



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**INCLUSIÓN DE UN LISADO PLAQUETARIO EN
UN SISTEMA DE LIBERACIÓN SUBMICRÓNICO
PARA SU ADMINISTRACIÓN EN PIEL DAÑADA**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Sergio Alberto Bernal Chávez

Dra. Flora Adriana Ganem Rondero
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1, UNAM

Ciudad de México, febrero 2020

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Sergio Alberto Bernal Chávez', written over a horizontal line.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**INCLUSIÓN DE UN LISADO PLAQUETARIO EN UN
SISTEMA DE LIBERACIÓN SUBMICRÓNICO PARA
SU ADMINISTRACIÓN EN PIEL DAÑADA**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Sergio Alberto Bernal Chávez

Dra. Flora Adriana Ganem Rondero
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1, UNAM



Ciudad de México, febrero 2020

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Sergio Alberto Bernal Chávez', is located in the bottom right corner of the page.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser la Institución donde he podido cumplir una de las partes de mi desarrollo profesional.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM, que permitió que me desarrollara tanto como persona ética como con un desarrollo académico muy valioso.

Al CONACYT por la beca otorgada (292701) para realizar mis estudios de doctorado y a los proyectos PAPIIT (IN216016, IN226119) y PIAPI 1803 por los recursos otorgados para la realización de este proyecto.

A mi Tutora Dra. Flora Adriana Ganem Rondero, por su apoyo moral, por la convivencia durante mi tiempo de estancia en el laboratorio y sobre todo por compartirme sus conocimientos, por su paciencia y dedicación. Por su confianza y sus talentos.

A la Dra. Doris Cerecedo Mercado por su gran apoyo para la realización y entendimiento de los estudios *in vitro* e *in vivo* y por la aportación del lisado plaquetario, indispensables en mi proyecto.

A mi comité tutor, Dra. Elizabeth Piñón y Dra. Helgi Jung, por sus aportaciones, comentarios y mejoras a mi trabajo desde el primer semestre hasta el día de hoy.

A los miembros del jurado, (Dr. Andrés Navarrete, Dra. Helgi Jung, Dra. Luz Melgoza, Dr. Emilio Bucio y Dr. Gerardo Leyva) por su tiempo dedicado a la revisión del trabajo de investigación y por sus comentarios aportados.

A mis compañeros y amigos de posgrado con los cuales conviví durante estos 4 años y de los cuales recibí apoyo para la realización de este trabajo, en especial a Tere Pineda a quien cada que veía, había un momento de alegría y risa.

A Josefina Tenopala y a las secretarías de apoyo administrativo del posgrado, en especial a Ana María Nuñez quien durante estos 4 años me proporcionó constante apoyo efectivo y cordial, para la realización de trámites ante el programa de posgrado, además de una simpatía excepcional.

A la Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza (Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía-IPN) por su generoso apoyo durante el análisis de dicroísmo circular y al profesor Crisóforo Mercado Márquez (Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-C1) por su excelente apoyo en los estudios *in vivo*.

DEDICATORIA

A mis amados padres Damian Bernal Reyes y Ma. Del Socorro Chávez González, a mis amados hermanos Cesar, Esteban y Ma. Fernanda y mi sobrina Suguey, a mi querido Sergio Alcalá por su amor incondicional, por ser mis mejores amigos, porque no me alcanzan las palabras para agradecerles todo el amor que siento para ustedes.

A aquella persona que tocó mi corazón y me enseñó a valorar la esencia del amor, confianza, apoyo y respeto hacia todo...Dios.

El presente trabajo de investigación se realizó en el
Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica, L-322
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1, UNAM

Artículos publicados:

Año: 2020.- **Nombre:** *Platelet lysate-loaded PLGA nanoparticles in a thermo-responsive hydrogel intended for the treatment of wounds. European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2020, in press . <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105231>

Año: 2019.- **Nombre:** *Tetraphenylporphyrin intended for use in photodynamic therapy: Influence of sonophoresis and the formulation (solution or microemulsion) on percutaneous penetration. Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2019, 53. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101145>

Año: 2019.- **Nombre:** *Uso de polímeros inteligentes en la formulación de cosméticos. Perfumería moderna* 2019, (578), 18-21. <https://issuu.com/revistaperfumeriamoderna/docs/perfumeriamoderna-578/20> ISSN 0185-6588 (artículo de divulgación)

Año: 2019.- **Nombre:** *Nanocarrier based systems for wound healing. Drug Development and Industrial Pharmacy.* 2019, 45(9). <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1620270>

Presentación en congresos:

Año: 2018.- **Nombre:** Incorporación de un Nanosistema Cargado con un Lisado Plaquetario en una Matriz Polimérica Estimulo-Responsiva Destinada al Tratamiento de Heridas Crónicas., en: QuimiUNAM **Institución:** Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas/UNAM. Ciudad de México, México.

Año: 2018.- **Nombre:** Desarrollo y Evaluación de una Matriz Polimérica Termosensible Conteniendo un Sistema Submicrónico Cargado con una Mezcla de Factores de Crecimiento Destinada al Tratamiento de Heridas Crónicas., en: 4° Congreso de Ciencia, Educación y Tecnología **Institución:** Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán/UNAM. Cuautitlán Izcalli, Estado de México

Año: 2017.- **Nombre:** Nanopartículas Poliméricas de PLGA conteniendo un Lisado Plaquetario para su Administración en Piel Dañada., en: 3° Congreso de Ciencias, Educación Y Tecnología **Institución:** Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán/UNAM. Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Año: 2017.- **Nombre:** Liposomas ultraflexibles conteniendo un Lisado Plaquetario para su Administración en Piel Dañada., en: Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas **Institución:** Asociación Farmacéutica Mexicana. Tequila, Jalisco.

Año: 2016.- **Nombre:** Inclusión de un lisado plaquetario en un sistema submicrónico para el saneamiento de heridas., en: Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas **Institución:** Asociación Farmacéutica Mexicana. Huatulco, Oaxaca.

Año: 2016.- **Nombre:** Validación de métodos analíticos para la cuantificación de proteínas: un estudio comparativo., en: Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas **Institución:** Asociación Farmacéutica Mexicana. Huatulco, Oaxaca.

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Representación esquemática de las funciones de la piel.	2
Figura 2. Representación esquemática de la estructura de la piel.	3
Figura 3. Representación esquemática de las capas de la epidermis y estructura de "ladrillos y cemento" del EC.	4
Figura 4. Representación esquemática de los mecanismos de transporte de sustancias a través de la piel.	5
Figura 5. Representación esquemática de las etapas del saneamiento de heridas basado en el tiempo.	8
Figura 6. Representación esquemática de la primera etapa del saneamiento de heridas (hemostasis).	10
Figura 7. Representación esquemática de la segunda etapa del saneamiento de heridas (inflamación).	11
Figura 8. Representación esquemática de la tercera etapa del saneamiento de heridas (proliferación celular).	12
Figura 9. Representación esquemática de la cuarta etapa del saneamiento de heridas (remodelación de tejido).	13
Figura 10. Representación esquemática del proceso de obtención y composición del lisado plaquetario.	22
Figura 11. Esquema de los diferentes métodos para mejorar la absorción de fármacos a través de la piel.	24
Figura 12. Tipos y subtipos de acarreadores de fármacos utilizados.	26
Figura 13. Composición y esquema de la penetración de liposomas convencionales y elásticos a través de la piel.	28
Figura 14. Formas y clasificación de las NP poliméricas.	33
Figura 15. Tipo de NP y disposición del fármaco basado en los métodos de fabricación empleados.	35
Figura 16. Esquema general de la metodología seguida durante el proyecto de investigación.	38
Figura 17. Procedimiento ilustrativo de la obtención de LSE por la técnica de hidratación de película.	42
Figura 18. Procedimiento ilustrativo de la obtención de NP poliméricas por la técnica de doble emulsión- evaporación de disolvente.	43
Figura 19. Procedimiento ilustrativo de la preparación de la MPT por el método en frío.	47
Figura 20. Espectro UV para el LPT.	52
Figura 21. Espectro IR para el LPT.	53
Figura 22. Espectro DC para el LPT.	53
Figura 23. Reacción de Bradford y Biuret con el LPT.	54
Figura 24. Distribuciones de TV de los LSE antes y después de la reducción de tamaño.	55
Figura 25. Distribuciones de TP de las NP sin y con LPT.	56
Figura 26. Micrografía de las NP. NP sin LPT por TEM y con LPT con SEM.	61
Figura 27. Micrografía de los LSE.	61
Figura 28. Termogramas para LSE.	65
Figura 29. Termogramas para NP.	67
Figura 30. Espectros de infrarrojo para todas las materias primas y LSE desarrollados.	70

Figura 31. Espectros de infrarrojo para todas las materias primas y NP desarrolladas.	71
Figura 32. Espectros de dicroísmo circular para los LSE desarrollados.	73
Figura 33. Espectros de dicroísmo circular para las NP desarrolladas.	74
Figura 34. Efecto de la temperatura sobre el tamaño del LPT y los LSE.	75
Figura 35. Efecto de la temperatura sobre el tamaño del LPT y las NP.	76
Figura 36. Efecto del plasma sanguíneo sobre el tamaño de los LSE.	77
Figura 37. Efecto del plasma sanguíneo sobre el tamaño de las NP.	77
Figura 38. Perfil de liberación in vitro de los LSE.	79
Figura 39. Perfil de liberación in vitro de las NP.	80
Figura 40. Evaluación in vitro de LSE + LPT en un cultivo celular de fibroblastos antes y un día después de estar en contacto con las diferentes muestras.	82
Figura 41. Evaluación in vitro de NP + LPT en un cultivo celular de fibroblastos antes y un día después de estar en contacto con las diferentes muestras.	82
Figura 42. Perfiles de viscosidad de las MPT desarrolladas con respecto al cambio de temperatura.	85
Figura 43. Tiempo de no fluidez de la MPT cargada con los diferentes NS a 33.5°C.	87
Figura 44. Termogramas de las MPT cargadas con NP.	90
Figura 45. Termogramas de las MPT cargadas con LSE.	91
Figura 46. Espectros de infrarrojo para todas las materias primas y las MPT cargadas con LSE desarrolladas	93
Figura 47. Espectros de infrarrojo para todas las materias primas y las MPT cargadas con LSE desarrolladas	94
Figura 48. Espectros obtenidos por dicroísmo circular del LPT y la MPT con LP (MPT+LPT) y sin LP (MPT).	95
Figura 49. Curvas de desnaturalización del LPT en solución y en la MPT.	96
Figura 50. Cambio en el tamaño de la MPT con variación en la temperatura.	98
Figura 51. Reducción en el valor de pérdida de agua transepidermal por efecto de la MPT con y sin NS.	100
Figura 52. Cinética de difusión del LPT a través de la MPT.	102
Figura 53. Imágenes representativas de las cuatro heridas profundas para cada caso; control, solución de LPT , LSE MPT y LSE+LPT MPT con respecto al tiempo.	103
Figura 54. Imágenes representativas de las cuatro heridas profundas para cada caso; control, solución de LPT , NP MPT y NP+LPT MPT con respecto al tiempo.	103
Figura 55. Ejemplo de la evolución de las heridas a nivel macroscópico con los diferentes tratamientos con respecto al tiempo.	104

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla. 1. <i>Tipos de heridas crónicas y las causas principales de aparición.</i>	7
Tabla. 2. <i>Etapas y subetapas del proceso de saneamiento de heridas.</i>	14
Tabla. 3. <i>Funciones principales de las proteasas en la cicatrización normal.</i>	16
Tabla. 4. <i>Principales FC y citocinas que participan en el saneamiento de heridas.</i>	21
Tabla. 5. <i>Métodos de fabricación de LSE.</i>	30
Tabla. 6. <i>Tipos de vesículas liposomales y sus características de tamaño y forma.</i>	32
Tabla. 7. <i>Métodos de fabricación de NP poliméricas.</i>	36
Tabla. 8. <i>Pruebas utilizadas para la caracterización del LPT.</i>	40
Tabla. 9. <i>Valores obtenidos para tamaño de vesícula (TV), IPD, pZ para los LSE.</i>	55
Tabla. 10. <i>Valores obtenidos par TP, IPD y pZ para las NP.</i>	56
Tabla. 11. <i>Valores de EE y CC de los NS a dos cantidades diferentes de LPT.</i>	60
Tabla. 12. <i>Estudio de estabilidad para los LSE.</i>	63
Tabla. 13. <i>Estudio de estabilidad para las NP.</i>	65
Tabla. 14. <i>Estudio de flexibilidad.</i>	81
Tabla. 15. <i>Valores de pH de las diferentes MPT preparadas.</i>	85
Tabla. 16. <i>Temperatura de transición sol-gel de las diferentes MPT preparadas.</i>	88

LISTA DE ABREVIATURAS

- **%EE:** Porcentaje de eficiencia de encapsulación
- **°C:** Grado Celcius
- **aa** Aminoacidos
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **BSA:** Albumina sérica bovina
- **CC:** Capacidad de carga
- **cm:** Centímetro
- **DCM:** Diclorometano
- **DSC:** Calorimetría diferencial de barrido
- **EC:** Estrato corneo
- **ECM:** Matriz extracelular
- **EGF:** Factor de crecimiento epidérmico
- **ELH:** Elastasa leucositaria humana
- **FC:** Factor de crecimiento
- **FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos
- **FH:** Fluido de herida
- **FTIR/ATR:** Espectroscopía de Infrarrojo por transformadas de Fourier/ Reflectancia total atenuada
- **IL-1, -6:** Interleucina 1 o 6
- **IPD:** Índice de polidispersión
- **kDa:** Kilodalton
- **LPS:** Lipopolisacaridos
- **LPT:** Lisado plaquetario
- **LSE:** Liposomas elásticos
- **LUV:** Vesícula unilamelar grande
- **mg:** Miligramo
- **MLV:** Vesícula multilamelar
- **mm:** Milímetro
- **MMP:** Metaloproteinasas de matriz
- **MPT:** Matriz polimérica termosensible
- **MVV:** Vesícula multivesicular
- **nm:** Nanómetro
- **NO:** Óxido nítrico

- **NP:** Nanopartícula
- **NS:** Nanosistema
- **PBS:** Solución amortiguadora de fosfatos
- **PC:** Fosfatidilcolina
- **PCL:** Policaprolactona
- **PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas
- **pH:** Potencial de hidrogeno
- **PLA:** Ácido poliláctico
- **PLGA:** Ácido poliláctico-co-glicólico
- **PRP:** Plasma rico en plaquetas
- **PVA:** Alcohol polivinílico
- **pZ:** Potencial Z
- **ROS:** Especies reactivas de oxígeno
- **s:** Segundo
- **SUV:** Vesícula unilamelar pequeña
- **TEM:** Microscopia electrónica de transmisión
- **TGF- β , - α :** Factor de crecimiento transformante β o α
- **TN:** Tamaño de nanosistema
- **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral α
- **TP:** Tamaño de partícula
- **TV:** Tamaño de vesícula
- **u.a.** Unidades arbitrarias
- **UV:** Ultravioleta
- **VEGF:** Factor de crecimiento del endotelio vascular
- **W/O, O/W:** Acuosa en oleosa u oleosa en acuosa
- **ZnSe:** Selenuro de zinc
- **μg :** Microgramo
- **μl :** Microlitro

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	2
2.1.	La piel	2
2.1.1.	Estructura de la piel.....	2
2.1.2.	Epidermis y estrato corneo.....	3
2.1.3.	Absorción Percutánea.....	4
2.2.	Heridas	6
2.2.1.	Definición y tipos de heridas.....	6
2.2.2.	Sanearamiento.....	7
2.2.2.1.	Etapas del saneamiento	9
2.2.2.2.	Función de las proteasas	14
2.2.2.3.	Efecto del pH	16
2.2.3.	Tratamiento.....	17
2.3.	Proteínas	18
2.3.1.	Función en los sistemas vivos.....	18
2.3.2.	Importancia en las enfermedades crónicas: ventajas y desventajas.....	18
2.3.3.	Citocinas y factores de crecimiento.....	19
2.3.4.	Efecto de las citocinas y factores de crecimiento en el saneamiento de heridas.....	20
2.4.	Lisado plaquetario	21
2.4.1.	Definición.....	21
2.4.2.	Función y composición.....	22
2.5.	Estrategias para incrementar la absorción de fármacos a través de la piel	23
2.5.1.	Moduladores de absorción físicos y químicos.....	24
2.5.2.	Nanoacarreadores.....	25
2.5.2.1.	Liposomas elásticos (LSE)	27
2.5.2.1.1.	Definición.....	27
2.5.2.1.2.	Características.....	28
2.5.2.1.3.	Métodos de preparación.....	29
2.5.2.2.	Nanopartículas poliméricas	32
2.5.2.2.1.	Definición.....	32
2.5.2.2.2.	Características.....	33
2.5.2.2.3.	Métodos de preparación.....	34
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
3.1.	Hipótesis	37
3.2.	Objetivo general	37
3.3.	Objetivos específicos	37
4.	PARTE EXPERIMENTAL	38
4.1.	Equipos y reactivos	39
4.2.	Métodos	41
4.2.1.	Caracterización del lisado plaquetario (LPT).....	41
4.2.2.	Obtención de liposomas elásticos (hidratación de película).....	42

4.2.3.	Obtención de nanopartículas poliméricas (doble emulsión-evaporación de disolvente).....	42
4.2.4.	Caracterización de los nanosistemas.....	43
4.2.4.1.	Tamaño, índice de polidispersión y potencial Z	43
4.2.4.2.	Eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (CC)	44
4.2.4.3.	Morfología	44
4.2.4.4.	Estabilidad	44
4.2.4.5.	Estudio calorimétrico	45
4.2.4.6.	Estudio por infrarrojo	45
4.2.4.7.	Estudio por dicroísmo circular (DC)	45
4.2.4.8.	Efecto de la temperatura sobre el tamaño del nanosistema	46
4.2.4.9.	Efecto del plasma sanguíneo sobre el tamaño del nanosistema	46
4.2.4.10.	Cinética de liberación	46
4.2.4.11.	Flexibilidad (solo para LSE)	47
4.2.4.12.	Evaluación in vitro	47
4.2.5.	Preparación de la matriz polimérica termosensible (MPT).....	47
4.2.6.	Caracterización de la MPT.....	48
4.2.6.1.	Viscosidad	48
4.2.6.2.	pH	48
4.2.6.3.	Tiempo de no fluidez	48
4.2.6.4.	Temperatura de transición sol-gel	48
4.2.6.5.	Estudio por DSC	49
4.2.6.6.	Estudio por infrarrojo	49
4.2.6.7.	Estudio por DC	49
4.2.6.8.	Desnaturalización del LPT	49
4.2.6.9.	Pérdida del movimiento Browniano	50
4.2.6.10.	Estabilidad	50
4.2.6.11.	Efecto oclusivo	50
4.2.6.12.	Cinética de difusión del LPT	50
4.2.6.13.	Evaluación in vivo de la MPT cargada con nanosistema	51
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
5.1.	Lisado plaquetario	51
5.2.	Nanosistemas	54
5.2.1.	Tamaño, índice de polidispersión y pZ.....	54
5.2.2.	Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga.....	59
5.2.3.	Morfología.....	60
5.2.4.	Estabilidad.....	62
5.2.5.	Estudio calorimétrico.....	64
5.2.6.	Estudio por infrarrojo.....	68
5.2.7.	Estudio por dicroísmo circular.....	72
5.2.8.	Efecto de la temperatura sobre el tamaño del NS.....	74
5.2.9.	Efecto de plasma sanguíneo sobre el tamaño del NS.....	76
5.2.10.	Cinética de liberación.....	79
5.2.11.	Flexibilidad (solo para LSE).....	81
5.2.12.	Estudios <i>in vitro</i>	81
5.3.	Matriz polimérica termosensible	83
5.3.1.	Viscosidad.....	84
5.3.2.	pH.....	85
5.3.3.	Tiempo de no fluidez.....	87

5.3.4.	Temperatura de transición sol-gel	88
5.3.5.	Estudio por DSC.....	89
5.3.6.	Estudio por IR.....	92
5.3.7.	Estudio por DC	95
5.3.8.	Desnaturalización del LPT.....	96
5.3.9.	Pérdida del movimiento Browniano	97
5.3.10.	Estabilidad	98
5.3.11.	Efecto oclusivo	99
5.3.12.	Cinética de difusión del LPT.....	101
5.3.13.	Evaluación <i>in vivo</i> de la MPT cargada con NS con y sin LPT	102
6.	CONCLUSIONES.....	104
7.	PERSPECTIVAS	106
8.	REFERENCIAS.....	106

1. INTRODUCCIÓN

Durante el paso de los años la prevalencia de gente con heridas crónicas ha incrementado dramáticamente por factores tales como el fumar, obesidad y enfermedades crónicas, por ejemplo, la diabetes que pueden retardar el proceso de recuperación de las heridas e incrementar el riesgo de que se vuelvan crónicas. Además del costo que conlleva el cuidado de las heridas, las terapias actuales están lejos de garantizar el adecuado saneamiento además de que la recurrencia es común. Por otro lado, muchos de los pacientes requieren de administraciones frecuentes y altas dosis para lograr el efecto deseado, con la posibilidad de que se presenten efectos indeseables si se alcanzan concentraciones sistémicas elevadas[1].

Por tal situación el mejoramiento de los tratamientos de heridas crónicas se ha vuelto una necesidad de tal modo que la comunidad científica se ha enfocado no sólo en desarrollar nuevos tratamientos sino también en mejorar la efectividad de las terapias actuales[2].

El proceso de desarrollo de heridas es un evento fisiológico complejo el cual se caracteriza por una etapa inflamatoria con la presencia de células proinflamatorias que actúan creando un microambiente proteolítico que incluye la degradación de factores de crecimiento y citocinas importantes en el proceso de cicatrización. Esta disminución de factores de crecimiento y citosinas prevé una estrategia interesante para el saneamiento de las heridas si son administrados externamente. El uso de sistemas nanométricos como sistemas de liberación de fármacos también ofrece una alternativa interesante en el área de sistemas dérmicos, tales como los liposomas y las nanopartículas poliméricas, debido a las ventajas que estos poseen[3]. Con esto, en este trabajo se planteó como una estrategia interesante el desarrollar un sistema nanométrico que permita incluir un lisado plaquetario con poder cicatrizante, por un lado, con el fin de incrementar su estabilidad tanto en anaquel como una vez expuesto al medio biológico, y por otro lado, para conseguir una liberación prolongada. La efectividad del sistema

propuesto se evaluó primeramente mediante estudios *in vitro* y finalmente a través de estudios *in vivo*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. La piel

Se sabe que la piel ocupa alrededor del 15% del peso total corporal de un adulto y tiene un área superficial de cerca de 2 m². La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y es hogar de más de tres millones de microorganismos por cm² los cuales se alimentan de los productos de descamación y secreciones de ésta. El entendimiento de las funciones (Figura 1) de este órgano ayudará a la evaluación de pacientes, la evaluación de su potencial para el saneamiento posterior a un daño y finalmente a la aplicación de formulaciones farmacéuticas y cosméticas[4].

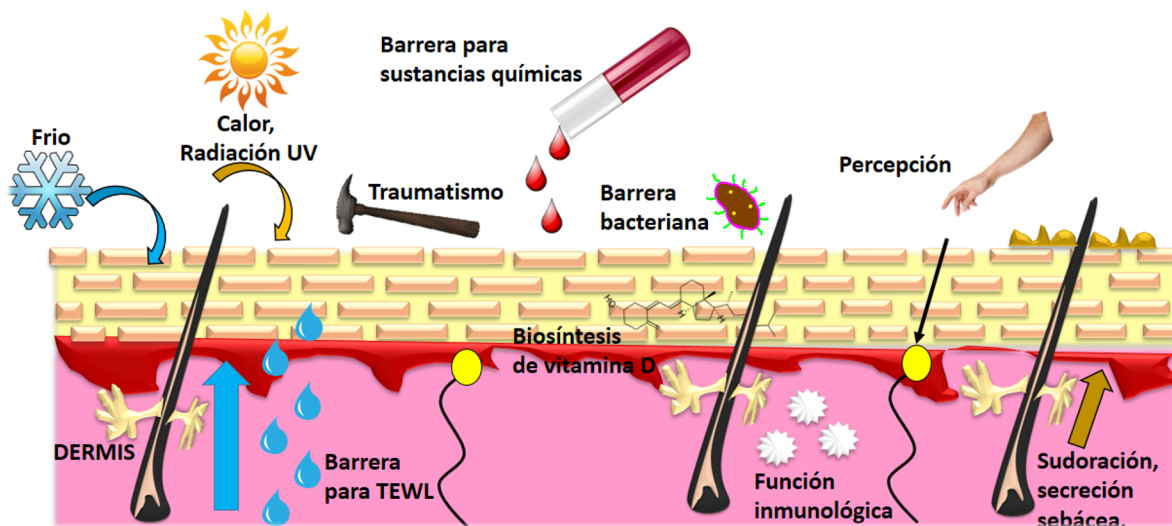


Fig. 1. Representación esquemática de las funciones de la piel.
TEWL: Abreviatura de Transepidermal Water Loss

2.1.1. Estructura de la piel

La piel es un órgano compuesto de diversas capas, histológicamente descritas en términos de capas de tejido, epidermis, dermis e hipodermis o tejido subcutáneo (Figura 2)[5]. La segunda capa por debajo de la capa epidérmica es la dermis la cual es mucho más gruesa que la epidermis

(alrededor de 1-4 mm). Los principales componentes de la dermis son las fibras de colágena y elastina, comparado con la epidermis hay mucho menos células y muchas más fibras en la dermis^[5]. Por debajo de la dermis encontramos la hipodermis, una capa subcutánea de grasa altamente vascularizada e inervada, que actúa como amortiguador de la epidermis y dermis, así como un aislante térmico de la piel^[6].

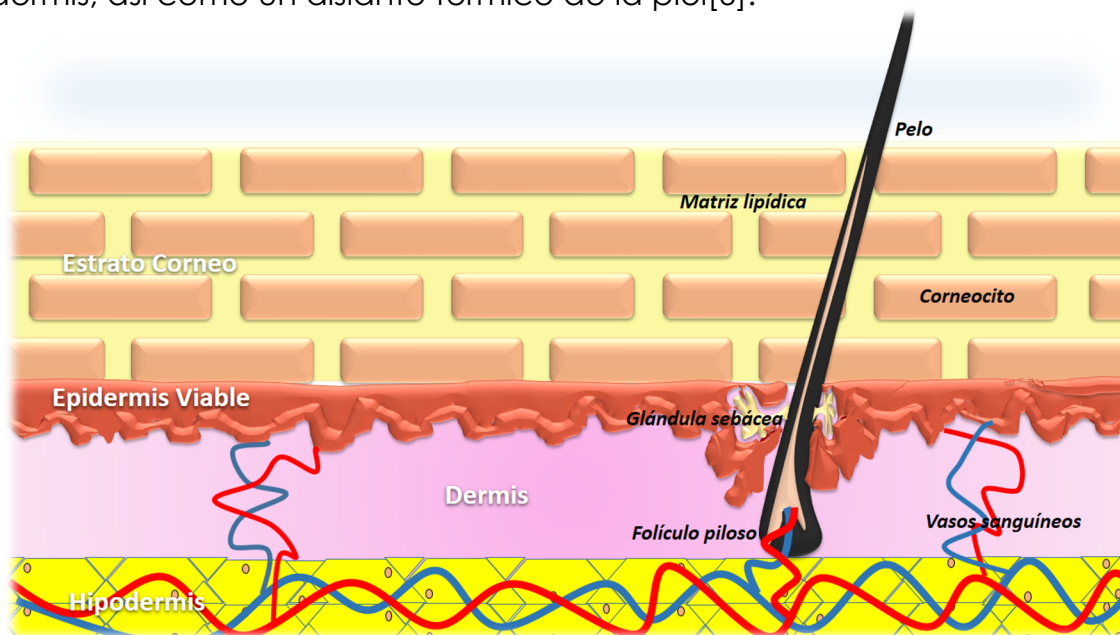


Fig. 2. Representación esquemática de la estructura de la piel.

2.1.2. Epidermis y estrato corneo

Las células de la epidermis están compuestas en un 96% por queratinocitos. La capa más externa, el estrato corneo (EC), está formada por corneocitos, las cuales son las células principales que forman una estructura denominada “de ladrillos y cemento” (Figura 3, usada para conceptualizar las propiedades de barrera de la piel); de igual manera se encuentran incluidas otras células como melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel (componentes menores). Estas células proliferan y las células hijas se comprometen a una diferenciación terminal, la cual termina con la formación del EC^[7]. Los corneocitos de queratina hidratada funcionan como “ladrillos” embebidos en un “cemento” compuesto de múltiples

bicapas lipídicas de ceramidas, ácidos grasos, colesterol y ésteres de colesterol. Estas bicapas forman regiones de dominios de cristal líquido y gel semicristalino^[8]. Debido a que la regeneración del EC lleva de 25 a 30 días, la pérdida de función de barrera persistirá^[9].

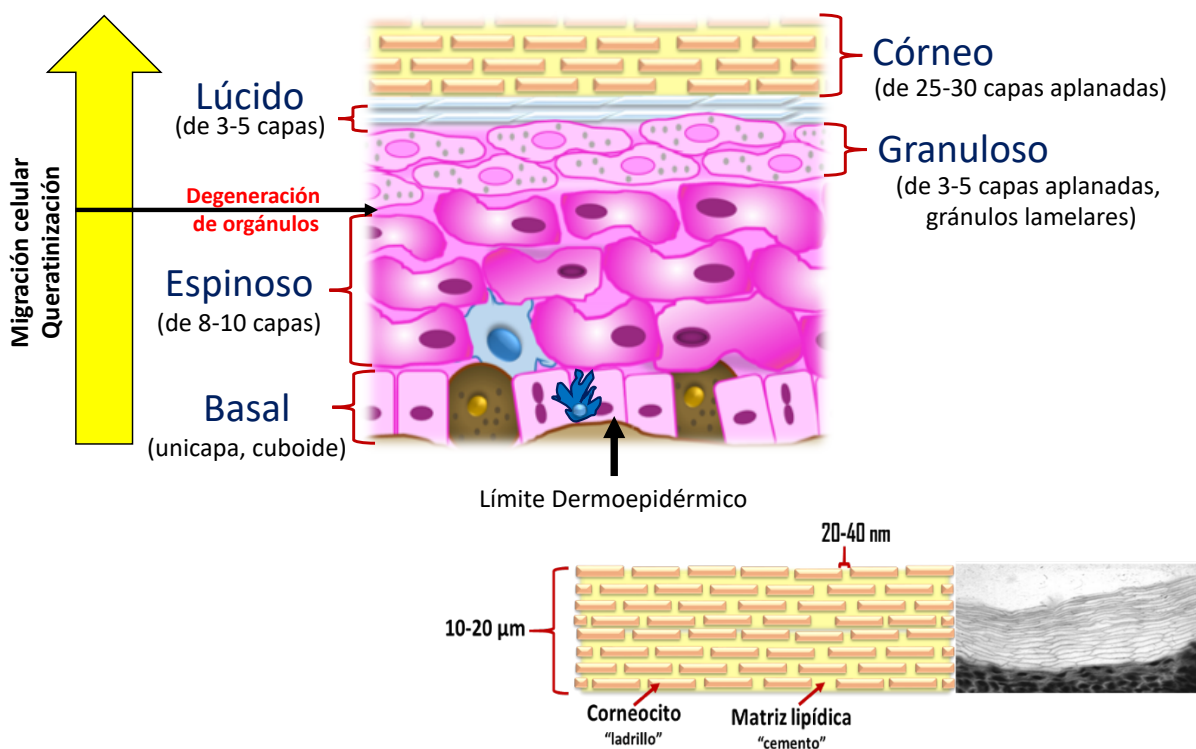


Fig. 3. Representación esquemática de las capas de la epidermis (superior) y estructura de "ladrillos y cemento" del EC (inferior).

2.1.3. Absorción Percutánea

La importancia de la vía transepidermal para transportar una variedad de fármacos sobre y dentro de la piel ha recibido gran atención en los últimos años^[10, 11]. Es bien sabido que el paso limitante en la difusión a través de la piel se presenta en los dominios lipídicos intercelulares del estrato córneo. La naturaleza polimórfica de estos lípidos, y las interacciones entre ellos mismos y con las proteínas, conduce a diferentes estados de la membrana, ej. transiciones cristalinas gel-líquido.

El proceso de difusión a través de la piel, controlado por el EC, puede ser considerado como un proceso de difusión pasiva a través de la

membrana. El flujo en estado estacionario (J) de un activo a través de la piel puede describirse por la segunda ley de difusión de Fick ($\delta C/\delta t=D(\delta^2 C/\delta X^2)$); donde C es la concentración de la sustancia que difunde, X el espacio medido normalmente, D es el coeficiente de difusión, y t es el tiempo. Con estudios de permeación en piel para evaluar el transporte de diversas sustancias, e.g., fármacos, protectores solares, entre otros, los investigadores a menudo utilizan un protocolo *in vitro* con una membrana que se sitúa entre dos compartimientos uno de los cuales (el donador) contiene la formulación y el otro (el receptor) una solución que provee condiciones *sink*.

La mayoría de las moléculas permean a través del EC por vías intercelular, transcelular y folicular (apéndices) (Figura 4)[5].

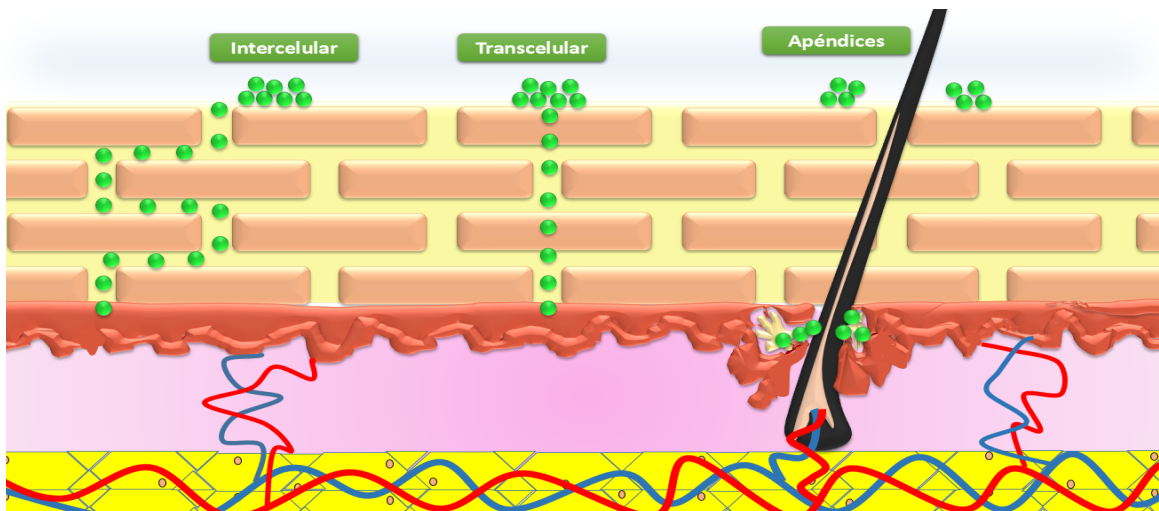


Fig. 4. Representación esquemática de los mecanismos de transporte de sustancias a través de la piel.

Existen varios factores los cuales afectan la penetración a través de la piel: diferentes especies, la edad de la piel, el sitio de aplicación, temperatura de la piel, estado de la piel (normal, erosionada, o con alguna condición patológica), área de aplicación, el tiempo de contacto, el grado de hidratación de la piel, pretratamiento de la piel y características físicas del modulador. El mecanismo de penetración del fármaco a través de la piel y sobre todo relacionado a la difusión, es dependiente de la concentración[5].

La liberación transdérmica permite la permeación de fármacos a través de la piel para que posteriormente lleguen a circulación sistémica, con lo cual se evita el metabolismo de primer paso hepático, efecto observado durante la administración oral[12]. Sin embargo, el principal obstáculo en la administración transdérmica y tópica es la barrera formada por la matriz intercelular lipídica del EC. Es por esto que los esfuerzos se han enfocado en el desarrollo de sistemas terapéuticos de liberación transdérmica, capaces de superar las propiedades de barrera del EC de una forma local y reversible[13]. Un gran número de técnicas se han desarrollado para mejorar y controlar el transporte a través de la piel, y ampliar el rango de liberación de fármacos. Esto involucra métodos tanto físicos como químicos, basados en dos estrategias: incrementar la permeabilidad de la piel y/o proveer una fuerza conductora que actúe sobre el fármaco[14]. Existen muchas tecnologías ingeniosas desarrolladas para mejorar los sistemas de liberación transdérmica, tanto con propósitos terapéuticos como de diagnóstico que van desde el uso de moduladores químicos, vesículas y partículas, remoción del EC, hasta promotores físicos (e.g., iontoforesis, electroporación, ultrasonido, etc.) o mezclas sinérgicas de estas estrategias[5].

2.2. Heridas

2.2.1. Definición y tipos de heridas

Las heridas son definidas de manera general como una lesión que rompe la piel u otros tejidos, lo que provoca una falta de continuidad. Esta lesión puede ser causada por accidentes, caídas, golpes, quemaduras, armas y otras causas[15]. El daño a membranas es una amenaza diaria para la vida de una célula, especialmente células musculares, intestinales, de la epidermis y de vasculatura, tejidos que están susceptibles a estrés mecánico[16]. En este caso la alteración dará como resultado un daño a muchas estructuras, capas y linajes celulares incluyendo la capa de queratinocitos de la epidermis y sus apéndices, la membrana basal, y la dermis[17]. Las heridas pueden ser clasificadas como agudas o crónicas y a

la vez estas últimas se dividen en úlcera venosa, úlcera arterial, úlcera diabética y úlcera por presión[18] (Tabla 1). La diferencia entre agudas y crónicas radica en que las heridas crónicas permanecen en un estado bloqueado de inflamación lo que no permite el avance a las siguientes etapas de saneamiento de heridas, situación que en las heridas agudas si es posible^[19]. Otra definición de herida crónica está referida a aquellas heridas que han fallado en restaurar la integridad funcional y anatómica de la piel en un periodo de tres meses[2].

Tabla. 1. Tipos de heridas crónicas y las causas principales de aparición. Tomada y modificada de ^[18].

ULCERA	CAUSAS	NUMERO DE PACIENTES AFECTADOS
<i>Venosa</i>	Insuficiencia venosa, trombosis, varicosis.	400,000-600,000
<i>Arterial</i>	Macroangiopatía, arterioesclerosis, insuficiencia arterial.	100,000
<i>Diabética</i>	Neuropatía, microangiopatía, hiperglicemia.	2 millones
<i>Por presión</i>	Inmovilidad, presión excesiva.	1.3 millones-3 millones

2.2.2. Saneamiento

El saneamiento de heridas es un proceso fisiológico central que involucra una interacción compleja entre hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación de tejido bajo la movilización y la comunicación de sistemas celulares y bioquímicos[20] que ocurren en una secuencia apropiada, en un tiempo específico (Figura 5) y continúa por un periodo establecido hasta un punto óptimo^[21]. Los sistemas que de manera general participan en este proceso son las plaquetas, células tales como neutrófilos, monocitos/macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos, así como componentes la matriz extracelular (ECM) [22]. Desde un punto de vista físico, un orificio, que va desde unos cuantos nanómetros a unos micrómetros

en la bicapa lipídica de la membrana celular en una herida, crea una situación desfavorable energéticamente y por tanto la membrana tendrá la tendencia a autorepararse[16]. Dos fuerzas se opondrán mutuamente durante el proceso de saneamiento. La primera fuerza, la tensión de membrana, se opondrá a la dirección de cerrado, una segunda, la tensión lineal, promoverá el sellado[16]. Este proceso tiene un impacto clínico importante en una gran variedad de enfermedades ampliamente distribuidas como la diabetes, desordenes inflamatorios crónicos, enfermedades vasculares y enfermedades autoinmunes[20, 23].

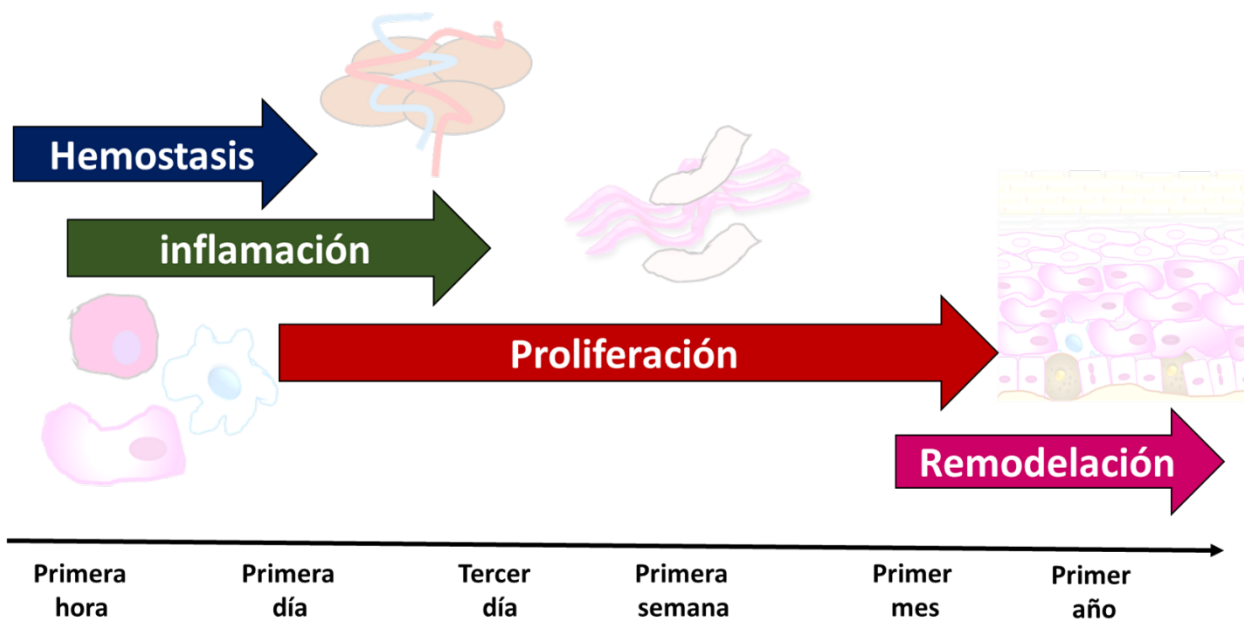


Fig. 5. Representación esquemática de las etapas del saneamiento de heridas basado en el tiempo. Tomada y modificada de [22].

Las causas de un proceso de recuperación afectado están frecuentemente relacionadas a una hipoxia local, infección o respuesta inflamatoria prolongada, y respuestas celulares al estrés alteradas[20]. Las heridas que exhiben un proceso de saneamiento alterado generalmente en heridas crónicas, entran en un estado de inflamación patológica[21] que no permite el avance a las siguientes etapas del saneamiento. Todas estas consideraciones han sido objeto de numerosos estudios experimentales,

basados fundamentalmente en modelos *in vitro* de migración celular, modelos animales y modelos *in silico*[20].

2.2.2.1. Etapas del saneamiento

Uno de los pasos críticos en el saneamiento de heridas es la reparación de una capa epitelial continua cuya función es restaurar la homeostasis del tejido, regenerar la integridad de la barrera, y proteger de posibles infecciones causadas por microorganismos[23]. Una vía exitosa para un saneamiento completo y funcional de la herida se logra sólo cuando se envían e interpretan ciertas señales biológicas [20]. Sin embargo, es importante mencionar que el proceso de saneamiento se puede ver interrumpido o prolongado. Para llegar a cumplir con este objetivo el saneamiento de las heridas contempla cuatro etapas generales, aunque dentro de ellas pueden ocurrir otra serie de subetapas (Tabla 2). Las fases, las cuales se sobrepone en el tiempo, poseen características particulares y de gran importancia, son las siguientes:

Hemostasia (Figura 6). Comienza inmediatamente después de que se produce la herida con la contracción vascular causada por factores vasoconstrictores, como la serotonina, tromboxano A₂ o adrenalina[22]. Otro fenómeno en esta etapa es la formación de un coágulo de fibrina insoluble por activación y agregación de plaquetas, como resultado del contacto con la colágena de vasos dañados, con el objetivo de prevenir el sangrado excesivo y proveer protección provisional en el área afectada[17, 18]. El coagulo y el tejido circundante liberan citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento (FC) transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF)[21]. Estos factores promueven varias etapas del proceso de reparación, ejemplo de ello están la angiogénesis, inflamación y migración de fibroblastos y queratinocitos[17]. Una vez que el sangrado se ha

controlado, las células inflamatorias migran al sitio de la lesión por efecto de los factores de crecimiento y la siguiente etapa tomará lugar.

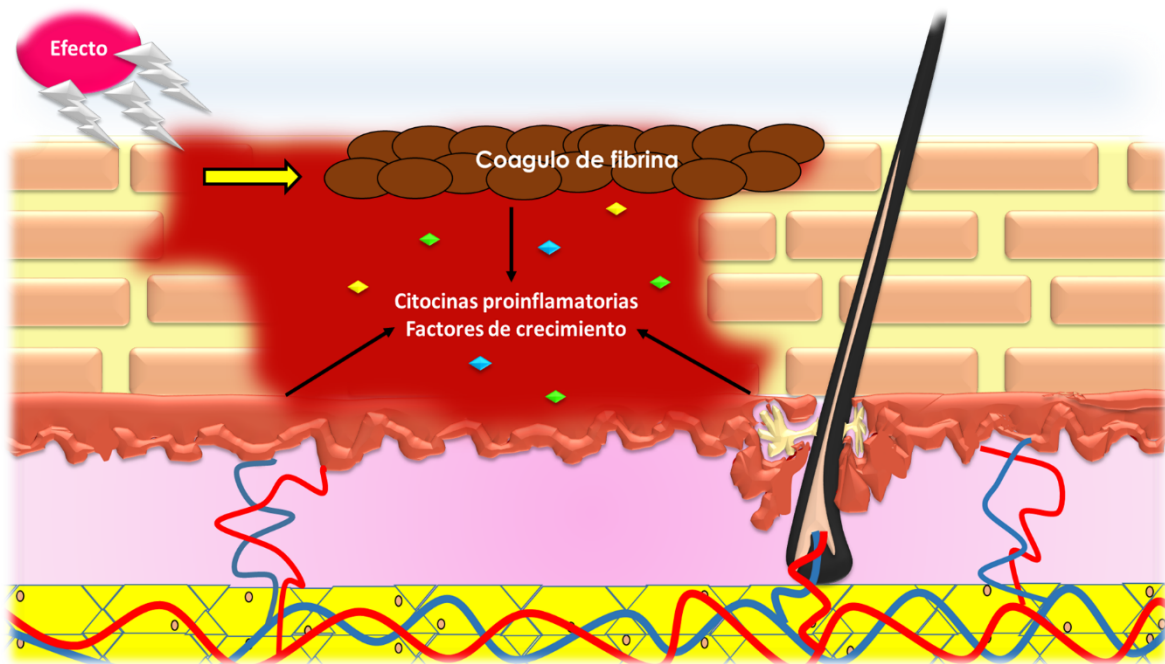


Fig. 6. Representación esquemática de la primera etapa del saneamiento de heridas (hemostasis).

Inflamación (Figura 7). Se desarrolla durante las 24 horas después de iniciado el daño y dura alrededor de 48 horas en promedio[22]. Esta etapa se caracteriza por una permeabilidad vascular incrementada, lo que promueve el drenaje de plasma al sitio de la herida. Así mismo, en esta etapa se da una infiltración secuencial, en primer lugar de neutrófilos, macrófagos y linfocitos por acción de FC y epítopes foráneos (ej. lipolisacaridos, LPS), así como de microorganismos invasores[17]. La función crítica de neutrófilos es la eliminación de microorganismos invasores y detritos celulares en el área de la herida, también producen sustancias como proteasas y especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO)[17, 21]. Cabe mencionar que las ROS son el mayor estímulo de la síntesis del VEGF que provee un rol sustancial en la respuesta inmune en la herida[22]. Por otro lado, los macrófagos liberan citocinas (IL-1 y TNF- α) que promueven la respuesta inflamatoria por reclutamiento y activación de leucocitos adicionales, inducen y limpian las

células que sufren apoptosis y las bacterias por la secreción de metaloproteinasas de matriz (MMP), ejemplo colagenasa o elastasa; promueven la transición a una fase proliferativa de saneamiento y síntesis de colágena por estimulación por citocinas y FC (TGF- β , PDGF, bFGF, HB-EGF, IL-1, IL-6, y TGF- α) sobre los fibroblastos[21, 22]. El proceso de resolución de esta etapa, se cree es debida a un efecto de citocinas antiinflamatorias (TGF-A1 e IL-1), y lípidos bioactivos (prostaglandinas, lipoxinas y resolvinas)[18].

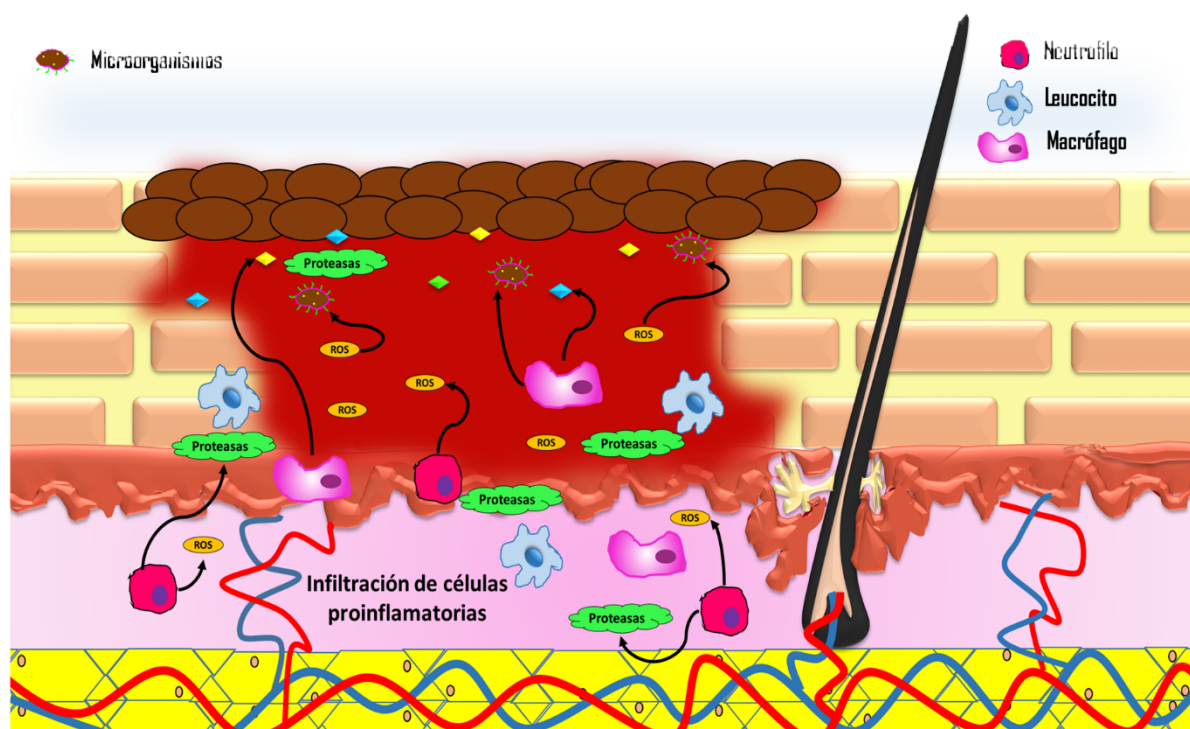


Fig. 7. Representación esquemática de la segunda etapa del saneamiento de heridas (inflamación).

Proliferación celular (Figura 8). Se caracteriza por la división epitelial y migración sobre una matriz provisional dentro de la herida (re-epitelización)[21]. En esta etapa los FC producidos por células inflamatorias remanentes y células epidérmicas y dérmicas actúan de manera autocrina, paracrina y juxtacelular para inducir y mantener la proliferación mientras toma lugar la migración. Las células que migrarán ensamblan protrusiones lamelares ricas en actina para que el proceso se dé adecuadamente,

también permiten la sobre-expresión de enzimas proteolíticas como las MMP[17], todos estos eventos son necesarios para la formación del tejido de granulación (estroma formado *de novo* por los componentes de la ECM que reemplaza el coágulo de fibrina)[17] lo que apoya la epitelización[18]. La reparación epitelial se lleva a cabo a través del movimiento colectivo de células cercanas al sitio de la lesión. Este movimiento comúnmente involucra dos mecanismos, el ensamblaje de un anillo de actomiosina supracelular al margen de la herida y una migración colectiva de células marginales y submarginales conducidas por protusiones lamelipodial y filopodial[23]. Dentro del sitio de la lesión, los fibroblastos procedentes ya sea de dermis sana circundante o circulantes, producen colágena, fictronectina, glucosaminoglicanos y proteoglicanos, mayores componentes de la EMC; así mismo secretan IGF-1, bFGF, TGF- β , PDGF y EGF, seguido de la proliferación robusta y la síntesis de la ECM, causadas por todos estos mediadores mencionados. Finalmente, el saneamiento de heridas entra en la última etapa [17, 21, 22].

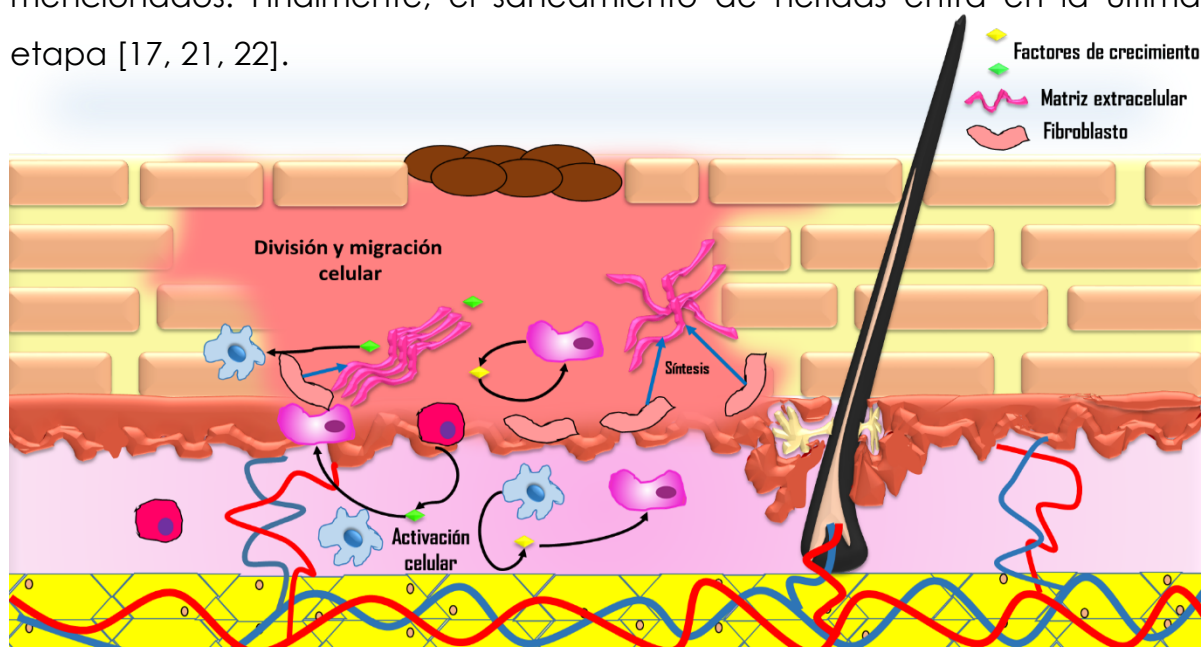


Fig. 8. Representación esquemática de la tercera etapa del saneamiento de heridas (proliferación celular).

Remodelación (Figura 9). En este último punto la densidad vascular comienza a disminuir hasta la normalidad. Una característica importante en esta fase es la remodelación del ECM, cuyos componentes juegan un rol significativo en cada etapa del proceso de saneamiento, hasta llegar a una arquitectura que se aproxime al tejido normal[21, 22] y un balance delicado de la síntesis de colágena, (entrelazamiento y degradación por MMP)[17]. De igual manera, la herida sufre un proceso de contracción física que es mediada por miofibroblastos que aparecen en la herida[24], en respuesta al TGF- α , a la tensión tisular, y a la presencia de ciertas proteínas de matriz (fibronectina y tenascina C), entre otros factores[18].

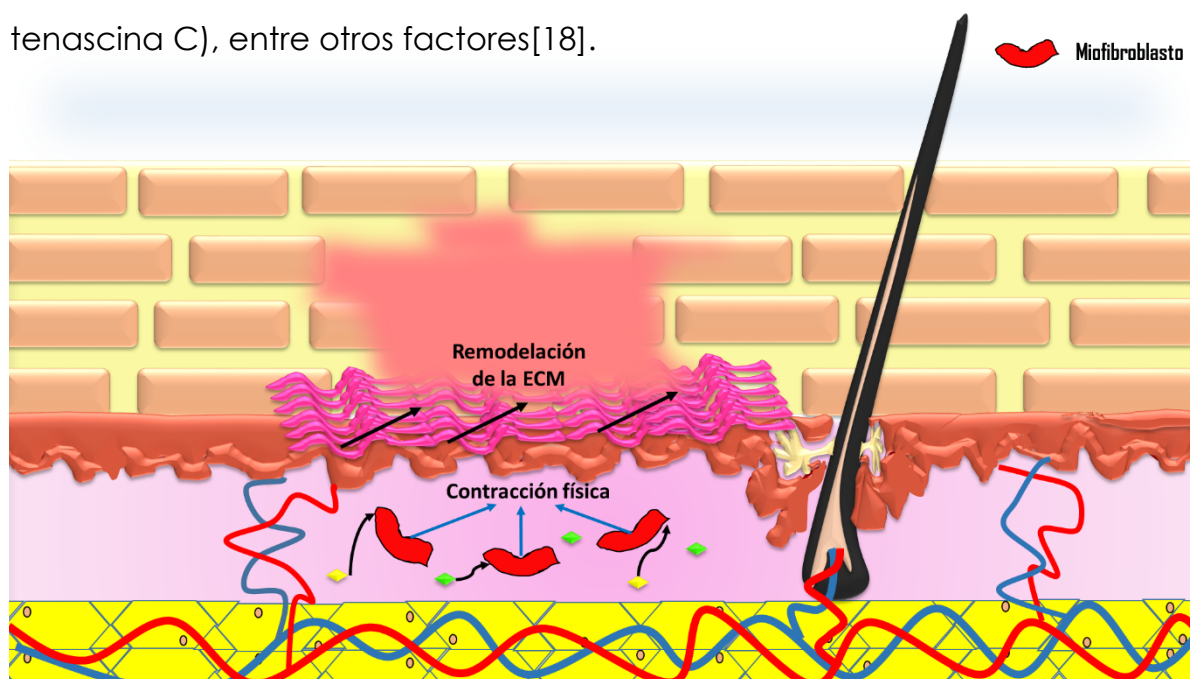


Fig. 9. Representación esquemática de la cuarta etapa del saneamiento de heridas (remodelación de tejido).

Tabla 2. Etapas y subetapas del proceso de saneamiento de heridas (ECM: matriz extracelular). Tomada y modificada de [21].

FASE	SUBETAPAS
<i>Hemostasia</i>	1. Contracción vascular
	2. Agregación plaquetaria, liberación del contenido granular, y formación de fibrina (trombo)
<i>Inflamación</i>	1. Infiltración de neutrófilos
	2. Infiltración de monocitos y diferenciación a macrófagos
	3. Infiltración de linfocitos
<i>Proliferación</i>	1. Reepitelización
	2. Angiogénesis
	3. Síntesis de colágena
	4. Formación de ECM
<i>Remodelación</i>	1. Remodelación de colágena
	2. Maduración vascular y regresión

Como se ha mencionado cuando una herida de tipo aguda se mantiene en un estado alterado de la fase de inflamación ésta comienza a adquirir el carácter de crónica. Esta situación, en la cual un herida no lleva a cabo el proceso de saneamiento completo, ha tenido relación con varios mecanismos, estos incluyen, aunque no son limitantes, biodisponibilidad reducida de FC y receptores, producción/modificación anormal de proteínas de matriz, capacidad proliferativa disminuida de células residentes, y perfusión hacia la herida alterada o insuficiente[25].

2.2.2.2. Función de las proteasas

Las proteasas son enzimas destructivas necesarias para el catabolismo de proteínas y la generación de aminoácidos en los organismos. Las proteasas actúan como una especie de “tijeras afiladas” y que catalizan reacciones altamente específicas de procesos proteolíticos, produciendo nuevos productos de proteínas. Las alteraciones en estos sistemas proteolíticos dan como resultado múltiples condiciones patológicas como cáncer, desordenes neurodegenerativos, y enfermedades cardiovasculares e inflamatorias[26].

En el proceso de desarrollo de una herida se genera un ambiente el cual generalmente está caracterizado por la presencia de un líquido conocido como fluido de herida (FH), este refleja los eventos metabólicos y celulares que conducen a la progresión de las heridas y/o su saneamiento. El FH está constituido principalmente de fluidos, electrolitos y proteínas[19]. Un tipo particular de proteínas que son de importancia en el desarrollo de heridas crónicas y así mismo se vuelven un objetivo terapéutico, son las proteasas.

En el proceso de cicatrización, las principales proteasas son las MMP y las serinas proteasas (ej., elastasa). En el proceso normal de cicatrización, las proteasas descomponen las proteínas dañadas de la ECM y la materia extraña para que puedan formarse nuevos tejidos y la herida se cierre de forma ordenada (Tabla 3). Sin embargo, cuando el nivel de actividad de las proteasas es demasiado alto, el delicado equilibrio entre la degradación y la reparación de tejidos se altera. Un exceso de proteasas en la herida ocasiona la degradación de la ECM recién formada y de otras proteínas, como por ejemplo los factores de crecimiento y sus receptores. En consecuencia, se producen trastornos de la cicatrización debido a los daños en la ECM y a la prolongación anormal de la fase inflamatoria de la cicatrización, que impide que la herida avance hacia la fase proliferativa[2].

Tabla. 3. *Funciones principales de las proteasas en la cicatrización normal.*

Tomada y modificada de [15].

FASE DE CICATRIZACIÓN	FUNCIÓN DE LAS PROTEASAS
<i>Inflamación</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminación de la ECM dañada (facilita el desbridamiento autolítico)
<i>Proliferación</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Degradación de la membrana basal capilar para la angiogénesis. • Facilita el desprendimiento y la migración de las células.
<i>Remodelación</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Contracción de la ECM cicatricial. • Remodelación de la ECM cicatricial.

Además de ser segregadas por las células que participan en el proceso de reparación, por ejemplo, los fibroblastos y las células endoteliales, las proteasas se producen en las células del sistema inmunitario estimuladas por

un proceso inflamatorio o infeccioso. Por ejemplo, la elastasa leucocitaria humana (ELH) se produce en los neutrófilos y es responsable de la degradación de la fibronectina en las heridas que no cicatrizan. Esto es importante porque los productos de degradación de la fibronectina estimulan la liberación de más MMPs. También se ha observado una producción de proteasas por parte de las bacterias[15].

En el curso normal de la cicatrización, hay un rápido incremento inicial de los niveles de proteasas. Los niveles alcanzan su máximo al cabo de unos tres días y comienzan a descender hacia el día cinco. En las heridas que no cicatrizan, sin embargo, no sólo las proteasas alcanzan niveles mayores que en las que lo hacen, sino que persisten mucho más tiempo. El resultado es un entorno en la herida altamente destructivo[15].

2.2.2.3. Efecto del pH

Comparado con el pH del fluido intersticial (7.0), de la sangre venosa (7.35) o arterial (7.45) el pH de la piel intacta va desde 4.8 a 6.0. El valor bajo de pH de la piel se atribuye principalmente a la presencia de un ambiente denominado "manto ácido", una barrera natural para el ambiente externo que está formado por aminoácidos, ácidos grasos y productos de los queratinocitos y de los apéndices[27, 28].

El carácter ácido de la piel es alterado en la presencia de heridas, donde el tejido subyacente con un pH de 7.4 se expone[27], en el caso de las heridas crónicas se ha reportado un pH dentro del rango de 7.15 - 8.9 es decir, va desde un pH ligeramente neutro hasta alcalino. La variabilidad es representativa de heridas que sanan y aquellas que no. En ambos casos, heridas agudas y crónicas, el ambiente con un pH elevadamente alcalino ha demostrado bajas tasas de recuperación, proliferación de microorganismos, entre otros, comparado con herida con valores de pH cercanos a lo neutral[27, 29].

El rol del pH en las heridas ha probado ser de importancia fundamental durante el saneamiento de heridas crónicas, por ejemplo, una disminución a

un pH ácido disminuye la actividad de las proteasas (pico de actividad máxima entre 7-8), suprime el crecimiento de bacterias patogénicas (actividad en pH 6), se provee más oxígeno a la herida, los fibroblastos proliferan más activamente, así mismo este valor ácido de pH es un indicador de un saneamiento exitoso lo que favorecerá una recuperación más rápida y efectiva[27, 28].

2.2.3. Tratamiento

Las heridas crónicas afectan alrededor del 1-2% en la población europea y estadounidense. En Europa, el manejo de las heridas implica un costo promedio por paciente y al año de 6,000-10,000 euros, asociado con hospitalización, tiempos de atención de enfermería, cambios frecuentes de apósitos y tratamiento de infecciones bacterianas, por otro lado, el cuidado de heridas cuesta al sistema de salud de Estados Unidos alrededor de 50 billones de dólares anualmente[2]. Las enfermedades crónicas no transmisibles, como la diabetes mellitus, las cardiovasculares, oncológicas, entre otras, pueden generar complicaciones tales como pacientes con pie diabético, úlceras venosas y arteriales, lesiones por presión, por mencionar algunas. En los últimos años se ha visto un aumento en relación con las heridas en nuestro país, lo cual implica estancias prolongadas en hospitales y el uso ineficiente de recursos médico-quirúrgicos y de enfermería. Los cuidados y manejo de los pacientes con heridas han sido tratados mediante el uso de técnicas y procedimientos tradicionales que hasta hace poco tiempo se centraban especialmente en un tratamiento de protección de las mismas con diversos materiales como antisépticos, gasas, apósitos absorbentes, entre otros, los cuales a través del tiempo se han modificado, por lo que existen en la actualidad métodos de curación adecuados para todo tipo de lesiones. En los últimos años la prevención, tratamiento y rehabilitación de pacientes con heridas se hace bajo la perspectiva del caso, con alta tecnología y la atención especializada y multidisciplinaria[30].

2.3. Proteínas

2.3.1. Función en los sistemas vivos

Una proteína está constituida por una secuencia precisa de aminoácidos que le permite estructurarse en una forma tridimensional o conformación. Las proteínas son las macromoléculas más versátiles en los sistemas vivos que ejercen una gran cantidad de funciones en todos los procesos biológicos. Dentro de estas funciones de las proteínas se pueden citar[31, 32]:

- Actuar como catalizadores.
- Transportar y resguardar moléculas como el oxígeno
- Proveer soporte mecánico y protección inmunológica
- Generar movimiento
- Transmitir impulsos nerviosos
- Controlar el crecimiento y la diferenciación celular.

2.3.2. Importancia en las enfermedades crónicas: ventajas y desventajas

Los productos terapéuticos a base de péptidos y proteínas representan una categoría cada vez más importante de productos biológicos utilizados para tratar enfermedades tales como cáncer, trastornos autoinmunes, neurológicos y endocrinos. Se han utilizado en este tipo de enfermedades por su alta especificidad por el sitio blanco (lo que resulta en reacciones adversas y toxicidad reducidos), la limitada interferencia con los procesos biológicos normales, baja inmunogenicidad, agentes potenciales en el reemplazo de terapia génica, y, desde un punto de vista industrial, desarrollo clínico y tiempo de aprobación más corto, así como también mejor protección por patente. Esto las convierte en una opción de tratamiento más eficaz y segura que los fármacos de moléculas pequeñas[33]. Actualmente hay más de 200 proteínas terapéuticas aprobadas y más de 100 péptidos en el mercado; lo que representa el 10% del mercado farmacéutico con un valor de 40 mil millones por año[33, 34].

Estas proteínas y péptidos, sin embargo, poseen una serie de desventajas que representan un reto importante en su formulación, por ejemplo, baja biodisponibilidad por vía oral (<2%), sensibilidad metabólica, degradación gastrointestinal, incapacidad para cruzar barreras epiteliales, pesos moleculares elevados, baja lipofilia, grupos funcionales cargados que dificultan su absorción, y tiempos de vida media cortos (<30 min). La administración intravenosa o subcutánea mejora la absorción, pero otros factores llegan a limitar su biodisponibilidad, son por ejemplo, las proteasas sistémicas, metabolismo rápido, opsonización, cambios conformacionales, disociación de subunidades proteicas, formación de complejos no covalentes con productos de la sangre y destrucción de grupos laterales sensibles[34].

Un ejemplo representativo del uso de proteínas como sistemas terapéuticos en el tratamiento de enfermedades crónicas, son aquellas que presentan un componente inflamatorio importante, como la arterosclerosis, diabetes tipo 2 y Alzheimer. De manera general se hace uso de analgésicos antiinflamatorios no esteroideos, glucocorticoides y agentes modificadores de enfermedad; sin embargo, se han logrado grandes beneficios con el uso de sistemas terapéuticos biológicos, FC por ejemplo uso de TNF- α , IL-1 β y el receptor de IL-1 ya sea solos o en conjunto con terapias convencionales, uso de anticuerpos monoclonales, entre otros, debido a las ventajas que se han mencionado[35].

