



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la encapsulación de insulina en gliconanopartículas de levana producidas mediante síntesis enzimática

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Salvador Guillen Tinoco

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Clarita Olvera Carranza
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales
[Instituto Nacional de Salud Pública, INSP](#)

Dra. Leonor Pérez Martínez
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Noviembre, 2022



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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Programas Institucionales 3 (LINPI-3), perteneciente al Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología, UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Clarita Olvera Carranza.

La realización de este proyecto estuvo financiada por la UNAM en el marco del proyecto PAPIIT 216120 y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante la aportación de la beca de maestría No. 1082186 (CVU).

Dedicatoria

A mis padres, Rosalva Tinoco Sánchez y Santiago Guillen Vargas, por ser mis ejemplos de vida y enseñarme valores como la perseverancia, la honradez y el amor incondicional, los cuales me acompañan en el día a día.

A mis abuelo, Guadalupe Vargas Jardines (Mamá Lupe) y Salvador Guillen Vargas (Papá Chava), por mostrarme el valor del amor familiar y otorgarme todo su amor incondicional.

Agradecimientos

A la Dra. Clarita Olvera Carranza por todas las lecciones académicas compartidas. Por el rigor en la enseñanza, y exigencia en el análisis y presentación de resultados. Por la calidez humana que muestra en el laboratorio y en el trato personal, lo cual permite una convivencia amena y de confianza entre los integrantes del grupo.

A la Dra. Marcela Ayala Aceves por sus grandes aportaciones en el mejoramiento de este proyecto, mediante la crítica constructiva constante y propuestas innovadoras.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Leonor Pérez Martínez y Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales por todas sus observaciones para el mejoramiento de este proyecto. Por su apoyo, comprensión y paciencia.

A los integrantes del jurado: Dr. Enrique Galindo Fentanes, Dra. Romina Rodríguez Sanoja, Dr. Raymundo David Valdez Echeverría, Dra. Norma Adriana Valdez Cruz y Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich por sus importantes observaciones que permitieron mejorar la calidad y entendimiento de este escrito.

Al Dr. Enrique Raga Carbajal el asesoramiento para la validación del método de cuantificación de polímero, la enseñanza del uso del HPLC, y por las observaciones perspicaces y objetivas que permitieron mejorar el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo.

Al Dr. Raymundo David Valdez Echeverría, M.C. Gerardo Flores Pacheco, Q.F.B. Jorge Michel Hernández Rodríguez, a la M. C. Ingrid Mercado del Río y Biol. Maura Jennifer Martínez Morales por la paciencia y dedicación en la enseñanza de las técnicas necesarias para la realización de este proyecto.

A la Biol. Rosa Román Miranda por el apoyo técnico otorgado en la realización de este proyecto. Por su gran calidez humana y alegría.

A la M.C Zoila Vanessa Hernández Rodríguez, M.C. Martha Alicia Contreras Ordoñez y al M.C. Luiz Guillermo De la Fuente Aguilera por el apoyo técnico otorgado para la realización de este proyecto.

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich y la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera por el préstamo de los equipos para el análisis de nanopartículas.

Índice

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE ANEXOS	VIII
ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	X
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	2
II Gliconanopartículas (GNPs)	2
III Gliconanopartículas de fructanas (GNPs-Fs).....	3
III.i Características físicas de las GNPs-L	4
III.ii Síntesis de gliconanopartículas de levana (GNPs-L).....	7
III.iii Propiedades biológicas de las GNPs-L	7
III.iv GNPs-Fs como nanoacarreadores	9
III.v Desarrollo de un tratamiento para el cierre de heridas crónicas	11
JUSTIFICACIÓN	14
OBJETIVOS	14
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	15
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	16
1. Producción de la levansacarasa SacB H243L	16
1.1. Preparación de células electrocompetentes	16
1.2. Transformación genética	16
1.3. Expresión heteróloga de SacB H243L.....	17
1.4. Purificación de la levansacarasa SacB H243L	17
1.5. Solubilización de insulina	17
2. Análisis de proteína.....	18
2.1. Cuantificación de proteína.....	18
2.2. Electroforesis desnaturizante (SDS-Page).....	18
2.3. Ensayo de actividad enzimática	18
3. Producción de las gliconanopartículas y gliconanoconjugado	19
3.1. Síntesis de gliconanopartículas de levana (GNPs-L).....	19
3.2. Síntesis de gliconanopartículas de levana-insulina (GNPs-LIns).....	19

3.3. Estimación del consumo de sacarosa	19
4. Caracterización de las GNPs-L y GNPs-LIns.....	20
4.1. Determinación del diámetro hidrodinámico promedio e índice de polidispersión (IPD)	20
4.2. Determinación del potencial ζ	20
5. Cuantificación de levana por hidrólisis ácida acoplada con DNS (HA/DNS)	20
5.1. Tiempo necesario para hidrolizar levana	20
5.2. Curva de calibración para la cuantificación de polímero por HA/DNS.....	21
5.3. Validación del método de cuantificación de polímero por HA/DNS.....	21
6. purificación de GNPs-L y GNPs-LIns mediante precipitación con solventes	23
6.1. Purificación de GNPs-L y GNPs-LIns	24
7. método de determinación de la Eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (CC).....	24
7.1. Cuantificación de proteína encapsulada (PE).....	24
7.2. Determinación de la eficiencia de encapsulación (EE)	25
7.3. Determinación de la capacidad de carga (CC)	25
8. análisis estadístico	25
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
9. Producción de gliconanopartículas y gliconanoconjugado.....	26
9.1. Efecto de la presencia de insulina en la reacción enzimática de la levansacarasa SacB H243L.....	26
9.2. Características fisicoquímicas de las GNPs-L y GNPs-LIns	30
10. Purificación de GNPs-L y GNPs-LIns mediante precipitación con solventes	31
11. Determinación de la Eficiencia de encapsulación (EE) de las GNPs-LIns	35
12. Determinación de la Capacidad de carga (CC) de las GNPs-LIns	37
13. Análisis de la CC y aplicación biológica de las GNPs-LIns	39
CONCLUSIONES.....	41
PERSPECTIVAS	42
PROSPECTIVAS.....	43
ANEXOS	45
REFERENCIAS	50

Índice de figuras

- Figura 1. Ejemplos de diferentes tipos de bionanopartículas. 3
- Figura 2. Estructura química de dos diferentes fructanas: a) inulina con enlace β (2 \rightarrow 1) y ramificaciones β (2 \rightarrow 6); b) levana con enlaces β (2 \rightarrow 6) y ramificaciones β (2 \rightarrow 1). c) Principales reacciones enzimáticas catalizadas por las fructansacarosas (FS; EC 2.4.1.-) en presencia de sacarosa como sustrato (Modificado de Raga-Carbajal, et al., 2016). 4
- Figura 3. a) Puentes de hidrógeno presentes en la cadena principal de levana: O6_(i) - H3O_(i+1) (centro); O1_(i) - H3O_(i) (derecha); O5_(i) - H1O_(i) (izquierda) (Tomado de Chunsrivrot, et al., 2018). b) Ejemplo de los tres ángulos formados entre cuatro residuos fructosilo de FOS-L: ω (O6-C6-C5-C4), ψ (C2'-O6-C6-C5) y ϕ (O5'-C2'-O6-C6) (Tomado de Kanjanatanin, et al., 2016). c) Puentes de hidrógeno presentes entre los residuos de las ramificaciones de la levana (Tomado de Chunsrivrot, et al., 2018). Como ejemplo se muestra la estructura de dos torciones con dos estructuras similares a hélice. Los átomos de carbono, oxígeno e hidrógeno se representan en cian, rojo y blanco, respectivamente. Los puentes de hidrógeno se representan con líneas discontinuas. La cadena de levana y las unidades fructosilo se representan como listones y pentágonos amarillos, respectivamente. 6
- Figura 4. Efecto las gliconanopartículas de levana (GNPs-L) como a) antiinflamatorios en la disminución de la expresión del factor de transcripción NF- κ B en macrófagos RAW-Blue en presencia de un agente proinflamatorio como un lipopolisacárido (LPS). b) En la promoción de la proliferación celular de queratinocitos HaCat ante un ambiente hiperglucémico inducido (glucosa 50 mmol l⁻¹). (c y d) En el cierre de heridas inducidas en un modelo de rasguño en monocapa de queratinocitos HaCat, sometidas a diferentes concentraciones de GNPs-L durante 48 h (Tomado de Valdez-Echeverría, 2021). (Las barras de error representan la desviación estándar, n = 3). 9
- Figura 5. Micrografías de las gliconanopartículas de fructanas conjugadas con biomoléculas. a y b) Microscopía electrónica de transmisión de conglomerados del conjugado de gliconanopartículas (GNPs) de inulina-DNAp (Tomado de Medrano-Villagomez, 2018). c y d) Microscopía electrónica de transmisión de conglomerados del conjugado de GNPs de levana-BSA (c) (Sezer, et al., 2011) y levana-insulina (d) (Tomado de Valdez-Echeverría, 2021). 10
- Figura 6. Efecto de las gliconanopartículas de inulina (GNPs-I) en la reducción de la proteólisis enzimática de lactoferrina, utilizando pepsina, dentro de una emulsión Pickering. a) Micrografías de micropartículas de gel de lactoferrina con presencia de GNPs-I en forma de una capa electrodensa en la periferia de las partículas. b) Análisis de imagen del efecto protector de las GNPs-I contra la digestión enzimática de lactoferrina a través del tiempo (Tomado de Sarkar, et al., 2018). (Las barras de error representan la desviación estándar, n = 3). 11
- Figura 6. Regresión lineal para la cuantificación de: a) levana mediante los método de hidrólisis ácida acoplado con DNS (HA/DNS) y cromatografía de exclusión tamaño de alta resolución (SEC-HPLC); b) glucosa, fructosa y sacarosa mediante HPLC. 22

- Figura 8. Consumo de sustrato (sacarosa) monitoreado mediante la cuantificación de azúcares reductores liberados (DNS) y cuantificación de levana producida cuantificada mediante hidrólisis ácida/DNS, durante la síntesis gliconanopartículas de levana (GNPs-L) y levana-insulina $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ (GNPs-LIns) a diferentes tiempos de reacción durante 28 h. La síntesis se hizo con $5.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de enzima, 100 g l^{-1} de sacarosa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y 350 rpm . (Las barras de error representan la desviación estándar con una $n = 3$)..... 27
- Figura 9. Diámetro hidrodinámico de las GNPs-L y GNPs-LIns y del índice de polidispersión (IPD) durante los diferentes tiempos de reacción. La síntesis se hizo con $5.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de enzima, 100 g l^{-1} de sacarosa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y 350 rpm . (Las barras de error representan la desviación estándar con una $n = 3$)..... 29
- Figura 10. Porcentaje de levana recuperada (20 g l^{-1}), al utilizar diferentes volúmenes de etanol absoluto o isopropanol (0, 1, 1.5, 2 y 3). La precipitación se llevó a cabo durante 1 h a $4 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ y por centrifugación a $15,000 \text{ g}$ durante 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. (Las barras de error representan la desviación estándar con una $n = 3$)..... 32
- Figura 11. Concentración de sacarosa y glucosa/fructosa, a partir de una solución 100 g l^{-1} , solubles al utilizar diferentes volúmenes de etanol (0, 1, 1.5, 2 y 3). La precipitación se llevó a cabo durante 1 h a $4 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ y por centrifugación a $15,000 \text{ g}$ durante 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. (Las barras de error representan la desviación estándar con una $n = 3$). 33
- Figura 12. a) Concentración de insulina soluble al utilizar diferentes volúmenes de etanol (0, 1, 1.5, 2,5 y 3). La precipitación se llevó a cabo durante 1 h a $4 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ y por centrifugación a $15,000 \text{ g}$ durante 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Concentración de insulina soluble en presencia y ausencia de levana 20 g l^{-1} a diferentes concentraciones de insulina (30, 60, 80 y 90). La precipitación se llevó a cabo durante 1 h a $4 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ y por centrifugación a $15,000 \text{ g}$ durante 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. (Las barras de error representan la desviación estándar con una $n = 3$)..... 33
- Figura 13. Modelo de la encapsulación de insulina durante la síntesis de las GNPs-LIns. 1) Atrapamiento físico, 2) adsorción. 34
- Figura 14. Producción y purificación de las gliconanopartículas de levana (GNPs-L) y del glicoconjugado de levana-insulina (GNPs-LIns). 35
- Figura 15. Eficiencia de encapsulación (EE) de las GNPs-LIns después de 24 h de incubación al utilizar distintas concentraciones de insulina (30, 60, 80 y $90 \mu\text{g ml}^{-1}$) durante la síntesis. La purificación del gliconanoconjugado se llevó a cabo durante 1 h a $4 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ y por centrifugación a $15,000 \text{ g}$ durante 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. (Las barras de error representan la desviación estándar con una $n = 3$). 36
- Figura 16. Diámetro hidrodinámico y capacidad de carga (CC) de proteína encapsulada sin purificación y con purificación de las GNPs-LIns con 1.5 volúmenes de etanol, producidas después de 24 h de incubación al utilizar distintas concentraciones de insulina ($30, 60$ y $90 \mu\text{g ml}^{-1}$) durante la síntesis. La precipitación se llevó a cabo durante 1 h a $4 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ y por centrifugación a $15,000 \text{ g}$ durante 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. (Las barras de error representan la desviación estándar con una $n = 3$)..... 38

Índice de tablas

Tabla 1. Coeficientes de linealidad (R^2), de variación (CV %) y ecuación de la recta obtenidos para las curvas de calibración de los diferentes métodos de cuantificación de polímero con hidrólisis ácida (HA/DNS) y cromatografía de exclusión de tamaño de alta resolución (SEC-HPLC), y cuantificación de monosacáridos (fructosa/glucosa) y disacáridos (sacarosa). (Desviación estándar $n = 3$).	22
Tabla 2. Concentración promedio recuperada, promedio de recuperación y coeficiente de variación (CV %) calculados para las soluciones problema de levana/fructosa/glucosa/sacarosa (5/5/10/80, 15/15/30/40 y 25/25/50/0 g l ⁻¹), mediante los diferentes métodos de cuantificación de polímero con hidrólisis ácida (HA/DNS) y cromatografía de exclusión de tamaño de alta resolución (SEC-HPLC), y cuantificación de monosacáridos (fructosa/glucosa) y disacáridos (sacarosa) (HPLC). (Desviación estándar $n = 3$).	23
Tabla 3. Efecto de la presencia de HCl 10 mM y HCl 10 mM + insulina 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en la reacción de síntesis de gliconopartículas de levana-insulina (GNPs-LIns), determinado mediante la liberación de azúcares reductores y cuantificación de polímero por hidrólisis ácida (DNS). La síntesis se hizo con 5.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de enzima, 100 g l ⁻¹ de sacarosa a 37 °C y 350 rpm.	28
Tabla 4. Características de las de GNPs-L y GNPs-LIns obtenidas después de 24 h de reacción. La síntesis se hizo con 5.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de enzima, 100 g l ⁻¹ de sacarosa a 37 °C y 350 rpm. (Desviación estándar obtenida de una $n = 3$).	31
Tabla 5. Concentración y cantidad de levana producidos después de 24 h de la síntesis de las gliconopartículas de levana (GNPs-L) y levana insulina (GNPs-LIns) utilizando diferentes concentraciones de insulina 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en la reacción durante la síntesis enzimática. La cuantificación de polímero se hizo mediante el método de hidrólisis ácida acoplado con DNS (HA/DNS). Las condiciones de reacción fueron: volumen de 0.6 ml, 5.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de enzima, 100 g l ⁻¹ de sacarosa a 37 °C y 350 rpm. (desviación estándar $n = 3$).	37

