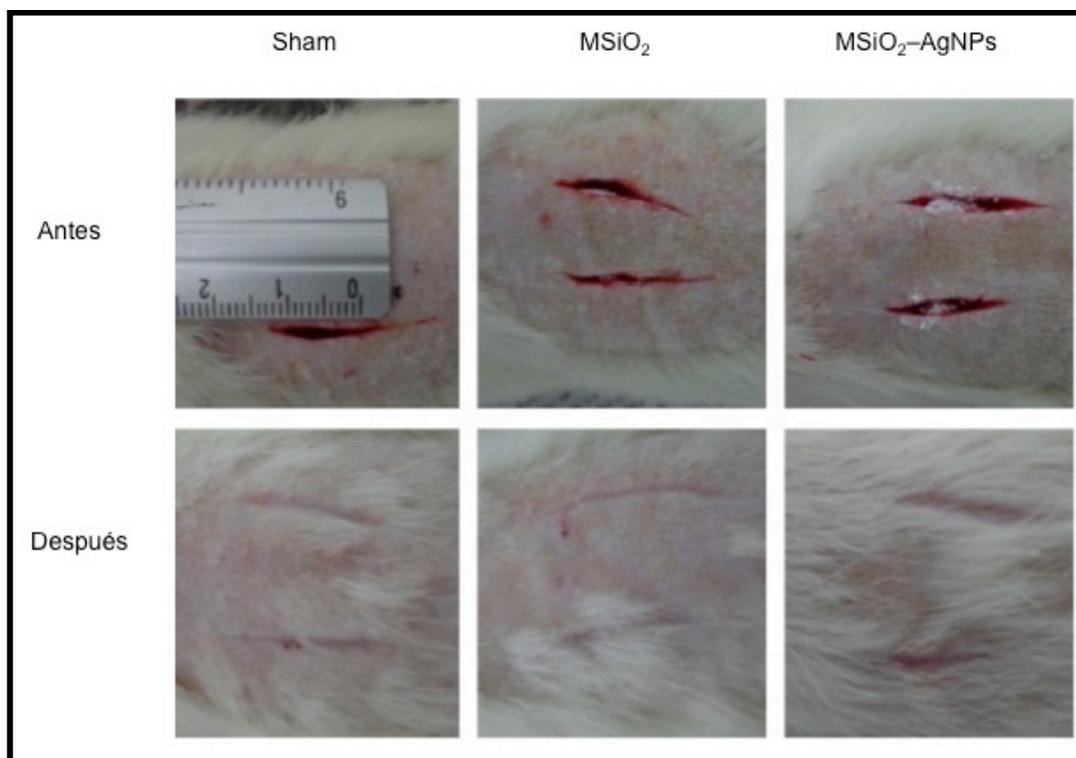


Figura 18. Progreso de la herida realizada, antes y después del tratamiento. Para el grupo sano se observó coloración rojiza y un poco de la costra aun, el grupo tratado con SiO₂ se observó con mejoría, y el grupo tratado con SiO₂-AgNPs se apreció notablemente recuperado.

Valoración histológica

Los cortes histológicos mostraron un tejido en vías de recuperación, para el grupo sham se observó amplitud y profundidad de la herida en proceso de regeneración, para el grupo tratado con las MSiO₂ la herida en apariencia fue más estrecha, con respecto al grupo sham, pero con más amplitud en la zona media de la dermis comparado con el grupo tratado con el nanocompuesto de MSiO₂-AgNPs, este último grupo mostró una ligera diferencia en la epidermis siendo más delgada en comparación con los dos grupos anteriores. Una gran



cantidad del infiltrado celular se observó en el grupo sham a diferencia de los grupos tratados, siendo en menor cantidad en el grupo tratado con el nanocompuesto de MSiO₂-AgNPs (Figura 19 A-C, tinción H&E).

Otro aspecto importante que destacó fue la presencia de matriz extracelular (color azul) con la tinción de Masson, se observó una importante disminución en la presencia de células que conforman la MEC, y un incremento de tejido sano (color rojo) con abundante presencia de vasos sanguíneos, folículos pilosos y glándulas sebáceas para el grupo tratado con el nanocompuesto MSiO₂-AgNPs, si se compara con la poca cantidad que existió en los otros dos grupos: sham y MSiO₂. Para el grupo tratado con MSiO₂, se observó formación de nódulos en la zona contigua a la hipodermis en comparación con los otros dos grupos de estudio (Figura 19 D-F, tinción tricrómica de Masson).

La existencia de fibras de colágena se observó en los tres grupos siendo muy similares en tonalidad para el grupo sham y el grupo tratado con MSiO₂, (rosáceo) dicho color es indicativo de colágeno, y el tono rojizo observado en el grupo tratado con el nanocompuesto de MSiO₂-AgNPs sugiere la presencia de colágeno denso presente en las etapas avanzadas de la cicatrización, (Senet, 2007) estos resultados proponen un incremento en la producción de colágeno dando un proceso de reparación acelerada con el uso del nanocompuesto de MSiO₂-AgNPs (Figura 19 G-I).

Los resultados presentados evocan una recuperación por arriba de la esperada con el grupo tratado con el nanocompuesto de MSiO₂-AgNPs, con respecto al grupo control. Las AgNPs sugieren una aceleración en la producción y degradación del colágeno ya que las fibras observadas, en la etapa temprana de la regeneración se hacen presentes el colágeno tipo I y III que ayudan a la formación de fibras y en la fase de epitelización, una etapa intermedia, se cuenta con la presencia de colágeno tipo IV y VII que proporciona estabilidad mecánica a las células (Senet, 2007).



Varios informes han sugerido que el SiO_2 puede influir en la síntesis de colágeno, la proteína con más presencia en la matriz extracelular (Reffit, 2003; Puri, 2009), y la plata origina un alineamiento del colágeno, lo que puede dar como resultado la obtención de mejores propiedades mecánicas del tejido durante la cicatrización (Kwan, 2011). Así mismo, Ma y col., afirman que el SiO_2 en macrófagos alveolares podría inducir la expresión génica de MMP-9 dando un efecto directo a la remodelación de la matriz extracelular en un estado de reparación tisular (Ma, 2005).

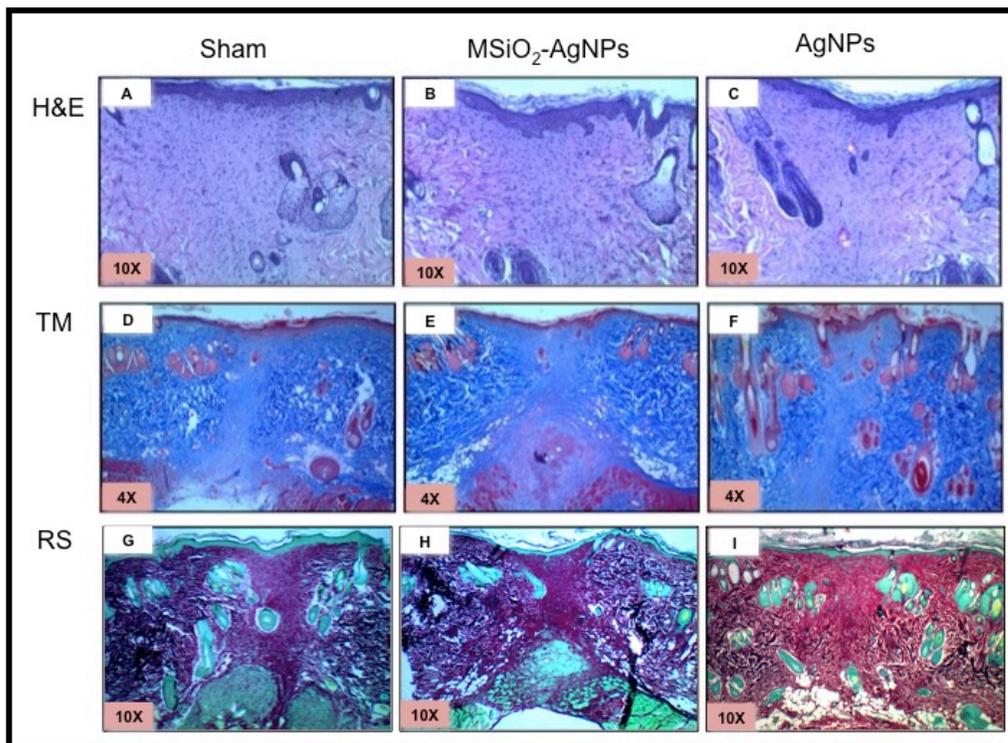


Figura 19. Tinciones TM, H&E, RS.

En el panel fotográfico se muestran las tinciones utilizadas, de A-C, se tiene tinción de H&E en donde se puede observar la citoarquitectura de la zona de la lesión, para el grupo sano se apreció gran amplitud de la herida en comparación con los grupos tratados, siendo menor en el grupo tratado con el nanocompuesto, así mismo se observó el infiltrado celular, producto de la inflamación. En las fotografías de D-F se tiene la tinción tricrómica de Masson para el grupo sano se observó gran producción de la matriz extracelular de color azul, y para los grupos tratados se observó la presencia de tejido sano en color rojo, siendo más aparente en el grupo tratado con el nanocompuesto. En el último panel de G-I se tiene la tinción con rojo sirio en la que se observó producción de colágeno de tipo fibrilar en el grupo sano con una coloración rosáceas y en el grupo tratado con SiO_2 y un colágeno más denso, el cual se hace presente en la etapa intermedia en la cicatrización notando su color rojizo.

Determinación inmunohistoquímica

El análisis inmunohistoquímico mostró la presencia de citocinas proinflamatorias como IL-6, en el grupo sham se observó abundante presencia de células expresando la citocina IL-6, en mayor proporción en la zona de la dermis cercana a la epidermis, para el grupo tratado con las MSiO_2 se observó la expresión de IL-6 con menor intensidad que el grupo sham, sin embargo fue mayor la expresión comparado con el grupo tratado con el nanocompuesto de MSiO_2 -AgNPs (Figura 20).

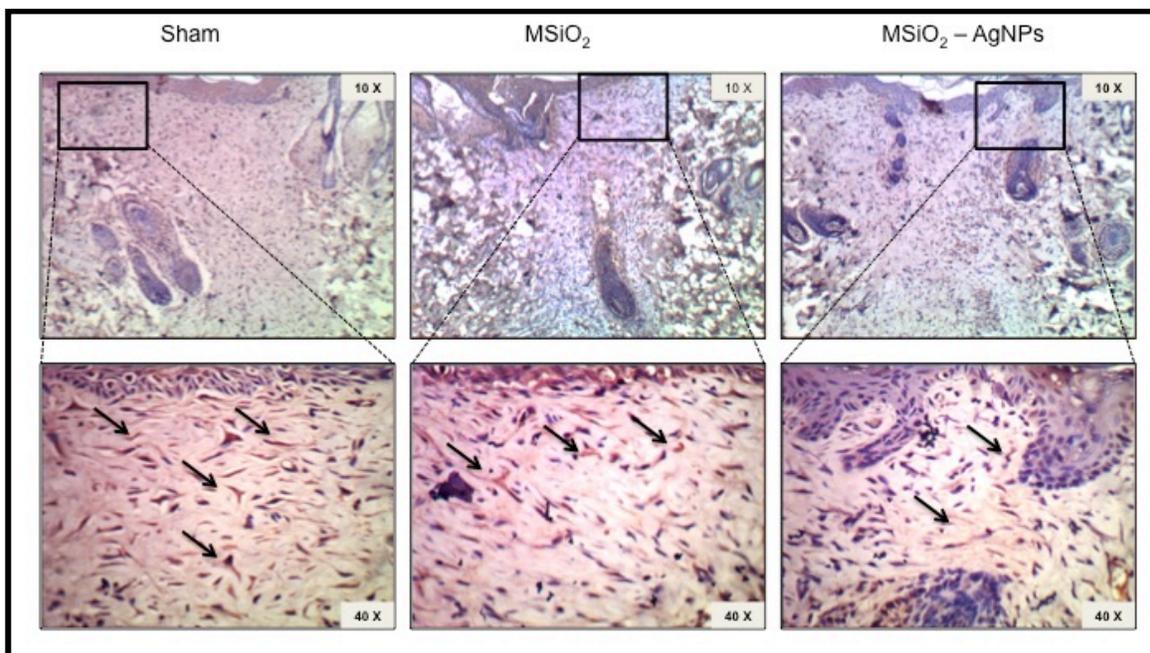


Figura 20. Inmunohistoquímica para IL-6.

En este panel se muestra la expresión de IL-6 marcado con DAB (color marrón) a una magnificación de 10X, y su ampliación a 40X, se observó mayor presencia de células expresando la proteína mayormente en el grupo sano y en el grupo tratado con MSiO_2 , siendo menor la presencia en el grupo tratado con el nanocompuesto de MSiO_2 -AgNPs.

El grupo tratado con las MSiO_2 mostró la formación de folículos linfoides a diferencia del grupo sham y el tratado con el nanocompuesto de MSiO_2 -AgNPs (Figura 21).