2.3.3. Citocinas y factores de crecimiento

Las citocinas y FC son proteínas que actúan como señales celulares internas para permitir la comunicación entre células. Los FC estimulan específicamente la migración y proliferación de células y la síntesis de nuevo tejido. Los pesos moleculares van desde 6 a 70 kDa y sus actividades celulares se presentan en pequeñas cantidades. Pueden regular funciones y actividades celulares vía mecanismos endocrinos, paracrinos, autocrinos, e

intracrinós. Para poder llevar a cabo su función estas proteínas requieren la presencia de un receptor en las células blanco[36].

2.3.4. Efecto de las citocinas y factores de crecimiento en el saneamiento de heridas

Como ya se ha mencionado el saneamiento de heridas es un proceso complejo que involucra la participación de varios tipos celulares que a su vez liberan mediadores químicos importantes en las diferentes etapas de la reparación; dentro de estos mediadores están las citocinas y FC. La participación de estas proteínas es variada y compleja. Por ejemplo, los queratinocitos liberan IL-1 que alerta las células circundantes, además de que se ha mencionado que durante la etapa de hemostasis, las plaquetas sufren un proceso de liberación de contenido granular, secretando principalmente FC (EGF, PDGF, TGF- β , etc.) que participan en la reepitelización^[37]. Otras funciones donde estas citocinas y FC pueden participar, son en la formación de tejido de granulación, remodelación, inflamación, formación de ECM, angiogénesis, entre otras[38]. En la siguiente tabla (Tabla 4) se muestran las funciones principales de las citocinas y FC que participan en el saneamiento de las heridas.

Tabla. 4. Principales FC y citocinas que participan en el saneamiento de heridas.

Tomada y modificada de [36] y [37].

FC / CITOCINAS	FUENTE	FUNCIÓN	NIVELES EN HERIDAS AGUDAS	NIVELES EN HERIDAS CRÓNICAS
<i>EGF</i>	Plaquetas, fibroblastos, macrófagos,	Reepitelización	Incrementados	Disminuidos
<i>FGF-2</i>	Queratinocitos, mastocitos, fibroblastos, células endoteliales. Células del musculo liso, condrocitos.	Formación de tejido de granulación, reepitelización, remodelación y formación de ECM.	Incrementados	Disminuidos
<i>TGF-β</i>	Plaquetas, macrófagos, fibroblastos, queratinocitos, linfocitos,	Inflamación, formación de tejido de granulación, reepitelización, remodelación y formación de ECM.	Incrementados	Disminuidos
<i>PDGF</i>	Plaquetas, macrófagos, endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, células	Inflamación, formación de tejido de granulación, reepitelización, remodelación y formación de ECM.	Incrementados	Disminuidos
<i>VEGF</i>	Plaquetas, macrófagos, endoteliales, células del musculo liso, fibroblastos, neutrófilos, células	formación de tejido de granulación.	Incrementados	Disminuidos
<i>IL-1</i>	Neutrófilos, macrófagos, queratinocitos, monocitos,	Inflación, reepitelización.	Incrementados	Incrementados
<i>IL-6</i>	Neutrófilos, macrófagos.	Inflación, reepitelización.	Incrementados	Incrementados
<i>TNF-α</i>	Neutrófilos, macrófagos.	Inflación, reepitelización.	Incrementados	Incrementados
<i>TGF-α</i>	Plaquetas, macrófagos, células epiteliales.	Proliferación celular epitelial, formación de tejido de granulación.	---	---
<i>KGF</i>	Fibroblastos.	Proliferación de células epiteliales.	---	---
<i>IFN</i>	Linfocitos, fibroblastos.	Inhibición de la proliferación de fibroblastos y síntesis de colágena.	---	---

2.4. Lisado plaquetario

2.4.1. Definición

El producto derivado de plaquetas, conocido como lisado plaquetario (LPT) o también llamado plasma rico en plaquetas (PRP), es un hemoderivado que contiene un conjunto de factores que promueven el crecimiento y se ha establecido como un suplemento seguro y eficiente en cultivos de células del estroma mesenquimales[39]. Ha sido estudiado desde los setenta por las grandes cualidades que este tiene en el tratamiento de enfermedades donde las actividades de FC son primordiales[40].

El LPT de manera tradicional es obtenido a través de un proceso de ciclos (aproximadamente tres) de congelamiento (-196 a -80°C)- calentamiento (37°C) de la fracción de plaquetas obtenido al centrifugar la sangre total, estos ciclos provocan la ruptura de las plaquetas lo que permite la liberación

de su contenido granular; finalmente se vuelven a centrifugar para separar el sobrenadante de los restos de plaquetas[40-44], dando como resultado el LPT.

2.4.2. Función y composición

Las plaquetas forman un reservorio celular de proteínas vitales para el saneamiento de heridas. Cuando son activadas liberan una mezcla de proteínas biológicamente activas y otras sustancias que les permiten influir en un gran número de procesos promoviendo el reclutamiento, el crecimiento y la morfogénesis de las células[41].

El contenido de los gránulos encontrados en las plaquetas incluye principalmente FC que como se ha mencionado son esenciales para el saneamiento de heridas, además de otros compuestos (Figura 10). Por ejemplo, las glicoproteínas de adhesión que son liberadas en la etapa de hemostasis y que apoyan la agregación plaquetaria, son producidas por los gránulos alfa de las plaquetas, y estas son fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, trombospodina, y factor de von Willebrand[22].

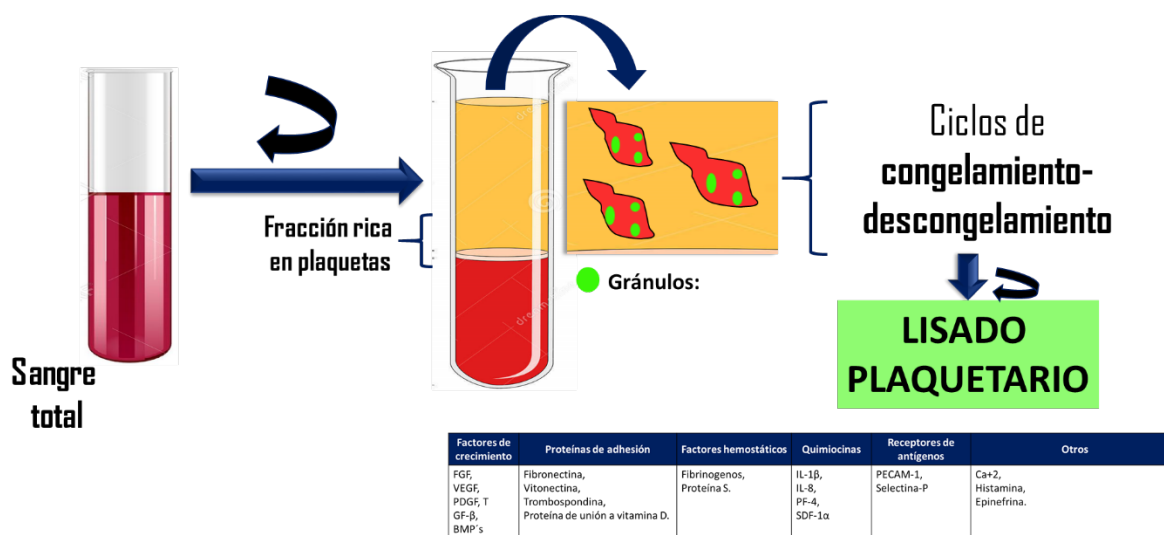


Fig. 10. Representación esquemática del proceso de obtención y composición (Tabla inferior) del lisado plaquetario.

Los FC que se encuentran en mayor concentración son el PDGF y TGF-β, sin embargo, es importante mencionar que la cantidad de FC varía y esta

variabilidad se encuentra asociada con el donador. El uso de este coctel de FC puede tener efectos sinérgicos y aditivos, conduciendo a mejorar la regeneración de tejidos[41, 42].

De manera específica el LPT ha demostrado acelerar la proliferación de fibroblastos, osteoblastos y células del ligamento periodontal[44], cabe mencionar que el LPT no sólo ha sido utilizado como un suplemento de citocinas y FC sino también como material principal en la producción de hidrogeles o andamios tridimensionales[40].

2.5. Estrategias para incrementar la absorción de fármacos a través de la piel

La liberación transdérmica permite la permeación de fármacos a través de la piel para que posteriormente lleguen a circulación sistémica, con lo cual se evita el metabolismo de primer paso hepático, efecto observado durante la administración oral[12]. Sin embargo, el principal obstáculo en la administración transdérmica y tópica es la barrera formada por la matriz intercelular lipídica del EC. Es por esto que los esfuerzos se han enfocado en el desarrollo de sistemas terapéuticos de liberación transdérmica, capaces de superar las propiedades de barrera del EC de una forma local y reversible[13]. Un gran número de técnicas se han desarrollado para mejorar y controlar el transporte a través de la piel, y con ello, ampliar el rango de liberación de fármacos. Esto involucra métodos tanto físicos como químicos, basados en dos estrategias: incrementar la permeabilidad de la piel y/o proveer una fuerza conductora que actúe sobre el fármaco[14]. Existen muchas tecnologías ingeniosas desarrolladas para mejorar los sistemas de liberación transdérmica tanto con propósitos terapéuticos como de diagnóstico que van desde el uso de moduladores químicos, vesículas y partículas, remoción del EC, hasta iontoforesis, electroporación, ultrasonido (promotores físicos) o mezclas sinérgicas de estos mecanismos[5] (Figura 11).

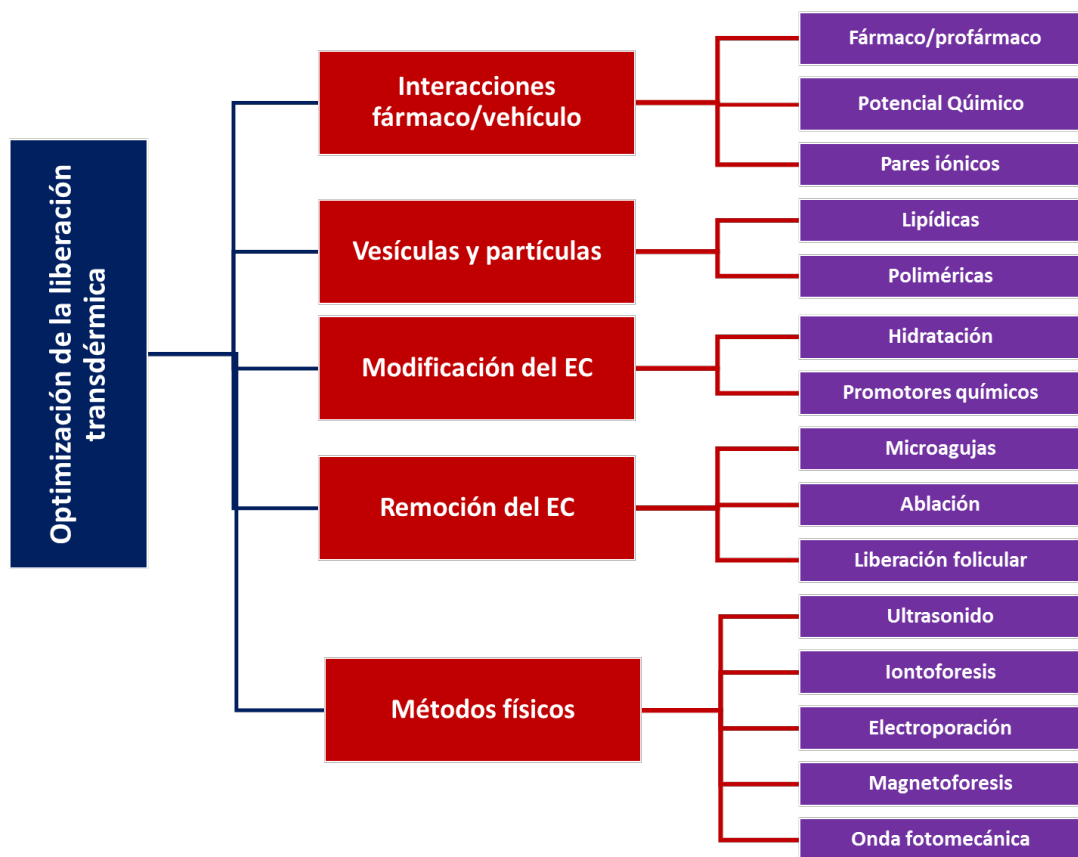


Fig. 11. Esquema de los diferentes métodos para mejorar la absorción de fármacos a través de la piel.

2.5.1. Moduladores de absorción físicos y químicos

Los promotores de absorción son compuestos que promueven la permeabilidad a través de la piel por alteración de la barrera, para mejorar el flujo de una molécula que se quiera administrar. Generalmente estos se encuentran incorporados dentro de una formulación para mejorar la difusión y solubilidad de fármacos a través de la piel, reduciendo reversiblemente las resistencia de barrera otorgada por la piel, y de esta manera permitiendo que el fármaco penetre al tejido viable y posteriormente entre a circulación sistémica[45]. Un modulador de absorción dérmica ideal es efectivo, no irritante, no sensibilizante, no fototóxico, no comedogénico y reversible[46-48], idealmente trabaja rápido, y la actividad y duración del efecto debe ser tanto predecible como reproducible; no debe tener un efecto farmacológico dentro del cuerpo, ej., no unirse a sitios de receptores; trabajar

unidireccionalmente, ej., debe provocar que los agentes terapéuticos estén dentro del cuerpo mientras se previene la pérdida de material endógeno; mostrar un efecto reversible, permitiendo que la piel regrese a su estado normal rápida y completamente una vez que se hayan removido de la piel; deben mostrar compatibilidad con la formulación y los componentes del sistema; ser inodoros, insípidos, incoloros y cosméticamente aceptables; tener un parámetro de solubilidad que se aproxime al de la piel[48]. El efecto de sustancias químicas, en particular de promotores, sobre la piel es importante, ya que algunos de estos causan daño permanente sobre la epidermis que puede solo ser reparados con la regeneración del EC[49, 50].

Dentro de los grupos de moduladores químicos que actúan sobre la piel también se encuentran los retardadores de absorción, que tienen el efecto opuesto a los promotores de absorción. En términos de liberación de fármacos, pueden ser usados para restringir la localización de los activos sobre las capas más externas de la piel, reduciendo la penetración transdérmica. Tales agentes tienen aplicaciones en formulaciones que contienen protectores solares, pesticidas o fármacos con un efecto específico a nivel local sobre la piel[51].

2.5.2. Nanoacarreadores

Algunos tipos de nanoacarreadores incluyen conjugados de fármaco-polímero, coloides poliméricos, nanogeles, dendrímeros, puntos cuanticos y nanotubos de carbono. Otros tipos de nanoacarreadores a menudo llamados nanopartículas, comprenden el autoensamblaje de pequeñas moléculas tal es el caso de liposomas, nanoesferas, nanocápsulas, niosomas, etosomas, nanocristales, microemulsiones, entre otros (Figura 12).

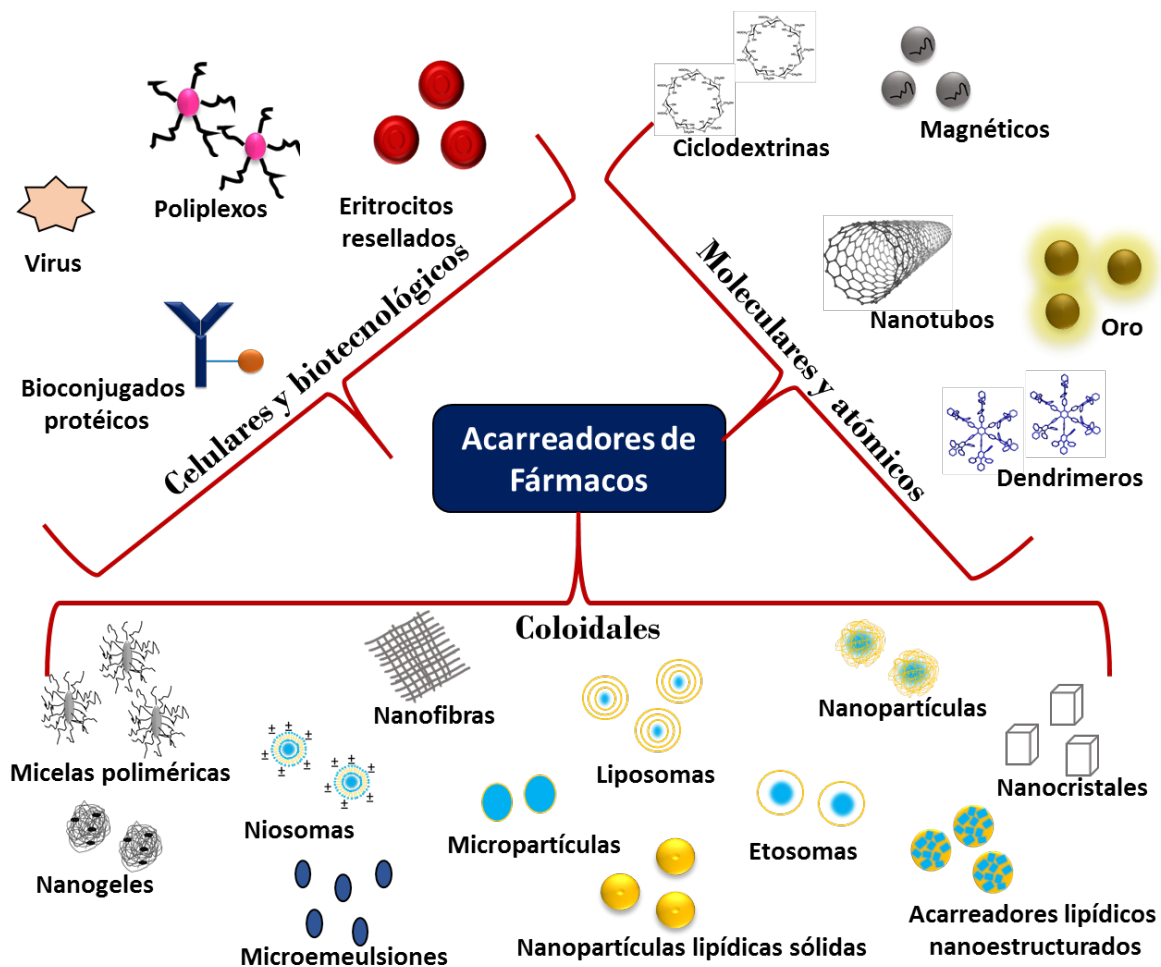


Fig. 12. Tipos y subtipos de acarreadores de fármacos utilizados.

El uso de un acarreador para la liberación sostenida y vectorizada de fármacos ofrece varias ventajas comparadas con la administración clásica:

- Incremento en la cantidad de fármaco que alcanza el sitio blanco.
- Mejora del mecanismo de transporte.
- Protección al fármaco contra la inactivación, degradación y metabolización.
- Encapsulación del fármaco sin desactivarlo.
- Posibilidad para la liberación de fármaco bajo condiciones y de acuerdo a una cinética apropiada.
- Alta solubilidad y tiempo de circulación mayor del fármaco después de la administración

- Capacidad para liberar el fármaco activamente o pasivamente en el blanco terapéutico.
- Ofrece una forma de cruzar barreras biológicas que puedan impedir la accesibilidad del fármaco.
- Prolongación del tiempo de vida media de péptidos, proteínas y oligonucleótidos.

Los nanoacarreadores poseen una relación área superficial/volumen alto, lo que provee una biodistribución y farmacocinética mejorada, minimizando su toxicidad. Entre los nanoacarreadores potenciales, sistemas coloidales tales como los liposomas y nanopartículas han tomado interés considerable y han sido extensamente revisados y estudiados[52].

2.5.2.1. Liposomas elásticos (LSE)

2.5.2.1.1. Definición

Son vesículas esféricas autoensambladas, también conocidas como liposomas ultradeformables o Transfersomas®. Están formadas por al menos un compartimiento acuoso rodeado de una o varias bicapas lipídicas concéntricas[53] que consisten de fosfolípidos y un activador de superficie que incrementa su grado de flexibilidad comparado con los liposomas convencionales (Figura 13). Estos sistemas fueron desarrollados en 1992 por Cevc y Blume[54] que los denominaron Transfersomas®, este desarrollo se realizó con el objetivo de mejorar los problemas que se tenían con los liposomas convencionales.

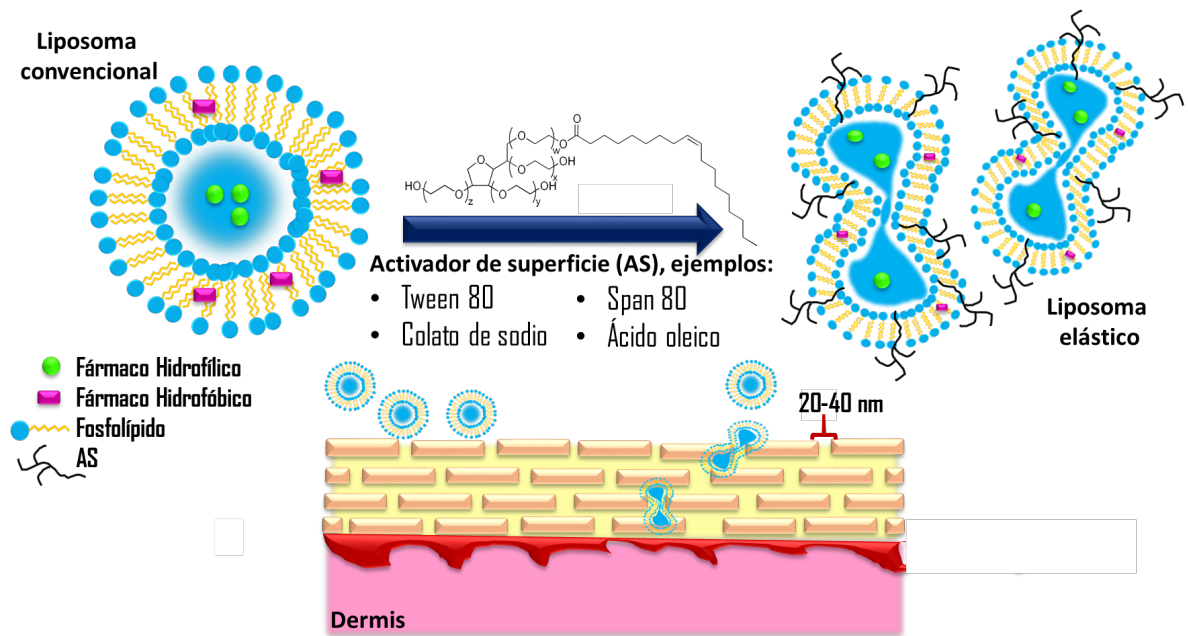


Fig. 13. Composición y esquema de la penetración de liposomas convencionales y elásticos a través de la piel.

2.5.2.1.2. Características

Son biocompatibles y tienen la capacidad de incorporar tanto fármacos hidrofílicos como hidrofóbicos. A diferencia de los liposomas convencionales son más efectivos en la liberación transdérmica de fármacos de bajo y alto peso molecular (moléculas pequeñas, péptidos, proteínas, ADN[55]) tanto en cantidad de fármaco liberado como en la profundidad de penetración, ya que tienen la capacidad de deformarse hasta un tamaño 10 veces menor al de su diámetro original, lo que permite que penetren la piel (Figura 13)[56]. Cevc y Blume[54] mostraron que los Transfersomas® penetran el EC a través de un gradiente osmótico, a pesar de que el transporte de la mayoría de los compuestos, se incrementa por una aplicación oclusiva, ellos han sugerido que las vesículas elásticas penetran más eficientemente bajo condiciones no oclusivas que crean este gradiente osmótico. El gradiente osmótico es causado por la diferencia en cantidad de agua entre la superficie de la piel y el interior de la misma.

Se han propuesto dos mecanismos de acción de los LSE sobre la penetración, en primero, los LSE pueden actuar como promotores de absorción por alteración de la organización lipídica (intercorneocitos). Segundo, pueden actuar como sistemas acarreadores de fármacos[56]. Sin embargo, se ha observado que pueden poseer los dos mecanismos simultáneamente.

Las interacciones en general de los liposomas con la piel y la transferencia del fármaco a partir del liposoma a la piel están influenciadas por el estado termodinámico de las bicapas liposomales y por lo tanto influenciadas por la naturaleza de los fosfolípidos usados en la preparación de estos. Dependiendo de la composición, las bicapas liposomasles pueden existir en un estado "gel", caracterizado por bicapas rígidas o en un estado "líquido cristalino" donde las bicapas son relativamente más flexibles y ordenadas[55]. En el primer caso encontramos a los liposomas convencionales y en el segundo estado a las vesículas elásticas o transfersomas®.

2.5.2.1.3. *Métodos de preparación*

Existen varias maneras de llevar a cabo la fabricación de LSE que corresponden a aquellas utilizadas en la fabricación de liposomas convencionales, incluso las técnicas originalmente desarrolladas han sido modificadas con la adición o eliminación de ciertos pasos, incorporación de diferentes tipos de disolventes, uso de alternativas en equipos, entre otras, que proveen una buena cantidad de opciones para su fabricación. El punto común a todas las técnicas utilizadas es la dispersión de los lípidos en una fase acuosa para la preparación de LSE, independientemente del tamaño y estructura de éstos. En la Tabla 5, se especifican y describen los métodos de fabricación más utilizados:

Tabla. 5. Métodos de fabricación de LSE.

Organización fosfolípido → LSE,





LSE preformados → LSE con tamaño menor y homogeneidad.

MÉTODO	PROCEDIMIENTO GENERAL	CARACTERÍSTICAS
Hidratación de Capa Delgada	<ol style="list-style-type: none"> 1. Disolución de lípidos en un disolvente orgánico. 2. Evaporación del disolvente para formar una capa delgada en las paredes de un matraz. 3. Adición de medio de hidratación sobre la capa. 4. Desprendimiento de la capa lipídica por agitación. 	<ul style="list-style-type: none"> • Se obtienen generalmente vesículas tipo MLV. • Se pueden encapsular tanto fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos.
Inyección	<ol style="list-style-type: none"> 1. Disolución de lípidos en etanol o éter. 2. Inyección rápida (con etanol) o lenta (con éter) a la fase acuosa con agitación a temperatura ambiente (con etanol) o con calentamiento (con éter). 3. Remoción del etanol o éter. 	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica rápida y sencilla. • La encapsulación de fármacos hidrofílicos es baja. • Se pueden obtener LUV.
Evaporación de Fase Reversa	<ol style="list-style-type: none"> 1. Disolución de lípidos en disolvente orgánico. 2. Remoción del disolvente por evaporación para formar una capa delgada. 3. Resuspender la capa delgada con dietileter. 4. Adición de agua (w) para formación de una emulsión w/o. 5. Evaporación del disolvente hasta formar un gel seco. 6. Ruptura del gel por agitación y adición de agua. 	<ul style="list-style-type: none"> • Proceso más largo. • Se obtienen MLV
Depleción de Detergente	<ol style="list-style-type: none"> 1. Disolución de lípidos en un disolvente orgánico. 2. Evaporación del disolvente para formar una capa delgada. 3. Hidratación con una solución de detergente. 4. Remoción del detergente por filtración en gel o por diálisis. 	<ul style="list-style-type: none"> • Se obtienen micelas de detergente-fosfolípido con posterior formación los liposomas. • La velocidad y técnica de remoción del detergente determinan el tamaño y homogeneidad.

		<ul style="list-style-type: none"> • Baja encapsulación de fármacos hidrofílicos.
Vesículas Gigantes	<ol style="list-style-type: none"> 1. Disolución de lípidos en cloroformo/metanol (2:1). 2. Deposición en una pieza de vidrio y posterior evaporación. 3. Hidratación con la fase acuosa. 	<ul style="list-style-type: none"> • Población bastante heterogénea.
Extrusión	<ul style="list-style-type: none"> • Se hace pasar la suspensión de liposomas, generalmente tipo MLV, a través de filtros de policarbonato con tamaño de poro bien definidos bajo la aplicación de presión. • Usualmente se hacen múltiples extrusiones para reducir el número de lamelas y producir los liposomas principalmente unilamelares. 	
Sonicación	<ul style="list-style-type: none"> • Se utiliza energía de ultrasonido proveniente de un sonicador en baño o con probeta a una dispersión de MLV que reducen el tamaño de estos últimos generalmente a SUV. 	
Prensa Francesa	<ul style="list-style-type: none"> • MLV son introducidas a una celda y un pistón presiona la dispersión. Las presiones utilizadas son arriba de 25,000 psi con lo que se obtienen SUV. • No es aplicable a lípidos con temperatura de transición por debajo de los 20°C. 	
Microfluidización	<ul style="list-style-type: none"> • MLV se hacen circular con una bomba a alta presión a través de un prefiltro y después a la cámara de interacción. Posteriormente son separados en dos corrientes que pasan a través de microcanales definidos a alta velocidad. Este proceso se repite varias veces hasta la reducción de tamaño significativo. Se pueden obtener SUV. 	
Deshidratación-Rehidratación de Vesículas	<ul style="list-style-type: none"> • SUV "vacíos" son rotos durante un proceso de liofilización en presencia del fármaco a encapsular, posteriormente hay un paso de rehidratación que permite la fusión en vesículas oligolamelares encapsulando altas cantidades de soluto. • Se obtienen poblaciones de MLV. 	
LUV a partir de cocleatos	<ul style="list-style-type: none"> • SUV de fosfatidilserina adoptan la forma de laminas enrolladas (cocleatos) después de la adición de calcio. La adición de EDTA crea complejos con el calcio, lo que permite que los cocleatos se transformen en LUV. 	

Durante la preparación y dependiendo de la técnica de fabricación que se utilice se pueden obtener diferentes tipos de vesículas liposomales (Tabla 6).

Tabla. 6. Tipos de vesículas liposomales y sus características de tamaño y forma. MLV: multilamellar vesicle, SUV: small unilamellar vesicle, LUV: large unilamellar vesicle y MVV: multivesicular vesicle. Información tomada de [53].

CLASE DE VESÍCULA	CARACTERÍSTICAS	FORMA
<i>Multilamelares (MLV)</i>	<ul style="list-style-type: none"> De 500 a 5,000 nm varias capas concéntricas. 	
<i>Unilamellar pequeña (SUV)</i>	<ul style="list-style-type: none"> De alrededor de 100 nm y formados por una única bicapa. 	
<i>Unilamellar grande (LUV)</i>	<ul style="list-style-type: none"> De 200 a 800 nm, una única bicapa. 	
<i>Multivesicular (MVV)</i>	<ul style="list-style-type: none"> De 100 a 10,000 nm, varias vesículas dentro de otra vesícula mas grande. 	

2.5.2.2. Nanopartículas poliméricas

2.5.2.2.1. Definición

Se ha reconocido que no todas las partículas usadas con propósitos médicos cumplen con la definición propuesta y generalmente aceptada de tamaños ≤ 100 nm, lo cual no necesariamente tiene un impacto sobre su funcionalidad en aplicaciones biomédicas[57]. A pesar de que la definición identifica como nanopartículas (NP) a aquellas que poseen dimensiones por debajo de los 100 nm, en el área de sistemas de liberación de fármacos se comprende el estudio de sistemas que son en sí mismos o tienen componentes esenciales en el rango de 1-1,000 nm, que representa desde unos cuantos átomos a tamaños subcelulares[58, 59], aunque generalmente son obtenidas en el rango de 100-500 nm[60].

Las NP se pueden preparar a partir de polímeros naturales, tales como dextran, β -ciclodextrinas, quitosan, ácido hialurónico, heparina, gelatina,

gelatina catiónica modificada con espermina, o polímeros sintéticos, principalmente ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), poli- ϵ -caprolactona (PCL) y polialquilcianocrilatos. Dependiendo del tipo de polímero y el diseño del nanoacarreador se pueden obtener diferentes mejoras en las propiedades físicas, químicas y farmacocinéticas en términos de la eficiencia de encapsulación, biodisponibilidad y liberación controlada[61]. De manera general los polímeros sintéticos han sido utilizados para la liberación de fármacos pequeños y lipofílicos[62].

2.5.2.2.2. Características

Las NP poliméricas en el área farmacéutica se pueden clasificar como nanocápsulas o nanoesferas. Las nanoesferas son sistemas matriciales en las que el fármaco está disperso sobre toda la NP, mientras que las nanocápsulas son sistemas vesiculares en las cuales el fármaco está localizado en una cavidad acuosa u oleosa, la cavidad puede contener el fármaco en forma líquida o sólida o como una dispersión molecular, y se encuentra rodeada por una capa polimérica[59, 63](Figura 14).

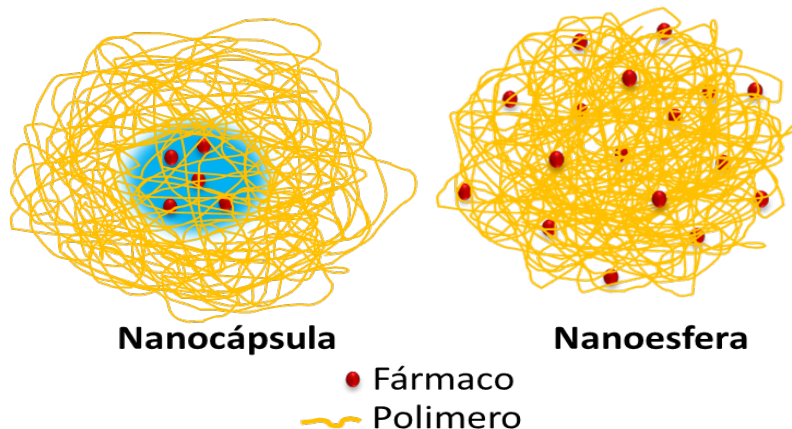


Fig. 14. Formas y clasificación de las NP poliméricas.

Las NP son usadas como sistemas de liberación de fármacos en diferentes vías de administración, principalmente debido a su capacidad para preservar la estabilidad del fármaco cargado y liberarlo de una manera sostenida, mejorando su biodisponibilidad. Son capaces también de mejorar

la permeabilidad de fármacos a través de barreras biológicas. Bajo la funcionalización de la matriz polimérica es también posible direccionar fármacos a tejidos y órganos específicos, con una acumulación notoria en el sitio de acción, mejorando el efecto terapéutico y disminuyendo la posibilidad de efectos secundarios indeseados[63]. Además de esto, estos sistemas son estables en la sangre, son no tóxicas, no trombogénicas, no inmunogénicas, no activan la respuesta inflamatoria y no activan a los neutrófilos, son biodegradables, pueden ser capaces de evitar el sistema reticuloendotelial y se aplican a la encapsulación de varias moléculas como fármacos, proteínas, péptidos o ácidos nucleicos[64].

Las NP son a menudo producidas en forma de una suspensión acuosa. Sin embargo, las NP suspendidas en un medio acuoso son físicamente inestables, presentándose frecuentemente fenómenos de agregación y fusión de las partículas durante periodos largos de almacenamiento. La acción hidrolítica del agua sobre la matriz polimérica puede conducir a la liberación del fármaco, dañando o eliminando las propiedades de liberación sostenida y conduciendo a la formación de productos de degradación indeseables. Además, una suspensión es susceptible del desarrollo y crecimiento de microorganismos[63].

2.5.2.2.3. *Métodos de preparación*

La NP poliméricas han sido sintetizadas usando varios métodos, y como en el caso de los LSE, de acuerdo a las necesidades buscadas para su aplicación, el tipo de NP polimérica buscada y el tipo de fármacos a encapsular[64] (Figura 15).

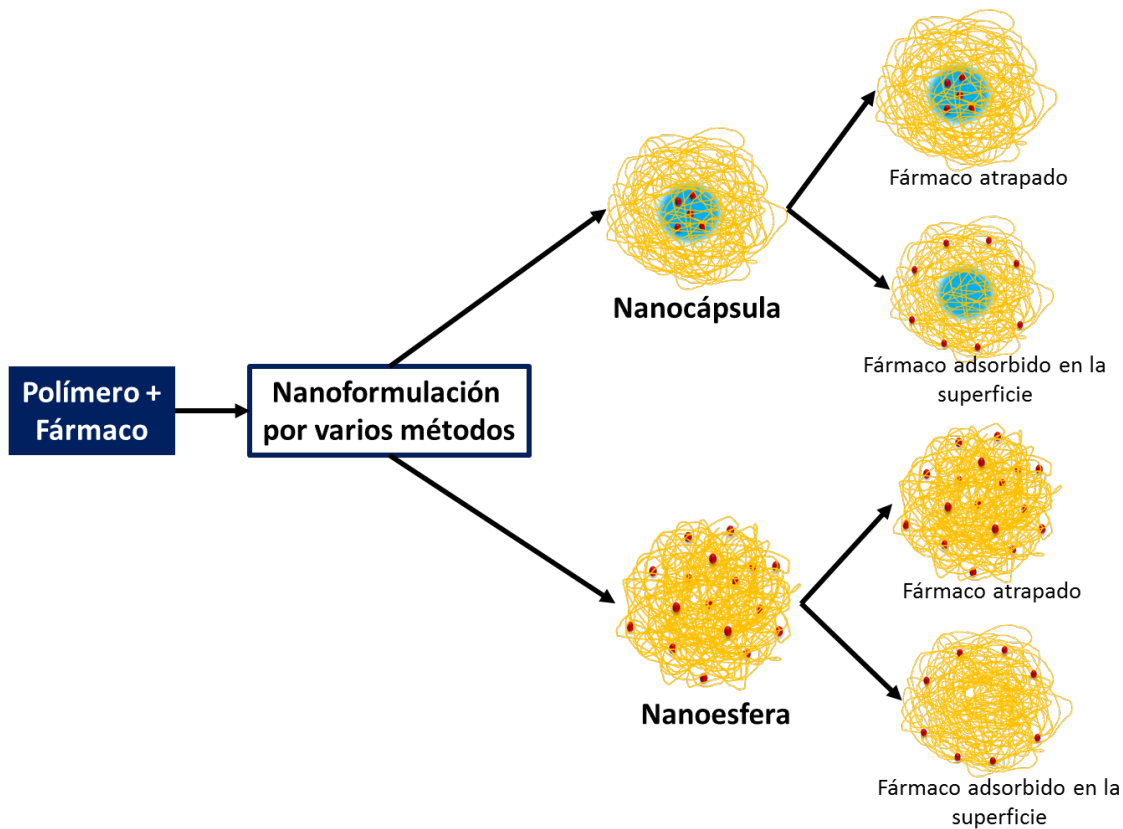


Fig. 15. Tipo de NP y disposición del fármaco, basado en los métodos de fabricación empleados. Tomada y modificada de [64].

Como ya se ha mencionado, la fabricación de NP generalmente resulta en una suspensión acuosa de NP conteniendo el o los fármacos, a partir del uso de polímeros preformados o métodos de polimerización *in situ*[59]. En la Tabla 7 se especifican y describen los métodos de fabricación más utilizados:

Tabla. 7. Métodos de fabricación de NP poliméricas. Información tomada de [64], [59].

MÉTODO	PROCEDIMIENTO GENERAL	CARACTERÍSTICAS
Nanoprecipitación	<ol style="list-style-type: none"> 1. Disolución del polímero en un disolvente orgánico volátil miscible con agua (acetona). 2. Adición gota a gota a la fase acuosa, con o sin estabilizante, con agitación constante 3. Evaporación del disolvente mediante la agitación. 	<ul style="list-style-type: none"> • La velocidad de adición, agitación del medio acuoso, el método de adición de la fase orgánica, son parámetros clave a controlar.
Emulsificación-difusión	<ol style="list-style-type: none"> 1. Disolución del polímero en un disolvente orgánico parcialmente soluble en agua (o) 	<ul style="list-style-type: none"> • Se crea un fenómeno turbulento por la

	<ol style="list-style-type: none"> Adición de fase orgánica a una fase acuosa (w) que contiene un estabilizante para formar una emulsión o/w. Remoción del disolvente orgánico por dilución. 	difusión del disolvente a la fase acuosa.
Emulsificación- evaporación de disolvente	<ol style="list-style-type: none"> Disolución del polímero en un disolvente orgánico volátil (o) e inmiscible con el agua. Adición de fase orgánica a una fase acuosa (w), que contiene o no un estabilizante, para formar una emulsión o/w. Remoción del disolvente orgánico volátil por agitación constante, presión reducida o temperatura. 	<ul style="list-style-type: none"> Se han preparado emulsiones dobles (w/o/w) para encapsulación de fármacos hidrofílicos. Utiliza altas velocidades de homogenización o sonicación.
Emulsificación- coacervación	<ol style="list-style-type: none"> Disolución del polímero en disolvente orgánico (o) Emulsificación (o/w) con fase acuosa (w) por agitación. Adición de un agente de entrecruzamiento. Coacervación por agitación moderada. 	<ul style="list-style-type: none"> Útil con polímeros naturales como alginato y gelatina. La formación de la fase de coacervado que causa la precipitación del polímero es crítica.
Recubrimiento polimérico	<ol style="list-style-type: none"> Emulsificación w/o de una fase oleosa en una fase acuosa. Adición del agente de recubrimiento. Emulsificación o/w por homogenización o sonicación. 	<ul style="list-style-type: none">
Capa por capa	<ol style="list-style-type: none"> Recubrimiento de un soporte con polímero catiónico o aniónico. Adición de un segundo polímero catiónico o aniónico. 	<ul style="list-style-type: none"> Requiere un soporte coloidal para adsorber la capa polimérica. El método se repite n-veces.

Debido al uso de disolvente orgánicos en los métodos de preparación de NP poliméricas, es importante y desafiante mantener la actividad biológica de los péptidos y proteínas[62], así como tratar de eliminar por completo el disolvente durante la manufactura en el sistema final ya que pudiera tener un impacto tóxico o de irritación sobre la piel o mucosas.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

- La incorporación de nanopartículas poliméricas o liposomas elásticos cargados con un lisado plaquetario en un sistema termosensible tipo hidrogel mejorará la estabilidad del lisado, su aplicación en piel y permitirá aumentar la velocidad de proliferación celular de fibroblastos en estudios *in vitro*, así como mejorar el proceso de cicatrización de piel dañada en estudios *in vivo*.

3.2. Objetivo general

- Preparar, caracterizar y evaluar un hidrogel termosensible conteniendo sistemas submicrónicos (liposomas elásticos y nanopartículas poliméricas) cargados con un lisado plaquetario destinado a promover la recuperación de piel dañada.

3.3. Objetivos específicos

- Preparar nanopartículas poliméricas y liposomas elásticos que contengan un lisado plaquetario a través de las técnicas de doble emulsión-evaporación del disolvente e hidratación de película fina respectivamente.
- Caracterizar ambos sistemas submicrónicos con base en tamaño, índice de polidispersión, potencial zeta, morfología, eficiencia de encapsulación, espectroscopía de infrarrojo, calorimetría diferencial de barrido, estabilidad en frío, dicroísmo circular, cinética de liberación.
- Incorporar los sistemas submicrónicos en un hidrogel termosensible.
- Caracterizar el hidrogel termosensible por comportamiento reológico, prueba de oclusión, temperatura de transición sol-gel, espectroscopía de infrarrojo, calorimetría diferencial de barrido, estabilidad en frío, dicroísmo circular y cinética de liberación.
- Evaluar la eficacia del hidrogel en estudios *in vivo* en un modelo de ratón.

4. PARTE EXPERIMENTAL

La Figura 16 muestra la secuencia metodológica general seguida durante el desarrollo del proyecto de investigación propuesto, indicando pasos generales.

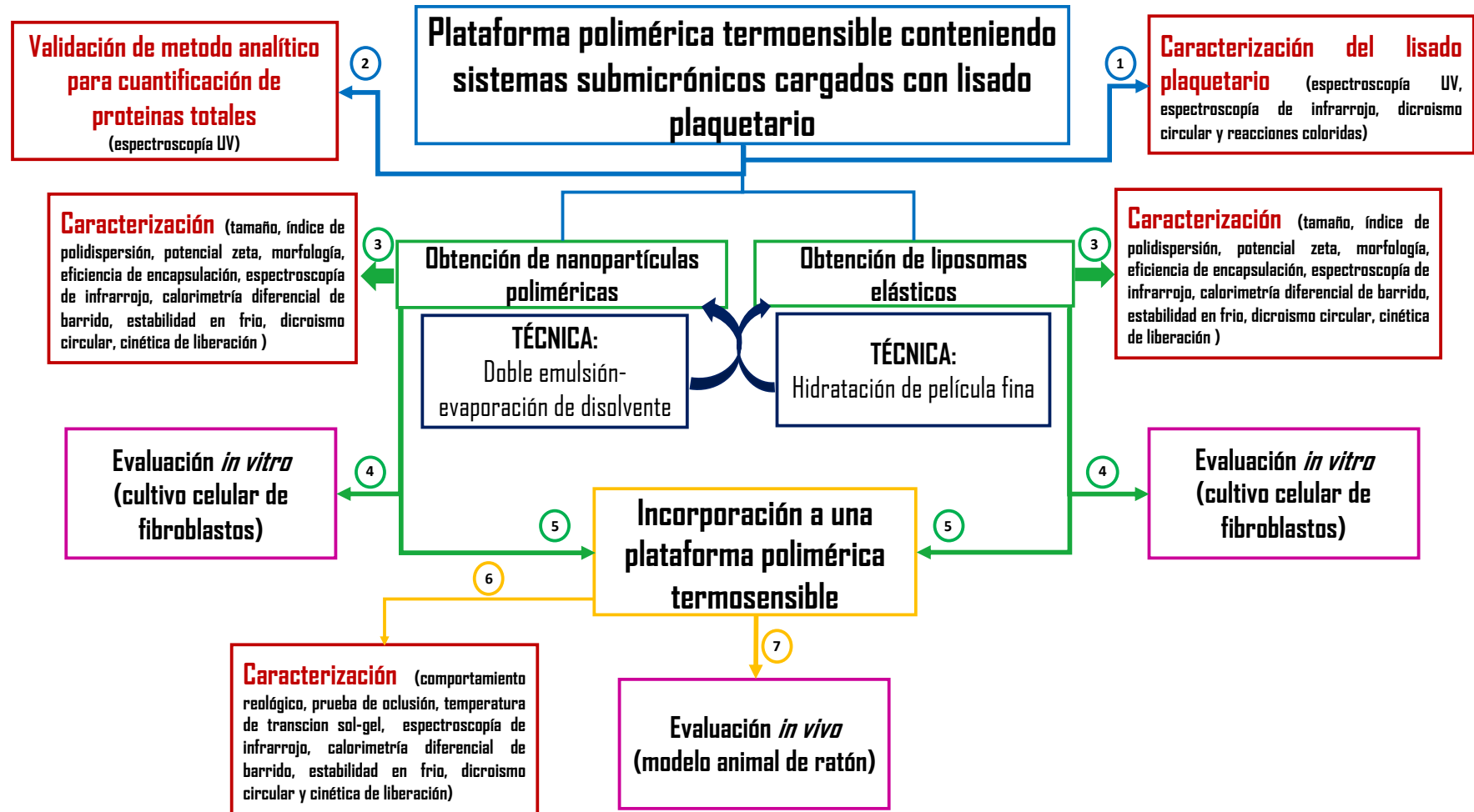


Fig. 16. Esquema general de la metodología seguida durante el proyecto de investigación.

4.1. Equipos y reactivos

a) Equipos y consumibles:

EQUIPO (E) Y CONSUMIBLES (C)	MODELO	PAÍS
• Balanza analítica (E)	Shimadzu, ATX224	Japón
• Baño de permeación (E)	Casa de acrílicos	México
• Baño sonicador (E)	Branson Branson 5210	U.S.A.
• Bolsa de diálisis (C)	Spectrum, Biotech CE	U.S.A.
• Calorímetro (E)	TA Instruments, Q20	Canadá
• Celda de plástico para potencial Z (C)	Malvern, DTS1070	U.S.A.
• Celda de plástico para tamaño de partícula (C)	Sarstedt, D51588	Alemania
• Celdas de Franz (E)	Taller de vidrio soplado, FES-Cuautitlán, Sr. Draucin Jiménez	México
• Centrífuga (E)	Hermle	Alemania
• Charola de aluminio (C)	TA Instruments, Tzero	Suiza
• Espectrofotómetro de infrarrojo (E)	ABB, MB3000	Suiza
• Espectrofotómetro UV-VIS (E)	Hitachi U5100	Japón
• Espectropolarímetro CD (E)	Jasco J-815	U.S.A.
• Estufa (E)	Memmert	Alemania
• Filtros (C)	Millipore, VMWP y VULP	Irlanda
• Homogeneizador de alto impacto (E)	IKA, Ultraturax T18	Alemania
• Liofilizadora (E)	Labconco FreeZone 2.5	U.S.A.
• Microscopio electrónico (E)	JEOL-JSM-7600F	Japón
• Parrilla de agitación magnética multiplaza (E)	IKA, RO15	U.S.A.
• Potenciómetro (E)	Corning, 430	U.S.A.
• Rotaevaporador (E)	BUCHI, R-300	Brasil

• <i>Termostato (E)</i>	Polyscience	U.S.A.
• <i>Tewameter (E)</i>	MPA2, Courage+Khazaka	Alemania
• <i>Texturómetro (E)</i>	Brookfield, CT3	U.S.A.
• <i>Ultracentrífuga (E)</i>	Optima L-90K	U.S.A.
• <i>Viscosímetro (E)</i>	Brookfield, CAP 2000	U.S.A.
• <i>Zetasizer (E)</i>	Malvern, ZS90	U.S.A.

b) Reactivos y excipientes:

REACTIVO	PROVEDOR	PAÍS
• <i>Ácido poliláctico-co-glicólico</i>	Evonik, Resomer RG503	Alemania
• <i>Albúmina Sérica Bovina</i>	Sigma-Aldrich	U.S.A.
• <i>Alcohol polivinílico</i>	Silanes	México
• <i>Diclorometano</i>	J.T. Baker	U.S.A.
• <i>Etanol</i>	Tecsiquim	México
• <i>Fosfatidilcolina</i>	Silanes	México
• <i>Fosfato de sodio monobásico</i>	Macron	México
• <i>Hidróxido de sodio</i>	J.T. Baker	Suecia
• <i>Lisado plaquetario</i>	Lab. De Hematobiología, IPN Dra. Doris Atenea Cerecedo Mercado	México
• <i>Polisorbato 80</i>	Hycel	México
• <i>Poloxámero 407</i>	Sigma-Aldrich	U.S.A.

c) Celulas y animales

Celulas y animales	PROVEDOR	PAÍS
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Fibroblastos dérmicos PCS-201-012</i> 	ATCC®	U.S.A.
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Ratón de cepa CD1</i> 	Unidad de Aislamiento-Bioterio, M. en C. Crisóforo Mercado Márquez, FES-Cuautitlán	México

4.2. Métodos

4.2.1. Caracterización del lisado plaquetario (LPT)

Con el objetivo de verificar las características como estructura proteica del LPT después de su obtención y como control de trabajo, se evaluaron diferentes aspectos que corroboraron lo anterior, los cuales se enlistan a continuación (Tabla 8):

Tabla. 8. Pruebas utilizadas para la caracterización del LPT.

PRUEBA	PARÁMETRO EVALUADO	TÉCNICA
<ul style="list-style-type: none"> • Interacción con la radiación infrarroja. 	Presencia de las señales amida I y amida II, características de aminoácidos.	Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier /reflectancia total atenuada
<ul style="list-style-type: none"> • Interacción con la radiación ultravioleta. 	Presencia de la señal de aminoácidos aromáticos a 280 nm.	Espectroscopía UV-VIS
<ul style="list-style-type: none"> • Interacción con radiación ultravioleta polarizada circularmente. 	Presencia de la señal referente a un plegamiento proteico de estructura secundaria alfa hélice y/o beta laminar de 200-250 nm.	Espectroscopía por dicroísmo circular
<ul style="list-style-type: none"> • Reacción colorida 1 	Detección de un color morado indicativo de la presencia de enlaces peptídicos.	Reacción de Biuret
<ul style="list-style-type: none"> • Reacción colorida 2 	Detección de un color azul indicativo de la presencia de una estructura proteica con aminoácidos aromáticos y/o básicos.	Reacción de Bradford

4.2.2. Obtención de liposomas elásticos (hidratación de película)

Se disolvieron las cantidades correspondientes de fosfatidilcolina y polisorbato 80, para preparar 125 mg de LSE, en 10 ml de etanol en una relación 85:15, una vez disueltos, la solución se colocó en un matraz bola y el etanol se evaporó bajo vacío a una temperatura de 40°C por 3 h, después del cual el matraz se mantuvo en un desecador por toda la noche para asegurar una evaporación completa del disolvente. La encapsulación del LPT dentro de los LSE se realizó durante el paso de hidratación con 10 ml de una solución del LPT en PBS pH 7.2 por 30 minutos. Después de la hidratación, la suspensión de LSE se maduró, manteniéndola a 4 °C por 30 minutos, posteriormente, se sonicó por 3 minutos y se extruyó 2 veces por una membrana de policarbonato con poro de 0.1 μm , obteniendo los LSE con el tamaño de vesícula deseado. La preparación de LSE sin LPT se realizó de la misma forma, hidratando solamente con PBS pH 7.2 (Figura 17).

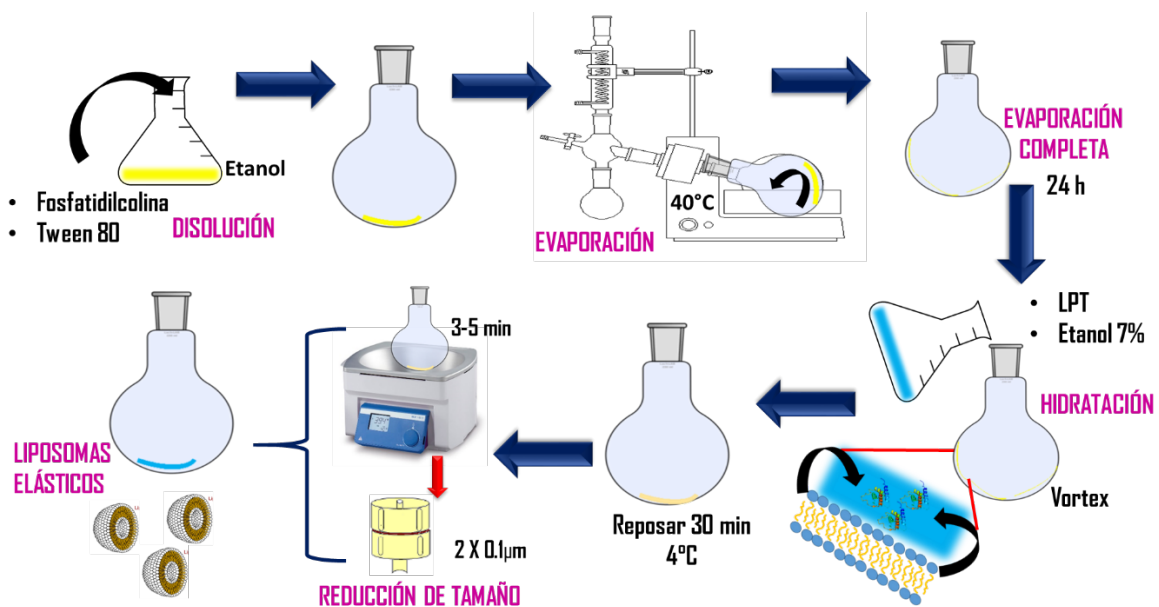


Fig. 17. Procedimiento ilustrativo de la obtención de LSE por la técnica de hidratación de película.

4.2.3. Obtención de nanopartículas poliméricas (doble emulsión- evaporación de disolvente)

Se disolvieron 150 mg de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) en 10 ml de diclorometano (DCM), la cual constituye la fase orgánica (O). Después, se adicionó lentamente una solución acuosa de LPT (W_1) de concentración

conocida a la solución de PLGA, emulsificando a una velocidad de 15,000 rpm por 5 min con un homogeneizador de alto impacto, generando la primera emulsión (W₁/O). Esta emulsión se adicionó a una solución de alcohol polivinílico (PVA) al 5% (W₂) y de igual manera se emulsificó a las mismas condiciones que la emulsión 1, dando lugar así a la formación de la doble emulsión (W₁/O/W₂). Finalmente, se evaporó el disolvente con agitación magnética por un mínimo de 8 h lo que dio como resultado la formación de las NP. La preparación de NP sin LPT se realizó de la misma forma, emulsificando solamente con PBS pH 7.2 en la primera emulsión (Figura 18).

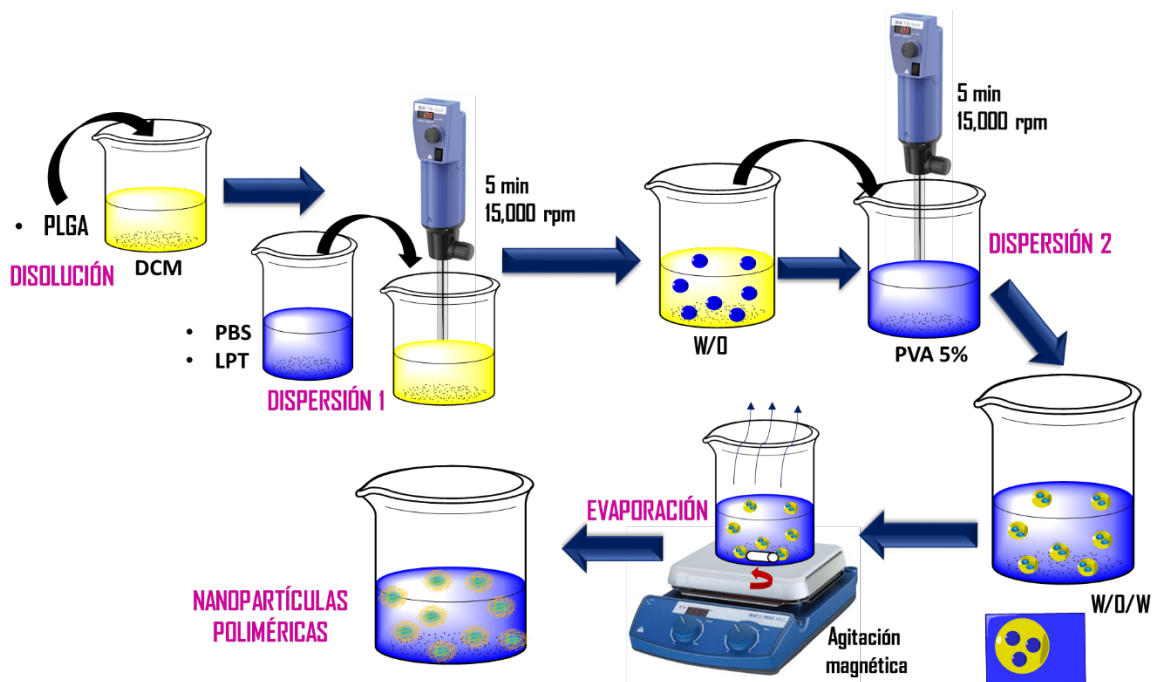


Fig. 18. Procedimiento ilustrativo de la obtención de NP poliméricas por la técnica de doble emulsión-evaporación de disolvente.

4.2.4. Caracterización de los nanosistemas

Las siguientes pruebas representan las metodologías utilizadas para caracterizar tanto los LSE como las NP, en caso de que la prueba solo aplique a uno de los nanosistemas, ésto se especificará.

4.2.4.1. Tamaño, índice de polidispersión y potencial Z

De la suspensión obtenida se tomaron 145 µl y se colocaron en 1.2 ml de agua desionizada, esta dilución se colocó en una celda de plástico de poliestireno y se midió por la técnica de dispersión de luz dinámica, tanto el tamaño del

nanosistema (TN), como su IPD, haciendo uso del equipo Zetasizer ZS90 Malvern®. De igual manera se preparó la dilución para potencial Z (pZ), solamente que esta última se colocó en una celda exclusiva para pZ y su valor se midió por la técnica de dispersión de luz electroforética en el mismo equipo empleado para TN e IPD. Para los tres parámetros medidos (TN, IPD, pZ) se hizo el análisis por triplicado, con una fase de equilibrio a 25°C por 120 s y 3 lecturas por cada réplica.

4.2.4.2. Eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (CC)

Durante el estudio de EE, la suspensión de NP obtenida, con y sin LPT, se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 h. En el caso de los LSE se hizo por ultracentrifugación a 45,000 rpm por 2 h. Transcurrido el tiempo, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó el LPT no encapsulado en los nanosistemas (NS) por espectroscopía ultravioleta a 280 nm, calculando la %EE por diferencia con la cantidad inicial agregada de LPT, utilizando la siguiente formula :

$$\%EE = \frac{\text{Cantidad inicial de LPT}(mg) - \text{Cantidad de LPT en sobrenadante}(mg)}{\text{Cantidad inicial de LPT}(mg)} \times 100$$

Posteriormente y con la previa determinación de la EE, se calculó la CC de LPT por los NS con la siguiente formula:

$$CC = \frac{\text{Cantidad de LPT encapsulado} (\mu g)}{\text{Cantidad de NS} (mg)}$$

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

4.2.4.3. Morfología

El estudio de morfología de los NS se realizó por TEM, para lo cual se colocó una pequeña gota (aprox. 25 µl), de una dilución de la suspensión del NS, sobre una rejilla de cobre y se dejó secar a temperatura ambiente aproximadamente 24 h; finalmente, la rejilla fue colocada en un microscopio electrónico (JEOL-JSM-7600F, Japón) para su observación.

4.2.4.4. Estabilidad

La estabilidad de la suspensión de los NS con y sin LPT se siguió durante 3 meses, colocando los sistemas necesarios para analizar muestras por

triplicado a los siguientes tiempos: tiempo 0, 1 semana, 15 días, 1 mes, 2 meses y 3 meses, a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. La estabilidad de las suspensiones se evaluó mediante el cambio en el TN, IPD, pZ y EE en los diferentes tiempos de muestreo.

4.2.4.5. Estudio calorimétrico

En este caso se realizó estudio calorimétrico por la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC), tanto a las materias primas [para NP: PLGA, PVA; para LSE: fosfatidilcolina (PC), tween 80 (T80), y al LPT], así como a la mezcla física y a los NS con y sin LPT. Se colocaron aproximadamente 3 mg de muestra en una charola de aluminio Tzero®, seguido de esto y con previo cerrado de la charola, se colocó esta última en el calorímetro, realizando un análisis con las siguientes condiciones: equilibrio de muestra a 20°C , isoterma por 1 min y rampa de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta $250\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.4.6. Estudio por infrarrojo

La técnica empleada en este estudio fue espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier/reflectancia total atenuada (FTIR/ATR). En este caso, se colocó la muestra (LPT, PC, T80, PLGA, PVA, NS con y sin LPT) sobre el cristal de ZnSe y se presionó la muestra con ayuda de una punta plana especial contra el cristal, posteriormente, se hizo un barrido de 150 escaneos con una resolución de 16 a cada una de las muestras en un intervalo de lectura en número de onda de $500\text{ a }4,000\text{ cm}^{-1}$. En todos los casos se leyó previamente una referencia bajo las mismas condiciones que las muestras.

4.2.4.7. Estudio por dicroísmo circular (DC)

El análisis por espectroscopía con DC se realizó colocando una muestra de una solución acuosa de LPT en una celda de 1 mm y posteriormente se dispuso en un equipo J-815 Perkin-Elmer (Jasco Inc., Easton, MD) que mantuvo los siguientes parámetros: sensibilidad estándar, ancho de banda de 1.00 nm, velocidad de escaneo $10\text{ nm}/\text{min}$, temperatura de 25.04°C con una longitud de onda de inicio y de terminación de 250 nm y 195 nm respectivamente, con intervalos de 0.5 nm, registrándose 110 puntos de lectura y por triplicado. El estudio también se realizó para la suspensión de los

dos NS considerando tener la misma concentración del LPT que en la solución.

4.2.4.8. Efecto de la temperatura sobre el tamaño del nanosistema

Con el objetivo de evaluar si la temperatura que generalmente se presenta en el sitio de herida influye sobre el TN y sobre el LPT, se llevó a cabo un análisis de manera similar al descrito en el apartado 4.2.4.1., a diferencia de que en este caso se hizo una rampa de calentamiento de 20-65°C con un incremento de 2.5°C/lectura. El análisis fue por triplicado, con una fase de equilibrio a cada valor de temperatura por 120 s y 3 lecturas por cada lectura. Se utilizó la misma concentración de LPT en el NS y en solución.

4.2.4.9. Efecto del plasma sanguíneo sobre el tamaño del nanosistema

De igual manera se llevó a cabo la evaluación del efecto del fluido de herida sobre el tamaño del NS, en este caso se utilizó plasma sanguíneo como fluido de herida simulado, considerando la similitud entre este último y el de una herida. Para lo cual se colocaron 50 µl de plasma sobre la suspensión de NS considerando la relación cantidad de fluido presente de manera cotidiana y la cantidad de NS a colocar al día. El análisis se realizó por la misma técnica y celda que en los apartados 4.2.4.1 y 4.2.4.8. a 33.5°C.

4.2.4.10. Cinética de liberación

Para el estudio de liberación del LPT a partir de las NP, se colocó 1 ml de suspensión de NP con una concentración conocida de LPT, dentro de una bolsa de diálisis con un valor de corte de peso molecular de 1,000 kD, esta bolsa se colocó dentro de un vial que contenía 5 ml de solución de PBS pH 7.2 (medio receptor), y después el vial se colocó en un baño de permeación a 33°C, con agitación magnética. Para este estudio se tomaron muestras del medio receptor a diferentes tiempos establecidos y se leyeron las absorbancias por espectroscopía UV a 280 nm para posteriormente determinar las concentraciones de LPT en cada una de las muestras. La cinética de liberación se realizó por triplicado y usando como blanco un sistema donde solo se colocaron NP sin LPT.

4.2.4.11. Flexibilidad (solo para LSE)

Para el estudio de flexibilidad de los LSE, la suspensión obtenida se hizo pasar tres veces a través de una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 50 nm. Al final del proceso de extrusión se midió el TN (ver apartado 4.2.4.1) y se comparó con el TN antes de la extrusión. La determinación se realizó por triplicado.

4.2.4.12. Evaluación *in vitro*

Para corroborar que el LPT una vez incorporado en los NS mantuviera su actividad biológica, se realizaron estudios *in vitro* en un cultivo de fibroblastos (ATCC® PCS-201-012 Manassas, VA, USA). La técnica utilizada para esta evaluación fue por ruptura de cultivo, para la cual, con ayuda de una punta de plástico, se atravesó diametralmente el cultivo con lo que se generó un espacio libre de células, finalmente, se colocó la suspensión de NS cargada con el LPT y se determinó por imagen el proceso de migración de los fibroblastos hacia el espacio vacío. Este estudio fue realizado con el LPT en solución y con PBS. Se tomó especial consideración en lograr observar que los NS cubrieran el espacio en un tiempo mayor el del cultivo que contenía PBS y ligeramente menor al de la solución de LPT.

4.2.5. Preparación de la matriz polimérica termosensible (MPT)

Las MPT fueron preparadas por el método en frío [65]. La MPT de Pluronic® F-127 al 20% fue obtenida por adición gradual del polímero a un medio acuoso a 4°C, bajo agitación magnética, hasta completa hidratación del polvo (Figura 19).

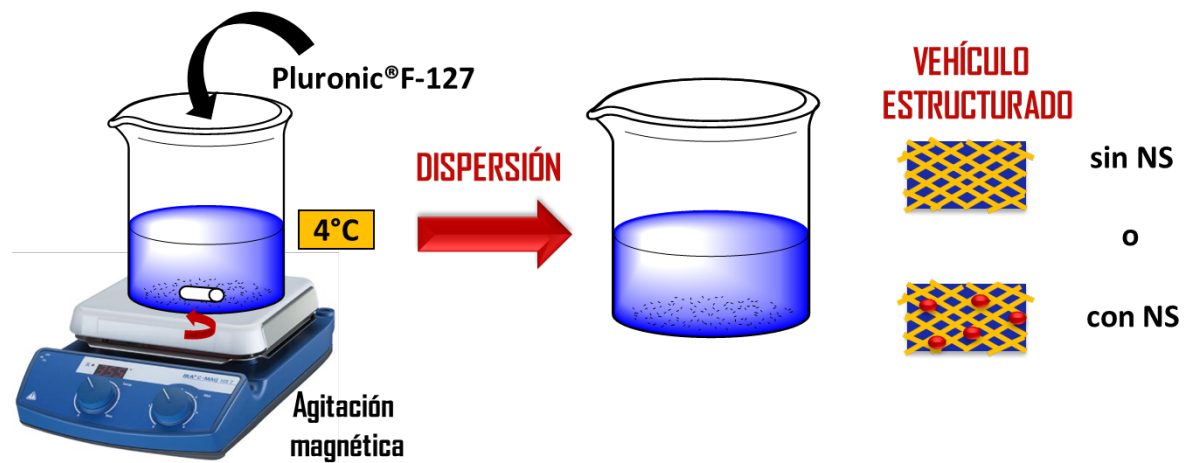


Fig. 19. Procedimiento ilustrativo de la preparación de la MPT por el método en frío. Las MPT que contenían NS con y sin LPT fueron preparadas de la misma forma que las MPT sin NS, en este caso el medio acuoso utilizado fue la suspensión previamente obtenida de cada NS (Figura 19).

4.2.6. Caracterización de la MPT

4.2.6.1. Viscosidad

La evaluación se llevó a cabo haciendo uso de un viscosímetro tipo *Brookfield* (Brookfield, CAP 2000), para lo cual se colocó una muestra de 50 μ l de cada uno de las MPT (Base, LSE+LPT, LSE, NP+LPT y NP) en el equipo. Posteriormente se realizó un perfil de viscosidad contra temperatura (5 °C - 40 °C) con una rampa de calentamiento de 2 °C/min, a una velocidad de aguja de 50 rpm y se tomó la lectura en cada incremento de temperatura. Este estudio se realizó por triplicado para cada uno de los sistemas.

4.2.6.2. pH

Para la medición del pH se colocó una cantidad del hidrogel en un vaso, haciendo la medida con un potenciómetro (Corning, 430) previamente calibrado. La lectura de pH se realizó a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y con agitación constante. Esta lectura se llevó a cabo por triplicado y para todas las matrices (base, LSE, LSE+LPT, NP y NP+LPT).