Índice de anexos

Anexo 1. Resumen de diferentes trabajos en los que se reporta el uso de insulina como tratamiento en la cicatrización de heridas agudas y crónicas en modelos animales sanos y con diabetes inducida (modificado de Wang & Xu, 2020).	45
Anexo 2. Resumen de diferentes trabajos en los que se reporta el uso de nanoglicoconjugados con insulina como tratamiento en la cicatrización de heridas agudas y crónicas en modelos animales sanos y con diabetes inducida (modificado de Wang & Xu, 2020).	46
Anexo 3. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% con la construcción pET22b+: SacB H243L. En cada carril se usaron 150 ng de plásmido.	47
Anexo 4. Cromatograma de la purificación de SacB H243L mediante cromatografía de intercambio catiónico. A) La enzima eluyó a una concentración de amortiguador de acetatos 1 M pH 6. B) SDS-Page de poliacrilamida 10%: 1) marcador de peso molecular, 2) botón, 3) extracto, 4) flow through, 5) fracción 3, 6) enzima concentrada, 7) ultrafiltrado y 8) recirculado. Cada pozo contiene 10 μ l de muestra. Se observó la presencia de una banda sobre expresada de aproximadamente 55 kDa en los diferentes pasos de purificación.	47
Anexo 5. Tabla de purificación de la mutante SacB H243L. La actividad de la enzima se tomó bajo las siguientes condiciones de reacción: amortiguador de acetatos 50 mM + CaCl_2 1 mM, 100 g l^{-1} de sacarosa, 37 °C, 350 rpm, durante 10 min.	48
Anexo 6. Comparación de la distribución del diámetro hidrodinámico de las GNPs-L y GNPs-LIns: a) GNPs-L y GNPs-LIns producidas utilizando 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de insulina; b) GNPs-LIns producidas utilizando 30, 60 y 90 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de insulina. La síntesis se hizo durante 24 h utilizando 5.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de enzima, 100 g l^{-1} de sacarosa a 37 °C y 350 rpm. (Las barras de error representan la desviación estándar con una n = 3).	48
Anexo 7. Método de purificación con etanol de las GNPs-L y GNPs-LIns (PE/GNPs-LIns)	48

Abreviaturas

Ácido 3,5-dinitrosalicílico	DNS
Capacidad de carga (μg de proteína / mg de GNPs-LIns)	CC
Cromatografía de exclusión tamaño de alta resolución	SEC-HPLC
Cromatografía líquida de alta eficiencia	HPLC
Dispersión de luz dinámica	DLS
Dispersión de luz electroforética	ELS
Eficiencia de encapsulación (%)	EE
Fructansacarosas	FS
Fructooligosacáridos	FOS
Fructooligosacáridos de levana	FOS-L
Gliconanopartículas	GNPs
Gliconanopartículas de fructanas	GNPs-Fs
Gliconanopartículas de inulina	GNPs-I
Gliconanopartículas de levana	GNPs-L
Gliconanopartículas de levana-Insulina	GNPs-LIns
Hidrólisis ácida acoplado a la determinación de azúcares reductores con ácido 3,5-dinitrosalicílico	HA/DNS
Índice de polidispersión	IPD
Levana de alto peso molecular	LAPM
Levana de bajo peso molecular	LBPM
Levansacarosas	LS
Lipopolisacárido	LPS
Polímero de alto peso molecular	PAPM
Polímero de bajo peso molecular	PBPM
Purificación de las GNPs-LIns con etanol	PE/GNPs-LIns

Resumen

Las gliconanopartículas de levana (GNPs-L) presentan propiedades promotoras de la proliferación celular, inmunomoduladoras y antiinflamatorias. Además, las GNPs-L tienen la capacidad de encapsular compuestos con actividad biológica, lo cual permitió proponer a las GNPs-L como nanoacarreadores de biomoléculas para su aplicación como un tratamiento tópico que mejore el cierre de heridas crónicas. Una de las moléculas interesantes para ser encapsulada es la insulina debido a su capacidad para mejorar la reepitelización de tejidos en heridas, ya que regula la respuesta inflamatoria e incrementa la migración y proliferación celular. Con base en lo anterior, nuestro grupo de investigación ha propuesto la encapsulación de esta hormona durante la síntesis enzimática de levana, formando un glicoconjugado de GNPs levana-insulina (GNPs-LIns) en un solo paso de producción. Sin embargo, aún no existe un estudio que detalle el proceso de síntesis y la caracterización de este glicoconjugado. Por esta razón, este proyecto se enfocó en realizar el estudio del proceso de síntesis enzimática de las GNPs-L y GNPs-LIns, en el desarrollo de un método de purificación de las GNPs-L y GNPs-LIns, para obtener los parámetros de encapsulación del sistema de GNPs-LIns, eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (CC). En la reacción de síntesis del glicoconjugado, la adición de insulina provocó la reducción de aproximadamente el 5% de la producción de GNP-Ls, alcanzando a las 24 h la máxima producción de levana (GNPs-LIns $18.3 \pm 0.30 \text{ g l}^{-1}$), utilizando $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ de insulina. Durante la reacción de síntesis las GNPs-L y GNPs-LIns redujeron progresivamente su diámetro, disminuyendo en un 24 % su tamaño después de 24 h, a este tiempo el tamaño promedio de las GNPs-LIns fue de 114.6 nm. El índice de polidispersión (IPD) de las nanopartículas fue de 0.08, demostrando que el nanoconjugado es monodisperso. Además, el nanoconjugado presentó un potencial ζ de -5 mV, lo que sugiere la posibilidad de agregación, sin embargo, nuestros análisis no demostraron este fenómeno. El método de purificación de las GNP-Ls y GNPs-LIns por precipitación con etanol, nos permitió recuperar más del 97 % de las nanopartículas producidas, sin presencia de subproductos de la reacción. Se determinó que la máxima cantidad de insulina encapsulada fue de $33.93 \pm 1.85 \mu\text{g}$ al utilizar $80 \mu\text{g ml}^{-1}$ de insulina en la síntesis del complejo. La EE máxima de insulina fue de aproximadamente el 63 % al utilizar de 60 a $90 \mu\text{g ml}^{-1}$ de insulina para la síntesis del conjugado, alcanzando una CC máxima de $3.24 \pm 0.23 \mu\text{g}$ de proteína / mg de GNPs-LIns. Finalmente, calculamos que las GNPs-LIns contienen la relación suficiente de insulina (0.5 U) y de levana (5 mg) para mostrar un efecto en la promoción de la proliferación y migración celular, la regulación de la respuesta inflamatoria y por tanto el cierre de una herida en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Abstract

Levan glyconanoparticles (GNPs-L) promote cell proliferation and they have immunomodulatory and anti-inflammatory properties. Also, it has been proved that active biological compounds can be encapsulated in this GNPs-L, for these reasons, they have been proposed as nanocarriers in topical treatments to improve wound healing. Insulin is an interesting molecule because it improves wound re-epithelialization, regulates the inflammatory response, and increases cell migration and cell proliferation. Accordingly, our research group proposed the insulin encapsulation in GNPs-L via enzymatic synthesis, generating a levan-insulin GNPs glycoconjugate (GNPs-LIns). Nevertheless, there still does not exist a detailed study about the synthesis and characterization of the glycoconjugate GNPs-LIns. In this work, we studied the enzymatic synthesis process of GNPs-L and GNPs-LIns, developed a purification method of GNPs-L and GNPs-LIns to calculate the encapsulation parameters as encapsulation efficiency (EE) and loading capacity (CC) of insulin in GNPs-LIns. Our results demonstrated that the insulin add, decreased the GNP-Ls production by approximately 5 %, reaching a maximum glycoconjugate yield at 24 h of $18.3 \pm 0.30 \text{ g l}^{-1}$ using $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ of insulin. The average diameter of the GNPs-L and GNPs-LIns was gradually reduced by 24 % after 24 h of the enzymatic reaction, reaching a final average size of 114.6 nm. The polydispersity index (IPD) of glycoconjugate was 0.08, demonstrating that it is monodisperse. The purification method of GNP-Ls and GNPs-LIns by ethanol precipitation allowed us to recover more than 97% of glyco-conjugated, without the presence of reaction by-products. It was determined that the maximum amount of encapsulated insulin was $33.93 \pm 1.85 \mu\text{g}$, using $80 \mu\text{g ml}^{-1}$ of insulin. The maximum EE of insulin was about 63%, using 60 to $90 \mu\text{g ml}^{-1}$ of insulin, reaching a maximum CC of $3.24 \pm 0.23 \mu\text{g}$ of protein/mg of GNPs-LIns. Finally, we estimate that the GNPs-LIns contain enough insulin (0.5 U) and levan (5 mg) to show an effect in promoting cell proliferation and migration, regulation of the inflammatory response and therefore closure of a wound *in vitro* and *in vivo* models.

Introducción

La nanomedicina es un área de la nanotecnología que busca preservar y promover la salud humana, estudiando el uso y efecto de los nanomateriales en el organismo (Rojas-Aguirre, et al., 2016). Dentro de las múltiples aplicaciones de la nanomedicina, se encuentran el uso de los nanoacarreadores como vehículos de protección, entrega y liberación regulada para su uso en la detección, diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades (Dickinson, et al., 2019; Ventola, et al., 2010). Las nanopartículas biopoliméricas son uno de los principales tipos de nanoacarreadores utilizados, las cuales pueden ser generadas a partir de macromoléculas como DNA, proteínas y carbohidratos (GNPs; gliconanopartículas) (Cauerhff & Castro, 2013). Particularmente, las gliconanopartículas destacan por su biocompatibilidad y biodegradabilidad (Khan, et al., 2019; Polito, 2020). Se ha reportado la síntesis de GNPs utilizando diversos polisacáridos como el alginato, el quitosano, el dextrano y las fructanas, como la inulina y la levana (de Siqueira, et al., 2020). Las GNPs de fructanas tienen la capacidad de proteger a compuestos cargo de interés como las proteínas, reduciendo la proteólisis enzimática (Sarkar, et al., 2018). Recientemente, en nuestro grupo de trabajo hemos demostrado que las gliconanopartículas de levana (GNPs-L), conformadas por polímeros de fructosa con enlaces β (2 \rightarrow 6), promueven la proliferación celular, actúan como inmunomoduladores y poseen propiedades antiinflamatorias (Valdez-Echeverría, 2021). Conjuntando las propiedades que poseen las GNPs-L de nanoestructurarse y de promover la regeneración celular, nuestro grupo de investigación ha trabajado para demostrar su potencial uso como nanoacarreadores de biomoléculas que tienen y/o podrían potenciar efectos regenerativos, para aplicaciones como un posible tratamiento en el cierre de heridas. Con base en estos antecedentes, Valdez Echeverría (2021) logró la encapsulación de insulina en GNPs-L (GNPs-LIns), hormona que incrementa la velocidad de cicatrización de las heridas al aplicarse como un tratamiento tópico, ya que regula la respuesta inflamatoria, el incremento de la migración, la proliferación celular y acelera la reepitelización de la epidermis (Wang & Xu, 2020). Sin embargo, aún no existe un estudio detallado que se enfoque en el proceso de síntesis enzimática, así como en la implementación de un método de purificación de las GNP-L y las GNPs-LIns, ni en la determinación de la capacidad de carga de este sistema de encapsulación. Por esta razón, este proyecto se enfocó en realizar el estudio del proceso de síntesis enzimática de las GNPs-L y GNPs-LIns, así como en desarrollar un método de purificación para poder determinar los parámetros de encapsulación, eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (CC), del sistema, con la finalidad de desarrollar un proceso factible para la producción de este conjugado, el cual nos permita generar un tratamiento viable para mejorar el proceso de cicatrización en heridas crónicas.

Capítulo 1

Antecedentes

I Bionanotecnología

La bionanotecnología se enfoca en el diseño, optimización y manufactura de nanosistemas utilizando biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos) para el desarrollo de nuevas aplicaciones, aprovechando la especificidad y actividad biológica de las biomoléculas, sin limitarse a aplicaciones biológicas (Ehud, 2007; Ramsden, 2016). La bionanotecnología ha tomado gran relevancia por su potencial aplicación en áreas como la agricultura (Zhao, et al., 2020), la biorremediación (Dahoumane, et al., 2016), la industria alimentaria (Primožič, et al., 2021) y la nanomedicina (Nagamune, 2017).

La nanomedicina busca preservar y promover la salud humana, estudiando el efecto de los nanomateriales en el organismo (Rojas-Aguirre, et al., 2016). Es así como dentro de las diferentes especialidades médicas, existen múltiples aplicaciones de la nanomedicina en imagenología, cirugía e ingeniería de tejidos, con la finalidad de permitir el diagnóstico, monitoreo, control, prevención y tratamiento de diferentes enfermedades (Soares, et al., 2018; Tinkle, et al., 2014). Algunos de los nanocompuestos más comúnmente usados son las nanoemulsiones, nanocomplejos, nanocristales y las nanopartículas de biomoléculas (bionanopartículas) (Soares, et al., 2018).

Las bionanopartículas son sistemas a escala nanométrica (tamaño menor a 1,000 nm) y que se constituyen total o parcialmente de biomoléculas (Nagamune, 2017). Las bionanopartículas híbridas combinan biomoléculas con materiales inorgánicos, mientras que las bionanopartículas orgánicas se conforman por ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, carbohidratos o de una mezcla de biomoléculas (Cauerhff & Castro, 2013). Ejemplos de bionanopartículas orgánicas son las nanopartículas proteicas (nanopartículas virales y nanopartículas de ferritina), las nanopartículas basadas en lípidos (nanoemulsiones y liposomas), y las bionanopartículas basadas en carbohidratos (gliconanopartículas) (Figura 1) (Papazoglou & Parthasarathy, 2007; Jutz & Böker, 2011).

II GLICONANOPARTÍCULAS (GNPs)

Las gliconanopartículas (GNPs) son un tipo de bionanopartículas formadas parcial (GNPs híbridas) o totalmente (GNPs poliméricas) por carbohidratos. Algunos ejemplos de GNPs híbridas son las GNPs metálicas, los glico-quantum dots, las GNPs lipídicas y las GNPs de núcleo proteico, mientras que las GNPs poliméricas se conforman totalmente por uno o varios tipos de polisacáridos, formando nanoesponjas, nanocápsulas, dendrímeros, nanogeles y GNPs de núcleo polimérico (Figura 1) (Polito, 2020; Khan, et al., 2019). Existen reportes sobre polisacáridos capaces de formar GNPs. Entre ellos se encuentran los polímeros con carga, como son el quitosano (Grenha, et al., 2005) y el ácido hialurónico (Zhang, et al., 2014a). También, se han reportado polímeros neutros como las

ciclodextrinas (Namgung, et al., 2014), el dextrano (Semyonov, et al., 2014), el alternano (Wangpaiboon, et al., 2019), la celulosa (Zhang, et al., 2007) y las fructanas, como la inulina (Zhang, et al., 2014b) y la levana (Kim, et al., 2015), entre otros. A diferencia de otras nanopartículas las GNPs destacan por su biocompatibilidad y biodegradabilidad, lo cual las vuelve altamente idóneas en aplicaciones terapéuticas (Srikanth, et al., 2015).