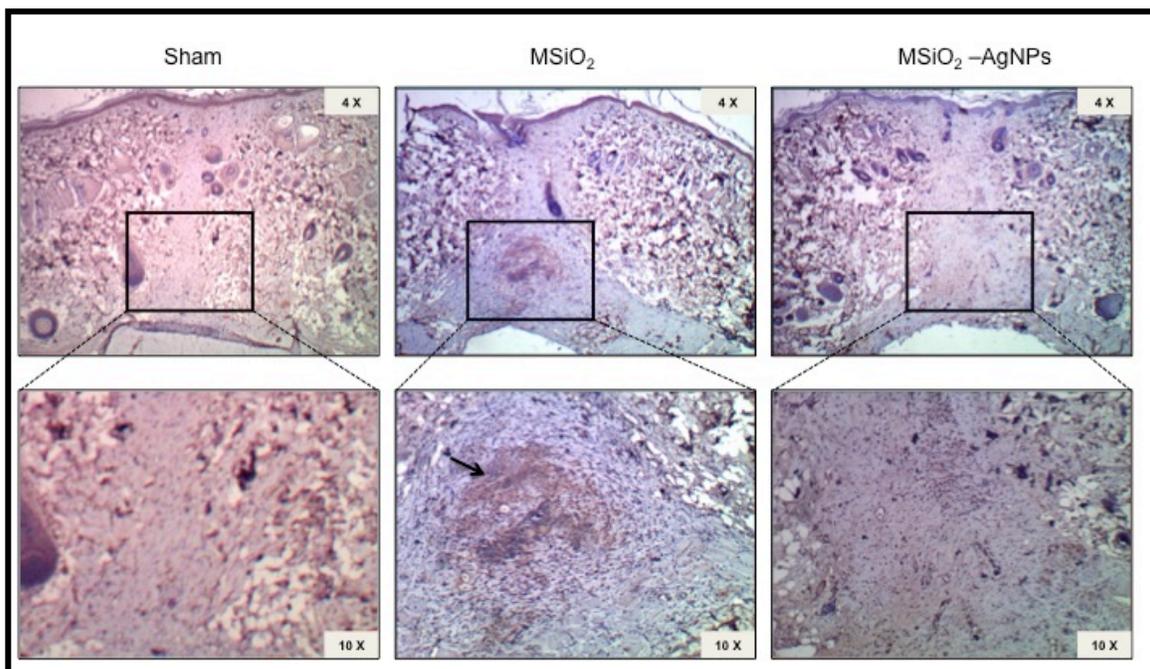


Figura 21. Inmunohistoquímica para IL-6 (2).

En este panel se muestra la presencia de un folículo linfoide a 4 X y su ampliación a 10X del grupo tratado con las MSiO₂ y la ausencia de éste en el grupo sham y tratado con el nanocompuesto de MSiO₂-AgNPs.

Con respecto a la expresión de TNF α , el grupo sham mostró una gran expresión, los grupos tratados se observaron muy similares en la expresión, aunque en la amplitud del daño es menos aparente en el grupo tratado con el nanocompuesto (Figura 22).

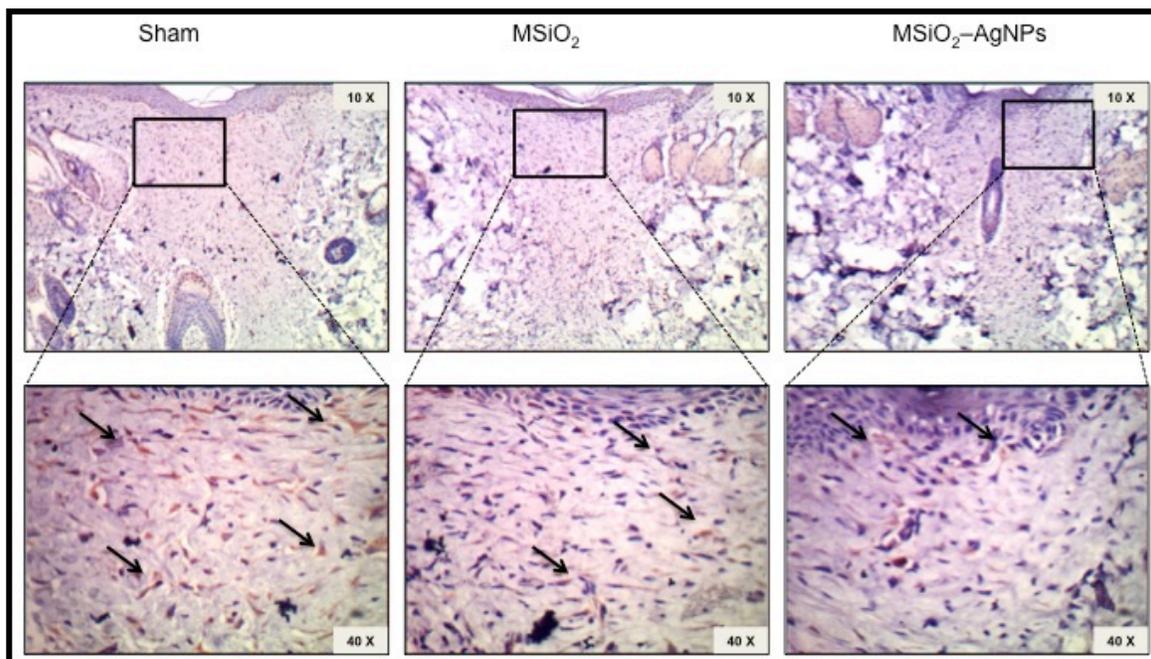


Figura 22. Inmunohistoquímica para $\text{TNF}\alpha$.

En este panel se muestra la expresión de $\text{TNF}\alpha$ marcado con DAB (color marrón) a una magnificación de 10X, y su ampliación a 40X, se observó mayor presencia de células expresando la proteína mayormente en el grupo sham y en el grupo tratado con MSiO_2 , siendo menor la presencia en el grupo tratado con el nanocompuesto de MSiO_2 -AgNPs.

El proceso inflamatorio se presenta a escasas horas de haberse presentado el daño y dura hasta 9 días (Senet, 2007; Eming, 2014) en el grupo tratado con el nanocompuesto de MSiO_2 -AgNPs, se observó que la presencia de IL-6 y $\text{TNF}\alpha$ se ve disminuida, lo que es indicativo de aceleración en el proceso de regeneración, sin embargo, la presencia de la interleucina mencionada en el grupo tratado sólo con las MSiO_2 fue aparente, incluso se observó la formación de folículos linfoides. Aunque se ha reportado que las NSiO_2 intervienen en la modulación de la inflamación (Kang, 2000). Por otro lado, estudios reportados estiman a la plata como un elemento antiinflamatorio (Chaloupka, 2010). Nuestros resultados apuntan a este hecho, sin embargo, es interesante recabar más información para ver que proceso se desencadena como alternativa a la inflamación para el reclutamiento de células involucradas en la reparación y obtener información contundente de la intervención que tiene el SiO_2 en el



proceso inflamatorio y si puede atribuirse a un efecto benéfico o nocivo su uso de forma pura, es decir no en nanocompuesto.

Se determinó un incremento notable de la proliferación celular tanto epidérmica como endodérmica para las muestras de los tejidos de los animales tratados con el nanocompuesto MSiO₂-AgNPs. Para el grupo tratado con las MSiO₂, se apreció una disminución en la multiplicación celular siendo similar al grupo sin tratamiento (Figura 23).

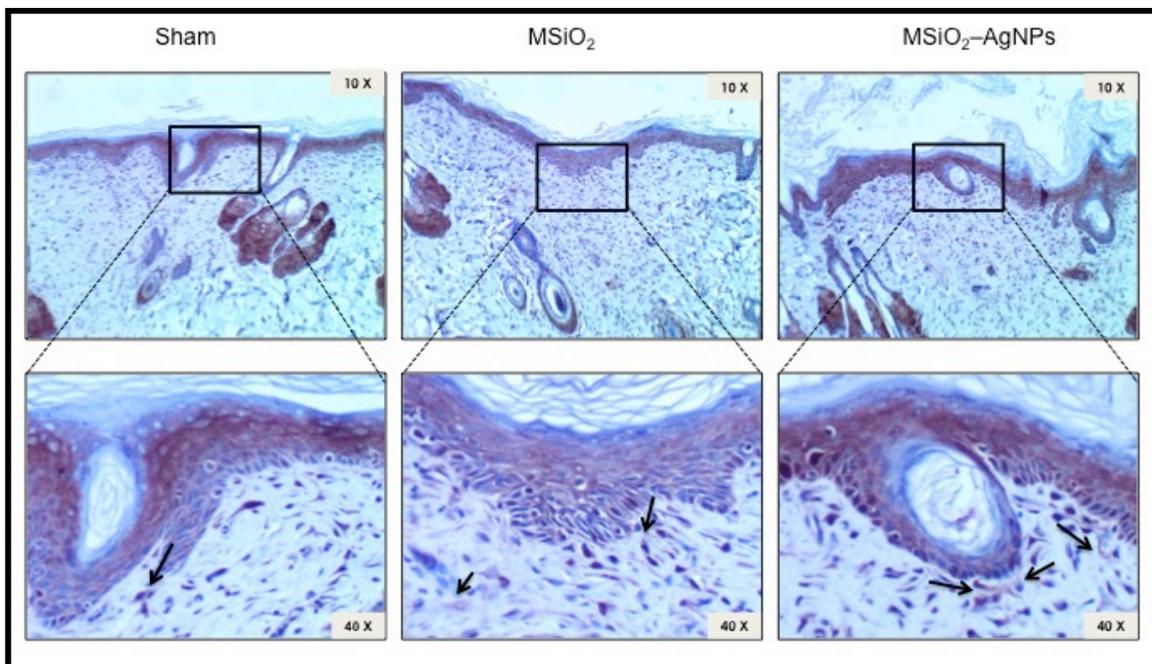


Figura 23. Inmunohistoquímica para PCNA.

En este panel se muestra la expresión de PCNA marcada con DAB (color marrón) a una magnificación de 10X, y su ampliación a 40X, se observó mayor presencia de células expresando la proteína mayormente en el grupo tratado con el nanocompuesto MSiO₂-AgNPs, siendo menor la presencia en el grupo sano y el tratado con el MSiO₂.

Se observó un marcado aumento de las células α SMA positivas (miofibroblastos) en el grupo tratado con el nanocompuesto MSiO₂-AgNPs, estas células se ubicaron alrededor de los vasos sanguíneos, en congruencia con las observadas en la Figura 19, que resultaron ser las más abundantes (Figura 24).

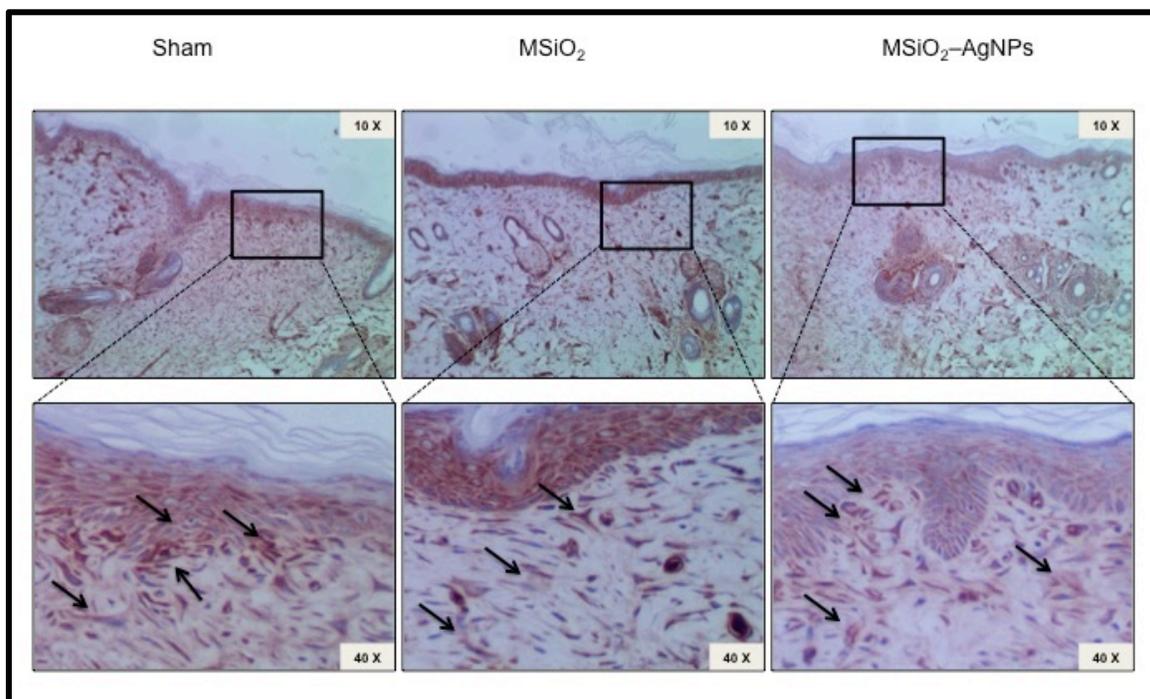


Figura 24. Inmunohistoquímica para α SMA.

En este panel se muestra la expresión de α SMA marcado con DAB (color marrón) a una magnificación de 10X, y su ampliación a 40X, se observó mayor presencia de células expresando la proteína mayormente en el grupo tratado con el nanocompuesto MSiO₂-AgNPs, siendo menor la presencia en el grupo sham y el tratado con el MSiO₂.

La presencia de plata sugiere la proliferación celular, en específico de queratinocitos, que podrían estar asociadas a un moderado incremento de los niveles (concentración) de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Duan, 2017), así mismo algunos autores han reportado efectos de las AgNPs en la proliferación celular de fibroblastos y queratinocitos (Tian, 2007; Liu, 2010).

En nuestros resultados sólo determinamos la presencia de proliferación sin especificar el tipo celular presentado, sin embargo, con α SMA observamos la presencia de miofibroblastos, mayormente en el grupo tratado con el nanocompuesto de MSiO₂-AgNPs.

En la zona superior de la dermis, fue observado el proceso de angiogénesis en el grupo sham con mayor intensidad en comparación con el grupo tratado con las MSiO₂, en el grupo tratado con en nanocompuesto fue casi imperceptible la



presencia de células marcadas, no obstante, en la zona inferior dérmica, se observó la presencia de células con expresión del factor de crecimiento VEGF, para los dos grupos que recibieron tratamiento (Figura 25).