4.2.6.3. Tiempo de no fluidez

Se colocaron 500 μ l de la MPT en un vial, colocándolo dentro de una incubadora a una temperatura de $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, evaluando, a diferentes tiempos (2, 5 y 10 minutos) y de manera visual, en que tiempo la MPT perdía por completo su fluidez mediante la inversión del vial.

4.2.6.4. Temperatura de transición sol-gel

Para este estudio, se colocó una cantidad de la MPT en un vial y enseguida, se colocó un agitador magnético dentro de la muestra. El sistema se mantuvo en un baño maría a $33^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con agitación magnética, hasta que el agitador se detuviera por completo e inmediatamente se llevó a cabo la lectura de la temperatura de la MPT con un sensor metálico, esta temperatura representa la transición sol-gel del sistema.

4.2.6.5. Estudio por DSC

Se realizó DSC para el polímero (*Pluronic*® F-127) y para las diferentes MPT, para lo cual, se colocaron aproximadamente 10 mg de muestra en una charola de aluminio Tzero®, seguido de esto y del previo cerrado de la charola, se colocó en el calorímetro y se corrió el análisis con las siguientes condiciones: equilibrio de muestra a 0°C, isoterma por 1 min y rampa de calentamiento de 1 °C/min hasta 70 °C.

4.2.6.6. Estudio por infrarrojo

En este caso, se colocó la muestra (*Pluronic*® F-127 o MPT en sus diferentes sistemas) sobre el cristal de ZnSe y se hizo un barrido de 150 escaneos con una resolución de 16 a cada una de las muestras en un intervalo de lectura en número de onda de 500 a 4,000 cm^{-1} mediante FTIR/ATR. En todos los casos se leyó previamente una referencia bajo las mismas condiciones que las muestras.

4.2.6.7. Estudio por DC

El análisis por espectroscopía con DC se realizó colocando una muestra de una solución de LPT en una celda de 1 mm y posteriormente se dispuso en un equipo J-815 Perkin-Elmer (Jasco Inc., Easton, MD) que mantuvo los siguientes parámetros: sensibilidad estándar, ancho de banda de 1.00 nm, velocidad de escaneo 10 nm/min, temperatura de 25.04°C con una longitud de onda de inicio y de terminación de 250 nm y 195 nm respectivamente con intervalos de 0.5 nm, registrándose 110 puntos de lectura. El estudio también se realizó para la MPT con LPT, considerando tener la misma concentración del LPT que en la solución.

4.2.6.8. Desnaturalización del LPT

El análisis de transición térmica monitoreada por espectroscopía de DC se realizó en un espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco Inc., Easton, MD) equipado con un portaceldas PFD-425S tipo Peltier para el control de temperatura y un agitador magnético. Las transiciones de desnaturalización térmica se mantuvieron en continuo monitoreo de los cambios de elipticidad a una longitud de onda fija de 222 nm y a una tasa de calentamiento de 2 °C

min⁻¹. Los perfiles, tanto de calentamiento como de enfriamiento fueron controlados a través del accesorio de Peltier. Este estudio se realizó para la solución de LPT y para el sistema MPT+LPT.

4.2.6.9. Pérdida del movimiento Browniano

Se colocaron 1.3 ml de cada uno de las MPT en una celda de poliestireno exclusiva para TN y se midió el efecto de la temperatura sobre el TN por la técnica de dispersión de luz dinámica, haciendo uso del equipo *Zetasizer*.. Las condiciones de estudio fueron: una fase de equilibrio de 120 s, de 5 °C - 30 °C y con 3 lecturas por cada replica.

4.2.6.10. Estabilidad

La estabilidad de las MPT se siguió durante 3 meses, para lo cual se colocaron los sistemas a una temperatura de 4 °C ± 0.5 °C, tomando muestras al tiempo 0, 1 semana, 15 días, 1 mes, 2 meses y 3 meses. La estabilidad se evaluó mediante el cambio en la apariencia física y viscosidad de las MPT, a los diferentes tiempos de muestreo (ver apartado 4.2.6.1).

4.2.6.11. Efecto oclusivo

La piel de cerdo, previamente aislada de la oreja del animal, se montó en celdas de Franz modificadas, colocando una solución amortiguadora pH 7.2 en el receptor y sobre la piel, 100 µl de cada uno de las MPT, las celdas se colocaron dentro de una incubadora a 33 °C ± 0.5 °C. Después de 24 horas de contacto y con la completa evaporación del agua en el compartimento donador, se procedió a medir la pérdida de agua empleando un *Tewameter* (MPA2, Courage+Khazaka, Alemania). Los resultados fueron comparados con los valores obtenidos en piel no tratada (valor basal).

4.2.6.12. Cinética de difusión del LPT

Para el estudio de difusión del LPT a partir de la MPT, se colocó una muestra del sistema en un vaso y se incubó a 33 °C ± 0.5 °C hasta obtener un estado semisólido no fluido, posteriormente, en la parte superior se colocaron 2.0 ml de solución PBS pH 7.2. Para este estudio, se tomaron muestras a diferentes tiempos establecidos de la parte superior y se leyeron por espectroscopía UV a 280 nm, para determinar la cantidad de LPT que difundió en el tiempo. La

cinética de difusión se realizó usando como blanco un sistema donde solo se colocó MPT base.

4.2.6.13. Evaluación in vivo de la MPT cargada con nanosistema

El Comité de Ética de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía-IPN aprobó los experimentos con animales en este estudio (CBE / 015/2018), que se realizaron de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999. Ratones hembra CD1 de siete a nueve semanas de edad fueron utilizados. El grupo fue de siete animales. Los ratones se anestesiaron con un cóctel de ketamina (90 mg / kg) -xilazina (7 mg / kg) y, posteriormente, se afeitó el pelo de la parte posterior de cada ratón y se realizó la cirugía. Se realizaron cuatro biopsias por punción para crear una herida cutánea profunda con un diámetro de 3 mm. Luego, se depositaron 5 μ L del NP, NP + LPT o solución de LPT en tres de las heridas, utilizando la cuarta herida como control (sin tratamiento). Las heridas se trataron mediante la aplicación diaria de las formulaciones mencionadas, siguiendo la evolución de las heridas mediante fotografías y midiendo el tamaño de las heridas en relación con el control, en los días 0, 1, 3, 5, 7 y 10.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Lisado plaquetario

Las proteínas como biomoléculas tienen características fisicoquímico-biológicas que las hacen diferentes con respecto a otros compuestos u otras biomoléculas. Estas características pueden ser detectadas a través de varias metodologías analíticas y/o reacciones coloridas que constituyen un indicativo de la presencia y conformación de estos biopolímeros. En el caso de la espectroscopía ultravioleta (UV), permite detectar a una longitud de 280 nm la presencia de aminoácidos (aa) con carácter aromático, como triptófano y tirosina en una cadena peptídica[66]. Como se puede observar en la Figura 20 el espectro de UV muestra esta señal característica a 280 nm para el LPT.

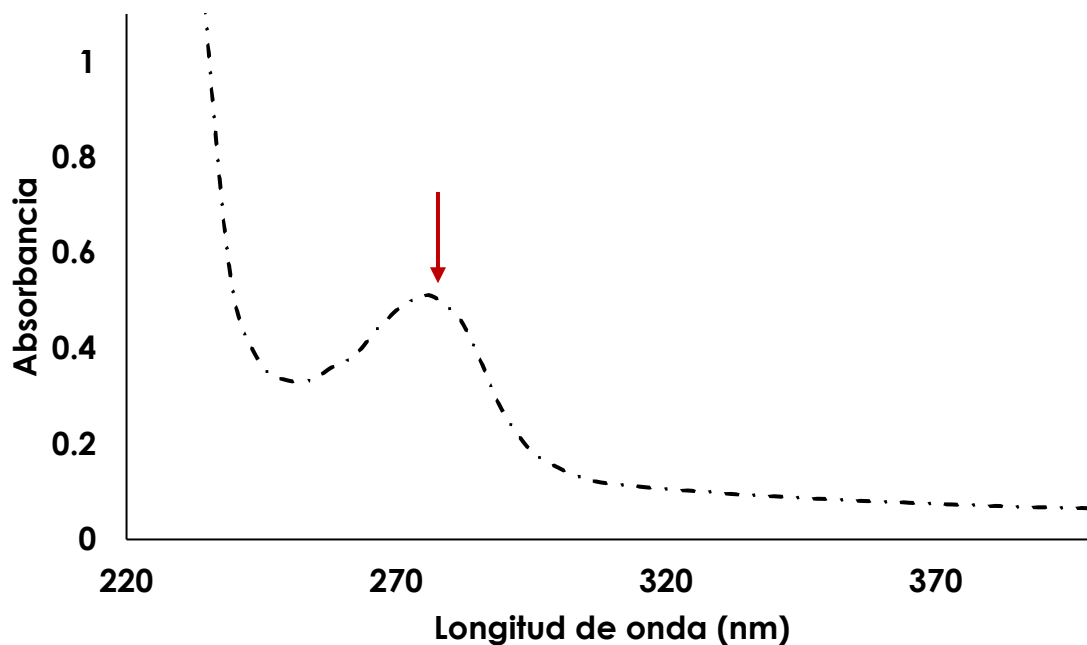


Fig. 20. Espectro UV para el LPT. Se indica con flecha el pico de máxima absorción en 280 nm.

Otras técnicas analíticas empleadas para caracterizar una proteína son la espectroscopía de IR^[67] y la espectroscopia por DC^[68]. La primera, permite detectar grupos funcionales de los aa, usualmente denominados amida I: cerca de 1650 cm^{-1} (C=O) y amida II: aprox. 1550 cm^{-1} (N-H, C-N). En el caso del DC, se puede determinar la presencia de plegamiento en estructuras secundarias (alfa hélices y láminas beta, principalmente). Las Figuras 21 y 22 muestran los espectros de IR y de DC respectivamente, obtenidos para el LPT. Como se aprecia, en el espectro de IR se detectaron las señales amida I y II, mientras que en el espectro de DC se aprecia la forma característica de una estructura secundaria plegada, donde la señal predominante es representativa de estructuras alfa hélices^[68].

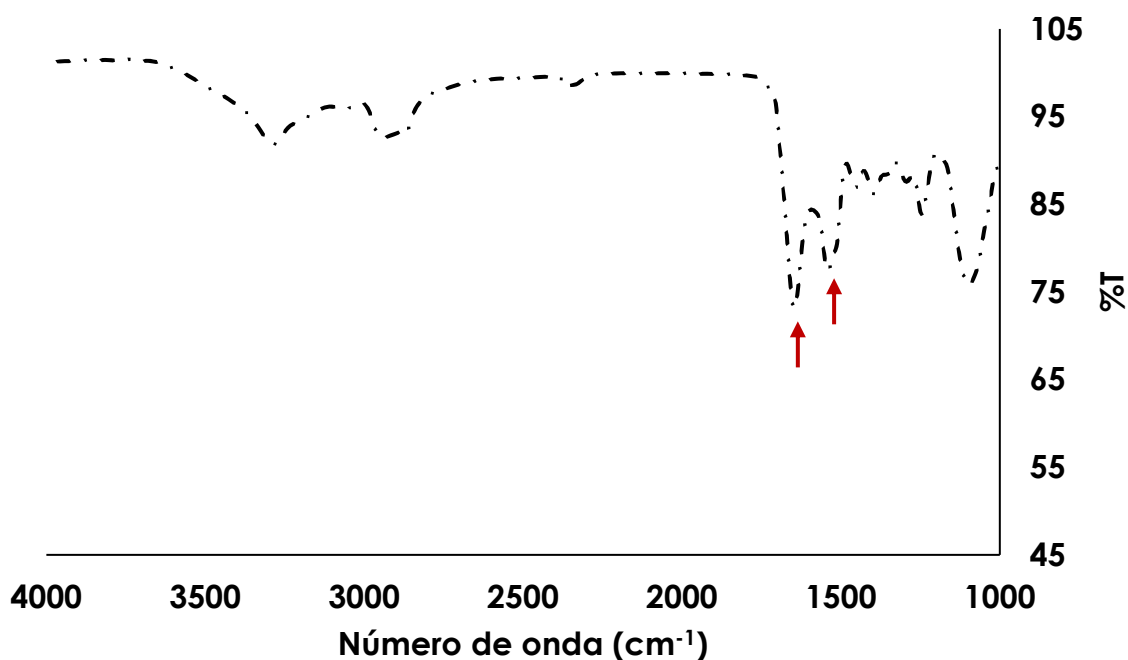


Fig. 21. Espectro IR para el LPT. Se indican con flechas las bandas de amida I (izquierda) y amida II (derecha)

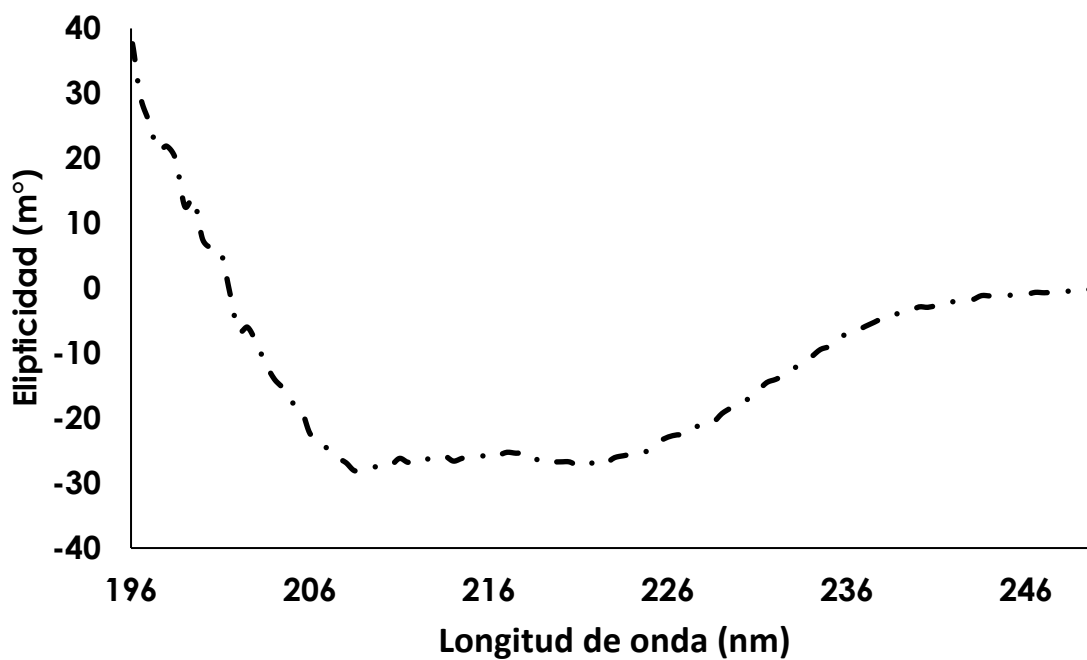


Fig. 22. Espectro DC para el LPT.

Finalmente, la Figura 23 muestra la reacción colorida del LPT en presencia del reactivo de Bradford y Biuret respectivamente, detectando los cambios de

color característico en cada uno de las reacciones, en el primer caso indicando la presencia de aa básicos y en el segundo caso estructuras peptídicas[69].

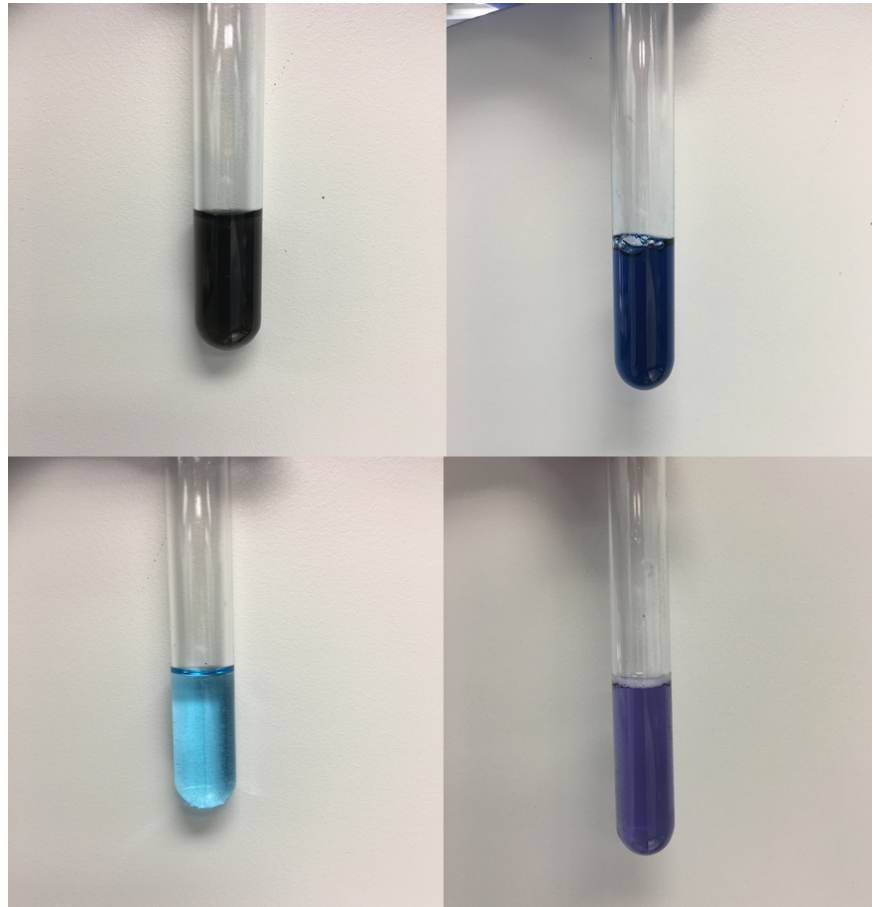


Fig. 23. *Reacción de Bradford (arriba) y Biuret (abajo) con el LPT.*

Con estos resultados se corrobora que efectivamente el LPT que se obtiene a partir de lisis de las plaquetas y que es usado como activo en la preparación de los NS y la MPT, goza de propiedades características de una proteína.

5.2. Nanosistemas

5.2.1. Tamaño, índice de polidispersión y pZ

En las Tablas 9 y 10 se muestran los valores de TN, IPD Y pZ para los LSE y las NP respectivamente. En el caso de los LSE, se muestran dos grupos de valores (antes y después de la extrusión) debido a que una de las características importantes de este NS, es la diversidad de estructuras que se pueden formar

por las diversas técnicas de preparación[53, 70], así mismo se desglosan los valores que se obtienen cuando los LSE contienen o no LPT.

Tabla. 9. Valores obtenidos para tamaño de vesícula (TV), IPD y pZ para los LSE. Los valores representan aquellos obtenidos antes y después del proceso de reducción de tamaño.

	ANTES ^a		DESPUÉS ^a	
	SIN LPT	CON LPT	SIN LPT	CON LPT
Tamaño de vesícula (nm)	1257.7 ± 718.6	2005.7 ± 833.6	105.5 ± 6.2	134.6 ± 11.0
IPD	0.790 ± 0.441	0.660 ± 0.155	0.260 ± 0.014	0.273 ± 0.012
Potencial Z (mV)	-9.47 ± 0.31	-8.94 ± 0.33	-9.64 ± 1.85	-9.39 ± 2.27

^a $\alpha = 0.05$, $n = 3$

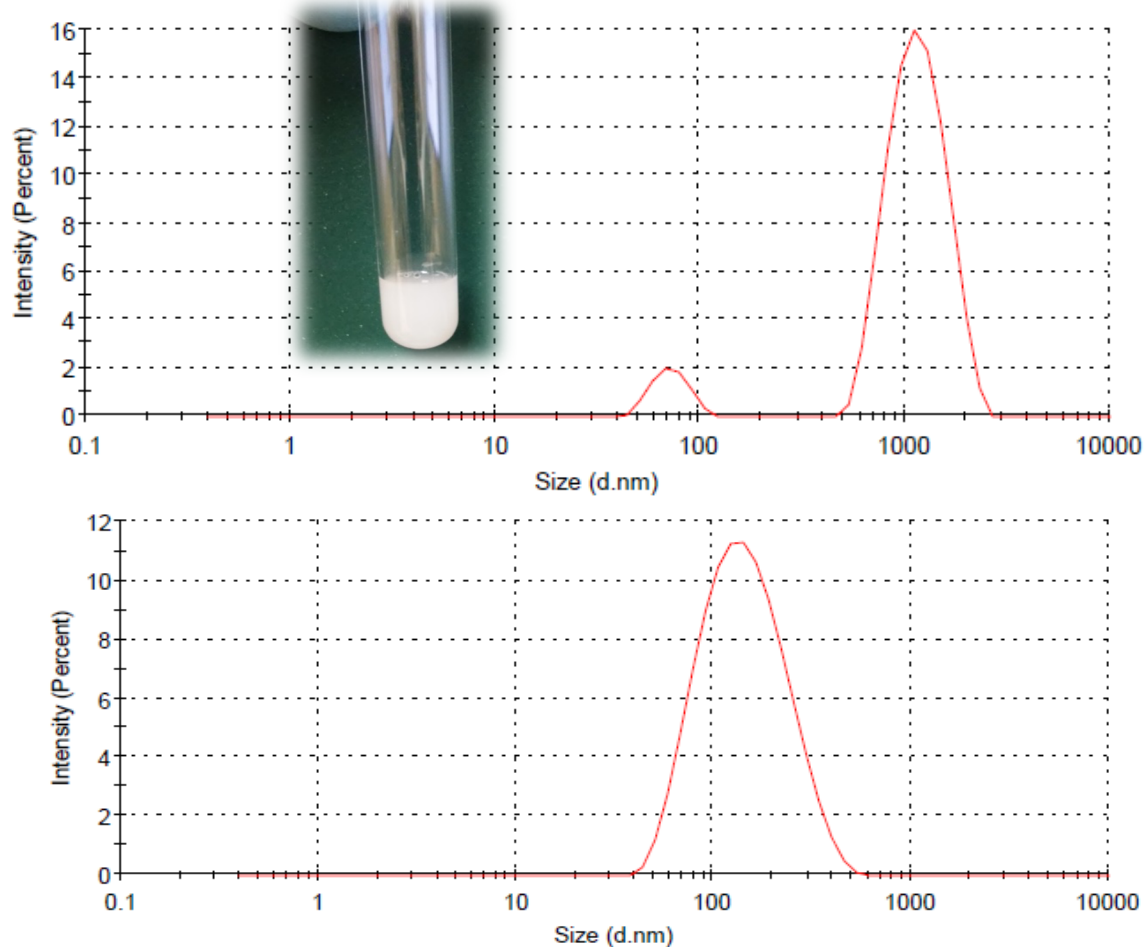


Fig. 24. Distribuciones de TV de los LSE antes (superior) y después (inferior) de la reducción de tamaño.

Tabla. 10. Valores obtenidos para TP, IPD y pZ para las NP.

	SIN LPT ^a	CON LPT ^a
Tamaño de partícula (nm)	267.0 ± 10.5	317.9 ± 18.2
IPD	0.103 ± 0.026	0.298 ± 0.023
Potencial Z (mV)	-29.1 ± 1.0	-17.6 ± 1.8

^a $\alpha = 0.05$, $n = 3$

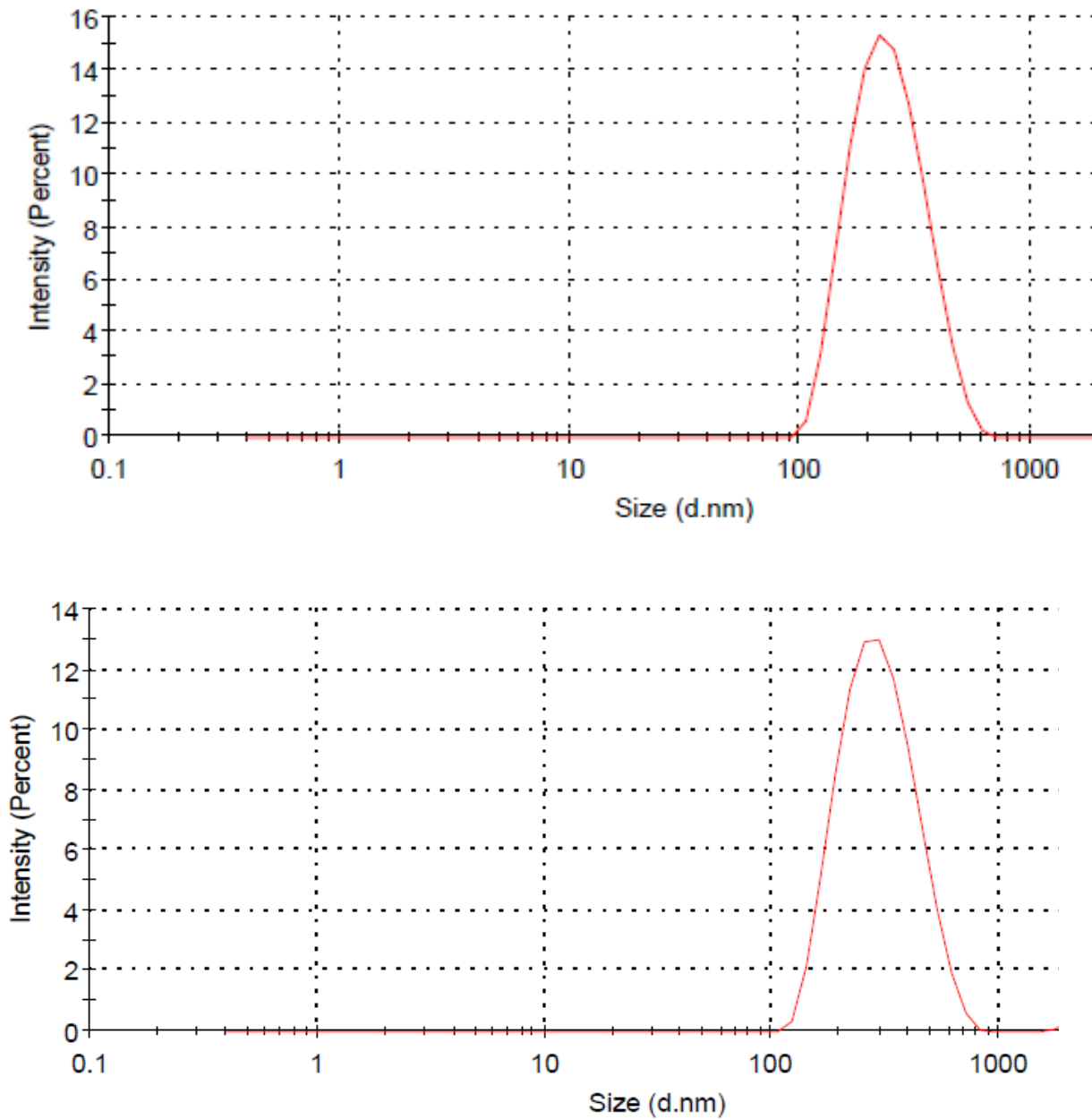


Fig. 25. Distribuciones de TP de las NP sin (superior) y con (inferior) LPT.

En el caso de las NP se presentan los valores que se obtienen cuando éstas contienen o no LPT. Una de las principales diferencias respecto al TN está relacionado al método de preparación, que como ya se mencionó, los LSE son NS que generan suspensiones heterogéneas con formas estructurales diversas, dependiendo del método, por ejemplo, el método por hidratación de película[71]. Por esta situación fue necesario realizar un proceso de reducción de tamaño de la suspensión de LSE empleando sonicación y extrusión. En la Tabla 9 se aprecia como el tamaño después de esta reducción se vuelve significativamente menor. La Figura 24 muestra las distribuciones de tamaño antes y después, donde se corrobora el desplazamiento a TV menores e incluso se muestra la suspensión de LSE con un aspecto lechoso comparada con la misma suspensión, pero después de la reducción, donde su apariencia genera un tono azul, representativo de sistemas en tamaño nanométrico. En el caso de las NP el proceso utilizado en la preparación también influye en su tamaño, sin embargo, es factible, como en los LSE, controlar las variables del proceso, por ejemplo, la velocidad de agitación, el tiempo de agitación, la concentración del estabilizante, etc. No obstante, es bien sabido que, a diferencia de los lípidos, el PLGA genera partículas con tamaños menos dispersos [72, 73], lo que conduce a la obtención de suspensiones con TP más homogéneos por lo que no es necesario realizar un reducción posterior a la obtención (Tabla 10). En ambos NS se obtuvieron valores de tamaño significativamente mayores, cuando se adicionó el LPT, lo que respalda la idea de que la presencia de algunas moléculas pueden aumentar el tamaño del NS [74, 75]. En este caso, se puede justificar por el hecho de que el activo utilizado al ser una mezcla de proteínas posee un peso y tamaño molecular mayor, lo que indirectamente aumenta las dimensiones del NS, generando coloides que por este aumento de tamaño se moverán más lentamente, dando como resultado TN mayores, considerando el principio de medida de la técnica de dispersión de luz dinámica[76].

Con respecto al IPD, los valores obtenidos en ambos NS se pueden considerar adecuados con base en el mismo principio de medición de TN y con respecto a algunos reportes publicados[77]. Las ligeras desviaciones a valores más grandes se atribuyen de igual manera a la presencia del LPT en la estructura del NS.

Finalmente, es bien sabido que, hablando de NS, la obtención de valores alrededor de ± 30 mV en pZ representan un sistema cuya estabilidad electrostática en suspensión es buena, con respecto a aquellas suspensiones con valores inferiores a éste[76]. En este caso, los LSE poseen un valor pequeño y negativo, y aunque la suspensión de manera visual no mostró sedimentación (característica de sistemas no estables en suspensión) en por lo menos tres meses, se pueden considerar dos posibilidades, (i) que la vesícula no tendrá una estabilidad electrostática "buena", (ii) que este valor se ve opacado por la presencia del modificador de membrana (Tween 80®). En el segundo caso, si se considera que los LSE poseen un modificador de membrana, se puede pensar que la estabilidad en suspensión que predominará en estas vesículas será de tipo estérica, situación que se ha observado con este tipo de compuestos, por ejemplo el Tween 80 ® [53, 78], que por el volumen de la región hidrofílica, expuesta hacia el exterior de los LSE (ver Figura 13), puede brindar estabilización estérica. En el caso de las NP los valores son mayores y negativos con respecto a los LSE, este valor más grande, con respecto a los LSE, se puede atribuir al hecho de que las NP no poseen un segundo componente que pueda alterar el comportamiento de la partícula como lo hace el Tween 80®, por lo que el valor no se ve opacado como probablemente sucedió en los LSE. Aun así, el valor está por debajo del "ideal" (± 30 mV). De hecho, hay una disminución con respecto a las NP sin LPT, que puede relacionar a la ligera interacción que existe entre los grupos polares positivos del LPT con el grupo carboxilo terminal ionizado[79] lo que reduce la carga en la superficie de la NP. Se sabe que el signo que adquiere el valor de pZ está relacionado a la carga que presentan las

moléculas que constituyen los sistemas [76]. En este caso se observaron valores negativos en ambos NS, lo que se atribuye, en el caso de los LSE, a la carga negativa que soporta el grupo fosfato de la fosfatidilcolina, la cual predomina con respecto a la carga positiva de la colina, esta predominancia está relacionada al pH de trabajo[80]. Mientras que en las NP, la carga es representativa del grupo terminal carboxilo del polímero PLGA usado para su preparación, que en un medio acuoso se mantiene ionizado, generando el valor negativo[81].

5.2.2. Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga

Debido a la naturaleza hidrofílica del LPT, y a la dificultad para obtener tasas de encapsulación elevadas en los NS, es de vital relevancia determinar la cantidad de LPT que los NS puede incorporar. No sólo para determinar dosis, sino para evaluar la protección que tendrá el LPT frente a factores externos, la mejora en la potencia terapéutica comparada con tratamientos convencionales para el saneamiento de heridas y la obtención de un sistema con una liberación controlada que permita disminuir la frecuencia de administración[2]. En la Tabla 11 se muestran los valores de eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (CC) de los NS cuando se preparan adicionado dos cantidades diferentes de LPT.

Tabla. 11. Valores de EE y CC de los NS a dos cantidades diferentes de LPT

Formulación (LPT)	%EE	CC (µg/mg)	Ralación en peso (LPT:lípido/polímero)
LSE (2 mg) ^a	97.4± 1.3	15.5 ± 2.5	1:63
LSE (8 mg) ^a	72.6 ± 2.4	46.5 ± 4.2	1:16
NP (2 mg) ^a	90.3 ± 4.4	12.0 ± 3.1	1:75
NP (8 mg) ^a	60.1 ± 3.7	32.0 ± 2.9	1:19

^a Representa la cantidad de LPT adicionada durante la preparación del NS. $\alpha = 0.05$, $n = 3$, Una de las ventajas de las proteínas terapéuticas es que a concentraciones muy pequeñas se pueden tener efectos farmacológicos significativos[82], en este caso no es la excepción, ya que se observa primeramente que los LSE pueden soportar hasta 15 µg/mg de LSE lo que representa un valor muy

bueno en el entendido de que se requieren aproximadamente 100 ng, para tener un efecto del LPT a nivel de la proliferación y migración celular de los fibroblastos, esenciales en el saneamiento de heridas, además de que permitirá que la administración sea, hasta el momento, de una vez al día considerando el %EE. En el caso de las NP se tienen CC hasta de 12 µg/mg de NP, valor que de igual manera es bueno para los fines terapéuticos buscados. En segundo lugar, se aprecia que, como muchos sistemas nanométricos, ambos NS presentan saturación[83, 84], ya que conforme se aumenta la cantidad de LPT (de 2 mg a 8 mg) el %EE disminuye, por lo que se puede pensar, por ejemplo, que si adicionamos una cantidad de LPT mayor a 7 mg al preparar los LSE probablemente estaremos topando con un sistema saturado que ya no cargará más LPT, dando valores de %EE aun menores. En el caso de las NP podemos notar que la saturación de las partículas se obtiene con cantidades menores de LPT con respecto a los LSE. Esta diferencia se atribuye a la afinidad del LPT al NS, mientras que LSE tienen la capacidad de encapsular activos tanto hidrofílicos (en su núcleo acuoso) como lipofílicos (en la membrana lipídica)[53]. Por su parte, las NP de PLGA son predominantemente sistemas hidrofóbicos[85, 86], por lo que la EE es menor para el LPT, que como ya se mencionó es un activo hidrofílico. Cabe resaltar que, para el caso de las NP, aunque el LPT y el polímero son de hidrofiliidad diferente, se obtiene una EE adecuada para los fines buscados, lo cual está relacionado a la técnica de preparación utilizada (ver sección 4.2.3), metodología altamente empleada para mejorar la EE de activos hidrofílicos, como las proteínas, en NP[87, 88].

5.2.3. Morfología

Una forma de corroborar la forma de los sistemas, así como el tamaño y compararlo con el determinado por dispersión de luz dinámica, es el uso de la microscopía electrónica. En las Figuras 26 y 27 se muestran las imágenes de los NS vistas por TEM. Como se puede ver, ambos NS poseen una forma esférica, geometría esperada para sistemas de este tipo. En el caso de las NP se puede ver que efectivamente hay un aumento en el TP al momento de

ser incorporado el LPT, tal y como se observó en la medición por dispersión de luz dinámica (Tabla 10). Cabe resaltar que con respecto al tamaño para los LSE, este se ve disminuido en relación al mostrado en la Tabla 9, sin embargo, esta disminución se atribuye al procedimiento de preparación de la muestra previo a la observación y también al efecto de la fuente electrónica sobre sistemas termolábiles como los LSE [89].

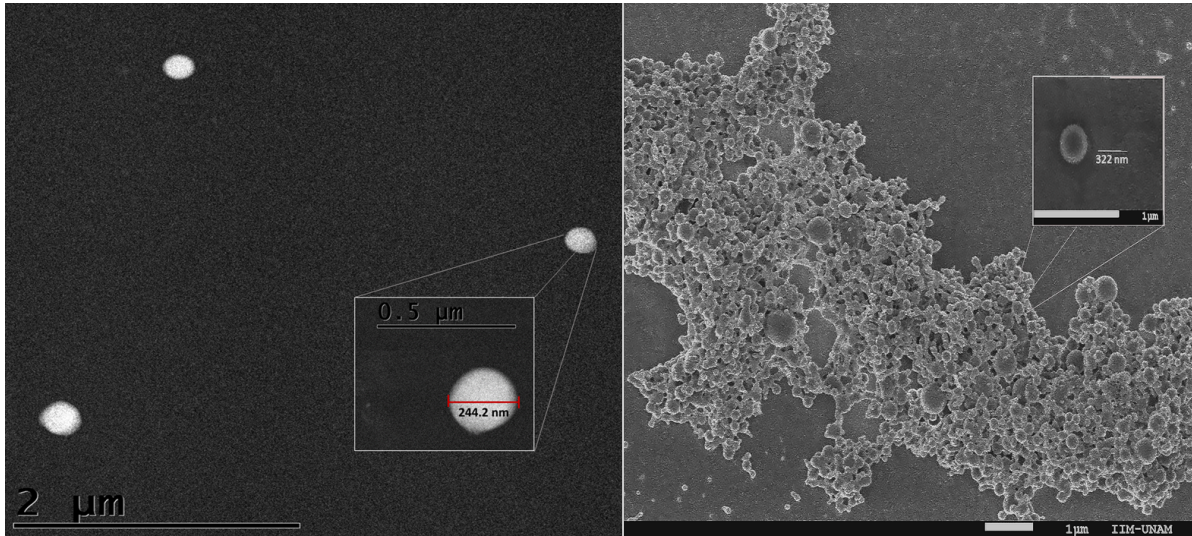


Figura 26. Micrografía de las NP. NP sin LPT por TEM (izquierda) y con LPT con SEM (derecha). En el recuadro pequeño se muestra una NP representativa con el valor de tamaño correspondiente en nm.

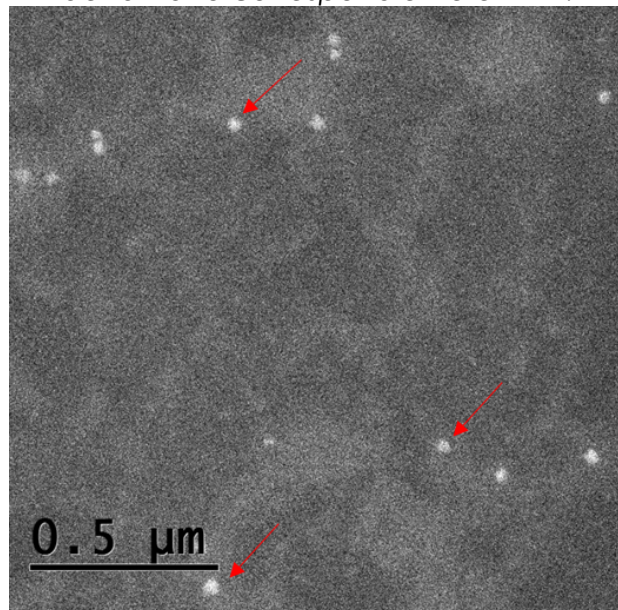


Figura 27. Micrografía de los LSE. Con una flecha roja se indican algunas vesículas representativas.

5.2.4. Estabilidad

Cuando se habla de un nuevo sistema con una propiedad terapéutica, su capacidad de mantener sus características basales a ciertas condiciones por un periodo de tiempo es primordial. Si se comenta de un NS como los LSE o las NP, su tamaño, su IPD, su pZ y su capacidad de mantener al LPT en su estructura se vuelven críticas, debido y como se ha mencionado, a los pros y contras que estas propiedades otorgan al sistema.

La estabilidad de los sistemas se siguió por un periodo de tres meses, para observar como los parámetros arriba mencionados se modificaban. El estudio se llevó a cabo en refrigeración a $4^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ considerando la ventaja que ésta le otorga al LPT y la propiedad de sistema fluido de la MPT. Las Tablas 12 y 13 muestran los valores obtenidos para los NS durante el periodo de análisis.

Tabla 12. Estudio de estabilidad para los LSE. Se muestra el tamaño de vesícula (TV), IPD, potencial Z (pZ) y carga de LPT en función del tiempo a 4°C

		0 DÍAS	7 DÍAS	15 DÍAS	1 MES	2 MESES	3 MESES
TV (nm)	SIN LPT	102.2 ± 0.8	102.7 ± 0.6	106.9 ± 1.8	125.5 ± 1.1	127.5 ± 2.1	124.1 ± 3.1
	CON LPT	126.6 ± 4.4	126.7 ± 1.5	128.5 ± 6.6	139.7 ± 3.3	137.7 ± 2.8	139.1 ± 1.6
IPD	SIN LPT	0.243 ± 0.003	0.220 ± 0.002	0.208 ± 0.010	0.360 ± 0.004	0.348 ± 0.006	0.375 ± 0.007
	CON LPT	0.264 ± 0.009	0.268 ± 0.001	0.311 ± 0.013	0.272 ± 0.006	0.264 ± 0.011	0.250 ± 0.014
pZ (mV)	SIN LPT	-10.8 ± 0.4	-10.8 ± 0.4	-11.7 ± 0.5	-6.33 ± 0.15	-6.74 ± 0.18	-6.47 ± 0.09
	CON LPT	-7.98 ± 0.25	-8.83 ± 0.26	-11.2 ± 0.3	-11.1 ± 0.4	-12.4 ± 1.0	-12.0 ± 0.7
LPT (mg)	SIN LPT	---	---	---	---	---	---
	CON LPT	5.71 ± 0.90	5.45 ± 0.73	5.12 ± 0.59	4.51 ± 0.72	4.14 ± 0.43	4.01 ± 0.91

Intervalos de confianza con $\alpha = 0.05$, $n = 3$ para cada tiempo.

En la Tabla 12 se observa que en el transcurso de tres meses se liberaron aproximadamente 1.7 mg del LPT, este cambio se puede corroborar con un aumento significativo en el tamaño de vesícula en el mismo periodo ($p < 0.05$).

Este fenómeno se puede atribuir al dinamismo de ruptura-formación de este tipo de vesículas, que puede generar que el activo se vaya liberando conforme transcurre el tiempo, cabe resaltar que el estudio de estabilidad se llevó a cabo con los LSE en suspensión y como se ha reportado, su estabilidad, principalmente basada en el tamaño de vesícula, se suele modificar[90, 91]. Con respecto a la cantidad liberada a tres meses, es importante mencionar que a pesar de que se pierde LPT, la cantidad mantenida dentro de los LSE es un valor que representa una proporción de LPT que es adecuado para su administración, ya que como se ha mencionado, el LPT tiene efecto a una dosis baja, aproximadamente 100 ng, lo que habla de su gran potencia terapéutica. En el caso de la suspensión de NP la cantidad de LPT fue similar, aproximadamente 1.9 mg a los 3 meses, sin embargo, en este caso no hubo cambio significativo en el TP ($p>0.05$), por lo que la liberación del LPT a partir de las NP, se atribuye a difusión natural del LPT por efecto de la diferencia en la hidrofiliidad entre el PLGA y el LPT, lo que se puede traducir como un estado de inestabilidad del LPT dentro de la NP, que previamente se ha establecido como un mecanismo que se presenta en este tipo de NS[85]. Por otro lado, tanto el LPT liberado, el aumento de tamaño en los LSE o la inestabilidad del LPT en las NP son características que en cierto sentido se esperaban, es por ello por lo que se buscó la incorporación de los NS en una MPT que mejorara estas condiciones.

Tabla 13. Estudio de estabilidad para las NP. Se muestra el tamaño de partícula (TP), IPD, potencial Z (pZ) y carga de LPT en función del tiempo a 4°C

		0 DÍAS	7 DÍAS	15 DÍAS	1 MES	2 MESES	3 MESES
TP (nm)	SIN LPT	264.7 ± 12.2	261.0 ± 12.8	266.3 ± 26.2	262.7 ± 18.3	252.3 ± 10.2	256.7 ± 13.4
	CON LPT	333.1 ± 25.8	335.5 ± 13.9	307.0 ± 26.9	317.4 ± 23.0	343.7 ± 9.8	328.1 ± 20.2
IPD	SIN LPT	0.101 ± 0.024	0.116 ± 0.059	0.097 ± 0.044	0.091 ± 0.053	0.065 ± 0.128	0.088 ± 0.098
	CON LPT	0.307 ± 0.024	0.285 ± 0.015	0.314 ± 0.014	0.316 ± 0.014	0.291 ± 0.010	0.284 ± 0.016
pZ (mV)	SIN LPT	-30.0 ± 1.52	-28.2 ± 1.27	-28.6 ± 2.07	-27.0 ± 2.51	-26.7 ± 1.03	-26.4 ± 2.09
	CON LPT	-17.4 ± 0.66	-18.3 ± 1.12	-19.5 ± 1.50	-16.5 ± 1.87	-16.1 ± 0.50	-16.4 ± 0.70
LPT (mg)	SIN LPT	---	---	---	---	---	---
	CON LPT	5.68 ± 0.18	4.82 ± 0.56	4.01 ± 0.34	4.30 ± 0.11	4.0 ± 0.14	3.81 ± 0.21

Intervalos de confianza con $\alpha = 0.05$, $n = 3$ para cada tiempo.

Finalmente, el IPD y el pZ en ambos NS no sufrieron cambios considerables que puedan comprometer al sistema o al LPT mientras se encuentran en suspensión, a excepción del pZ de los LSE donde se presentan cambios que pueden modificar su estabilidad electroestática, sin embargo, se ha mencionado que estos sistemas se estabilizan por un efecto estérico más que electrostático. Los cambios de pZ de igual manera se relacionan al dinamismo de ruptura-formación de los LSE.

5.2.5. Estudio calorimétrico

Una forma de evaluar que el LPT se ha incorporado a los NS y con ello justificar su capacidad de protegerlo de los factores externos con los que se enfrentará al contacto con el área de la herida, como el pH, la temperatura, proteasas, entre otros, es la evaluación de sus termogramas. Los termogramas nos permiten definir, a partir de propiedades como el punto de fusión, transiciones vítreas, etc., la localización de activos dentro de estructuras como los LSE o las NP.

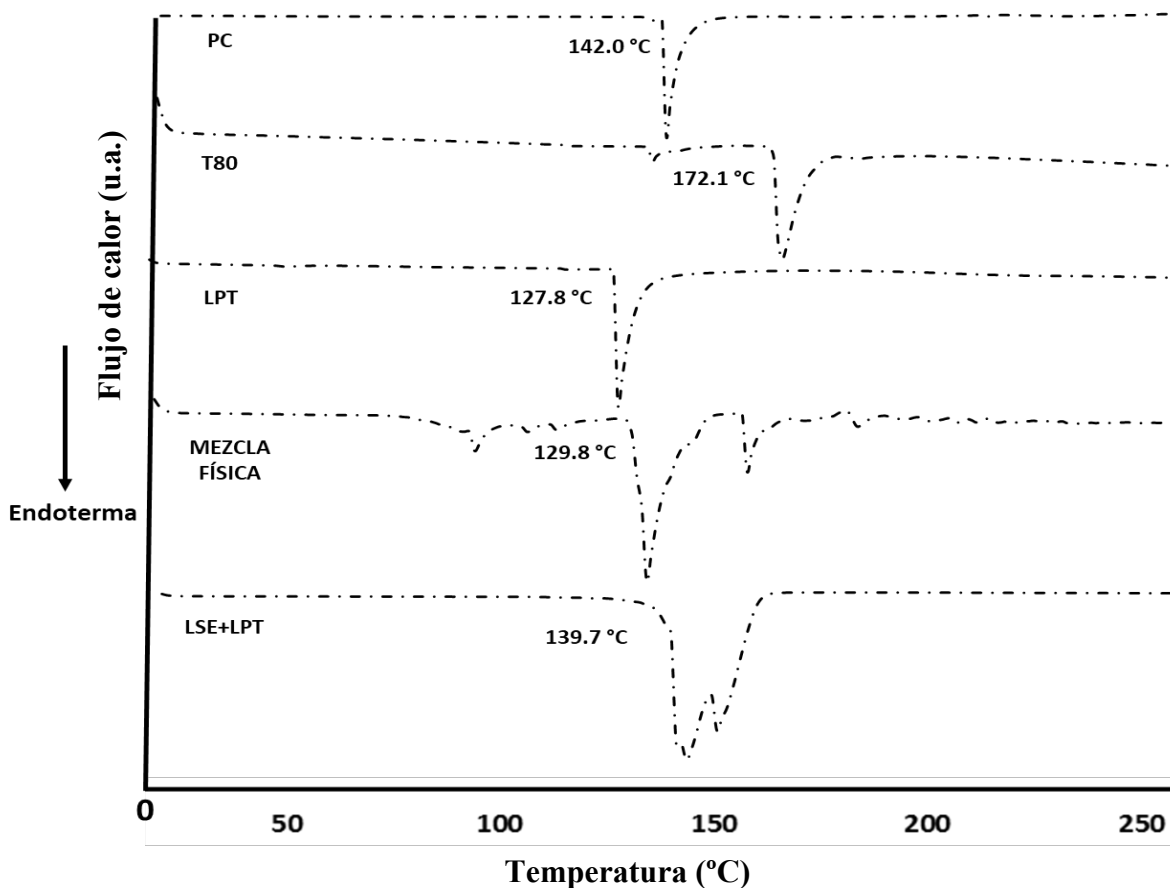


Figura 28. Termogramas para LSE. El valor de temperatura a la izquierda de cada señal representa el inicio del evento térmico. PC: fosfatidilcolina, T80: Tween 80.

Como se aprecia, en la Figura 28, se muestran los eventos térmicos de los tres componentes de los LSE, de la mezcla física y de los LSE con LPT. En el termograma de la mezcla física se observan un número de señales que representan los puntos de fusión de cada componente. Cabe mencionar que la mezcla física resulta de combinar, con una espátula, los componentes individuales guardando las mismas proporciones que en las vesículas, lo que nos permite evaluar la interacción de los componentes, y como se puede observar se presentan las señales individuales de los mismos; los picos nuevos y la disminución del tamaño de las señales, reflejan una pequeña interacción entre los componentes, principalmente se le atribuye a la presencia de Tween® 80, ya que éste se encuentra en un estado fluido, lo que permite que los demás componentes se disuelvan y por ende aumenten las probabilidades de interacción. La PC muestra una señal endotérmica a 142.0 °C que se

puede relacionar a la transición de fase de un estado gel a un estado líquido cristalino, relacionado a la fusión de las cadenas hidrocarbonadas en esta fase, que da como resultado un pico afilado[92], lo cual tiene relación con aquellas observaciones donde una transición exotérmica es indicativa de un cambio de la estructura (o una parte de ella) de una fase desordenada a una fase más ordenada[93], considerando que el fosfolípido está en un estado gel (ordenado) y al calentarlo pasa a un estado líquido (desordenado) la señal esperada será de tipo endotérmica, tal y como se muestra en los termogramas de la Figura 28. En el termograma identificado como LSE+LP que representa el nanosistema bajo estudio, se aprecia una única señal, pero no así señales individuales y discretas, por lo que se puede corroborar que los componentes interaccionan en su estructura vesicular y con ello, podemos mencionar que el LPT se encuentra incorporado en las vesículas[94, 95], que, por sus propiedades hidrofílicas, se puede decir que está localizado en el núcleo acuoso de los LSE.

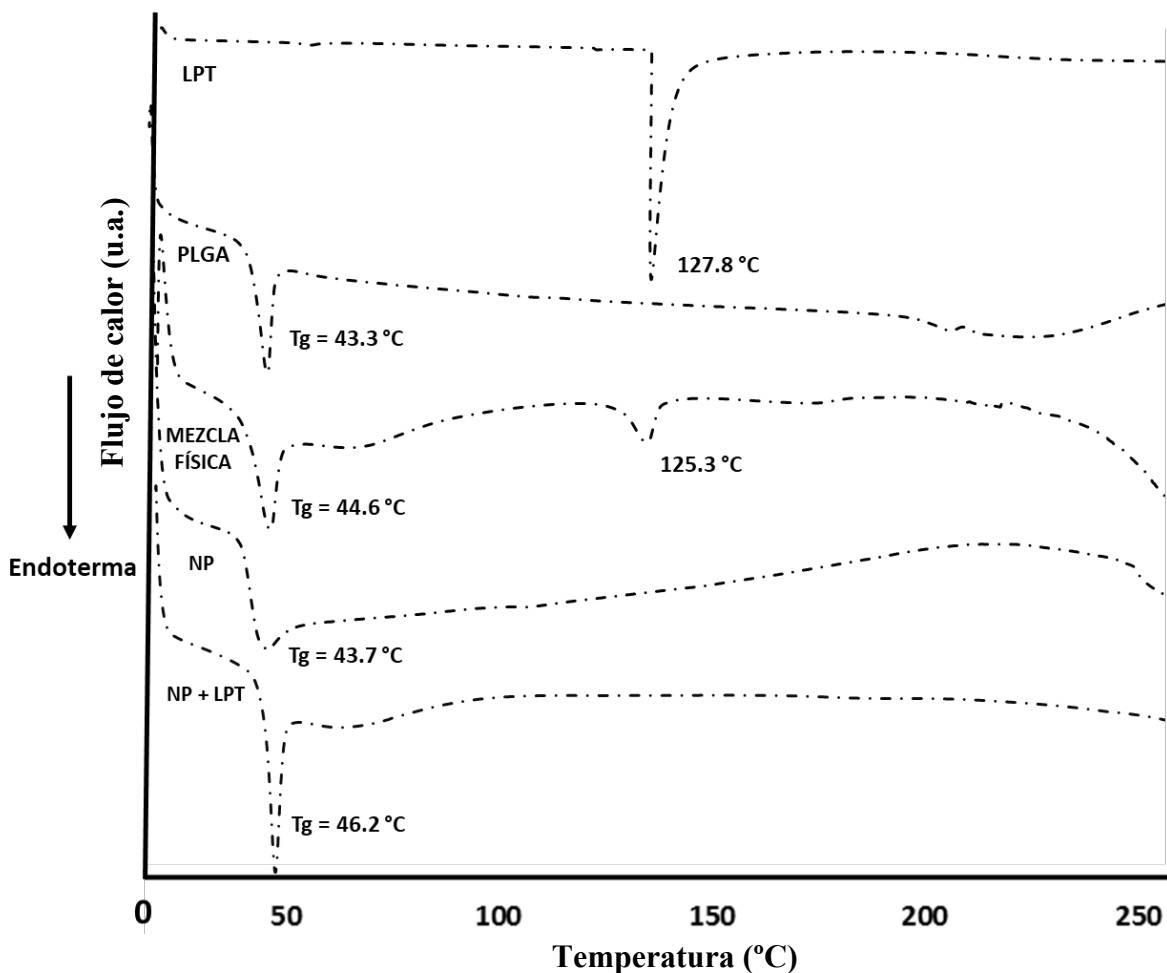


Figura 29. Termogramas para NP. El valor de temperatura a la derecha de cada señal representa el inicio del evento térmico, a excepción de las Tg, cuyo valor se midió en el punto central de la caída. Tg: transición vítrea.

En el caso de las NP (Figura 29) se muestran los eventos térmicos de los componentes de las NP (LPT y PLGA), de la mezcla física y de las NP con y sin LPT. En el termograma de la mezcla física se observan las dos señales esperadas a 44.6 y 125.3 °C indicativas del polímero y lisado respectivamente, lo que muestra que no hay una interacción importante entre estos componentes. Además, el valor de Tg para las NP tiene relación con otras investigaciones reportadas donde se utiliza el mismo polímero con proporción 50:50 [96]. De igual manera y como en el caso de los LSE, el termograma etiquetado como NP+LPT no muestra la señal característica del LPT lo que indica que éste se encuentra incorporado en la NP, lo cual tiene relación con estudios donde se han preparado NP de PLGA conteniendo una

proteína y en los cuales el termograma relacionado a las NP cargadas no presenta la señal de ésta^[97]. En un trabajo previo realizado por Yadav y Sawant^[98] quienes prepararon partículas de PLGA cargadas con etopósido, sugirieron que la molécula de activo está presente en un estado amorfo dentro de las NP cargadas y que está homogéneamente disperso en la matriz del polímero. En este caso, parece que tal conclusión no es probable. El LPT es hidrofílico y el PLGA hidrofóbico. Pareciera más probable que el activo esté atrapado dentro de la partícula o adsorbido en la superficie, esto basado en la misma situación que encontró Miladi y cols.,^[99] donde también utilizaron un compuesto hidrofílico y un polímero hidrofóbico para preparar NP cargadas. El desplazamiento de aproximadamente 3 °C en la Tg de las NP+LPT con respecto al valor del PLGA, puede estar relacionado una ligera interacción entre el LPT y el polímero, considerando la naturaleza hidrofóbica del PLGA, se infiere que las interacciones que pueden presentarse son de tipo hidrofóbico con algunas contribuciones por puentes de hidrogeno.

5.2.6. Estudio por infrarrojo

Las Figuras 30 y 31 presentan los espectros de infrarrojo (IR) de las materias primas utilizadas para la preparación de los LSE y NP respectivamente, así como los espectros de los NS con y sin el LPT. Con flechas rojas se indican las señales amida I y amida II del LPT en cada figura.

Como se puede observar en los espectros de IR para los LSE y LSE+LPT se presentan todas las bandas características con respecto a las materias primas que forman la vesícula (PC y T80), por ejemplo, aquellas que se observan a un número de onda de aproximadamente 1730 y 1643 cm^{-1} indicativo del grupo carbonilo (C=O) y el doble enlace (C=C), respectivamente en la estructura de la PC y del T80 (flechas negras). Esta y las demás señales permiten determinar que la estructura de las materias primas no se modifica o altera al ser transformadas a una estructura vesicular, lo que permite que guarden sus propiedades tecnológicas y terapéuticas en los LSE. La presencia de una pequeña banda (flecha azul) aproximadamente a los 1558 cm^{-1} en el espectro de LSE+LPT comparado con el de LSE que

representa solo vesículas blanco, corrobora que el LPT se encuentra presente en la estructura vesicular, debido a que esta señal es un indicador del enlace C-N con una pequeña contribución del enlace C=O presente en una cadena proteica (amida II, ver espectro IR de LPT)[100]. Incluso se puede observar un ligero incremento en la banda a 1643 cm^{-1} en este mismo sistema, dicho incremento no se observa en el sistema indicado como LSE, por lo que se puede pensar en una influencia por parte del LPT al ser incorporado en los LSE, ya que previamente se definió (ver Figura 21) que las proteínas poseen una señal cerca de 1650 cm^{-1} (C=O) atribuida a un grupo amida I[67]. Los pequeños desplazamientos en el número de onda de las diferentes bandas en las materias primas con respecto a las bandas de LSE y LSE+LP se pueden atribuir a los cambios que se presentan al pasar de una estructura lineal a una vesicular.

En el caso de las NP (Figura 31), las bandas que caracterizan al LPT no son observadas en el sistema marcado como NP+LPT. Esta situación es muy similar al comportamiento que tiene este NS en los estudios calorimétricos (Figura 29), donde se puede pensar que efectivamente el LPT no está disperso molecularmente en la matriz polimérica, sino que se encuentra atrapado en la partícula por efecto de las diferencias en hidrofiliicidad, caso que no representa a los LSE debido a que estos le proveen un núcleo acuoso al LPT. Otro aspecto que sugiere la encapsulación del LPT en las NP es la presencia de una banda alrededor de 3286 cm^{-1} en el sistema indicado como NP+LPT, comúnmente denominado amida A, indicativo del grupo funcional -NH del LPT[67, 101] y el cual no se presenta de manera natural en el polímero.

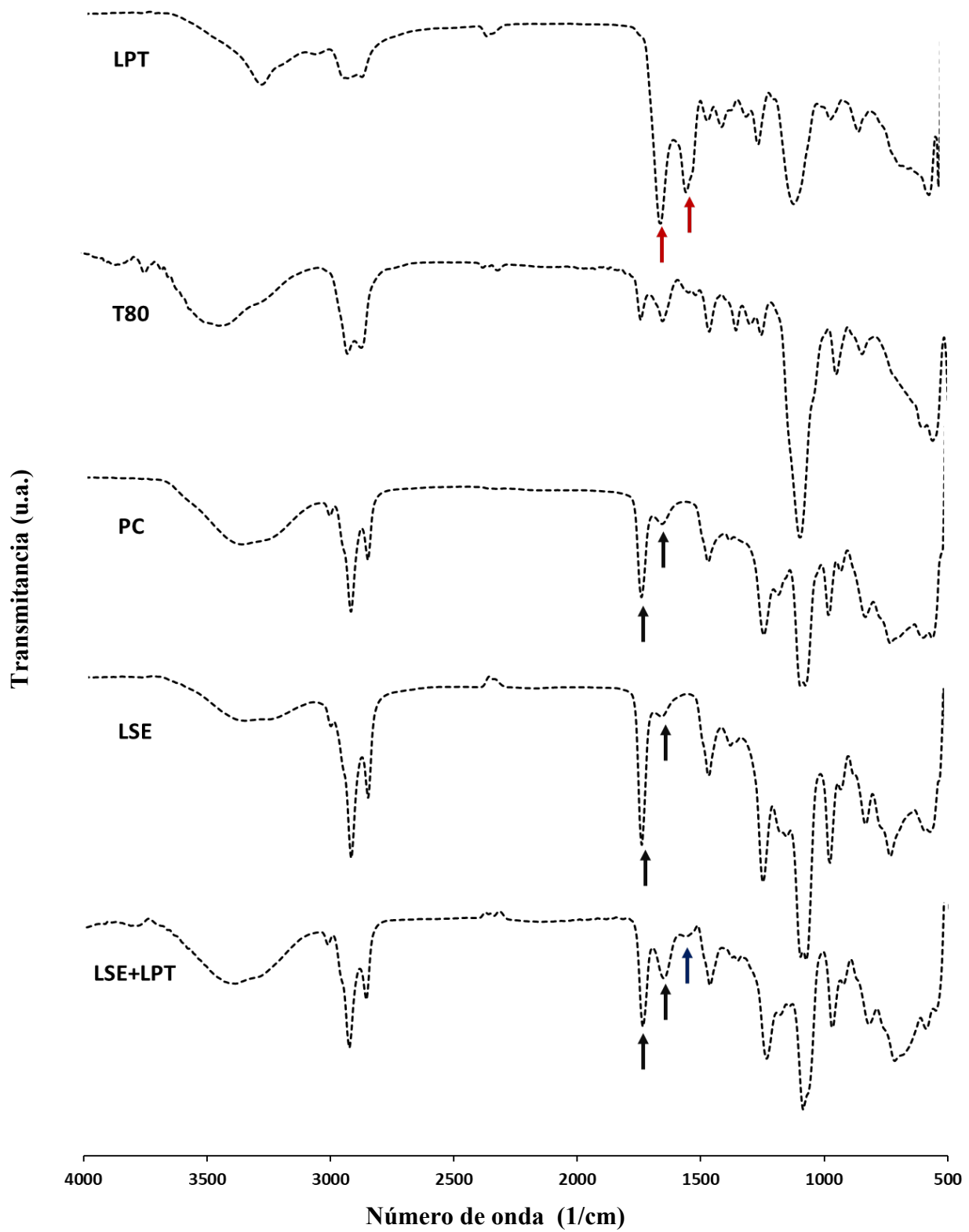


Figura 30. Espectros de infrarrojo para todas las materias primas y LSE desarrollados.
 PC: fosfatidilcolina, T80: Tween 80.

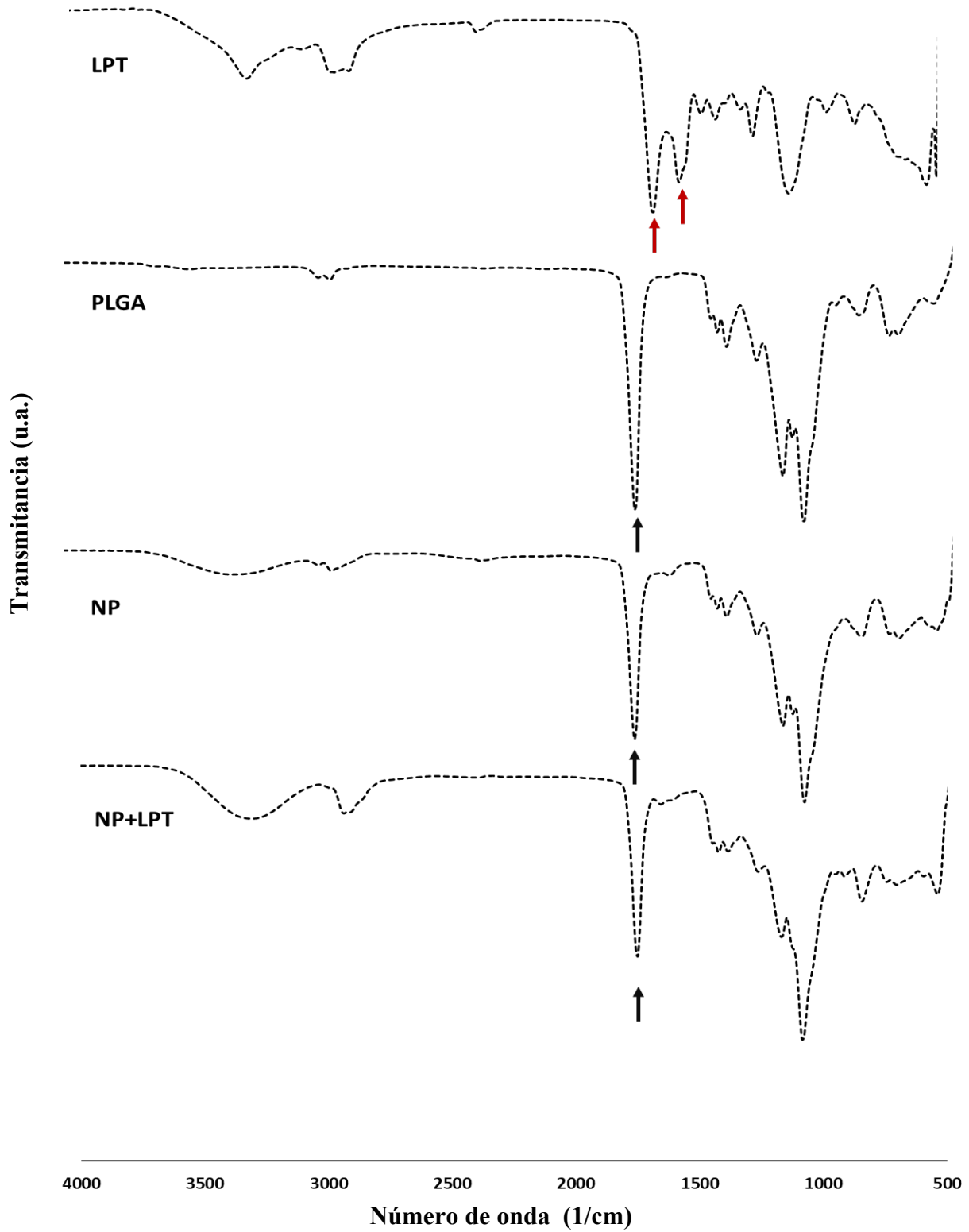


Figura 31. Espectros de infrarrojo para todas las materias primas y NP desarrolladas.

Finalmente, cabe mencionar que al igual que los LSE, las NP no mostraron cambios significativos, ni desaparición o aparición de alguna banda en los espectros de las NP con y sin LPT, lo que nos permite afirmar que la estructura base de las materia prima (PLGA) se conserva durante la preparación de estas, dicha situación la podemos notar en una de las señales características del PLGA a 1750 cm^{-1} representativa del grupo funcional carbonilo (C=O) en los ácidos que conforman el polímero, la cual se mantiene en los sistemas nanoparticulados (flechas negras).

5.2.7. Estudio por dicroísmo circular

Otra de las inquietudes que se tiene cuando se trabaja con moléculas como las proteínas, es evaluar su estabilidad fisicoquímica cuando éstas son incluidas en un sistema nanométrico como los LSE y las NP, lo que nos dará idea de que su estructura e indirectamente su actividad biológica, no han sufrido modificaciones por el proceso de fabricación y/o manipulación. En las Figuras 32 y 33 se muestran los espectros obtenidos por dicroísmo circular para los sistemas con y sin LPT y del LPT en solución. Como se puede apreciar en los espectros para LSE (Figura 32) tanto el espectro del LPT como el de los LSE que contienen LPT (LSE+LPT) tienen valores de elipticidad (θ) superiores a aquellos que presentan el *buffer* y los LSE sin LPT, lo que indica la presencia de estructuras secundarias en su estado nativo y funcional. Este espectro es representativo de la presencia de cadenas en conformación alfa hélice, resultado de uno de los estados electrónicos del grupo amida en el enlace peptídico, donde una de sus bandas característica aparece a una longitud de onda entre 215-230 nm con valores de θ negativos[68]. Así mismo, es de resaltar que el espectro LSE+LPT muestra una señal muy similar al LPT en solución, lo que apoya la idea de que el LPT, independientemente del estrés al que se puede ver sometido durante la preparación de los LSE, está encapsulado en un núcleo acuoso dentro de una vesícula lipídica, conservando su estructura secundaria, y como ya se mencionó, da una aproximación de que la actividad terapéutica se mantiene.

Si se compara el espectro de los LSE cargados, con el de las NP cargadas (Figura 33), se puede ver que este último no muestra un espectro como el primero, si no que más bien se parece al de las NP no cargadas. Con esto se puede decir que el LPT efectivamente se encuentra atrapado en la NP, tal y como se ha confirmado por espectroscopía de infrarrojo y DSC, y si consideramos que las NP no poseen un núcleo acuoso como los LSE, con ello afirmaríamos que el LPT no está disuelto, y entonces se puede justificar el hecho de que por la técnica de espectropolarimetría por dicroísmo circular no se logre su detección, dando valores cercanos a cero, esto basado en el hecho de que la técnica permite el estudio de proteínas en solución[68].