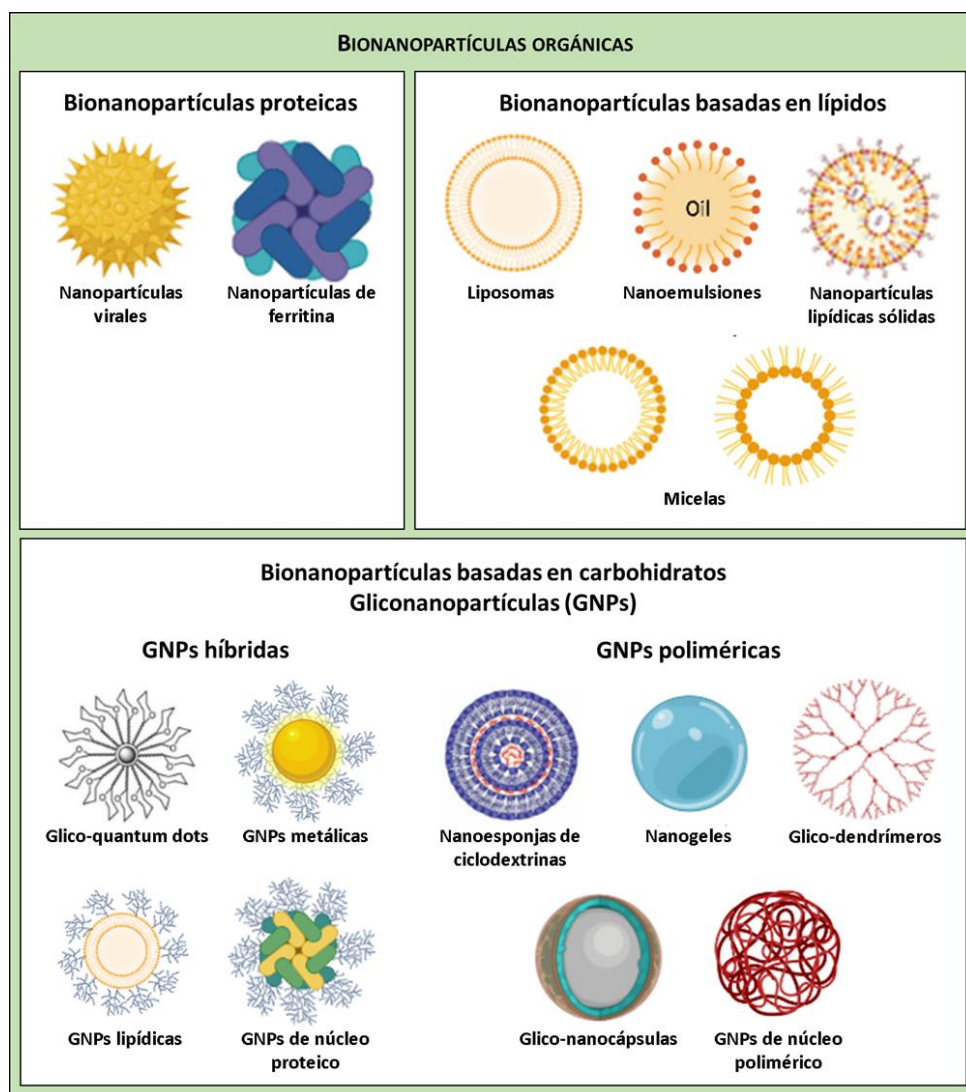


Figura 1. Ejemplos de diferentes tipos de bionanopartículas.

III GLICONANOPARTÍCULAS DE FRUCTANAS (GNPs-Fs)

Las GNPs de fructanas (GNPs-Fs) se conforman por polímeros de fructosa y son clasificadas en GNPs de inulina (GNPs-I) o GNPs de levana (GNPs-L) dependiendo del tipo de enlace principal que une a las unidades fructosilo del polímero que las conforma. La inulina presenta un enlace β (2 \rightarrow 1), con ramificaciones en la posición β (2 \rightarrow 6) (Figura 2a); mientras que la levana poseen un enlace β (2 \rightarrow 6) y ramificaciones de tipo β (2 \rightarrow 1) (Figura 2b). Estructuralmente son muy similares, aunque difieren en el grado de polimerización y peso molecular, catalogándose como fructooligosacáridos (FOS, ≤ 10 residuos fructosilo),

polímero de bajo (PBPM, $\leq 2,000$ kDa) y alto peso molecular (PAPM, $>2,000$ kDa). Las enzimas implicadas en la síntesis de inulina y levana son conocidas como fructansacarasas (FS; EC 2.4.1.-), debido a que utilizan a la sacarosa como sustrato para la síntesis de polímero, y reciben su nombre con base en el tipo de polímero que sintetizan, clasificándose como inulosacarasas (EC 2.4.1.9) y levansacarasas (LS; EC 2.4.1.10) (Raga-Carbajal, 2019).

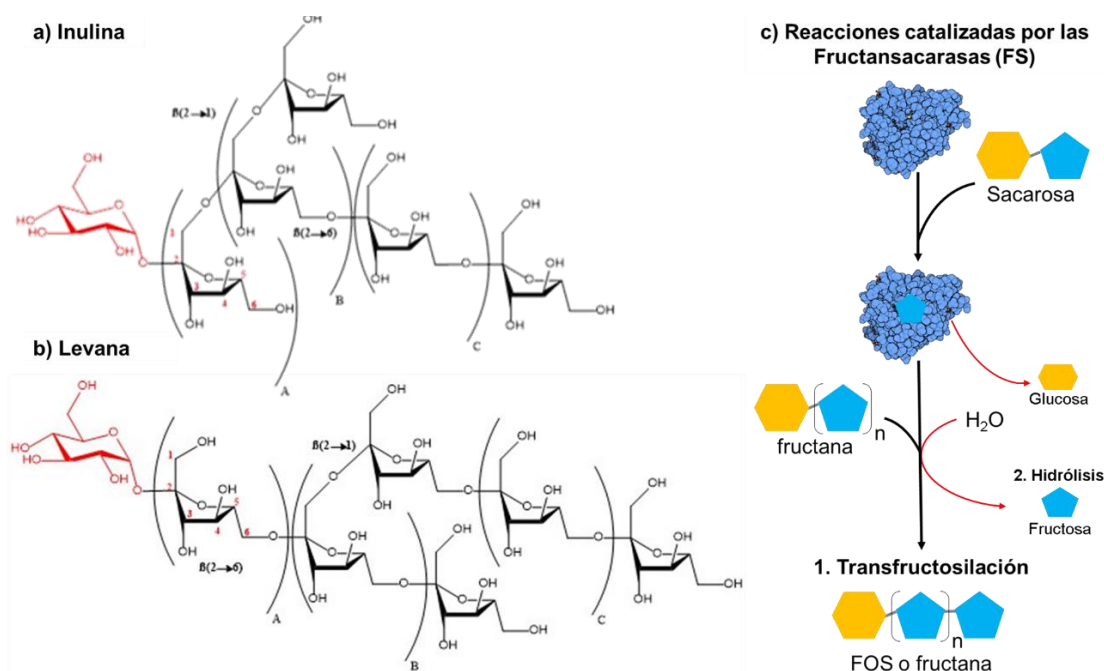


Figura 2. Estructura química de dos diferentes fructanas: a) inulina con enlace $\beta(2 \rightarrow 1)$ y ramificaciones $\beta(2 \rightarrow 6)$; b) levana con enlaces $\beta(2 \rightarrow 6)$ y ramificaciones $\beta(2 \rightarrow 1)$. c) Principales reacciones enzimáticas catalizadas por las fructansacarasas (FS; EC 2.4.1.-) en presencia de sacarosa como sustrato (Modificado de Raga-Carbajal, et al., 2016).

Las FS realizan dos tipos de reacciones en presencia de sacarosa como sustrato, durante la síntesis enzimática de las fructanas que conforman a las GNPs-Fs. La primera reacción, denominada transfructosilación, consiste en la transferencia de unidades fructosilo de una molécula de sacarosa (molécula donadora) hacia otra molécula de sacarosa o una cadena de fructana en crecimiento (molécula aceptora), liberando una molécula de glucosa como subproducto de reacción; la segunda reacción, denominada hidrólisis, consta de la transferencia de la unidad fructosilo proveniente de la sacarosa a una molécula de agua, liberando glucosa y fructosa al medio de reacción (Figura 2c) (Raga-Carbajal, et al., 2016).

III.i CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LAS GNPs-L

Solubilidad: La levana que conforma las GNPs-L es un polímero altamente soluble en agua a temperatura ambiente e insoluble en solventes orgánicos, esta cualidad se atribuye a su composición química rica en sustituyentes $-OH$ y a la presencia de ramificaciones que favorecen la nanoestructuración de las GNPs-L a través de interacciones de tipo puente de hidrógeno (Newbrun & Baker, 1968; Han & Clarke, 1990).

Viscosidad: La levana de alto peso molecular (LAPM) posee una baja viscosidad intrínseca ($0.14-0.45$ dl g^{-1}) a comparación de otros polímeros de peso molecular similar (Gojgic-

Cvijovic, et al., 2019; Benigar, et al., 2014; Arvidson, et al., 2006). Esta propiedad se atribuye a la capacidad que posee la LAPM de nanoestructurarse formando GNPs-L, reduciendo la interacción entre las diferentes cadenas del polímero que no formen parte de las GNPs (Benigar, et al., 2014).

Diámetro: El intervalo de tamaño reportado para las GNPs-L se encuentra entre los 57 y 521 nm. Sin embargo, el diámetro hidrodinámico promedio varía dependiendo de las condiciones y método de síntesis. Por ejemplo: se produjeron GNPs-L de 200 - 521 nm mediante la técnica de precipitación con sales usando LAPM (Sezer, et al., 2011; Xu, et al., 2020); mediante la síntesis por autoensamblaje en presencia de compuestos hidrofóbicos se reportaron GNPs-L de 57.1 nm al usar levana de bajo peso molecular (LBPM) y de 129.1 nm con LAPM (Kim, et al., 2015); por último, el diámetro promedio obtenido de las GNPs-L producidas durante la síntesis enzimática del polímero se encuentra entre los 62 y 180 nm (Quiñónez-Vázquez, 2015; Nakapong, et al., 2013).

Índice de polidispersión (IPD): El IPD muestra la distribución poblacional del tamaño de las nanopartículas en suspensión, catalogando como: poblaciones monodispersas a aquellas con un tamaño muy similar o mejor dicho con una distribución de tamaño reducida; y como polidispersas a aquellas poblaciones de nanopartículas con una distribución de tamaño muy amplia. Un valor de $IPD \leq 0.1$ corresponde a una población monodispersa, mientras que valores de 0.1 a 0.4 y > 0.4 , hablan de una población moderada y altamente polidispersa, respectivamente. Las GNPs-L obtenidas mediante la síntesis enzimática han presentado un $IPD < 0.1$, mostrando una población altamente monodispersa (González-Garcinuño, et al., 2019; Valdez-Echeverría, 2021).

Estabilidad: El polímero que conforma a las GNPs-L es estable a temperaturas elevadas, teniendo su punto de descomposición a los 227 °C (Bostan, et al., 2014). También es estable en pH ácidos y básicos, ya que sufre un bajo grado de hidrólisis en condiciones de alta acidez ($pH < 3.5$), siendo la temperatura el factor determinante de la velocidad de hidrólisis. Además, es compatible con la presencia de sales (Bekers, et al., 2005; Vina, et al., 1998). Sin embargo, aún no existen reportes que determinen la relación entre la hidrólisis de la levana y la reducción en el diámetro hidrodinámico de las GNPs-L bajo condiciones de alta acidez. En cuanto a la estabilidad coloidal de las GNPs-L, no se reportan cambios significativos en el diámetro hidrodinámico promedio, IPD y el potencial ζ durante 15 días de almacenamiento bajo condiciones fisiológicas (PBS pH 7.4 y 37 °C) (González-Garcinuño, et al., 2019). Estos resultados muestran la alta estabilidad de las GNPs-L bajo condiciones fisiológicas.

Potencial Z: El potencial ζ o potencial electrocinético es la diferencia de potencial entre la doble capa eléctrica de las partículas electroforéticamente móviles (capa rígida y capa de recambio) y la capa del dispersante en que se encuentran embebidas (Bhattacharjee, 2016). Es una medida de la estabilidad de sistemas coloidales, que permite describir la interacción entre biomoléculas con base en interacciones electrostáticas de repulsión de cargas. Los sistemas de nanopartículas se clasifican como: altamente inestables (-10 a +10 mV); relativamente estables (-10 a -20 y +10 a +20 mV), moderadamente estables (-20 a -30 y +20 a +30 mV); y muy estables ($> \pm 30$ mV) (Bhattacharjee, 2016). Variaciones en la

determinación del potencial ζ de las nanopartículas son consecuencia de cambios en el pH y en la concentración de solutos disueltos en la solución utilizada para la determinación de este parámetro (Taberero, et al., 2017). Las GNPs-L producidas durante la síntesis enzimática de la levana presentan un potencial ζ de entre -4 mV (González-Garcinuño, et al., 2019) y +1 mV (Valdez-Echeverría, 2021), el cual las clasifica como un sistema altamente inestable y propenso a agregarse, debido a la ausencia teórica de la repulsión electrostática entre la superficie cargada de las GNPs-L, como consecuencia de la presencia de una superficie prácticamente neutra. Sin embargo, se ha comprobado la estabilidad coloidal (ausencia de agregación) de las GNPs-L durante el almacenamiento (González-Garcinuño, et al., 2019).

Nanoestructuración: El inicio de la nanoestructuración de las GNPs-L comienza al alcanzar una concentración de polímero específica, también llamada concentración crítica de agregación (CCA). La levana presenta una CCA de 0.05 g l^{-1} a producirse en sistemas bacterianos. Mientras que la CCA determinada para la formación de GNPs-L durante la síntesis enzimática es de 0.24 g l^{-1} (González-Garcinuño, et al., 2019).

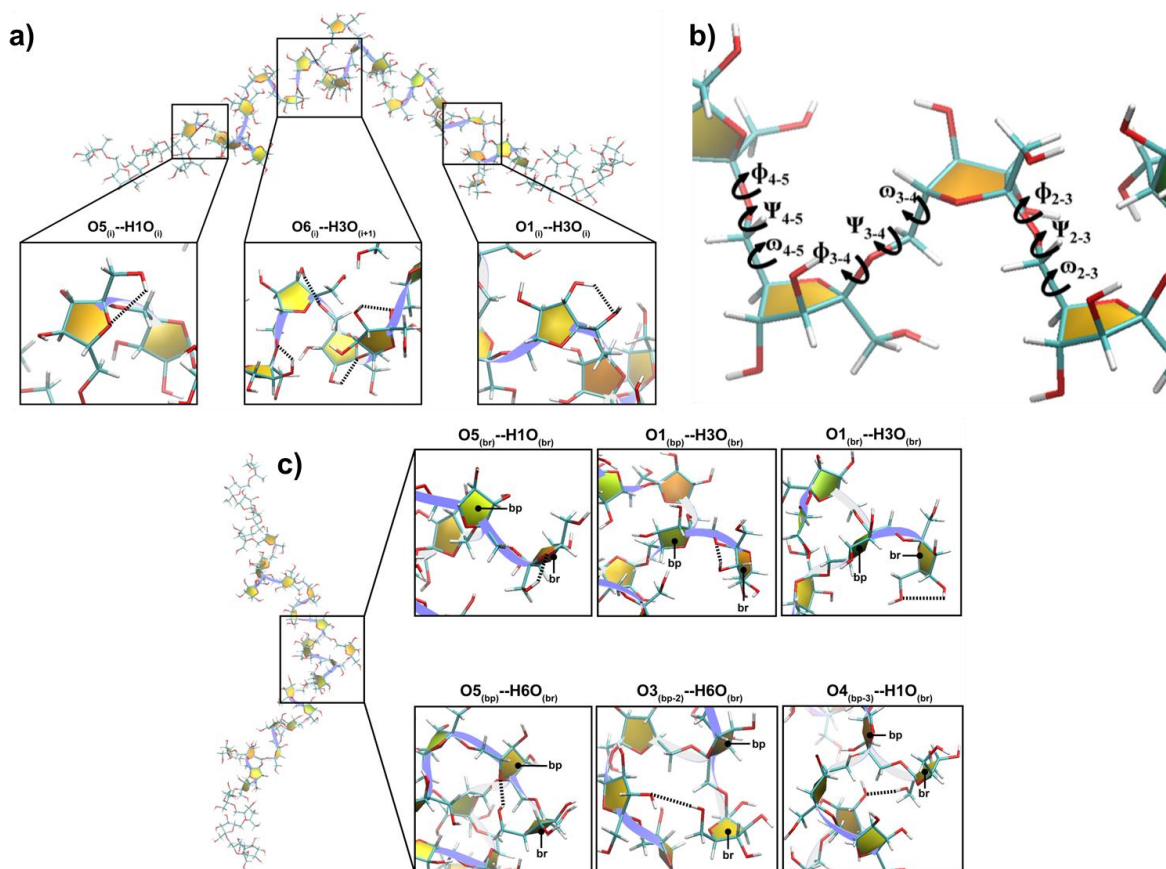


Figura 3. a) Puentes de hidrógeno presentes en la cadena principal de levana: $O6_{(i)} - H3O_{(i+1)}$ (centro); $O1_{(i)} - H3O_{(i)}$ (derecha); $O5_{(i)} - H1O_{(i)}$ (izquierda) (Tomado de Chunsriviot, et al., 2018). b) Ejemplo de los tres ángulos formados entre cuatro residuos fructosilo de FOS-L: ω ($O6-C6-C5-C4$), ψ ($C2'-O6-C6-C5$) y ϕ ($O5'-C2'-O6-C6$) (Tomado de Kanjanatanin, et al., 2016). c) Puentes de hidrógeno presentes entre los residuos de las ramificaciones de la levana (Tomado de Chunsriviot, et al., 2018). Como ejemplo se muestra la estructura de dos torciones con dos estructuras similares a hélice. Los átomos de carbono, oxígeno e hidrógeno se representan en cian, rojo y blanco, respectivamente. Los puentes de hidrógeno se representan con líneas discontinuas. La cadena de levana y las unidades fructosilo se representan como listones y pentágonos amarillos, respectivamente.