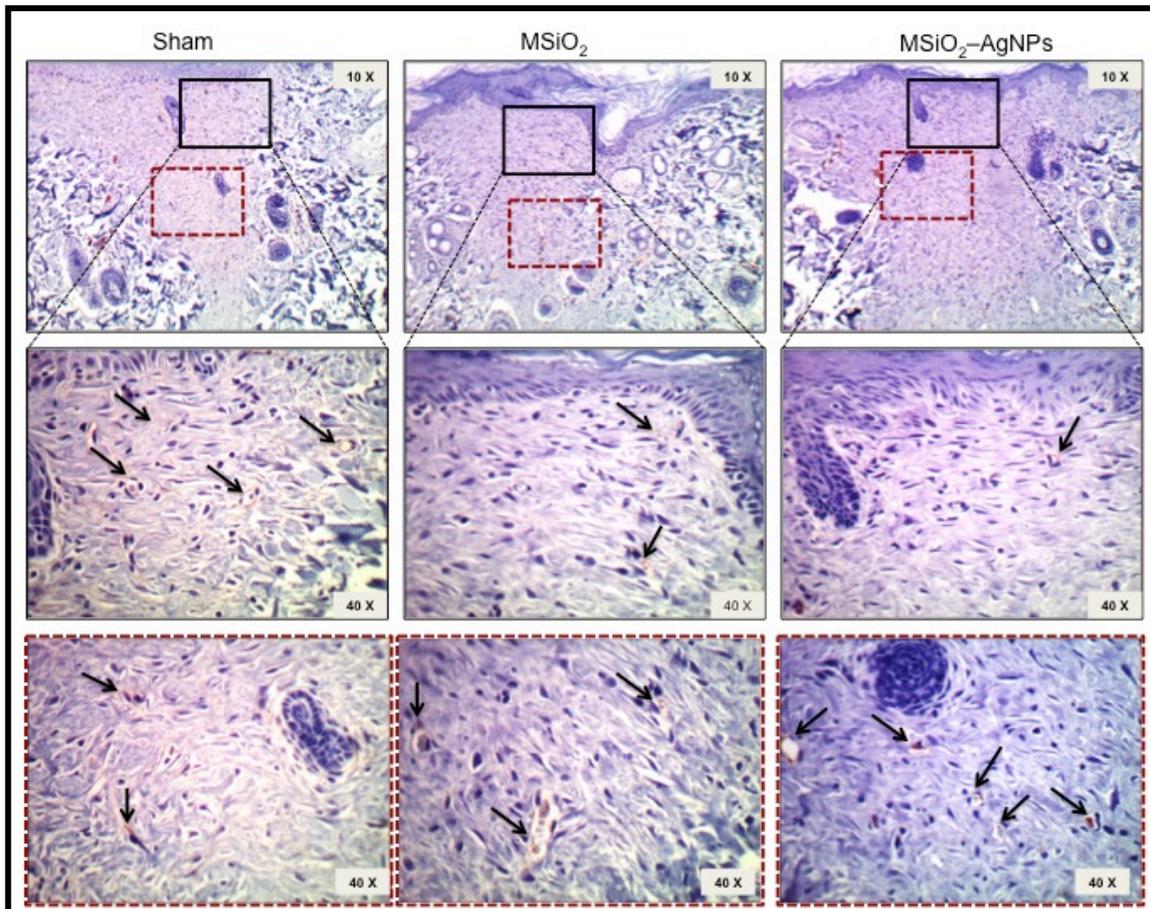


Figura 25. Inmunohistoquímica para VEGF.

En este panel se muestra la expresión de VEGF marcado con DAB (color marrón) a una magnificación de 10X, y su ampliación a 40X, se observó mayor presencia de células expresando la proteína mayormente en el grupo sham en la zona cercana a la epidermis, escasamente se observó la expresión de la proteína en los grupos tratados con las MSiO_2 y el nanocompuesto de MSiO_2 -AgNPs. Aunque, para estos dos últimos se apreció la expresión de la proteína en la zona de la dermis media, siendo pobre la formación de vasos sanguíneos en el grupo sham.

En 2015 Wei y col., describieron a las AgNPs con propiedades antiangiogénicas (Wei, 2015), contrariamente las NPSiO_2 se han reportado con propiedades moduladoras de la angiogénesis (Detsh, 2014; Ring, 2010) así



como que puede estimular significativamente el incremento en la secreción de factores de crecimiento incluido VEGF (Keshaw, 2005), que posterior estimulan la proliferación de fibroblastos y células endoteliales (Gerwins, 2000; Day, 2005) Mao, 2014)

En nuestros resultados observamos una baja presencia de VEGF en la zona cercana al epitelio para los dos grupos que recibieron el tratamiento con MSiO₂ o con el nanocompuesto de MSiO₂-AgNPs con respecto al grupo sham, sin embargo, en la zona de hipodermis se observó gran formación de vasos sanguíneos en el grupo tratado con el nanocompuesto MSiO₂-AgNPs.

El nanocompuesto de MSiO₂-AgNPs, mejora el proceso de cicatrización de las heridas dérmicas experimentales. Se observó un importante efecto benéfico en la curación de las heridas de los animales tratados con las MSiO₂, y con MSiO₂-AgNPs, con este último se obtuvieron mejores resultados, al observarse un incremento en la presencia de folículos capilares, disminución de la inflamación; a nivel histológico se observó una disminución significativa de la matriz extracelular, un estado de remodelación más avanzado y ordenado, así como la presencia de abundantes vasos sanguíneos, y un aumento en la producción de proteínas de la matriz extracelular, lo que es indicativo de un estado avanzado de la reparación.

Los resultados antes mostrados, demuestran efectos positivos de la aplicación de un nanocompuesto conformado por MSiO₂-AgNPs, es prometedor para proporcionar un tratamiento efectivo y directo para diversas afecciones dérmicas.



CONCLUSIONES

- ✓ Se obtuvieron poblaciones homogéneas del nanocompuesto formado por AgNPs soportadas en microesferas de SiO₂.
- ✓ La caracterización realizada permitió determinar que el nanocompuesto presenta morfología esférica, con la presencia de las AgNPs soportadas en las microesferas de SiO₂.
- ✓ El nanocompuesto MSiO₂-AgNPs indujo de manera favorable la reparación tisular experimental en el grupo tratado con el nanocompuesto en comparación a los grupos controles.
- ✓ En el grupo tratado con el nanocompuesto de MSiO₂-AgNPs, a nivel histológico se observó que la matriz extracelular fue más organizada y con presencia de tejido sano y por la presencia de colágeno denso, en comparación con los grupos control.
- ✓ Molecularmente, se observó aumento en la proliferación celular fibroblástica y miofibroblástica, determinadas con la presencia de PCNA, αSMA. De igual manera, en el grupo experimental (tratado con MSiO₂-AgNPs) mostró la presencia de VEGF y la aparente formación de vasos sanguíneos, lo cual indica un proceso de angiogénesis superior comparado con los grupos sin tratamiento.
- ✓ El proceso inflamatorio, en el grupo tratado con el nanocompuesto de MSiO₂-AgNPs, se vio atenuado con poca presencia de infiltrado inflamatorio y presencia disminuida de citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNFα), en comparación con el grupo que no recibió tratamiento.
- ✓ Con los resultados obtenidos, se concluye que el tratamiento con AgNPs soportadas en MSiO₂ ayuda a mejorar y acelerar el proceso de cicatrización, y este puede ser una perspectiva para la aplicación en la terapia de heridas.



PERSPECTIVAS

1. Estudiar el comportamiento fisiológico de las heridas dérmicas experimentales en modelos sanos, a diferentes tiempos y etapas durante la evolución de la reparación tisular.
2. Determinar la acción de otros factores de crecimiento como podrían ser: TGF β , PDGF, bFGF y KGF.
3. Delimitar la interacción de los queratinocitos durante el proceso de reparación y su respuesta (1-120 días).
4. Determinar la posible interacción del nanocompuesto MSiO₂-AgNPs con la vía de señalización TGF β /Smad, y la regulación de la actividad de metaloproteínas y sus inhibidores.
5. Realizar estudios con modelos experimentales de procesos patológicos:
 - a) De heridas crónicas como: pie diabético, quemaduras, etc; ya que puede restaurar de manera acelerada la cicatrización.
 - b) De cicatrices hipertróficas y en queloides, debido a la reciente relación que se ha visto de las AgNPs al promover la apoptosis en células tumorales.



BIBLIOGRAFIA

- Ahmad Z, Pandey R, Sharma S & Khuller GK. (2005). Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potential. *Ind J Chest Dis Allied*, 48,171–176.
- Akhavan O & Ghaderi E. (2009). Bactericidal effects of Ag nanoparticles immobilized on surface of SiO_2 thin film with high concentration. *Current Applied Physics*. 9, 1381-1385.
- Álvarez E, Baiuk V, Acosta D, Flores-Morales C, Puente I, Bassiouk M et al. (2010). Microwave irradiation of pristine multi-walled carbon nanotubes in vacuum. *J Nanosci Nanotechnol* 10 (1), 448-455.
- Al-Ghamdi H & Mahmoud W. (2014). Synthesis of self-assembly plasmonic silver nanoparticles with tunable luminescence color. *Journal of Luminescence*. 145, 880-883.
- Angelito-Baños J, Barreiro-Rodríguez G, Avilés-Arellano L & González-Hernández J, (2004). Structural Characterization of Silver Doped Silica prepared by two different wet chemical methods. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 30(2) 89-94.
- Archana D, Singh B, Dutta J & Dutta P. (2013). In vivo evaluation of chitosan-PVP-Titanium dioxide nanocomposites as wound dressing material. *Carbohydr Polym*, 5, 95(1) 530-539.
- Arcos D & Vallet-Regí M. (2013). Bioceramics for drug delivery. *Acta Materialia* 61 890-911.
- Arenas J. 2003. Las heridas y su cicatrización. *Dermatología* 22(5).
- Arosemena A & Arosemena R. (2007). Actualización sobre el queloides y la cicatriz hipertrófica, *Acta terapéutica Dermatológica*, 30, 238.
- AshaRani P, Sethu S, Lim H, Balaji G, Valiyaveetil S, & Hande M. (2012). Differential regulation of intracellular factors mediating cell cycle, DNA repair and inflammation following exposure to silver nanoparticles in human cells. *Genome Integrity*, 3, 2. <http://doi.org/10.1186/2041-9414-3-2>
- Austin L, Mackey M, Dreaden E & El-Sayed M. (2014). The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery. *Arch. Toxicol*. 88, 1391–1417.
- Ayati A, Ahmadpour A, Bamoharram F, Tanhaei B, Mäntäri M & Sillanpää M. (2014). A review on catalytic applications of Au/TiO₂ nanoparticles in the removal of water pollutant, *Chemosphere*, 107, 163-74.
- Ayyapan S, Srinivasa R, Subbana G & Rao C. (1997). Nanoparticles of Ag, Au, Pd and Cu produced by alcohol reduction of the salts, *Journal of Materials Research*, 12(2) 398-401.
- Bates O. (2010). Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovasc Res*. 87,262-271.



- Bang J & Kamat P. (2009). Quantum dot Quantum dot sensitized solar cells. A tale of two semiconductor nanocrystals: CdSe and CdTe. *ACS Nano* 23, 3(6), 1467-1476.
- Barbucci R, 2002, *Integrated Biomaterial Science*.
- Bragg P & Rainnie D. (1974). The effect of silver ion on the respiratory chain of Escherichia coli. *Can J Microbiol*, 20, 883–889.
- Braun G, Friman T, Pang H, Pallaoro A, Hurtado de Mendoza T, et al. (2014). Etchable plasmonic nanoparticle probes to image and quantify cellular internalization. *Nat Mater* 13, 904-911.
- Boldyrev V. (2006). “Mechanochemistry and mechanical activation of solids”. *Russian Chemical Reviews*, 75, 177-189.
- Boucher W, Stern J, Kotsinyan V, Kempurai D, Papaliodis D, Cohen M, et al. (2008). Intravesical nanocrystalline silver decreases experimental bladder inflammation. *J. Urol.* 179, 1598–1602.
- Bravo R, Frank R, Blundell P & Macdonald-Bravo H. (1987). Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 32, 515–517.
- Bushan B. (2004), *Handbook of Nanotechnology*. ed. Springer.
- Canham L, (1997), *Properties of porous silicon*. editor EMIS.
- Castillo P, Herrera J, Fernández R, Caro C, Zaderenko J & Pozo D. (2008). Tiopronin monolayer-protected silver nanoparticles modulate IL-6 secretion mediated by Toll-like receptor ligands. *Nanomedicine* 3(5), 627–635.
- Chaloupka K, Malam Y & Seifalian A, (2010). Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*. 28(11).
- Chen X & Borowiak-Palen E. (2012). Magnetic silica nanotubes: synthesis, drug release, and feasibility for magnetic hyperthermia, *ACS Appl Mater Interfaces*, 4, 2303-2309.
- Creighton J, Blatchford C & Albrecht M. (1979). Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 75, 790-798.
- Day R. (2005). Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. *Tissue Eng.* 11(5-6)768-777.
- Detsch R, Stoor P, Grünwald A, Roether J, Lindfors N & Boccaccini A, (2014). Increase in VEGF secretion from human fibroblast cells by bioactive glass S53P4 to stimulate angiogenesis in bone. *J Biomed Mater Res A.* 102 (11) 4055-4061.
- Dhanalekshmi K & Meena K. (2014). Comparison of antibacterial activities of Ag@TiO₂ and Ag@SiO₂ core-shell nanoparticles. *Spectrochimica*, 128, 887-890.
- Diaz V, Ramírez-Maureira M, Monrás J, Vargas J, Bravo D, Osorio-Román I, et al. (2012). Spectroscopic Properties and Biocompatibility