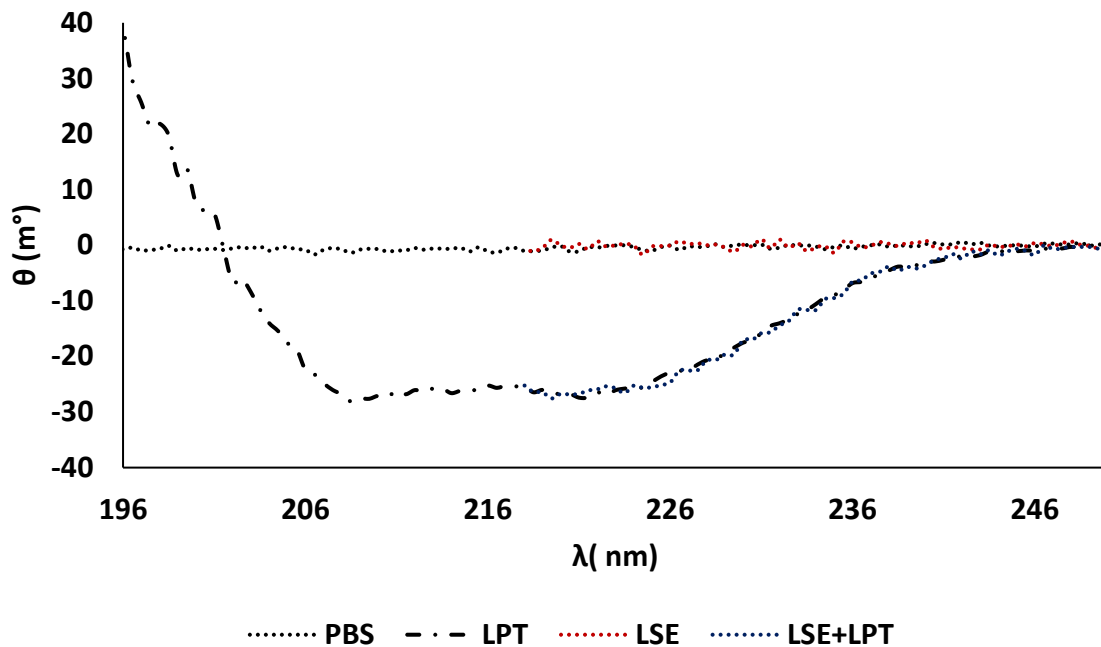


Figura 32. Espectros de dicroísmo circular para los LSE desarrollados. λ : longitud de onda, θ : elipticidad.

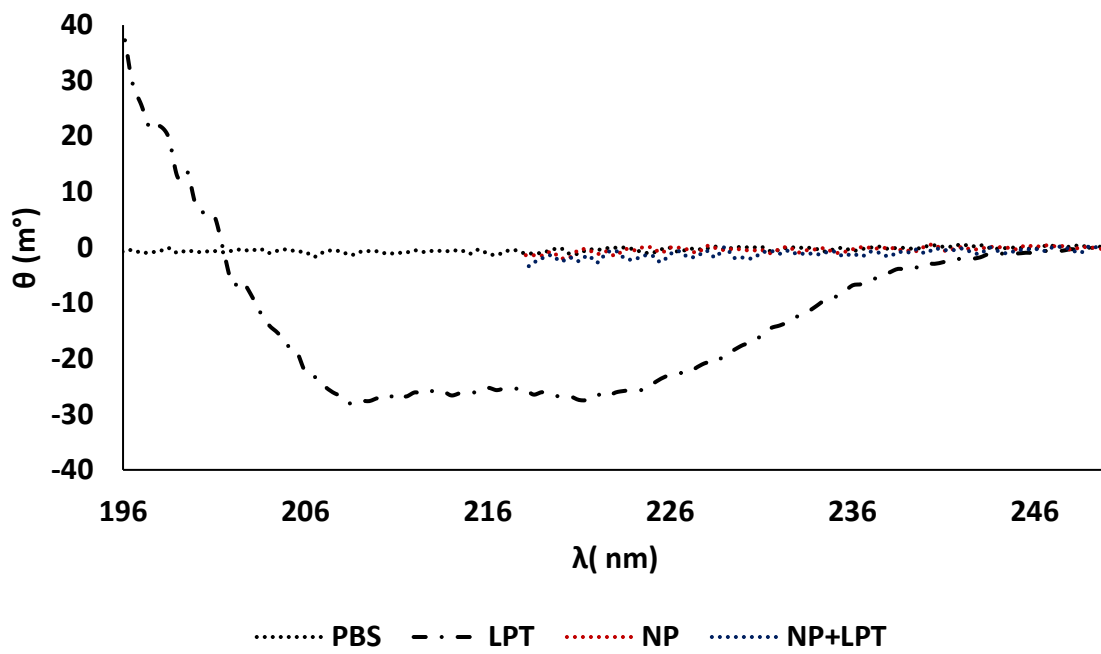


Figura 33. Espectros de dicroísmo circular para las NP desarrolladas. λ : longitud de onda, θ : elipticidad.

Un punto que resaltar del porqué los espectros de los NS no se muestran en todo el rango de valores, como ocurre con el del LPT en solución (gráfico en negro), se debe a la saturación del detector ocasionada por la presencia del NS, sin embargo, esto no genera complicaciones para poder evaluar y obtener información relevante al respecto.

Con estos resultados, con los espectros de IR, DSC y el cálculo de %EE se corrobora que efectivamente el LPT se encuentra incorporado en los NS.

5.2.8. Efecto de la temperatura sobre el tamaño del NS

Como se ha mencionado, el LPT es rico en FC y CK, estas últimas son proteínas que, como la mayoría de este tipo de biomoléculas, sufren cambios reversibles o irreversibles en su conformación cuando cierta temperatura crítica es alcanzada, lo que puede llevar a la pérdida de su actividad terapéutica[102]. En este sentido, su evaluación se vuelve relevante principalmente porque el LPT hará contacto en una zona donde la temperatura puede variar basado en las variables fisiopatológicas de los diferentes tipos de heridas y las zonas de aplicación. Además, es importante determinar las condiciones óptimas para su conservación, sobre todo

considerando las diferencias en la temperatura ambiente que impera en las distintas zonas del planeta.

En la Figura 34 se puede observar cómo conforme la temperatura aumenta, el LPT en solución cambia drásticamente su tamaño cuando se alcanzan temperaturas por arriba de los 40 °C y este incremento continúa hasta por arriba de los 60°C. Este es un fenómeno que presentan la mayoría de las proteínas, que conforme la temperatura aumenta, la estructura de la biomolécula se desdobra y con ello aumenta la posibilidad de interacciones hidrofóbicas con otras proteínas circunvecinas, lo que genera la formación de agregados de mayor tamaño[103]. Lo sorprendente es observar que en el caso de los LSE que contienen LPT (LSE+LPT, gráfico en azul) el tamaño no se ve alterado conforme la temperatura aumenta, lo que nos permite pensar que efectivamente la vesícula le da protección al LPT con respecto a los cambios de temperatura. Se presume que esto permitirá tener un sistema que será térmicamente estable, previniendo uno de los inconvenientes de las proteínas.

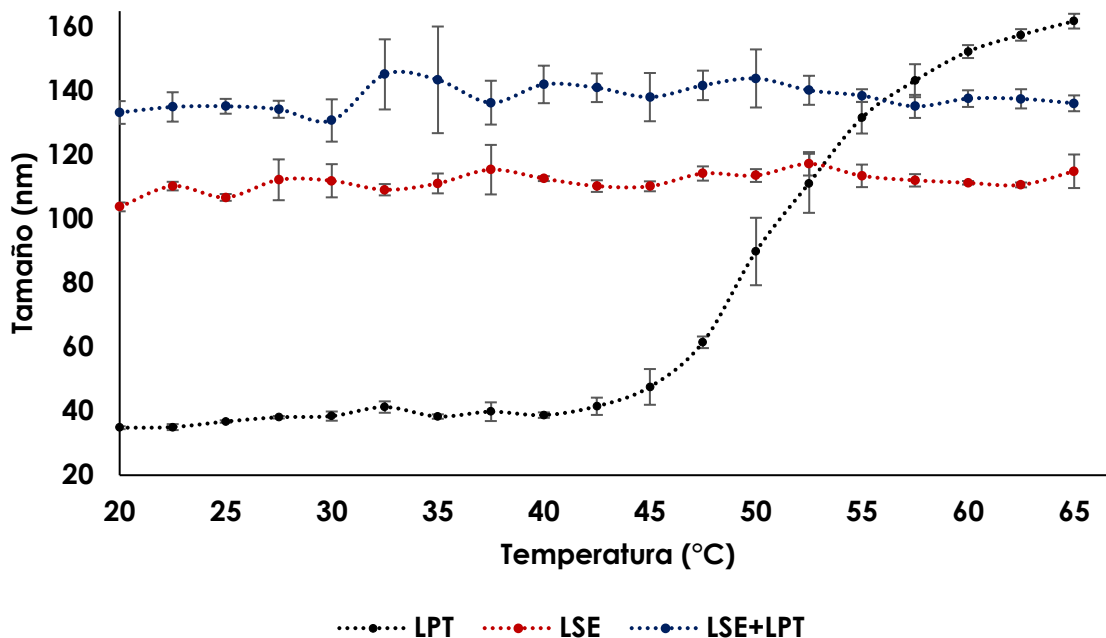


Figura 34. Efecto de la temperatura sobre el tamaño del LPT y los LSE.

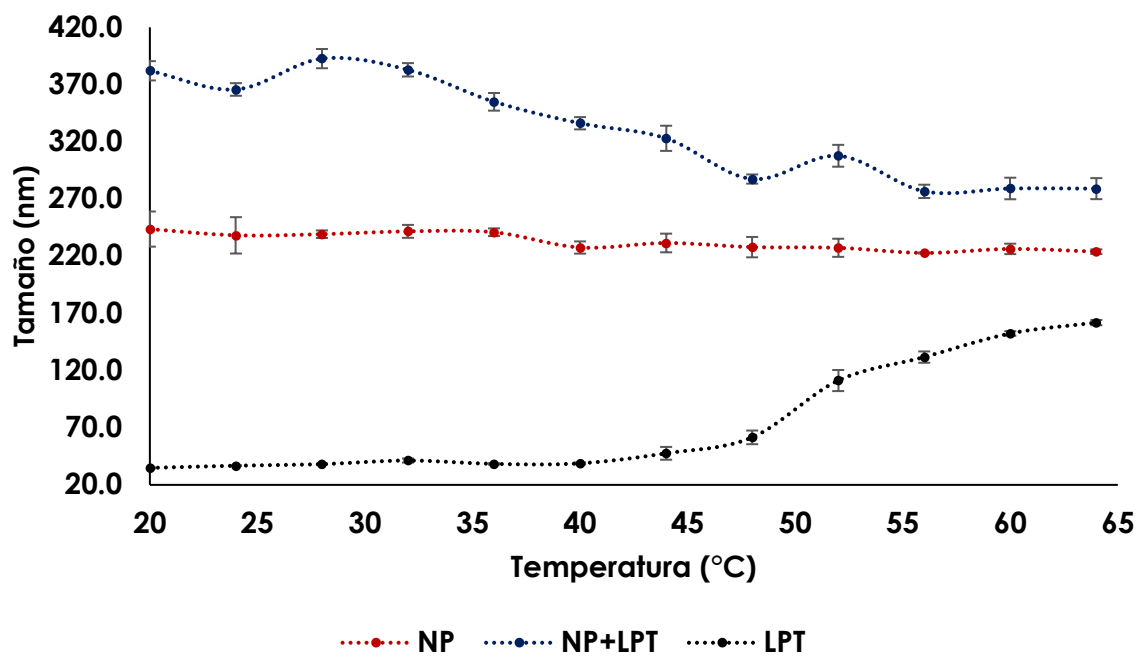


Figura 35. Efecto de la temperatura sobre el tamaño del LPT y las NP.

En el caso de las NP (Figura 35), algo similar se aprecia respecto a la estabilidad del sistema sin LPT (grafico en rojo) cuyo tamaño no se ve modificado conforme aumenta la temperatura. Lo importante a resaltar es que el sistema que contiene LPT (grafico en azul) comienza a disminuir su tamaño conforme la temperatura aumenta, esta disminución puede estar atribuida al hecho de que cierta cantidad de proteína que no se logró encapsular puede estar adsorbida en la superficie de la partícula, la cual conforme la temperatura incrementa ésta comienza a desorberse y pasa a solución, provocando que el tamaño de partícula disminuya. Sin embargo, cabe resaltar que el cambio significativo se da por arriba de los 40 °C, similar a la temperatura donde el tamaño del LPT en solución incrementa (gráfico en negro), además, este evento significativo se presenta por arriba de una temperatura no común en las heridas.

5.2.9. Efecto de plasma sanguíneo sobre el tamaño del NS

Como se ha mencionado uno de los aspectos a considerar cuando una nueva formulación es desarrollada, es evaluar los posibles efectos que se pueden presentar dependiendo del ambiente al que estará expuesto en la zona de aplicación. En el caso de una herida, uno de estos efectos es la

presencia de un líquido conocido como fluido de herida (FH), resultado del drenaje del plasma sanguíneo al sitio de herida [104].

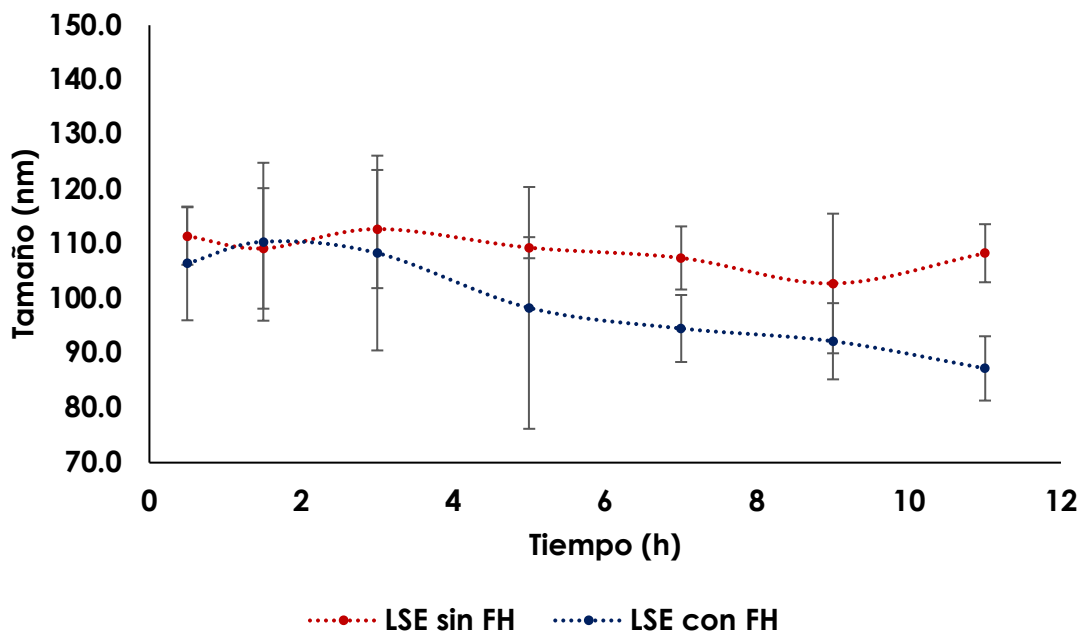


Figura 36. Efecto del plasma sanguíneo sobre el tamaño de los LSE.

Para este estudio se utilizó suero sanguíneo como simulador del FH[105]. En las Figuras 36 y 37 se muestran los cambios observado en el tamaño de NS con respecto al tiempo de exposición con el FH. En el caso de los LSE (Figura 36)

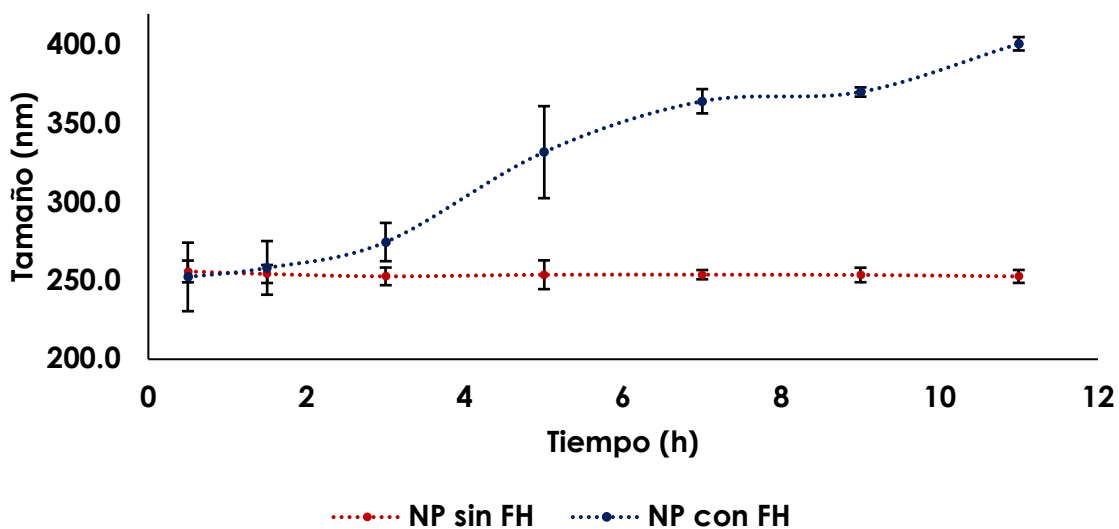


Figura 37. Efecto del plasma sanguíneo sobre el tamaño de las NP.

se observa que conforme aumenta el tiempo de exposición el tamaño del sistema no expuesto se mantiene constante a una temperatura de 33.5°C (temperatura promedio de una herida[106]), caso contrario con los LSE expuestos, donde se aprecia que hay una disminución del tamaño conforme el tiempo aumenta, esto se puede atribuir a la labilidad de este tipo de NS, que como se ha mencionado al estar en suspensión son más susceptibles a los factores externos, además podemos pensar que a la temperatura de trabajo algunas enzimas presentes en el FH se pueden activar causando alguna reacción catalítica sobre los LSE. En este caso se puede pensar en la ruptura de capas lamelares de los LSE, que por su efecto hidrofóbico se esperaría se vuelvan a formar. Este fenómeno pudiera generar una liberación más rápida para este sistema.

Para las NP (Figura 37) de igual manera las que no están en contacto con el FH no cambian significativamente conforme aumenta el tiempo a 33.5 °C, pero si se puede marcar que aquellas que están en contacto con el FH y al contrario de los LSE, aumentan su tamaño. Este fenómeno se puede atribuir a las propiedades de adsorción de las NP, que como se ha publicado, pueden formar interacciones con proteínas sanguíneas dando como resultado estructuras llamadas NP corona [107]. Dicha situación se justifica al pensar que el FH utilizado contiene gran cantidad de proteínas, principalmente albúmina, las cuales pudieran estarse adsorbiendo sobre la NP de PLGA, lo que incrementa el tamaño, y si el tiempo de exposición aumenta, mayor cantidad de proteínas podrán adsorberse.

Se puede pensar que la disminución del tamaño de los LSE es menos marcada que el incremento de las NP, esto posiblemente debido al efecto estérico que genera el T80, que como se ha reportado en el caso de los liposomas puede haber adsorción de proteínas sanguíneas; sin embargo, la presencia de liposomas, por ejemplo, pegilados, no permiten que este

proceso ocurra [108], situación que se puede pensar sucede en los LSE, por lo que no se observa un incremento en el TN.

El volumen de FH utilizado para el estudio se eligió basado en una relación aproximada de la cantidad de NS que se colocarían en una herida de tamaño promedio con respecto a la cantidad promedio de FH que se produce al día [109], aunque cabe mencionar que debido a la gran variabilidad entre individuos con heridas crónicas y de la propia fisiopatología de la herida, el volumen de FH es muy variable [110].

5.2.10. Cinética de liberación

Las Figuras 38 y 39 muestran los perfiles de liberación del LPT a partir de los LSE y de las NP en suspensión acuosa, respectivamente, de igual manera se muestra el perfil de salida del LPT en solución a través de la bolsa de diálisis bajo las mismas condiciones a las que se sometió la suspensión de los nanosistemas (NS).

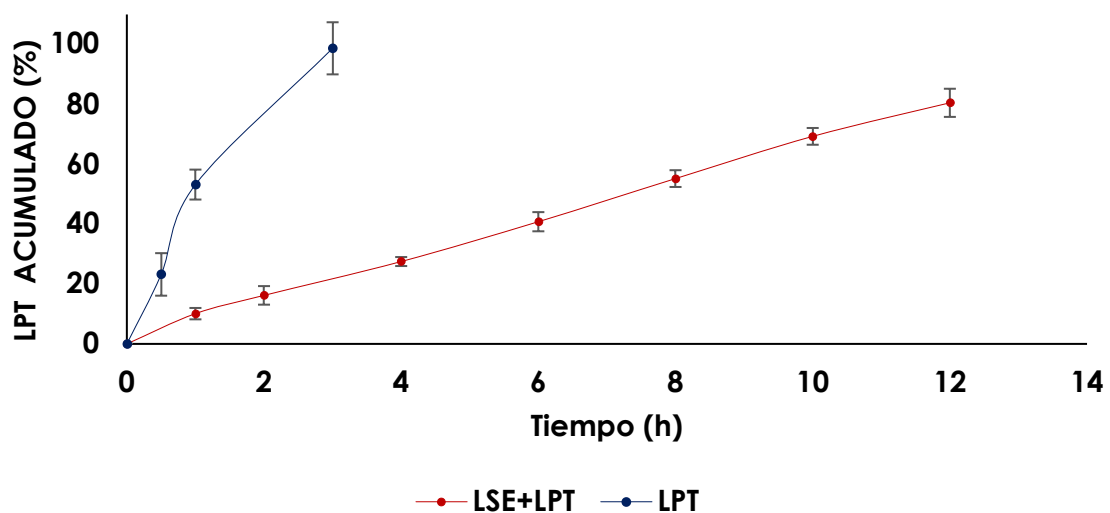


Figura 38. Perfil de liberación in vitro de los LSE.

Como se puede observar al LPT en solución le toma aproximadamente 3 h en salir por completo del sistema de diálisis, mientras que para los NS cargados esto se prolonga.

Para el caso de los LSE desde la primera hora de muestreo se cuantifica LPT fuera del nanosistema, con un 80% liberado a las 12 h de estudio.

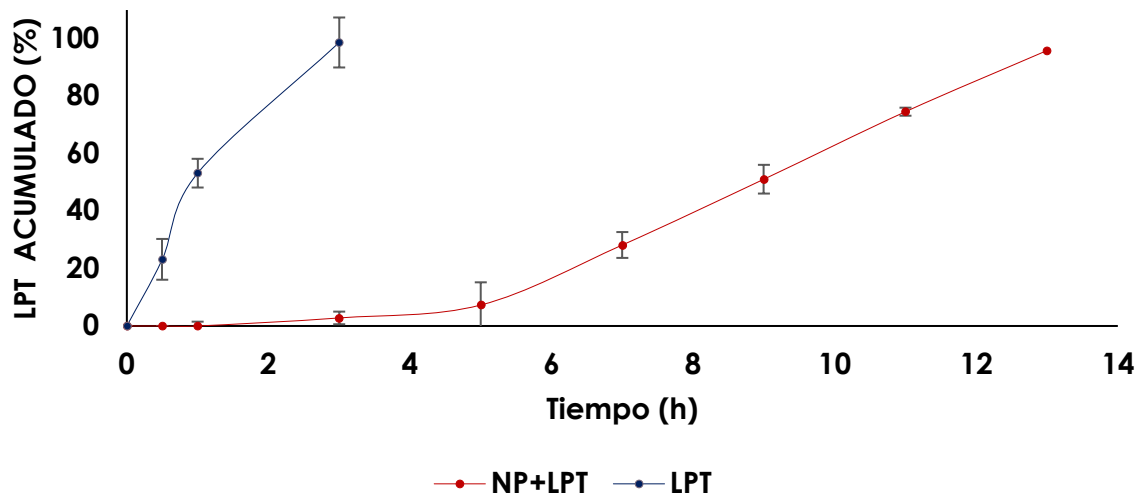


Figura 39. Perfil de liberación in vitro de las NP.

Para las NP, se logra observar un tiempo de retraso en la liberación (*lag time*) del LPT de aproximadamente 3 h, a partir de este tiempo la liberación se mantiene constante hasta las 13 h de estudio donde aproximadamente el 95% del LPT ya había sido liberado. El *lag time* observado puede estar relacionado a la dificultad que tiene una estructura molecular grande e hidrofílica como las proteínas, para atravesar una estructura polimérica hidrofóbica como la del PLGA. En el caso de los LSE, la liberación fue más fácil considerando que son sistemas flexibles, con dominios hidrofílicos que pueden ayudar a la migración del LPT a través de su estructura.

En ambos casos la liberación ocurre durante un lapso de tiempo que para los fines de aplicación buscados, es adecuado, considerando que la zona de herida requiere ser lavada por buenas prácticas de higiene, y por otro lado, que la secreción de fluidos en la herida puede contribuir a eliminar la formulación.

Al aplicar distintos modelos, se encontró que la liberación a partir de los LSE sigue una cinética de orden cero ($r^2=0.9986$), es decir se puede pensar que el LPT es liberado por difusión e independiente de la concentración; mientras que en el caso de las NP la liberación se ajusta al modelo de Korsmeyer-

Peppas ($r^2=0.9820$, $n=2.7$) lo que indica un mecanismo de liberación gobernado por difusión y erosión del sistema.

5.2.11. Flexibilidad (solo para LSE)

Como se ha mencionado, una de las ventajas de los LSE es su capacidad de deformarse, lo que les da la capacidad de penetrar a zonas de la piel en donde las vesículas convencionales por su rigidez, y el LPT por su tamaño molecular e hidrofiliidad, no pueden llegar. Además, los LSE se mueven bajo un gradiente osmótico [111, 112], por lo que el estado comúnmente sobrehidratado de una herida mejora su penetración y que se mantengan en el área afectada. Es por ello, que la evaluación de su flexibilidad adquiere gran importancia. En la Tabla 14 se muestran los valores del tamaño de vesícula con y sin LPT antes y después de hacerlos pasar tres veces por membranas con tamaño de poro de 50 nm. Se aprecia que los cambios en el tamaño de vesícula no son significativos, por lo que se corrobora que la presencia de Tween® 80 ejerce su efecto como modificador de superficie dando la característica de ultraflexibilidad a estas vesículas.

Tabla 14. Estudio de flexibilidad. Se muestra el tamaño de vesícula e IPD antes y después de pasar la suspensión de LSE por un poro de 50 nm, con y sin LPT.

	SIN LPT		CON LPT	
	ANTES	DESPUÉS	ANTES	DESPUÉS
Tamaño de vesícula (nm)	105.5 ± 6.2	107.9 ± 2.6	134.6 ± 11.0	130.8 ± 0.7
IPD	0.260 ± 0.014	0.271 ± 0.008	0.273 ± 0.002	0.262 ± 0.037

Intervalos de confianza con $\alpha = 0.05$, $n = 3$.

5.2.12. Estudios *in vitro*

Con la finalidad de evaluar que el LPT mantiene su actividad biológica al ser incorporado en los LSE y en las NP, y así mismo corroborar que las variables del proceso de fabricación de cada uno de estos nanosistemas no afectan su desempeño, se llevó a cabo la evaluación sobre un cultivo celular de fibroblastos, considerando que el LPT ejerce su principal actividad durante el saneamiento de heridas precisamente sobre estas células.

Las Figuras 40 y 41 muestran los resultados obtenidos por microscopía, del crecimiento de los fibroblastos y su migración al espacio vacío (espacio donde se practicó la ruptura del cultivo), después del tratamiento con el LPT en solución, así como incluido en LSE y en NP. Como se puede apreciar, después de 24 h de contacto, el espacio de la ruptura se cubrió casi completamente, tanto con la solución de LPT, como con el LPT incluido en los nanosistemas, en comparación con el control (solución amortiguadora de fosfatos). No obstante, como se observa en las micrografías, la zona de saturación muestra una ligera diferencia entre el LPT en solución e incluido en los nanosistemas, lo que puede atribuirse a la liberación controlada del LPT que ofrecen ambos nanosistemas. Además, esto corrobora que el LPT mantiene su actividad biológica incluso si está incorporado en un sistema nanométrico.

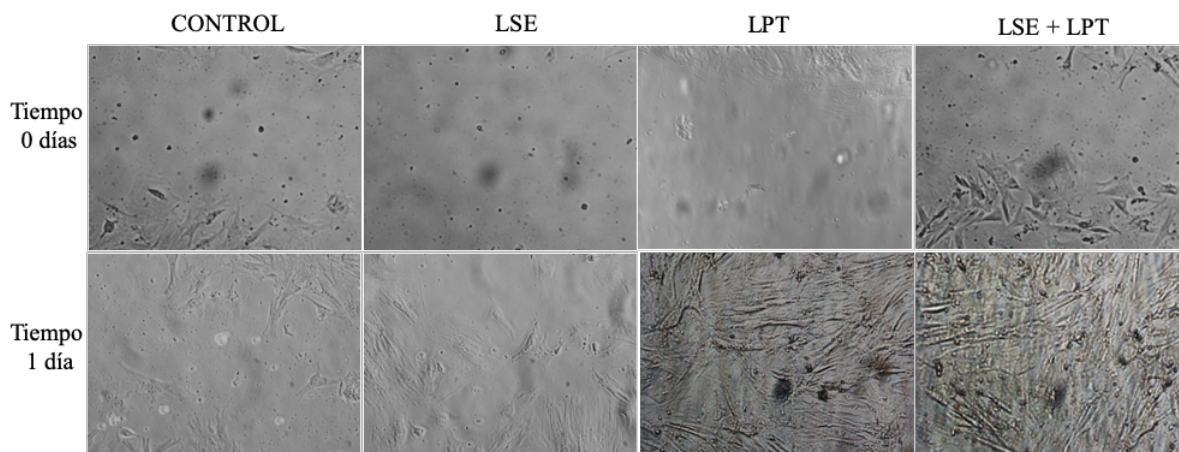


Figura 40. Comparación del efecto de LPT en solución (LPT), incluido en liposomas (LSE + LPT) y de una formulación placebo (LSE), sobre un cultivo celular de fibroblastos. Se muestran las imágenes antes y un día (24 h) después de estar en contacto con las diferentes formulaciones.

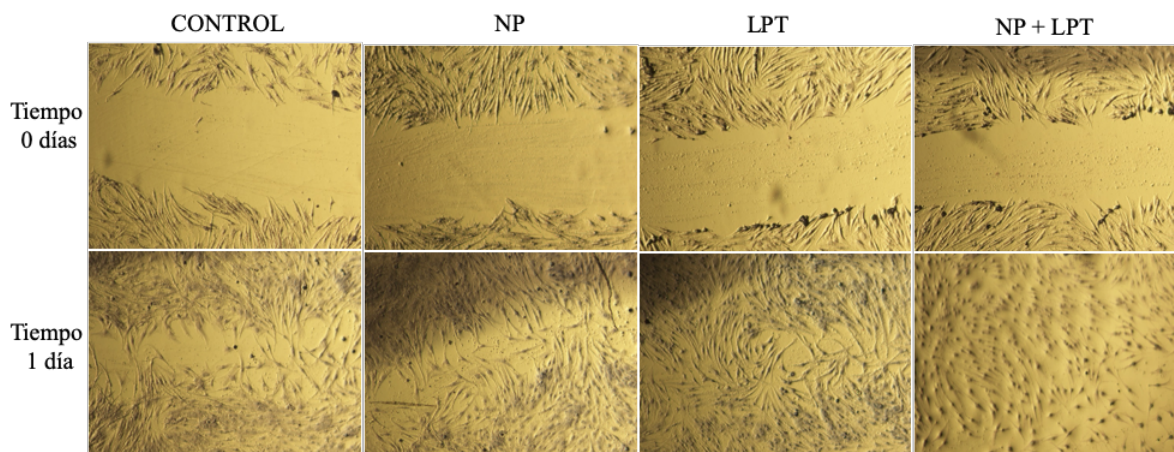


Figura 41. Comparación del efecto de LPT en solución (LPT), incluido en nanopartículas (NP + LPT) y de una formulación placebo (NP), sobre un cultivo celular de fibroblastos. Se muestran las imágenes antes y un día (24 h) después de estar en contacto con las diferentes formulaciones.

5.3. Matriz polimérica termosensible

Se ha indicado previamente y con la evidencia experimental del presente trabajo, que los NS sufren de ligeras fugas de fármaco y cambios en el tamaño al estar en suspensión (Tablas 11 y 12) y más aún si se encuentran a temperatura ambiente[90]. Así mismo, debido a la baja viscosidad de la suspensión de los NS, su aplicación y residencia en el sitio blanco, se dificulta, por lo que la incorporación de éstas a una MPT mejorará estos dos problemas. Además, la propiedad del Pluronic, como un sistema termosensible, permite que la matriz se encuentre en forma fluida a temperatura ambiente (aprox. 25 °C), para poder ser administrada en forma de aerosol, y que posteriormente por efecto de la temperatura de la herida (33.5 °C aproximadamente) ésta gelifique, permitiendo que la formulación se retenga en la zona de la herida. Una ventaja adicional de este sistema y la forma de administrarlo es que se disminuye considerablemente el contacto con otras partes del cuerpo, como las manos, lo que se espera reduzca la posibilidad de contaminar la herida al ser aplicado, situación que puede presentarse con los tratamientos tradicionales. Con esto en mente se desarrolló una MPT y se muestran a continuación los resultados obtenidos.

5.3.1. Viscosidad

Un aspecto a considerar en la caracterización de la MPT es su comportamiento reológico, porque como ya se ha mencionado al ser un sistema que presenta gelación térmica reversa, su grado de fluidez se va perdiendo y con ello se observa un aumento en la viscosidad conforme se aumenta la temperatura. La Figura 42 muestra los valores de viscosidad con respecto a la temperatura tanto para la MPT base (sin NS), como para las MPT cargadas con los NS, con y sin LPT. Como se puede apreciar para los 5 casos (base, NP, NP+LPT, LSE y LSE+LPT) la viscosidad incrementa conforme la temperatura se eleva, teniendo su valor más alto de viscosidad por arriba de los 32°C (indicado con una flecha roja), temperatura ideal cuando hablamos de una herida, ya que se ha mencionado constantemente que la temperatura promedio de una herida ronda alrededor de los 33.5°C, por lo que se apoya la idea que al momento de su administración, la MPT se encontrará completamente gelificada, permitiendo su residencia en el sitio por el periodo de liberación del LPT. A pesar de que la viscosidad comienza a disminuir después de los 36 a 37 °C, esta disminución no es significativa de manera que pudiera generar que la MPT se derramara fuera del sitio de herida. Así mismo, la temperatura a la cual ocurre este fenómeno es a una temperatura no común en heridas de tipo crónico. La disminución de la viscosidad a temperaturas por arriba de 36 °C puede ser atribuida a un relajamiento de las cadenas poliméricas por la agitación térmica, lo que incrementa su movilidad y con ello el aumento en la fluidez.

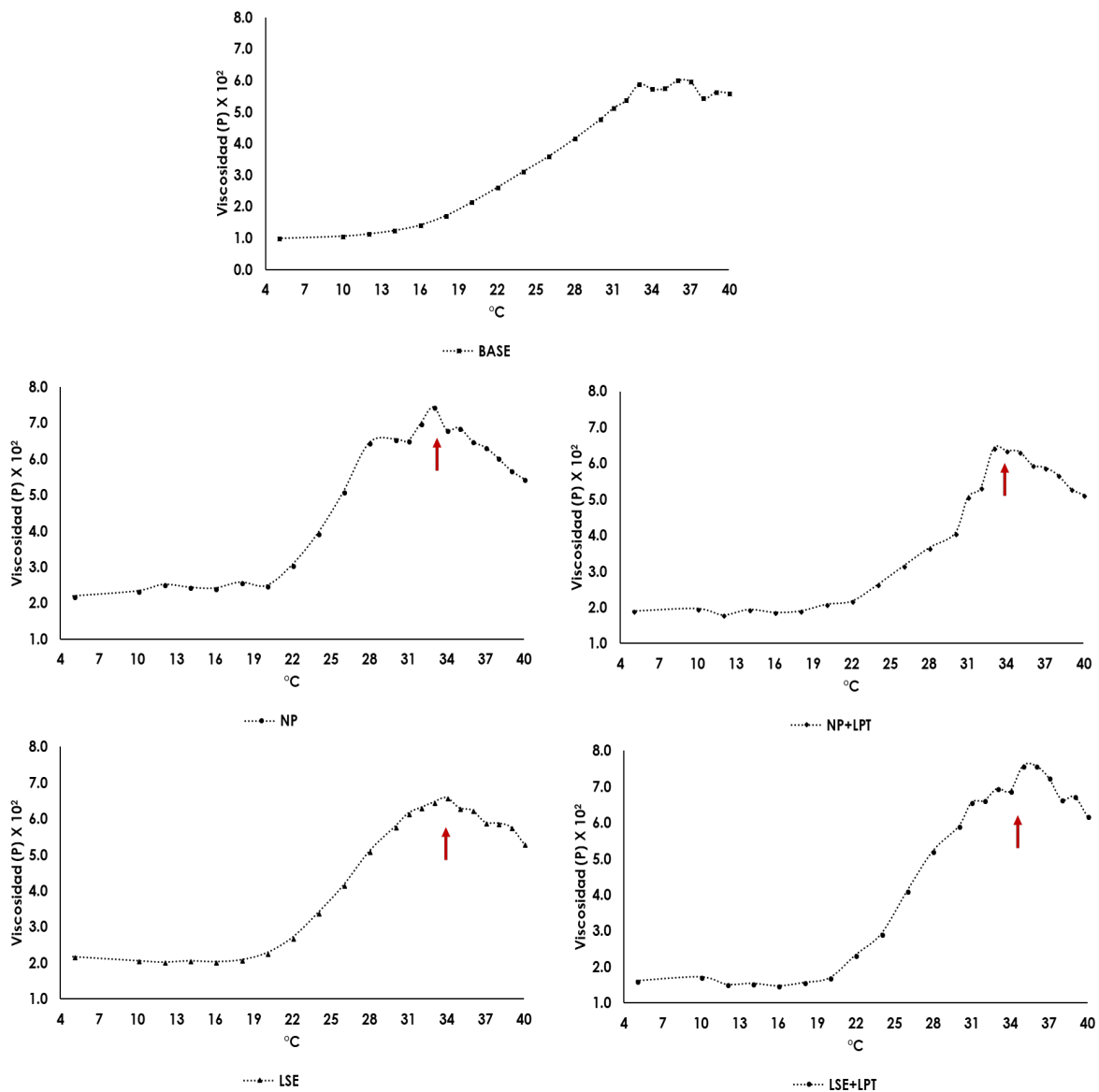


Figura 42. Perfiles de viscosidad para las formulaciones de MPT en función de la temperatura. Base (MPT sin NS), formulaciones placebo (NP y LSE en MPT, sin LPT), formulaciones con LPT incluido en los NS (NP + LPT y LSE + LPT). P: Poise.

5.3.2. pH

El pH de la piel intacta se encuentra entre 4.0 y 6.0. Este pH ácido es atribuido principalmente a la presencia de un “manto ácido” que tiene una contribución importante en las propiedades de barrera de la piel[27]. En el caso de las heridas el rol del pH se ha probado ser de fundamental importancia durante el saneamiento de heridas crónicas, su valor se mueve entre 7.15-8.9[29]. Con acidificación química prolongada del lecho de herida se ha visto que hay un incremento en la tasa de saneamiento de úlceras

venosas de extremidades inferiores. La principal explicación para este mecanismo está relacionado al incremento en la disponibilidad de oxígeno, y a la reducción la histotoxicidad de productos finales de bacterias, entre otros. También se ha documentado que el FH contiene un elevado nivel de proteasas cuya actividad es extremadamente sensible al pH. El pico de actividad de las proteasas se encuentra entre 7 a 8 y disminuye rápidamente en presencia de ambientes ácidos y se ve potenciada a pH por arriba de 7[113]. Además, cuando una herida se mantiene en condiciones ácidas, los fibroblastos proliferan más activamente[114].

Tabla 15. Valores de pH de las diferentes MPT preparadas.

	pH	
	Sin LPT	Con LPT
MPT + LSE	6.44 ± 0.08	6.62 ± 0.03
MPT +NP	6.58 ± 0.06	6.59 ± 0.14

Intervalos de confianza con $\alpha = 0.05$, n =3.

En la Tabla 15 se muestran los valores de pH obtenidos para las MPT preparadas, como se observa los valores de pH están por debajo de 7 lo que permite relacionar el hecho de que las MPT no poseerán un pH cuyo valor pueda perjudicar el saneamiento de las heridas, considerando las situaciones que a valores de pH por arriba de 7 se pueden presentar. Algo importante a resaltar y pensando en la aplicación de la MPT en el sitio de herida, es que, al tener valores de pH ligeramente ácidos, y tal y como se mencionó, la actividad de las proteasas se verá disminuida, lo que permitirá a los FC y CK, liberados a partir de los NS, realizar su actividad terapéutica con una probabilidad baja de ser degradados por parte de estas enzimas y/o una velocidad de degradación mucho más lenta, tal y como se demostró por Greener B. y cols., quienes reportan que la caída del pH alrededor de 6.0

disminuye en un 40-90% la actividad de la proteasas[113]. El valor de pH de las MPT base fue de 6.52 ± 0.01 , el cual no difiere significativamente de aquellos obtenidos para las MPT cargadas con los NS.

5.3.3. Tiempo de no fluidez

Posteriormente se determinó el tiempo de gelificación de la MPT una vez en contacto con la herida. Como se observa en la Figura 43 el tiempo de transición sol-gel se presenta después de los 5 minutos para las MPT con ambos NS, aunque desde los 2 minutos se aprecia un cambio en la fluidez. Estos resultados fueron para un volumen de 500 μ l de MPT en todos los casos, por lo que, si a este volumen le toma poco más de 5 minutos gelificar, se esperaría que para las capas delgadas que serán depositadas en una herida, el tiempo de no fluidez será mucho menor. Con esto se puede pensar que la MPT tiene propiedades tecnológicas adecuadas para poder ser administrada en una herida.

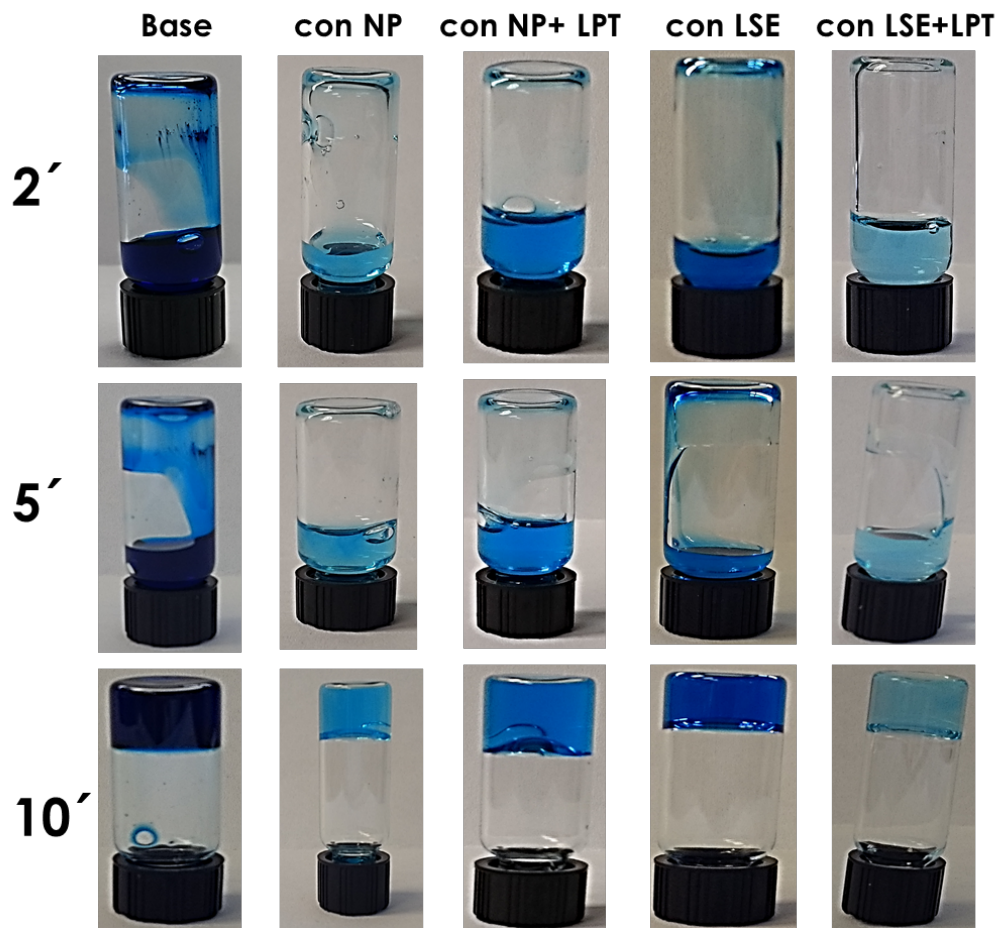


Figura 43. Tiempo de no fluidez de la MPT cargada con los diferentes NS a 33.5°C.

5.3.4. Temperatura de transición sol-gel

La temperatura de transición sol-gel (Tabla 16) permite evaluar si la MPT generará un sistema no fluido a la temperatura de la zona de aplicación, en este caso, a la de una herida. Esto corrobora los resultados de la prueba de no fluidez, confirmando que la MPT podrá ser aplicada sin generar problemas de escurrimiento, depósitos de material en ciertas zonas, etc. En este caso la temperatura de transición sol-gel está por arriba de 25°C para todos los casos. La temperatura representa el punto donde un agitador magnético se detiene por completo debido al aumento de la viscosidad, hasta el punto donde la MPT no fluye más. El valor de temperatura de transición sol-gel para la MPT base fue de 28.2 ± 0.14

Tabla 16. Temperatura de transición sol-gel de las diferentes MPT preparadas.

	Temperatura SOL-GEL (°C)	
	Sin LPT	Con LPT
MPT + LSE	26.4 ± 2.88	26.6 ± 1.79
MPT +NP	26.8 ± 1.46	26.9 ± 0.87

Intervalos de confianza con $\alpha = 0.05$, $n = 3$.

Como se puede observar no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las diferentes MPT preparadas, por lo que se puede pensar que el hecho de que una MPT contenga un NS polimérico o un NS lipídico no influye sobre la transición de un estado fluido a un estado no fluido (sol \rightarrow gel) de la matriz. Lo que si se notó es una ligera diferencia entre la MPT con o sin NS. Esto se puede relacionar al hecho de que la presencia de una partícula, material o compuesto dentro de la red polimérica tiende a modificar ciertos parámetros termodinámicos, como por ejemplo, la temperatura de micelización de la MPT a base de Pluronic® F127. Esta modificación ocasiona generalmente una disminución del parámetro [115], tal y como se observa en los resultados.

5.3.5. Estudio por DSC

Los gráficos de DSC (Figuras 44 y 45) representan los termogramas de la MPT, permitiendo identificar el punto donde las MPT sufren un cambio de un estado de cadenas poliméricas “libres” a un estado micelar, entendiéndose por micelar el punto donde las cadenas de polímero se agregan para formar una estructura esférica llamada micela que provoca que la MPT presente una estructura más rígida[116]. En los gráficos se observa una señal ancha, indicada con un flecha negra en ambas figuras, que representa el proceso de micelización de las MPT, que para el caso de la MPT base, el inicio de la micelización comienza aproximadamente a los 10 °C, en los sistemas que ya contienen NS, este punto se recorre a valores por debajo de los 10 °C. Se ha reportado que la presencia de una estructura como las NP o LSE dentro de una MPT modifica su punto de micelización a un valor menor que el valor basal [115]. La señal que aparece a los 55 °C aproximadamente, para todos los sistemas, representa un evento térmico característico del polímero probablemente una fusión (flecha roja).

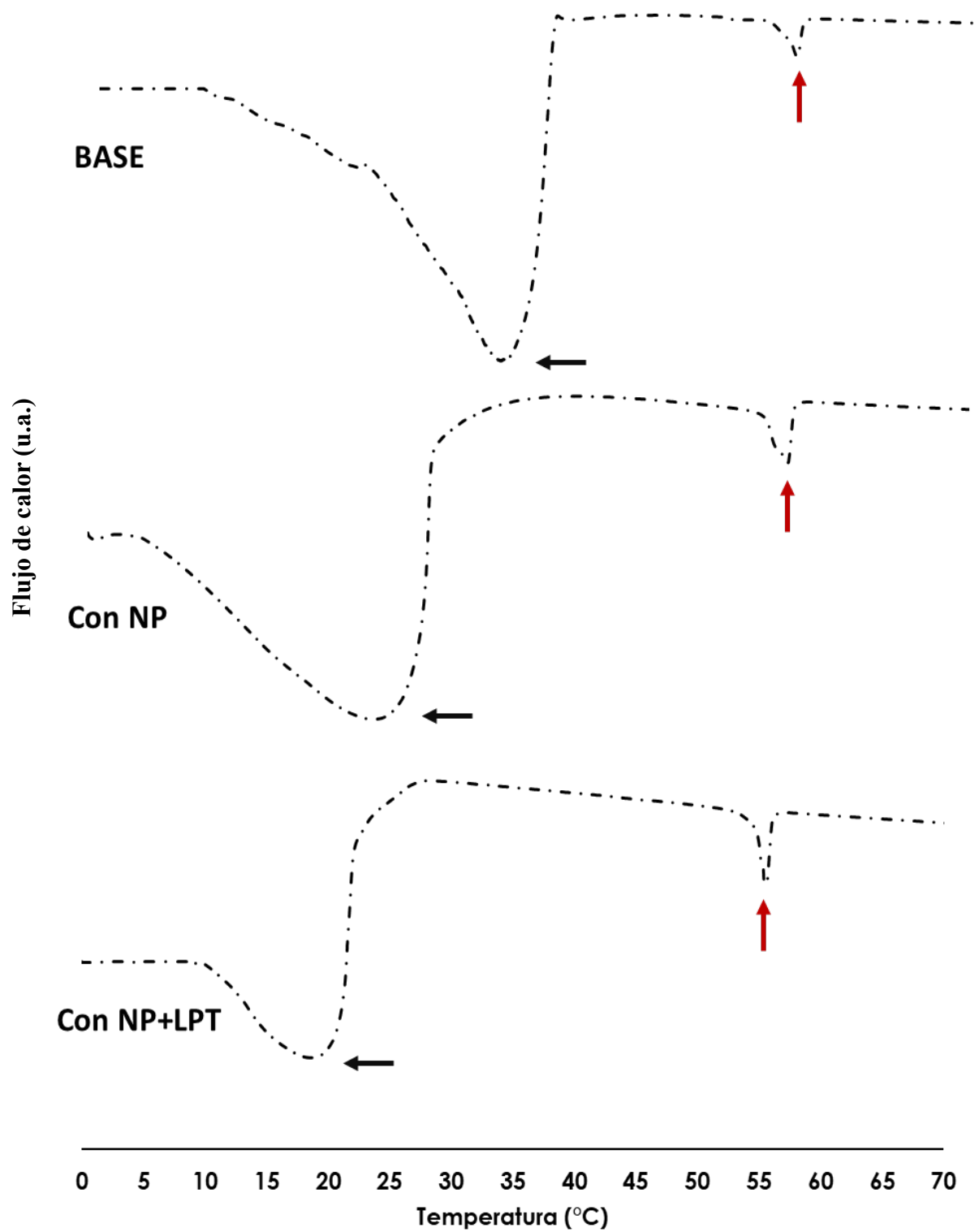


Figura 44. Termogramas de las MPT cargadas con NP.

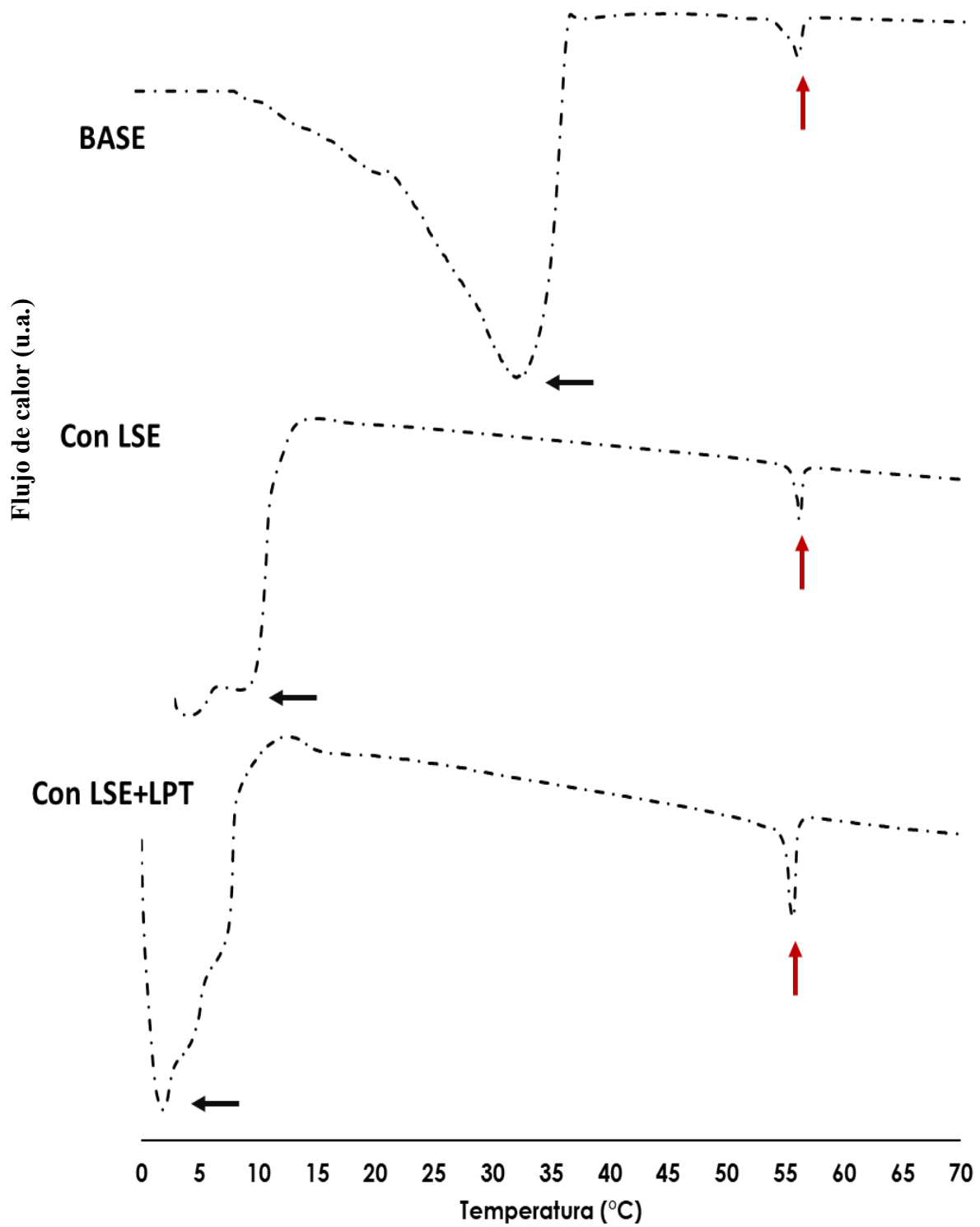


Figura 45. Termogramas de las MPT cargadas con LSE.

5.3.6. Estudio por IR

Por medio de espectroscopía de IR se corroboró que la MPT mantiene la estructura del polímero utilizado (Pluronic®-F127), es decir, que no presenta cambios significativos en su cadena polimérica al estar en forma de matriz al analizar una de sus bandas más representativa (Figuras 46 y 47), aproximadamente a 1095 cm^{-1} (flecha roja) indicativa del enlace C-O. En todos los casos analizados (MPT base y MPT cargadas con NS), las demás bandas del polímero se ven opacadas por la presencia del agua, ya que como se recordará las MPT son sistemas hidratados, por lo que la cantidad de agua es más alta comparada con la cantidad de polímero, lo cual se demuestra por la disminución de la longitud de la banda a 1095 cm^{-1} comparada con el polímero no hidratado. Aunque a aproximadamente 2887 cm^{-1} se logra ver una pequeña deformación en los espectros de los diferentes sistemas, indicando la influencia de esa señal presente en el polímero, las flechas negras sólo indican una de las bandas características del espectro de agua para indicar un sistema hidratado.

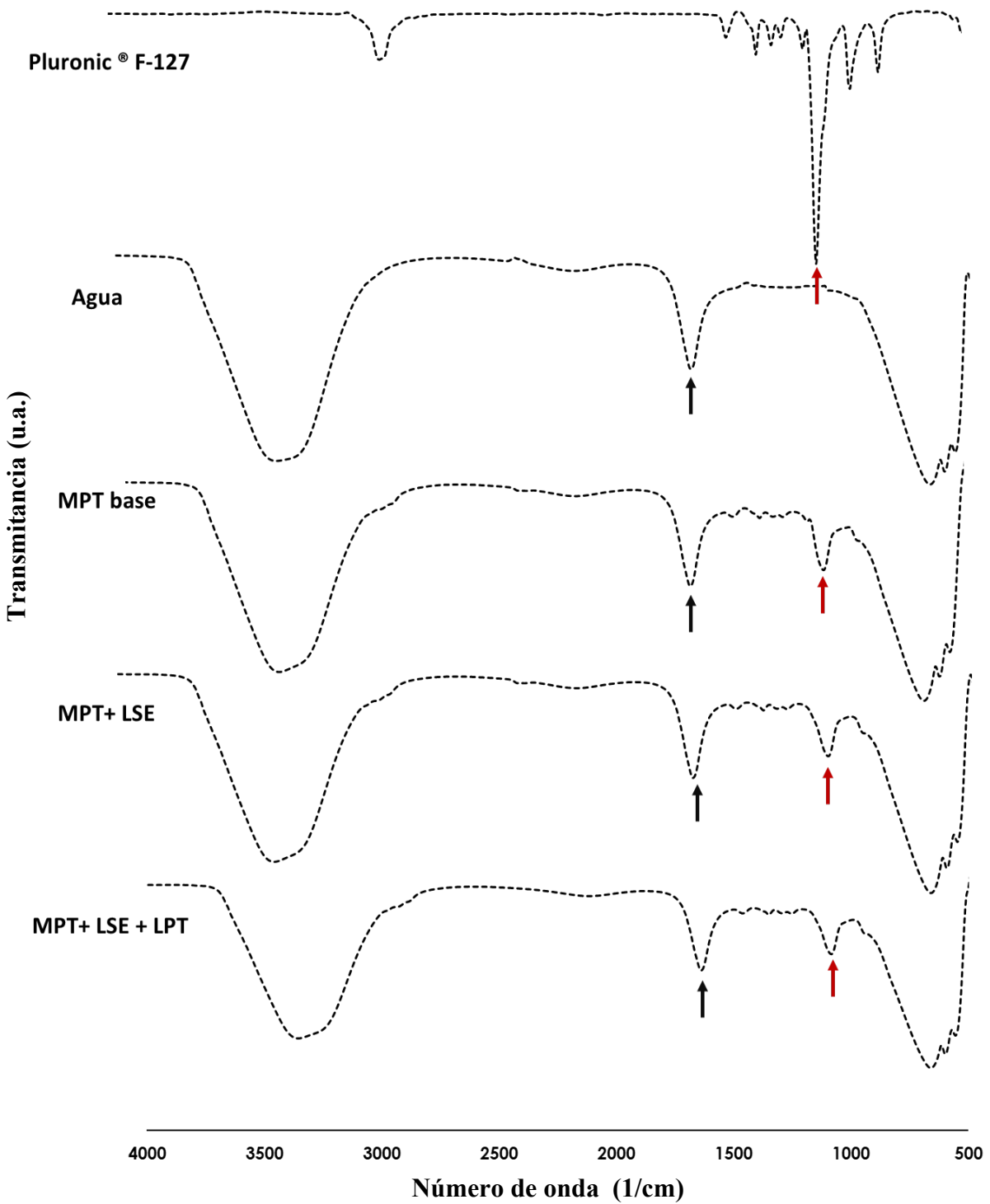


Figura 46. Espectros de infrarrojo para todas las materias primas y las MPT cargadas con LSE desarrolladas.

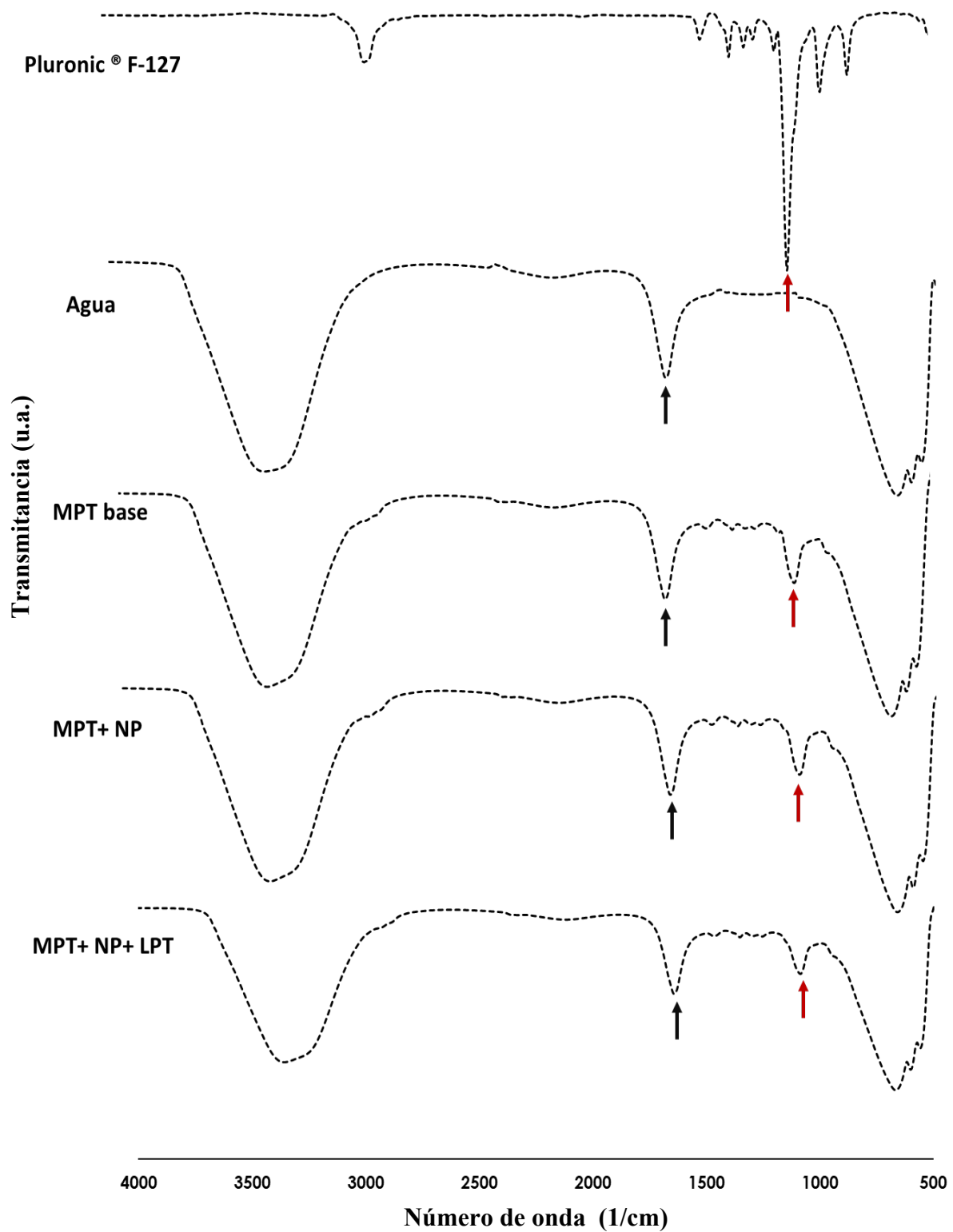


Figura 47. Espectros de infrarrojo para todas las materias primas y las MPT cargadas con LSE desarrolladas.

5.3.7. Estudio por DC

Así como se demostró por dicroísmo circular que el LPT mantiene su estructura dentro de los NS, de igual manera se evaluó este efecto en la MPT, considerando que el LPT estará en contacto con ella una vez que es liberado del NS a la MPT para posteriormente difundir a la herida. La Figura 48 muestra los espectros de la MPT con y sin LPT comparada con el del LPT en solución, para los cuales la misma situación positiva fue observada, notando solo una pequeña separación de alrededor del 7.5% de los espectros por un posible efecto de la concentración del LPT o algún cambio estructural en el LPT. A pesar de esto, la estructura sigue manteniéndose y conservando su similitud con respecto al LPT en solución.

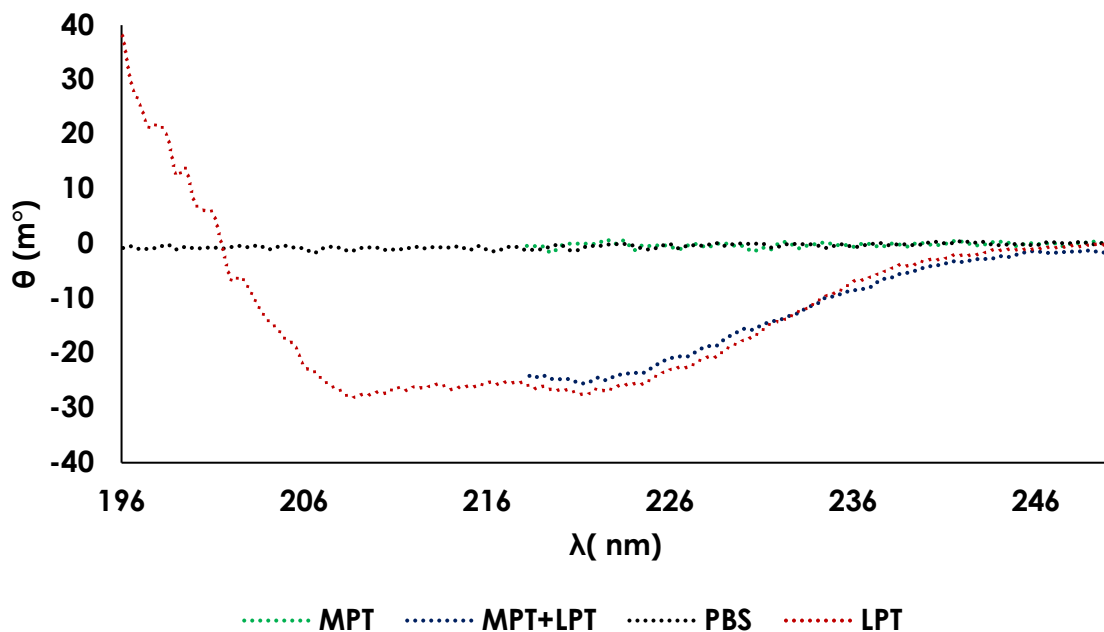


Figura 48. Espectros obtenidos por dicroísmo circular del LPT en solución y la MPT con LPT (MPT+LPT) y sin LPT (MPT).

Al igual que los espectros de los NS, los espectros de las MPT no alcanzan valores similares a los del LPT en solución (gráfico en rojo), esto se debe a la saturación del detector ocasionada por la presencia de la estructura y concentración del polímero usado en la fabricación de la MPT, sin embargo, esto no genera complicaciones para poder evaluar y sacar información relevante al respecto.

5.3.8. Desnaturalización del LPT

De igual manera para corroborar que el LPT en solución mantiene su comportamiento de desdoblamiento por efecto de la temperatura cuando ha salido del NS a la MPT y con ello apoyar la idea que cuando el LPT esté en contacto con la herida la proteína estará en su estado nativo, se evaluó por dicroísmo circular a 222 nm la desnaturalización proteica. La Figura 49 muestra la curva de desnaturalización del LPT en solución comparada con la del LPT en la MPT. Como se puede apreciar el LPT en la MPT muestra un comportamiento muy similar al LPT en solución, incluso se puede observar como en la MPT el LPT comienza su estado de transición de nativo a desnaturalizado, aproximadamente 8°C después (flecha azul) comparada con la temperatura a la cual ocurre, cuando el LPT está en solución (flecha roja). Incluso se puede observar que el 50% de desnaturalización con respecto a la concentración inicial, ocurre a los 62 °C para el LPT en la MPT, (línea en azul), la cual es ligeramente mayor al LPT en solución (57°C, línea roja) lo que habla de la protección que la MPT le proporciona al LPT con respecto al factor temperatura.

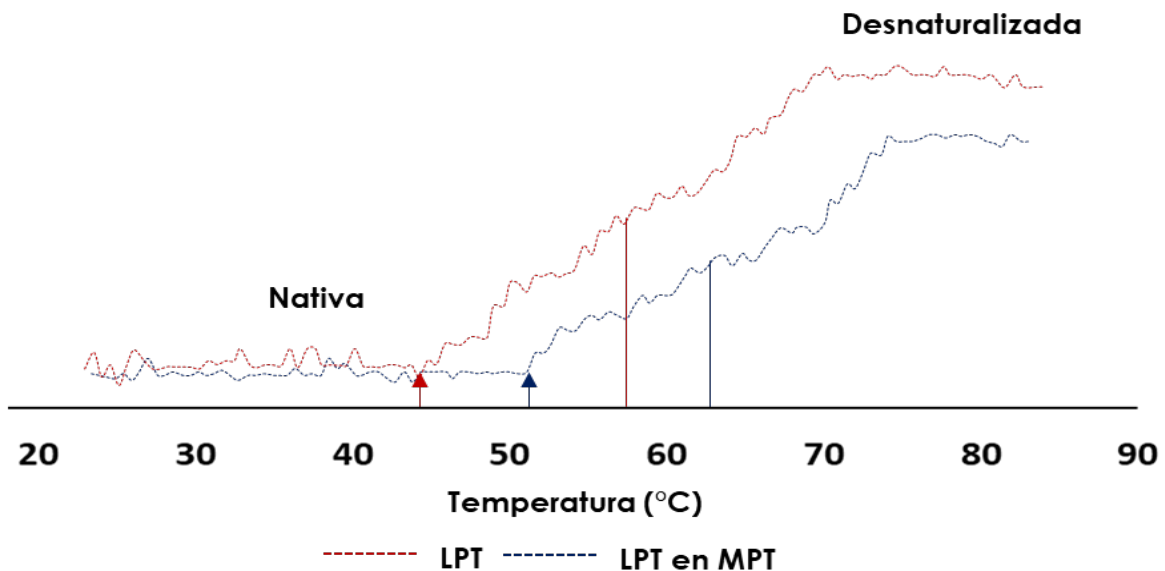


Figura 49. Curvas de desnaturalización del LPT en solución y en la MPT.