No existen reportes que expliquen la forma en que la LAPM se nanoestructura para formar nanopartículas, sin embargo, existen estudios de dinámica molecular empleando FOS de levana (FOS-L) (5 y 10 residuos) y pequeños polímeros lineales (15 y 34 residuos) con diferentes grados de ramificación (0, 1, 3 y 5 residuos por ramificación), que esclarecen las interacciones intermoleculares que podrían estar implicados en la nanoestructuración de la LAPM. Estos estudios destacan la importancia de los puentes de hidrógeno en el plegamiento tridimensional de la levana permitiendo la formación de estructuras similares a hélices en un 54 - 63 %) y hélices parciales en 34 - 22 % de los FOS-L y pequeños polímeros (Chunsriviro, et al., 2018; Kanjanatanin, et al., 2016). El principal puente de hidrógeno que conforma las hélices es el que se forma entre el $O6_{(i)}$ - $H3O_{(i+1)}$ (60 - 65 %) de cada monómero fructosilo (Figura 3a). Además, se describen tres ángulos de torsión responsables de la flexibilidad conformacional de la cadena de levana: Φ ($O5'-C2'-O6-C6$: -63°); Ψ ($C2'-O6-C6-C5$: 173°); y ω ($O6-C6-C5-C4$: -170 , -60 y 60°). Dentro de estos ángulos, ω es el de mayor importancia para la formación de hélices, debido a que posee mayor libertad de rotación y por tanto, favorece el cambio conformacional de la cadena de levana (Figura 3b). Aunado a lo anterior, existe la formación de puentes de hidrógeno entre los monómeros de las ramificaciones (br) y de la cadena principal de levana (bp), siendo la $O1_{(bp)}$ - $H3O_{(br)}$ (0.8 - 0.9 %) la interacción más frecuente (Figura 3c). Como consecuencia, estos estudios permiten proponer que los puentes de hidrógeno están implicados en la nanoestructuración de la levana, ya que al incrementar la longitud de la cadena de polímero se eleva la frecuencia de formación de estas interacciones. Lo cual, podría favorecer la formación de hélices y la torsión de la molécula, ocasionando la reducción de la longitud de la cadena y finalmente, la formación del núcleo de agregación de la nanopartícula.

III.ii SÍNTESIS DE GLICONANOPARTÍCULAS DE LEVANA (GNPs-L)

Previamente, se ha reportado la síntesis de GNPs-Fs mediante el autoensamblaje del PAPM durante la síntesis enzimática de inulina (Jiménez-Sánchez, et al., 2019) y levana (González-Garcinuño, et al., 2019; Kim, et al., 2005; Valdez-Echeverría, 2021). Otras técnicas reportadas para la síntesis de GNPs-L, son la precipitación con sulfato de sodio (Na_2SO_4) (Sezer, et al., 2011; Xu, et al., 2020), la reducción química, el autoensamblaje de PBPM por acomplejamiento con compuestos hidrofóbicos (Kim, et al., 2015), la pirólisis de flama (Bondarenko, et al., 2016) y la coprecipitación con hidróxido de amonio (NH_4OH) (Kim & Chung, 2016)

III.iii PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LAS GNPs-L

La levana y otras fructanas modulan la respuesta inmune a través de los receptores de reconocimiento de patógenos (pathogen recognition receptors, PRRs). Los PRRs potencialmente implicados son los receptores tipo C de lectinas unidos a membrana (membrane-bound C-type lectin receptors, CLR), los receptores tipo NOD (NOD-like receptors, NLR) y los receptores similares a Toll (Toll-like receptors, TLR). El TLR2 reconoce lipopéptidos y lipoproteínas, además del peptidoglicano de bacterias gram positivas. En cambio, el TLR4 reconoce lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram negativas. Ambos receptores reconocen a las fructanas y la respuesta resultante depende del tamaño del polímero (grado de polimerización) (Vogt, et al., 2013).

La levana estimula la síntesis de interleucinas (IL) proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α en cultivos de macrófagos y otros tipos celulares, principalmente mediante la

activación del TLR4, aunque el TLR2 puede promover esta actividad proinflamatoria en menor medida (Xu, et al., 2006). Por otro lado, este biopolímero posee propiedades antiinflamatorias al estimular el incremento de las IL-4 e IL-10, mediante las rutas de AMPK e IP3K/AKT/mTOR, y al bloquear la ruta de activación de NF- κ B en macrófagos, monocitos y “natural killers” (células, NK) (Peshev & Van den Ende, 2014), y posiblemente al bloquear la activación de IRF3 (Liu, et al., 2011). La discrepancia en la expresión de factores pro- y antiinflamatorios se atribuye al uso de diferentes tipos de levana que presentan cambios estructurales que dependen del origen del polímero. Se propone que, el grado de ramificación, peso molecular y la presencia del residuo fructosilo inicial, determinan las respuestas biológicas observadas. Adicionalmente, es evidente que la respuesta obtenida depende del tipo celular analizado en los ensayos *in vitro* e *in vivo* (Young, et al., 2021).

Numerosos trabajos han demostrado que la levana actúa como antiinflamatorio (Srikanth, et al., 2015), inmunomodulador (Ishida, et al., 2016; Aramsangtienchai, et al., 163), antitumoral (Calazans, et al., 2000), antioxidante (Taylan, et al., 2019) y prebiótico (Lei, et al., 2018; Liu, et al., 2020). Por lo cual nuestro equipo de investigación buscó determinar si las GNPs-Ls producidas por la LS SacB H243L poseen propiedades similares, encontrando que tienen la capacidad de fungir como un antiinflamatorio, además de presentar una nula citotoxicidad y promover la proliferación celular en macrófagos y queratinocitos, al utilizar diferentes concentraciones de GNPs-L (2.5 y 5 g l⁻¹) en presencia de un agente proinflamatorio como un lipopolisacárido (LPS) o un ambiente hiperglucémico (Valdez-Echeverría, 2021). En macrófagos RAW-Blue, se observó que al agregar las GNPs-L en presencia del LPS los niveles de expresión del factor nuclear κ B (Nuclear factor kappa B, NF- κ B) se reducen (Figura 4a). Acorde a lo anterior, se reportó la promoción de la proliferación celular en el mismo modelo biológico en presencia y ausencia del LPS. Adicionalmente, se comprobó que este efecto también ocurre en queratinocitos, al utilizar cultivos de células HaCaT con hiperglucemia inducida. Se observó que 5 mg ml⁻¹ de GNPs-L son suficientes para incrementar el número de células en un ambiente normoglucémico, mientras que ambas concentraciones promueven la proliferación celular después de 60 h de tratamiento bajo un ambiente hiperglucémico inducido (Figura 4b).

Finalmente, se comprobó que las GNPs-L promueven la proliferación celular y no la migración, al utilizar un modelo de rasguño en monocapa de queratinocitos y añadir un inhibidor de la proliferación celular (Ara-C), observando la ausencia del cierre del rasguño aun en presencia de las GNPs-L (Valdez-Echeverría, 2021) (Figura 4c y d). Acorde a lo anterior, otros autores reportaron previamente la promoción de la proliferación celular en queratinocitos y fibroblastos, además del incremento en la síntesis de colágeno tipo I al utilizar LBPM (Choi, et al., 2018) y LAPM (Kim, et al., 2005).

Complementariamente, se reconoce el efecto de la LBPM como un inmunomodulador, ya que incrementa la migración (Hiss, et al., 1981) y activación de macrófagos (aumentando su tamaño y la formación de prolongaciones celulares) en modelos *in vivo* de ratones (Robertson, et al., 1977). De igual forma, la LBPM favorece la migración de linfocitos B y T (Srikanth, et al., 2015) y promueve la expresión de las metaloproteinasas 2 y 9, las cuales participan durante el proceso de regeneración celular durante el cierre de heridas (Sturzoiu,

et al., 2011). Con base en lo anterior, existe la posibilidad de que las GNPs-L posean propiedades similares en modelos *in vivo*, lo cual sugiere que podrían fungir como un tratamiento que promueva la regeneración celular en heridas agudas y crónicas.

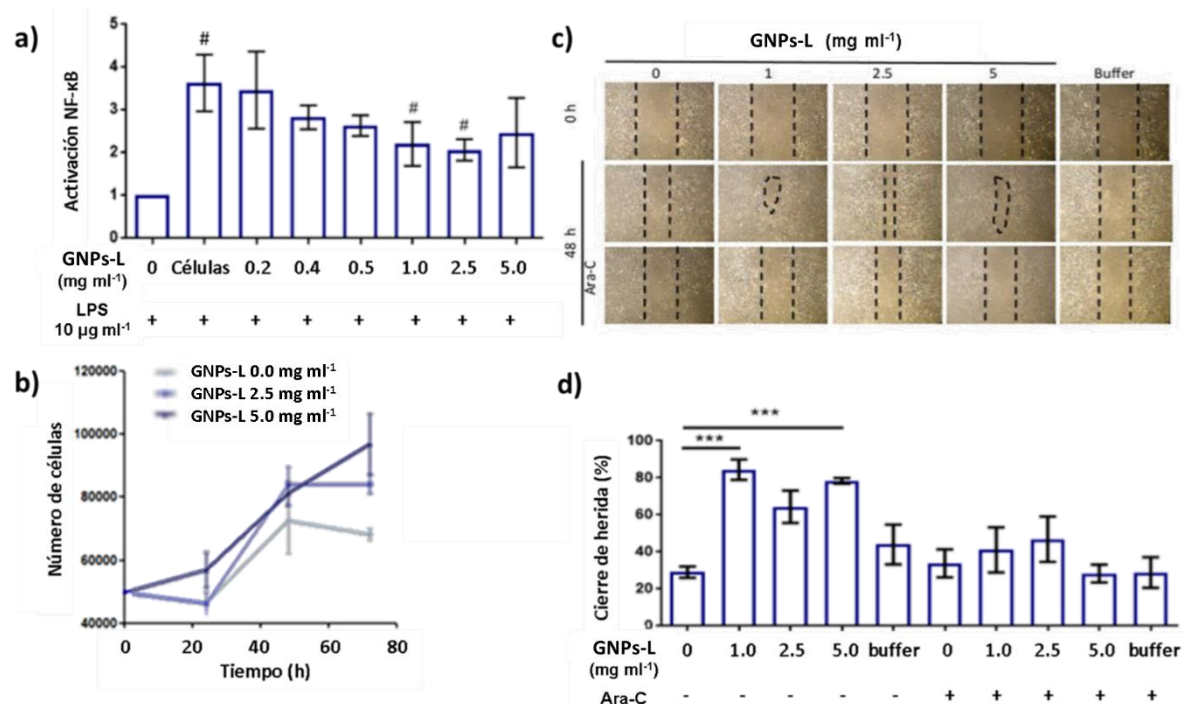


Figura 4. Efecto de las gliconanopartículas de levana (GNPs-L) como a) antiinflamatorias en la disminución de la expresión del factor de transcripción NF-κB en macrófagos RAW-Blue en presencia de un agente proinflamatorio como un lipopolisacárido (LPS). b) En la promoción de la proliferación celular de queratinocitos HaCat ante un ambiente hiperglucémico inducido (glucosa 50 mmol l⁻¹). (c y d) En el cierre de heridas inducidas en un modelo de rasguño en monocapa de queratinocitos HaCat, sometidas a diferentes concentraciones de GNPs-L durante 48 h (Tomado de Valdez-Echeverría, 2021). (Las barras de error representan la desviación estándar, n = 3).

III.iv GNPs-Fs COMO NANOACARREADORES

Dentro las aplicaciones en nanomedicina, una de las más desarrolladas es el uso de GNPs como nanoacarreadores, vehículos de entrega, protección y liberación regulada de fármacos en tratamientos personalizados (Dickinson, et al., 2019; Ventola, et al., 2010). Estos sistemas pueden ingresar al organismo por diferentes vías: 1) atravesando el tracto digestivo, la piel, las vías aéreas; y 2) mediante la administración localizada. Las GNPs pueden ser utilizadas como nanoacarreadores, destacando por su biocompatibilidad y biodegradabilidad, lo cual las vuelve altamente idóneas en aplicaciones terapéuticas (Srikanth, et al., 2015). En este sentido, las GNPs-Fs poseen una potencial aplicación como nanoacarreadores para la encapsulación y liberación prolongada de fármacos, y biomoléculas como DNA (Medrano-Villagomez, 2018) (Figura 5a y b) y proteínas como la BSA (Figura 5c) (Sezer, et al., 2011; Xu, et al., 2020) y la insulina (Figura 5d) (Valdez-Echeverría, 2021).

Aunque estrictamente hablando, el término “encapsulación” se refiere al atrapamiento de compuestos dentro de una estructura hueca o cápsula, en este trabajo la definiremos como el atrapamiento físico dentro de la matriz del polímero que conforma a las GNPs y la

adsorción del compuesto en la superficie de la nanopartícula (Augustin & Hemar, 2009), debido a que en ambos casos el compuesto asociado forma parte del nanosistema. Los reportes sobre encapsulación han observado un aumento en el diámetro hidrodinámico promedio de la nanopartícula como consecuencia de la encapsulación del compuesto cargo. Sin embargo, en los análisis reportados en estos estudios no se ha tomado en cuenta la distribución poblacional.