- Studies of Cd T Quantum Dots Capped with Biological Thiols, *Sci. Adv. Mater*, 4, 5/6.
- Duan X, Peng D, Zhang Y, Huang Y, Liu Y, Liu X, et al. (2017). Sub-cytotoxic concentrations of ionic silver promote the proliferation of human keratinocytes by inducing the production of reactive oxygen species. *Front Med*. <https://doi.org/10.1007/s11684-017-0550-7>.
 - Dung T, Tuyet T, Fribourg E & Chien M. (2012). Influence of surfactant on the preparation of silver nanoparticles by polyol method, *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 3(3).
 - Ehlich P & Hunt T. (1968). Effects of Cortisone and Vitamin A on Wound Healing. *Annals of Surgery*. 167(3). 324-328.
 - Eming S, Martin P & Tomic-Canic M, (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Wound repair*, 6 (265).
 - Esteva E. (2006). El tratamiento de las heridas. *Ámbito farmacéutico, educación sanitaria*, 25(8), 54-60.
 - Falconi de La Fuente E, García L, Marín O, Padrón L, Rivas M, et al. (2010). Manual para el manejo de animales con fines de experimentación y enseñanza. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
 - Fan X, Chen K, He X, Li N, Huang J, Tang K, et al. (2016). Nano-TiO₂ /collagen-chitosan porous scaffold for wound repairing. *Int. J. Biol Macromol*, 91, 15-22.
 - Feng Q, Wu J, Chen G, Cui F, Kim T & Kim J. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater*. 52(4), 662–668.
 - Ferenc Ö, Dietrich R, Ganz C, Dau M, Wolter D, Kasten A, et al. (2017). Silicon-Dioxide-Polyninylpyrrolidone as a wound dressing for skin defects in a murine model. *Journal of Cranio-Maxilo-Facial Surgery*. 45, 99-107.
 - Filella X, Molina R & Ballesta A. (2002). Estructura y función de las citocinas. *Med Integral*, 39(2), 63-71.
 - Fornaguera C, Dols A, Calderó G, García-Celma M, Camarasa J & Solans C. (2015). PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating using low-energy methods as efficient nanocarriers for drug delivery across the blood-brain barrier. *J. Control Release*. 211:134-143.
 - Fuentes E, Serramía M, Sánchez-Nieves J, Álvarez S, Muñoz M, Gómez R & De la Mata F. (2015). Fluorescein labelled cationic carbosilane dendritic systems for biological studies, *European Polymer Journal* 71, 61-72.
 - Gareth H. 2005, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1,1 22.
 - Ganzagh, M. A. A., Yousefpour, M., & Taherian, Z. (2016). The removal of mercury (II) from water by Ag supported on nanomesoporous silica. *Journal of Chemical Biology*, 9(4), 127–142. <http://doi.org/10.1007/s12154-016-0157-5>



- Gerwins P, Sköldenberg E & Claesson-Welsh L. (2000). *Crit Rev Oncol Hematol*. 34 (3)185-194.
- Gnanakumar G, Karunakaran B, Nahm K & Elizabeth R. (2009). Nanometer sized Silver Particles Embedded Silica Particles-Spray Method. *Nanoscale Res. Lett.* 4, 452. <https://doi.org/10.1007/s11671-009-9269-y>.
- Gong P, Li H, He X, Wang K, Hu J, Tan W, et al. (2007). Preparation and antibacterial activity of $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ nanoparticles. *Nanotechnology*, 18, 604–611.
- González J, López M & Ruiz G. (2006). Nanomedicina, *Informe de vigilancia tecnológica*, 6.
- Gu H, Ho P, Tong E, Wang L & Xu B. (2003). Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities. *Nano Lett*, 3(9):1261–1263.
- Gu G, Xu J, Wu Y, Chen M & Wu L. (2011). Synthesis and antibacterial property of hollow SiO_2/Ag nanocomposite spheres. *Journal of Colloid and Interface Science*. 359, 327-333.
- He D, Kacopieros M, Ikeda-Ohno A & Waite T. (2014). Optimizing the design and synthesis of supported silver nanoparticles for low cost water disinfection. *Environ Sci Technol*, 48 (20):12320-12326.
- Hench L, Splinter R, Greenlee T & Kand Allen W. (1971). *J Biomed Mater Res*. 2:117.
- Hench L. (1990). The sol-gel process. *Chem. Rev.* 90, 33-72.
- Hong C & Lee C, (2011), Porous Silicon nanoparticles for cancer phototherapy, *Nanoscale Research Letters* (6):321-28.
- Horikoshi S & Serpone N. (2013). Introduction to Nanoparticles: Microwaves in nanoparticle synthesis: fundamentals and applications. 1o ed. Weinheim, Germany: *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*; p. 1–24.
- Hu C & Zhang L. (2012). Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. *Biochemical Pharmacology* 83, 1104-1111.
- Huang T. & Nancy X. (2010). Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using single-nanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy. *J. Mater. Chem.* 20, 9867–9876.
- Hwan K, Keun L, Gil Cha, Woo K & Soo K. (2007). Synthesis and Characterization of Antibacterial $Ag\text{-SiO}_2$ Nanocomposite. *J. Phys. Chem*, 111, 3629-3635.
- Imamura K, Inagaki M & Naka S. (1984). “Mechanochemical synthesis of hercynite”. *Journal of Materials Science*, 19, 1397.
- IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social, 2016. 23 de Enero 2018, <http://www.imss.gob.mx/conoce-al-imss/informes-estadisticas>.
- INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Salud en establecimientos particulares. 2016. <http://www.beta.inegi.org.mx/proyectos/registros/sociales/salud/default.ht>



- ml.
- Jaimes S, González A, Granados C, Álvarez D & Espitia E, (2012), Nanotecnología: avances y expectativas en cirugía. *Rev. Colombiana* 27.
 - Jiang Z, Liu C & Sun L. (2005). Catalytic properties of silver nanoparticles supported on silica spheres. *J Phys Chem B*. 10, 109(5) 1730-1735
 - Johannsen M, Gneveckow U, Taymoorian K, Cho C, Thiesen B, Scholz R, et al. (2007). Termoterapia en cáncer de próstata mediante el uso de nanopartículas magnéticas. *Actas urol esp*. 31,6, 660-667..
 - Johnston H, Hutchison G, Christensen F, Peters S, Hanking S & Stone V. (2010). A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit. Rev Toxicol*. 40, 328-346. <https://doi.org/10.3109/10408440903453074>.
 - Jordan A & Felix J. (1999). Magnetic Fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles, *Journal of Magnetism an magnetic Materials*, (201): 413-419.
 - Jose J. & Charyulu R. (2016). Prolonged drug delivery system of an antifungal drug by association with polyamidoamine dendrimers. *Int J Pharm Investig*. 6,2, 123-127.
 - Jung C, Mun H, Li T & Park H. (2008). A simple gold nanoparticle-mediated immobilization method to fabricate highly homogeneous DNA microarrays having higher capacities than those prepared by using conventional techniques. *Nanotechnology* 20 (3): 035607.
 - Kang J, Pack I, Lee H & Castranova V. (2000). Enhancement of nuclear factor-kappaB activation and protein tyrosine phosphorylation by a tyrosine phosphatase inhibitor, pervanadate, involves reactive oxygen species in silica-stimulated macrophages. *Toxicology*. 151(1-3) 81-89.
 - Karumuri A, Oswal D, Hostetler H & Mukhopadhyay S. (2016). Silver nanoparticles supported on carbon nanotube carpets: influence of surface functionalization. *Nanotechnology*. 27(14) 145603.
 - Karunagaran B, Nahm K & Elizabeth R. (2009). Nanometer sized silver particles embedded silica particles-spray method. *Nanoscale Research Letters*. 4(5) 452.
 - Kerker M, Siiman O & Wang D. (1984). Effect of aggregates on extinction and surface-enhanced Raman scattering spectra of colloidal silver. *Journal of Physical Chemistry* 88(15) 3168-3170.
 - Keshaw H, Forbes A & Day R. (2005). Release of angiogenic growth from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass. *Biomaterials* 26(19) 4171-4179.
 - Klasen H. (2000). A historical review of the use of silver in the treatment of burns. Part I early uses. *Burns*, 30:1-9.
 - Kreibitz U & Vollmer M. (1995). Optical properties of metal clusters. Berlin, Germany: Springer.



- Kwan K, Liu X, To M, Yeung K, Ho C & Wong K. (2011). Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing. *Nanomedicine* 7(4) 497-504.
- Lara H, Ayala-Nuñez N, Ixtepan-Turrent L, & Rodríguez-Padilla C. (2010). Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, 8, 1. <http://doi.org/10.1186/1477-3155-8-1>
- Lechuga L. (2009). La revolución de la nanomedicina, *Sedisa*, 38-43.
- Li C, Li X, Duan X, Li G & Wang J. (2014). Halloysite nanotube supported Ag nanoparticles heteroarchitectures as catalysts for polymerization of alkylsilanes to superhydrophobic silanol/siloxane composite microspheres. *J Colloid Interface Sci.* 436, 70-76.
- Li R, Clark A & Hench L. (1991). An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. *J Appl Biomater.* 2:231.
- Liao S, Read D, Pugh W, Furr J & Russell A. (1997). Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett Appl Microbiol*, 25, 279-83
- Lin J, Lin W, Li S, Lin C & Hsu S. (2013). Evaluation of the antibacterial activity and biocompatibility for silver nanoparticles immobilized on nano silicate platelets. *ACS Appl Mater Interfaces.* 23,5(2), 433-443.
- Liu T, Song X, Guo Z, Dong Y, Guo N & Chang X. (2014). Prolonged antibacterial effect of silver nanocomposites with different structures. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1, 116, 793-796.
- Liu X, Lee P, Ho C, Lui V, Chen Y, Che C, Tam P, et al. (2010). Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing. *ChemMed Chem* 1,5(3) 468-475.
- López M, (2003). *Fitoterapia*, 22, 11, Elsevier.
- López G, Rodríguez C, Álvarez R. (2015). Uso de la nanopartícula de SiO₂-TiO₂ en el tratamiento de úlceras en pie diabético: Comunicación preliminar. *Novedades en medicina*, 58(3), 5-12.
- Ma X, Li X, Sun S & Yang F. (2005). Effect of SiO₂ on the expression of MMP-9 and TIMP-1 in human alveolar macrophages *in vitro*. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*, 23(3) 203-205.
- Maga G & Hubscher U. (2003). Proliferation cell nuclear antigen (PCNA): advancer with many partners. *Journal of Cell Science.* 116, 3051-3060.
- Mahmoud M, & El-Sayed M. (2013). Different plasmon sensing behavior of silver and gold nanorods. *J. Phys. Chem. Lett.* 4, 1541-1545.
- Martínez A. Proliferación y diferenciación celular en cultivos primarios de adipocitos marrones, 1991, tesis Universidad Complutense de Madrid, España.
- Matsuo K, Hirobe S, Okada N & Nakagawa S. (2016). Analysis of Skin Permeability and Toxicological Properties of Amorphous Silica Particles. *Biol Pharm Bull.* 39(7) 1201-1205.



- Mao C, Lin C & Chen X, (2014). Enhanced healing of full-thickness diabetic wounds using bioactive glass and Yunnan baiyao ointments. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater Sci. Ed.* 29, 1063.
- McDonald R. (1958). Surface Functionality of Amorphous Silica by Infrared Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry.* 62(10), 1168-1178.
- Mohamed B, Verma N, Prina-Mello A, Williams Y, Davies, A, Bakos G, Volkov, et al (2011). Activation of stress-related signalling pathway in human cells upon SiO₂ nanoparticles exposure as an early indicator of cytotoxicity. *Journal of Nanobiotechnology,* 9, 29. <http://doi.org/10.1186/1477-3155-9-29>.
- Morones J, Elechiguerra J, Camacho A & Ramirez J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 16, 2346–2353.
- Morry J., Ngamcherdtrakul W, Gu S, Goodyear S, Castro D, Reda, M. et al. (2015). Dermal delivery of HSP47 siRNA with NOX4-modulating mesoporous silica-based nanoparticles for treating fibrosis. *Biomaterials,* 66, 41–52.
- Mulvaney P. (1996). Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir,* 12, 788–800.
- Mytych J, Wnuk M & Rattan S. (2016). Low doses of nanodiamonds and silica nanoparticles have beneficial hormetic effects in normal human skin fibroblasts in culture. *Chemosphere,* 148, 307-315.
- Nabeshi H, Yoshikawa T, Matsuyama K, Nakazato Y, Arimori A, Isobe M, et al. (2010). Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells. *Pharmazie,* 3 (65), 199-201.
- Nadworny P, Wang J, Tredget E & Burrell R. (2008). Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. *Nanomedicine* 4, 241–251.
- NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>, 15 noviembre 2017, 18:00 hrs.
- NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Ojeda M, Yáñez I, Zamudio A, Gálvez F, Machuca R & Velásquez C. (2013). SiO₂-Ag⁰ Generation by sol-gel technique for antibacterial use. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures,* 8(1), 409-414.
- Ojeda M, Yáñez I, Velásquez C, Martínez M, Álvarez A, García M, et al, (2015). Skin wound healing with chitosan thin films containing supported silver nanospheres. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers.* 30(6). 617-632.
- OMS: Estadísticas sanitarias mundiales, 2014. 13 de enero 18:00 hrs http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014/es/
- Pal S, Tak Y & Song J. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol,*



- 27(6):1712–1720.
- Park J, Gu L, Von Maltzahn G, Ruoslahti E, Bhatia S, & Sailor M. (2009). Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for *in vivo* applications. *Nature Materials*, 8(4), 331–336.
 - PLM: <http://www.medicamentosplm.com>. 20 diciembre 2017, 14:00 hrs.
 - Pratsinis A, Hervella P, Leroux J, Pratsinis S, Sotiriou G, (2013). T Small
 - Prelich G, Tan C & Kostura M. (1987). Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature* 326, 517–520.
 - Puri N & Talwar A. (2009). The efficacy of silicone gel for treatment of hypertrophic scars and keloids. *J Cutan Aesthet Surg.* 2(2):104-106.
 - Quignard S, Mosser G, Boissière M & Coradin T, (2012). Long-term fate of silica nanoparticles interaction with human dermal fibroblasts. *Biomaterials*, 33(17), 4431-4442.
 - Quin Z, Joo J, Gu L & Sailor M. (2014). Size control of porous silicon nanoparticles by electrochemical perforation etching, *Particle & Particle Systems Characterization* 31 (2), 252-256.
 - RAE: Real academia de la lengua española, 2018, <http://dle.rae.es/srv/search?m=30&w=cicatriz>. 15 febrero 2018, 15:00 hrs.
 - Rai M, Yadav A & Gade A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* (27), 76–83.
 - Raimondi F, Scherer G, Kotz R & Wokaun A. (2005). Nanoparticles in energy technology: examples from electrochemistry and catalysis. *Angew. Chem., Int. Ed.*;44:2190–209.
 - Ramos C, Becerril C, Cisneros J, Montaña M. 2004. El miofibroblasto, una célula multifuncional en la patología pulmonar. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.* 17(3).
 - Reffit D, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung H, Evans B, Thompson R, Powell J, et al. (2003). Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone*, 32(2), 127-135.
 - Ren J & Tilley R. (2007). Preparation, self-assembly, and mechanistic study of highly monodispersed nanocubes. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 3287–3291
 - Retchkiman-Schabes P, Canizal G, Becerra-Herrera R, Zorrilla C, Liu H, Ascencio J. (2006). Biosynthesis and characterization of Ti/Ni bimetallic nanoparticles. *Opt. Mater.*, 29:95–99.
 - Ring A, Langer S, Tilkorn D, Goertz O, Henrich L, Stricker I, Steinau HU, Stein. et al. (2010). Induction of angiogenesis and neovascularization in adjacent tissue of plasma-collagen-coated silicones implants. *Eplasty.* 10, 61. 504-520.
 - Rodríguez-Razón C, Yañez-Sánchez I, Ramos-Santillán V, Velásquez-Ordoñez C, Gutiérrez-Rubio S, García-García M. et al. (2018). Adhesion, proliferation and apoptosis in different molecular portraits of breast cancer