5.3.9. Pérdida del movimiento Browniano

La evaluación de la temperatura de transición sol-gel (ver apartado 5.3.4.) permitió evaluar el punto en el que nuestro sistema fluido a 4°C, pierde su movilidad al ser calentado gradualmente y mediante agitación magnética. En este caso la temperatura de transición sol-gel se encuentra alrededor de los 26°C para todas las MPT. Este mismo fenómeno se observó al realizar el estudio de la pérdida de movimiento Browniano (Figura 50) de la MPT, en la cual por arriba de los 25 °C se presenta una caída a tamaños muy cercanos a cero (señalando el inicio de la caída con flecha roja), indicativo de la pérdida de movimiento y por ende a la pérdida de fluidez de la matriz. Este fenómeno se justifica por el principio de medición que utiliza la metodología empleada (dispersión de luz dinámica) donde el tamaño es proporcional al movimiento browniano, por lo que, si éste último se pierde, ocurre lo mismo con el valor de tamaño. La temperatura de transición sol-gel (Tabla 15), confirma lo obtenido mediante dispersión de luz dinámica, donde por arriba de 25°C se pierde el movimiento.

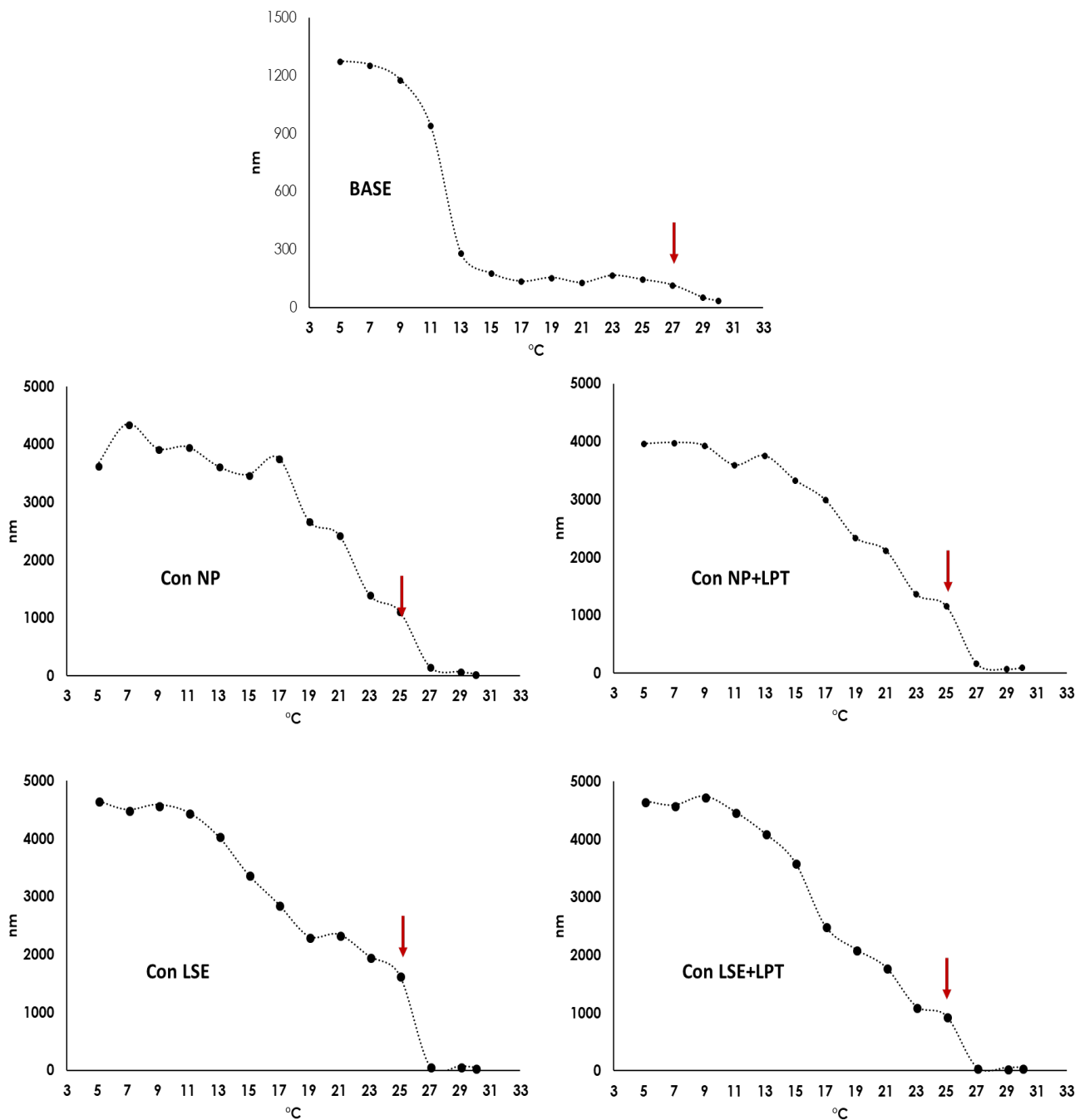


Figura 50. Cambio en el tamaño de la MPT en función de la temperatura para determinar el momento en que ya no hay movimiento Browniano y por tanto ocurre la gelificación de la matriz.

5.3.10. Estabilidad

Después de un periodo de 12 meses la MPT para los dos nanosistemas evaluados no presentó cambios significativos ($p > 0.05$) en la viscosidad, apariencia y propiedades organolépticas. No se detectó la formación de

agregados de partículas o vesículas en ningún punto, lo que indica que a una temperatura de 4°C el sistema físicamente es estable.

5.3.11. Efecto oclusivo

La medida de pérdida de agua transepidermal es un método bien establecido en dermatología para evaluar la integridad de la barrera de la piel *in vivo* o *in vitro*. Cuando la piel se encuentra alterada, su función de barrera se ve modificada dando como resultado un aumento en la pérdida de agua. Esta situación se presenta ya sea por un estado patológico o por una perturbación experimental, terapéutica o cosmética[117, 118].

Esta técnica nos permite evaluar el efecto oclusivo de la MPT. Se ha reportado que la presencia de un sistema terapéutico en una herida como un gel, un apósito, una película, etc., debe generar un efecto semioclusivo esto es, que la pérdida de agua transepidermal no se inhiba por completo (totalmente oclusivo) sino que permita que una cantidad de agua sea eliminada mientras que otra se mantiene en la herida (semioclusivo). El tener un estado totalmente oclusivo fomentaría el crecimiento bacteriano e incluso propiciaría una mayor actividad proteolítica que degradaría los FC endógenos[119]. Sin embargo, tampoco es ideal tener un sistema que no provea cierto grado de oclusividad en la herida, ya que una de las formas de recuperación "natural" de una herida es la actividad autocatalítica que degrada el tejido muerto[120], y ésta se presenta con cierto nivel de humedad en la zona dañada; entonces, si no hay un nivel de humedad, el

saneamiento de la herida sería más lento, por ello la importancia de desarrollar sistemas semioclusivos.

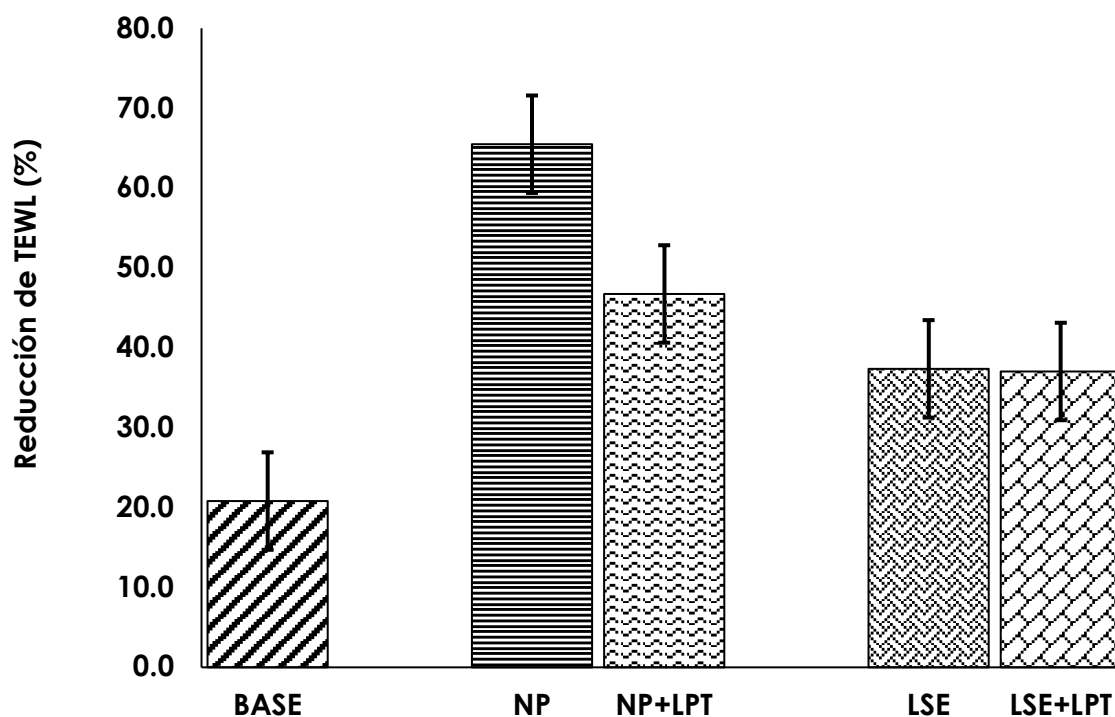


Figura 51. Reducción en el valor de pérdida de agua transepidermal por efecto de la MPT con y sin NS. Esta reducción se calculó en relación a un control (valor basal antes de aplicar la formulación). TEWL: Pérdida de agua transepidermal, por sus siglas en inglés.

Este estudio se llevó a cabo utilizando piel de oreja de cerdo. En la Figura 51 se puede ver que la presencia de la MPT base (sin NS) genera una reducción en la pérdida de agua de alrededor del 20% con respecto al valor inicial (piel sin MPT). Cuando se coloca la MPT que contiene LSE sin LPT (cuarta barra) y con LPT (quinta barra) la reducción se incrementa aún más, con una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a la MPT base, hasta un 37% para los dos casos. Esto se justifica por el hecho de que la presencia de los LSE cubre más el área dañada, evitando que el agua se escape a través de la piel. En el caso de la MPT base, que no contiene NS, la reducción sólo se debe al efecto que el polímero ejerce sobre el valor basal, en el caso de las MPT con LSE la reducción representa el efecto del polímero y de los LSE. En el caso de las MPT cargadas con NP sin LPT y con LPT (segunda y tercera barra respectivamente) se obtienen valores de reducción de alrededor del 65% y

45%, respectivamente. Si comparamos estos valores nos podemos dar cuenta que la ausencia del LPT en las NP (segunda barra) genera un mayor efecto oclusivo comparada con el sistema que si contiene LPT (tercera barra), esta diferencia se puede atribuir al carácter hidrofílico del LPT, lo que provoca que haya una mayor atracción de agua hacia la NP lo que resulta en un porcentaje de reducción menor. Al comparar ambos NS (LSE y NP) en general, se observa que existe una diferencia ($p < 0.05$) entre los valores de reducción del porcentaje de pérdida de agua transpeidermal. Estas diferencias se atribuyen al carácter hidrofóbico de las NP comparado con el de los LSE, además de recordar que los LSE se mueven a través de un gradiente osmótico, por lo que la atracción de agua será mayor si lo comparamos con un liposoma convencional o en este caso con NP de PLGA. En los casos de MPT cargados con NS y a la vez estos últimos conteniendo LPT (tercera y quinta barra) la reducción está por debajo del 50 % con respecto al valor inicial, por lo que se puede decir que la MPT ejerce un efecto semioclusivo sobre la piel, lo que se suma a las ventajas antes mencionadas para este tipo de sistema.

5.3.12. Cinética de difusión del LPT

Finalmente, es indispensable corroborar que el LPT, que se encuentra contenido en los diferentes NS y que estos a su vez están dentro de una MPT, difunda a través de la matriz para poder alcanzar el sitio blanco en la herida y con ello ejercer su actividad biológica. Para ello, se estudió la difusión del LPT a través de la MPT. En la Figura 52 se muestran los resultados obtenidos.

Como se puede ver, el LPT difunde de una manera constante y controlada a través del tiempo, lo que permite inferir que las ventajas que un sistema de liberación controlada posee (ver análisis de la sección 5.2.10), también se presentarán en la MPT. La diferencia que se encontrará únicamente es en cuanto al tiempo que le tomará llegar a la herida, pues es menor (aunque no de manera significativa), debido a que ahora el LPT tendrá que atravesar dos barreras para llegar a al sitio blanco: la bicapa fosfolipídica en los LSE o

la capa polimérica en las NP y posteriormente la estructura matricial de la MPT.

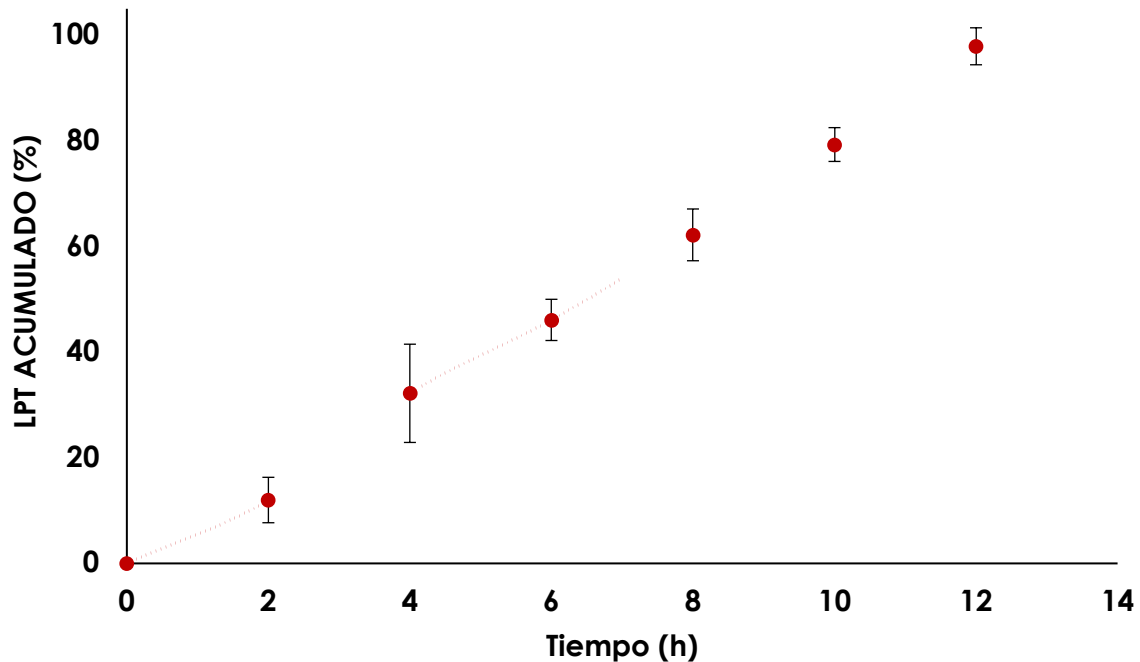


Figura 52. Cinética de difusión del LPT a través de la MPT.

5.3.13. Evaluación *in vivo* de la MPT cargada con NS con y sin LPT

Para evaluar el efecto de la solución de LPT, NS+MPTy NS + LPT+MPT en el saneamiento de una herida, se empleó un modelo de cicatrización de heridas por escisión cutánea. Cabe destacar que las heridas sin tratamiento mostraron un retraso en el proceso de cierre. Las imágenes digitales de las heridas representativas de los ratones en los días 0, 1, 3, 5, 7 y 10 se muestran en las Figuras 53 a 55. En el día 3, no se encontraron diferencias representativas entre las heridas (Figuras 53 y 54). Sin embargo, en el día 5, las heridas que contenían LPT (solución de LPT y NS+LPT+MPT) y la herida que contenía NP+MPT mostraron una ligera mejora en el cierre de la herida debido a los efectos proliferativos y migratorios del LPT y la humedad proporcionada por la MPT. Sin embargo, en el día 7, NP + LPT + MPT mostró una clara mejora en la cicatrización, con una aceleración en el cierre de la herida en comparación con el resto de las formulaciones, sin que se

apreciara un daño en la piel. El día 10 posterior a la herida, se observó el cierre total de la misma. Por lo tanto, estos datos sugieren que la aplicación de LPT usando un NS para prevenir su degradación e incorporada a una MPT para mejorar su aplicación, acelera el cierre de la herida, especialmente durante el proceso de curación proliferativa temprana desde el día 3 hasta el día 10[121], lo que resulta en un mejor efecto de saneamiento de heridas en comparación con las otras formulaciones. Es importante notar que la solución de LPT también mejoró la cicatrización de la herida, sin embargo, la apreciación del lugar de la herida todavía era visible en el día 10. Además, es bien sabido que el LPT en solución será más susceptible a la degradación por proteasas y al pH en una herida crónica[122]. Es importante mencionar que no se observó ninguna pérdida de peso clínicamente significativa ni evidencia de infección en ningún ratón durante el período de estudio.

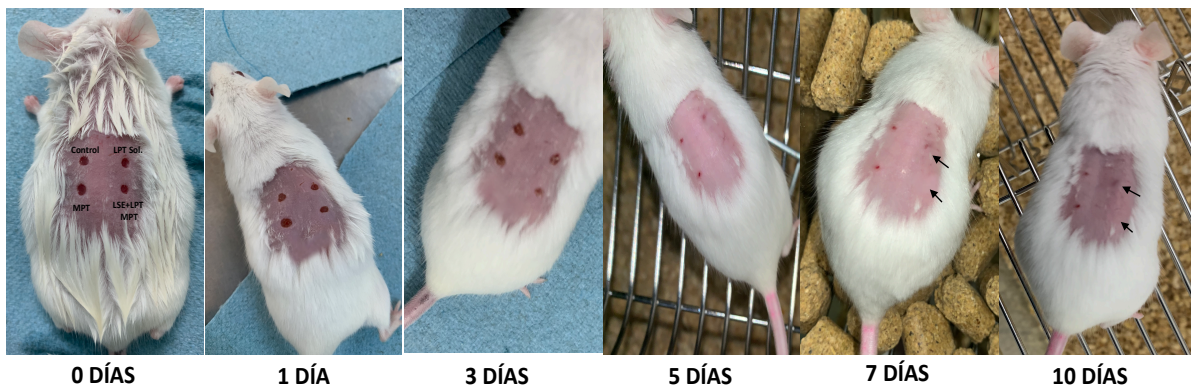


Figura 53. Imágenes representativas de las cuatro heridas profundas para cada caso: control (sin tratamiento), solución de LPT (LPT sol) , LSE MPT y LSE+LPT MPT con respecto al tiempo. Las puntas de flecha indican los lugares originales de las heridas para la solución de LPT y para LSE+LPT MPT.

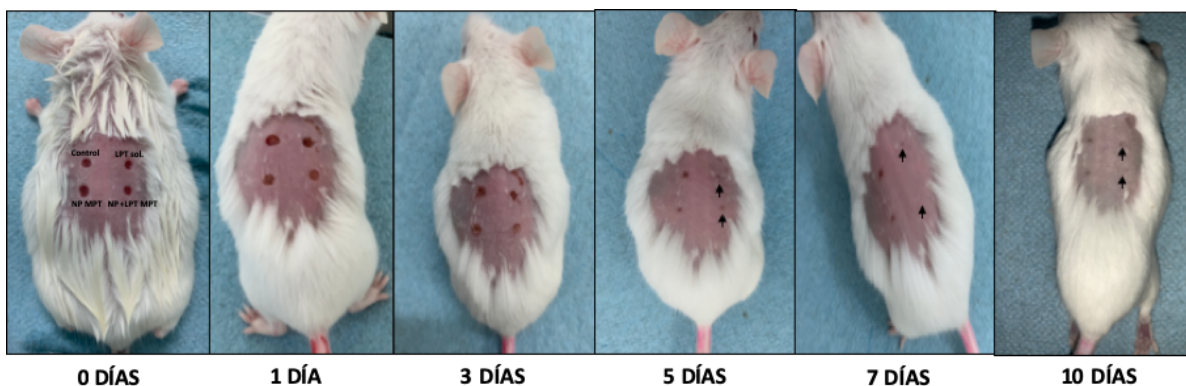


Figura 54. Imágenes representativas de las cuatro heridas profundas para cada caso: control (sin tratamiento), solución de LPT (LPT sol) , NP MPT y NP+LPT MPT con respecto al tiempo. Las puntas de flecha indican los lugares originales de las heridas para la solución de LPT y para NP+LPT MPT.

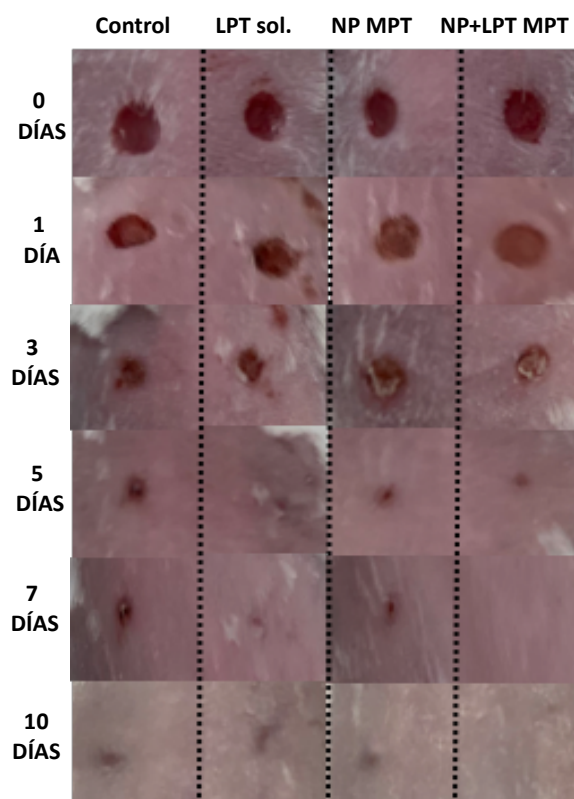


Figura 55. Ejemplo de la evolución de las heridas a nivel macroscópico con los diferentes tratamientos con respecto al tiempo.

6. CONCLUSIONES

Se preparó un sistema inteligente termorreversible a base de Pluronic F-127, conteniendo un nanosistema (nanopartículas poliméricas o liposomas elásticos) cargados con un lisado plaquetario, destinado al tratamiento de heridas crónicas. Los nanosistemas se caracterizaron por el tamaño de

partícula/vesícula, el potencial Z, el índice de polidispersión y la eficiencia de encapsulación, mostrando características tecnológicas adecuadas para el estudio y garantizando la dosis necesaria para lograr un efecto terapéutico. Con técnicas como la espectroscopía infrarroja y la calorimetría diferencial de barrido, se corroboró la inclusión del lisado en el sistema. Se encontró que el lisado incluido en los nanosistemas aumenta el efecto de reparación en un cultivo de fibroblastos, promoviendo la migración celular y la proliferación. La inclusión de las nanopartículas o liposomas en la matriz polimérica termorreversible tiene varias ventajas, como las que se enumeran a continuación: (i) Fácil administración, ya que puede aplicarse en forma de un aerosol, que al contacto con el sitio blanco forma una película protectora sobre la herida. (ii) Los estudios de liberación muestran perfiles donde la cantidad liberada en función del tiempo es constante y dura aproximadamente 12 h, lo que garantiza la liberación gradual del lisado durante este tiempo, evitando el contacto de la dosis total de lisado administrada con el medio biológico, que potencialmente puede afectarlo. (iii) Proporciona un efecto semi-oclusivo, formando una barrera protectora que mantiene un cierto grado de humedad, pero que permite un intercambio gaseoso adecuado.

Los resultados de los estudios *in vitro* e *in vivo* con los que se evaluaron las propiedades de este sistema son muy prometedores indicando que la actividad del LPT es mantenida y su liberación es controlada durante la incorporación dentro del nanosistema, lo que podrá asegurar su estabilidad en el sitio de la herida. Así mismo, la inclusión del LPT en un nanosistema, mejora el proceso de saneamiento de las heridas, lo que se atribuye a los siguientes factores: (i) Protección del LPT del ataque del medio biológico; (ii) liberación controlada del LPT a partir del nanosistema; (iii) efecto semioclusivo conseguido con la MPT; (iv) retención de la formulación y contacto más íntimo con el sitio afectado.

Se espera que este sistema ofrezca ventajas en relación con los sistemas convencionales, contribuyendo de esta manera a la rehabilitación y recuperación de las heridas crónicas que afectan cada vez más a un mayor número de personas en todo el mundo y que en muchos casos no sólo condicionan sus actividades, sino también que puede llevarlos a situaciones extremadamente serias, como la amputación de miembros e incluso comprometer su vida.

7. PERSPECTIVAS

- Aislar los factores de crecimiento responsables del efecto terapéutico del lisado plaquetario para ser incluidos en los nanosistemas.
- Hacer evaluaciones histológicas y de inmunohistoquímica de las zonas de heridas tratadas para justificar en mayor medida el efecto proliferativo del LPT incluido dentro de los nanosistemas e incorporado en un hidrogel termosensible.
- Evaluar los sistemas en un modelo animal diabético para observar el efecto de la hiperglucemia en relación al saneamiento de heridas.
- Corroborar, mediante estudios con pacientes que presenten heridas crónicas, los resultados obtenidos en los estudios realizados.

8. REFERENCIAS

1. Chandika P, Ko SC, Jung WK: **Marine-derived biological macromolecule-based biomaterials for wound healing and skin tissue regeneration.** *International journal of biological macromolecules* 2015, **77**:24-35.
2. Gainza G, Villullas S, Pedraz JL, Hernandez RM, Igartua M: **Advances in drug delivery systems (DDS) to release growth factors for wound healing and skin regeneration.** *Nanomedicine* 2015, **11**(6):1551-1573.
3. Shekhter AB, Rudenko TG, Istranov LP, Guller AE, Borodulin RR, Vanin AF: **Dinitrosyl iron complexes with glutathione incorporated into a collagen matrix as a base for the design of drugs accelerating skin wound healing.** *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2015, **78**:8-18.
4. Richardson M: **Understanding the structure and function of the skin.** *Nursing times* 2003, **99**(31):46-48.
5. Alexander A, Dwivedi S, Ajazuddin, Giri TK, Saraf S, Saraf S, Tripathi DK: **Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery.** *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2012, **164**(1):26-40.
6. Monfort A, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Izeta A: **Production of human tissue-engineered skin trilayer on a plasma-based hypodermis.** *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 2013, **7**(6):479-490.

7. Candi E, Schmidt R, Melino G: **The cornified envelope: a model of cell death in the skin.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2005, **6**(4):328-340.
8. Riviere JE, Papich MG: **Potential and problems of developing transdermal patches for veterinary applications.** *Advanced drug delivery reviews* 2001, **50**(3):175-203.
9. Kang L, Poh AL, Fan SK, Ho PC, Chan YW, Chan SY: **Reversible effects of permeation enhancers on human skin.** *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 2007, **67**(1):149-155.
10. Lopez RF, Lange N, Guy R, Bentley MV: **Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters.** *Advanced drug delivery reviews* 2004, **56**(1):77-94.
11. Prausnitz MR: **Microneedles for transdermal drug delivery.** *Advanced drug delivery reviews* 2004, **56**(5):581-587.
12. Kalluri H, Banga AK: **Formation and closure of microchannels in skin following microporation.** *Pharmaceutical research* 2011, **28**(1):82-94.
13. Escobar-Chavez JJ, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A: **In vivo skin permeation of sodium naproxen formulated in pluronic F-127 gels: effect of Azone and Transcutol.** *Drug development and industrial pharmacy* 2005, **31**(4-5):447-454.
14. Foldvari M: **Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design.** *Pharmaceutical science & technology today* 2000, **3**(12):417-425.
15. Calne S: **Función de las proteasas en el diagnóstico de heridas.** In: Wounds International Enterprise House: Printwells; 2011.
16. Jimenez AJ, Perez F: **Physico-chemical and biological considerations for membrane wound evolution and repair in animal cells.** *Seminars in cell & developmental biology* 2015, **45**:2-9.
17. Shaw TJ, Martin P: **Wound repair at a glance.** *Journal of cell science* 2009, **122**(Pt 18):3209-3213.
18. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM: **Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care.** *Advances in skin & wound care* 2012, **25**(7):304-314.
19. Ligi D, Mosti G, Croce L, Raffetto JD, Mannello F: **Chronic venous disease - Part I: Inflammatory biomarkers in wound healing.** *Biochimica et biophysica acta* 2016, **1862**(10):1964-1974.
20. Javierre E: **Impact of anomalous transport kinetics on the progress of wound healing.** *Medical engineering & physics* 2016, **38**(9):885-894.
21. Guo S, Dipietro LA: **Factors affecting wound healing.** *Journal of dental research* 2010, **89**(3):219-229.
22. Olczyk P, Mencner L, Komosinska-Vassev K: **The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing.** *BioMed research international* 2014, **2014**:747584.
23. Brugues A, Anon E, Conte V, Veldhuis JH, Gupta M, Colombelli J, Munoz JJ, Brodland GW, Ladoux B, Trepat X: **Forces driving epithelial wound healing.** *Nature physics* 2014, **10**(9):683-690.
24. Campos AC, Groth AK, Branco AB: **Assessment and nutritional aspects of wound healing.** *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2008, **11**(3):281-288.
25. Demidova-Rice TN, Durham JT, Herman IM: **Wound Healing Angiogenesis: Innovations and Challenges in Acute and Chronic Wound Healing.** *Advances in wound care* 2012, **1**(1):17-22.
26. Lopez-Otin C, Bond JS: **Proteases: multifunctional enzymes in life and disease.** *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**(45):30433-30437.
27. Schneider LA, Korber A, Grabbe S, Dissemond J: **Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy?** *Arch Dermatol Res* 2007, **298**(9):413-420.

28. **The relationship between pH and wound healing** [<https://www.smith-nephew.com/belgique/produits-old/cadesorb-/cadesorb--simple-science/the-relationship-between-ph-and-wound-healing/>]
29. Percival SL, McCarty S, Hunt JA, Woods EJ: **The effects of pH on wound healing, biofilms, and antimicrobial efficacy.** *Wound Repair Regen* 2014, **22**(2):174-186.
30. DIRECCIÓN GENERAL DE CALIDAD Y EDUCACIÓN EN SALUD DGDPYDES: **Modelo de atención de las heridas crónicas.** 2018.
31. Alberts B JA, Lewis J, et al.: **Protein Function.** In: *Molecular Biology of the Cell.* Edited by Science G, 4th edn. National Center for Biotechnology Information; 2002.
32. Berg JM TJ, Stryer L.: **Protein Structure and Function.** In: *Biochemistry.* Edited by Company WHFa, 5th edn. National Center for Biotechnology Information; 2002.
33. Skalko-Basnet N: **Biologics: the role of delivery systems in improved therapy.** *Biologics* 2014, **8**:107-114.
34. Bruno BJ, Miller GD, Lim CS: **Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery.** *Ther Deliv* 2013, **4**(11):1443-1467.
35. Tabas I, Glass CK: **Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities.** *Science* 2013, **339**(6116):166-172.
36. Ganapathy N, Venkataraman SS, Daniel R, Aravind RJ, Kumarakrishnan VB: **Molecular biology of wound healing.** *J Pharm Bioallied Sci* 2012, **4**(Suppl 2):S334-337.
37. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M: **Growth factors and cytokines in wound healing.** *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2008, **16**(5):585-601.
38. Chen FM, Zhang M, Wu ZF: **Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering.** *Biomaterials* 2010, **31**(24):6279-6308.
39. Fekete N, Gadelorge M, Furst D, Maurer C, Dausend J, Fleury-Cappellesso S, Mailander V, Lotfi R, Ignatius A, Sensebe L *et al*: **Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components.** *Cytotherapy* 2012, **14**(5):540-554.
40. Santo VE, Popa EG, Mano JF, Gomes ME, Reis RL: **Natural assembly of platelet lysate-loaded nanocarriers into enriched 3D hydrogels for cartilage regeneration.** *Acta Biomater* 2015, **19**:56-65.
41. Santo VE, Duarte AR, Popa EG, Gomes ME, Mano JF, Reis RL: **Enhancement of osteogenic differentiation of human adipose derived stem cells by the controlled release of platelet lysates from hybrid scaffolds produced by supercritical fluid foaming.** *J Control Release* 2012, **162**(1):19-27.
42. Oliveira SM, Santo VE, Gomes ME, Reis RL, Mano JF: **Layer-by-layer assembled cell instructive nanocoatings containing platelet lysate.** *Biomaterials* 2015, **48**:56-65.
43. Shanskii YD, Sergeeva NS, Sviridova IK, Kirakozov MS, Kirsanova VA, Akhmedova SA, Antokhin AI, Chissov VI: **Human platelet lysate as a promising growth-stimulating additive for culturing of stem cells and other cell types.** *Bull Exp Biol Med* 2013, **156**(1):146-151.
44. Ranzato E, Patrone M, Mazzucco L, Burlando B: **Platelet lysate stimulates wound repair of HaCaT keratinocytes.** *Br J Dermatol* 2008, **159**(3):537-545.
45. Shin SC, Kim HJ, Oh IJ, Cho CW, Yang KH: **Development of tretinoin gels for enhanced transdermal delivery.** *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 2005, **60**(1):67-71.
46. Barry BW: **Breaching the skin's barrier to drugs.** *Nature biotechnology* 2004, **22**(2):165-167.
47. Hadgraft J: **Modulation of the barrier function of the skin.** *Skin pharmacology and applied skin physiology* 2001, **14 Suppl 1**:72-81.

48. Pfister WR, Hsieh DS: **Permeation enhancers compatible with transdermal drug delivery systems. Part I: selection and formulation considerations.** *Medical device technology* 1990, **1**(5):48-55.
49. Goodman M, Barry BW: **Action of penetration enhancers on human skin as assessed by the permeation of model drugs 5-fluorouracil and estradiol. I. Infinite dose technique.** *The Journal of investigative dermatology* 1988, **91**(4):323-327.
50. Barry BW, Bennett SL: **Effect of penetration enhancers on the permeation of mannitol, hydrocortisone and progesterone through human skin.** *The Journal of pharmacy and pharmacology* 1987, **39**(7):535-546.
51. Morrow DI, Garland MJ, McCarron PA, Woolfson AD, Donnelly RF: **Innovative drug delivery strategies for topical photodynamic therapy using porphyrin precursors.** *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer* 2007, **26**(2):105-116.
52. Roberto Solaro FCaAB: **Targeted Delivery of Protein Drugs by Nanocarriers.** *Materials* 2010, **3**:1928-1980.
53. Torchilin VP: **Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers.** *Nat Rev Drug Discov* 2005, **4**(2):145-160.
54. Cevc G, Blume G: **Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force.** *Biochimica et biophysica acta* 1992, **1104**(1):226-232.
55. Ashtikar M, Nagarsekar K, Fahr A: **Transdermal delivery from liposomal formulations - Evolution of the technology over the last three decades.** *J Control Release* 2016, **242**:126-140.
56. Choi MJ, Maibach HI: **Elastic vesicles as topical/transdermal drug delivery systems.** *Int J Cosmet Sci* 2005, **27**(4):211-221.
57. De Jong WH, Borm PJ: **Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards.** *Int J Nanomedicine* 2008, **3**(2):133-149.
58. Ferrari M: **Cancer nanotechnology: opportunities and challenges.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(3):161-171.
59. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A: **Polymer-based nanocapsules for drug delivery.** *Int J Pharm* 2010, **385**(1-2):113-142.
60. Quintanar-Guerrero D, Allemann E, Fessi H, Doelker E: **Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers.** *Drug Dev Ind Pharm* 1998, **24**(12):1113-1128.
61. Mogosanu GD, Grumezescu AM, Bejenaru C, Bejenaru LE: **Polymeric protective agents for nanoparticles in drug delivery and targeting.** *Int J Pharm* 2016, **510**(2):419-429.
62. Goyal R, Macri LK, Kaplan HM, Kohn J: **Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery.** *J Control Release* 2016, **240**:77-92.
63. Fonte P, Reis S, Sarmiento B: **Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery.** *J Control Release* 2016, **225**:75-86.
64. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC: **Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems.** *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010, **75**(1):1-18.
65. Soga O, van Nostrum CF, Fens M, Rijcken CJ, Schiffelers RM, Storm G, Hennink WE: **Thermosensitive and biodegradable polymeric micelles for paclitaxel delivery.** *J Control Release* 2005, **103**(2):341-353.
66. Anthis NJ, Clore GM: **Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm.** *Protein Sci* 2013, **22**(6):851-858.
67. Barth A: **Infrared spectroscopy of proteins.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1767**(9):1073-1101.
68. Kelly SM, Jess TJ, Price NC: **How to study proteins by circular dichroism.** *Biochim Biophys Acta* 2005, **1751**(2):119-139.

69. Sapan CV, Lundblad RL, Price NC: **Colorimetric protein assay techniques.** *Biotechnol Appl Biochem* 1999, **29 (Pt 2)**:99-108.
70. Colletier JP, Chaize B, Winterhalter M, Fournier D: **Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer.** *BMC Biotechnol* 2002, **2**:9.
71. Zhang H: **Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation.** *Methods Mol Biol* 2017, **1522**:17-22.
72. Sahin A, Esendagli G, Yerlikaya F, Caban-Toktas S, Yoyen-Ermis D, Horzum U, Aktas Y, Khan M, Couvreur P, Capan Y: **A small variation in average particle size of PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation leads to considerable change in nanoparticles' characteristics and efficacy of intracellular delivery.** *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2017, **45(8)**:1657-1664.
73. Mura S, Hillaireau H, Nicolas J, Le Droumaguet B, Gueutin C, Zanna S, Tsapis N, Fattal E: **Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells.** *Int J Nanomedicine* 2011, **6**:2591-2605.
74. Bhardwaj SB, Shukla AJ, Collins CC: **Effect of varying drug loading on particle size distribution and drug release kinetics of verapamil hydrochloride microspheres prepared with cellulose esters.** *J Microencapsul* 1995, **12(1)**:71-81.
75. Bohrey S, Chourasiya V, Pandey A: **Polymeric nanoparticles containing diazepam: preparation, optimization, characterization, in-vitro drug release and release kinetic study.** *Nano Converg* 2016, **3(1)**:3.
76. Elizondo E, Moreno E, Cabrera I, Cordoba A, Sala S, Veciana J, Ventosa N: **Liposomes and other vesicular systems: structural characteristics, methods of preparation, and use in nanomedicine.** *Prog Mol Biol Transl Sci* 2011, **104**:1-52.
77. Simona Mura HH, Julien Nicolas, ET AL.: **Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells.** *International Journal of Nanomedicine* 2011, **2011(6)**:2591–2605.
78. Kronberg B, Dahlman A, Carlfors J, Karlsson J, Artursson P: **Preparation and evaluation of sterically stabilized liposomes: colloidal stability, serum stability, macrophage uptake, and toxicity.** *J Pharm Sci* 1990, **79(8)**:667-671.
79. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Preat V: **PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications.** *J Control Release* 2012, **161(2)**:505-522.
80. Castangia I, Nacher A, Caddeo C, Valenti D, Fadda AM, Diez-Sales O, Ruiz-Sauri A, Manconi M: **Fabrication of quercetin and curcumin bionanovesicles for the prevention and rapid regeneration of full-thickness skin defects on mice.** *Acta Biomater* 2014, **10(3)**:1292-1300.
81. Tefas LR, Tomuta I, Achim M, Vlase L: **Development and optimization of quercetin-loaded PLGA nanoparticles by experimental design.** *Clujul Med* 2015, **88(2)**:214-223.
82. Mitragotri S, Burke PA, Langer R: **Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies.** *Nat Rev Drug Discov* 2014, **13(9)**:655-672.
83. Goke K, Bunjes H: **Carrier characteristics influence the kinetics of passive drug loading into lipid nanoemulsions.** *Eur J Pharm Biopharm* 2018, **126**:132-139.
84. Sun J, Wang F, Sui Y, She Z, Zhai W, Wang C, Deng Y: **Effect of particle size on solubility, dissolution rate, and oral bioavailability: evaluation using coenzyme Q(1)(0) as naked nanocrystals.** *Int J Nanomedicine* 2012, **7**:5733-5744.
85. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE: **Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices.** *J Control Release* 2001, **70(1-2)**:1-20.
86. Makadia HK, Siegel SJ: **Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier.** *Polymers (Basel)* 2011, **3(3)**:1377-1397.

87. Nabi-Meibodi M, Vatanara A, Najafabadi AR, Rouini MR, Ramezani V, Gilani K, Etemadzadeh SM, Azadmanesh K: **The effective encapsulation of a hydrophobic lipid-insoluble drug in solid lipid nanoparticles using a modified double emulsion solvent evaporation method.** *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013, **112**:408-414.
88. Patel A, Gaudana R, Mitra AK: **A novel approach for antibody nanocarriers development through hydrophobic ion-pairing complexation.** *J Microencapsul* 2014, **31**(6):542-550.
89. Bibi S, Kaur R, Henriksen-Lacey M, McNeil SE, Wilkhu J, Lattmann E, Christensen D, Mohammed AR, Perrie Y: **Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM.** *Int J Pharm* 2011, **417**(1-2):138-150.
90. Hernandez-Caselles T, Villalain J, Gomez-Fernandez JC: **Stability of liposomes on long term storage.** *J Pharm Pharmacol* 1990, **42**(6):397-400.
91. Law SL, Lo WY, Teh GW: **Effect of liposomes on suspension stability.** *J Pharm Sci* 1987, **76**(7):545-547.
92. Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, Saha BP, Mukherjee PK: **Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats.** *Int J Pharm* 2007, **330**(1-2):155-163.
93. Feng Y, Rainteau D, Chachaty C, Yu ZW, Wolf C, Quinn PJ: **Characterization of a quasicrystalline phase in codispersions of phosphatidylethanolamine and glucocerebroside.** *Biophys J* 2004, **86**(4):2208-2217.
94. !!! INVALID CITATION !!! .
95. Mahalingam Rajamanickam Vijayakumar RK, Parameswara Rao Vuddanda, et al.: **Trans resveratrol loaded DSPE PEG 2000 coated liposomes: An evidence for prolonged systemic circulation and passive brain targeting.** *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2016, **33**:125-135.
96. Zolnik BS, Burgess DJ: **Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release.** *J Control Release* 2007, **122**(3):338-344.
97. Monireh Azizi FF, Mohammadtaghi Joghataei, et al.: **Fabrication of protein-loaded PLGA nanoparticles: effect of selected formulation variables on particle size and release profile.** *J Polym Res* 2013, **20**(110).
98. Yadav KS, Sawant KK: **Formulation optimization of etoposide loaded PLGA nanoparticles by double factorial design and their evaluation.** *Curr Drug Deliv* 2010, **7**(1):51-64.
99. K. Miladi SS, H. Fessi, et al.: **Encapsulation of alendronate sodium by nanoprecipitation and double emulsion: From preparation to in vitro studies.** *Industrial Crops and Products* 2015, **72**:24-33.
100. Murphy BM, D'Antonio J, Manning MC, Al-Azzam W: **Use of the amide II infrared band of proteins for secondary structure determination and comparability of higher order structure.** *Curr Pharm Biotechnol* 2014, **15**(9):880-889.
101. Kong J, Yu S: **Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures.** *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007, **39**(8):549-559.
102. Matsuura Y, Takehira M, Joti Y, Ogasahara K, Tanaka T, Ono N, Kunishima N, Yutani K: **Thermodynamics of protein denaturation at temperatures over 100 degrees C: CutA1 mutant proteins substituted with hydrophobic and charged residues.** *Sci Rep* 2015, **5**:15545.
103. Roberts CJ: **Protein aggregation and its impact on product quality.** *Curr Opin Biotechnol* 2014, **30**:211-217.
104. Staiano-Coico L, Higgins PJ, Schwartz SB, Zimm AJ, Goncalves J: **Wound fluids: a reflection of the state of healing.** *Ostomy Wound Manage* 2000, **46**(1A Suppl):85S-93S; quiz 94S-95S.
105. Trengove NJ, Langton SR, Stacey MC: **Biochemical analysis of wound fluid from nonhealing and healing chronic leg ulcers.** *Wound Repair Regen* 1996, **4**(2):234-239.

106. Dini V, Salvo P, Janowska A, Di Francesco F, Barbini A, Romanelli M: **Correlation Between Wound Temperature Obtained With an Infrared Camera and Clinical Wound Bed Score in Venous Leg Ulcers.** *Wounds* 2015, **27**(10):274-278.
107. Fornaguera C, Caldero G, Mitjans M, Vinardell MP, Solans C, Vauthier C: **Interactions of PLGA nanoparticles with blood components: protein adsorption, coagulation, activation of the complement system and hemolysis studies.** *Nanoscale* 2015, **7**(14):6045-6058.
108. Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S: **Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery.** *Front Pharmacol* 2015, **6**:286.
109. Thomas S: **Assessment and management of wound exudate.** *J Wound Care* 1997, **6**(7):327-330.
110. Cutting KF: **Wound exudate: composition and functions.** *Br J Community Nurs* 2003, **8**(9 Suppl):suppl 4-9.
111. Gupta A, Aggarwal G, Singla S, Arora R: **Transfersomes: a novel vesicular carrier for enhanced transdermal delivery of sertraline: development, characterization, and performance evaluation.** *Sci Pharm* 2012, **80**(4):1061-1080.
112. Badran M, Shalaby K, Al-Omrani A: **Influence of the flexible liposomes on the skin deposition of a hydrophilic model drug, carboxyfluorescein: dependency on their composition.** *ScientificWorldJournal* 2012, **2012**:134876.
113. Greener B, Hughes AA, Bannister NP, Douglass J: **Proteases and pH in chronic wounds.** *J Wound Care* 2005, **14**(2):59-61.
114. Liu Y, Kalen A, Risto O, Wahlstrom O: **Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent.** *Wound Repair Regen* 2002, **10**(5):336-340.
115. Nie S, Hsiao WL, Pan W, Yang Z: **Thermoreversible Pluronic F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies.** *Int J Nanomedicine* 2011, **6**:151-166.
116. Gilles Dumortier JLG, Florence Agnely, et al.: **A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics.** *Pharmaceutical Research* 2006, **23**(12).
117. Netzlaff F, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF: **TEWL measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells in vitro. Limitations shown by transport data testing.** *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 2006, **63**(1):44-50.
118. du Plessis J, Stefaniak A, Eloff F, John S, Agner T, Chou TC, Nixon R, Steiner M, Franken A, Kudla I et al: **International guidelines for the in vivo assessment of skin properties in non-clinical settings: Part 2. transepidermal water loss and skin hydration.** *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin* 2013, **19**(3):265-278.
119. Zhai H, Maibach HI: **Effect of Occlusion and Semi-occlusion on Experimental Skin Wound Healing: A Reevaluation.** *Wounds* 2007, **19**(10):270-276.
120. Atkin L: **Understanding methods of wound debridement.** *Br J Nurs* 2014, **23**(12):S10-12, S14-15.
121. Dreifke MB, Jayasuriya AA, Jayasuriya AC: **Current wound healing procedures and potential care.** *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015, **48**:651-662.
122. McCarty SM, Percival SL: **Proteases and Delayed Wound Healing.** *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013, **2**(8):438-447.

Journal Pre-proof

Platelet lysate-loaded PLGA nanoparticles in a thermo-responsive hydrogel intended for the treatment of wounds

Sergio Alberto Bernal-Chávez , Sergio Alcalá-Alcalá ,
Doris Cerecedo , Adriana Ganem-Rondero

PII: S0928-0987(20)30020-8
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105231>
Reference: PHASCI 105231



To appear in: *European Journal of Pharmaceutical Sciences*

Received date: 20 September 2019
Revised date: 28 December 2019
Accepted date: 20 January 2020

Please cite this article as: Sergio Alberto Bernal-Chávez , Sergio Alcalá-Alcalá , Doris Cerecedo , Adriana Ganem-Rondero , Platelet lysate-loaded PLGA nanoparticles in a thermo-responsive hydrogel intended for the treatment of wounds, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105231>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 Published by Elsevier B.V.

Platelet lysate-loaded PLGA nanoparticles in a thermo-responsive hydrogel intended for the treatment of wounds

Sergio Alberto Bernal-Chávez^a, Sergio Alcalá-Alcalá^b, Doris Cerecedo^c and Adriana Ganem-Rondero^{a*}

^aDivisión de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli 54740, Estado de México, México.

^bLaboratorio de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México.

^cLaboratorio de Hematobiología, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Sección de Estudios de Posgrado, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

q901108@hotmail.com (S.A.B.-C.); sergio.alcala@uaem.mx.com (S.A.-A.);
dcereced@ipn.mx (D.C.)

* Correspondence: ganemq@hotmail.com; Tel.: +52-55-56-23-20-89

^{a, b, c} These authors contributed equally to this work.

Abstract

A thermo-responsive hydrogel of Pluronic F-127, containing PLGA nanoparticles loaded with a platelet lysate for wound treatment, was prepared. A high rate of incorporation of the lysate (about 80%) in the nanoparticles was achieved by the double emulsion-solvent evaporation method. The nanoparticles were characterized by measuring their size (about 318 nm), polydispersity index (0.29) and Z potential (-17.6), as well as by infrared and calorimetric techniques, and determining their stability as a function of time. It was found through measures of transepidermal water loss that the hydrogel containing the nanoparticles was capable of providing a semi-occlusive environment, necessary for the recovery of a wound. The inclusion of lysate in nanoparticles and this in turn in the hydrogel allowed a gradual release, which would avoid contact of the total dose with the biological medium. Studies with fibroblasts and *in vivo* in mice showed that the hydrogel containing nanoparticles with platelet lysate promoted faster tissue regeneration than the lysate in its free form, so this system is presented as a good alternative for the treatment of wounds.

Keywords

Platelet lysate; PLGA nanoparticles; hydrogel; thermo-responsive polymer; Pluronic F-127; wound healing.

1. Introduction

Over the years, the prevalence of people with chronic wounds has increased dramatically by a number of factors including smoking, obesity, and chronic diseases such as diabetes, that can slow the healing process of a wound and increase the risk of becoming chronic [1]. A single diabetic ulcer, which usually becomes a chronic wound, with all the consequences that this implies, costs thousands of dollars to the health system, and the cost increases dramatically, considering that the number of affected patients grows exponentially each year. This has resulted in the immense market for wound healing, which does not stop growing year by year [2]. In addition to the cost of wound care, current therapies are far from guaranteeing adequate healing and recurrence is common. Furthermore, many systems require frequent administrations and high doses to achieve the desired effect, with the possibility of undesirable effects if high systemic concentrations are reached [1]. Because of this situation, the improvement of chronic wound treatments has become such a necessity that the scientific community has focused not only on developing new treatments but also on improving the effectiveness of current therapies [3-4]. The wound healing process is a complex physiological event involving several overlapping stages that include inflammation, the formation of granulation tissue, re-epithelization, matrix formation and remodeling [5]. However, any interruption or interference on these pathways, such as those caused by intracellular and extracellular pH changes, as well as the increase in enzyme and macrophage activity, among others, results in a non-healing wound, turning the wound into chronic. In chronic wounds, the physiological balance between tissue degradation and tissue reassembly has been lost and catabolic process predominates [6]. The inflammation stage is characterized by an exudate coming from the wound, with a high content of proteins, such as growth factors [GF: transforming growth factor (TGF)- β 1, platelet-derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factor (IGF), fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF)], inflammatory components, chemokines, cytokines (CK) and matrix molecules; moreover, it facilitates the ingress of white cells and provides the moist environment important for healing [7-8]. The presence of proinflammatory cells creates a proteolytic microenvironment, constituted for example by matrix metalloproteinases that facilitate extracellular matrix degradation, as well as the degradation of GF and CK during the healing process. This decrease in GF and CK can

retard wound healing. Therefore, if they are externally administered they would contribute to regenerate tissue growth [3]. Platelet lysate (PL) is a blood product containing a plethora of growth-promoting factors (GF), which has been studied and used since the 1970s [9]. PL is widely recognized for the positive effects of GF on tissue repair and regeneration, vascular remodeling and regulation of inflammatory and immune responses [10-12] and has been considered as a safe and efficient mesenchymal stromal cells (MSC) culture supplement for robust MSC cultivation [13]. Furthermore, PL is known to stimulate the *in vitro* proliferation of chondrocytes [10], fibroblasts [14] and the keratinocytes migration [15]. Since PL represents a natural source of multiple GF, it avoids the need of including different bioactive agents in a delivery system. However, if PL is externally administered, it is difficult to expect the desired biological effect *in vivo* because of the short half-life of GF. Furthermore, high doses and/or frequent administrations will be required, which raises the issues of toxicity and costs. Thus, it is indispensable for improved *in vivo* high efficacy to achieve a controlled PL delivery system [3, 12].

The use of polymeric nanoparticles as drug delivery systems offers an interesting alternative in the area of dermal administration, especially for hydrophilic macromolecules such as GF [3, 8, 16]. These nanoparticles can protect PL from the external environment of wounds and in addition they are able to control its release. PLGA is one of the polymers that has been most used as a GF carrier for wound treatment due to its biocompatibility and biodegradability [3]. A few controlled release systems including PL have been developed. For example, Santo et al. [10, 12] developed PL-loaded chitosan-chondroitin sulfate nanoparticles for cartilage regeneration and as an osteogenic supplement for bone tissue engineering. Likewise, a foam based on poly(D,L-lactic acid), containing the same type of nanoparticles, but in this case, to enhance the osteogenic differentiation of human adipose derived stem cells [17]. Few are the references that focus on the healing of skin wounds using micro- and nanocarriers loaded with PL. Fontana et al. [14] created PL-modified porous silicon microparticles for the proliferation of cells in wounds. In all the cases mentioned above, controlled release of PL was achieved.

Likewise, hydrogel (HG) dressings, based on smart polymers, can be ideal platforms for the administration and retention of drugs to the skin. In relation to thermo-sensitive HG, these

have several advantages [3-4]: i) They can be easily applied in the form of a solution, becoming a HG *in situ* at physiological temperature; ii) they can adopt the exact shape of the wound, which promotes intimate contact with the area, covering and protecting it; iii) the use of adhesives, glues or sutures is not necessary; iv) maintain the necessary moisture conditions for wound healing; v) they may constitute semi-occlusive systems that allow an adequate gas exchange; vi) contribute to the controlled release of the drug; vii) provide protection to the drug; viii) they are easy to prepare. However, they also have disadvantages such as low mechanical resistance, dilution with wound fluids and rapid drug release. That is why in this work the properties of polymeric nanoparticles based on PLGA were combined with those of thermo-sensitive Pluronic F-127® HG, seeking to achieve a better effect of PL on skin wounds. Therefore, a Pluronic F-127® HG containing NP loaded with PL was developed, characterized and evaluated through *in vitro* and *in vivo* tests, as a release system for wound healing.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA 50:50, carboxylic end group) was purchased from Evonik Industries (Darmstadt, Germany). Pluronic F127® was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Low viscosity polyvinyl alcohol (PVA) was obtained from Silanes Laboratories (CDMX, Mexico). PL was donated by Banco de Sangre, Hospital Juárez de México, S.S. (CDMX, Mexico). Fibroblasts were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 400 mM L-glutamine, 50 µM gentamycin, 25 mM HEPES, 2 g/L sodium bicarbonate, 1mM sodium pyruvate in a humid atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Cell viability was assessed by exclusion of 0.2% trypan blue and was routinely > 90%. Sodium hydroxide and potassium monobasic phosphate were all supplied by Fermont (CDMX, Mexico). All the solutions were prepared using water from a Milli-Q® filtration system (Millipore, Billerica, MA, USA).

2.2. Methods

2.2.1. Preparation and characterization of placebo nanoparticles (NP) and PL-loaded nanoparticles (NP+PL)

Preparation of nanoparticles

Before preparing the nanoparticles, platelet lysate (PL) was characterized by techniques such as Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR/ATR), circular dichroism (CD) and ultraviolet (UV) spectrophotometry, as well as by the well-known reactions for proteins, using the Bradford and Biuret reagents (the results of these tests can be found in the supplementary material).

Both NP (placebo nanoparticles) and NP+PL (nanoparticles loaded with platelet lysate) were prepared according to a previously optimized process, based on a modified double emulsion-solvent evaporation technique [18], using PLGA as a biodegradable polymer. Briefly, 150 mg of PLGA were dissolved in 10 ml of dichloromethane, adding dropwise 1 ml of phosphate buffer solution (PBS) for NP or 1 ml of PL aqueous solution for the NP+PL, under constant homogenization at 15,000 rpm during 5 min. This first water in oil (W/O) emulsion was then added to 30 ml of an aqueous solution of PVA (5% w/w) under the same conditions of homogenization, obtaining the second emulsion (W/O/W). Afterward, the solvent was evaporated at room temperature, under magnetic stirring, getting the nanoparticles. Finally, the nanoparticle suspension was washed three times with 10 ml of deionized water, removing the residual PVA by centrifugation at 12000 rpm using a Hermle Z326 K centrifuge (Germany) for 45 min each. The nanoparticles were prepared by adding two amounts of PL, 2 mg and 8 mg, keeping a PL:PLGA ratio of 1:75 and 1:19, respectively.

Particle size (PS), polydispersity index (PDI), Z potential (zP), encapsulation efficiency (%EE), loading capacity (%LC) and morphology of nanoparticles

Both NP and NP+PL were characterized by measuring particle size (PS), polydispersity index (PDI) and Z potential (zP), using a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Worcs, UK). PS and PDI were determined by the dynamic light scattering technique, diluting the suspension of NP or NP+LP with deionized water, using polystyrene cuvettes and a 90° angle. For zP, the preparation was similar, using capillary polystyrene cuvettes and performing the measurement by the electrophoretic light scattering technique. The measurements were made in triplicate for each sample.

Encapsulation efficiency (%EE) and loading capacity (%LC) were calculated using equations 1 and 2, respectively:

$$\%EE = \frac{\text{Initial amount of PL} - \text{Amount of PL in the supernatant}}{\text{Initial amount of PL}} * 100\%$$

Eq. (1)

$$\%LC = \frac{\text{Initial amount of PL} - \text{Amount of PL in the supernatant}}{\text{Total weight of NP}} * 100\%$$

Eq. (2)

Free PL (in the supernatant, including the three wash volumes) was separated by centrifuging the NP+PL suspension at 12,000 rpm for 2.5 h, at 4 °C, using a Hermle Z326 K centrifuge (Germany). Quantification was carried out by UV spectrophotometry at 280 nm, using a previously validated method (data shown in the supplementary material).

The nanoparticles were visualized by scanning electron microscopy (SEM) using a JSM-7600F electron microscope. Samples were prepared by spreading dropwise 25 µl of diluted nanoparticle suspension over a copper grill, drying it at room temperature for 24 h.

Thermal behavior

The nanosystems and the individual components were frozen at -20 °C and were then lyophilized for 24 h at a temperature of -52 °C and a vacuum value of 0.450 mBar in a freeze dryer machine (Labconco FreeZone 2.5, USA). Then, the thermal behavior was analyzed by Differential Scanning Calorimetry (DSC) using a Q20 calorimeter (TA Instruments, New Castle, DE, USA). Briefly, 5 mg of each sample was placed in a Tzero® aluminum pan (TA Instruments, Switzerland), carrying out the analysis under the following conditions: thermal equilibrium at 20°C, isotherm for 3 min and a thermal ramp of 10°C/min until 350°C.

Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy

Once dried by lyophilization, under the conditions set forth in the previous section (*Thermal Behavior*), nanoparticles were placed on a horizontal ATR zinc selenide cell, registering the infrared spectrum of the nanosystems using an infrared equipment ABB-MB3000 FTIR (Quebec, Canada). Measurements represented an average of 150 scans with

a resolution of 16. The infrared spectra for the raw materials of the nanosystems were also obtained. Experiments were performed in triplicate.

Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism (CD) spectroscopy analysis was performed in a J-815 Perkin-Elmer equipment (Jasco Inc., Easton, MD) by placing the sample in a 1 mm cell. The analysis was carried out under the following conditions: standard sensitivity, bandwidth of 1.00 nm, scan speed 10 nm/min, temperature of 25 °C, wavelength from 250 to 195 nm, with intervals of 0.5 nm, registering 110 points for reading. The study was carried out for the PL solution, as well as for the suspension of nanoparticles and for the hydrogels. All systems had the same concentration of PL.

Stability

A sample of 5 ml of each system (NP or NP+PL) was stored at $4.0\text{ °C} \pm 0.1\text{ °C}$, to avoid the instability problems inherent to PL. The stability of the systems was assessed by measuring PS, PDI and zP using the same techniques previously mentioned. Likewise, the PL released from the NP+PL system was quantified in the supernatant after centrifuging the samples at 12,000 rpm for 2.5 h, at 4 °C, using a Hermle Z326 K centrifuge (Germany). Quantification was carried out by UV spectrophotometry at 280 nm (see supplementary material). Stability studies were followed for 3 months. Experiments were performed in triplicate.

Effect of temperature and of wound fluid on particle size (PS)

The effect of both temperature and components of wound fluid (WF) on the nanosystems, was evaluated by measuring PS by dynamic light scattering, according to the procedure described above. In the case of temperature, a ramp from 20 °C to 65 °C was performed. Each measurement was repeated three times for each sample (PL in solution, NP and NP+PL). For the WF effect, 1.0 ml of the nanosystem suspension was exposed for 11 h to 0.3 ml of blood plasma, used as a WF simulator, at 33 °C (average temperature of a wound) [19-20].

In vitro release of PL from NP

A volume of 1 ml of NP+PL suspension was placed inside a dialysis membrane bag composed of Biotech Grade Cellulose Ester with a MWCO of 1,000 kDa (Spectrum® Labs, San Francisco CA, USA). The bag was immersed in 5 ml of PBS solution pH 7.2 at 33 °C, with constant magnetic stirring. For comparison purposes, the release of PL from an aqueous solution was studied. For this, 1 ml of solution containing an amount of PL equivalent to that of the NP suspension was placed in the dialysis bag. The total volume of the receptor medium was withdrawn at pre-set times and it was analyzed by UV spectroscopy at 280 nm (validation parameters presented in the supplementary material). The test was performed in triplicate.

Effect of free and encapsulated PL on a fibroblast culture

In order to confirm if PL maintained its biological activity once incorporated into the NP, *in vitro* studies were carried out in a culture of dermal fibroblasts (ATCC® PCS-201-012 Manassas, VA, USA). The technique for this evaluation was the scratch assay [21], which consisted of diametrically scratching the fibroblast culture using a plastic tip and thereby generating a cell-free space, in which the formulation was placed. The progressive coating of this space by fibroblasts was followed by sequential photographs. The study was conducted by treating fibroblasts with PBS solution, a solution of PL, a NP suspension and the suspension of NP+PL, separately.

2.2.2. Inclusion of NP and NP+PL in a hydrogel

Preparation and characterization

Both NP and NP+PL were included in a thermosensitive polymeric hydrogel (HG) based on Pluronic F-127®. The HG was prepared by the cold method, dissolving a quantity of polymer, equivalent to 20% (w/v), in deionized water at 4 °C under magnetic stirring. The polymer was left to hydrate at that temperature for 24 h until a clear solution was obtained. HGs containing NP or NP+PL were obtained by the same procedure, replacing the deionized water with the NP (NP HG) or the NP+PL suspension (NP+PL HG).

Approximately 75 mg of NP are contained in 100 ml of HG.

Hydrogel viscosity was measured using a Brookfield CAP2000 + L viscometer (Brookfield Engineering Labs., Stoughton, MA, USA). A volume of 50 µl of each hydrogel (HG, NP HG and NP+PL HG) was placed on the flat plate of the equipment. A viscosity profile

versus temperature (from 5 °C to 40 °C) with a ramp of 2 °C/min was performed, with the spindle No. 3 at 50 rpm. The pH of the hydrogels was measured at 4 ± 1 °C, under constant stirring, using a pH meter (Corning 430 New York, USA).

In addition to viscosity measurements as a function of temperature, the sol-gel transition temperature, as well as the time needed to gel, were determined for hydrogels by the following methods: (i) *Determination of the non-flow time*: The time was recorded when the hydrogels, which were in an incubator at 33 °C, did not flow, once the vial containing them was reversed. (ii) *Loss of movement of a magnetic bar*: Magnetic stir bars were introduced into flasks containing the hydrogels. The temperature gradually increased, recording the moment when the bars stopped completely. (iii) *Brownian motion loss temperature*: This was determined by taking advantage of the measurement principle of the dynamic light scattering technique using a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Worcs, UK). PS measurements were made on a ramp from 5 to 30 °C, recording the temperature where the value of PS drops drastically, indicating that the system has gelled and therefore, the equipment was not able to measure PS. (iv) *Micellization temperature*: Thermograms were performed by differential scanning calorimetry (DSC) using a Q20 calorimeter (TA Instruments, New Castle, DE, USA). The analysis was made for the polymer (Pluronic® F-127) and for the different hydrogels, placing approximately 10 mg in Tzero® aluminum pans (TA Instruments, New Castle, DE, USA). The analysis was carried out under the following conditions: sample equilibrium at 0 °C, isotherm for 1 min and a heating ramp of 1 °C/min until 70 °C.

Stability

The stability of the hydrogels, maintained at 4 ± 0.5 °C, was followed for 3 months, observing any physical change and measuring the viscosity at time 0, 7, 15, 30, 60 and 90 days. Additionally, the stability of the PL included in the hydrogels was determined by circular dichroism.

Occlusive effect

Pig skin was assembled in modified Franz cells, filling the receiving chamber with a buffer solution pH 7.2 and extending 100 µl of each hydrogel (containing aprox. 75 µg of NP) on the exposed surface of the skin. The cells were maintained at $33 \text{ °C} \pm 0.5 \text{ °C}$ inside an incubator. After 24 h of contact, and with the complete evaporation of the HG water, the

water loss was measured using a Tewameter® TM-300 (Courage & Khazaka Electronic, Köln, Germany). The results were compared with those obtained with untreated skin.

In vitro release of PL from the hydrogel

A volume of 5 ml of hydrogel containing PL (PL HG) or hydrogel containing PL-loaded nanoparticles (NP+PL HG), was placed in the bottom of a flask and incubated at $33\text{ °C} \pm 0.5\text{ °C}$ until reaching a non-fluid semi-solid state. Then, 2 ml of PBS solution pH 7.2 was carefully added over the hydrogel. The entire volume of PBS was replaced with fresh medium at different time intervals, analyzing its PL content by UV spectroscopy at 280 nm (validation parameters shown in the supplementary material). The test was performed in triplicate.

In vivo evaluation of the NP+PL HG system

The Ethics Committee of Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía-IPN (Mexico), approved animal experimentation (CBE/015/2018), which was carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the official Mexican standard NOM-062-ZOO-1999. A group of seven CD1 mice, from 7 to 9 weeks of age was used. The mice were anesthetized with a ketamine (90 mg/kg)-xylazine (7 mg/kg) cocktail and later, the hair on the back of each mouse was shaved and the surgery was performed. Four punch biopsies were performed to create full-thickness cutaneous wound with 3 mm size in diameter. Then, 5 μL of NP HG, NP+PL HG or PL solution, were deposited on three of the wounds, using the fourth wound as control (without treatment). The wounds were treated by the daily application of the aforementioned formulations, following the evolution of the wounds by means of photographs on days 0, 1, 3, 5, 7 and 10. After that, the wound area was determined using imajeJ® software (version 1.52q, National Institutes of Health, USA), presenting the results graphically.

3. Results and discussion

Preparation and characterization of nanoparticles

Table 1 shows the particle size (PS), polydispersity index (PDI) and Z potential (zP) values for the PL-loaded nanoparticles (NP+PL) and for placebo nanoparticles (NP). Unlike lipid

systems, PLGA produces nanoparticles with more homogeneous sizes, without the need to carry out a subsequent reduction [22-24]. Significantly larger size values were obtained with the inclusion of PL, which was expected, considering that it is a mixture of protein, although in both cases, with and without PL, the nanoparticles showed a low dispersion, as shown by the PDI values obtained. In relation to the zP, a value of approximately -29 ± 1 was obtained for placebo nanoparticles, which may be indicative of a very stable system [23]. However, the incorporation of PL in NPs significantly reduced zP by almost 40%, attributable to the interaction of the polar groups of PL with the carboxyl groups of PLGA. The negative zP values are also attributed to the carboxyl terminal group of PLGA, which is ionized in the aqueous medium [25-26].

Table 2 shows the values of encapsulation efficiency (% EE) and loading capacity (LC) when incorporating two different amounts of PL. As observed, although the % EE decreased when increasing the amount of PL, the LC increased by more than 60%. The reduction in %EE by increasing the amount of PL from 2 mg (drug:polymer ratio 1:75) to 8 mg (drug:polymer ratio 1:19) can be attributed to the saturation of the system, as reported for various nanometric carriers [27-28].