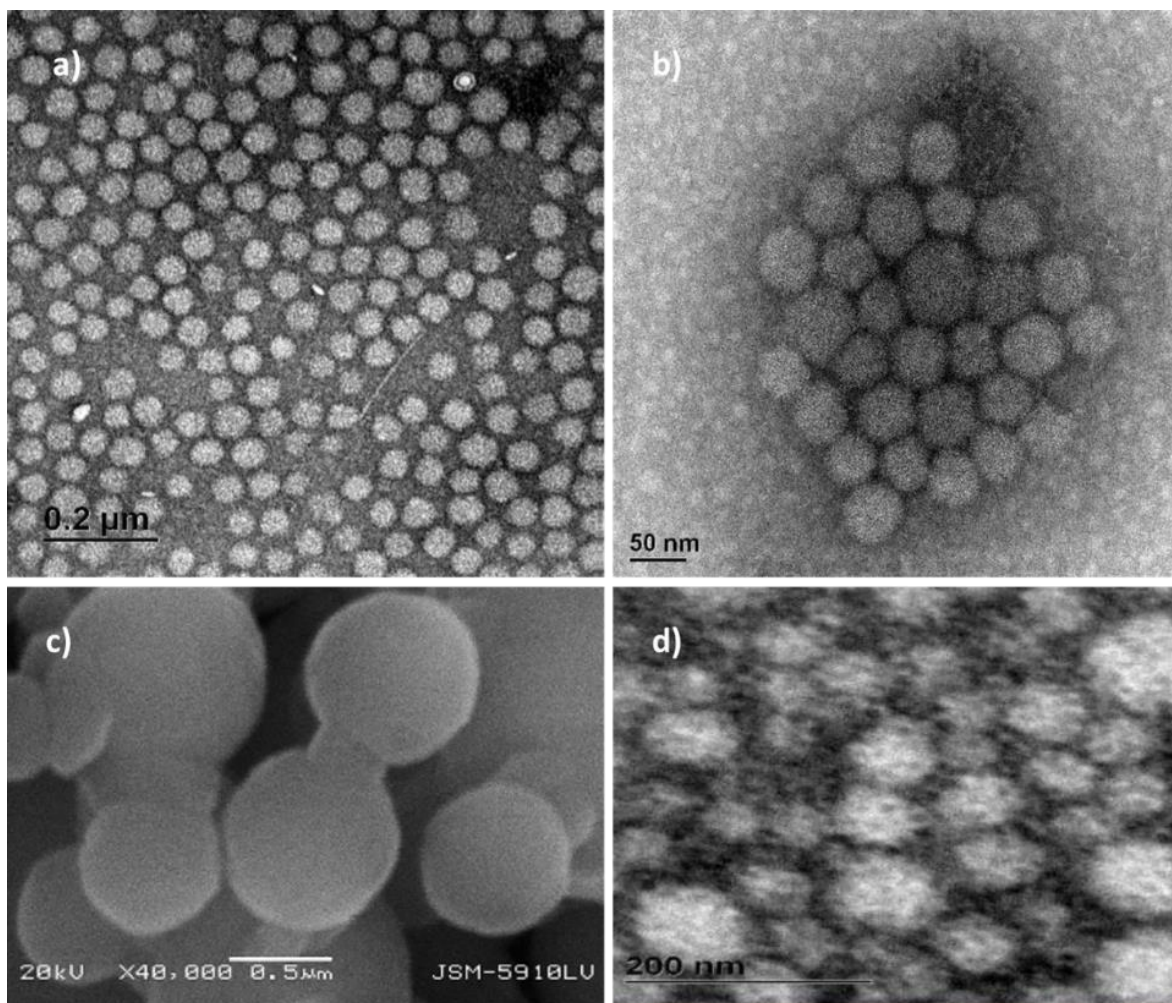


Figura 5. Micrografías de las gliconopartículas de fructanas conjugadas con biomoléculas. a y b) Microscopía electrónica de transmisión de conglomerados del conjugado de gliconopartículas (GNPs) de inulina-DNAp (Tomado de Medrano-Villagomez, 2018). c y d) Microscopía electrónica de transmisión de conglomerados del conjugado de GNPs de levana-BSA (c) (Sezer, et al., 2011) y levana-insulina (d) (Tomado de Valdez-Echeverría, 2021).

Las GNPs-Fs pueden producirse mediante el autoensamblaje del PAMP durante la síntesis enzimática de fructanas (Valdez-Echeverría, 2021) y utilizando otros métodos de síntesis química como la precipitación con Na_2SO_4 (Sezer, et al., 2011; Xu, et al., 2020). Basados en las propiedades reportadas de las GNPs-L, nuestro equipo de trabajo propone su uso como nanoacarreadores y a su vez como un potencial tratamiento que favorezca la cicatrización en heridas. Algunos antecedentes sobre la encapsulación de proteínas han mostrado que las GNPs-L pueden encapsular BSA bajo diferentes concentraciones de levana y BSA, obteniendo GNPs-L de entre 200 y 521 nm, un potencial ζ de entre $+3.92 \pm$

0.43 y $+4.4 \pm 0.2$ y $+7.1 \pm 0.2$ mV, y una EE del 49.3 al 71.3 %, al utilizar 0.1 y 0.5 % de levana y 0.1 % de BSA, respectivamente. En dichos estudios encontraron que la liberación de BSA es rápida durante el primer día (15 % de BSA) y prolongada durante 100 días, observando que la velocidad de liberación no es influenciada significativamente por la concentración inicial de BSA durante la síntesis de GNPs-L (Xu, et al., 2020; Sezer, et al., 2011). Polímeros similares a la composición de la levana y que pueden formar GNPs han mostrado su capacidad de proteger a compuestos cargo de origen proteico reduciendo la degradación por proteasas. Esto se observó al añadir GNPs-I a una emulsión de lactoferrina, mostrando el efecto retardador de la proteólisis enzimática de la lactoferrina después de 120 min de digestión gástrica simulada con pepsina, protección atribuida a la formación de una barrera que impide la libre difusión de la pepsina (Sarkar, et al., 2018) (Figura 6).

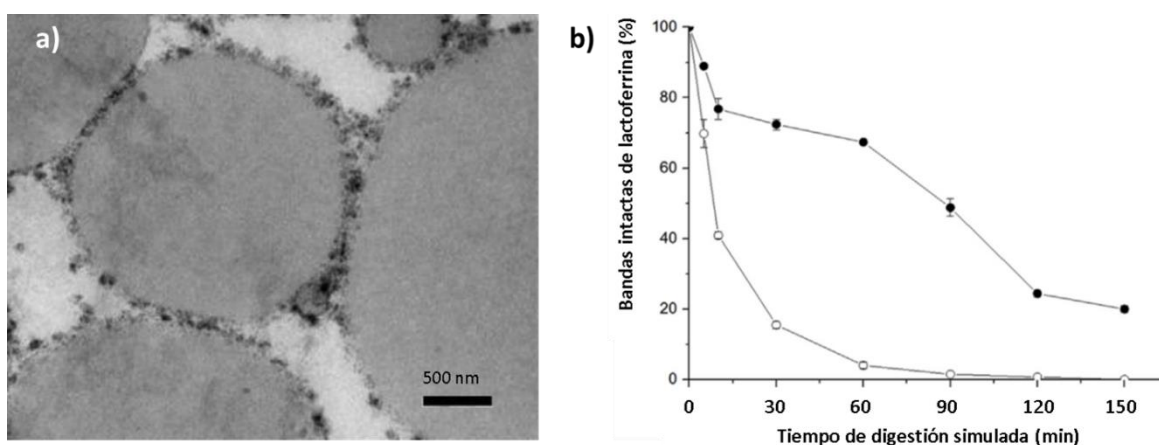


Figura 6. Efecto de las gliconanopartículas de inulina (GNPs-I) en la reducción de la proteólisis enzimática de lactoferrina, utilizando pepsina, dentro de una emulsión Pickering. a) Micrografías de micropartículas de gel de lactoferrina con presencia de GNPs-I en forma de una capa electrodensa en la periferia de las partículas. b) Análisis de imagen del efecto protector de las GNPs-I contra la digestión enzimática de lactoferrina a través del tiempo (Tomado de Sarkar, et al., 2018). (Las barras de error representan la desviación estándar, $n = 3$).

III.v DESARROLLO DE UN TRATAMIENTO PARA EL CIERRE DE HERIDAS CRÓNICAS

Una herida se caracteriza por el incremento en la respuesta proinflamatoria, la presencia de un ambiente altamente proteolítico que favorece la degradación de las IL y factores de crecimiento que regulan el desarrollo celular (Eming, et al., 2009; Eming, et al., 2014). El proceso de curación requiere de la comunicación estrecha entre los tipos celulares residentes del tejido dañado y células hematopoyéticas, esto se logra a través de la liberación de citocinas y factores de crecimiento que estimulan la proliferación y desarrollo celular. El proceso de regeneración involucra cuatro fases: 1) la coagulación o adhesión celular, 2) la fase inflamatoria, 3) la proliferación o granulación y 4) la remodelación. La resolución de la respuesta inflamatoria consta del incremento de mediadores antiinflamatorios y la reducción de los proinflamatorios, la normalización de la permeabilidad vascular y de la remoción de las células proinflamatorias (Abdelkader, et al., 2016; Falanga, 2005; Eming, et al., 2014).

La interrupción o mala regulación de alguno de los mecanismos regenerativos conlleva al desarrollo de una cicatrización excesiva (cicatrización hipertrófica) o defectos ulcerativos en la piel (heridas crónicas) (Eming, et al., 2014). Las heridas crónicas son aquellas que

tardan más de tres meses en concluir el proceso de regeneración del tejido dañado y se caracterizan por la pérdida de la homeóstasis del tejido dañado, a través de: la alta presencia de proteasas que conducen a un estado de estrés oxidativo (Tarnuzzer & Schultz, 1996; Wlaschek, et al., 1997), el cual favorece el desarrollo de microorganismos patógenos que provocan infecciones recurrentes (Pastar, et al., 2013; Roche, et al., 2012); la reducción de la presencia de células progenitoras (Stojadinovic, et al., 2014); la degradación de los diferentes factores de crecimiento que participan en la regeneración (Wlaschek, et al., 1997); y la persistencia de una etapa inflamatoria prolongada, mediante la pérdida del balance de la síntesis y liberación de citocinas pro- y antiinflamatorias (Eming, et al., 2010). En las heridas crónicas, frecuentemente se observa el incremento de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6, el interferón- γ (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Beidler, et al., 2009; Feldmeyer, et al., 2007). A su vez, tiene lugar el alza en la presencia de macrófagos proinflamatorios (M1) a comparación de los macrófagos antiinflamatorios (M2) (Eming, et al., 2014; Eming, et al., 2009).

Con base en las propiedades de las GNPs-Fs, en nuestro grupo de investigación propusimos el desarrollo de un tratamiento para heridas crónicas, utilizando GNPs-L como sistemas de encapsulación de biomoléculas que presenten actividades biológicas deseables para su aplicación en el tratamiento de heridas agudas y crónicas. Para ello propusimos el uso de insulina como potenciador de la regeneración celular, ya que posee propiedades promotoras de la regeneración celular, reduciendo el tiempo necesario para la remodelación total del área afectada en modelos animales y en pacientes humanos, sanos y con diabetes inducida (Chen, et al., 2012; Lima, et al., 2012; Zhang, et al., 2007; Zagon, et al., 2007; Apikoglu-Rabus, et al., 2010; Negrini, et al., 2017; Azevedo, et al., 2016). Esto nos permitiría contar con tratamiento que podría potenciar los efectos individuales de la levana y la insulina.

La insulina es una hormona proteica producida por las células β pancreáticas, con un peso molecular de 5.8 kDa y conformada por dos cadenas peptídicas (cadena A de 21 aa y B de 30 aa) unidas por dos puentes disulfuro (Huus, et al., 2005). La insulina recombinante es obtenida por ingeniería genética mediante la expresión heteróloga de insulina humana en modelos microbianos. En sus diferentes presentaciones comerciales, esta hormona es estable en almacenamiento a 25 - 30 °C hasta por 48 días y a 37 °C hasta por 45 días (Heinemann, et al., 2021). Adicionalmente se ha probado su estabilidad a 100 °C y diferentes pHs, reportando una vida media de 9.3 h y 40 min, en pH 6 y 8, respectivamente (Volkin & Klibanov, 1987). La insulina induce el reclutamiento temprano de neutrófilos, promueve la expresión de macrófagos M2 e incrementa la expresión de la interleucina antiinflamatoria IL-10. Además, esta hormona facilita la migración de macrófagos y queratinocitos, acelerando la reepitelización y la reacción fibroblástica, mediante el alza en la deposición de colágeno tipo I (Wang & Xu, 2020). La insulina actúa sobre los receptores dependientes de insulina (IR) y en los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF), efecto mediado por la vía de señalización PI3K/AKT y MAPK/ERK, por lo cual se propuso su implementación en el tratamiento de heridas crónicas (Abdelkader, et al., 2016).

La insulina aplicada como un tratamiento tópico incrementa la velocidad de cierre de las heridas en modelos animales sanos y con diabetes, y en pacientes diabéticos, ya que ha mostrado la reducción del 13 al 50 % del tiempo necesario para observar la completa remodelación del tejido dañado (Anexo 1). Este efecto se debe a la actividad que posee en la promoción de la proliferación, migración celular y reepitelización, la regulación de la respuesta inflamatoria y la neovascularización en el tejido dañado (Chen, et al., 2012; Apikoglu-Rabus, et al., 2010; Zhang, et al., 2007; Lima, et al., 2012). Se ha usado insulina de diferentes orígenes biológicos (insulina porcina, bovina y humana) (Negrini, et al., 2017; Chen, et al., 2012; Lima, et al., 2012) para su aplicación en una o dos dosis diarias con cantidades totales de hormona que se encuentran entre las 0.03 (Chen, et al., 2012) y 5 U (Zagon, et al., 2007; Negrini, et al., 2017), observando resultados similares.

Se ha propuesto la encapsulación de insulina con fines terapéuticos, utilizando nanopartículas formadas con biopolímeros como el quitosano (Al-Qadi, et al., 2012; Fernández-Urrusuno, et al., 1999) y el almidón (Jain, et al., 2008). Particularmente, se han aplicado conjugados con insulina para promover el cierre de heridas en modelos animales con diabetes inducida, en los cuales destaca el uso de una dosis al inicio del estudio, permitiendo obtener resultados similares a la aplicación diaria de la insulina (Abdelkader, et al., 2016; Li, et al., 2019; Lee, et al., 2020; Ehterami, et al., 2018) (Anexo 2). Adicionalmente, las GNPs de quitosano poseen propiedades promotoras de la migración y proliferación celular. Sin embargo, al combinarse en un conjugado de quitosano-insulina, no se encontraron diferencias al utilizar las GNPs, la insulina o el conjugado. Este efecto se atribuye a la alta estabilidad del complejo por la presencia de sustituyentes amino en la estructura química del quitosano, los cuales confieren una fuerte atracción electrostática entre la insulina y la cadena de polímero, ocasionando la incapacidad de liberar la hormona para llevar a cabo su acción biológica (Ribeiro, et al., 2020). Por lo anterior, el desarrollo de sistemas de encapsulación de insulina en polímeros con propiedades promotoras de la regeneración celular, como lo es la levana (neutros), podría favorecer la liberación de la hormona y por tanto la acción conjunta de ambos compuestos.

Con esta visión en mente, Valdez-Echeverría (2021) reportó la síntesis de GNPs de levana-insulina (GNPs-LIns), demostrando el encapsulación de la hormona durante la síntesis enzimática, utilizando la LS SacB H243L (Valdez-Echeverría, 2021). Este autor obtuvo GNPs-LIns de 155 nm, con un IPD de 0.13 que sugiere una población monodispersa, además reportó una EE del 61 % y estimó una capacidad de carga (CC) de 1.8 μg de proteína / mg de GNPs-LIns, al usar una concentración de insulina durante la síntesis enzimática de las GNPs-LIns ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$). Sin embargo, aún no existe un estudio sobre el proceso de síntesis enzimática, de la determinación de la CC máxima de este sistema de encapsulación y tampoco se ha implementado un método de purificación del conjugado de GNPs-LIns. Esta información nos permitirá conocer si es posible obtener un sistema de GNPs-LIns que proporcione la dosis reportada de ambos compuestos, 2.5 a 5 mg de levana (Valdez-Echeverría, 2021) y 0.03 a 5 U (Negrini, et al., 2017; Chen, et al., 2012) para observar las respuestas biológicas esperadas en futuros ensayos.

Justificación

Dentro de la nanomedicina, se propuso el uso de nanopartículas biopoliméricas como nanoacarreadores de biomoléculas. Particularmente, gliconanopartículas como las de fructanas presentan un gran potencial por su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Específicamente, las gliconanopartículas de levana poseen la propiedad de nanoestructurarse durante la síntesis enzimática del polímero. Además, promueven la proliferación celular, actúan como inmunomoduladores y poseen propiedades antiinflamatorias, por lo cual se propuso su uso como nanoacarreadores de biomoléculas que favorezcan la cicatrización, para su aplicación como un posible tratamiento en el cierre de heridas. De esta forma se seleccionó la insulina, ya que al incrementar la velocidad de cicatrización de las heridas al aplicarse como un tratamiento tópico, acelerando la reepitelización de la epidermis, debido a que regula la respuesta inflamatoria e incrementa la migración y proliferación celular. Sin embargo, aún no existe un estudio sobre el proceso de síntesis enzimática y de la purificación de las gliconanopartículas de levana-insulina, así como de la determinación de la capacidad de carga máxima de este sistema. Por esta razón, en este proyecto se llevó a cabo un estudio del proceso de síntesis del conjugado levana-insulina, se desarrolló un método de purificación del conjugado que nos permitió determinar los parámetros de encapsulación, con el fin de analizar la factibilidad del proceso de producción y generar un sistema con la cantidad reportada de insulina y levana para su futura aplicación en pruebas biológicas y posteriormente como tratamiento para mejorar el proceso de cicatrización en heridas crónicas.