- treated with nanoparticles. *Int.J.Nanomedicine*, En proceso de publicación
- Rosenkranz H & Carr H. (1972). Silver sulfadiazine: effect on growth and metabolism of bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*; 5,199–201.
 - Roy M, Gagnon C, & Gagnon J. (2016). New method for sequestration of silver nanoparticles in aqueous media: in route toward municipal wastewater. *Chemistry Central Journal*, 10(1), 54. <http://doi.org/10.1186/s13065-016-0198-4>
 - Rycenga M, Cobley C, Zeng J, Li W, Moran C, Zhang Q, et al. (2011). Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications. *Chem Rev*. 111, 3669-3712.
 - Sailor M, (2012). *Porous silicon in practice*, ISBN: 9783527313785 online ISBN: 9783527641901.
 - Santos H. (2014). *Porous silicon for biomedical application*, 1ra edición, ISBN:9780857097118, online ISBN: 9780857097156.
 - Schreurs W & Rosenberg H. (1982). Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. *J Bacteriol*.152(1):7-13.
 - Seisenbaeva G, Fromell K, Vinogradov V, Terekhov A, Pakhomov A., Nilsson B, et al. (2017). Dispersion of TiO₂ nanoparticles improves burn wound healing and tissue regeneration through specific interaction with blood serum proteins. *Scientific Reports*, 7, 15448. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-15792-w>
 - Senet P. 2007 *Physiologie de la cicatrisation cutanée* EMC, Elsevier Masson SAS. París, *Dermatologie* 98-040-A-10.
 - Shade C. (2016). Liposomes as advanced delivery systems for nutraceuticals. *Integr Med*. 15, 1, 33-36.
 - Shi J, Wang L, Zhang J, Ma R, Gao J, Liu Y, et al. (2014). A tumor-targeting near-infrared laser-triggered drug delivery system based on GO@Ag nanoparticles for chemo-photothermal therapy and X-ray imaging. *Biomaterials* 35, 5847–5861.
 - Sibbald R, Gary B, Contreras Ruíz J, Coutts P, Fierheller M, Rothman A, et al. (2007) Bacteriology, inflammation, and healing: a study of nanocrystalline silver dressings in chronic venous leg ulcers. *Adv. Skin Wound. Care* 20, 549–558
 - Sondi I & Salopek-Sondi B. (2007). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria. *J Colloid Interface*. 275,177–82.
 - Song H, Ko K, Oh L & Lee B. (2006). Fabrication of silver nanoparticles and their antimicrobial mechanisms. *Eur Cells Mater*, 11,58.
 - Sopinsky M, Vlasenko N, Lisovskyy I, Zlobin S, Tsybrii Z & Veligura L, (2015). Formation of Nanocomposites by Oxidizing Annealing of SiO₂ and SiO_x <Er,F>Films: Ellipsometry and FTIR Analysis, *Nanoscale Res Lett* 10:232.
 - SSA: Secretaria de Salud. Boletín epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema único de información. 14 de marzo



- 2018, 11:00 hrs. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>.
- Stöber W, Fink A & Bohn E. (1968). Controlled Growth of monodisperse Silica spheres in the micron size range. *J. Colloids Interface Sci.* 26, 62.
 - Strzalka W, Ziemienowicz A, (2011). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany* 107, 1127-1140.
 - Tan C, Castillo C, So A & Downey K. (1986). An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus. *The Journal of Biological Chemistry*, 261, 12310–12316.
 - Tian J, Wong K, Ho C, Lok C, Yu W, Che C, et al. (2007) Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *Chem. Med. Chem.* 2, 129–136.
 - Ung T, Liz-Marzán L, Mulvaney P. (1998) Controlled method for Silica Coating of Silver Colloids. Influence of Coating on the rate of Chemical Reactions. *Langmuir*. 14, 3740 -3748.
 - Vallet-Regí M, 2013. *Biomateriales*, Ed. Catarata.
 - Vempati, P, Popel A & Mac Gabhann F. (2014). Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 25(1), 1–19.
 - Vicente S, Moia C, Zhu H & Vigé X, (2017). *In vitro* evaluation of the internalization and toxicological profile of silica nanoparticles and submicroparticles for the design of dermal drug delivery strategies. *J Appl Toxicol*, 37 (12), 1396-1407.
 - Villafuerte-Robles L. (2007), Nanotecnología Farmacéutica, Primera revista digital en América Latina especializada en tópicos de comunicación, 1-12.
 - Wachs I. (2001). Characterization of catalytic materials. New York: *Momentum Press*.
 - Waga S & Stillman B. (1998). The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annual Review of Biochemistry*. 67,721–751.
 - Wang L, Zhao W & Tan W. (2008). Bioconjugated Silica Nanoparticles:Development and applications, *Nano Re*, 1,99-115.
 - Webster T, 2007, IJN's second year is now a part of nanomedicine history. Editorial foreword. *Nanomedicine*, 2,1.
 - Wei L, Lu J, Xu H, Patel A, Chen Z-S & Chen G. (2015). Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today*. 20(5).
 - Willard H. (1991). *Métodos instrumentales de análisis*, Grupo Editorial Iberoamérica, ISBN:9687270837, 9789687270838.
 - Wright J, Lam K, Buret A, Olson M & Burrell R. (2002). *Wound Repair Regen*, 10 (3), 141-151.



- Wu J, Zheng Y, Wen X, Lin Q, Chen X & Wu Z, (2014). Silver nanoparticle/bacterial cellulose gel membranes for antibacterial wound dressing: investigation in vitro and in vivo. *Biomed Mater.* 9 (13).
- Wu P, Gao Y, Lu Y, Zhang H & Cai C. (2013) High specific detection and near-infrared photothermal therapy of lung cancer cells with high SERS active aptamer–silver–gold shell–core nanostructures. *Analyst* 138, 6501–6510.
- Xia Y, Gao X, Taratula O, Treado S, Urbas A, Holbrook D, et al. (2009). Anti-HER2 IgY antibody-functionalized single-walled carbon nanotubes for detection and selective destruction of breast cancer cells. *BMC Cancer.* 9,351.
- Xu P, Liang J, Cao X, Tang J, Gao J, Wang L, et al. (2016). Facile synthesis of monodisperse of hollow mesoporous SiO₂ nanoparticles and in-situ growth of Ag nanoparticles for antibacterial. *J Colloid Interface Sci.* 15(474), 114-118.
- Yang J, Lee C, Ko H, Suh J, Yoon H, Lee K, et al. (2007) Multifunctional magneto-polymeric nanohybrids for targeted detection and synergistic therapeutic effects on breast cancer. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 46, 8836–8839.
- Yañez I, Carreón C, Velásquez C, Ojeda M, Gálvez F, Zamudio A, et al, (2014). *Digest Journal of Nanomaterials and Biosctrutures*, 9(4), 1681-1687
- Yeh C, Chen C, Leu Y, Lin M, Chiu M & Wang S. (2017). The effects of artocarpin on wound healing: *in vitro* and *in vivo* studies. *Scientific Reports*, 7, 15599. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-15876-7>
- Yordanova T, Vasileva P, Karadjova I & Nihtianova D. (2014). Submicron silica spheres decorated with silver nanoparticles as a new effective sorbent for inorganic mercury in surface waters. *Analyst.* 139(6): 1532-1540.
- Yu K, Lu F, Li Q, Chen H, Lu B, Liu J, et al. (2017). *In situ* assembly of Ag nanoparticles (AgNPs) on porous silkworm cocoon-based wound film: enhanced antimicrobial and wound healing activity. *Scientific Reports*, 7, 2107.
- Zaleska A, Marchelek M, Diak M & Grabowska E. (2016) Noble metal-based bimetallic nanoparticles: the effect of the structure on the optical, catalytic and photocatalytic properties. *Advances in Colloid and Interface Science* 229, 80-107.
- Zanella R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano.* 5(1), 69-81.
- Zhai H, Sun D & Wang H. (2006). Catalytic properties of silica/silver nanocomposites. *J Nanoscience Nanotechnol.* 6(7), 1968-1972.
- Zhang T, Wang L, Chen Q, & Chen C. (2014). Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles. *Yonsei Medical Journal*, 55(2), 283–291. <http://doi.org/10.3349/ymj.2014.55.2.283>



- Zhao D, Sun X, Tong J, Ma J, Bu X, Xu R, et al. (2012). A novel multifunctional nanocomposite C225-conjugated Fe₃O₄/Ag enhances the sensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells to radiotherapy. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 44(31), 678–684.
- Zieger M, Ochoa M, Rahimi R, Campana G & Tholpady S. (2017). Skin Regeneration Using Dermal Substrates that Contain Autologous Cells and Silver Nanoparticles to Promote Antibacterial Activity: In Vitro Studies. *Mil Med.* 182(S1):376-382.



ANEXOS

ANEXO A: NANOPARTICULAS

Generalidades

Las NPs son partículas microscópicas con una dimensión menor a 100 nm es decir, que son entre cien y mil veces más pequeñas que las partículas de los materiales en su estado sólido másico (*bulk*), este diminuto tamaño le atribuye a los nanomateriales nuevas propiedades y características únicas (Bushan, 2004).

Se les conoce también como partículas ultrafinas o clusters (agregados moleculares). Debido a sus propiedades físicas y químicas únicas, las NPs son con frecuencia descritas como átomos artificiales. Las formas en las que se pueden presentar las NPs son variadas, como coloides, aerosoles, hidrosoles u organosoles y se obtienen a partir de diferentes materiales descritos en el Cuadro 5 (Zanella, 2012).

Las NPs se pueden clasificar de acuerdo a su estructura electrónica de la siguiente manera:

- a) Metálicas: Su principal característica es que contienen un número determinado de electrones libres confinados en un pequeño espacio, lo que les da propiedades como la resonancia plasmónica (Zanella, 2012).
- b) Magnéticas: Tienen a formar aglomerados a fin de reducir la energía asociada con la elevada relación área superficial/volumen, propia de las partículas a escala nanométrica. Constituidas generalmente por elementos magnéticos como hierro, níquel, cobalto y sus óxidos, por lo que pueden ser manipuladas por campos magnéticos externos. Sus características dependen del tamaño de la nanopartícula (Zanella, 2012).
- c) Semiconductoras: Tienen propiedades de fotoluminiscencia, ya que son capaces de absorber la luz para después emitirla en una longitud de onda diferente (Vallet-Regí, 2013).



Los efectos de tamaño y superficie son más notables cuando el diámetro de las NPs se reduce, por ejemplo, el confinamiento de electrones en NPs metálicas y conductoras, se manifiesta en efectos cuánticos, los cuales pueden ser rastreados a través de propiedades magnéticas y o de conducción electrónica y en algunas propiedades termodinámicas, como la capacidad calorífica (Vallet-Regí, 2013).

Características particulares

Dentro de las principales características que presentan las NPs destacan las siguientes:

- Al tener un pequeño número de átomos o moléculas, presentan efecto de tamaño cuántico, por lo que sus estados electrónicos son diferentes de su estado sólido másico.
- Presentan una gran proporción de átomos (o moléculas) superficiales lo que les da una actividad, por tanto tienen una mayor superficie de contacto con el ambiente (Figura 26) (Vallet-Regí, 2013).

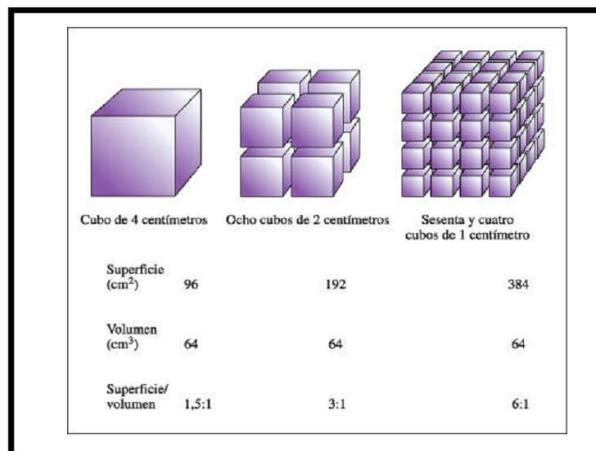


Figura 26. Relación superficie volumen.

Esquema que representa la relación superficie/volumen en diversos cuerpos o moléculas. Aquí se ejemplifica con un cubo con una superficie de 4 cm el cual tiene una superficie de contacto de 96 cm^2 y un volumen de 64 cm^3 , su relación volumen es por cada cubo 1.5 cm. Si este cubo se divide en 8 cubos de 2 cm, sigue teniendo el mismo volumen, pero aumenta su superficie de contacto y la relación superficie contacto aumenta a 3 cm. Si estos cubos se vuelven a dividir para obtener 64 cubos de 1 cm, aumenta la superficie de contacto a 6 cm, con el mismo volumen. Imagen tomada de <http://jtortiz.blogspot.mx/2010/01/termodinamica-definiciones.html>



El área superficial de las NPs origina una redistribución de los átomos, incrementándose la fracción de átomos que se encuentran en su superficie. El número de átomos en la superficie crece de forma parabólica, a medida que la NP es más pequeña. Una NP de tamaño 1 nm tiene más del 90% de sus átomos situados en su superficie (Figura 27) (Vallet-Regí, 2013).