One of the advantages of therapeutic proteins is that very small concentrations have significant pharmacological effects [29]. In the case of PL, previous studies have shown that approximately 100 ng of PL/15000 fibroblasts are required to have an effect on the proliferation and migration of fibroblasts in cell culture (unpublished data). Therefore, considering the loading capacity obtained in this work, the amount of PL is well above the dose required to obtain the proliferative effect necessary for the healing of a wound. It should be noted, that although a low %EE may be expected for the PL, due to the different nature of PLGA (hydrophobic) and PL (hydrophilic), an adequate %EE was achieved thanks to the preparation technique used in this work, which has proven to be useful to increase the %EE of hydrophilic molecules, such as proteins [30-33]. **Considering the above, the 1:19 PL:PLGA ratio was used for the subsequent tests.**

The nanoparticles presented a spherical shape, as shown in SEM images (Figure 1). An increase in particle size was observed when incorporating PL (NP+PL), which corroborates the result obtained by dynamic light scattering (Table 1). The small differences between

dynamic light scattering and microscopy can be attributed to the process of preparation of the sample prior to observation and also to the effect of the electronic source on nanoparticles [34].

A way to assess that PL has been incorporated into NP and thus justify the ability of NP to protect PL from the external factors that it will face within a wound (e.g., pH, temperature, proteases), is the evaluation of its thermal behavior. Figure 2 shows the thermal events for PL, PLGA, the physical mixture of both components, the placebo nanoparticles (NP) and the nanoparticles with PL (NP+PL). In the case of the physical mixture, two signals were observed, one at 44.6 °C, corresponding to PLGA, and the other at 125.3 °C which was associated to the lyophilized PL. Considering that only these two components form the mixture, a shift from 127.8 °C to 125.3 °C in the endotherm associated with the PL, might indicate that there was an interaction between these two components during the mixing procedure. The value of T_g in the NP corresponded to that reported for PLGA 50:50 [35]. The thermogram labeled NP+PL did not show the characteristic signal for PL, which indicated that it was incorporated in NP. The same result has been reported when incorporating a protein in PLGA nanoparticles [36]. The shift of approximately 3 °C in the T_g of NP+PL with respect to the PLGA value, may be related to an interaction between PL and the polymer (just as observed in the case of the physical mixture). Considering the nature of PLGA, it can be thought that the interactions are hydrophobic with some contributions of hydrogen bonds [37-38].

Figure 3 presents the infrared spectra of the raw materials used for the preparation of nanoparticles, as well as the spectra for NP and NP+PL. The arrows in the spectrum for PL are attributed to amide I and amide II characteristic signals, although these bands were not observed in the system marked as NP+PL. This behavior correlates very well with that observed in the calorimetric studies which indicate the incorporation of PL in NP (Figure 2). Another aspect that suggests the encapsulation of PL in NP is the presence of a band around 3286 cm⁻¹ in the system labeled as NP+PL, commonly called amide A, attributed to the -NH group of PL [39-40], which is not observed naturally in the polymer. It should also be noted that one of the main signals of PLGA at 1750 cm⁻¹ corresponding to the carbonyl group (C=O) is clearly observed in both NP and NP+PL.

The results of the stability studies performed for NP and NP+PL, are shown in Table 3. Although no significant differences were found in PS, PDI and zP, neither for NP nor for NP+PL during the three months in which the stability of the nanosystems was evaluated ($p>0.05$); on average 1.9 mg of PL were released (approximately 33% in relation to the initial amount). The release of PL from NP is attributed to the natural diffusion of PL, due to the difference in hydrophilicity between the PLGA and PL [30]. It is worth mentioning that the PL released each time preserved its activity when added to a fibroblast culture (data not shown).

Effect of temperature and wound fluid on the particle size

Changes in the size of PL in solution, NP and NP+PL, were monitored as the temperature increased, without finding significant changes until before 40 °C (Figure 4). It was only after 40 °C that there was an increase in the size of the PL in solution (e.g., from 34 to 47 nm at 44 °C), attributed to protein unfolding and aggregate formation [41]. The PS of unloaded nanoparticles (NP) was not modified as the temperature increased, while the system containing PL (NP+PL) decreased its size as the temperature increased above 40 °C (e.g., approximately from 382 to 323 nm at 44 °C, reaching 276 nm at 55 °C). This decrease can be attributed to the fact that the protein adsorbed on the surface of the nanoparticles, began to desorb going to solution, causing the PS to decrease. However, these changes would not be expected to occur at normal body temperature. Another relevant wound characteristic that has to be taken into account, and that can affect nanoparticles upon their administration, is the presence of a fluid known as wound fluid (WF), resulting from the drainage of blood plasma to the wound site [42]. The results showed that the size of unexposed NP remained constant (approximately 250 nm), while systems exposed to blood plasma (simulating the WF) increased their PS, reaching an average size of 400 nm (Figure 5). This phenomenon can be attributed to the adsorption properties of NPs, which are capable of interacting with blood proteins, resulting in protein-nanoparticle corona formation [43]. The volume of blood plasma used for the study was chosen taking into account the average amount produced per day in a wound of certain dimensions [44], considering of course that the great variability between individuals with

chronic wounds and the pathophysiology of the wound, can cause the amount of WF to be very variable [7].

Effect of free and encapsulated PL on a fibroblast culture

In order to assess that PL maintained its biological activity once incorporated in nanoparticles, and also to corroborate that the conditions of the manufacturing process of nanoparticles did not affect its performance, the effect of the systems on a fibroblasts cell culture was evaluated. As appreciated in Figure 6, after 24 h of contact with the PL solution and NP+PL, the cell-free space generated in the fibroblast cell culture was almost covered, compared to the control (a phosphate buffer solution) and to the NP (unloaded nanoparticles). A slight difference in the appearance of the cell culture was observed for PL and NP+PL regarding the saturation of the zone. This can be attributed to the controlled release of PL when included in NP. Something relevant about this test is that PL retained its biological activity when incorporated into a nanometric system.

Hydrogel-type platform characterization

With the experimental evidence shown so far in this document, nanosystems suffered from drug leakage when they are in suspension (table 3) [45]. Likewise, due to the low viscosity of the NP suspension, its application and residence on the target site becomes difficult, so it is expected that the incorporation of NP into a hydrogel-type platform (HG) can solve these two problems. In addition, the property of Pluronic® F127, as a thermosensitive polymer, allows the platform to be in a fluid form at room temperature (approximately 22 °C), in order to be administered in the form of a spray, and subsequently due to the temperature of the wound (approximately 33.5 °C) it will solidify, allowing the formulation to be retained in the wound area. Another additional advantage of this type of administration is the possibility of avoiding contact with other parts of the body, which minimizes the possibility of contaminating the wound at the time of applying the formulation.

The gelation temperature of the hydrogels and the moment in which this occurs was determined in this work by different techniques, including the measurement of viscosity as the temperature increased. Figure 7A shows the viscosity values of hydrogels with respect to the temperature for HG (without nanoparticles), HG containing unloaded nanoparticles (NP HG) and HG containing PL-loaded nanoparticles (NP+PL HG). As can be seen for the

three profiles, the viscosity increased as the temperature rose, having its highest viscosity value above 32 °C, so it is expected that at the moment of its administration, the hydrogel will gel completely, allowing its permanence on the application site during the PL release period. Although the viscosity began to decrease after 36 to 37 °C, this decrease was not relevant, without causing the HG to spill out of the wound site. The decrease in viscosity at temperatures above 36 °C can be attributed to a relaxation of the polymer chains by thermal agitation, which increase their mobility and therefore the fluidity. The time needed to gel was determined visually, placing the hydrogel in vials, which were kept in an incubator at 33 °C. The moment when the hydrogel did not flow, remaining at the bottom of the vials when they were inverted, was recorded (Figure 7B). The base gel (HG) began to gel earlier (at 5 minutes) than the systems with the nanoparticles (NP HG and NP + PL HG), but all the systems completely lost their fluidity at 10 minutes. In this study, a volume of 500 µl of hydrogel was used in all cases, so if it took between 5 and 10 minutes for this volume to form a gel, it would be expected that for the thin layers that will be deposited on a wound, the non- flow time will be much less.

Other techniques were used in order to identify the point where hydrogels undergo a change from a state of "free" polymer chains to a micellar state, thereby causing hydrogels to have a more rigid structure [46-47]. Among these techniques, calorimetry allowed to follow the micellization process, which for the base hydrogel (HG) occurred at approximately 32 °C, whereas for the systems with nanoparticles (NP HG and NP + PL HG), this point was found below 25 °C (data shown in the supplementary material). It has been reported that the presence of a structure such as nanoparticles within a hydrogel modifies its micellization point to a value lower than that of the base system (without nanoparticles) [47]. Other methods used in this work included the point at which a magnetic bar stopped completely due to the increase in viscosity, meaning that the hydrogel no longer flowed. In this way, the sol-gel transition temperature value was around 28 °C for all the systems. The same phenomenon occurs when carrying out the Brownian motion loss study, in which the size of the systems was monitored by dynamic light scattering at increasing temperatures. In this case, above 27 °C there was a fall to sizes very close to zero, indicative of the loss of

movement and therefore to the loss of fluidity. This phenomenon is explained by the fact that by dynamic light scattering the size is proportional to the Brownian motion rate, so if the latter is lost, the same thing happens with the size value. The results of micellization monitored by calorimetry, as well as those of Brownian motion loss temperature, can be consulted in the supplementary material.

The pH of the intact skin is between 4.0-6.0. This acidic pH is attributed mainly to the presence of an "acid mantle" that has an important contribution on the skin's barrier properties [48]. In the case of wounds, the role of pH (whose value is between 7.15-8.9) has proven to be of fundamental importance during the rehabilitation of chronic wounds [6, 48]. Prolonged chemical acidification of the wound bed, results in an increase of the rate of healing of venous ulcers in the lower extremities. The main explanation for this mechanism is related to the increase in the availability of oxygen, and to the reduction of the histotoxicity of final products of bacteria, among others. It has also been mentioned that the wound fluid (WF) contains a high level of proteases whose activity is extremely sensitive to pH. The peak of activity of proteases is between 7-8 and decreases rapidly in the presence of acidic environments, being enhanced at pH above 7 [49]. In addition, when a wound is maintained in acidic conditions, fibroblasts proliferate more actively [50].

The hydrogels had a pH value between 6.5 and 6.6, which suggests that the activity of proteases may decrease, allowing the release of PL from the nanoparticulate system, and therefore, performing their therapeutic activity with a low probability of being degraded by these enzymes (at least, a slower degradation rate is expected), as demonstrated by Greener B. et al. [49] who noticed that the fall in pH around 6.0 decreases the activity of proteases by 40-90%.

Stability

The stability of the hydrogels was followed for three months, measuring their viscosity and observing the physical changes that could occur. No changes in the viscosity of the systems are reported during this time, nor any noticeable alteration to the naked eye. In addition, the stability of the PL included in the hydrogels was verified by circular dichroism. Figure 8A shows the spectra of HG with and without PL compared with a solution of PL, presenting almost the same spectra profile for PL HG and for PL solution. In addition, with the aim of

corroborating that the proteins of PL maintain their folded structure when exposed to the temperature of the wound, protein denaturation was evaluated by circular dichroism at 222 nm. Figure 8B shows the denaturing curve of PL in solution compared with the hydrogel containing PL (PL HG). As can be observed, when included in HG, PL began its transition from native to denatured, approximately 8 °C later (black dotted arrow) compared to the PL solution (black solid arrow). It can even be observed that 50% of denaturation, with respect to the initial concentration, occurred at about 70 °C for the PL HG (black solid line), which was higher than for the PL solution (57 °C, black dotted line). This agrees with the reports confirming the protection that hydrogels provide to the drugs, among them platelet rich plasma [51-53].

Occlusive effect

When applying a formulation or a dressing on a wound, it is desirable that it generates a semi-occlusive environment, since one of the "natural" forms of recovery of a wound is the autocatalytic activity that degrades dead tissue [54], and this occurs with a certain level of humidity in the damaged area. Below a certain level of humidity, the rate of wound healing slows down and on the other hand, a totally occlusive system favors bacterial growth and even encourage greater proteolytic activity that would degrade endogenous growth factors [55-56]. In this work, the degree of occlusion caused by hydrogels on pig skin *in vitro* was determined by measuring the transepidermal water loss (TEWL). Figure 9 shows the reduction in TEWL with the different hydrogels, in relation to untreated skin (skin without hydrogel). As can be seen, the presence of the base gel (HG) generated a reduction in TEWL of around 20%, while for the gel with placebo nanoparticles (NP HG) and nanoparticles with PL (NP+PL HG), a reduction of around 65 % and 45 % were obtained, respectively, these reductions were significantly different from HG ($p < 0.05$). This behavior is explained by the fact that the presence of nanoparticles (about 75 mg of NP per 100 ml of HG), is expected to limit the moisture loss to a greater extent than when the base hydrogel (HG) is applied. On the other hand, the hydrophilic nature of PL in NP+PL HG, caused a greater attraction of water towards the NP, resulting in a lower percentage of reduction (on average 45 % with respect to the initial value). Therefore, considering that the value of TEWL showed a decrease between 45 and 65% in the case of hydrogels with

nanoparticles, it can be thought that the systems exert a semi-occlusive effect on the skin, because they only partially block the loss of transepidermal water. This could represent another advantage in addition to those already mentioned for the system proposed in this work.

In vitro delivery of PL from the systems

In Figure 10, the release profiles of all the systems prepared in this work, including the PL in solution, used as reference can be compared. As expected, the release of PL from the solution was immediate, reaching 23% at 30 minutes and having practically released 100% at 3 h. When the PL was formulated in the hydrogel (PL HG) it diffused steadily over time, without a lag time. The release reaches 98% at 12 h. From the nanoparticles (NP + PL), the release presented a lag time, quantifying the PL in the receptor medium at 3 h. As with the hydrogel, the release profile of the PL from the nanoparticles was constant and was completed at 13 h with an average of 94% released. Therefore, with both systems a sustained release was achieved for 12 h. When evaluating the release of the complete system (NP+PL HG) there was a lag time greater than with the NP+PL system, quantifying PL in the receptor solution after 5 h. The release was constant until 13 h with approximately 75 % released, decreasing the release rate from this time, but continuing until 24 h when 96% was reached. This decrease in the release rate can be attributed to the depletion of the drug in the system, which reduces the flow. In the latter case, the PL has to cross two barriers to reach the target site: the polymeric layer of NP and subsequently the platform structure of HG, which allows prolonging the release for 24 h. The results obtained coincide with reports that show a sustained and controlled release when formulating growth factors in nanoparticles [3, 57], in hydrogels [3, 53, 58] or with the combination of carriers and hydrogels [59].

In vivo evaluation of the NP+PL HG system

The effect of PL on wound closure, both in its free form (in solution) and included in the system (NP+PL HG), was evaluated by a cutaneous excisional wound-healing model. In order to contrast the effect, a control (wound without treatment) and a placebo formulation (NP HG) were also monitored. Images of representative wounds of the mice from days 0, 1, 3, 5, 7 and 10 are presented in Figure 11A and 11B. As shown, on day 3, only slight

differences were found among the wounds. However, on day 5, wounds treated with PL (PL solution) and NP+PL HG, as well as the placebo formulation (NP HG), showed a rather slight progress in wound closure. This can be attributed to the proliferative and migration effects of PL, but also to the protective and moisturizing effect provided by the NP HG system as such. Some authors attribute the progress in wound regeneration to lactate produced by the degradation of PLGA, which accelerates angiogenesis and activates pro-collagen factors [3]; however, in our case is risky to ensure this, due to the short contact time. The changes in the area of the wound were recorded in the graph that appears in Figure 11C, where it can be seen that on day 5 there are already significant differences ($p < 0.05$) between the NP+PL HG system and the other systems, the wound disappearing with this treatment from day 7. These *in vivo* data suggest that PL application using nanoparticles to prevent its degradation, and incorporated into a hydrogel to improve its application and retention, and forming a semi-occlusive protective film, accelerates wound closure, having shown to be more effective than PL in solution [55]. It is important to notice that the PL solution also improved wound healing, nonetheless, the appreciation of the wounded place was still visible at day 10. This can be attributed to the fact that PL in solution will be more susceptible to degradation by proteases and pH in a chronic wound [56], while the complete system allowed a closer contact, for a longer time with the affected site, releasing PL in a sustained manner. No clinically significant weight loss or evidence of infection in any mouse were appreciated throughout the study period.

The results found in this work coincide with that reported by other authors in relation to an increase in cell proliferation and a faster wound recovery by including biomolecules participating in the tissue regeneration process, in some type of carrier (e.g., micro-nanoparticle or hydrogel) as reported by Chu et al. [57], who demonstrate that encapsulation of rhEGF in PLGA nanoparticles stimulates cell proliferation and reduces healing time. Fontana et al. [14], who loaded platelet lysate into porous silicon microparticles finding a greater proliferative effect and an effective, but short lasting acidophilia of the collagen fibres, a sign of regeneration. Other authors found that the inclusion of platelet-rich plasma in a gel promoted the proliferation of fibroblasts [51-53]. As discussed so far in this document, the prepared system constitutes a potentially valuable alternative for the treatment of wounds.

Conclusions

A smart thermo-reversible system was prepared, containing PLGA nanoparticles loaded with a platelet lysate, intended for the treatment of chronic wounds. Polymeric nanoparticles were characterized by particle size, Z potential, polydispersity index and encapsulation efficiency, showing adequate technological characteristics for the purpose of the study and guaranteeing the dose necessary to achieve a therapeutic effect. The inclusion of the lysate in the particles was corroborated by means of techniques such as infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. It was found that the lysate included in the particles enhances the repair effect on a culture of fibroblasts, promoting cell migration and proliferation.

The inclusion of the nanoparticles in the thermo-reversible gel offers multiple advantages such as the following: (i) Easy administration, as it can be applied in the form of a spray, which on contact with the site forms a protective film on the wound. (ii) **The release is prolonged for up to 24 h, which guarantees the gradual release of the lysate during this time.** (iii) It provides a semi-occlusive effect, forming a protective barrier that keeps a certain degree of humidity, but which allows an adequate gaseous exchange.

The results of the *in vitro* studies with which the properties of this system were evaluated, are very promising, and are supported by the *in vivo* tests performed in mice, where a faster tissue regeneration was observed when applying the complete system (NP+PL HG).

Declarations of interest: none

Acknowledgments

The authors would like to thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the scholarship provided to Bernal-Chávez. The authors also thank Dr. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza (Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía-IPN) for her generous support during circular dichroism analysis and Prof. Crisóforo Mercado Márquez (Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán) for supporting the *in vivo* studies.

Funding

This work was supported by the PAPIIT IN226119 project (DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México) and PIAPI1803 (Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México).

Credit Author Statement

This was the contribution of each author during the development of this work:

Sergio A Bernal-Chávez - Development of the bulk of the experimental part: Preparation and characterization of the nanoparticles including the platelet lysate. Inclusion of the nanoparticles in the hydrogel. Characterization of the hydrogel. *In vivo* studies.

Sergio Alcalá-Alcalá - Micrographies. Support for the release studies and transepidermal water loss tests.

Doris Cerecedo - Obtaining the platelet lysate. Evaluation of the effect on fibroblasts. Support the protocol for *in vivo* studies.

Adriana Ganem-Rondero - Proposal, administration of the project and planning of activities. Analysis of results and revision of the manuscript.

References

[1] P. Chandika, S.C. Ko, W.K. Jung, Marine-derived biological macromolecule-based biomaterials for wound healing and skin tissue regeneration, *International journal of biological macromolecules*, 77 (2015) 24-35.

[2] G. Han, R. Ceilley, Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments, *Adv Ther*, 34 (2017) 599-610.

[3] G. Gainza, S. Villullas, J.L. Pedraz, R.M. Hernandez, M. Igartua, Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration, *Nanomedicine*, 11 (2015) 1551-1573.

[4] D. Chouhan, N. Dey, N. Bhardwaj, B.B. Mandal, Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances, *Biomaterials* 216 (2019) 119267.

[5] S. Barrientos, O. Stojadinovic, M.S. Golinko, H. Brem, M. Tomic-Canic, Growth factors and cytokines in wound healing, *Wound Repair Regen*, 16 (2008) 585-601.

[6] S.L. Percival, S. McCarty, J.A. Hunt, E.J. Woods, The effects of pH on wound healing, biofilms, and antimicrobial efficacy, *Wound Repair Regen*, 22 (2014) 174-186.

[7] K.F. Cutting, Wound exudate: composition and functions, *Br J Community Nurs*, 8 (2003) suppl 4-9.

[8] I. Garcia-Orue, J.L. Pedraz, R.M. Hernandez, M. Igartua, Nanotechnology-based delivery systems to release growth factors and other endogenous molecules for chronic wound healing, *J. Drug Deliv. Sci. Tec.* 42 (2017) 2-17.

[9] Y.D. Shanskii, N.S. Sergeeva, I.K. Sviridova, M.S. Kirakozov, V.A. Kirsanova, S.A. Akhmedova, A.I. Antokhin, V.I. Chissov, Human platelet lysate as a promising growth-

stimulating additive for culturing of stem cells and other cell types, *Bull Exp Biol Med*, 156 (2013) 146-151.

[10] V.E. Santo, E.G. Popa, J.F. Mano, M.E. Gomes, R.L. Reis, Natural assembly of platelet lysate-loaded nanocarriers into enriched 3D hydrogels for cartilage regeneration, *Acta Biomater*, 19 (2015) 56-65.

[11] E. Dellera, M.C. Bonferoni, G. Sandri, S. Rossi, F. Ferrari, C. Del Fante, C. Perotti, P. Grisoli, C. Caramella, Development of chitosan oleate ionic micelles loaded with silver sulfadiazine to be associated with platelet lysate for application in wound healing, *Eur J Pharm Biopharm*, 88 (2014) 643-650.

[12] V.E. Santo, M.E. Gomes, J.F. Mano, R.L. Reis, Chitosan-chondroitin sulfate nanoparticles for controlled delivery of platelet lysates in bone regenerative medicine, *J Tissue Eng Regen Med*, 6 Suppl 3 (2012) s47-59.

[13] N. Fekete, M. Gadelorge, D. Furst, C. Maurer, J. Dausend, S. Fleury-Cappellesso, V. Mailander, R. Lotfi, A. Ignatius, L. Sensebe, P. Bourin, H. Schrezenmeier, M.T. Rojewski, Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components, *Cytotherapy*, 14 (2012) 540-554.

[14] F. Fontana, M. Mori, F. Riva, E. Makila, D. Liu, J. Salonen, G. Nicoletti, J. Hirvonen, C. Caramella, H.A. Santos, Platelet Lysate-Modified Porous Silicon Microparticles for Enhanced Cell Proliferation in Wound Healing Applications, *ACS Appl Mater Interfaces*, 8 (2016) 988-996.

[15] E. Ranzato, M. Patrone, L. Mazzucco, B. Burlando, Platelet lysate stimulates wound repair of HaCaT keratinocytes, *Br J Dermatol*, 159 (2008) 537-545.

[16] A.B. Shekhter, T.G. Rudenko, L.P. Istranov, A.E. Guller, R.R. Borodulin, A.F. Vanin, Dinitrosyl iron complexes with glutathione incorporated into a collagen matrix as a base for the design of drugs accelerating skin wound healing, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 78 (2015) 8-18.

[17] V.E.Santo, A.R.C. Duarte, E.G. Popa, M.E. Gomes, J.F. Mano, R.L. Reis , Enhancement of osteogenic differentiation of human adipose derived stem cells by the controlled release of platelet lysates from hybrid scaffolds produced by supercritical fluid foaming, *J Control Release* 162 (2012) 19-27.

[18] P. Fonte, F. Araujo, V. Seabra, S. Reis, M. van de Weert, B. Sarmiento, Co-encapsulation of lyoprotectants improves the stability of protein-loaded PLGA nanoparticles upon lyophilization, *Int J Pharm*, 496 (2015) 850-862.

[19] N.J. Trengove, S.R. Langton, M.C. Stacey, Biochemical analysis of wound fluid from nonhealing and healing chronic leg ulcers, *Wound Repair Regen*, 4 (1996) 234-239.

- [20] V. Dini, P. Salvo, A. Janowska, F. Di Francesco, A. Barbini, M. Romanelli, Correlation Between Wound Temperature Obtained With an Infrared Camera and Clinical Wound Bed Score in Venous Leg Ulcers, *Wounds*, 27 (2015) 274-278.
- [21] C.C. Liang, A.Y. Park, J.L. Guan, In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro, *Nat Protoc*, 2 (2007) 329-333.
- [22] A. Sahin, G. Esendagli, F. Yerlikaya, S. Caban-Toktas, D. Yoyen-Ermis, U. Horzum, Y. Aktas, M. Khan, P. Couvreur, Y. Capan, A small variation in average particle size of PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation leads to considerable change in nanoparticles' characteristics and efficacy of intracellular delivery, *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 45 (2017) 1657-1664.
- [23] S. Mura, H. Hillaireau, J. Nicolas, B. Le Droumaguet, C. Gueutin, S. Zanna, N. Tsapis, E. Fattal, Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells, *Int J Nanomedicine*, 6 (2011) 2591-2605.
- [24] E. Elizondo, E. Moreno, I. Cabrera, A. Cordoba, S. Sala, J. Veciana, N. Ventosa, Liposomes and other vesicular systems: structural characteristics, methods of preparation, and use in nanomedicine, *Prog Mol Biol Transl Sci*, 104 (2011) 1-52.
- [25] F. Danhier, E. Ansorena, J.M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Preat, PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications, *J Control Release*, 161 (2012) 505-522.
- [26] L.R. Tefas, I. Tomuta, M. Achim, L. Vlase, Development and optimization of quercetin-loaded PLGA nanoparticles by experimental design, *Clujul Med*, 88 (2015) 214-223.
- [27] K. Goke, H. Bunjes, Carrier characteristics influence the kinetics of passive drug loading into lipid nanoemulsions, *Eur J Pharm Biopharm*, 126 (2018) 132-139.
- [28] J. Sun, F. Wang, Y. Sui, Z. She, W. Zhai, C. Wang, Y. Deng, Effect of particle size on solubility, dissolution rate, and oral bioavailability: evaluation using coenzyme Q(1)(0) as naked nanocrystals, *Int J Nanomedicine*, 7 (2012) 5733-5744.
- [29] S. Mitragotri, P.A. Burke, R. Langer, Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies, *Nat Rev Drug Discov*, 13 (2014) 655-672.
- [30] K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni, W.E. Rudzinski, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *J Control Release*, 70 (2001) 1-20.
- [31] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, *Polymers (Basel)*, 3 (2011) 1377-1397.
- [32] M. Nabi-Meibodi, A. Vatanara, A.R. Najafabadi, M.R. Rouini, V. Ramezani, K. Gilani, S.M. Etemadzadeh, K. Azadmanesh, The effective encapsulation of a hydrophobic

lipid-insoluble drug in solid lipid nanoparticles using a modified double emulsion solvent evaporation method, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 112 (2013) 408-414.

[33] A. Patel, R. Gaudana, A.K. Mitra, A novel approach for antibody nanocarriers development through hydrophobic ion-pairing complexation, *J Microencapsul*, 31 (2014) 542-550.

[34] S. Bibi, R. Kaur, M. Henriksen-Lacey, S.E. McNeil, J. Wilkhu, E. Lattmann, D. Christensen, A.R. Mohammed, Y. Perrie, Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM, *Int J Pharm*, 417 (2011) 138-150.

[35] B.S. Zolnik, D.J. Burgess, Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release, *J Control Release*, 122 (2007) 338-344.

[36] M. Azizi, F. Farahmandghavi, M. Joghataei, M.I. Mojgan Zandi, M. Bakhtiary, F.A. Dorkoosh, F. Ghazizadeh, Fabrication of protein-loaded PLGA nanoparticles: effect of selected formulation variables on particle size and release profile, *J Polym Res*, 20 (2013) 110.

[37] K.S. Yadav, K.K. Sawant, Formulation optimization of etoposide loaded PLGA nanoparticles by double factorial design and their evaluation, *Curr Drug Deliv*, 7 (2010) 51-64.

[38] K. Miladia, S. Sfar, H. Fessi, A. Elaissari, Encapsulation of alendronate sodium by nanoprecipitation and double emulsion: From preparation to in vitro studies, *Industrial Crops and Products*, 72 (2015) 24-33.

[39] A. Barth, Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim Biophys Acta*, 1767 (2007) 1073-1101.

[40] J. Kong, S. Yu, Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 39 (2007) 549-559.

[41] C.J. Roberts, Protein aggregation and its impact on product quality, *Curr Opin Biotechnol*, 30 (2014) 211-217.

[42] L. Staiano-Coico, P.J. Higgins, S.B. Schwartz, A.J. Zimm, J. Goncalves, Wound fluids: a reflection of the state of healing, *Ostomy Wound Manage*, 46 (2000) 85S-93S; quiz 94S-95S.

[43] C. Fornaguera, G. Caldero, M. Mitjans, M.P. Vinardell, C. Solans, C. Vauthier, Interactions of PLGA nanoparticles with blood components: protein adsorption, coagulation, activation of the complement system and hemolysis studies, *Nanoscale*, 7 (2015) 6045-6058.

[44] S. Thomas, Assessment and management of wound exudate, *J Wound Care*, 6 (1997) 327-330.

- [45] T. Hernandez-Caselles, J. Villalain, J.C. Gomez-Fernandez, Stability of liposomes on long term storage, *J Pharm Pharmacol*, 42 (1990) 397-400.
- [46] S. Nie, W.L. Hsiao, W. Pan, Z. Yang, Thermoreversible Pluronic F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies, *Int J Nanomedicine*, 6 (2011) 151-166.
- [47] M.R. Matanovic, J. Kristl, P.A. Grabnar, Thermoresponsive polymers: insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications, *Int J Pharm*, 472 (2014) 262-275.
- [48] L.A. Schneider, A. Korber, S. Grabbe, J. Dissemond, Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy?, *Arch Dermatol Res*, 298 (2007) 413-420.
- [49] B. Greener, A.A. Hughes, N.P. Bannister, J. Douglass, Proteases and pH in chronic wounds, *J Wound Care*, 14 (2005) 59-61.
- [50] Y. Liu, A. Kalen, O. Risto, O. Wahlstrom, Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent, *Wound Repair Regen*, 10 (2002) 336-340.
- [51] N.K. Selvan, T.S. Shanmugarajan, V.N.V.A. Uppuluri, Hydrogel based scaffolding polymeric biomaterials: Approaches towards skin tissue regeneration, *J. Drug Deliver. Sci. Tec.* 55 (2020) 101456.
- [52] M. Samberg, R. Stone, S. Natesan, A. Kowalczewski, S. Becerra, N. Wrice, A. Cap, R. Christy, Platelet rich plasma hydrogels promote in vitro and in vivo angiogenic potential of adipose-derived stem cells, *Acta Biomater.* 87 (2019)76-87.
- [53] E. Jain, S. Sheth, A. Dunn, S.P. Zustiak, S.A. Sell, Sustained release of multicomponent platelet-rich plasma proteins from hydrolytically degradable PEG hydrogels, *J. Biomed. Mater. Res. A.* 105 (2017) 3304-3314.
- [54] H. Zhai, H.I. Maibach, Effect of Occlusion and Semi-occlusion on Experimental Skin Wound Healing: A Reevaluation, *Wounds*, 19 (2007) 270-276.
- [55] M.B. Dreifke, A.A. Jayasuriya, A.C. Jayasuriya, Current wound healing procedures and potential care, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 48 (2015) 651-662.
- [56] S.M. McCarty, S.L. Percival, Proteases and Delayed Wound Healing, *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2 (2013) 438-447.
- [57] Y. Chu, D. Yu, P. Wang, J. Xu, D. Li, M. Ding, Nanotechnology promotes the full-thickness diabetic wound healing effect of recombinant human epidermal growth factor in diabetic rats, *Wound Repair Regen.* 18 (2010) 499-505.
- [58] G. Dumortier, J.L. Grossiord, F. Agnely, J.C. Chaumeil, A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics, *Pharm Res*, 23 (2006) 2709-2728.

[59] M.P. Ribeiro, P.I. Morgado, S.P. Miguel, P. Coutinho, I.J. Correia. Dextran-based hydrogel containing chitosan microparticles loaded with growth factors to be used in wound healing. *Mater Sci Eng C* 33 (2013) 2958-66.

Journal Pre-proof

FIGURE CAPTIONS

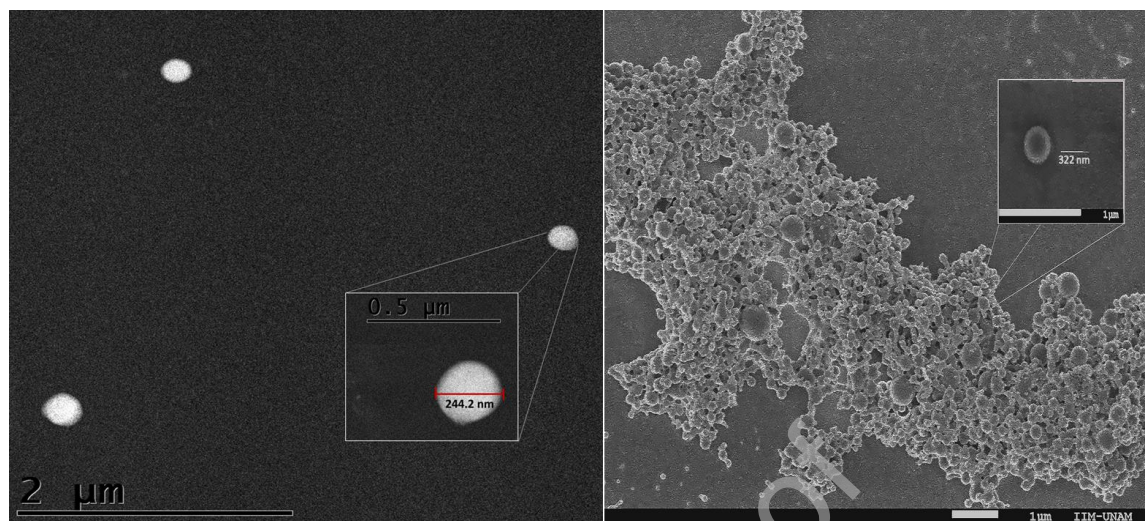


Figure 1. SEM micrographs for NP (left) and NP+PL (right). The square shows a representative nanoparticle of each group with its particle size value in nm.

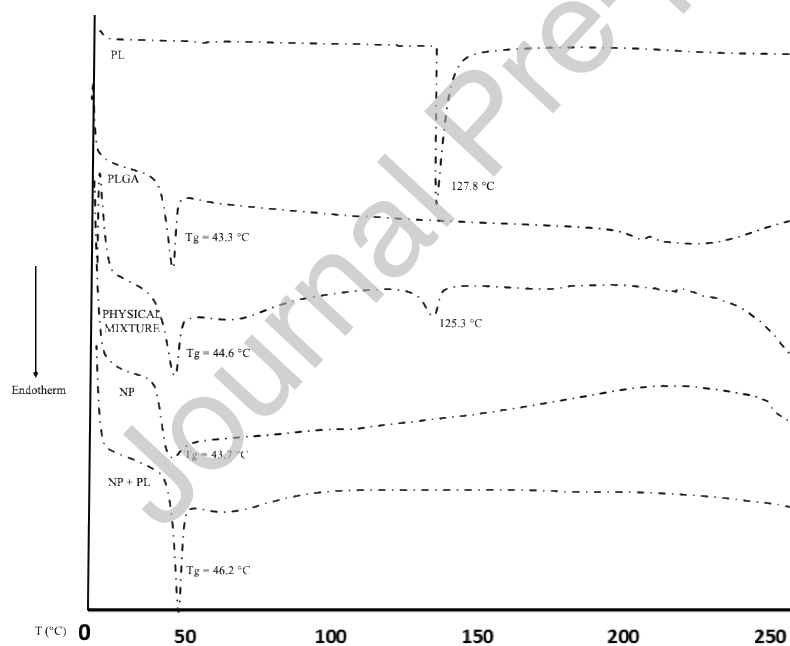


Figure 2. Thermograms obtained with the raw materials, the physical mixture, NP and NP+PL.

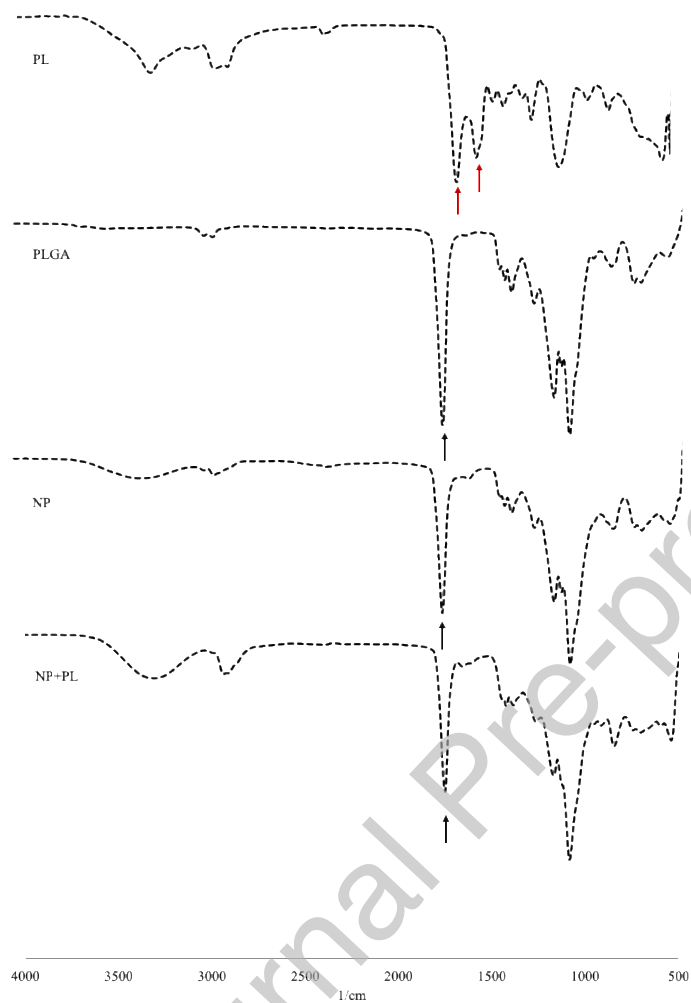


Figure 3. Infrared spectra for raw materials, NP and NP+PL

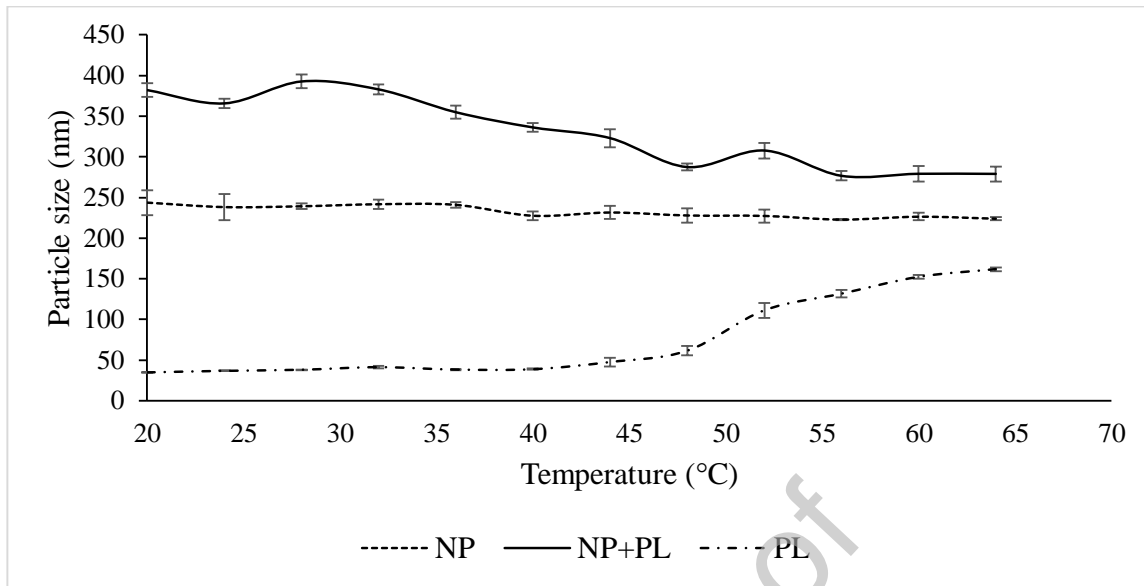


Figure 4. Effect of temperature on the size of PL in solution, NP and NP+PL

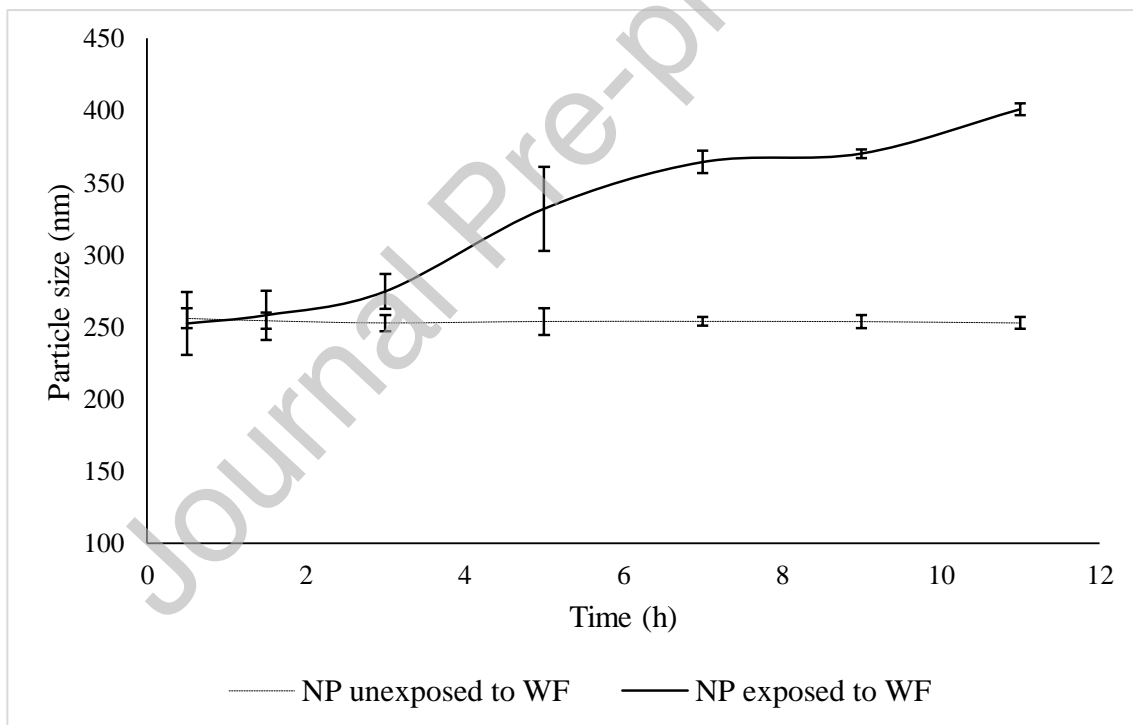


Figure 5. Effect of exposure time of wound fluid (WF) on the particle size of NP. Blood plasma was used as a WF simulator. A temperature of 33 °C was maintained during the measurement.

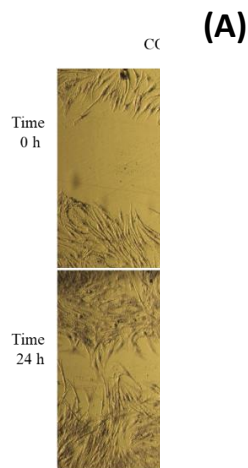
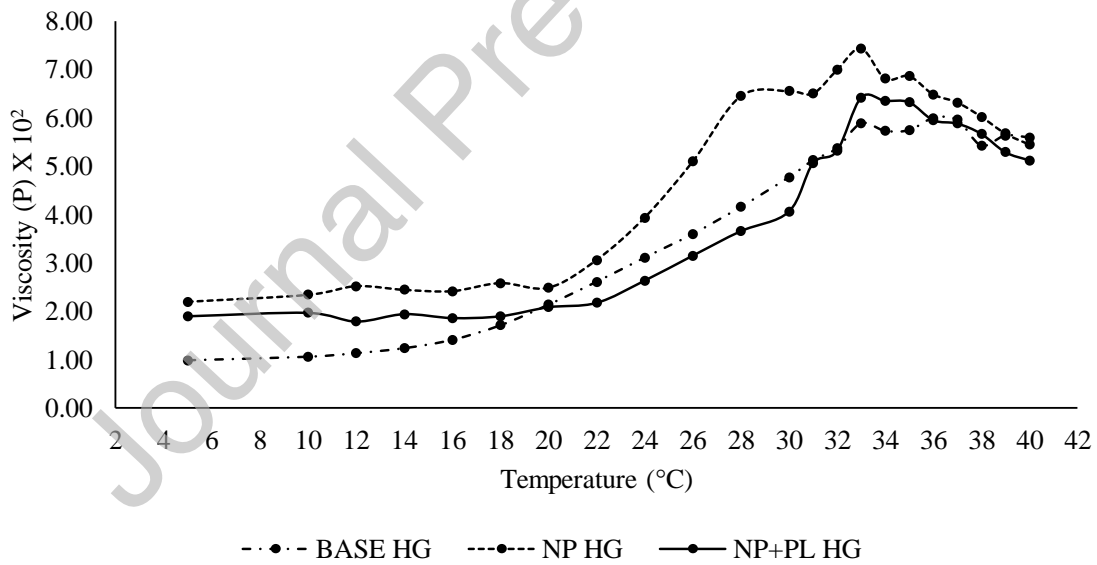


Figure 6. In vitro evaluation of the effect of PL in solution, NP and NP + PL on a scratched fibroblasts cell culture. The upper images correspond to the scratched fibroblasts before applying the formulations, and the ones below are the resulting images after 24 h in contact with the formul (B) Control was a PBS solution.



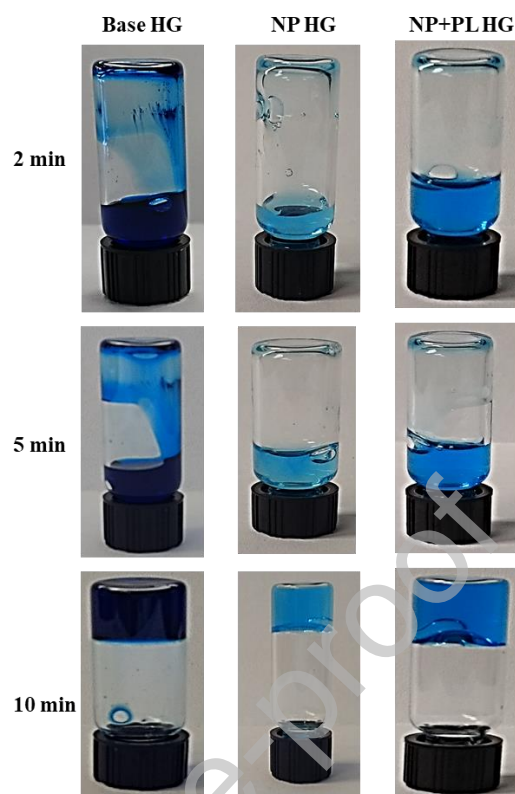


Figure 7. (A) Viscosity profiles for hydrogels versus temperature changes. (B) Non-flow time of the different HG at 33.5 °C. A blue dye was added in order to more clearly visualize the hydrogel. Base = without nanosystem (HG); HG containing unloaded nanoparticles (NP HG); HG containing PL-loaded NP (NP+PL HG). P=Poise.

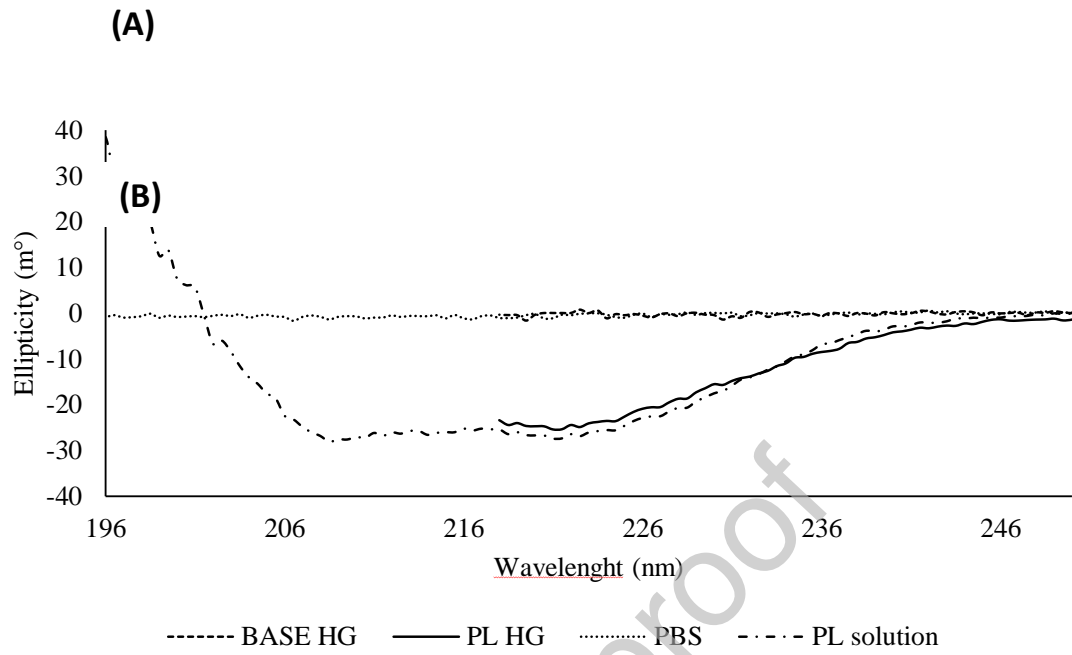
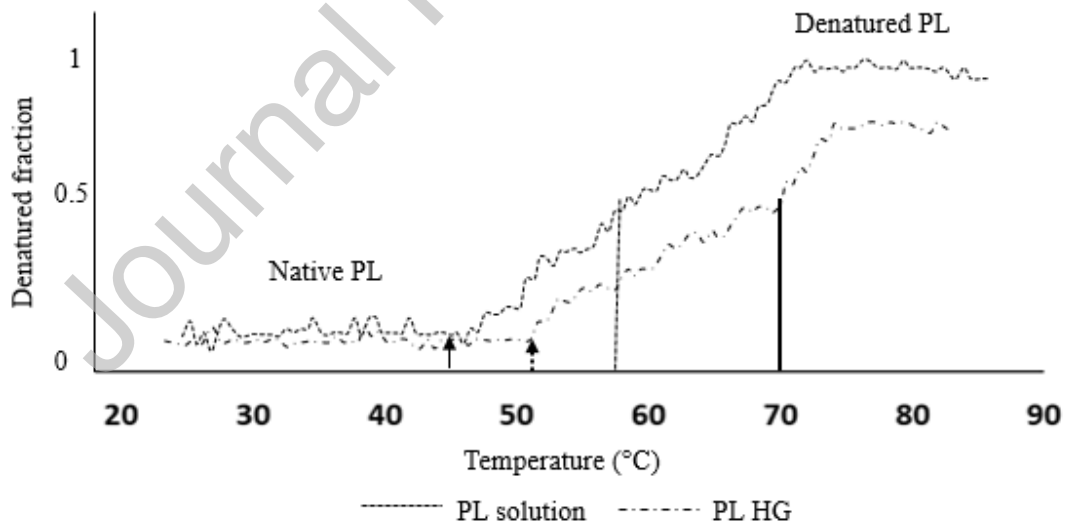


Figure 8. (A) Circular dichroism spectra for a PBS solution, platelet lisate in PBS solution



(PL solution), hydrogel (Base HG), and hydrogel containing PL (PL HG); (B) Denaturing profiles for the PL solution and PL HG.

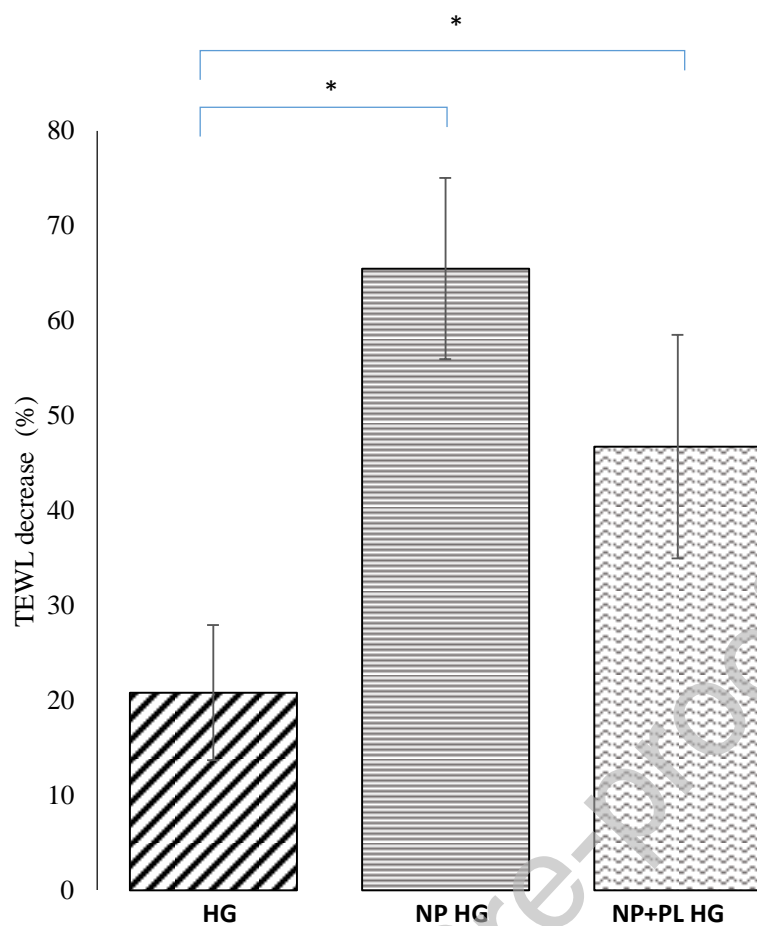


Figure 9. Decrease in transepidermal water loss (TEWL) for pigskin exposed to HG systems. Hydrogel without nanosystem (HG); HG containing unloaded nanoparticles (NP HG); HG containing PL-loaded NP (NP+PL HG). Error bars represent confidence intervals with $\alpha=0.05$ ($n=8$). * $p<0.05$.

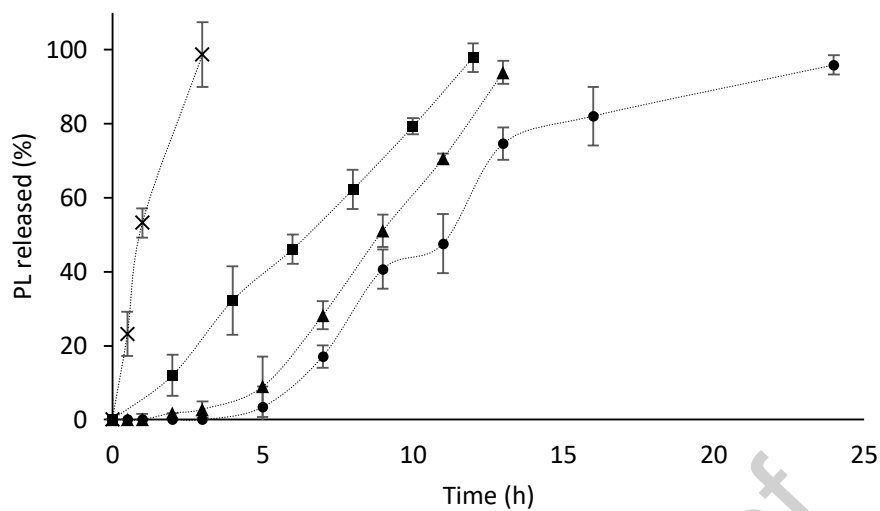


Figure 10. Release profiles of PL from different systems: (●) NP+PL HG: hydrogel containing PL-loaded nanoparticles; (■) PL HG: hydrogel containing PL; (▲) NP+PL: PL-loaded nanoparticles; (×) PL in solution. The graph was constructed with the averages of three replicates (n=3). Error bars represent the standard deviation.

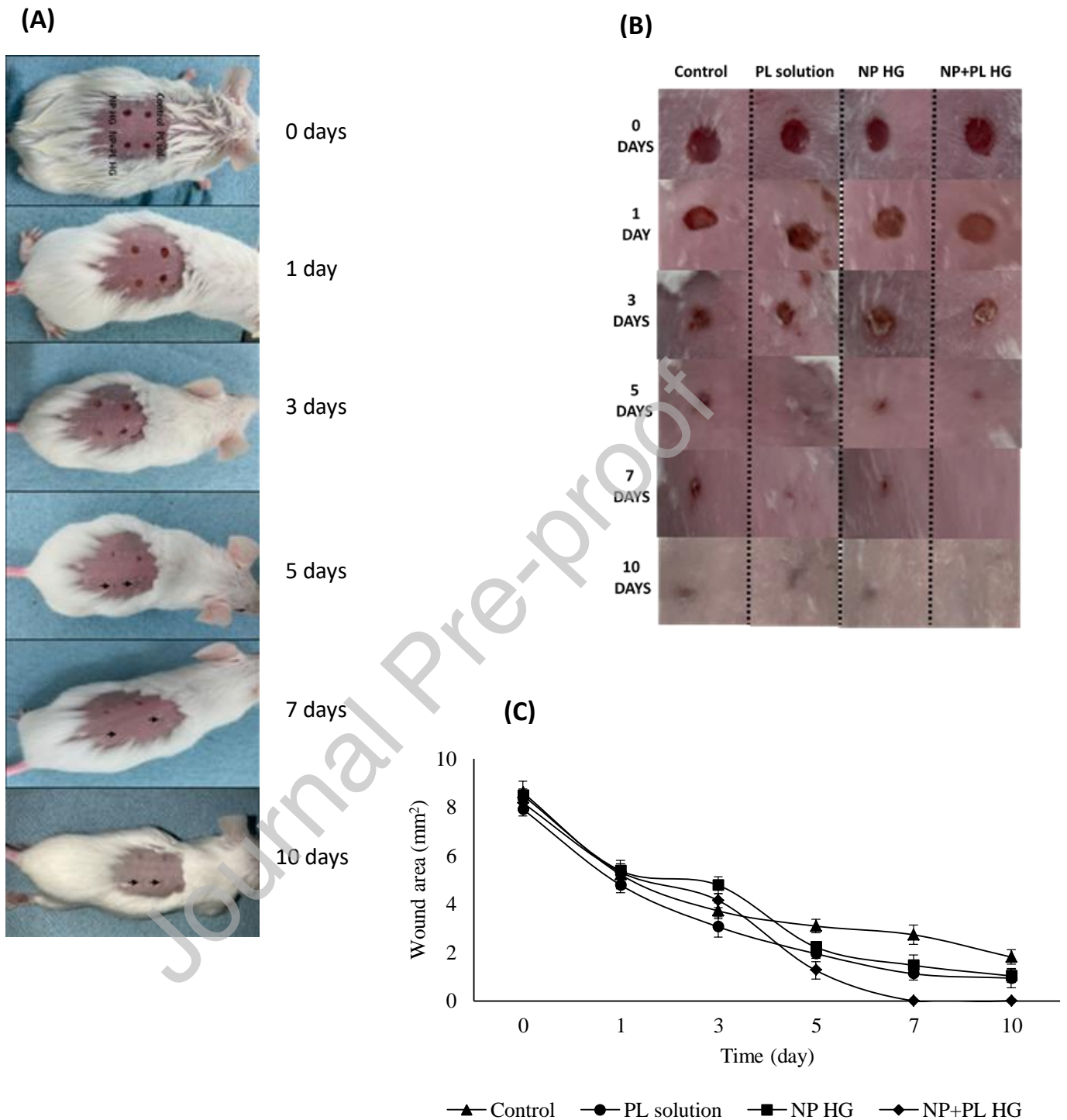


Figure 11. (A) and (B) are representative images of the evolution of the four full-thickness wounds caused to mice, as a function of time, for each treatment. The arrowheads indicate the original wound places for PL solution and for NP+PL HG. (C) Graph showing the excisional wound-closure area in the dorsal region of mice during different treatment days. Platelet lisate in PBS solution (PL solution); HG containing unloaded nanoparticles (NP

HG); HG containing PL-loaded NP (NP+PL HG). Control: wound without treatment. Data are presented as mean \pm standard deviation.

Graphical abstract

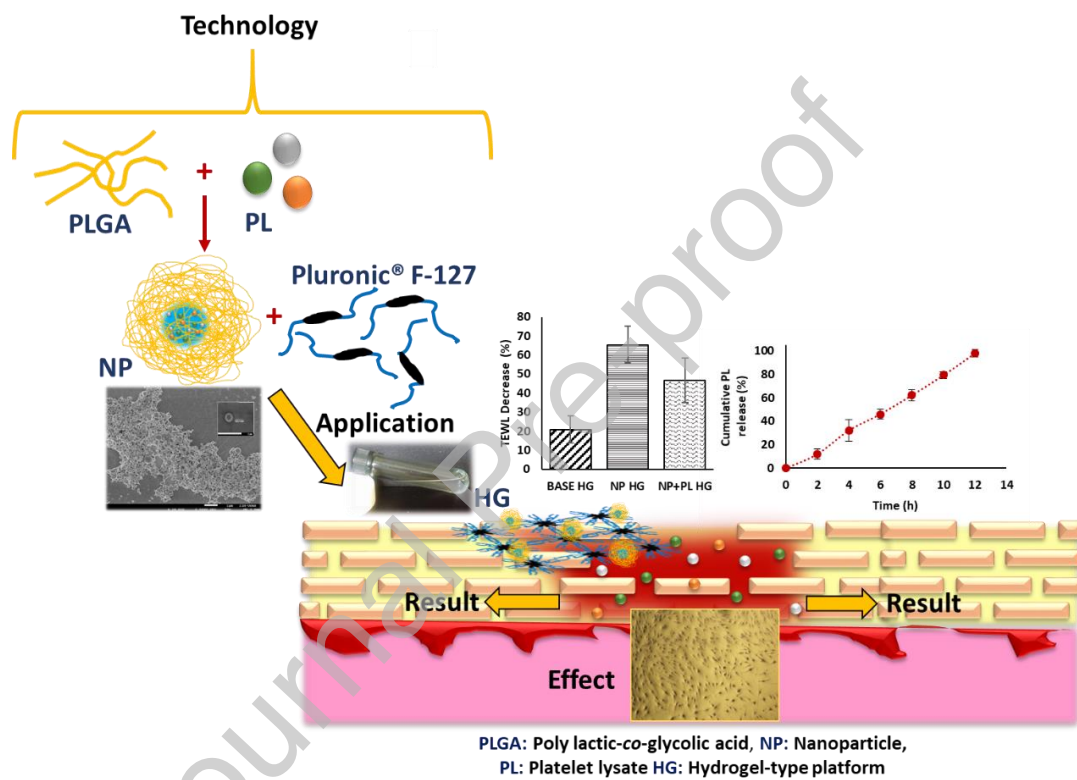


Table 1. Values of particle size (PS), polydispersity index (PDI) and Z potential (zP) for nanoparticles (NP+PL)^a

	NP	NP+PL
PS (nm)	267.0 ± 10.5	317.9 ± 18.2*
PDI	0.103 ± 0.026	0.298 ± 0.023*
zP (mV)	-29.1 ± 1.0	-17.6 ± 1.8*

plain nanoparticles (NP) and loaded

^a PL:PLGA ratio 1:19. *p < 0.05 after addition of PL (n = 6).

Table 2. Values of encapsulation efficiency (% EE) and loading capacity (LC) for the nanoparticle suspensions prepared with two different amounts of platelet lysate (PL).

PL added (mg)	PL:PLGA ratio	%EE	LC ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
2	1:75	90.3 \pm 4.4	12.0 \pm 3.1
8	1:19	60.1 \pm 3.7*	32.0 \pm 2.9*

*p < 0.05 after increasing the amount of PL (n = 6)

Journal Pre-proof

Table 3. Stability studies for NP and NP+PL at 4.0 °C ± 0.1 (n = 3)

		0 days	7 days	15 days	1 month	2 months	3 months
PS (nm)	NP	264.7 ± 12.2	261.0 ± 12.8	266.3 ± 26.2	262.7 ± 18.3	252.3 ± 10.2	256.7 ± 13.4
	NP+PL	333.1 ± 25.8	335.5 ± 13.9	307.0 ± 26.9	317.4 ± 23.0	343.7 ± 9.8	328.1 ± 20.2
PDI	NP	0.101 ± 0.024	0.116 ± 0.059	0.097 ± 0.044	0.091 ± 0.053	0.065 ± 0.128	0.088 ± 0.098
	NP+PL	0.307 ± 0.024	0.285 ± 0.015	0.314 ± 0.014	0.316 ± 0.014	0.291 ± 0.010	0.284 ± 0.016
ZP (mV)	NP	-30.0 ± 1.52	-28.2 ± 1.27	-28.6 ± 2.07	-27.0 ± 2.51	-26.7 ± 1.03	-26.4 ± 2.09
	NP+PL	-17.4 ± 0.66	-18.3 ± 1.12	-19.5 ± 1.50	-16.5 ± 1.87	-16.1 ± 0.50	-16.4 ± 0.70
PL (mg)	NP	---	---	---	---	---	---
	NP+PL	5.68 ± 0.18	4.82 ± 0.56	4.01 ± 0.34	4.30 ± 0.11	4.0 ± 0.14	3.81 ± 0.21

PS = Particle size; PDI = polydispersity index; zP = Z potential; PL = Platelet lysate amount; NP = Placebo nanoparticles; NP+PL = PL-loaded nanoparticles.



Tetraphenylporphyrin intended for use in photodynamic therapy: Influence of sonophoresis and the formulation (solution or microemulsion) on percutaneous penetration



R.I.Y. Quiroz-Segoviano^a, M.A. García-Sánchez^b, N.L. Delgado-Buenrostro^c, Y.I. Chirino^c, S. Bernal-Chávez^a, M.G. Nava-Arzaluz^a, A. Ganem-Rondero^{a,*}

^a División de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 1o de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, 54740, Estado de México, Mexico

^b Department of Chemistry, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Vicentina, Cd. de México, 09340, Mexico

^c Laboratorio 10, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios Número 1, Colonia Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, C.P. 54090, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Tetraphenylporphyrin
Photodynamic therapy
Microemulsion
Sonophoresis
Percutaneous penetration
Confocal microscopy

ABSTRACT

Tetraphenylporphyrin (H₂TPP), was synthesized and characterized by UV and FTIR spectroscopy. H₂TPP was included in a solution (Labrasol™:Transcutol™ 1:2 v/v) and in a microemulsion (whose composition was chosen from the construction of pseudo-ternary diagrams). Permeation experiments were performed with these two systems through intact skin and skin pretreated with sonophoresis. Confocal laser scanning microscopy was useful to evidence that in all cases, H₂TPP penetrated the interior of the skin, increasing the amount that penetrates when the skin was treated with sonophoresis, especially for the combination sonophoresis/microemulsion, with which the highest permeated amount was achieved. In no case, H₂TPP was found in the receptor medium, which may be desirable if the aim is to reduce a systemic effect. The results obtained suggest that the proposed systems have potential application in photodynamic therapy, whose effectiveness depends on the penetration and accumulation of photosensitizer in the affected tissue.

1. Introduction

Porphyryns are naturally occurring compounds with a very wide range of biological properties including anti-inflammatory, antimicrobial, antiviral and antifungal properties [1–4].

Due to its interesting properties, porphyryns have found various applications in the field of medicine, especially as photosensitizers in photodynamic therapy, as imaging probes and as oxygen carriers [3–7]. Metal-free bases of porphyryns exhibit intense fluorescence from 600 to 730 nm, wavelength range in which a deeper radiation penetration into living tissues occurs and corresponds to the laser beams employed for photodynamic therapy (PDT). Because of these properties, and since some free bases of substituted porphyryns can be taken up selectively by malignant cells or diverse bacteria, these compounds have been used to kill cancer cells or microorganisms. The mechanism by which porphyryns kill malignant cells is based on the ability of these species to

generate singlet oxygen (¹O₂), primarily, by the incidence of red laser light on it [8]. In general, the mechanism of action involves [9,10]: (1) Penetration of the porphyryns in the target tissue; (2) activation of the drug through irradiation with a visible light; (3) generation of reactive oxygen species and cytotoxicity; (4) death of neoplastic tissue or microorganisms. The topical administration of porphyryns for the treatment of skin tumors, allows the delivery of the drug directly into the pathological site, reducing the side effects observed after a systemic administration [9]. Although Photofrin[®], a non-charged porphyryn, has been one of the oldest and most used photosensitizer in PDT to treat tumors, charged porphyryns also have useful properties. However, a problem to solve with some porphyryns is their low water solubility and their tendency to form aggregates in aqueous solution. To overcome these inconveniences and in order to improve the efficacy of porphyryns in PDT, diverse strategies has been proposed and explored. In this sense, some authors suggest the chemical modification of these compounds

* Corresponding author.

E-mail addresses: irisayahel@hotmail.com (R.I.Y. Quiroz-Segoviano), mags@xanum.uam.mx (M.A. García-Sánchez), nldb1@hotmail.com (N.L. Delgado-Buenrostro), irasemachirino@gmail.com (Y.I. Chirino), q9011108@hotmail.com (S. Bernal-Chávez), gpearz@hotmail.com (M.G. Nava-Arzaluz), ganemq@hotmail.com (A. Ganem-Rondero).

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101145>

Received 3 January 2019; Received in revised form 6 June 2019; Accepted 5 July 2019

Available online 06 July 2019

1773-2247/ © 2019 Published by Elsevier B.V.

[9,11,12]. Since its discovery in the last century, the properties of diverse porphyrins and related compounds, its structural modifications and delivery alternatives have been pointed and studied in order to have more efficient systems for PDT [4,13].