Hipótesis

El cambio de la concentración de insulina en la reacción enzimática de síntesis de conjugado levana-insulina permitirá obtener la relación reportada de levana/insulina que mejora la cicatrización en heridas.

Objetivos

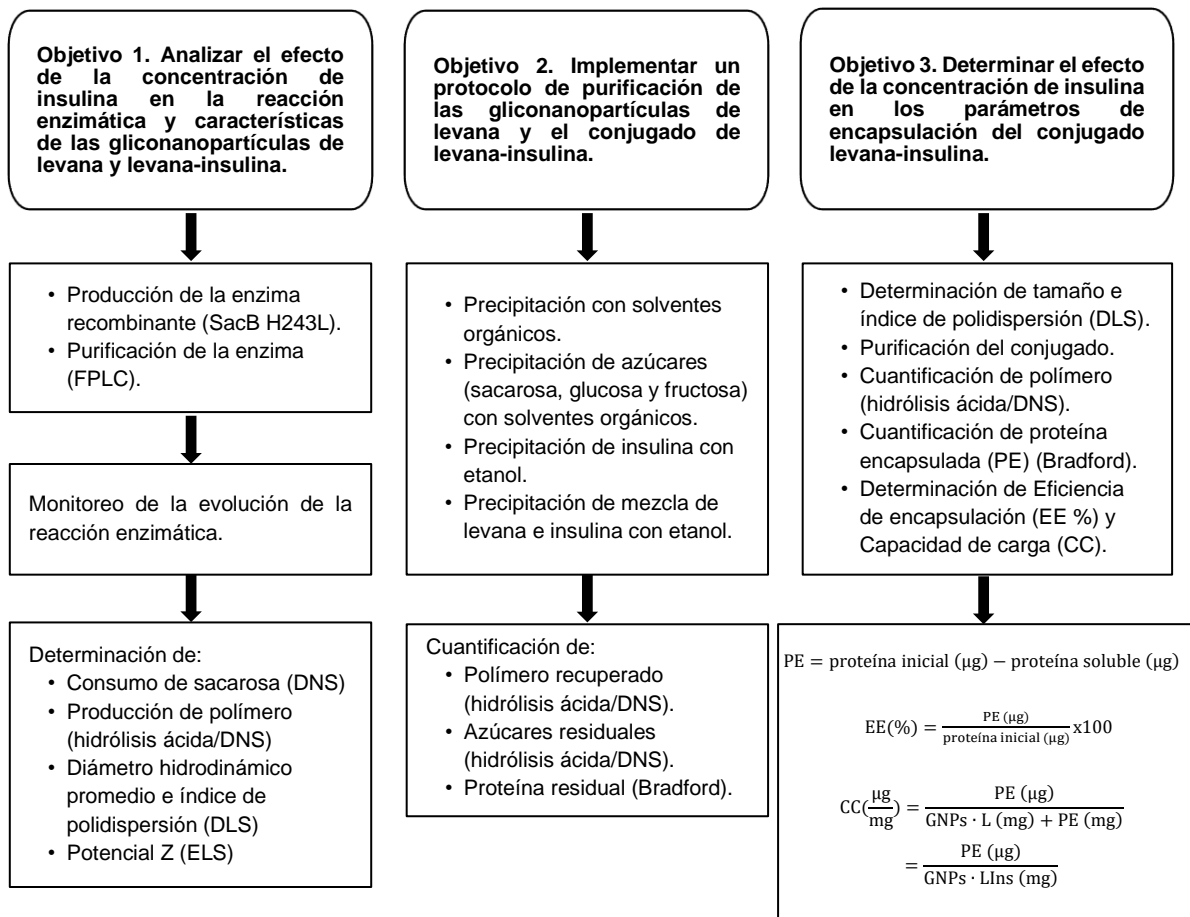
Objetivo general:

Estudiar la encapsulación de insulina en gliconanopartículas de levana.

Objetivos particulares:

1. Analizar el efecto de la concentración de insulina en la reacción enzimática de síntesis de levana, y las características de las gliconanopartículas de levana y levana-insulina.
2. Implementar un protocolo de purificación de las gliconanopartículas de levana y el conjugado de levana-insulina.
3. Determinar el efecto de la concentración de insulina en los parámetros de encapsulación del conjugado levana-insulina.

Estrategia experimental



Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

1. PRODUCCIÓN DE LA LEVANSACARASA SacB H243L

1.1. Preparación de células electrocompetentes

La preparación de células electrocompetentes se hizo siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor Bio-Rad (Catalog Number 165-2100) con algunas modificaciones. En 25 ml de medio YENB se colocó una muestra de aproximadamente 2 ml de bacterias electrocompetentes *Escherichia coli* BL21(DE3) o DH5 α (New England) y se incubaron durante 12 h a 37 °C y 200 rpm. Se inocularon 200 ml de medio YENB fresco con 2 ml de fermentado, se incubaron a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una DO de 0.5 - 0.7 a una λ 600 nm. Se recuperaron las células por centrifugación a 4 °C y 8,000 rpm por 15 min. Se hicieron tres lavados con agua ultrapura estéril suspendiendo las células y centrifugando nuevamente. Se hizo un lavado con glicerol estéril al 10%. Se suspendió en 0.5 ml de glicerol estéril al 10%. Finalmente, se colocaron alícuotas de 60 μ l en microtubos estériles y se almacenan a -80 °C hasta su uso.

1.2. Transformación genética

La levansacarasa SacB H243L es una mutante derivada de la levansacarasa de *Bacillus subtilis*, la cual se caracteriza por la producción exclusiva de levana de alto peso molecular bajo condiciones específicas de reacción (amortiguador de acetatos 50 mM + CaCl₂ 1 mM, pH 6, 5.5 μ g ml⁻¹ de enzima, 100 g l⁻¹ de sacarosa, 37 °C y 350 rpm) (Raga-Carbajal, 2019). La transformación genética se hizo siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor Bio-Rad (Catalog Number 165-2100) con algunas modificaciones. *Escherichia coli* DH5 α y *E. coli* BL21(DE3) se transformaron con la construcción SacB H243L:pET22b+ (6,748 bp). *E. coli* DH5 α se utilizó para la producción y purificación del plásmido, mientras que *E. coli* BL21(DE3) se empleó para la expresión de la fructansacarasa SacB H243L. Para la transformación se tomaron 150 ng del plásmido y se mezclaron con 60 μ L de células electrocompetentes, las cuales se sometieron a un choque eléctrico en un electroporador MicroPulser™ de BioRad. Las células se suspendieron en 0.5 ml de medio LB líquido y se incubaron a 37 °C y 300 rpm durante 1 hora, después de lo cual se sembraron en 20 ml de medio LB sólido, adicionado con 200 μ g ml⁻¹ de ampicilina. Se incubaron durante 12-16 h a 37 °C. Para la purificación de plásmido se utilizó el paquete Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit de Zymo Research, siguiendo las indicaciones del proveedor. La integridad de la construcción se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% (Anexo 3). La presencia de la mutación de la SacB H243L se corroboró mediante secuenciación por síntesis utilizando los oligonucleótidos complementarios a la secuencia del promotor T7 5'-TAATACGACTCACTATAGG-3' y terminador T7 5'-CCGCTGAGCAATAACTAGC-3'.

1.3. Expresión heteróloga de SacB H243L

Se inocularon 25 ml de medio líquido LB adicionado con 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ampicilina, con una colonia bacteriana y se incubó de 12-16 h a 37 °C y 200 rpm. En un matraz Fernbach se colocó 1 L de medio LB adicionado con 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ampicilina se inoculó con 10 ml de del cultivo bacteriano y se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una DO de 0.5 - 0.6 a una λ 600 nm. Se indujo la expresión de SacB H243L con 0.2 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 18 °C y 120 rpm, durante 8 h. El cultivo bacteriano se separó en cuatro volúmenes de 250 ml y se recuperaron las células por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se hicieron dos lavados con amortiguador de acetatos 100 mM pH 6, centrifugando después de cada lavado. Finalmente, las células se congelaron a -20 °C hasta su uso (Raga-Carbajal, 2019).

1.4. Purificación de la levansacarasa SacB H243L

Lisis celular: Las células se suspendieron en una solución de lisozima 1 mg ml^{-1} con amortiguador de acetatos 100 mM pH 6 y se mantuvieron en incubación en hielo durante 30 min. La mezcla se congeló en hielo seco/acetona y se descongeló en agua fría, repitiendo el proceso tres veces. Se adicionó amortiguador de acetatos 100 mM hasta alcanzar un volumen de 30 ml. Se sonicó con nueve pulsos de 10 s encendido y 30 s apagado a una amplitud de 70 %. Finalmente, se centrifugó a 10,000 rpm durante 40 min a 4 °C, se recuperó la fracción soluble, se volvió a centrifugar y finalmente se separó el extracto celular para su uso posterior.

Purificación de la enzima: La enzima se purificó por cromatografía rápida de proteínas (Fast protein liquid chromatography, FPLC) de intercambio catiónico en dos columnas conectadas en serie HiTrap CM-sepharosa Fast Flow (GE Healthcare) de 5 ml. La columna se equilibró con 5 volúmenes de amortiguador de acetatos 100 mM pH 6 empleando una bomba peristáltica. El extracto se recirculó durante 20 min a un flujo de 5 ml min^{-1} . El lavado y elución se realizaron en un equipo ÄKTA prime (Amersham Pharmacia Biotech). El lavado se hizo con amortiguador de acetatos de 100 mM pH 6 durante 20 min a un flujo de 5 ml min^{-1} . La elución se realizó con amortiguador de acetatos 1 M pH 6, con un flujo de 5 ml min^{-1} y una presión de 0.3 MPa (Anexo 4A). Para identificar las fracciones que contenían a la enzima, se hizo el ensayo de actividad enzimática por determinación de azúcares reductores con DNS. Las fracciones con actividad enzimática se analizaron mediante electroforesis desnaturizante (SDS-Page) (Anexo 4B) y se seleccionaron las fracciones con menor presencia de impurezas, posteriormente se concentraron por ultrafiltración en un ultrafiltro con punto de corte de 30 kDa (Amicon®) a 6,000 rpm a 4 °C. La enzima concentrada se lavó tres veces con amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 adicionado con 1 mM de CaCl_2 y se suspendió en un ml del mismo amortiguador (Raga-Carbajal, 2019), se hicieron alícuotas de 50 μl y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

1.5. Solubilización de insulina

Se utilizó insulina recombinante humana (SAFC Biosciences™, SIGMA). Se solubilizó siguiendo las instrucciones del proveedor en una solución HCl 10 mM (pH 2). Una noche

antes de cada ensayo, se preparó una solución madre de insulina con 4 mg ml⁻¹. La concentración de la solución madre se corroboró con el ensayo de cuantificación de proteína de Bradford.

2. ANÁLISIS DE PROTEÍNA

2.1. Cuantificación de proteína

La concentración de enzima SacB H243L se cuantificó por el método de Bradford, utilizando la solución reactiva Protein Assay (Bio-Rad®). Todos los ensayos se hicieron por triplicado, midiendo la absorbancia a una λ de 595 nm. Como control se utilizó una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA) (Bradford, 1976).

2.2. Electroforesis desnaturizante (SDS-Page)

Se utilizó gel de poliacrilamida al 10 % y se colocaron 10 μ l de muestra por carril. La muestra de proteína se mezcló previamente con 5 μ l de amortiguador de carga compuesto por 0.124 M tris-HCl pH 6.8, 4 % SDS (w/v), 10 % glicerol (v/v), 10 % de β -mercaptoetanol (v/v) azul de bromofenol 0.05 % (w/v). La electroforesis se hizo bajo un campo eléctrico de 20 mA durante aproximadamente 1.5 h. Finalmente se tiñó el gel con una solución de azul de Coomassie 0.125 %.

2.3. Ensayo de actividad enzimática

La actividad enzimática de SacB H243L se determinó mediante el ensayo de cuantificación de azúcares reductores con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Se prepararon diluciones de la enzima en 500 μ l de amortiguador de acetatos 50 mM adicionado con 1 mM de CaCl₂ pH 6. Se agregaron 100 μ l de sacarosa 600 g l⁻¹ para una concentración final de 100 g l⁻¹ dejando la reacción por 10 min. Se tomaron alícuotas de 50 μ l de reacción y se añadieron 50 μ l de reactivo DNS. Se calentó la mezcla en agua en ebullición durante 5 min y se enfrió a 4 °C por 5 min. Se midió la absorbancia de cada muestra a una λ de 540 nm. Se seleccionó la dilución cuya absorbancia se acercase a 1 y se repitió la reacción enzimática tomando alícuotas a los tiempos 0, 2.5, 5, 7.5 y 10 min. Se obtuvo una actividad específica de 167.15 \pm 0.296 U mg⁻¹ (Anexo 5), similar a la reportada previamente, 160.3 U mg⁻¹ (Ortiz-Soto, et al., 2008) y 177.5 U mg⁻¹ (Valdez-Echeverría, 2021).

Para determinar la actividad volumétrica se utilizó la ecuación:

$$AV \left(\frac{U}{ml} \right) = \left(\frac{m_{exp}}{m_{DNS}} \right) \left(\frac{1}{PM_p} \right) (V) \left(\frac{1}{V_E} \right)$$

En la cual AV = actividad volumétrica (U ml⁻¹), m_{exp} = pendiente experimental (Abs min⁻¹), m_{DNS} = pendiente de curva de calibración con DNS (Abs/mg ml⁻¹), PM_p = peso molecular de productos de reacción (fructosa/glucosa 0.180156 mg μ mol⁻¹), V = volumen total de ensayo (0.6 ml) y V_E = volumen de la muestra utilizado (ml).

La actividad específica de proteína total y de la enzima pura se obtuvo como:

$$AE = \frac{U}{E} = \frac{AV(V_T)}{E}$$

En la cual AE = actividad específica ($U \text{ mg}^{-1}$), V_T = volumen total de la muestra (ml) y E = cantidad de proteína (mg). Se obtuvo la pendiente de la recta por regresión lineal y se determinaron las actividades volumétrica y específica. Se utilizó una curva de calibración de glucosa/fructosa (en concentración equimolar) en concentraciones 0.5 a 2 mg ml^{-1} . Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

3. PRODUCCIÓN DE LAS GLICONANOPARTÍCULAS Y GLICONANOCONJUGADO

3.1. Síntesis de gliconanopartículas de levana (GNPs-L)

La síntesis de GNPs-L se hizo bajo las condiciones de reacción previamente reportadas para la producción de levana de alto peso molecular con la mutante SacB H243L (Raga-Carbajal, 2019) con algunas modificaciones. En un microtubo se colocaron 500 μl de amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 adicionado con 1 mM de CaCl_2 . Para mantener el volumen inicial de la reacción (600 μl) se retiró el volumen necesario para adicionar las concentraciones deseadas de enzima y posteriormente se añadió el volumen de la solución concentrada de SacB H243L a una concentración final de 0.1 μM (5.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$). La mezcla con la enzima y una solución concentrada de sacarosa (600 g l^{-1}) se incubaron a 37 °C y 350 rpm, durante 5 min. Para inicial la síntesis de levana se adicionaron 100 μl de la solución de sacarosa 600 g l^{-1} , dejando una concentración final de 100 g l^{-1} . Las muestras se incubaron a 37 °C y 350 rpm, durante 24 h. Se inactivó la enzima por congelamiento en hielo seco/acetona y calentamiento en agua en ebullición durante 25 min, se incubó durante 5 min a 4 °C. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

3.2. Síntesis de gliconanopartículas de levana-insulina (GNPs-LIns)

La síntesis de GNPs-LIns se realizó bajo las mismas condiciones descritas previamente para la síntesis de GNPs-L. Se retiró el volumen necesario para adicionar las concentraciones deseadas de insulina en concentraciones finales de 30, 60, 80, 90 y 120 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Las concentraciones de insulina se seleccionaron con base en el trabajo de Valdez-Echeverría (2021) (30, 60 $\mu\text{g ml}^{-1}$). La mezcla de enzima/insulina y una solución concentrada de sacarosa (600 g l^{-1}) se incubaron a 37 °C y 350 rpm, durante 5 min. Para inicial la síntesis de levana se adicionaron 100 μl de la solución de sacarosa 600 g l^{-1} , dejando una concentración final de 100 g l^{-1} . Las muestras se incubaron a 37 °C y 350 rpm, durante 24 h. Se inactivó la enzima por congelamiento en hielo seco/acetona y calentamiento en agua en ebullición durante 25 min, se incubó durante 5 min a 4 °C. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

3.3. Estimación del consumo de sacarosa

La estimación del consumo de sacarosa se determinó mediante la liberación de azúcares reductores. Se tomaron alícuotas de la reacción de síntesis de GNPs-L y GNPs-LIns a los tiempos 0, 2.5, 4, 6, 9, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28 h y se determinó la concentración

de los azúcares liberados mediante el ensayo de cuantificación de azúcares reductores por DNS (Miller, 1959).