Los átomos localizados en la superficie de las NPs tienden a ser inestables, ya que poseen un mayor nivel energético y las fuerzas de atracción de los átomos internos de la estructura o matriz de la nanopartícula, con las que son atraídos son débiles, por lo tanto tienen un mayor potencial de reacción, presentando la capacidad de unirse a otros átomos superficiales de otras NPs cercanas, con velocidades de reacción muy superiores y formando enlaces químicos más fuertes. Así mismo, la absorción óptica en NPs también es un fenómeno de superficie que se modifica, y se puede modular dependiendo de las características de la partícula (composición, tamaño, protectores de superficie, etc.) (Vallet-Regí, 2013).

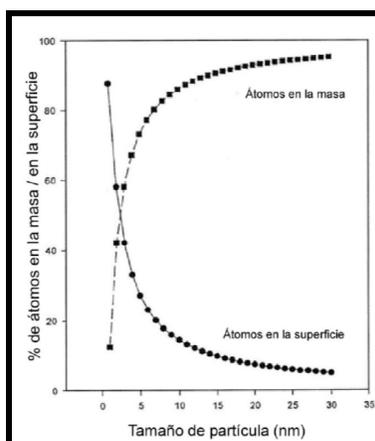


Figura 27. Variación del porcentaje átomos interiores/superficiales con respecto al tamaño de la nanopartícula.

Cuando las nanopartículas poseen diámetros grandes, sus átomos se conservan en la masa, es decir más al centro en la partícula y escasean en la superficie, sin embargo cuando las nanopartículas tiene un menor diámetro sus átomos se localizan en la superficie lo que les facilita reaccionar más fácilmente con átomos circundantes. Imagen tomada de <http://nuevatecnologiasymateriales.com/por-que-las-nanopartículas-tienen-propiedades-muy-diferentes-los-materiales-de-mayor-tamaño/>



Métodos de síntesis

En la síntesis de las NPs se busca que se puedan controlar diversas características como son diámetro, morfología, cristalinidad, propiedades químicas y físicas (Zanella,2012).

La elaboración de NPs se lleva a cabo a partir de dos técnicas (Figura 28):

a) Técnica descendente o *top-down*, consiste en la división de sólidos máscicos en porciones más pequeñas hasta alcanzar una escala nanométrica; es decir se va minimizando el tamaño de las partículas. Este enfoque puede involucrar la molienda o el desgaste, métodos químicos, y la volatilización de un sólido seguida por la condensación de los componentes volatilizados (Wachs, 2001).

b) Técnica ascendente o *bottom-up*, es la fabricación de NPs a través de la condensación de átomos o entidades moleculares en una fase gaseosa o en solución. Dicho en otras palabras, a partir de átomos individuales en solución se van formando ensambles cuyos tamaños son controlables con precisión (Wachs, 2001). Está técnica es más utilizada en la síntesis, las NPs pueden ser soportadas o no. El soporte les da estabilidad, además de que les puede conferir propiedades específicas (Wachs, 2001).

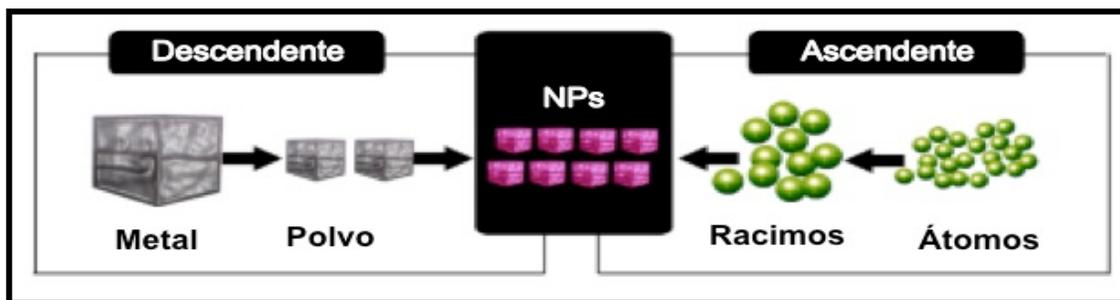


Figura 28. Esquemas de procesos de síntesis de nanopartículas.

Descendentes (*top-down*): A partir del metal en su estado sólido máscico, se va decreciendo el tamaño de partícula. Ascendentes (*bottom-up*) a partir de átomos se realizan las uniones, generando así racimos moleculares hasta llegar al tamaño nanométrico deseado. Imagen tomada y modificada de https://www.researchgate.net/figure/Scheme-of-Top-Down-and-Bottom-Up-approaches-to-the-synthesis-of-MNPs_fig3_232907342

A su vez, los métodos de técnicas ascendentes o descendentes se clasifican en métodos físicos y químicos, para llevar a cabo la síntesis (Figura 29). En los primeros se utilizan equipos mecánicos para cambiar algunas de las propiedades físicas del material, a diferencia de los métodos químicos donde es requerida una reacción química que implique la reducción o precipitación de metales en presencia de agentes estabilizantes. Recientemente los métodos químicos se utilizan con mayor frecuencia (Zanella, 2012).

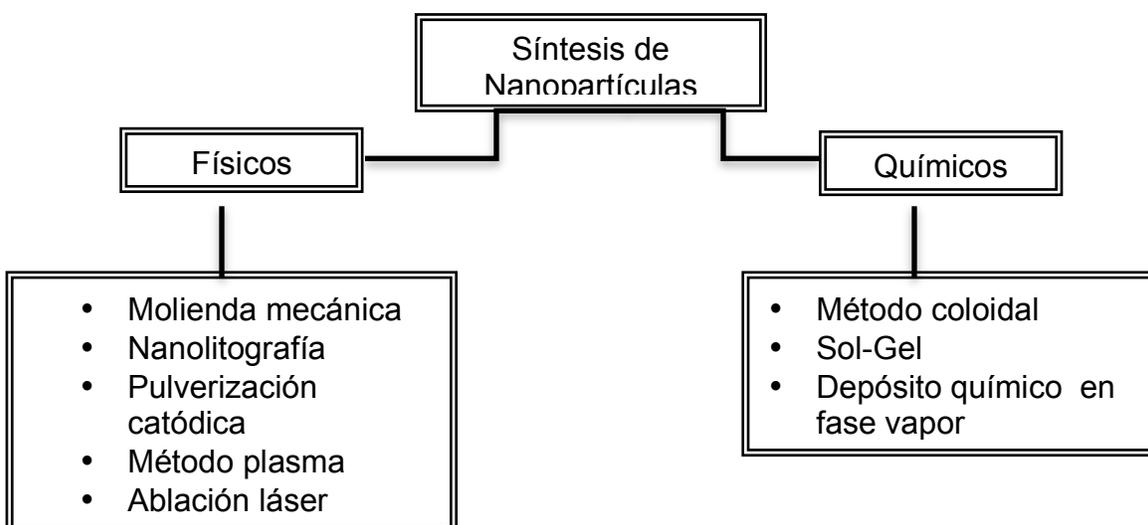


Figura 29. Métodos físicos y químicos.

Se mencionan los más utilizados para la síntesis de nanopartículas.

a) Métodos físicos:

Molienda mecánica

Consiste en la fragmentación de un material con el fin de reducir su tamaño. La molienda se realiza por medio de cuerpos molidores duros, fabricados de acero inoxidable, que impactan con el material a fragmentar. La molienda mecánica se puede llevar a cabo a baja o alta energía, estos métodos se diferencian por la eficiencia que ofrece cada proceso, ésta última produce partículas más finas. Las partículas resultantes son clasificadas por medios físicos, recuperándose las de tamaño nanométrico (Boldyrev, 2006; Imamura, 1984).



Nanolitografía

Se refiere a la síntesis de microestructuras con tamaños nanométricos y al menos, una de sus dimensiones longitudinales es del tamaño de átomos individuales y aproximadamente del orden de 10 nm. Esta técnica se utiliza durante la fabricación de circuitos integrados de semiconductores o sistemas nanoelectromecánicos, conocidos como *nanoelectromechanical Systems* o NEMS (Bushan, 2004).

Pulverización catódica.

Es un proceso en el que se produce la vaporización de los átomos de un material sólido denominado blanco mediante el bombardeo de éste por iones energéticos. Se utiliza en la formación de películas delgadas sobre materiales, técnicas de grabado y técnicas analíticas (Bushan, 2004).

Método Plasma.

En este método se utiliza plasma generado por bobinas de radiofrecuencia de calentamiento. El metal de partida se introduce en un recipiente dentro de una cámara de vacío y se calienta por encima de su punto de evaporación, se deja entrar helio (He) gaseoso al sistema y se forma un plasma de alta temperatura en la región de las bobinas. El vapor del metal se aglutina con átomos de He gaseoso y se difunde hacia una varilla colectora donde se forman NPs (Zanella, 2012).



Ablación láser.

Consiste en la ablación de un blanco, en forma sólida por lo general, por una intensa radiación láser, llevando esto a la expulsión de sus constituyentes y la formación de nanoclusters y nanoestructuras. Cuando un blanco es expuesto a un proceso de ablación al vacío o con atmósfera controlada, los nanoclusters pueden ser depositados en un substrato, colocado a cierta distancia del blanco, llevando esto a la formación de películas delgadas nanoestructuradas (Zanella, 2012).

Existen otros métodos, pero son menos utilizados como son la termólisis y métodos sonoquímicos y fotoquímicos.

a) Métodos químicos

Método coloidal.

Consiste en disolver una sal del precursor metálico o del óxido a preparar, un reductor y un estabilizante en una fase continua o dispersante líquido. El tamaño, la distribución de tamaños y la morfología de las NPs pueden ser controlados variando la concentración de los reactantes, del reductor y del estabilizante así como la naturaleza del medio dispersante. Por este método se pueden formar dispersiones estables por periodos de tiempo muy largos (Zanella, 2012).

Sol-gel

El proceso sol-gel se basa en la síntesis de una suspensión coloidal de partículas en estado sólido, llamada sol, y la hidrólisis y condensación de esta suspensión para formar un material en estado sólido lleno de solvente, llamado



gel. El solvente y agua residual se extrae del gel por medio de envejecimiento con lo que se obtendrá una reducción en el gel, finalmente se somete a un tratamiento térmico con lo que se obtiene una película delgada o monolito (Hench, 1990).

Deposición física de vapor (CVD).

Consiste en la descomposición de uno o varios compuestos volátiles, en el interior de una cámara de vacío, en cerca o en la superficie de un sólido para dar lugar a la formación de un material en forma de capa delgada o de NPs (Zanella, 2012).

Caracterización de nanopartículas

Las técnicas de caracterización y análisis han sido indispensables en el diseño, síntesis y procesado de materiales, permitiendo un cuidadoso control de sus propiedades. La ciencia e ingeniería de materiales depende del entendimiento, de la relación existente entre las propiedades de los materiales, su composición, microestructura y procesado (Willard, 1991).

Si se requiere que un material cuya propiedad sea tener coloración roja específica, es decir, que esté asociado a una reflexión de luz a cierta longitud de onda, será necesario realizar espectros de absorción en el visible con objeto de comprobar que esa y sólo esa es la radiación que el material refleja, puesto que las demás longitudes de onda las absorbe. Otro ejemplo, si se desea un material muy resistente cuando esté sometido a esfuerzos unidireccionales, será necesario medir a partir de ensayos de tracción la tensión máxima que dicho material es capaz de soportar. Por lo anterior, la caracterización de materiales nos va a permitir conocer o predecir las propiedades de un material y así valorar su utilidad en diversa aplicaciones. La información obtenida con las técnicas de



caracterización son: composición, estructura, topología, topografía, morfología y sus propiedades. Se cuenta con varias técnicas para la caracterización de los materiales, según la propiedad a analizar. La información resultante puede ser procesada para producir imágenes o espectros que revelan los detalles topográficos, geométricos, estructurales, químicos o físicos de la materia (Willard, 1991). En la Figura 30 se muestran las técnicas más comunes para caracterizar diversos materiales.

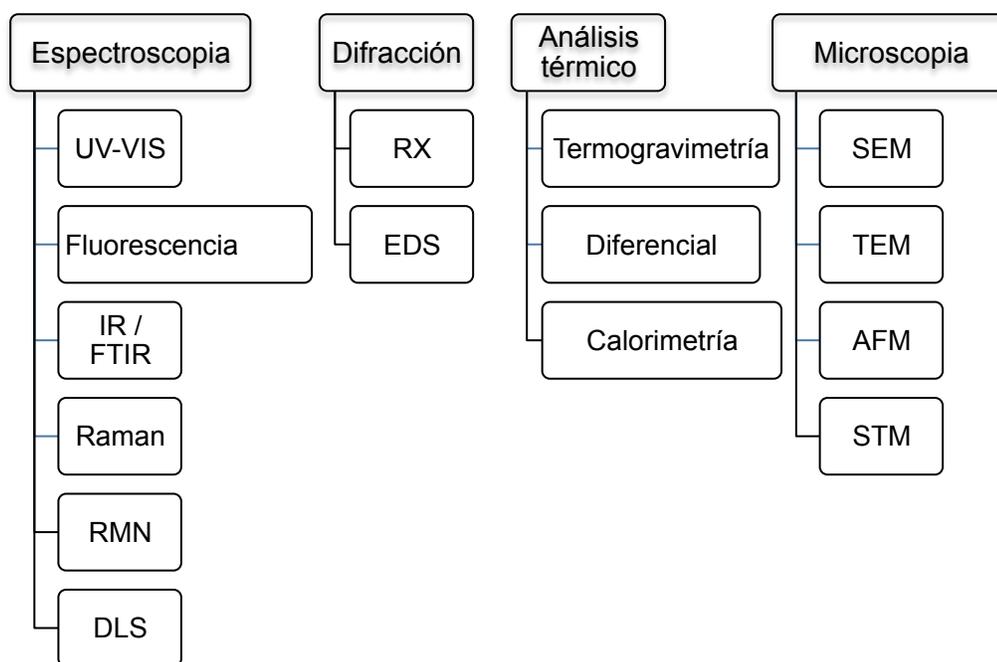


Figura 30. Principales técnicas de caracterización de materiales.