Another interesting approach is to include porphyrins in delivery systems, seeking to improve bioavailability and preventing the effects of aggregation. Among nanosized delivery systems, microemulsions have several advantages such as [14]: (i) High solubilization capacity for both lipophilic and hydrophilic drugs; (ii) ease of manufacturing and scale-up; (iii) generally obtained by gentle mixing of ingredients; (iv) thermodynamically stable; (v) microemulsion components may act as skin permeation enhancers by disrupting the stratum corneum lipid organization or by increasing the partition of the drug into the skin; (vi) the droplet size of the microemulsion (less than 200 nm) can have a positive effect on drug permeation. Microemulsions are isotropic, transparent or translucent, thermodynamically stable dispersions of oil and water, stabilized by an interfacial film of surfactant frequently in combination with a co-surfactant [14,15].

With the idea of achieving a more efficient PDT for the treatment of skin disorders, in this work, the free base of the *meso*-tetraphenylporphyrin (H₂TPP) (whose structure is shown in Fig. 1), was synthesized, formulated in microemulsions and in a solution, and assays in skin were performed applying sonophoresis in order to improve the penetration. Although cavitation (formation and collapse of gaseous cavities), is the main mechanism related to sonophoresis, non-cavitation mechanisms have also been reported, e.g., convection-related mechanisms, thermal effects and lipid extraction. Sonophoresis is capable of causing disruption of the stratum corneum lipids, inducing conformational changes and increasing the porosity of the skin, thereby promoting the diffusion of solutes [16]. In this research, it is expected that the dual strategy proposed of vehicle/sonophoresis combination solves the problem of poor porphyrin penetration into the skin, representing a good alternative for the application of topical PDT.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Acetone, benzaldehyde, chloroform and anhydrous ethyl alcohol, were purchased from Meyer (Mexico). Capryol[®] 90, Labrafac[™] Lipophile WL 349, Labrasol[®] and Transcutol[®] P were kindly provided by Gattefossé (France). Cremophor[®] EL, ethylene glycol, propylene glycol, propionic acid, pyrrole and Span 80, were all supplied by Sigma-Aldrich (USA). Kolliphor EL[®] and Kollisol[®] P 124 were provided by BASF (Germany). Anhydrous methanol and sodium hydroxide were supplied by J.T. Baker (USA). Tween[®] 80 was purchased to Merck (Mexico). The other reagents were: Isopropyl myristate NF and mineral oil (Cosmopolita, Mexico), potassium phosphate monobasic (MACRON Fine Chemicals TM, Mexico), Tween[®] 20 (HYCEL, Mexico). Water was obtained from a Milli-Q[®] system (Millipore[®] Corp., MA; EE. UU). For confocal microscopy the following materials were used: Bovine serum albumin pH 7.0 ≥ 98% (Sigma-Aldrich, USA), Triton[®] X-100 (USB[™], USA), anhydrous glycerol (J. T. Baker, México), Hoechst 33,342 (Thermo Scientific, Germany), In vitrogen[®] molecular Probes[®] Rhodamine Phalloidin TRITC (Thermo Fisher Scientific, USA), sodium phosphate dibasic 7-Hydrate-Crystal (J. T. Baker, México), sodium phosphate monobasic ≥ 99.0% (Productos Químicos Monterrey S. A., Mexico).

2.2. Skin

Pig's ears were obtained immediately after slaughter of the animals. Once the skin was removed from the pig's ear, it was fixed on a wooden frame, obtaining skin slides of approximately 750 μm in thickness, cutting the dorsal surface with a Zimmer[®] Electronic Dermatome (USA). Skin samples were stored at - 20 °C for a maximum of 30 days before use.

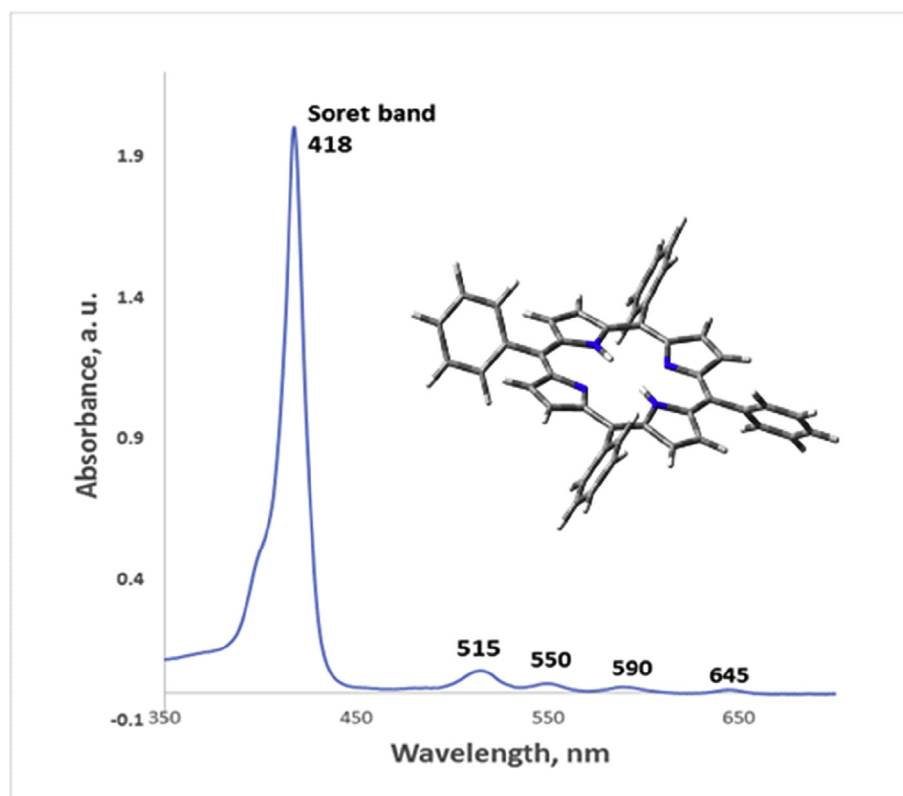


Fig. 1. Chemical structure of the specie H₂TPP and its UV-Vis spectra.

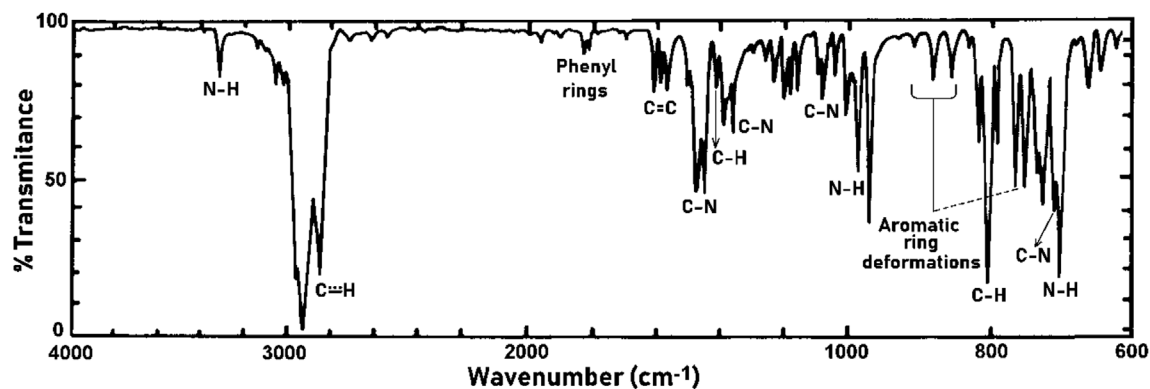


Fig. 2. FTIR spectrum of the purified tetraphenyl porphyrin synthesized.

2.3. Synthesis of porphyrin

Tetraphenylporphyrin (H_2TPP) was synthesized according to the method reported by Adler et al. [17] and Rothmund [18]. Briefly, a 4:4 M mixture of pyrrole and benzaldehyde was heated in propionic acid and kept around 2 h under refluxing conditions. The resultant black solid mixture was washed several times with a 10:1 (v/v) ether:acetone mixture. The purple crystals obtained were then washed with methanol and vacuum dried with $CuCl_2$. A first purification was made in Soxhlet with benzene, then in a basic alumina column extracting with xylene, and finally in Soxhlet with the same solvent. The resultant solution was heated in order to concentrate H_2TPP , and cooled slowly. The process renders 16% of purple crystals with a melting point at around 410 °C. The compound was characterized by UV-Vis and FTIR spectroscopy.

2.4. Microemulsions

2.4.1. Solubility tests

Excipient candidates were screened based on the solubility of porphyrin. Capryol 90, Transcutol[®], Labrasol[®], Tween 80[®], Tween 20[®], Cremophor EL[®] and Kolliphor ELP[®] were saturated with H_2TPP and kept under magnetic stirring during 24 h at room temperature, in airtight containers. Once this time had elapsed, each of the solutions was centrifuged in order to separate the undissolved H_2TPP , and a known volume of the supernatant was taken, to dilute it and determine the concentration by spectrophotometry.

2.4.2. Construction of pseudo-ternary diagrams

Microemulsions were prepared by a water titration method, by testing different surfactant:co-surfactant ratio (1: 1, 1: 2 and 2: 1). Mixtures with different proportions of oily phase/surfactant:co-surfactant, were titrated with water by drop-wise addition. The systems were allowed to equilibrate for 30 min under gentle shaking. Formation of microemulsion was visualized as a transparent or opalescent fluid system [19]. The schematization of pseudo-ternary diagrams was performed with the Prosim Ternary Diagram software. Once the diagram was constructed, randomly selected points were used to prepare the microemulsions, in order to confirm the zones of microemulsion formation.

2.4.3. Preparation of H_2TPP microemulsions

Selected formulations, chosen from the microemulsion obtained domain, were saturated with H_2TPP under continuous stirring, during 24 h. These microemulsions were then centrifuged at 12,000 rpm/20 min, the supernatant was diluted with chloroform, and the resulting solution was analyzed for H_2TPP concentration by spectrophotometry. Microemulsions were prepared in triplicate.

2.4.4. Characterization of microemulsions

2.4.4.1. Droplet size. The average droplet size and the polydispersity index of the chosen microemulsions were measured by dynamic light scattering using a Zetasizer NanoZS90 (Malvern, USA). Measurements were made in triplicate, without dilution of the sample, and were performed at a 90° scattering angle at 25 °C. and were performed at a 90° scattering angle at 25 °C.

2.4.4.2. Viscosity. The viscosity of microemulsions was measured with a CAP2000 Viscometer (Brookfield, MA, USA) using spindle number 1, at a speed of 50 rpm, at 25 °C.

2.4.4.3. Transmission electron microscopy. Microemulsions were examined using transmission electron microscopy (TEM). To prepare samples, a drop of microemulsion was applied onto a formvar-coated copper grid and left in contact for 2 min to form a thin film. A drop of phosphotungstic acid (1%) was added, wiping off the excess with filter paper. The grid was allowed to dry and samples were examined using a transmission electron microscope (JEM-1010, JEOL, USA).

2.5. Analytical methods

Spectrophotometric methods were validated for the quantification of porphyrin in the following tests: (i) Solubility; (ii) porphyrin content in microemulsions; (iii) permeation studies (using a 90:10 (v/v) phosphate buffer pH 7.4:Labrasol[™] solution, in contact with pig skin). Validation was performed according to the ICH Validation Guidelines, evaluating parameters such as specificity, linearity, precision (repeatability and intermediate precision), limit of quantification and limit of detection.

2.6. Ex-vivo skin permeation studies

2.6.1. Intact skin

The pig skin, cut with the dermatome as already described in section 2.2, was mounted between the donor and the receptor compartments of vertical Franz-type diffusion cells, which effective permeation area was 0.78 cm². The receptor solution consisted of 1.8 mL of a mixture 90:10 (v/v) of phosphate buffer pH 7.4 and Labrasol[™], constantly stirred with a magnetic bar. The temperature of the receptor medium was maintained at 37 °C and that of the donor at 32 °C. One ml of 1% (w/v) sodium laureth sulphate solution (used as a coupling medium in permeation studies with sonophoresis) was added to the donor compartment and left in contact with the skin for 3 min, at the end of which, it was removed and the skin was rinsed and dried carefully, to then add to this compartment 300 μ L of the microemulsion formulation. The receptor fluid was completely replaced with fresh solution, at defined time intervals, during 24 h, analyzing the drug content by spectrophotometry. Permeation experiments with a porphyrin solution (H_2TPP

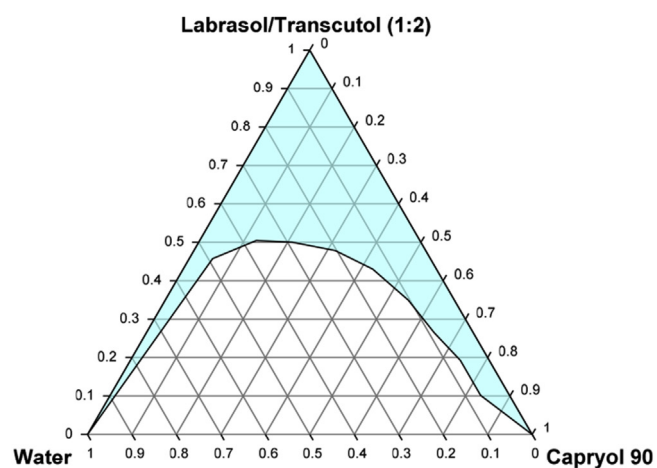
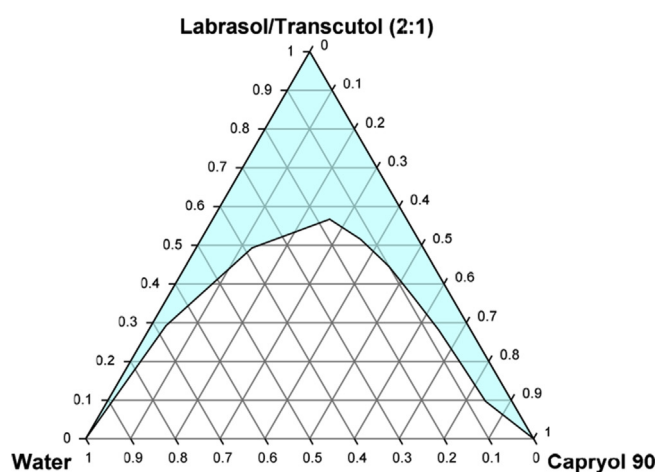
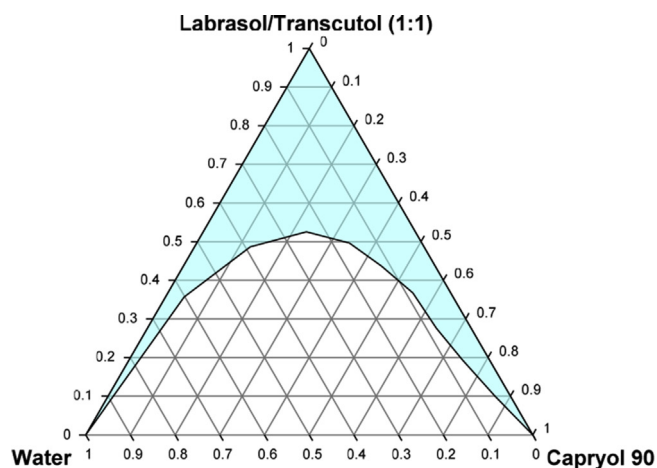


Fig. 3. Pseudo-ternary phase diagrams of water, Capryol 90 and Labrasol/Transcutol, showing microemulsion regions.

in a mixture Labrasol™:Transcutol™ 1:2 v/v) were carried out in the same manner. A suitable calibration curve was used in order to calculate H₂TPP concentrations in all these tests. The tests were performed in sextuplicates.

2.6.2. Skin pretreated with sonophoresis

The experiments were carried out as described in section 2.6.1, with the proviso that the skin area was pretreated with sonophoresis, using

Table 1
Composition of microemulsions with the highest H₂TPP content.

Sample	Labrasol®/Transcutol® ratio	Fraction			H ₂ TPP [mg/ml]
		Labrasol/Transcutol	Capryol 90	Water	
PME1	1:1	0.35	0.60	0.05	0.643 ± 0.10
PME2	2:1	0.22	0.73	0.05	0.694 ± 0.13
PME3	1:2	0.50	0.45	0.05	1.155 ± 0.15

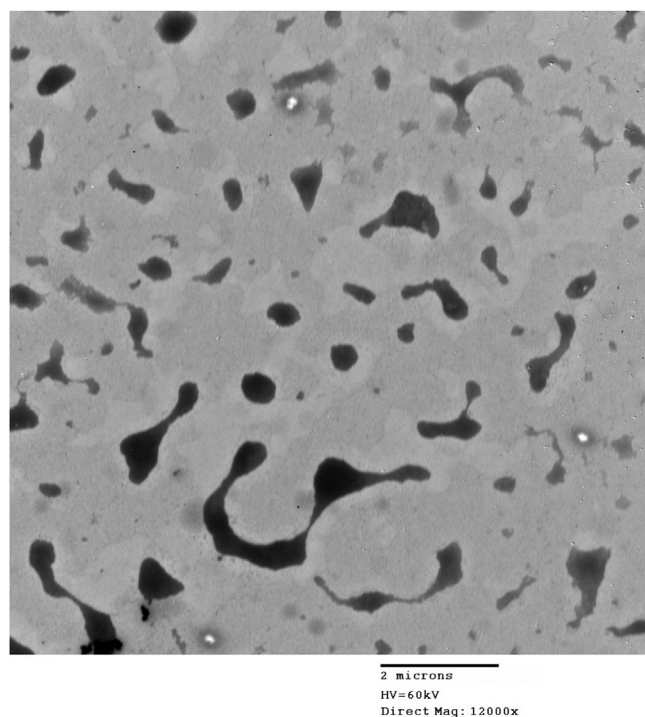


Fig. 4. Transmission electron microscope (TEM) image of H₂TPP-loaded microemulsion (PME3).

an ultrasonic processor UP50H (Hielscher, Germany), during 3 min at 30 kHz in discontinuous mode (pulsed), 100% amplitude, using a 1% (w/v) sodium laurth sulphate solution as coupling medium.

2.6.3. Confocal laser scanning microscopy for percutaneous penetration analysis

In order to determine the H₂TPP distribution pattern in the skin, confocal laser scanning microscopy was used. After a 24-h permeation experiment (carried out as previously exposed), a skin surface of 0.78 cm², was scanned at various depths up and step size, depending on the sample, for axial scanning [20].

In order to establish the top and the bottom of the skin for scanning the fluorescence of H₂TPP, the skin was pretreated by indirect immunofluorescence technique, permeabilizing the skin with 2.5% Triton X-100. The samples were then incubated with a mixture of a solution of 10 µg/ml of rhodamine-conjugated phalloidin and a solution 1:1000 of Hoechst in PBS [21].

The samples were mounted with a drop of glycerol-PBS 1:1 and were stored in dark at 4 °C.

Once the skin was sandwiched between a glass slide and a cover slip, it was examined directly using inverted laser scanning confocal microscope (Confocal Laser Scanning Microscope Leica TCS SP8, Germany), without any additional tissue processing or fixation or mechanical sectioning. The fluorescence of H₂TPP was excited at a wavelength of 480 nm by means of an argon laser. Examination of the skin samples was carried out using a numerical aperture 10x/0.4.

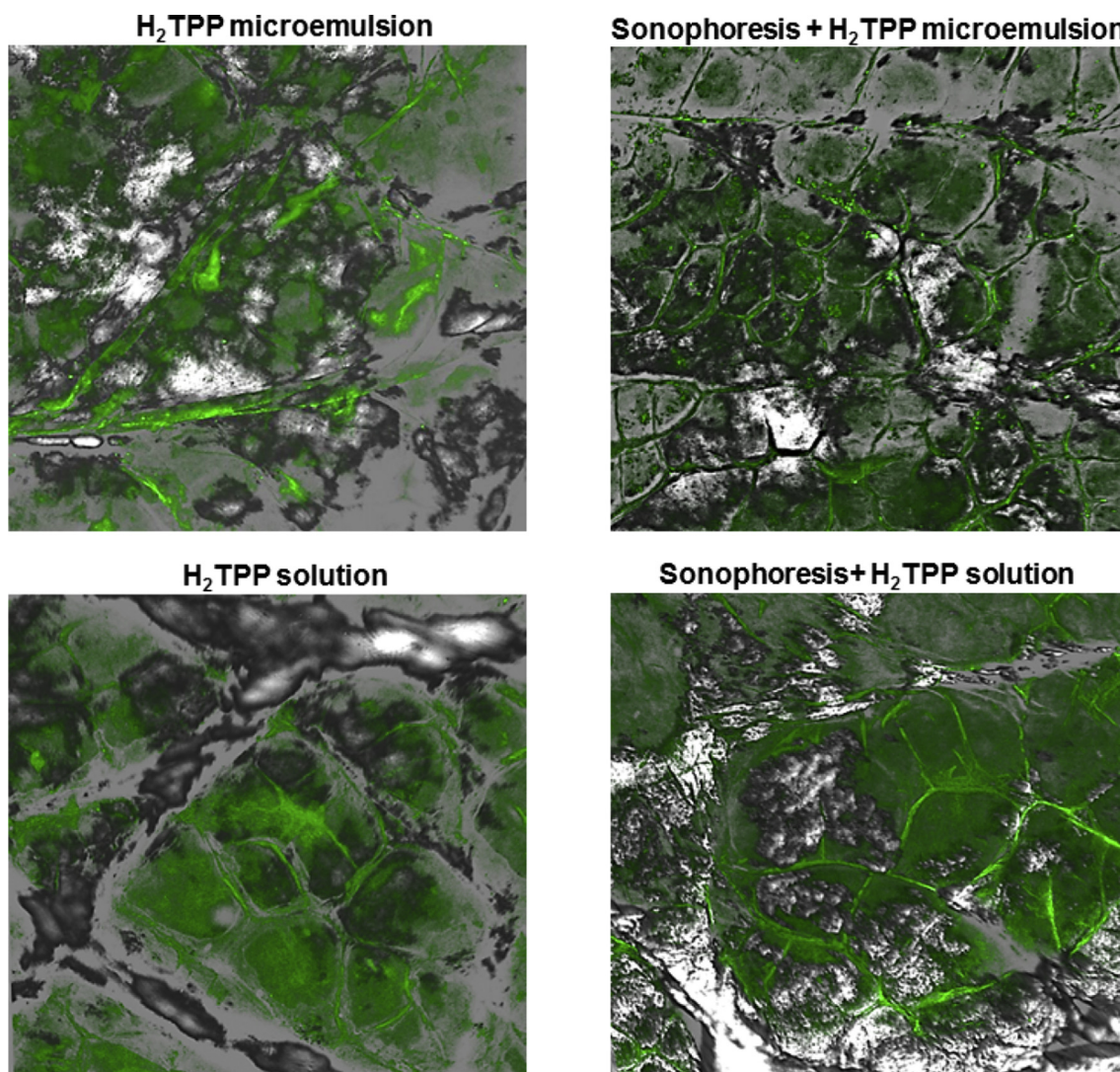


Fig. 5. Representative differential interference contrast images of skin treated with H₂TPP microemulsion and H₂TPP solution, with and without pre-treatment with sonophoresis. The H₂TPP, a green fluorescent compound, can be detected in the outermost layer of the skin (the stratum corneum). Confocal images were taken at 10× magnification of three independent experiments. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

2.6.4. Statistical analysis

Data were expressed as mean ± S.D. Analysis of variance (ANOVA) was employed to evaluate the difference between groups of data. The level of significance was fixed at $P < 0.05$.

3. Results and discussion

In order to analyze the physicochemical state of H₂TPP, and to infer the structural modifications of the loaded porphyrin in microemulsions, absorbance was monitored, considering that the electronic transitions of porphyrins display an extreme sensitivity toward structural modifications and changes in the polarity of the surrounding environment. Absorptions are attributed to $\pi-\pi^*$ electronic transitions; the most intense band of which corresponds to the Soret band, displayed between 410 and 440 nm, assigned to the $a_{2u} \rightarrow e_g$ (transitions involving the free electron pairs of the pyrrole nitrogens). The Q bands (Q_{IV}, Q_{III}, Q_{II} and Q_I), observed in the range from 500 to 700 nm and assigned to a_{1u} , $a_{2u} \rightarrow e_g$, are attributed to the charge transfer from the pyrrole carbons to other atoms of the macrocycle [22,23]. In the absorption spectra of the porphyrin synthesized and purified in this work, the characteristic bands of the free bases were observed. For the H₂TPP specie, the Soret

band appears at 418 nm, while Q bands are displayed at 515, 550, 590, and 645 nm (Q_{IV} to Q_I, respectively) (Fig. 1). This pattern of bands indicates that the porphyrin is stable and remains solubilized in monomeric form and no protonation or dimerization signals were observed [19]. Soret band, the most intense band, was used to determine the amount of porphyrin that was solubilized in each of the tests, since it allows determining low concentrations.

The infrared spectrum of porphyrin is shown in Fig. 2, finding the following bands: The N–H vibrations at around 3300, 1000, 980 and 700 cm^{-1} . The vibrations of the C–H groups of the aromatic macro ring can be observed at around 3020 to 3050 cm^{-1} , the C=C at around 1650 cm^{-1} and the C–N vibrations at 1550, 1470, 1350 and 700 cm^{-1} [24]. Furthermore, the deformations of the diverse groups of the molecule can be observed below 1000 cm^{-1} , particularly, those deformations of the aromatic rings of the molecule that are observed at 900 cm^{-1} and 730 cm^{-1} . The phenyl bands observed around 1800 cm^{-1} and the deformations of the acute bands that appear below 1000 cm^{-1} , suggest the cyclic and aromatic nature of the compound (presence of phenyls and pyrrole).

The components of microemulsions were selected according to the solubility of porphyrin in different excipients. The concentration of

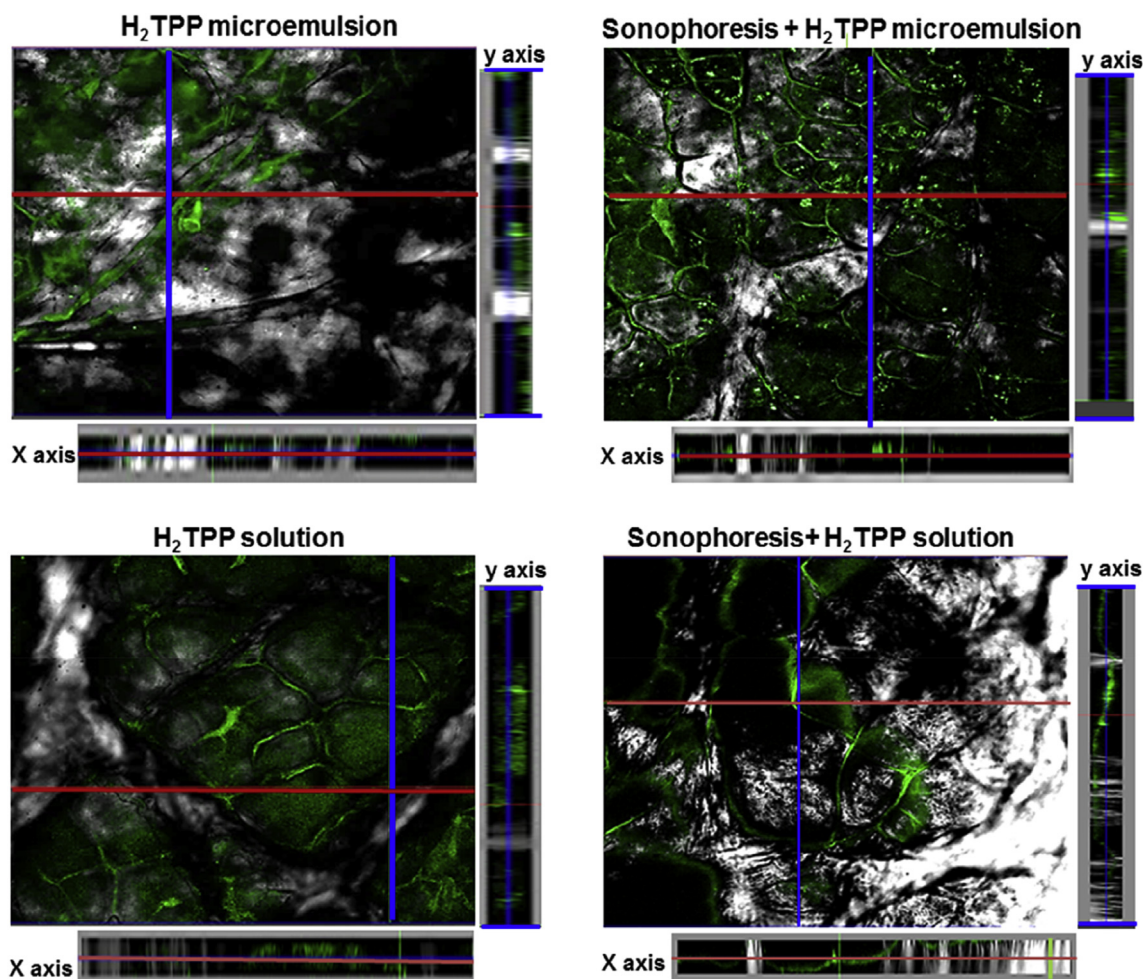


Fig. 6. Representative images of orthogonal projections of skin treated with H₂TPP microemulsion and H₂TPP solution, with and without pre-treatment with sonophoresis. Each image is a slide of 2.11 μm with a cut in x (red line) and y (blue line) axis, in which the fluorescence indicates the percutaneous penetration of systems. Images were taken by confocal microscopy at 10 \times magnification of three independent experiments. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

porphyrin was determined by a suitable calibration curve ($y = 0.0556x - 0.0005$, $r^2 = 0.99,946$). The results showed a good solubility of H₂TPP in Capryol 90 $^\circ$ (0.990 mg/ml), Labrasol (3.769 mg/ml) and Transcutol (2.141 mg/ml). For the other excipients tested, lower solubility values were found. Therefore, Capryol 90 $^\circ$ was selected as the oily phase, Labrasol $^\circ$ as surfactant and Transcutol $^\circ$ as co-surfactant. Three Labrasol $^\circ$ /Transcutol $^\circ$ ratio were evaluated, 1:1, 1:2 and 2:1, and as mentioned, pseudo-ternary diagrams were constructed by titration of Capryol 90/Labrasol/Transcutol mixtures with water. As shown in Fig. 3, wide areas corresponding to microemulsion formation, are presented in the three diagrams as a shaded area in blue. Points corresponding to different coordinates on the diagrams were selected to confirm the formation of microemulsion and to determine the solubility of the porphyrin. Table 1 shows the points with the highest solubility of H₂TPP, for the three Labrasol $^\circ$ /Transcutol $^\circ$ ratio evaluated. The highest content of H₂TPP (about 1.155 mg/ml) was found for the system PME3, corresponding to a Labrasol $^\circ$ /Transcutol $^\circ$ ratio 1:2.

Although stable, transparent, single-phase, low viscosity systems were obtained (for the three microemulsions chosen, the viscosity oscillated around 130 Centipoises), large fluctuations were observed when measuring the globule size of the microemulsions, with high polydispersity indices. While the proportion of water would suggest that w/o type microemulsions were obtained, when observing them under transmission electron microscopy (Fig. 4), water-rich domains and oil-rich domains appeared, clearly separated, quite possibly by a

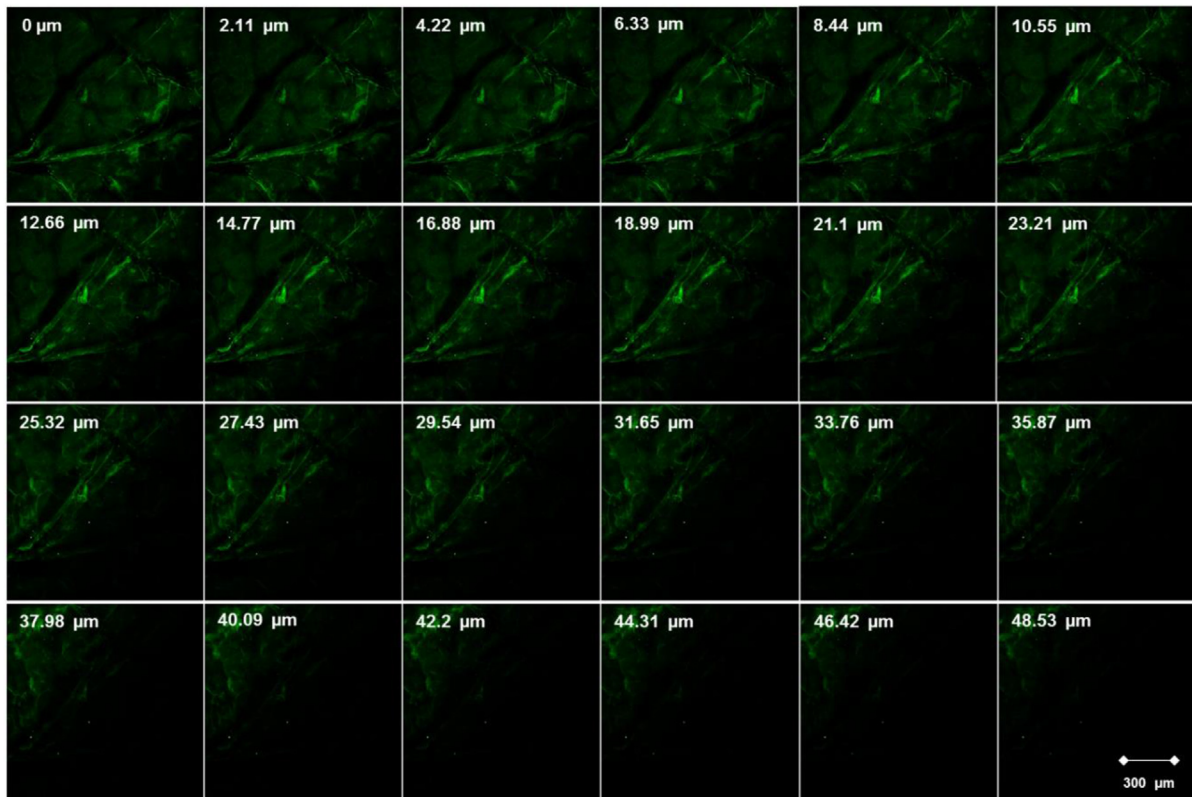
rich layer of surfactant. These findings suggest that there are bi-continuous structures, attributed to the high content of surfactant/co-surfactant and the dynamic exchange of these two components between both phases, which hinders the particle size measurement.

The permeation studies were carried out by formulating H₂TPP in both the selected microemulsion (PME3, to which we will refer in the text only as “microemulsion”) and in a 1:2 Labrasol:Transcutol solution (components of the PME3 microemulsion, where the porphyrin was easily dissolved). The amount of permeated porphyrin was determined in intact skin and in skin pretreated with sonophoresis. The results of the permeation studies revealed that H₂TPP was not detected in the receptor compartment in any case, even treating the skin with sonophoresis.

As mentioned, quantification was performed by a spectrophotometric method, using the experimental calibration equation $y = 0.3749x + 0.0094$ ($r^2 = 0.99,965$, CV = 2.8%), whose limits of detection and quantitation were found to be 0.0069 and 0.0215 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

Confocal laser scanning microscopy provides valuable information about the degree of penetration of solutes or carriers through and into the skin. In this work, this technique was used to evaluate the enhancing effect of sonophoresis on the penetration of H₂TPP into the skin, comparing the influence of the formulation, *i.e.*, microemulsion and solution. Then, making use of the multiple tools that this technique offers, it was possible to detect, through differential interference

H₂TPP microemulsion



Sonophoresis+H₂TPP microemulsion

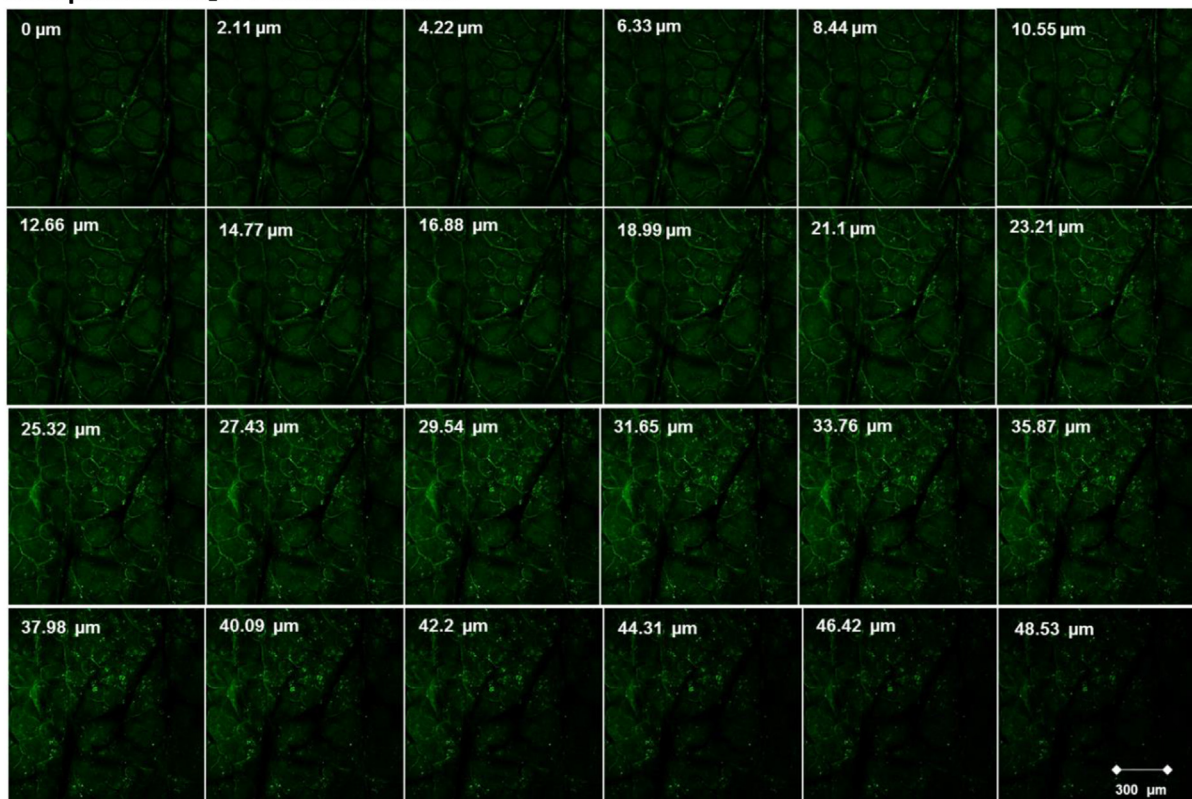
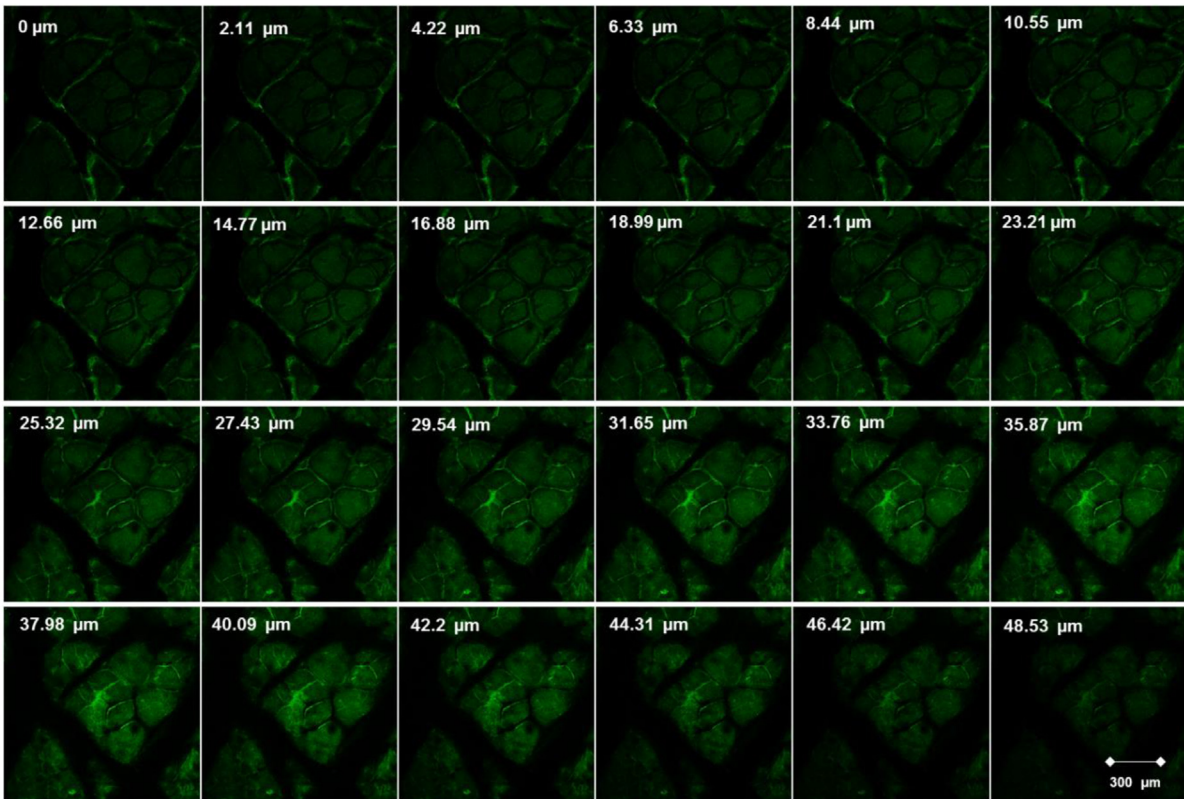


Fig. 7. Z-stack images of the skin after the application of H₂TPP formulated in microemulsion and in solution, with and without pretreatment with sonophoresis, scanning from the skin surface (0 μm depth) to 48.52 μm depth, with 2.11 μm increments.

H₂TPP solution



Sonophoresis+H₂TPP solution

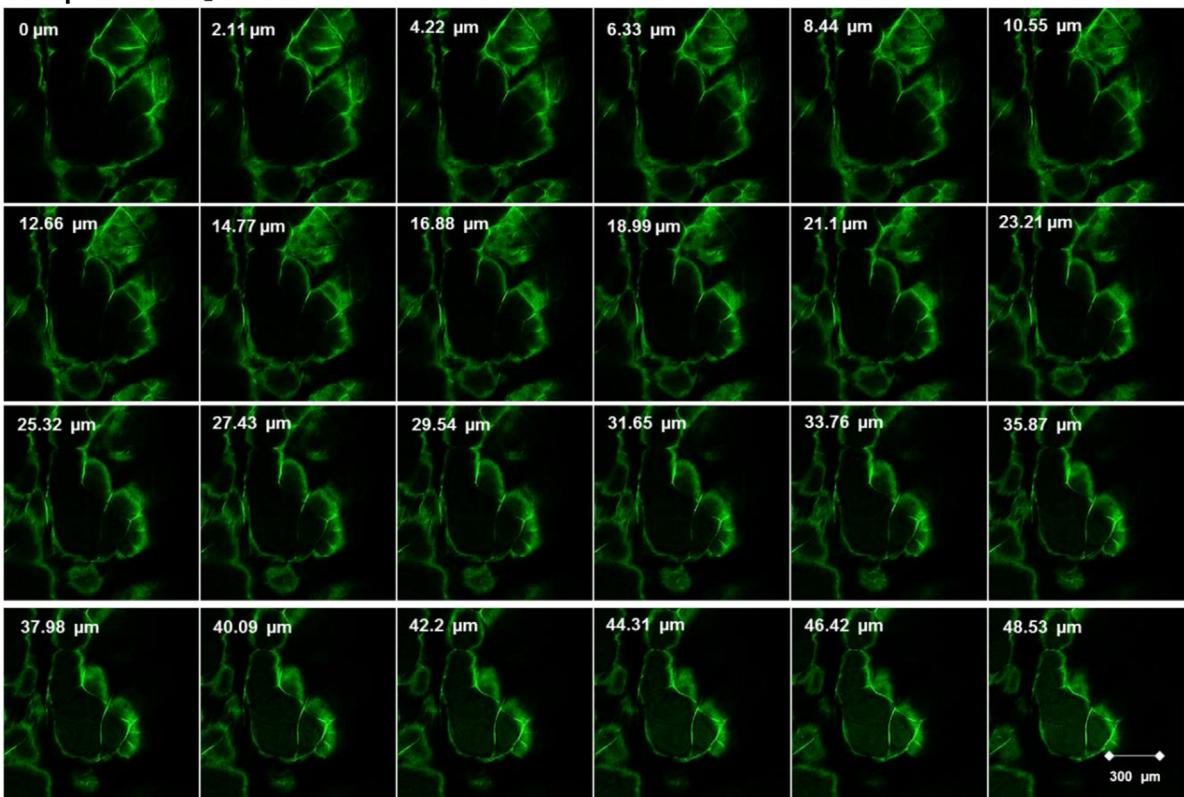


Fig. 7. (continued)

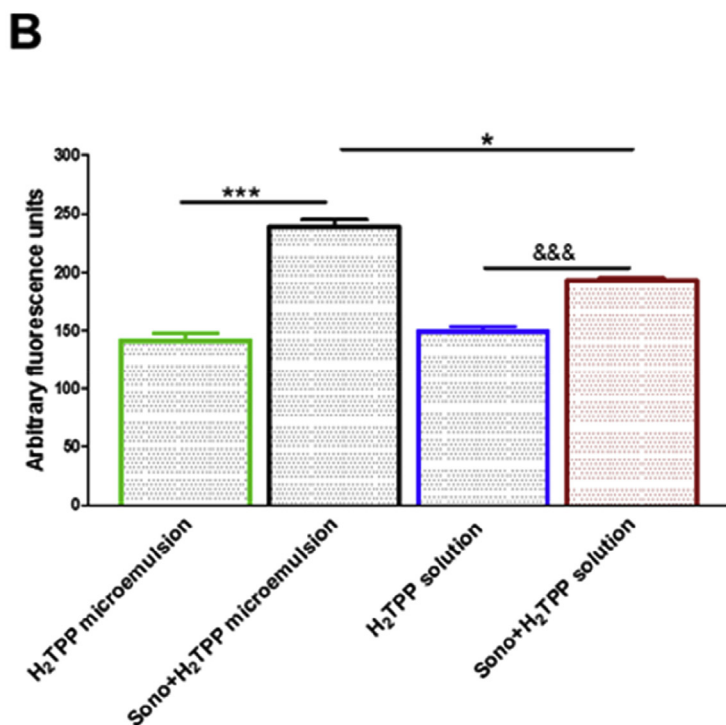
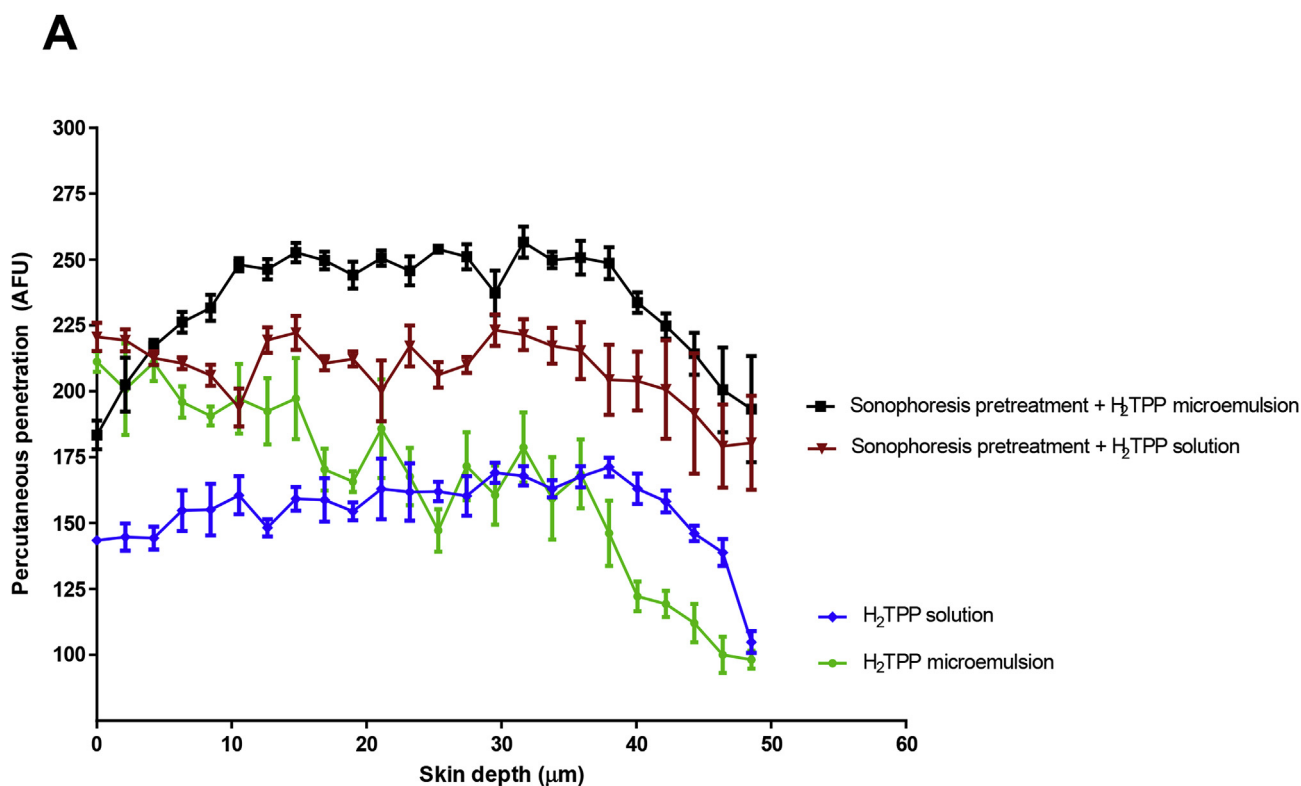


Fig. 8. A) Effect of systems on skin penetration. Fluorescence detected in each slide from a total of 24 slides. The analysis was performed in a stratum corneum depth of $48.52\ \mu\text{m}$ and each dot in the plot represents the fluorescence in each slide from the top to the bottom. Higher arbitrary fluorescence units (AFU) indicates the presence of higher amount of compound. **B) Quantification of fluorescence of systems on skin.** The average fluorescence of 24 slides for a stratum corneum depth of $48\ \mu\text{m}$ was calculated for each system. Significant differences were found between the systems, as indicated in the graph: *** $p < 0.0001$; &&& $p < 0.0001$ and * $p < 0.05$.

contrast, the presence of H_2TPP in the *stratum corneum* surface, seen as green fluorescence (Fig. 5). The penetration capacity of the systems was visualized through orthogonal projections, as those shown in Fig. 6, as well as analyzing the fluorescence of 24 slides, making a scan from the

surface of the skin ($0\ \mu\text{m}$ depth) until reaching a skin depth of $48.52\ \mu\text{m}$ (Fig. 7). With the fluorescence intensity values determined in each box of Fig. 7, it was possible to construct a penetration profile for each of the systems, which are presented in Fig. 8A. Therefore, as can be seen

from these results, although pre-treatment of the skin with sonophoresis increased the penetration for both the solution and the microemulsion, the permeated amount was still much higher for microemulsion. In the case of the passive application of both formulations (without sonophoresis), H₂TPP was also able to penetrate, but in a lower quantity, in comparison with the skin treated with sonophoresis. Again, the fact of formulating H₂TPP in a microemulsion promoted the penetration of a greater amount than with the solution, at least for the first 20 μm (Fig. 8A). According to the fluorescence quantification results shown in Fig. 8B, it was confirmed that the pre-treatment of the skin with sonophoresis increased the penetration of H₂TPP for both formulations. The amount permeated with microemulsion + sonophoresis (sono + H₂TPP microemulsion) increased approximately 40%, in relation to the passive application of microemulsion (H₂TPP microemulsion) (**p < 0.0001); while an increase of approximately 23% was observed for solution + sonophoresis (sono + H₂TPP solution), in relation to the passive application of solution (H₂TPP solution) (&&p < 0.0001). This graph also shows an increase of approximately 18% in the fluorescence found with the microemulsion, in relation to the solution, applying sonophoresis (sono + H₂TPP microemulsion and sono + H₂TPP solution, respectively) (*p < 0.05). According to this graph, no significant differences were found between the passive administration (without pre-treatment) of the microemulsion (H₂TPP microemulsion) and the solution (H₂TPP solution).

The penetration enhancer capacity of microemulsion can be attributed: (i) to its components, e.g., Transcutol® and Labrasol®, which themselves have enhancer properties; (ii) to its peculiar structure, which, as shown in Fig. 4, presents rich aqueous domains and rich oily domains, which can favor the partition of H₂TPP, not only towards the stratum corneum, but towards deeper layers, of a more hydrophilic nature; (iii) evidently to the combination sonophoresis/microemulsion.

As already mentioned, an interesting application area for these systems would be photodynamic therapy, to treat certain conditions present on, or just underneath the surface of the skin, such as actinic keratosis or cancerous skin lesions.

4. Conclusion

The penetration of free bases H₂TPP formulated in a microemulsion and in a solution through intact skin and skin pretreated with sonophoresis, was evidenced by confocal laser scanning microscopy. In all cases, H₂TPP penetrated the interior of the skin, increasing the amount that penetrates when the skin was treated with sonophoresis, especially for the combination sonophoresis/microemulsion, with which the highest permeated amount was achieved. In no case, H₂TPP was found in the receptor medium, which may be desirable if the aim is to reduce a systemic effect. The proposed systems have potential application in photodynamic therapy, whose effectiveness depends on the penetration and accumulation of the photosensitizer in the affected tissue, being a valuable technique for the treatment of disorders and diseases of the skin, adjacent regions and other tissues.

Acknowledgments

This work was supported by PAPIIT (Reference IN226119), DGAPA and PIAP / FESC (Reference 1803), all of them from Universidad Nacional Autónoma de México, MEXICO. The authors are grateful for the support provided by Dr. Edgar Oliver López-Villegas and Dr. María del Rosario Espinoza-Mellado (Central de Microscopía, ENCB, Instituto Politécnico Nacional, Mexico) for the acquisition of images in TEM.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101145>.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest related to the subject matter or materials discussed in this article.

References

- [1] A.J. Alonso-Castro, J.R. Zapata-Morales, A. Hernández-Munive, N. Campos-Xolalpa, S. Pérez-Gutiérrez, C. Pérez-González, Synthesis, antinociceptive and anti-inflammatory effects of porphyrins, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 2529–2537, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.043>.
- [2] Sh Meng, Z. Xu, G. Hong, L. Zhao, Z. Zhao, J. Guo, H. Ji, T. Liu, Synthesis, characterization and in vitro photodynamic antimicrobial activity of basic amino acid-porphyrin conjugates, *Eur. J. Med. Chem.* 92 (2015) 35–48, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.12.029>.
- [3] Z. Malik, H. Landan, B. Erenberg, Y. Nitzan, Bacterial and viral Photodynamic inactivation, in: B.W. Henderson, T.J. Dougherty (Eds.), *Photodynamic Therapy: Medical Applications*, Marcel Dekker Inc., New York, Buffalo, pp. 97–113.
- [4] M. Ethirajan, Y.Y. Chen, P. Joshi, R.K. Pandey, The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 340–362, <https://doi.org/10.1039/b915149b>.
- [5] I.I. Yoon, Z.L. Jia, Y.K. Shim, Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy, *Clin. Endosc.* 46 (2013) 7–23, <https://doi.org/10.5946/ce.2013.46.1.7>.
- [6] F. Ito, Sh Imamura, Sh Asayama, K. Kanamura, H. Kawakami, Dermal administration of manganese porphyrin by iontophoresis, *Mater. Sci. Eng. C* 41 (2014) 349–353, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.066>.
- [7] F. Lv, L. Mao, T. Liu, Thermosensitive porphyrin-incorporated hydrogel with four-arm PEG-PCL copolymer: preparation, characterization and fluorescence imaging in vivo, *Mater. Sci. Eng. C* 43 (2014) 221–230, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.07.019>.
- [8] E. Weizman, C.H. Rothman, L. Greenbaum, A. Shainberg, M. Adamek, B. Ehrenberg, Z. Malik, Mitochondrial localization and photodamage during photodynamic therapy with tetraphenylporphyrins, *J. Photochem. Photobiol., B* 59 (2000) 92–102, [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(00\)00143-3](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(00)00143-3).
- [9] G.M. Gelfuso, T. Gratieri, J.G. Souza, J.A. Thomazine, R.F.V. Lopez, The influence of positive or negative charges in the passive and iontophoretic skin penetration of porphyrins used in photodynamic therapy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77 (2011) 249–256, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.11.018>.
- [10] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 1 (2004) 279–293, [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4).
- [11] G. Oenbrink, P. Jurgenlimke, D. Gabel, Accumulation of porphyrins in cells: influence of hydrophobicity aggregation and protein binding, *Photochem. Photobiol.* 48 (1988) 451–456, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1988.tb02844.x>.
- [12] A. Makky, J.P. Michel, Ph Maillard, V. Rosilio, Biomimetic liposomes and planar supported bilayers for the assessment of glycodendrimeric porphyrins interaction with an immobilized lectin, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1808 (2011) 656–666, <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2010.11.028>.
- [13] M.A. García-Sánchez, F. Rojas-González, E.C. Menchaca-Campos, S.R. Tello-Solís, R.I.Y. Quiroz-Segoviano, L.A. Diaz-Alejo, E. Salas-Bañales, A. Campero, Crossed and linked histories of tetrapyrrolic macrocycles and their use for engineering pores within sol-Gel Matrices, *Molecules* 18 (1) (2013) 588–653, <https://doi.org/10.3390/molecules18010588>.
- [14] S. Talegaonkar, A. Azeem, F.J. Ahmad, R.K. Khar, ShA. Pathan, Z.I. Khan, Microemulsions: a novel approach to enhanced drug delivery, *Recent Pat. Drug Deliv. Formulation* 2 (2008) 238–257, <https://doi.org/10.2174/187221108786241679>.
- [15] K.P. Bidyut, P.M. Satya, Uses and applications of microemulsions, *Curr. Sci.* 80 (2001) 990–1001.
- [16] E. Piñón-Segundo, M.G. Nava-Arzaluz, A. Ganem-Rondero, Effect of the combined use of chemical enhancers with sonophoresis, electroporation, and microneedles on transdermal drug delivery, in: N. Dragicevic, H.I. Maibach (Eds.), *Percutaneous Penetration Enhancers. Physical Methods in Penetration Enhancement*, Springer-Verlag GMBH, Berlin Heidelberg, 978-3-662-53273-7, 2017, pp. 399–419, <https://doi.org/10.1007/978-3-662-53273-7> (Chapter 26).
- [17] A.D. Adler, F.R. Logo, J.D. Finarelli, J. Goldmacher, J. Assour, L. Korsakoff, A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphyrin, *J. Org. Chem.* 32 (1967), <https://doi.org/10.1021/jo01288a053> 476–476.
- [18] P. Rothemund, Preparation of meso-tetrasubstituted porphyrins by condensation of pyrrole with an aldehyde, *J. Am. Chem. Soc.* 57 (1935) 2010–2011.
- [19] M.J. Lawrence, G.D. Rees, Microemulsion-based media as novel drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 45 (2000) 89–121 (PII: S0169-409X(00)00103-4).
- [20] H.M. Smilowitz, D.N. Slatkin, P.L. Micca, M. Miura, Microlocalization of lipophilic porphyrins: non-toxic enhancers of boron neutron-capture therapy, *Int. J. Radiat. Biol.* 89 (2013) 611–617, <https://doi.org/10.3109/09553002.2013.782446>.
- [21] P. Wäster, I. Eriksson, L. Vainikka, I. Rosdahl, K. Öllinger, Extracellular vesicles are transferred from melanocytes to keratinocytes after UVA irradiation, *Sci. Rep.* 27890 (2016) 1–13, <https://doi.org/10.1038/srep27890>.
- [22] D. Dolphin, *The Porphyrins, Physical Chemistry, Part A*, Academic Press, New York, NY, USA, 1978 (eBook ISBN: 9780323143905).
- [23] M. Goutterman, Study of the effects of substitution on the absorption spectra of porphyrin, *J. Chem. Phys.* 30 (1959) 1139–1161, <https://doi.org/10.1063/1.1730148>.
- [24] M.A. García-Sánchez, Síntesis y Caracterización de Macrocielos mixtos Lantanoides, Tesis de Maestría, UAM-Iztapalapa, México, 1993.

Nanocarrier-based systems for wound healing

S. Bernal-Chávez, M. G. Nava-Arzaluz, R. I. Y. Quiroz-Segoviano & A. Ganem-Rondero

To cite this article: S. Bernal-Chávez, M. G. Nava-Arzaluz, R. I. Y. Quiroz-Segoviano & A. Ganem-Rondero (2019) Nanocarrier-based systems for wound healing, Drug Development and Industrial Pharmacy, 45:9, 1389-1402, DOI: [10.1080/03639045.2019.1620270](https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1620270)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1620270>



Accepted author version posted online: 17
May 2019.
Published online: 20 Jun 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 43



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

REVIEW ARTICLE



Nanocarrier-based systems for wound healing

S. Bernal-Chávez, M. G. Nava-Arzaluz, R. I. Y. Quiroz-Segoviano and A. Ganem-Rondero

División de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli, Mexico

ABSTRACT

In general, the systems intended for the treatment and recovery of wounds, seek to act as a coating for the damaged area, maintaining an adequate level of humidity, reducing pain, and preventing the invasion and proliferation of microorganisms. Although many of the systems that are currently on the market meet the purposes mentioned above, with the arrival of nanotechnology, it has sought to improve the performance of these coatings. The variety of nano-systems that have been proposed is very extensive, including the use of very different materials (natural or synthetic) ranging from polymers or lipids to systems derived from microorganisms. With the objective of improving the performance of the systems, seeking to combat several of the problems that arise in a wound, especially when it is chronic, these materials have been combined, giving rise to nanocomposites or scaffolds. In recent years, the interest in the development of systems for the treatment of wounds is notable, which is reflected in the increase in publications related to the subject. Therefore, this document presents generalities of systems involving nanocarriers, mentioning some examples of representative systems of each case.

ARTICLE HISTORY

Received 13 February 2019
Revised 22 April 2019
Accepted 30 April 2019

KEYWORDS

Chronic wounds; wound healing; drug delivery system; nanotechnology; nanocarriers; skin regeneration

Introduction

The sedentary lifestyle and unhealthy eating habits have caused the number of people affected by chronic diseases such as diabetes or heart disease, has increased alarmingly in recent years. Among the serious consequences derived from these diseases, are the problems of wound healing and all the complications that this implies. A wound can be defined as a break in the continuity of the skin. In general, wounds can be classified as acute and chronic, depending on the mechanism of repair and the period in which this occurs. Acute wounds heal in very short periods of time and do not leave scars or they are minimal. In the case of chronic wounds, they heal very slowly, taking even months to see an improvement. In fact, when the wound lasts for more than three months, it is already considered chronic [1].

A chronic wound may be a consequence of various factors, e.g. hospitalized patients who are immobilized, injuries associated with excess moisture due to incontinence, profuse sweating, drainage and exudate from wounds, aggressions caused by clinical devices (i.e. catheters, tubes and respirators, collars, plasters, probes, etc.), and even the use of dressings with very strong adhesives that cause injuries when removed. In a chronic wound, the mechanisms responsible for recovery are altered due to some medical condition, among which are age, poor nutrition, genetics, chronic disease, and venous or arterial insufficiency. However, there is no doubt that diabetes mellitus remains one of the most frequent causes of ulcers and chronic wounds. In fact, as the number of people affected by diabetes has increased in the last decades, the incidence of chronic wounds has also increased, and with this, the expenses in the health system [1–3]. In addition to the aforementioned medical conditions, which hinder the recovery of a wound, a compromised immune system increases the risk of infections.

Nanotechnology has positively impacted this area, contributing to tissue regeneration, by promoting wound closure (preserving function and aesthetics), as well as controlling possible infections. Therefore, this document deals with the systems used in the regeneration of wounds (in particular those that have become chronic), both conventional systems and those that include nanocarriers. There are excellent reviews about new systems for wound healing, including nanocarriers that have been proposed, those that are in clinical stages and those that are already on the market [e.g. 4–6]. So in this review, generalities of the systems based on nanocarriers are presented, mentioning some examples of representative systems of each case.

Wound healing process (wound repair)

A wound can be defined as a rupture in skin epithelial continuity. When the wound lasts for more than 42 days, it is considered to be chronic [7]. A skin wound requires several cell lineages to exhibit considerable plasticity as they migrate towards and over the site of damage to contribute to repair [8]. Most chronic wounds can be classified into four major types: pressure ulcers, arterial ulcers, venous ulcers, and diabetic ulcers. The development of chronic wounds has been related to four factors, local tissue hypoxia, bacterial colonization of the wound, repetitive ischemia-reperfusion injury, and an altered cellular and systemic stress response in the aged patient [9].

Wound healing is an important physiological process that involves a complex, dynamic, and highly intricate interaction between hemostasis, inflammation, proliferation, and tissue remodeling that overlap on time (Figure 1) [3,10–13]. The process requires a well-orchestrated series of responses, resulting in blood clotting, vascular wall repair, protection against infection, cell

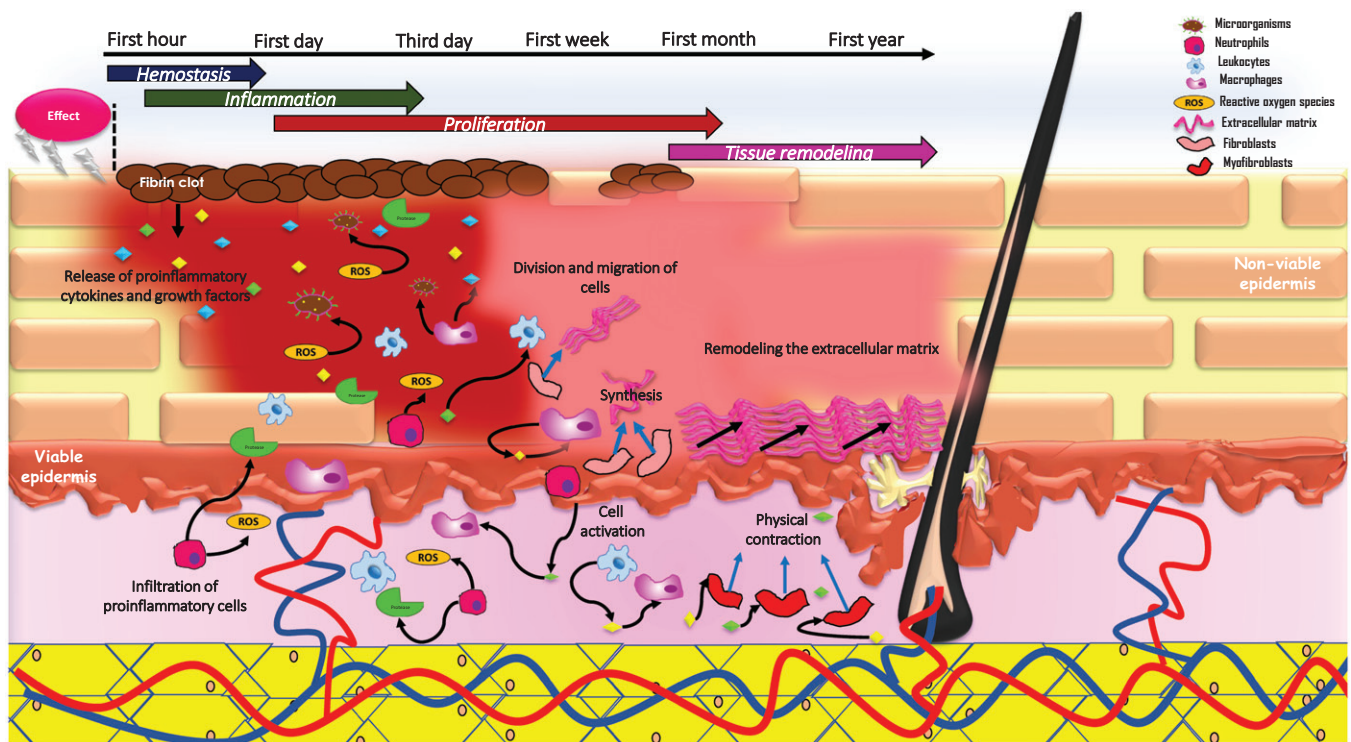


Figure 1. Graphic representation of the stages that occur in the process of wound healing.

proliferation, and migration, and the creation of new blood vessels for the provision of nutrients to those cells [14]. These activities are supported by one of the characteristics presented by organisms, the ability to perform self-repair of wounds by the migration of cells to the site of injury, due to an energetically unfavorable situation on lipid bilayers [15]. This involves important cellular processes like cell crawling and 'purse-string' contraction of a supracellular actomyosin ring, that have been evaluated experimentally by Brugues et al. [10]. Furthermore, the communication of appropriate cellular and biochemical species, coupled with the mechanical status of the affected tissue has shown to be critical [11].

The first stage, hemostasis, is the process whereby blood loss and pathogen incursion are limited physically and is based on the constriction of the damaged vessels and clot formation [16]. This mechanism occurs in both, chronic and acute wounds; however, the difference between those is that the last one usually contemplates the four overlapped and timely limited phases whereas, in a chronic wound, the healing process is obstructed due to a persistent state of inflammation, poor perfusion, and/or the presence of necrotic tissue which does not allow skin remodeling to a more optimal state [17,18].