4. CARACTERIZACIÓN DE LAS GNPs-L Y GNPs-LINS

4.1. Determinación del diámetro hidrodinámico promedio e índice de polidispersión (IPD)

El diámetro hidrodinámico o tamaño de las nanopartículas y el índice de polidispersión (IPD o Polydispersion index, PDI) se determinaron mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (Dynamic light scattering, DLS), utilizando el equipo Malvern Zetasizer Nano ZS (ZEN3600) y una celda de cuarzo QS Hellmar Analytics de 3 mm. Se preparó una dilución en relación 3:14 v/v (levana: amortiguador) de cada muestra previo a su análisis. Las mediciones se hicieron utilizando el índice de refracción del agua (1.33 ml g^{-1}) y el índice de refracción de la levana disuelta en agua desionizada (1.472 ml g^{-1}) (Lauren, et al., 1975), a una temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ con un tiempo de estabilización térmica de 60 s.

4.2. Determinación del potencial ζ

El potencial ζ se determinó mediante la técnica de dispersión de luz electroforética (Electrophoretic light scattering, ELS) utilizando el equipo Malvern Zetasizer Nano ZS (ZEN3600) y una celda de capilar curva DTS1060 Malvern Panalytical. Se preparó una dilución 3:14 v/v de cada muestra previo a su análisis.

5. CUANTIFICACIÓN DE LEVANA POR HIDRÓLISIS ÁCIDA ACOPLADA CON DNS (HA/DNS)

Con el objetivo de contar con un método rápido y sencillo para cuantificar la cantidad de polímero producido en las reacciones de síntesis de GNPs, se implementó el método de cuantificación de polímero mediante hidrólisis ácida, acoplado a la determinación de azúcares reductores con DNS (HA/DNS). La hidrólisis ácida es un método que permite hidrolizar los polímeros de carbohidratos para liberar los monosacáridos que los conforman. En el caso de la levana, este método libera principalmente fructosa, la cual se cuantifica mediante la determinación de azúcares reductores por DNS (Miller, 1959).

5.1. Tiempo necesario para hidrolizar levana

La cuantificación de levana por HA/DNS se hizo siguiendo el protocolo un protocolo previamente reportado (Ávila-Fernández, et al., 2011) con algunas modificaciones. Inicialmente, se determinó el tiempo necesario para hidrolizar una concentración conocida de levana de alto peso molecular (LAPM, $\sim 2,300 \text{ kDa}$) de SacB de *Bacillus subtilis*. Para ello, se preparó un concentrado de levana 30 g l^{-1} , utilizando HCl 0.617 M como solvente. Se incubaron $200 \text{ } \mu\text{l}$ de la solución a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ y 450 rpm , durante $2:20 \text{ h}$. La hidrólisis se detuvo con el mismo volumen de NaOH 1 M . Se mezclaron $10 \text{ } \mu\text{l}$ de hidrolizado con $70 \text{ } \mu\text{l}$ de agua y $80 \text{ } \mu\text{l}$ de DNS. Las muestras se hirvieron en agua en ebullición durante 5 min , se enfriaron a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min , después de lo cual se añadieron $800 \text{ } \mu\text{l}$ de agua y se midió la absorbancia a una λ de 540 nm . Se cuantificó la concentración de azúcares reductores

utilizando la curva de calibración de glucosa/fructosa del método de DNS, considerando que la concentración de azúcares reductores es equivalente a la concentración de levana hidrolizada. Se determinó la hidrólisis total de la levana al cuantificar los 30 g l⁻¹ iniciales de polímero y no ver diferencias en la concentración de polímero después de 2:20 h de incubación. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

5.2. Curva de calibración para la cuantificación de polímero por HA/DNS

A partir del concentrado de levana 30 g l⁻¹, se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de levana (0, 5, 10, 15, 20 y 30 g l⁻¹) utilizando HCl 0.617 M, como solvente. Las soluciones se hidrolizaron y cuantificaron siguiendo el método de HA/DNS previamente descrito. Se construyó un gráfico de concentración de levana contra absorbancia y se obtuvo la ecuación de la recta mediante regresión lineal (Tabla 1). Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

5.3. Validación del método de cuantificación de polímero por HA/DNS

Se hizo la validación parcial del método con base en los lineamientos de la International Conference on Harmonization guidelines (ICH, 1996), utilizando los parámetros de linealidad, precisión y exactitud. La validación se llevó a cabo analizando tres soluciones problema de levana/fructosa/glucosa/sacarosa con concentraciones conocidas (5/5/10/80, 15/15/30/40 y 25/25/50/0 g l⁻¹), simulando las condiciones de reacción de la síntesis de GNPs-L. Las soluciones problema se analizaron mediante tres técnicas distintas, incluyendo la técnica a validar de HA/DNS.

La validación de la cuantificación de levana se hizo utilizando dos técnicas cromatográficas estandarizadas. La primera técnica se enfocó en la cuantificación de levana y la segunda en la de azúcares simples como monosacáridos (glucosa/fructosa) y disacáridos (sacarosa):

- 1. Cromatografía de exclusión tamaño de alta resolución (SEC-HPLC).** La distribución de la LAPM se analizó por HPLC con un detector de índice de refracción (Jasco IR-4030). Se empleó un sistema en serie de columnas Waters Ultrahydrogel™: Ultrahydrogel Linear (7.8 x 300 mm) y Ultrahydrogel 500 (7.8 x 300 mm) con un índice de exclusión entre 0.5 y 10,000 kDa. Se realizó una elución isocrática a una temperatura de 35 °C, con una fase de nitrato de sodio (NaNO₃) 0.1 M a un flujo de 0.8 ml min⁻¹.
- 2. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).** La cuantificación de azúcares simples se llevó a cabo en un sistema Dionex ICS-5000+ DC, equipado con un inyector Dionex AS-AP, un detector de índice de refracción Jasco IR-4030 y una columna Hypersil GOLD™ Amino 250 x 4.6 mm, manteniendo una temperatura de 35 °C y usando una fase móvil de acetonitrilo/agua (75:25) a un flujo de 1 ml min⁻¹.

Linealidad: Cada curva de calibración se graficó, se evaluó la linealidad por regresión lineal al obtener los coeficientes de correlación (R²), de variación (CV %) y la ecuación de la curva (Tabla 1 y Figura 7).

Tabla 1. Coeficientes de linealidad (R^2), de variación (CV %) y ecuación de la recta obtenidos para las curvas de calibración de los diferentes métodos de cuantificación de polímero con hidrólisis ácida (HA/DNS) y cromatografía de exclusión de tamaño de alta resolución (SEC-HPLC), y cuantificación de monosacáridos (fructosa/glucosa) y disacáridos (sacarosa). (Desviación estándar $n = 3$).

Método	R^2	CV (%)	Ecuación
HA/DNS	0.997	4.49	$y = 0.0302 x - 0.0126$
SEC-HPLC	0.997	4.69	$y = 109806.4 x - 28449.075$
Fructosa-HPLC	0.991	6.49	$y = 1502662.9 x + 62798.443$
Glucosa-HPLC	0.999	2.69	$y = 1475190.0 x - 127412.15$
Sacarosa-HPLC	0.999	3.06	$y = 1628754.5 x - 111178.69$

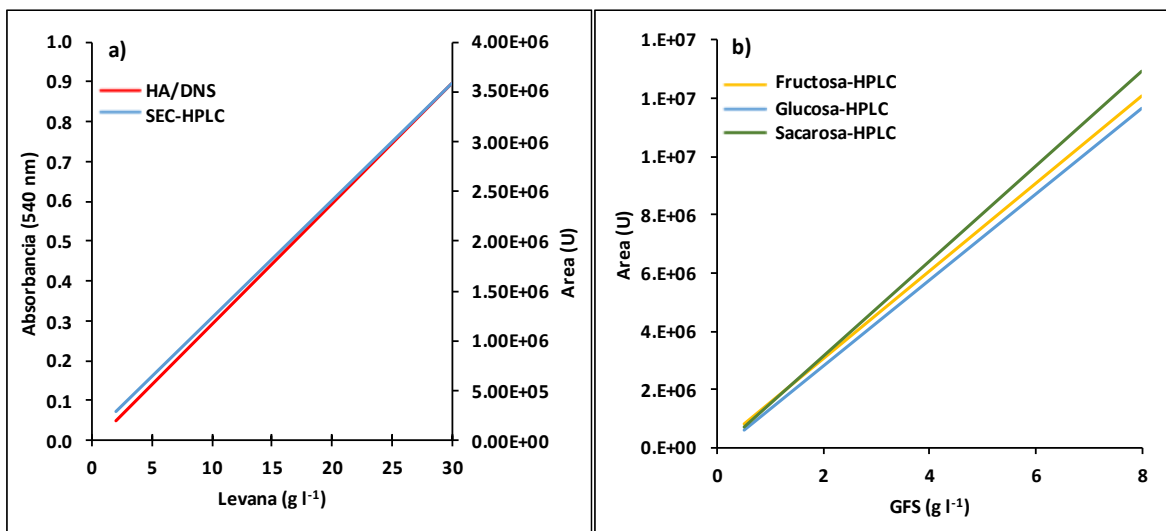


Figura 7. Regresión lineal para la cuantificación de: a) levana mediante los métodos de hidrólisis ácida acoplado con DNS (HA/DNS) y cromatografía de exclusión tamaño de alta resolución (SEC-HPLC); b) glucosa, fructosa y sacarosa mediante HPLC.

Análisis de muestra problema: la concentración de levana en las muestras problema se cuantificó mediante el método de HA/DNS. Se tomaron 200 μl de cada muestra y se mezclaron con 1.5 volúmenes de etanol, agitando vigorosamente por inversión e incubaron durante 1 h a 4 ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$. Las muestras se centrifugaron a 15,000 g durante 20 min a 4 $^{\circ}\text{C}$, se retiró el sobrenadante y se hicieron dos lavados con cuatro volúmenes de etanol absoluto, agitando vigorosamente, centrifugando bajo las mismas condiciones y retirando por completo el sobrenadante después de cada lavado. Se evaporó el solvente remanente en un horno a 60 $^{\circ}\text{C}$ durante al menos 10 min. La levana precipitada se suspendió en 200 μl de HCl 6.17 M, para ello se agitó vigorosamente e incubó a 60 $^{\circ}\text{C}$ y 450 rpm, por 2:20 h, repitiendo la agitación vigorosa cada 30 min. La hidrólisis se detuvo con el mismo volumen de NaOH 1 M. Se mezclaron 10 μl de hidrolizado con 70 μl de agua y 80 μl de DNS. Las muestras se hirvieron en agua en ebullición durante 5 min, se enfriaron a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min, después de lo cual se añadieron 800 μl de agua y se midió la absorbancia a una λ de 540 nm. Se cuantificó la concentración de levana utilizando la curva de calibración de levana. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Precisión y exactitud del método HA/DNS en la cuantificación de levana: se utilizó el método para la cuantificación de la concentración promedio de levana y el porcentaje de levana recuperada, respectivamente, así como el coeficiente de variación (CV %) de las

tres repeticiones analizadas por concentración conocida de las muestras problema (Tabla 2). Se compararon los resultados obtenidos mediante este método contra la determinación de levana y azúcares por HPLC.

Tabla 2. Concentración promedio recuperada, promedio de recuperación y coeficiente de variación (CV %) calculados para las soluciones problema de levana/fructosa/glucosa/sacarosa (5/5/10/80, 15/15/30/40 y 25/25/50/0 g l⁻¹), mediante los diferentes métodos de cuantificación de polímero con hidrólisis ácida (HA/DNS) y cromatografía de exclusión de tamaño de alta resolución (SEC-HPLC), y cuantificación de monosacáridos (fructosa/glucosa) y disacáridos (sacarosa) (HPLC). (Desviación estándar n = 3).

Método	Concentración muestra problema (g l ⁻¹)	Promedio recuperado (g l ⁻¹)	Recuperación (%)	CV (%)
HA/DNS	5	5.10 ± 0.40	102.0 ± 0.079	7.75
	15	14.92 ± 0.67	99.5 ± 0.044	4.46
	25	24.40 ± 0.22	97.6 ± 0.009	0.90
SEC-HPLC	5	4.97 ± 0.08	99.3 ± 0.015	1.54
	15	16.80 ± 0.37	112.0 ± 0.025	2.20
	25	25.33 ± 0.10	101.3 ± 0.004	0.40
Fructosa-HPLC	5	4.86 ± 0.01	97.2 ± 0.001	0.13
	15	14.84 ± 0.46	98.9 ± 0.031	3.09
	25	24.78 ± 0.05	99.1 ± 0.002	0.20
Glucosa-HPLC	10	10.87 ± 0.02	108.7 ± 0.002	0.22
	30	32.55 ± 0.79	108.5 ± 0.026	2.43
	50	50.68 ± 0.25	101.4 ± 0.005	0.50
Sacarosa-HPLC	80	78.76 ± 0.77	98.4 ± 0.010	0.98
	40	38.35 ± 0.83	95.9 ± 0.021	2.15
	0	0.00 ± 0.00	0.0 ± 0.000	-

6. PURIFICACIÓN DE GNPs-L Y GNPs-LINS MEDIANTE PRECIPITACIÓN CON SOLVENTES

Precipitación de levana con etanol o isopropanol: se utilizó una solución de levana 20 g l⁻¹ y levana/insulina 60 µg ml⁻¹. Se tomaron 200 µl de cada solución y se mezclaron con diferentes volúmenes de etanol absoluto o isopropanol (0, 1, 1.5, 2 y 3 volúmenes), agitando vigorosamente por inversión. Las muestras se incubaron durante 1 h a 4 ± 0.5 °C, se centrifugaron a 15,000 g durante 20 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se evaporó el solvente dentro de un horno a 60 °C. Se cuantificó la concentración de levana recuperada mediante el método de HA/DNS. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Azúcares residuales solubles en presencia de etanol o isopropanol: se utilizaron soluciones de sacarosa y glucosa/fructosa (relación equimolar) 100 g l⁻¹. Se tomaron 200 µl de cada solución y se mezclaron con diferentes volúmenes de etanol absoluto o isopropanol (0, 1, 1.5, 2 y 3 volúmenes), agitando vigorosamente. Las muestras se incubaron durante 1 h a 4 ± 0.5 °C, se centrifugaron a 15,000 g durante 20 min a 4 °C. Se tomaron 200 µl de sobrenadante, a los cuales se les evaporó el solvente dentro de un horno a 60 °C, teniendo cuidado de mantener la cristalinidad de la solución. Los azúcares recuperados se solubilizaron en 200 µl de agua destilada, la sacarosa se hidrolizó por el método de HA y en ambos casos se cuantificó la concentración de azúcares reductores con el ensayo de DNS (Miller, 1959). Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Insulina residual soluble en presencia de etanol: se utilizaron soluciones de insulina 30, 60, 90 y 120 µg ml⁻¹. Se tomaron 200 µl de cada solución y se mezclaron con diferentes

volúmenes de etanol absoluto (0, 1, 1.5, 2 y 3 volúmenes), agitando vigorosamente por inversión. Las muestras se incubaron durante 1 h a 4 ± 0.5 °C, se centrifugaron a 15,000 g durante 20 min a 4 °C. Se tomaron 400 μ l de sobrenadante, a los cuales se les evaporó el solvente dentro de un horno a 60 °C. La insulina recuperada se solubilizó en agua destilada y se cuantificó la concentración de proteína mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Precipitación de insulina en presencia de levana: se utilizaron soluciones de insulina con 30, 60, 80 y 90 μ g ml^{-1} , solas y en combinación con 20 g l^{-1} de levana. Se tomaron 200 μ l de cada solución y se mezclaron con diferentes volúmenes de etanol absoluto (0, 1, 1.5, 2 y 3 volúmenes), agitando vigorosamente. Las muestras se incubaron durante 1 h a 4 ± 0.5 °C, se centrifugaron a 15,000 g durante 20 min a 4 °C. Se tomaron 400 μ l del sobrenadante, a los cuales se les evaporó el solvente dentro de un horno a 60 °C. La insulina recuperada se solubilizó en agua destilada y se cuantificó la concentración de insulina mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