Diversas técnicas de caracterización, que engloban espectroscopía, difracción de rayos, análisis térmico y microscopía. UV-VIS: ultravioleta-visible, IR:infrarrojo, FTIR: infrarrojo con transformada de Fourier, RMN: resonancia magnética nuclear, DLS: dispersión de luz dinámica, RX: rayos X, EDS: espectrometría de dispersión de energía de rayos X, SEM: microscopía electrónica de barrido, TEM: microscopía electrónica de transmisión, AFM: microscopía de fuerza atómica, STM: microscopía de efecto túnel.

Los nanomateriales se caracterizan con técnicas a nanoescala propias al material estudiado; es importante saber que propiedad se desea identificar para aplicar la técnica correcta que brinde los resultados buscados. En la Figura 31 se muestran los más utilizados para la caracterización de NPs.

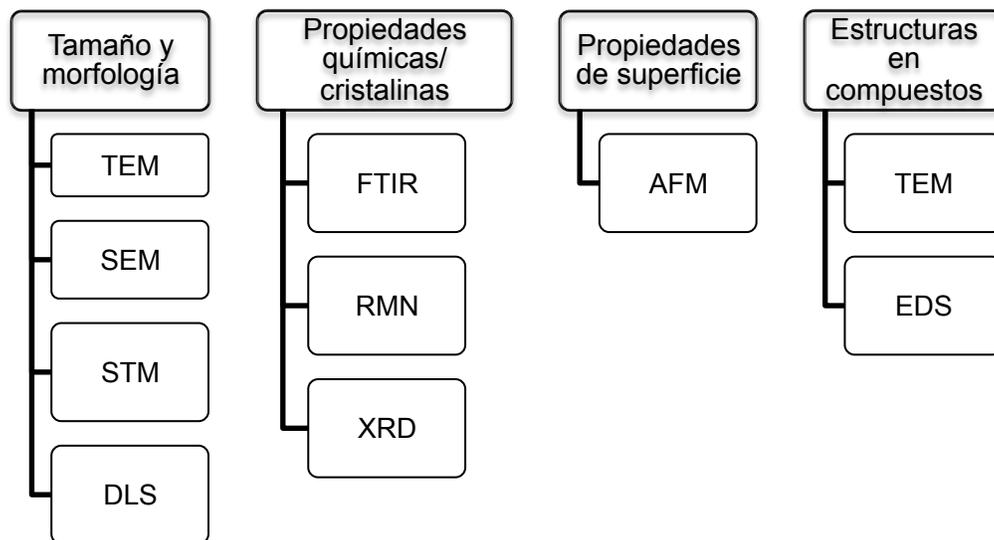


Figura 31. Técnicas de caracterización de nanopartículas.

Según la propiedad a analizar se pueden utilizar diferentes técnicas y éstas a su vez son complementarias para determinar, pureza, forma y grupos funcionales de las NPs. TEM: microscopía electrónica de transmisión, SEM: microscopía electrónica de barrido, STM: microscopía de efecto túnel, DLS: dispersión de luz dinámica; FTIR: infrarrojo con transformada de Fourier, RMN: resonancia magnética nuclear, XRD: difracción de rayos X, AFM: microscopía de fuerza atómica, EDS: espectrometría de dispersión de energía de rayos X.

Son varias las técnicas de caracterización que se utilizan en las ciencias de los nanomateriales, en este escrito se describen las técnicas aplicadas para la caracterización del nanoconstructo de MSiO_2 -AgNPs utilizado para el desarrollo de este proyecto de tesis.

a) Espectroscopía UV-Visible

Se basa en la medición de la transmitancia T o de la absorbancia A de soluciones que son depositadas en celdas transparentes y en el intervalo que abarca la última parte del ultravioleta (190 nm) y hasta el rojo del espectro visible (aproximadamente 750 nm) (Willard, 1991).

Su fundamento se apoya en las propiedades de los átomos y moléculas para absorber o emitir la energía electromagnética en una de las áreas del espectro electromagnético. Con la ley de Lambert-Beer se puede conocer la concentración en una muestra a partir de una reacción colorimétrica por medio de la absorbancia o transmitancia. La absorción de la luz UV-VIS causa



excitación electrónica. La energía de la molécula puede separarse en tres componentes asociados con: 1) el movimiento de un electrón en una molécula, 2) las vibraciones de los átomos, 3) la rotación de la molécula como un todo (Willard, 1991).

El espectro UV-VIS registra las longitudes de onda y se cuantifica la absorción, las bandas del espectro son anchas ya que incluyen la estructura fina de transiciones vibracionales y rotacionales de menor energía, estas transiciones pueden ser :

- a) De electrones en orbitales moleculares σ , π , η
- b) De electrones en orbitales atómicos d y/o f
- c) De transferencia de carga.

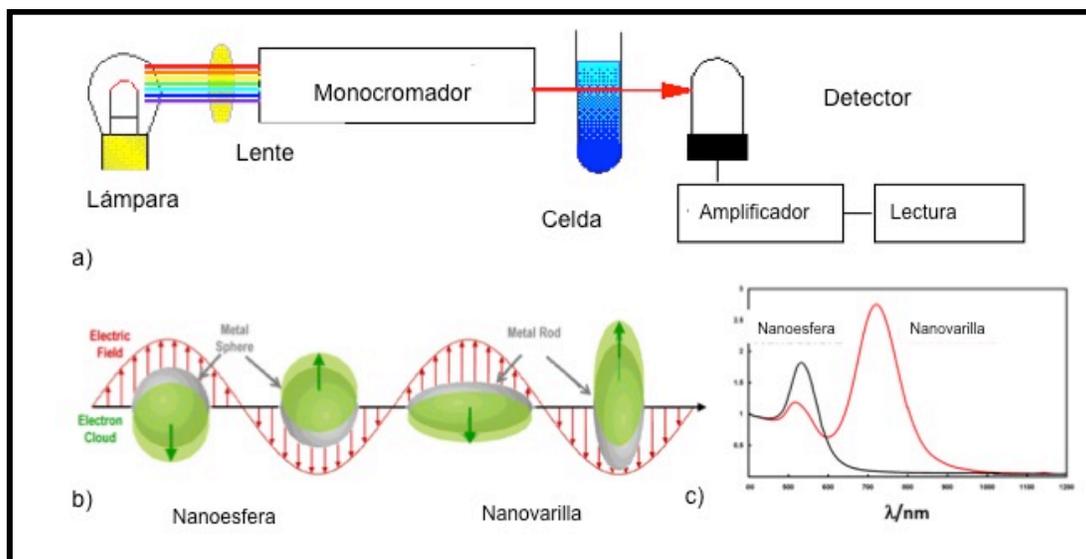


Figura 32. Esquemas de un espectrofotómetro UV-Vis.

a) Formación gráfica de resonancia del plasmón superficial en nanopartículas metálicas.

Imagen tomada de: <http://arturobola.tripod.com/spectro/xxx.htm>

b) Método para determinar formas de NPs metálicas

c) Banda de absorción por la excitación de resonancia del plasmón superficial.

Imagen tomada de: <http://ctqquimicasostenible.blogspot.mx/2016/01/>



b) Espectroscopía IR

Los enlaces químicos de las sustancias pueden vibrar de diferente forma si se les irradia con energía de frecuencias únicas que se corresponden a los niveles de energía de la molécula en específico, la espectroscopía infrarroja (IR) es capaz de detectar estas vibraciones particulares y dependen de la forma de la superficie de energía potencial de la molécula, la geometría molecular, las masas atómicas y, posiblemente, el acoplamiento vibracional. La espectroscopía IR permite obtener espectros de sólidos, líquidos y gases utilizando en cada caso las celdas o soportes adecuados. El material de estudio debe ser transparente a la radiación incidente y los haluros alcalinos son los que más se emplean en los métodos de transmisión (NaCl, KBr y KCl), la muestra se pulveriza en una matriz de KBr o se disuelve en un solvente apropiado, la humedad acuosa se debe retirar en la medida que sea posible de la muestra, ya que posee absorción en la región infrarroja. El tiempo de análisis para obtener un espectro en una muestra rutinaria es de 1 a 10 minutos, dependiendo de la resolución y el número de barridos requerido. Si la molécula recibe luz con la misma energía de esa vibración, entonces la luz será absorbida si se dan ciertas condiciones. Para que una vibración aparezca en el espectro infrarrojo, la molécula debe someterse a un cambio en su momento dipolar durante la vibración, es decir, cuando el hamiltoniano molecular correspondiente al estado electrónico estándar puede ser aproximado por un oscilador armónico cuántico en las cercanías de la geometría molecular de equilibrio, las frecuencias vibracionales de resonancia son determinadas por los modos normales correspondientes a la superficie de energía potencial del estado electrónico estándar (aproximación Born-Oppenheimer aproximaciones armónicas). Los enlaces pueden vibrar de seis maneras: estiramiento simétrico, estiramiento asimétrico, flexión y por rotación. Con el fin de hacer medidas en una muestra, se transmite un rayo monocromo de luz infrarroja a través de la muestra, y se registra la cantidad de energía absorbida (Figura 33) (Willard, 1991).

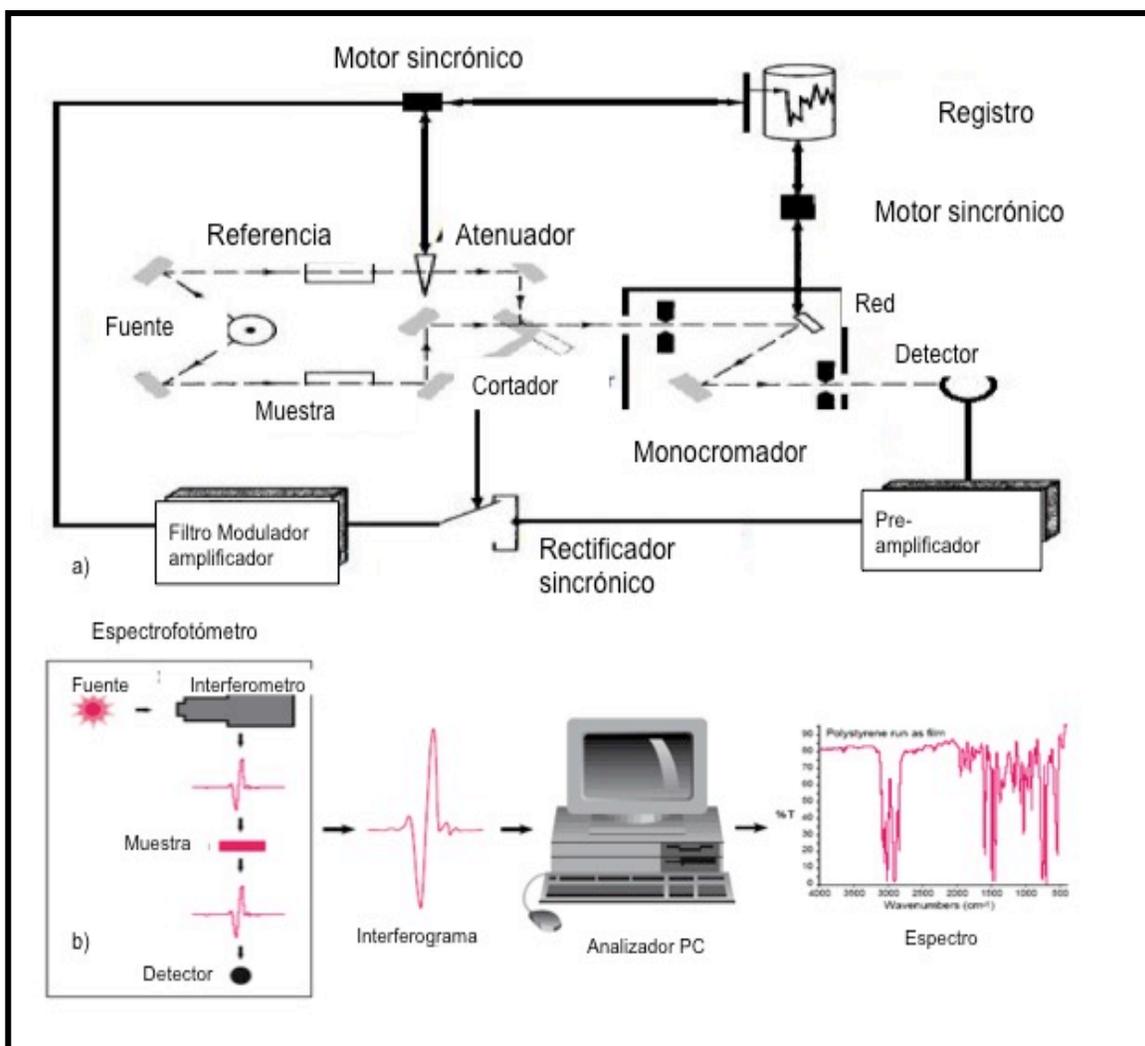


Figura 33. Esquema de un espectrofotómetro de doble haz de radiación infrarroja.

a) Un rayo monocromo de luz infrarroja se transmite a través de una muestra. b) se registra la cantidad de energía absorbida en un rango de longitudes de onda de interés, con la cual se puede construir un gráfico. Imagen tomada de: <https://photobioschool.ru/en/methods-en/ftir-spectroscopy/>

Microscopía Electrónica de Transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés “*Transmission Electron Microscopy*”) es la herramienta de caracterización utilizada ampliamente para determinar la forma y el tamaño de las NPs. Consiste en



irradiar una fina película de muestra (no más de 100 nm de grosor, para que ésta sea transparente a los rayos X) con un haz de electrones de densidad de corriente uniforme, con una energía elevada de 100 keV o superior. Parte de estos electrones son transmitidos, otra parte son dispersados y otra parte da lugar a interacciones que producen distintos fenómenos como emisión de luz o electrones secundarios. El TEM emplea la transmisión/dispersión de los elementos para formar imágenes, la difracción de los electrones para obtener información acerca de la estructura cristalina y la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de la muestra. El TEM nos proporciona imágenes reales de las formas de las nanoestructuras. Debido a los progresos en las fuentes de emisión del haz de electrones, así como en los correctores de aberración, la microscopía de alta resolución (HRTEM) es capaz de producir imágenes de las NPs con resolución subnanométrica. Así, algunos defectos, como la distorsión, la dislocación y las distancias interatómicas del nanomaterial, se pueden observar a partir de imágenes de alta resolución (High-resolution transmission electron microscopy: HRTEM) (Willard, 1991). La preparación de la muestra, consiste en depositar una gota de la suspensión coloidal sobre la rejilla de cobre para TEM recubierta de carbono, y permitiendo la evaporación del solvente, de preferencia en una cámara de vacío (Figura 34).