Wound healing has been investigated from an experimental perspective, mainly focused on *in vitro* models of cell migration, *in vivo* studies, cell force estimation and *in silico* models [11,19,20]. During these investigations, a large number of components involved in the wound repair, such as the wound fluid (WF), have been identified. WF is composed of electrolytes, proteins, and peptides (mostly proteases and kinins), as well as other substances such as lactate, glucose, and extracellular matrix molecules such as fibronectin, glycosaminoglycans, proteoglycans, thrombospondins, tenascin, vitronectin, among others. Cells such as leukocytes, macrophages, fibroblasts, and neutrophils that release inflammatory mediators (cytokines and chemokines) and reactive oxygen species (ROS), are also involved, leading to wound progression or

its healing [12,17,21,22]. The proinflammatory cytokines that can be found in WF are tumor necrosis factor- α (TNF- α) and the interleukins IL-1, IL-6, and IL-8. The inflammatory response continues with active recruitment of neutrophils and then macrophages from nearby vessels, being orchestrated by foreign epitopes such as the lipopolysaccharides of invading microorganisms, or by growth factor signals such as the transforming growth factor- β (TGF- β), the platelet-derived growth factor (PDGF), the epidermal growth factor (EGF), and the keratinocytes growth factor, coming from the resident cells and serum [13,18].

For the action of mediators and cells involved in wound repair to be adequate, a cascade of specific signals has to be carried out by cytokines, growth factors and extracellular matrix proteins, which are fundamental modulators during the inflammation stage. In addition, they can promote the activation of keratinocytes [14,22,23]. It is important to mention that during the activation of signaling pathways, copper ions are important as a metal modulating wound repair machinery [14], for example, activation of PDGF signaling, regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and, to a lesser extent, angiogenin [24,25]. Then, the proliferation phase of healing entails a local increase in epidermal cell division to replace those cells destroyed by wounding (re-epithelialization), the recruitment to the wound of other cell types such as fibroblasts and the generation of the so-called granulation tissue. Finally, the structures assembled during the previous stages are remodeled, and the granulation tissue is removed [16]. Figure 1 is a graphic representation of the stages that occur during the healing of a wound.

Almost all chronic wounds are associated with a well-defined disease that includes diabetes, chronic inflammatory disorders, vascular diseases, and auto-immune diseases and nowadays an association with cancer progress [10,18]. As mentioned, wound repair involves many stages, each of which includes complex mechanisms, that can be altered when factors such as diabetes, age, smoking, malnutrition, immune depression, among others are

present, turning a wound that was originally acute into a chronic wound, and in which the normal physiological process of repair is no longer effective. In the particular case of diabetic patients, leg or foot ulcers are the most common wounds, including 50–70% of all limb amputations. In fact, it has been reported that every 30 s, one leg is amputated worldwide due to the diabetic wound [26]. The healing process is delayed with diabetes because this disease affects all the stages involved in the healing of a wound: hemostasis, inflammation, proliferation, and remodeling (Figure 1). The mechanisms that prevent the healing of a wound are multifactorial and in the case of diabetes, there are different factors that have been identified as causes of the appearance of chronic ulcers. Among them, peripheral neuropathy, and with it the low sensitivity of patients in the lower extremities, which prevents the appearance of an ulcer to be detected in early stages. Neuropathy also affects neuro-immune interactions, reducing the expression of substances responsible for modulating inflammation during the healing of a wound. In fact, long-term hyperglycemia leads to chronic inflammation.

Angiogenesis is also affected in diabetic patients, where a reduction in blood flow delays tissue regeneration because it restricts macrophage and T-cell chemotaxis. Likewise, it reduces the migration of keratinocytes and fibroblasts to the wound, decreases the availability of oxygen and therefore, the production of ATP. That is why hyperbaric therapy contributes to the improvement of wounds [27]. Local ischemia, due to microvascular complications in diabetes, delays the healing of a wound. Different classes of RNAs play an important role in these complications, such as the MiR-210, induced in conditions of hypoxia and that targets E2f3, reducing keratinocyte proliferation [28].

The activity of NADPH oxidases (NOX) is increased in hyperglycemic conditions, being the main source of ROS, and although ROS are essential for the healing of a wound, an excess of ROS causes lipid peroxidation, protein modification, and DNA damage. In addition, an excess of ROS can cause the degradation of extracellular proteins, altering the functioning of fibroblasts and keratinocytes. It has been proposed that an imbalance in cytokine levels, with an excess of pro-inflammatory molecules like interleukin-1 beta (IL-1 β), TNF- α , and the protease matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and a deficit of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- β , contribute to the delay in the regeneration of the tissue. In addition, high glucose levels favor the formation of advanced glycation end products (AGEs) that are sugar-derived substances, which hinder the process of wound healing by suspending the inflammatory and proliferation phases, and that lead to the generation of free radicals. Patel et al. [26], present clearly, the major pathways responsible for decreased wound healing in diabetic patients.

In addition to the aforementioned medical conditions, which hinder the recovery of a wound, a compromised immune system increases the risk of infections. For example, in diabetic wounds, a down-regulation of Toll-like receptors (TLRs) may be related to an increased susceptibility to develop infections in the case of delayed wound healing and immunosuppression.

Although the beneficial effect of different drugs normally used to reduce glucose levels on wound healing has been reported, the results are inconclusive. Further studies are needed to conclude about the potential of concomitant diabetic medications, not only to have a hypoglycemic effect but to promote the regeneration of tissue in chronic ulcers [29]. An excellent review on nanoparticulate systems for the management of wounds in diabetics was recently published by Vijayakumar et al. [30].

Conventional systems for wound treatment

During the treatment of wounds, it is important to have an extensive knowledge about the pathophysiology, as well as an exact and coordinated evaluation of the patient, in order to generate a clear diagnosis, a treatment plan and monitoring, so that the patient adheres to the plan, in order to have the best recovery. For example, in the selection of an antibacterial agent, it is important to consider not only its antibacterial effect but also its effect on the modulation of wound healing, as well as the cytotoxic effects on immature and nonadherent keratinocytes [31]. Other key aspects are education and training about the most appropriate care of the wound, not only for the patient but for the people around him.

The management and control of patients who develop a wound is mainly determined by the type of ulcer they present (pressure ulcers, venous ulcers, arterial ulcers, or diabetic ulcers), and although in most cases the treatment is very similar and differs only in specific applications, the type of system may vary depending on the characteristics of the wound. Generally, the treatments that are nowadays focused on the improvement and recovery of wounds, are systems that prevent the wound progressing by decreasing the depth, preventing invasion and proliferation of microorganisms, increasing the skin moisturizing levels, decreasing the pain that may occur and maintaining a visually clean wound. In order to carry out these external wound healing processes, the agents listed in Table 1 can be used.

The substances above mentioned, are generally applied in the form of creams, ointments, hydrogels, solutions, dressings, foams, films, among others [27]. In the case of antibiotics, they can be administered topical or systemically, although the difficulties that systemic antibiotics encounter to reach the infected site must be taken into account. Furthermore, there are cases in which some drugs have stability problems, cannot be administered to certain types of

Table 1. Examples of agents used to treat a specific condition during wound healing.

Types	Examples	Reference
Cleansing	Aqueous solutions (sterile saline solution), mild soap.	[32]
Debridement	Sharp (e.g. scissors and/or scalpel), enzymatic (e.g. collagenase, papain/urea, trypsin), autolytic (facilitated by the use of moisture, e.g. hydrocolloids and hydrogels), larval therapy.	[33–36]
Antiseptics	Acetic acid, chlorhexidine gluconate, sodium hypochlorite, potassium permanganate, hydrogen peroxide, silver (e.g. sulfadiazine, ionic), polyhexamethylene biguanide, triclosan, iodine (e.g. povidone, cadexomer), hexachlorophene.	[37,38]
Dressings	Moist wound dressings, chlorhexidine gluconate, honey, silver (e.g. sulfadiazine, ionic), polyhexamethylene biguanide, triclosan, iodine (e.g. povidone, cadexomer), alginate, proteases modulators (e.g. regenerated oxidized cellulose/collagen), hydrocolloids (e.g. carboxymethylcellulose, gelatin, pectin), hydrogels (e.g. polymethacrylates and polyvinylpyrrolidone).	[32,38–41]
Antibiotic drugs	Doxycycline, penicillin G, metronidazole, bacitracin, fusidic acid, gentamicin, neomycin sulfate, nitrofurazone, polymyxin B, retapamulin, mupirocin.	[37,41,42]
Surgery	Surgical debridement of wounds.	[32]
Adjuvant agents	Stem cell, grafts, topical oxygen, electrical stimulation, phototherapy, ultrasound, prostaglandins, growth factors, hyperbaric oxygen.	[32,43,44]

Table 2. Characteristics of an ideal wound dressing [20,30,45–50].

Protects the wound tissue from bacterial infection.	Proper exchange of nutrients as well as waste disposal.
Protects the drug from the wound hostile environment.	Reduction in the replacement of the dressing over the duration of wound healing.
Reduces inflammation.	Stimulates tissue regeneration.
Proper adhesiveness to allow easy removal from the wound bed.	Anti-oxidative features.
Fits the shape of the wound, avoiding the formation of fluid-filled pockets.	Biodegradability.
Proper equilibrium of the wound fluids: good wound fluid uptake, controlling water loss rate, i.e. proper moisture transmission, without promoting bacterial growth.	Possibility of reducing the dose and administration frequency.
Provides permeability for oxygen.	Biocompatibility.
High initial release rate, followed by a sustained release of the drug.	Good mechanical properties.
Controlled and sustained release of the drug.	Sterilizable.
Hemostatic properties, particularly in the case of hemorrhagic traumatization.	Cost-effective.

patients, the way in which they are presented may not be adequate for a specific wound, and the frequent use, makes them tired for the patient, especially if numerous applications are required during the day. Nowadays, new systems have been developed to avoid some of these difficulties, providing some other advantages.

Ideal wound dressing

In order to promote tissue healing and avoid colonization by bacteria, a wound dressing must meet the characteristics shown in Table 2. Among the required characteristics, the system has to show a good adherence (avoiding traumatization during movements or removal), fitting the shape of the wound without the presence of fluid-filled pockets that contribute to bacteria proliferation. An adequate permeability for oxygen and moisture must avoid wound dehydration or occlusion, without promoting bacterial growth. In this sense, the system must be capable of eliminating wound exudate. It would be desirable that the system exhibits a high initial release of the drug (burst effect), in order to control infection at the beginning of the local therapy, followed by a sustained release, suitable to maintain an effective drug concentration, with the possibility of reducing the dose and administration frequency. An anti-oxidant effect would be an additional benefit, as free radicals exacerbate the inflammatory reactions that occur during the wound healing process. Obviously, the system must stimulate tissue regeneration [20,45–50]. The effectiveness of a wound dressing, as well as that of drugs or extracts focused on wound healing, is determined through *in vitro* and *in vivo* studies [19]. However, although these kind of studies are very useful, the definitive effects are demonstrated during the evaluation in humans, through clinical studies [e.g. 20,51–57]. Therefore, it would be essential to have studies of this type for systems based on nanocarriers, such as the systems addressed in this document.

Nanocarriers focused on wound healing

A broad range of nanocarriers prepared from synthetic, biological and hybrid materials have been proposed in order to improve

wound healing (Figure 2). These carriers represent an efficient mode to improve drug delivery into the skin. Nanocarriers can modify the pharmacokinetic and biodistribution of drugs, being considered new entities (different from free drugs; therefore, active compounds included within them may have different actions [58]. Improvement in wound healing is related to a better angiogenic response, a reduction of inflammation and antimicrobial activity. In this sense, antioxidants, anti-inflammatory, anti-bacterial, and anti-fungal agents have been widely used. Gainza et al. [46] provide an excellent review of the novel systems proposed for the administration of growth factors for skin regeneration. Due to some drawbacks imposed by the physicochemical properties of different active compounds, e.g. poor absorption, rapid metabolism and rapid clearance, the formulation of drugs in nanocarriers represents a way to improve their skin delivery, overcoming these limitations and increasing bioavailability [59,60]. However, despite the many advantages that these systems offer, there is still some concern about the risks associated with long-term exposure and the accumulation of nanoparticles.

In the following sections, some of the nanosystems reported in the literature in recent years are described. The intention was to classify them according to their composition (e.g. metallic, polymeric, lipid, etc.), but as shown, some of them are hybrids, being made up of materials of different nature (Figure 3).

Metal-based systems

Infections represent a serious problem when treating a wound, due to the emergence of bacterial resistance. In this context, different nanomaterials have been proposed for controlling infections without producing bacterial resistance. Metal nanoparticles such as silver, copper, and zinc have shown to be effective in controlling infectious diseases without causing bacterial resistance. The capability of silver nanoparticles to control biofilms has been widely studied. This has important implications especially in chronic wounds, where biofilms may compromise wound healing, because of their tolerance to antimicrobials [61].

Ashfaq et al. [62] proposed the use of Cu/Zn nanoparticles incorporated in carbon nanofibers, as a novel antibiotic material. As nanoparticles inhibited the growth of some bacterial strains, they propose this composite as a wound dressing, with an antioxidant effect due to the zinc nanoparticles and an antibacterial activity attributed to copper. Both Cu and Zn also participate in the cross-linking of collagen, synthesis, and stabilization of proteins, angiogenesis and cell proliferation, all of which accelerate the wound healing process. The material exhibits potential as wound dressing, because of its slow release and low cytotoxicity, showing to be effective to avoid the growth of different bacteria. Silver-based nanomaterials have been not only the most studied and effective to prevent and treat infections but the only ones approved by the Food and Drug Administration of the United States of America (US-FDA) to treat chronic and acute wounds. Although silver has the advantage of having an activity against a broad spectrum of microorganisms (e.g. *B. subtilis*, *E. coli*, and *S. aureus*, by interacting with sulfur and phosphorous-containing proteins which are present in bacteria membranes), it can cause discoloration of the skin (silver nitrate), eschar formation (silver sulfadiazine), and be inactivated by the presence of chloride ions or proteins. These disadvantages have been lessened with the development of slow-release products and products based on nanocrystalline silver, such as Acticoat™, which is probably the most clinically studied product of this type for the treatment of burns, chronic, and surgical wounds [1]. In order to prevent the

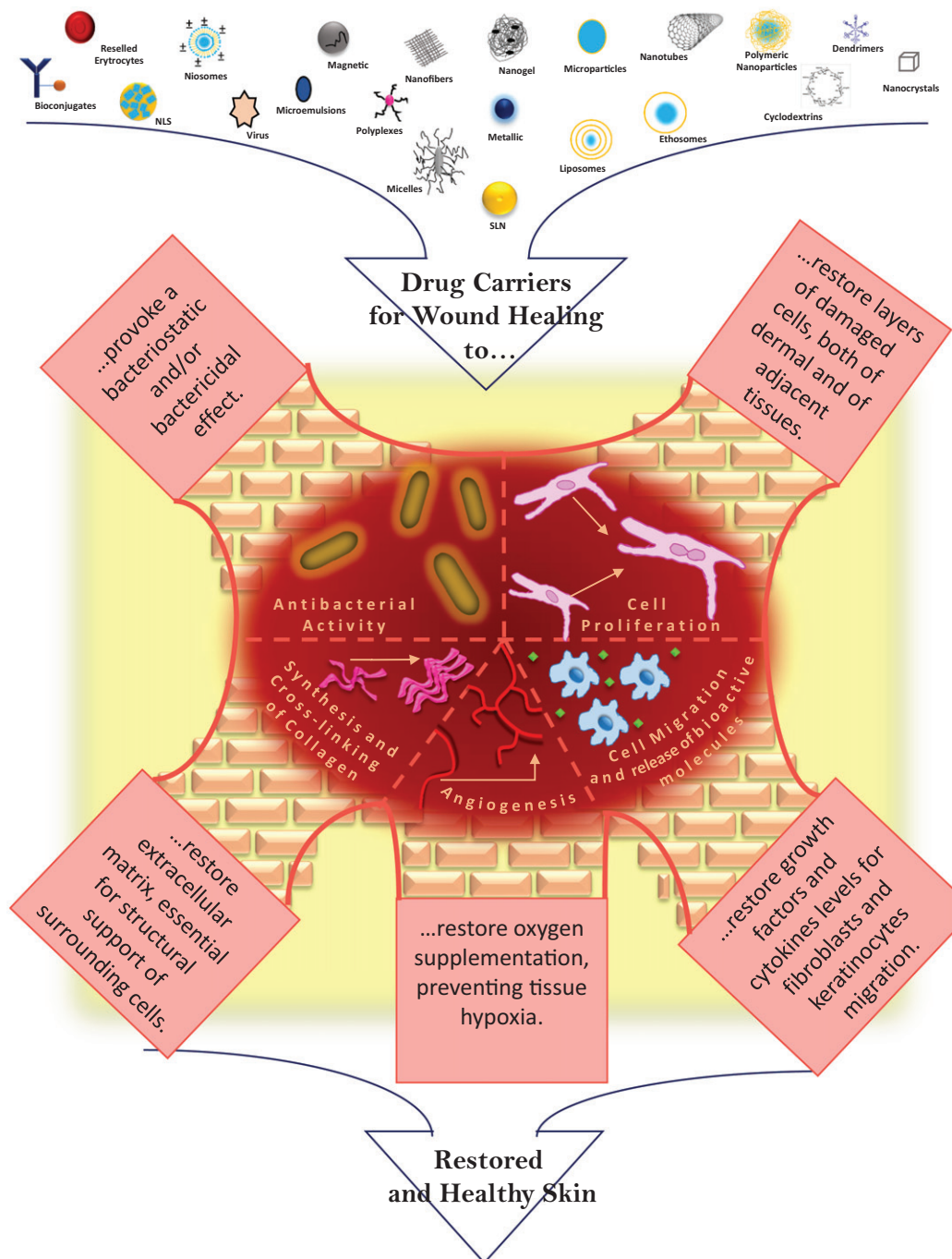


Figure 2. Schematic representation of different carriers and their main effects in the healing of a wound.

development of biofilms in chronic wounds, Pérez-Díaz et al. [63] evaluated the anti-biofilm capacity of chitosan gel formulations loaded with silver nanoparticles, finding that these gels can be useful in the prevention and treatment of infections.

Au nanoparticles are biologically active materials and cancer diagnostic agents; however, they can also have a wound healing application. The topical application of this type of nanoparticles accelerates normal and diabetic wound healing because of the triggering properties of some anti-oxidant agents such as epigallocatechin gallate and α -lipoic acid when combined with Au nanoparticles. Lee et al. [64] found that phytochemical-decorated Au nanoparticles can be potential candidates for skin regeneration

and wound healing. The authors tested Au nanoparticles covered with gallic acid-isoflavone and protocatechuic acid-isoflavone. In both cases, a higher expression of VEGF and angiopoietin-2 was found, and it is thought that the antioxidant properties of these nanoparticles promote the activation of biomolecules that accelerate the healing mechanisms.

The use of microorganisms, fungi, and plant extracts for the green synthesis of metallic nanoparticles has been widely documented. Mannan sulfate (MS) has been used as a reducing and capping agent for the synthesis of silver nanoparticles (MSAgNPs) [65]. This polysaccharide, composed of D-mannose units, is isolated from the cell wall of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). The

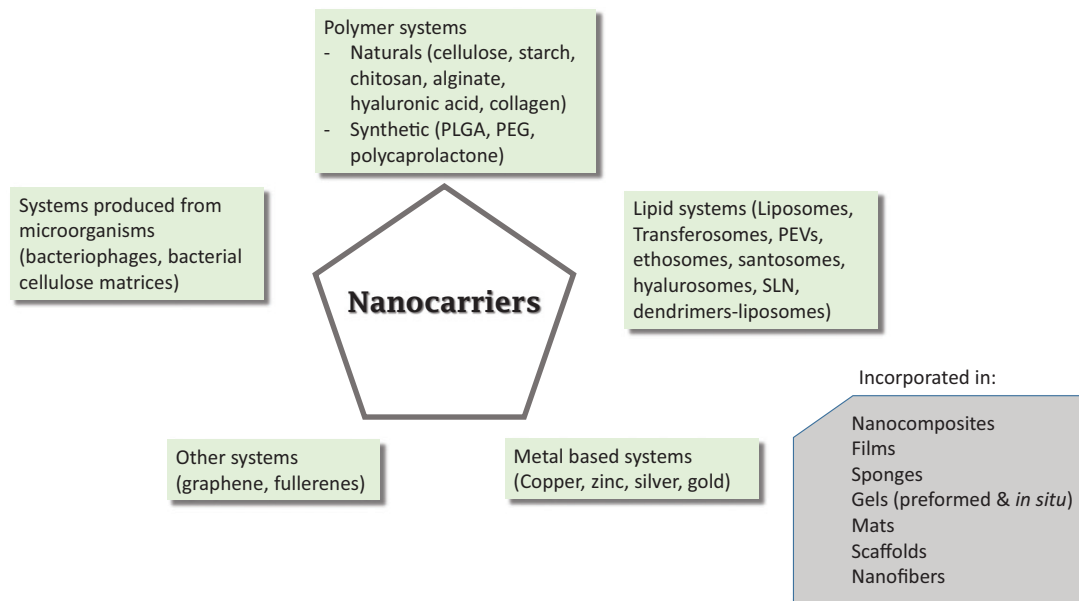


Figure 3. Summary of nanocarriers cited in the text.

authors found that the topical application of MSAGNPs hydrogel accelerates the recovery of wounds via modulation of cytokines and growth factors.

miRNAs have been shown to play an important role in the recovery of wounds, acting in different phases of the process, especially in the case of chronic wounds associated with diabetes. In this sense, Au nanoparticles complexed with miRNA and coated with PEG have received great attention as vectors for the release of miRNA [66]. Coating with water-soluble polymers such as PEG prolongs the circulating time of the miRNA, protects it from degradation and reduces capture by the reticuloendothelial system.

Polymer systems

Different materials have shown to be effective in enhancing cell proliferation and tissue regeneration. Among them, natural materials such as cellulose, starch, chitosan, alginate, and hyaluronic acid have found a wide application for wound dressing or wound healing [1,67].

Starch derivatives have shown good qualities for the treatment of wounds due to their ability to absorb and retain water. Starch-based products, in the form of films or hydrogels, are available on the market. Although cellulose is not completely digested by the human body, nanocellulose is considered as biocompatible and hemocompatible. According to its characteristics and its origin, it is possible to find different types of nanocellulose (e.g. nanocrystals, nanofibers, and bacterial). Due to its ability to increase cell proliferation and its high absorption capacity, bacterial nanocellulose represents an excellent biomaterial for wound healing products [1].

Chitosan, a natural product, biodegradable and biocompatible, exhibits antimicrobial properties [63–65]. Chitosan activates complement, promotes migration of polymorphonuclear leucocytes, induces the release of inflammatory mediators and improves granulation and reorganization of damaged tissue [68–71]. Chitosan has been processed in the form of films, hydrogels, nanoparticles, fibers, *in situ* gels, nanofibrous mats, etc. Either alone or combined, a large variety of nanosystems containing chitin and chitosan (e.g. chitosan-polyethylene oxide-mats, chitosan-PVA-mats, alginate-chitosan scaffolds), have been proposed [e.g.

1,72]. Ehterami et al. [73] proposed an electrospun nanofibrous hybrid wound dressing composed of insulin-loaded chitosan nanoparticles, coated onto the electrospun poly (ϵ -caprolactone)/collagen (1:1 w/w) solution. In addition to the slow release of insulin, which stimulates keratinocytes and fibroblast's proliferation through the regulation of glucose uptake by skin cells, this dressing showed good mechanical properties and water retention capacity. Furthermore, the porosity and hydrophilic nature of the system facilitate cell adhesion and growth.

Hyaluronic acid, a naturally occurring polysaccharide, has been used in veterinary practice and in human patients for wound healing. Hydrogels and films prepared from hyaluronic acid derivatives, such as pegylated compounds or carboxymethylated derivatives, have shown to be effective in fighting both acute and chronic wounds [67,74]. As known, hyaluronic acid (hyaluronan) is an important component of cartilage and connective tissue. With a great capacity to absorb water and form gels, hyaluronate keeps the wound hydrated. Garrastazu-Pereira et al. [75] prepared a sustained release system, consisted of hyaluronate nanoparticles containing vitamin E acetate, which were then incorporated in a bioadhesive polymeric film composed of PVA, alginate, hyaluronate, and Aloe vera extract. A synergistic effect in wound healing was expected due to the properties of each of the components, such as the antioxidant effect, promotion of the formation of collagen fibers, reduction of hypertrophic scars and increase in hydration and re-epithelialization.

Derivatization of gellan carboxyl groups (a linear anionic polysaccharide), with a hydrophobic moiety (e.g. cholesterol), has resulted in the formation of gels with nano-sized particles (nanohydrogels), capable of incorporating lipophilic molecules. These nanohydrogels have been shown to be biocompatible, and due to their ability to incorporate large volumes of water, they increase the hydration of the skin. Manconi et al. [76] demonstrated that baicalin autoclaved nanohydrogels, applied on the skin, led to complete wound healing.

On the other hand, fatty acids are able to modulate inflammation and to increase the presence of neutrophils [77]. In this sense, Bonferoni et al. [69] obtained hydrophobically modified chitosan, by ionic interaction between chitosan and fatty acids, such as oleic and linoleic acid. With this material, they prepared

nanoparticles with characteristics of polymeric micelles, through the ionic interaction of chitosan and fatty acids. As ionic bonds are weaker than the covalent ones, nanoparticles can dissociate into their elementary components (chitosan and fatty acids). Clarithromycin was included as a model antibiotic. The system with oleate, showed to be useful in the treatment of chronic wounds or burns, improving the release of poorly soluble drugs. These micelles were tested with silver sulfadiazine in combination with a platelet lysate [78]. Micelles helped to overcome some drawbacks associated with silver sulfadiazine such as cytotoxicity and aqueous solubility, and combined with the platelet lysate avoided the impairment proliferation effect reported for this drug. Cell attachment and proliferation were found with chitosan/silk fibroin blending membranes crosslinked with alginate [79].

Curcumin nanoparticles were prepared by Krausz et al. [80], through a sol-gel-based polymerization technique, combining chitosan, polyethylene glycol 400, and tetramethyl orthosilicate, to induce polymerization. Once obtained a gel, it was lyophilized and the particle size of the powder was reduced in a ball mill. The system circumvents the difficulties inherent with curcumin administration, favoring its action. In addition to the innate antimicrobial properties of curcumin, the system promotes wound healing, through different mechanisms such as by increasing re-epithelialization, collagen deposition, fibronectin production, and myofibroblast contraction. An excellent review on the effects of curcumin on the regeneration of wounds, as well as on the nanocarriers in which it has been formulated, is the one published by Hussain et al. [50]. Therefore, this system promises to be effective for the healing of infected cutaneous injuries or burns.

Alginate is a block copolymer of D-mannuronate and L-guluronate residues, whose properties depend on the proportion of mannuronate and guluronate. In general, its excellent gelation properties favor the slow release of the drugs included, the absorption of exudate and the conservation of moisture in the wound environment. De Cicco et al. [45] obtained an *in situ* gelling nanoparticulate powder by the nanospray drying technology. The system, composed of a blend of alginate (with high mannuronic content) able to stimulate cytokine production, and high amidated pectin to speed-up the gel-forming rate was loaded with gentamicin. This hydrogel, with gentamicin-loaded nanoparticles, showed a better antimicrobial effect compared to pure gentamicin, and additionally, presented an adequate gaseous exchange, without causing dehydration, nor accumulation of humidity (occlusion). Other systems with alginate include scaffolds consisting of alginate-chitosan and alginate-arabic gum, nanofibrous mats with alginate-PVA and alginate silver nanocomposites [1,81–83].

In chronic wounds, reconstitution of the microvasculature through angiogenesis aims to restore oxygen supplementation, preventing tissue hypoxia. Oxygen is essential for proper wound healing, on the contrary, lack of oxygen, known as hypoxia, hinders tissue repair processes. With this in mind, Basilico et al. [7] and Khadjavi et al. [84], prepared oxygenating compounds based on chitosan- or dextran-shelled and 2H,3H-decafluoropentane-cored oxygen-loaded nanodroplets, proving that they were effective to counteract hypoxia. Decafluoropentane is a stable and biologically inert material, able to carry oxygen. These nanodroplets release oxygen in a controlled manner, so they can be used as adjuvants for the treatment of chronic wounds, being able to accelerate tissue repair through the balance of proangiogenic proteolytic enzymes and their inhibitors. This has a positive effect on collagen deposition, fibroplasia, angiogenesis, and resistance to infection. Topical administration of oxygen included in

nanodroplet formulations can be able to promote the healing process in hypoxic wounds. Mohandas et al. [85] reported the preparation of chitosan-hyaluronic acid-nanofibrin composites sponges loaded with VEGF, for the treatment of diabetic wound with poor angiogenesis.

A wide variety of fibers have been prepared based on the natural materials mentioned above, such as chitosan, fibrinogen, silk fibrin, bacterial cellulose, gelatin, and collagen. Mats prepared with these fibers have many of the characteristics sought for a wound dressing. In addition, active molecules or drugs can be incorporated in the matrix, obtaining additional benefits, such as anti-inflammatory activity and tissue growth-enhancing activity [1,86].

Hashimoto et al. [47] proposed a new strategy for the production of a nanogel-crosslinked porous (NanoClip) gel, characterized by having macro-pores of several hundred micrometers in diameter, which allows it to harbor proteins or carriers (e.g. liposomes) within their structure, through hydrophobic interactions. The NanoClip gel is proposed as a scaffold for tissue engineering, due to its capacity to enhance cell infiltration and to promote neovascularization, without the need of exogenous growth factors. The porous network allows the exchange of nutrients as well as the disposal of waste, primary functions for tissue regeneration. The gel presents good mechanical properties, biodegradability, and a sustained release.

Protein-based natural polymers have found a wide field of application for the treatment of acute and chronic wounds. Collagen is one of the most widely used biomaterials in products for wound regeneration. In addition to being a homeostatic agent, collagen promotes cell migration and protein secretion. Different dressings based on collagen, collagen-alginate and collagen-silver combinations, are commercially available. Ashtikar and Wacker [1] present a review of products in development or in the market, based on biomaterials of natural origin.

Photodynamic therapy appears as an effective alternative to fight infections, avoiding common resistance problems with antibiotics. This technique is based on the administration of a photosensitizer followed by light activation. Nafee et al. [87] prepared polycaprolactone-poly(ethylene glycol) nanoparticles containing hypericin (a photosensitizer), whose antimicrobial properties against fungi and bacteria have been tested. The antibacterial activity of the free and nanoencapsulated hypericin, as well as the wound healing effect, were tested *in vitro* and *in vivo*. The results showed enhanced antibiofilm photoactivity and a faster wound healing in the *in vivo* studies for hypericin-loaded nanoparticles, compared to free drug.

Quinn et al. [88] and Seabra et al. [89] address the fundamental role of nitric oxide in all stages of the wound healing process and the importance of a system that allows the sustained release of nitric oxide. In these review documents, the authors mention a number of studies about nitric oxide-releasing polymeric nanocarriers (e.g. nanoparticles, dendrimers, and micelles) and their advantages over other treatments, in accelerating wound healing and as a potent antimicrobial agent, among other biomedical applications.

Dendrimers are a type of polymeric macromolecules, which can act by themselves as antibacterial agents or as drug carriers, enhancing the antibacterial activity of antibiotics. It has been found that the inclusion of silver nanoparticles in dendrimers enhances their anti-inflammatory and antimicrobial activity [90].

Among polymers of synthetic origin, poly(lactic-co-glycolic acid), known as PLGA, is probably the most widely used biodegradable polymer in medical applications. The fact that the degradation of PLGA involves the release of lactic acid, has a positive

effect because it promotes angiogenesis and wound healing. In addition to this effect, PLGA has been used for the production of nanocarriers with drugs focused on the regeneration of the skin, examples of which are mentioned below. Chereddy et al. [91] prepared PLGA nanoparticles loaded with curcumin, seeking to enhance the beneficial effects of both components. The authors found that curcumin-loaded nanoparticles reduce inflammation, promotes reepithelialization and collagen deposition. Nurhasni et al. [92] prepared poly(lactic-co-glycolic acid)-polyethyleneimine nanoparticles for the prolonged release of nitric oxide, taking advantage of its aforementioned properties. In another study, PLGA was attached to the N-termini of bacitracin A, to design a self-assembled nano-bacitracin A. Besides being biocompatible, this complex had strong antibacterial properties against both gram-positive and gram-negative bacteria. This is an important fact, since bacitracin originally has a very reduced spectrum of activity, being effective only against gram-positive bacteria. This novel class of self-assembling nano-bacitracin A was shown to be effective against both gram-positive and gram-negative bacteria [93].

As already mentioned miRNA has been effective in the treatment of chronic wounds, so it has been included in biodegradable nanoparticles based on PLGA or silica nanoparticles. Its encapsulation aims to solve problems such as low cellular uptake, degradation in the bloodstream, and rapid renal clearance. miRNA has also been included in dendrimers [66].

Polycaprolactone is a hydrophobic, biodegradable polyester, whose degradation depends mainly on its molecular weight; although, it is possible to adjust the degradation time through its polymerization or its combination with other polymers. Accelerated skin wound healing has been observed with polycaprolactone nanofibers, either alone or in combination with other polymers [94,95]. Nanofibers have also been prepared from other biodegradable polymers such as PLA, PLGA, PVA, and chitosan, which in addition to being biocompatible and nontoxic, have good mechanical properties [86,96]. Among the advantages of nanofibers is that they can act as drug carriers themselves, having a large surface area and controllable porosity. Materials such as antibiotics, triclosan, chlorhexidine, quaternary ammonium compounds, biguanides, silver nanoparticles, and metal oxide nanoparticles, have been included in these nanofibers.

Pavličáková et al. [97] included halloysite nanotubes (HNTs) (two-layered aluminosilicate material) to prepare electrospun polycaprolactone/gel nanofibers. Three types of HNTs (New Zealand – HNT NZ, Slovakia – HNT SK and Sigma-Aldrich, St. Louis, MO – HNT SA) with similar aspect ratio and different length and inner diameter have been used for nanofiber preparation. All HNT modified nanofibers were confirmed as wound healing covers.

The use of plant extracts for the treatment of wounds is an ancient practice that has proven to be useful for promoting tissue regeneration, not only because they take part in the different stages of wound healing, but also because of their antimicrobial activity. However, due to the disadvantages of semi-solid forms such as hydrogels and ointments (especially in the case of exudating wounds), its inclusion in polymeric substrates has been proposed. The polymers mentioned in the previous paragraphs have been combined with medicinal plant extracts to obtain different conjugate-based therapeutic constructs, such as films, sponges, nanofibers, and nanocomposites [98].

Lipid systems

Castangia et al. [59] prepared curcumin- and quercetin-loaded liposomes and penetration enhancer-containing vesicles (PEVs). PEVs

accomplish a double action: as penetration enhancers and as suitable carriers. In this work, two hydrophilic surfactants, polyethylene glycol 400 (PEG) and Oramix[®] CG110 (octyl-decyl polyglucoside), were used as enhancers in PEVs. Oligolamellar (liposomes) and multilamellar (PEVs) structures of different sizes were obtained. Although the authors found that both liposomes and PEVs were able to improve skin deposition, especially in the stratum corneum, the best results were observed with the curcumin PEG-PEV formulation. Polyphenolic phytocomplexes from *Fraxinus angustifolia* leaf and bark extracts were formulated in ethosomes and phospholipid vesicles containing Transcutol[®] or ethylene glycol. The systems allowed a higher cell uptake, resulting in a higher antioxidant and anti-inflammatory effect (particularly with the ethylene glycol-vesicles) than with the free extracts. Indeed, free *F. angustifolia* extracts showed a marginal effect [99].

Essential oils have been formulated in different systems (phyto-systems) in order to increase their physical stability. The essential oil of *S. insularis* (a plant from Italy) has been studied because of its antimicrobial and antiviral activity, as well as because of its ability to enhance the drug permeation through the skin. New carriers, named santosomes, are unilamellar polyhedral vesicles, composed of hydrogenated phosphatidylcholine and *S. insularis* essential oil. The essential oil of these carriers improves the delivery of the loaded drug due to two mechanisms: modification of the bilayer structure, and a synergistic enhancing effect of mono- and sesquiterpenes (potent penetration enhancers) and phospholipid. Castangia et al. [100] formulated phycocyanin (well-known because of its antioxidant, antiinflammatory, anti-cancer, and wound-healing activities), into santosomes (~118 nm). Encapsulated phycocyanin was more effective than the free protein, in promoting the internalization into endothelial cells and avoiding edema formation, protecting the skin against free radicals and contributing to the restoration of damaged tissue.

El-Refai et al. [101] and Manca et al. [102], formulated hyalurosomes (also called hyalurosomes) containing curcumin (recognized for its ability to promote wound healing [103]). As described by these authors, the systems can be prepared by different methods. In both cases, hyaluronic acid was chosen, because it fulfills two important functions, is the gelling agent and is recognized for its ability to reduce scars and promote tissue regeneration. One difference between these two works is the inclusion of Tween 80 in the work of El-Refai et al. [101], which allowed the production of flexible vesicles. The cutaneous wound healing potential of hyalurosomes (or hyalurosomes) were compared with conventional systems, such as transferosomes and liposomes. The results proved that hyalurosomes showed a marked improvement and complete healing, compared to conventional systems. This is attributed to the combined effect of curcumin (anti-inflammatory and anti-oxidant) [48] and hyaluronic acid (capable of reducing scars). Hyalurosomes are novel systems that take advantage of the flexible liposomes (thanks to the presence of Tween 80) and from the hygroscopic properties of hyaluronic acid. Hyaluronic acid may increase skin hydration, improving the penetration of flexible liposomes. A higher collagen formation and a marked re-epithelialization were observed in a shorter time, with hyalurosomes, as compared to the transferosomes. Furthermore, the hyalurosomes formulation was the only able to give a detectable amount of curcumin in the skin [101].

Solid lipid nanoparticles (SLNs) have shown several advantages as controlled delivery systems such as: (i) they represent a good option for hydrophilic and lipophilic active compounds; (ii) they do not present biotoxicity; (iii) they improve drug bioavailability and targeting; (iv) they promote diffusion through biological

barriers due to their size and liposolubility; (v) the manufacturing process can be easily scaled-up; (vi) the production processes can be solvent-free. Different works propose these systems to improve wound healing, e.g. Arana et al. [104] loaded *Calendula officinalis* extract in SLN, intended for epithelium repair in the ocular surface. The authors found that incorporation of *Calendula* extract into SLN, improved the wound-healing activity of the free extract. The nanostructured lipid carriers (NLCs), arise to solve the various disadvantages found with SLNs. Consisting of a mixture of liquid lipids and solid lipids, they have a higher load capacity and greater stability, in relation to SLN [105].

The inclusion of miRNA in non-viral delivery systems has advantages over viral vectors since they exhibit lower toxicity and immunogenicity, increased cellular uptake, water solubility, as well as resistance to endonucleases, and phagocytosis. An example of this is polyplexes, which are obtained from the complexation of negatively charged miRNA, with a positively charged carrier, through an electrostatic interaction [66].

Nanocarriers for small interfering RNA (siRNA) delivery, such as dendrimers complexed with liposomes, have shown to enhance wound closure. A microtubule-severing enzyme, fidgeting-like 2 (FL2), plays an important role in directional migration of keratinocytes and fibroblasts. FL2 knockdown can be achieved through siRNA nanocarriers, increasing in this way cell migration, which resulted in a more rapid wound closure [106]. Furthermore, as burns and non-healing wounds are colonized to a greater or lesser degree with bacteria, it is important that the delivery system provides a sustained release of antimicrobials to prevent bacterial proliferation, while simultaneously accelerating cell migration [79,107].

The effect of opioids on wound healing and on the reduction of severe pain of skin wounds was studied by Wolf et al. [108]. Opioids included in SLN and in dendritic core-multishell nanotransporters were found to be a good option for these goals.

Andrographolide, a natural diterpene lactone, has anti-inflammatory and antioxidant effects, improving the wound healing activity. However, a problem of Andrographolide is related to its low aqueous solubility. That is why Sanad and Abdel-Barb [109] formulated it in lipid nanocarriers, which in turn were included in a chitosan-hyaluronic acid composite sponge scaffold. The system showed reduced scar formation and improved histological progress when compared to control. The effects observed are attributed not only to the properties of andrographolide but to the whole system, for the aforementioned effects of chitosan and hyaluronic acid on the promotion of wound healing.

Systems produced from microorganisms

Bacteriophages

Bacteriophages are viruses that infect and replicate within bacteria. They have shown interesting therapeutic applications such as eradication of bacterial biofilms. Due to its ability to kill bacteria, they have been considered as promising antimicrobial agents. In fact, the use of phages as antimicrobial agents is known as phage therapy. Phages can be specific targeted delivery carriers since they can be manipulated or modified in such a way, that they can involve targeting ligands (e.g. antibodies) against specific receptors, or they can be combined with synthetic polymers [110]. Phages have been used to treat wound-related antibiotic-resistant infections, e.g. burn-wound-related *P. aeruginosa* infections treated with bandages soaked with phages showed full recovery in 50% of the cases [111]. However, the high specificity of the phages implies that in many occasions a cocktail of phages is required to

have a broad spectrum activity [6]. 'PhagoBioDerm' is a biodegradable polymer loaded with bacteriophages that have shown to be useful for the treatment of refractory ulcers. Complete healing of ulcers was observed in most of the patients [112,113].

Bacterial cellulose matrices

Bacterial cellulose matrices have found applications in a wide variety of areas. In nanomedicine, these matrices containing therapeutic molecules have been proposed for the treatment of wounds and burns. Bacterial cellulose is an extracellular polymer produced by different microorganisms. An important characteristic is that it has a nanoporous structure, which can take the form of nanofibrils, micro- and nanoparticles, and biofilm matrix. Although mammals are not able to degrade cellulose, it is expected that the system will integrate into the hosted tissue without a problem [114]. A bacterial cellulose-PEG composite showed good properties to be used for wound dressing or tissue-engineering applications [115]. The authors found better biocompatibility with the bacterial cellulose-PEG scaffolds than with the pure bacterial cellulose.

Other systems

Among other systems with antibacterial activity, graphene is a renewable and easy to obtain material, which has shown interesting properties and advantages, such as, severe cytotoxic effect on microorganisms, broad-spectrum, little bacterial resistance, and can function as a support for different nanomaterials (e.g. metals and polymers) enhancing its antibacterial effect, due to a synergistic effect. Its mechanism of action involves both physical and chemical effects, which have been described by Ji et al. [116] and include: Physical damage to bacterial membranes, caused by its sharp edges, as well as wrapping and photothermal ablation; the chemical effect is associated with the oxidative stress. Nanocomposites with metals, metal oxides, polymers, EDTA, and salts have been proposed as antibacterial systems. Composites in the form of nanofibers and films have shown to lead to a rapid and complete wound healing [117]. Graphene-based systems have been widely used as controlled release nanocarriers [116]. Photothermal treatment with graphene oxide using near-infrared laser was reported by Khan et al. [118]. Higher efficiency of graphene oxide irradiated with near-infrared ($\lambda = 1064$ nm) was demonstrated over graphene oxide alone, resulting in remarkable healing for infected wounds.

Fullerenes have also shown antioxidant activity and intrinsic antimicrobial activity against different bacteria. Fullerenes consist of 20 hexagonal and 12 pentagonal rings as the basis of an icosahedral symmetry closed cage structure, being able to act as vectors for drugs or drug delivery scaffolds with non-covalent linkages or with covalent linkages between the fullerene and a bioactive moiety [6].

Quignard et al. [119], investigated the effect of soluble silica (in the form of orthosilicic acid) or as silica nanoparticles, on the migration and proliferation of human skin fibroblasts. It is important to mention that silicon is one of the most abundant elements in the human body, after iron and zinc, and its functions are focused on the health of the connective tissue. The authors found that although the bioactive form of silica is silicic acid, it finds difficulty in penetrating the cells; nevertheless, in the form of silica nanoparticles, their internalization in the cells is favored, then releasing the silicic acid as a function of time, resulting in a

regenerative effect faster than with the application of the soluble silicic acid.

The anticonvulsant phenytoin acts in the regeneration of tissues in a number of ways, including stimulation of fibroblast proliferation, the formation of granulation tissue, and by increasing collagen deposition and neovascularization. However, because phenytoin is water-insoluble, it needs to be included in a carrier. Teo et al. [120] prepared nanoemulsions with phenytoin and found a significant increase in human keratinocytes viability relative to untreated cells. It is suggested that phenytoin acts as an EGF, promoting the repair of wounds. In addition, its inclusion in a nanoemulsion increases its activity in relation to that of a solution with this drug.

It is worth mentioning that there are other good reviews that can contribute and complement what has been mentioned so far about the use of nanocarriers in wound healing, for example, Hamdan et al. [121] describe advances in nanotechnology that introduce the newly developed nanomaterials, nanoengineering processes, growth factor, and stem cell therapies for wound healing. In the same way, Chakrabarti et al. [122] give the concepts of basic mechanisms of wound healing process and the strategies based on nanosystems, useful in the field of wound management, while Alberti et al. [123] describe the advantages of using nanofibrous materials for tissue repair as well as its capacity to deliver active molecules. Kim et al. [124] present different strategies to enhance the healing of non-healing wounds, including growth factor, gene delivery, and cell therapy; the replacement of damaged skin with substitutes comprising cell-laden scaffold; the sustained release of drugs from nano- and microparticulate systems, improving bioavailability and reducing the dosage frequency.

Conclusions and further perspectives

Several situations could lead to a risk of developing wounds; however, those that were probably going to be of the acute type, evolve to chronic due to disorders such as diabetes, obesity, smoking, among others. That is why the scientific community has focused on the improvement of current formulas or the development of new release systems for the wound healing, that may allow a controlled release, avoiding recurrent administration; that promotes cell proliferation by externally administering growth factors or cytokines, etc. Many of these technologies are based on the use of nanomaterials due to the advantages that they possess such as the ability to penetrate certain areas of the wound, protect drugs from degradation caused by high enzymatic activity, and the possibility of offering a controlled release in both time and space. The use of new materials, as well as the handling of nanocarriers, have improved the recovery rate of chronic wounds, avoiding critical situations such as the amputation of limbs in patients. It is noteworthy that although the nanosystems are an excellent alternative, reporting encouraging results especially for people with chronic wounds or with processes of wound healing altered by a condition such as those already mentioned in the text, it is necessary to carry out in-depth studies in areas such as the toxicology of nanocarriers and nanomaterials, foreseeing the fate and consequences of these systems not only in the organism (e.g. what happens if they accumulate, how they are eliminated, etc.), but also in the environment. On the other hand, although there is a lot of information about the potential use of these nanocarriers in wound healing, supported by computational biomedicine, *in vitro* and *in vivo* studies in animal models, it is necessary that all these proposals reach a clinical application, fulfilling the task of improving the quality of life of the population that

suffers from this type of affections. So far, studies in patients with chronic wounds, treated with systems based on nanotechnology, are still very limited, due to the complexity of the processes involved in wound healing and tissue regeneration, as well as the interindividual variability in the type of wound and its cause. This wide variability between patients and the comorbidity frequently associated with the wound, result in the absence of a single therapy appropriate for all cases. However, it is expected that the work shared among researchers from different areas will allow the development of effective systems for each particular situation, capable of promoting adequate tissue healing and regeneration.

Disclosure statement

The authors declare that they have no conflicts of interest related to the subject matter or materials discussed in this article.

Funding

The authors appreciate the support provided by PAPIIT/UNAM (reference 226119) and PIAPI/FESC/UNAM (reference 1803).

References

- [1] Ashtikar M, Wacker MG. Nanopharmaceuticals for wound healing – lost in translation? *Adv Drug Deliv Rev.* 2018; 129:194–218.
- [2] Cisneros-González N, Ascencio-Montiel JJ, Libreros-Bango VN. Índice de amputaciones de extremidades inferiores en pacientes con diabetes. *Rev Med Inst Mex Seg Soc.* 2016; 54:472–479.
- [3] Kaplani K, Koutsi S, Armenis V, et al. Wound healing related agents: ongoing research and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;129:242–253.
- [4] Garcia-Orue I, Gainza G, Villullas S, et al. Nanotechnology approaches for skin wound regeneration using drug-delivery systems. In: Grumezescu A, editor. *Nanobiomaterials in soft tissue engineering.* Norwich, NY: William Andrew; 2016. p. 31–55.
- [5] Pitorre M, Gondé H, Haury C, et al. Recent advances in nanocarrier-loaded gels: which drug delivery technologies against which diseases? *J Control Rel.* 2017;266:140–155.
- [6] Jahromi MAM, Zangabad PS, Basri SMM, et al. Nanomedicine and advanced technologies for burns: preventing infection and facilitating wound healing. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;123:33–64.
- [7] Basilico N, Magnetto C, D'Alessandro S, et al. Dextran-shelled oxygen-loaded nanodroplets reestablish a normoxia-like pro-angiogenic phenotype and behavior in hypoxic human dermal microvascular endothelium. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015;288:330–338.
- [8] Shaw TJ, Martin P. Wound repair: a showcase for cell plasticity and migration. *Curr Opin Cell Biol.* 2016;42:29–37.
- [9] Mustoe TA, O'Shaughnessy K, Kloeters O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(7):355–415.
- [10] Brugues A, Anon E, Conte V, et al. Forces driving epithelial wound healing. *Nat Phys.* 2014;10:683–690.
- [11] Javierre E. Impact of anomalous transport kinetics on the progress of wound healing. *Med Eng Phys.* 2016;38: 885–894.

- [12] Soley Bda S, Morais RL, Pesquero JB, et al. Kinin receptors in skin wound healing. *J Dermatol Sci*. 2016;82:95–105.
- [13] Shaw TJ, Martin P. Wound repair at a glance. *J Cell Sci*. 2009;122:3209–3213.
- [14] Kornblatt AP, Nicoletti VG, Travaglia A. The neglected role of copper ions in wound healing. *J Inorg Biochem*. 2016; 161:1–8.
- [15] Jimenez AJ, Perez F. Physico-chemical and biological considerations for membrane wound evolution and repair in animal cells. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;45:2–9.
- [16] Sonnemann KJ, Bement WM. Wound repair: toward understanding and integration of single-cell and multicellular wound responses. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27: 237–263.
- [17] Ligi D, Mosti G, Croce L, et al. Chronic venous disease – part I: inflammatory biomarkers in wound healing. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862:1964–1974.
- [18] Yager DR, Kulina RA, Gilman LA. Wound fluids: a window into the wound environment? *Int J Low Extrem Wounds*. 2007;6:262–272.
- [19] Sami DG, Heiba HH, Abdellatif A. Wound healing models: a systematic review of animal and non-animal models. *Wound Med*. 2019;24:8–17.
- [20] Kuhlmann M, Wigger-Alberti W, Mackensen Yv, et al. Wound healing characteristics of a novel wound healing ointment in an abrasive wound model: a randomised, intra-individual clinical investigation. *Wound Med*. 2019;24: 24–32.
- [21] Trengove NJ, Langton SR, Stacey MC. Biochemical analysis of wound fluid from nonhealing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen*. 1996;4:234–239.
- [22] Olczyk P, Mencner L, Komosinska-Vassev K. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *BioMed Res Int*. 2014;2014:1.
- [23] Triplett DA. Coagulation and bleeding disorders: review and update. *Clin Chem*. 2000;46:1260–1269.
- [24] Tsai CY, Finley JC, Ali SS, et al. Copper influx transporter 1 is required for FGF, PDGF and EGF-induced MAPK signaling. *Biochem Pharmacol*. 2012;84:1007–1013.
- [25] Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, et al. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol*. 1998; 152:1445–1452.
- [26] Patel A, Srivastava S, Rawat-Singh M, et al. Mechanistic insight into diabetic wounds: pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. *Biomed Pharmacother*. 2019;112:108615.
- [27] Han G, Ceilley R. Chronic wound healing: a review of current management and treatments. *Adv Ther*. 2017;34: 599–610.
- [28] Ozdemir D, Feinberg M. MicroRNAs in diabetic wound healing: pathophysiology and therapeutic opportunities. *Trends Cardiovasc Med*. 2019;29:131–137.
- [29] Salazar J, Ennis W, Koh T. Diabetes medications: impact on inflammation and wound healing. *J Diabet Complications*. 2016;30:746–752.
- [30] Vijayakumar V, Samal SK, Mohanty S, et al. Recent advancements in biopolymer and metal nanoparticle-based materials in diabetic wound healing management. *Int J Biol Macromol*. 2019;122:137–148.
- [31] Theunissen D, Seymour B, Forder M, et al. Measurements in wound healing with observations on the effects of topical agents on full thickness dermal incised wounds. *Burns*. 2016;42:556–563.
- [32] The Wound Healing Society. Chronic wound care guidelines; 2007. Abridged version. Available from: www.woundheal.org
- [33] Ramundo J, Gray M. Enzymatic wound debridement. *J Wound Ostomy Continence Nurs*. 2008;35:273–280.
- [34] Smith RG. Enzymatic debriding agents: an evaluation of the medical literature. *Ostomy Wound Manage*. 2008;54: 16–34.
- [35] Thomas S, Andrews A, Jones M. The use of larval therapy in wound management. *J Wound Care*. 1998;7:521–524.
- [36] Vowden KR, Vowden P. Wound debridement, part 2: sharp techniques. *J Wound Care*. 1999;8:291–294.
- [37] Lipsky BA, Hoey C. Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. *Clin Infect Dis*. 2009;49:1541–1549.
- [38] World Union of Wound Healing Societies (WUWHS). Principios de Las Mejores Prácticas: La Infección de Las Heridas en la Práctica Clínica. Consenso Internacional. London: MEP Ltd; 2008. Available from: www.mepltd.co.uk
- [39] Dhivya S, Padma VV, Santhini E. Wound dressings – a review. *Biomedicine (Taipei)*. 2015;5:22.
- [40] Dabiri G, Damstetter E, Phillips T. Choosing a wound dressing based on common wound characteristics. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2016;5:32–41.
- [41] Consenso Internacional [International Consensus]. Función de las proteasas en el diagnóstico de heridas. Revisión de un grupo de trabajo de expertos [The role of proteases in the diagnosis of wounds. Review of a working group of experts]. London: Wounds International; 2011.
- [42] Department of Violence and Injury Prevention and Disability World Health Organization. Prevention and management of wound infection. Guidance from WHO's Department of Violence and Injury Prevention and Disability and the Department of Essential Health Technologies. Available from: <http://www.who.int/hac/techguidance>
- [43] Beckmann KH, Meyer-Hamme G, Schröder S. Low level laser therapy for the treatment of diabetic foot ulcers: a critical survey. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:1.
- [44] Tricco AC, Antony J, Vafaei A. Seeking effective interventions to treat complex wounds: an overview of systematic reviews. *BMC Med*. 2015;13:89.
- [45] De Cicco F, Porta A, Sansone F, et al. Nanospray technology for an *in situ* gelling nanoparticulate poder as a wound dressing. *Int J Pharm*. 2014;473:30–37.
- [46] Gainza G, Villullas S, Pedraz JL, et al. Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration. *Nanomedicine*. 2015;11:1551–1573.
- [47] Hashimoto Y, Mukai S, Sawada S, et al. Nanogel tectonic porous gel loading biologics, nanocarriers, and cells for advanced scaffold. *Biomaterials*. 2015;37:107–115.
- [48] Mahmood K, Mahmood Zia K, Zuber M, et al. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: a review. *Int J Biol Macromol*. 2015;81:877–890.
- [49] Maitz MF. Applications of synthetic polymers in clinical medicine. *Biosurf Biotribol*. 2015;1:161–176.
- [50] Hussain Z, Thu HE, Ng Sh F, et al. Nanoencapsulation, an efficient and promising approach to maximize wound

- healing efficacy of curcumin: a review of new trends and state-of-the-art. *Colloids Surf B*. 2017;150:223–241.
- [51] Eberlein T, Gerke P, Lorenz H, et al. Advantages in wound healing by a topical easy to use wound healing lipo-gel for abrasive wounds – evidence from a randomized, controlled experimental clinical study. *Wound Med*. 2016;15:11–19.
- [52] Chen S, Huan Z, Zhang L, et al. The clinical application of a silicate-based wound dressing (DermFactor®) for wound healing after anal surgery: a randomized study. *Int J Surg*. 2018;52:229–232.
- [53] Izadpanah A, Soorgi S, Geraminejad N, et al. Effect of grape seed extract ointment on cesarean section wound healing: a double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Complementary Ther Clin Pract*. 2019;35:323–328.
- [54] Rittenhouse BA, Rizzo JA, Shields BA, et al. Predicting wound healing rates and survival with the use of automated serial evaluations of burn wounds. *Burns*. 2019;45:48–53.
- [55] Chetter IC, Oswald AV, McGinnis E, et al. Patients with surgical wounds healing by secondary intention: a prospective, cohort study. *Int J Nurs Stud*. 2019;89:62–71.
- [56] Zeleníková R, Vyhřídálová D. Applying honey dressings to non-healing wounds in elderly persons receiving home care. *J Tissue Viability*; 2019 [cited Apr 13]. DOI:10.1016/j.jtv.2019.04.002
- [57] Manzoor S, Khan FA, Muhammad S, et al. Comparative study of conventional and topical heparin treatment in second degree burn patients for burn analgesia and wound healing. *Burns*. 2019;45:379–386.
- [58] Vogt A, Wischke C, Neffe AT, et al. Nanocarriers for drug delivery into and through the skin – do existing technologies match clinical challenges? *J Control Rel*. 2016;242:3–15.
- [59] Castangia I, Nácher A, Caddeo C, et al. Fabrication of quercetin and curcumin bionanovesicles for the prevention and rapid regeneration of full-thickness skin defects on mice. *Acta Biomater*. 2014;10:1292–1300.
- [60] Mena F, Mena A, Mena B. Chapter 65, polyphenols nano-formulations for topical delivery and skin tissue engineering. *Polyphenols in human health and disease*. Cambridge (MA): Elsevier Academic Press; 2014. p. 839–848.
- [61] Barbosa DB, Agostinho-Hunt AM, Berretta A, et al. The importance of preventing and controlling biofilm in wounds: biofilm models and nanotechnology in antibiofilm approaches. *Wound Heal Biomater*. 2016;2:79–105.
- [62] Ashfaq M, Verma N, Khan S. Copper/zinc bimetal nanoparticles-dispersed carbon nanofibers: a novel potential antibiotic material. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;59:938–947.
- [63] Pérez-Díaz M, Alvarado-Gomez E, Magaña-Aquino M, et al. Anti-biofilm activity of chitosan gels formulated with silver nanoparticles and their cytotoxic effect of human fibroblasts. *Mat Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;60:317–323.
- [64] Lee J, Kim J, Go J, et al. Transdermal treatment of the surgical and burned wound skin via phytochemical-capped gold nanoparticles. *Colloids Surf B*. 2015;135:166–174.
- [65] Mugade M, Patole M, Pokharkar V. Bioengineered mannan sulphate capped silver nanoparticles for accelerated and targeted wound healing: physicochemical and biological investigations. *Biomed Pharmacother*. 2017;91:95–110.
- [66] Meng Z, Zhou D, Gao Y, et al. miRNA delivery for skin wound healing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;129:308–318.
- [67] Liu J, Willför S, Xu C. A review of bioactive plant polysaccharides: biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioact Carbohydr Diet Fibre*. 2015;5:31–61.
- [68] Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur Polym J*. 2013;49:780–792.
- [69] Bonferoni MC, Sandri G, Dellera E, et al. Ionic polymeric micelles based on chitosan and fatty acids and intended for wound healing. Comparison of linoleic and oleic acid. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014;87:101–106.
- [70] Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;52:105–115.
- [71] Muzzarelli A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydr Polym*. 2009;76:167–182.
- [72] Basha M, AbouSamra MM, Awad GA, et al. A potential antibacterial wound dressing of cefadroxil chitosan nanoparticles *in situ* gel: fabrication, *in vitro* optimization and *in vivo* evaluation. *Int J Pharm*. 2018;544:129–140.
- [73] Ehterami A, Salehi M, Farzamfar S, et al. *In vitro* and *in vivo* study of PCL/collagen wound dressing loaded with insulin-chitosan nanoparticles on cutaneous wound healing in rats model. *Int J Biol Macromol*. 2018;117:601–609.
- [74] Kuo J-W, Prestwich GD. 2.214. Hyaluronic acid. *Materials science and materials engineering, comprehensive biomaterials II*. Oxford: Elsevier; 2011. p. 239–259.
- [75] Garrastazu-Pereira G, Britto-Detoni C, Giulia-Balducci A, et al. Hyaluronate nanoparticles included in polymer films for the prolonged release of vitamin E for the management of skin wounds. *Eur J Pharm Sci*. 2016;83:203–211.
- [76] Manconi M, Manca ML, Caddeo C, et al. Preparation of gellan-cholesterol nanohydrogels embedding baicalin and evaluation of their wound healing activity. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018;127:244–249.
- [77] Cardoso CR, Favoreto S Jr., Oliveira LL, et al. Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: a new approach for skin repair. *Immunobiology*. 2011;216:409–415.
- [78] Dellera E, Bonferoni MC, Sandri G, et al. Development of chitosan oleate ionic micelles loaded with silver sulfadiazine to be associated with platelet lysate for application in wound healing. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014;88:643–650.
- [79] Gu Z, Xie H, Huang C, et al. Preparation of chitosan/silk fibroin blending membrane fixed with alginate dialdehyde for wound dressing. *Int J Biol Macromol*. 2013;58:121–126.
- [80] Krausz AE, Adler BL, Cabral V, et al. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. *Nanomedicine*. 2015;11:195–206.
- [81] Thomas JG, Slone W, Linton S, et al. *In vitro* antimicrobial efficacy of a silver alginate dressing on burn wound isolates. *J Wound Care*. 2011;124:126–128.
- [82] Montaser AS, Abdel-Mohsen AM, Ramadan MA, et al. Preparation and characterization of alginate/silver/nicotinamide nanocomposites for treating diabetic wounds. *Int J Biol Macromol*. 2016;92:739–747.
- [83] Kong Y, Xu R, Darabi MA, et al. Fast and safe fabrication of a free-standing chitosan/alginate nanomembrane to promote stem cell delivery and wound healing. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:2543–2555.

- [84] Khadjavi A, Magnetto C, Panariti A, et al. Chitosan-shelled oxygen-loaded nanodroplets abrogate hypoxia dysregulation of human keratinocyte gelatinases and inhibitors: new insights for chronic wound healing. *Toxicol Appl Pharm.* 2015;286:198–206.
- [85] Mohandas A, Anisha BS, Chennazhi KP, et al. Chitosan-hyaluronic acid/VEGF loaded fibrin nanoparticles composite sponges for enhancing angiogenesis in wounds. *Colloids Surf B Biointer.* 2015;127:105–113.
- [86] Zhao Y, Qiu Y, Wang H, et al. Preparation of nanofibers with renewable polymers and their application in wound dressing. *Int J Polym Sci.* 2016;1:4672839.
- [87] Nafee N, Youssef A, El-Gowell H, et al. Antibiotic-free nanotherapeutics: hypericin nanoparticles thereof for improved *in vitro* and *in vivo* antimicrobial photodynamic therapy and wound healing. *Int J Pharm.* 2013;454:249–258.
- [88] Quinn JF, Whittaker MR, Davis TP. Delivering nitric oxide with nanoparticles. *J Control Rel.* 2015;205:190–205.
- [89] Seabra AB, Justo GZ, Haddad PS. State of the art, challenges and perspectives in the design of nitric oxide-releasing polymeric nanomaterials for biomedical applications. *Biotechnol Adv.* 2015;33:1370–1379.
- [90] Liu X, Hao W, Lok CN, et al. Dendrimer encapsulation enhances anti-inflammatory efficacy of silver nanoparticles. *J Pediatr Surg.* 2014;49:1846–1851.
- [91] Chereddy KK, Coco R, Memvanga PB, et al. Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity. *J Control Rel.* 2013;171:208–215.
- [92] Nurhasni H, Cao J, Choi M, et al. Nitric oxide-releasing poly(lactic-co-glycolic acid)-polyethylenimine nanoparticles for prolonged nitric oxide release, antibacterial efficacy, and *in vivo* wound healing activity. *Int J Nanomed.* 2015;10:3065–3080.
- [93] Hong W, Gao X, Qiu P, et al. Synthesis, construction, and evaluation of self-assembled nano-bacitracin A as an efficient antibacterial agent *in vitro* and *in vivo*. *IJN.* 2017;12:4691–4708.
- [94] Levengood SL, Erickson AE, Chang F-C, et al. Chitosan-poly(caprolactone) nanofibers for skin repair. *J Mater Chem B.* 2017;5:1822–1833.
- [95] Kim BJ, Cheong H, Choi ES, et al. Accelerated skin wound healing using electrospun nanofibrous mats blended with mussel adhesive protein and polycaprolactone. *J Biomed Mater Res.* 2017;105:218–225.
- [96] Liu M, Duan X-P, Li Y-M, et al. Electrospun nanofibers for wound healing. *Mater Sci Eng C.* 2017;76:1413–1423.
- [97] Pavličáková V, Fohlerová Z, Pavličák D, et al. Effect of halloysite nanotube structure on physical, chemical, structural and biological properties of elastic polycaprolactone/gelatin nanofibers for wound healing applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018;91:94–102.
- [98] Das U, Behera SSh, Singh S, et al. Progress in the development and applicability of potential medicinal plant extract-conjugated polymeric constructs for wound healing and tissue regeneration. *Phytother Res.* 2016;30:1895–1904.
- [99] Moulouli K, Caddeo C, Manca ML, et al. Identification and nanoentrapment of polyphenolic phytocomplex from *Fraxinus angustifolia*: *in vitro* and *in vivo* wound healing potential. *Eur J Med Chem.* 2015;89:179–188.
- [100] Castangia I, Manca ML, Caddeo C, et al. Santosomes as natural and efficient carriers for the improvement of phycocyanin reepithelising ability *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;103:149–158.
- [101] El-Refaie WM, Elnaggar YSR, El-Massik MA, et al. Novel curcumin-loaded gel-core hyalurosomes with promising burn-wound healing potential: development, *in-vitro* appraisal and *in-vivo* studies. *Int J Pharm.* 2015;486:88–98.
- [102] Manca ML, Castangia I, Zaru M, et al. Development of curcumin loaded sodium hyaluronate immobilized vesicles (hyalurosomes) and their potential on skin inflammation and wound restoring. *Biomaterials.* 2015;71:100–109.
- [103] Mehanny M, Hathout RM, Geneidi AS, et al. Exploring the use of nanocarrier systems to deliver the magical molecule; curcumin and its derivatives. *J Control Rel.* 2016;225:1–30.
- [104] Arana L, Salado C, Vega S, et al. Solid lipid nanoparticles for delivery of *Calendula officinalis* extract. *Colloids Surf B.* 2015;135:18–26.
- [105] Iqbal MA, Md S, Sahni JK, et al. Nanostructured lipid carriers system: recent advances in drug delivery. *J Drug Target.* 2012;20:813–830.
- [106] Jozic I, Daunert S, Tomic-Canic M, et al. Nanoparticles for fidgety cell movement and enhanced wound healing. *J Invest Dermatol.* 2015;135:2151–2153.
- [107] Daftarian PM, Stone GW, Kovalski L, et al. A targeted and adjuvanted nanocarrier lowers the effective dose of liposomal amphotericin B and enhances adaptive immunity in murine cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2013;208:1914–1922.
- [108] Wolf NB, Kuchler S, Radowski MR, et al. Influences of opioids and nanoparticles on *in vitro* wound healing models. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;73:34–42.
- [109] Sanad R-B, Abdel-Barb HM. Chitosan-hyaluronic acid composite sponge scaffold enriched with andrographolide-loaded lipid nanoparticles for enhanced wound healing. *Carbohydr Polym.* 2017;173:441–450.
- [110] Karimi M, Mirshekari H, Moosavi Basri SM, et al. Bacteriophages and phage-inspired nanocarriers for targeted delivery of therapeutic cargos. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;106(Pt A):45–62.
- [111] Abdul-Hassan HS, El-Tahan E, Massoud B, et al. Bacteriophage therapy of *Pseudomonas* burn wound sepsis. *Ann Medit Burn Club.* 1990;3:262–264.
- [112] Markoishvili K, Tsitlanadze G, Katsarava R, et al. A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. *Int J Dermatol.* 2002;41:453–458.
- [113] Jikia D, Chkhaidze N, Imedashvili E, et al. The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*-infected local radiation injuries caused by exposure to Sr90. *Clin Exp Dermatol.* 2005;30:23–26.
- [114] Cacicedo ML, Castro MC, Servetas I, et al. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. *Bioresour Technol.* 2016;213:172–180.
- [115] Cai Z, Kim J. Bacterial cellulose/poly(ethylene glycol) composite: characterization and first evaluation of biocompatibility. *Cellulose.* 2010;17:83–91.
- [116] Ji H, Sun H, Qu X. Antibacterial applications of graphene-based nanomaterials: recent achievements and challenges. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;105:176–189.

- [117] Zhang K, Bai X, Yuan Z, et al. Layered nanofiber sponge with an improved capacity for promoting blood coagulation and wound healing. *Biomaterials*. 2019;204:70–79.
- [118] Khan MS, Abdelhamid HN, Wu H-F. Near infrared (NIR) laser mediated surface activation of graphene oxide nanoflakes for efficient antibacterial, antifungal and wound healing treatment. *Colloids Surf B*. 2015;127:281–291.
- [119] Quignard S, Coradin T, Powell JJ, et al. Silica nanoparticles as sources of silicic acid favoring wound healing in vitro. *Colloids Surf B*. 2017;155:530–537.
- [120] Teo SY, Yew MY, Lee SY, et al. In vitro evaluation of novel phenytoin-loaded alkyd nanoemulsions designed for application in topical wound healing. *J Pharm Sci*. 2017;106:377–384.
- [121] Hamdan S, Pastar I, Drakulich S, et al. Nanotechnology-driven therapeutic interventions in wound healing: potential uses and applications. *ACS Cent Sci*. 2017;3:163–175.
- [122] Chakrabarti S, Chattopadhyay P, Islam J, et al. Aspects of nanomaterials in wound healing. *Curr Drug Deliv*. 2019;16:26–41.
- [123] Alberti T, Coelho DS, Voytena A, et al. Nanotechnology: a promising tool towards wound healing. *Curr Pharm Des*. 2017;23:3515–3528.
- [124] Kim HS, Sun X, Lee J-H, et al. Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018 [cited Dec 31]. DOI:10.1016/j.addr.2018.12.014