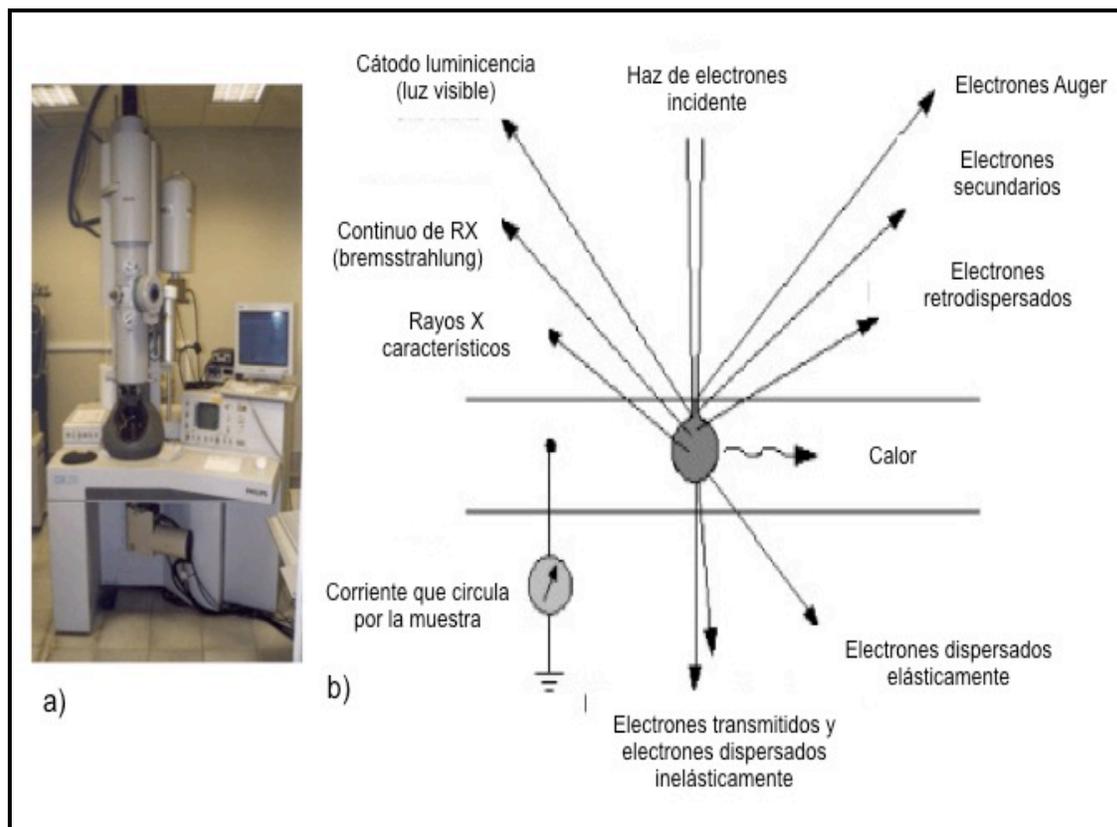


Figura 34. Esquema y fotografía de un microscopio electrónico de transmisión (TEM).

a) Microscopio TEM, Imagen tomada de: <http://www.icms.us-csic.es/es/electrones>

b) Proporciona imágenes reales de las formas de las NPs mediante la transmisión/dispersión de un haz de electrones, la difracción de los electrones da información acerca de la estructura cristalina y la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de la muestra. Imagen tomada de:

<https://dl.sciencesocieties.org/publications/jeq/abstracts/34/5/1707?access=0&view=article>



ANEXO B: Copa de Licurgo

La Nanociencia ha estado presente desde hace muchos años. Un ejemplo de esto es la famosa copa de Licurgo que se encuentra en el museo británico (Figura 35) creado por los romanos en el siglo IV d.C. El vidrio de la copa posee propiedades dicroicas es decir refleja la luz verde y transmite la roja. El análisis al que se sometió el cristal de la copa, reveló su composición química sosa-cal-sílica (que esta proporción es la que se utiliza hoy en día) 0.5 % de manganeso, y trazas de otros elementos como antimonio y de especial interés oro y plata con 40 ppm y 300 ppm respectivamente. La microscopía electrónica de transmisión (TEM) reveló la presencia de nanopartículas entre 50 y 100 nm de aquellos elementos. El análisis de rayos X determinó la proporción de estos últimos metales siendo 7:3. Estas nanopartículas (NPs) son las responsables de las propiedades ópticas del cristal. Por ello, cuando la luz incide en pequeñas partículas metálicas de tamaño nanométrico es capaz de excitar a la nube electrónica de manera colectiva, dando como resultado oscilaciones dipolares que decaen en escalas de tiempo entre 10 y 100 fs. Este movimiento es conocido como la resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR). Esta interacción con la luz produce diferentes colores dependiendo de la composición, tamaño y forma de las NPs. Con ello se explica el color verde de la copa debido a las NPs de plata y rojo a las de oro. Si bien el color depende de la concentración exacta de las NPs y esto, a la vez, la proporción mencionada de 7:3 de los metales; se piensa que el antimonio, utilizado en aquella época como decolorante y opacificante del vidrio, en una proporción de 0.3% fue el agente reductor necesario para la formación de las NPs, también podrían haber ayudado las otras especies químicas utilizadas en el vidrio de la copa para que se diera la reducción del oro y la plata, y subsecuentemente la formación, morfología y tamaño de las NPs resultantes. La temperatura para moldear el vidrio y reducir los metales así como la atmósfera del proceso fueron instrumento clave para la generación de este fenómeno. El plasmón, le confiere



a las NPs metálicas una extremada sensibilidad al ambiente local, dando cambios en su índice de refracción. Esta propiedad ofrece la posibilidad de utilizarles como biosensores y poder cuantificar la unión y cinética de un antígeno-anticuerpo, medir la concentración de estos ligandos o bien, determinar el peso molecular del metabolito unido (Horikoshi, 2013).



Figura 35. Copa de Licurgo.

El color verde se observa cuando la luz es reflejada, cambia a rojo si la luz es transmitida a través del mismo. Imagen tomada de <https://www.infobae.com/tendencias/2017/05/01/nanotecnologia-en-el-siglo-iv-la-misteriosa-copa-bicolor-de-licurgo/>

La copa de Licurgo es un ejemplo de NPs muy famoso, sin embargo ellas han estado en nuestro planeta por siglos, se liberan de manera natural al medio ambiente a través del fuego forestal, erupción volcánica y erosión del suelo por viento y/o agua. A partir de la revolución industrial, son incorporadas accidentalmente por diferentes procesos industriales donde se libera carbón, petróleo o gas de calderas y también por las emisiones de vehículos. Sin embargo, en los últimos años, se están fabricando de manera indiscriminada en varias aplicaciones industriales. En la Figura 36, se muestra un resumen de la historia de la Nanotecnología con los sucesos más relevantes en este campo (Webster, 2007).

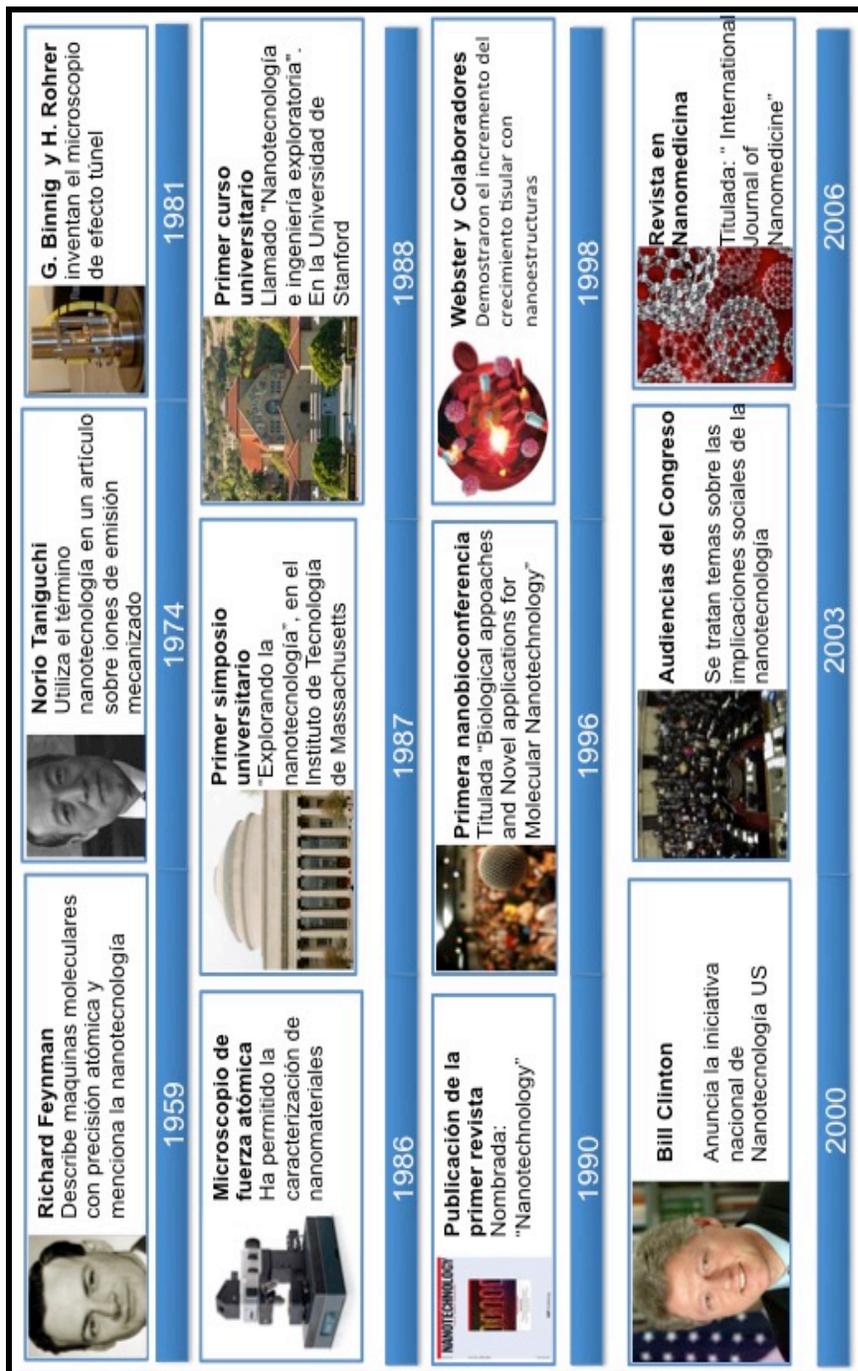


Figura 36. Línea del tiempo de la Nanotecnología.

En esta Figura se muestran los principales eventos relacionados a la Nanotecnología.



ANEXO C: Preparación de soluciones

❖ Buffer de Citratos

2.1 g en un litro de agua destilada, ajustar a un pH de 6 N con HCl 1

❖ PBS 10 X

80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14.4 g de Na₂HPO₄ 12H₂O, 2.4 g de KH₂PO₄.
Aforar a 1 L. Ajustar pH 7.2-7.4

❖ PBS 1 X

8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.4 g de Na₂HPO₄ 12H₂O. Aforar a 1 L.
Ajustar pH 7.2 - 7.4

❖ Sustrato DAB

1 pastilla de bencidina, 1 pastilla urea en 5 mL. Con una vida útil de 4 horas.

❖ TRIS-EDTA

1.21 g de Tris base, 0.37 g de EDTA, aforar a 1 L.

Agitar, verificar el pH a 9.0, agregar 0.5 mL de tween 20, agitar y almacenar. Con vida útil de 3 meses a temperatura ambiente o 6 meses a 4 °C.

❖ TBS (1X)

2.42 g de tris base, 8 g de NaCl. Aforar a 1 L.

Ajustar el pH a 7.6



❖ **TBST**

A un litro de TBS con pH de 7.6 agregar 1 mL de tween 20.

❖ **Buffer EDTA 1X**

0.37 g en un litro de agua destilada.

❖ **PBS albúmina 1%**

2 g de albúmina en 200 mL de PBS 1 X

❖ **Rojo Sirio:**

Ácido pícrico saturado: Se calientan 100 mL de agua destilada a 50 °C y se adiciona ácido pícrico. Se refrigera a 4 °C durante 8 hrs, se filtra de 2-5 veces hasta que ya no se tengan sales precipitadas, se le agrega rojo sirio (red 80, sigma) (100 mg/ 100 mL), se le agrega rojo rápido (fast green FCF 0.1%, sigma) se guarda en refrigeración en un frasco color ámbar y se deja macerar 30 días en refrigeración.



ANEXO D: Producción del trabajo

- ❖ Presentación oral/seminario con el tema de tesis: ***"Nanopartículas de plata soportadas en microesferas de SiO₂ para reparación de heridas dérmicas experimentales"***, en el Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica del Estado de Jalisco (CIATEJ). Febrero 2018.
- ❖ Presentación del cartel: ***"Análisis histológico de IL-6, TNF α , PCNA, α SMA y VEGF en la reparación dérmica experimental tratada con microesferas de SiO₂-AgNPs"*** en el XX Congreso Internacional de Avances en Medicina. Febrero 2018.
- ❖ Asistencia al XX Congreso Internacional de Avances en Medicina. Módulo "Patología" Febrero 2018.
- ❖ Publicación del artículo: ***"Nanocomposite of Ag⁰ NPs supported on SiO₂ microspheres induces wound healing in experimental skin incisions"***. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. Vol. 13, No, 1, 2018.