6.1. Purificación de GNPs-L y GNPs-LIns

Se utilizaron reacciones de síntesis de GNPs-L y GNPs-LIns de 24 h de incubación con insulina 30, 60, 80, 90 μ g ml^{-1} . Se tomaron 200 μ l de las reacciones enzimáticas y se mezclaron con 1.5 volúmenes de etanol absoluto, agitando vigorosamente por inversión. Las mezclas se incubaron durante 1 h a 4 ± 0.5 °C y se centrifugaron a 15,000 g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se separó del precipitado y se almacenó para su posterior tratamiento y análisis. Las GNPs-L y GNPs-LIns precipitadas se lavaron dos veces con cuatro volúmenes de etanol absoluto, agitando vigorosamente, centrifugando bajo las mismas condiciones y retirando por completo el sobrenadante después de cada lavado. Finalmente se evaporó el solvente remanente en un horno a 60 °C durante al menos 10 min y se almacenaron las GNPs-L y GNPs-LIns purificadas a temperatura ambiente hasta su uso.

7. MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN (EE) Y CAPACIDAD DE CARGA (CC)

Para la determinación de la EE y CC, se cuantificó la concentración de proteína soluble (μ g ml^{-1}) y levana (mg ml^{-1}), en el sobrenadante y GNPs-LIns, respectivamente. Para la cuantificación de proteína soluble se tomó una alícuota del sobrenadante y se evaporó por completo el solvente en un horno a 60 °C, cuidado mantener la cristalinidad de la muestra. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Mientras que la cuantificación de la concentración de levana en las GNPs-LIns se obtuvo mediante el método de HA/DNS.

7.1. Cuantificación de proteína encapsulada (PE)

Se calculó como la diferencia entre la cantidad de proteína inicial (tiempo 0 h de reacción) y proteína soluble (después de 24 h de reacción), en las reacciones de síntesis de GNPs-

LIns. La cantidad de proteína inicial y soluble (μg) se calculó multiplicando la concentración de proteína ($\mu\text{g ml}^{-1}$) por el volumen de reacción de 0.6 ml.

$$PE (\mu\text{g}) = \text{proteína inicial } (\mu\text{g}) - \text{proteína soluble } (\mu\text{g})$$

7.2. Determinación de la eficiencia de encapsulación (EE)

La eficiencia de encapsulación (EE) se calculó como el cociente de la cantidad de la proteína encapsulada (μg) entre la cantidad de proteína inicial (μg), multiplicado por 100.

$$EE (\%) = \frac{PE (\mu\text{g})}{\text{proteína inicial } (\mu\text{g})} (100)$$

7.3. Determinación de la capacidad de carga (CC)

La capacidad de carga (CC) se calculó como el cociente de la cantidad de proteína encapsulada (μg), entre el peso de las GNPs-LIns (mg). El peso de las GNPs-LIns se calculó como la sumatoria del peso de la levana (mg) y de la proteína encapsulada (mg). Para calcular el peso de cada compuesto en la reacción, se multiplicó la concentración de proteína y levana por un volumen de reacción de 0.6 ml.

$$CC \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} \right) = \frac{PE (\mu\text{g})}{GNPs \cdot L (\text{mg}) + PE (\text{mg})} = \frac{PE (\mu\text{g})}{GNPs \cdot LIns (\text{mg})}$$

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los experimentos se calculó la media y desviación estándar de tres repeticiones independientes. Los datos se analizaron mediante el Análisis de Varianza (ANOVA), aplicando los análisis post-hoc de Tukey y Bonferoni cuando se encontraron diferencias significativas. El análisis de datos se hizo con el software GraphPad Prism 8.0.1.

Capítulo 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9. PRODUCCIÓN DE GLICONANOPARTÍCULAS Y GLICONANOCONJUGADO

9.1. Efecto de la presencia de insulina en la reacción enzimática de la levansacarasa SacB H243L

Raga-Carbajal, et al. (2016) demostraron que las condiciones de reacción modulan la síntesis de LAPM al utilizar la LS SacB. En su trabajo comprobaron que el incremento en la concentración de proteína en la reacción enzimática de síntesis de levana, provocó un ligero cambio en la cantidad de polímero producido, al añadir albúmina o lisozima hasta una concentración final 10 veces mayor a la concentración de enzima ($55 \mu\text{g ml}^{-1}$). Por esta razón, con la finalidad de estudiar si la adición de insulina durante la síntesis de las gliconanopartículas de levana-insulina (GNPs-LIns) afecta la reacción enzimática, se monitorearon reacciones de síntesis de gliconanopartículas de levana (GNPs-L) y GNPs-LIns estimando el consumo de sustrato (sacarosa) mediante la cuantificación de azúcares reductores con DNS, la cantidad de polímero sintetizado por HA/DNS, así como el tamaño del glicoconjugado (diámetro hidrodinámico promedio) mediante la dispersión de luz dinámica (DLS). La síntesis de las GNPs-L y GNPs-LIns se realizó bajo las condiciones estándar de reacción ($5.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de enzima, 100 g l^{-1} de sacarosa, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y 350 rpm durante 24 h) (Valdez-Echeverría, 2021).

Durante la síntesis enzimática de la levana, el biocatalizador (LS SacB H243L) lleva a cabo dos tipos distintos de reacciones: la primera es la reacción de transfructosilación, la cual consiste en el uso de moléculas de sacarosa como donadores de unidades fructosilo que son transferidas a un aceptor, el cual puede ser a otras moléculas de sacarosa o de levana en crecimiento, liberando glucosa como subproducto de reacción; la segunda reacción es la hidrólisis, la cual consiste en la transferencia de las unidades fructosilo a moléculas de agua que funge como aceptor, liberando glucosa y fructosa. La SacB H243L tiene una relación de 50/50 % entre la hidrólisis y la transferencia de unidades fructosilo (Raga-Carbajal, 2019), lo cual significa que de cada 100 unidades fructosilo donadas por la sacarosa, 50 se transfieren a la cadena de levana en crecimiento y 50 se hidrolizan liberando fructosa. Las moléculas de glucosa y fructosa liberadas son cuantificables mediante la determinación de azúcares reductores con DNS, sin la posibilidad de distinguir entre ambas especies químicas, por lo cual este método permite monitorear la evolución de la reacción mediante la estimación del consumo de sacarosa a través de la cuantificación de los azúcares liberados.

Se observó que el final de la reacción enzimática se alcanzó a las 24 h en presencia y ausencia de la insulina, tiempo después del cual no existe una diferencia significativa en el consumo de sacarosa (Figura 8). Además, la presencia de insulina ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) provocó un alza del 17.6 % en la liberación de azúcares reductores con respecto a la síntesis de GNPs-

L, lo cual sugirió que la presencia de esta hormona podría influir en la reacción enzimática, ya sea aumentando la transfructosilación o promoviendo la hidrólisis de la sacarosa consumida. Sin embargo, un hecho importante es que la insulina utilizada en este estudio se disolvió en una solución de HCl 10 mM, lo cual pudo haber ocasionado un ligero decremento en el pH de la mezcla de reacción (pH 6). Para corroborar si el incremento en la liberación de azúcares reductores después de 24 h se debió a la adición de insulina o del HCl 10 mM, se determinó la concentración de azúcares reductores en presencia de la misma cantidad de HCl 10 mM utilizado para añadir los $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ de insulina. Se observó que la presencia del ácido sin insulina provocó el incremento del 12.4 % de la liberación de azúcares reductores, efecto similar al observado en presencia de la hormona (60.7 ± 1.0 y $64.5 \pm 1.9 \text{ g l}^{-1}$, respectivamente). Con base en esto, concluimos que el alza en la liberación de azúcares reductores en presencia de la solución de HCl 10 Mm/insulina se debió principalmente a un ligero cambio en el pH de la mezcla de reacción, como consecuencia de la adición del ácido. Además, hipotetizamos que la diferencia del 5.9 % entre la adición de la mezcla HCl 10 Mm/insulina y HCl solo en la liberación de azúcares reductores, pudiera atribuirse a la sola presencia de la hormona. Sin embargo, debido a la incapacidad de solubilizar la proteína en el amortiguador, no pudimos corroborar esta hipótesis (Tabla 3).

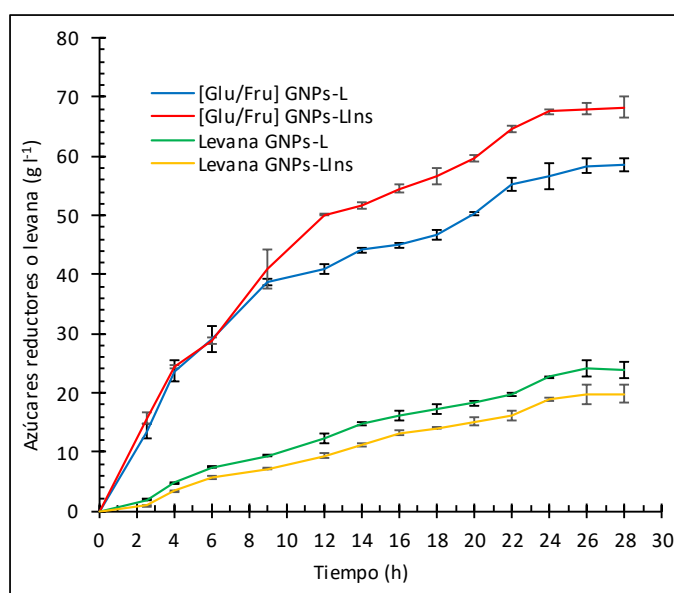


Figura 8. Consumo de sustrato (sacarosa) monitoreado mediante la cuantificación de azúcares reductores liberados (DNS) y cuantificación de levana producida cuantificada mediante hidrólisis ácida/DNS, durante la síntesis gliconanopartículas de levana (GNPs-L) y levana-insulina $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ (GNPs-LIns) a diferentes tiempos de reacción durante 28 h. La síntesis se hizo con $5.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de enzima, 100 g l^{-1} de sacarosa a 37°C y 350 rpm. (Las barras de error representan la desviación estándar con una $n = 3$).

Se encuentra reportado que al utilizar BSA o lisozima para incrementar la concentración de proteína en la reacción enzimática de síntesis de levana se modifica la producción de polímero. Se propone que este efecto se debe a interacciones inespecíficas enzima-proteína o proteína-carbohidrato. Sin embargo, no se ha comprobado si existe la formación de conglomerados proteicos de la enzima con proteínas inespecíficas como la BSA y la

lisozima (Raga-Carbajal, et al., 2016). Un comportamiento similar podría suceder entre la insulina y la enzima SacB H243L, lo cual se podría comprobar haciendo análisis del diámetro hidrodinámico de la insulina en presencia del biocatalizador utilizando la técnica de DLS.

Para corroborar si la diferencia observada en la liberación de azúcares reductores por la presencia de la insulina afecta la producción de levana, se cuantificó la concentración de polímero a diferentes tiempos de reacción durante la producción de las GNPs-L y GNPs-LIns. Los resultados obtenidos mostraron que con el paso del tiempo se incrementó la concentración de levana, la cual alcanzó una máxima concentración a las 24 h de reacción. Se obtuvo una concentración de levana de $22.7 \pm 0.08 \text{ g l}^{-1}$ en la síntesis de GNPs-L y de $18.3 \pm 0.30 \text{ g l}^{-1}$ en la síntesis de GNPs-LIns. De igual forma, fue notable que la presencia de la mezcla de HCl 10 mM/insulina provocó un decremento del 19.4 % de la concentración de levana producida durante la síntesis enzimática, con respecto a las condiciones estándar de síntesis de GNPs-L (Figura 8 y Tabla 3). Mientras, la adición de HCl 10 mM solo, ocasionó la reducción del 14.9 % (19.3 ± 0.40) de polímero. En este sentido, los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas entre la producción de levana en presencia de la mezcla HCl/insulina y del HCl 10 mM solo ($p < 0.05$). En consecuencia, se sugiere que la insulina provocó un decremento del 4.4 % con respecto a la adicción de la mezcla HCl 10 mM/insulina, lo cual concuerda con la diferencia observada en la liberación de azúcares reductores al comparar ambos grupos. En resumen, se observó que la presencia de una mezcla de HCl/insulina durante la síntesis del conjugado de GNPs-LIns provoca un cambio en la relación hidrólisis/transferencia del sustrato, incrementando la liberación de glucosa y fructosa, y reduciendo la producción de levana, atribuyéndose este efecto principalmente al cambio en el pH causado por la presencia del ácido (12.4 y 14.9 %, respectivamente) e hipotetizando que en menor medida a la adicción de insulina (5.9 y 4.4 %, respectivamente).

Tabla 3. Efecto de la presencia de HCl 10 mM y HCl 10 mM + insulina $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ en la reacción de síntesis de gliconanopartículas de levana-insulina (GNPs-LIns), determinado mediante la liberación de azúcares reductores y cuantificación de polímero por hidrólisis ácida (DNS). La síntesis se hizo con $5.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de enzima, 100 g l^{-1} de sacarosa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y 350 rpm.

Tratamiento	Azúcares reductores (g l^{-1})	Levana (g l^{-1})
Sin insulina, ni HCl	53.5 ± 2.2	22.7 ± 0.08
HCl 10 mM/Insulina	64.5 ± 1.9	18.3 ± 0.30
HCl 10 mM	60.7 ± 1.0	19.3 ± 0.40

La desviación estándar se obtuvo de una $n = 3$. La prueba Tukey mostró diferencias significativas con una $p < 0.05$ (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$).

Para conocer el efecto de la adicción de insulina en el tamaño de las GNPs producidas, se determinó el diámetro hidrodinámico a diferentes tiempo de la producción de las GNPs-L y GNPs-LIns mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). En la Figura 9 se observa una reducción del diámetro hidrodinámico promedio de alrededor de 35 nm al comparar las GNPs-L y GNPs-LIns producidas a 2.5 h contra las de 24 h. Este resultado contrastó con el alza en la concentración de levana al paso del tiempo, ya que pareciera lógico pensar que al incrementarse la concentración de polímero podría incrementar el tamaño de las GNPs-L y GNPs-LIns. Sin embargo, se comprobó que esto no ocurre y que

dicho efecto tampoco se debe a la hidrólisis del polímero que conforma las GNPs-L (Figura 8), lo cual concuerda con lo reportado por Valdez-Echeverria (2021). Como consecuencia, aún no se comprueba la razón por la cual las GNPs-L y GNPs-LIns reducen su diámetro al paso del tiempo de reacción aun cuando la concentración de polímero se eleva.

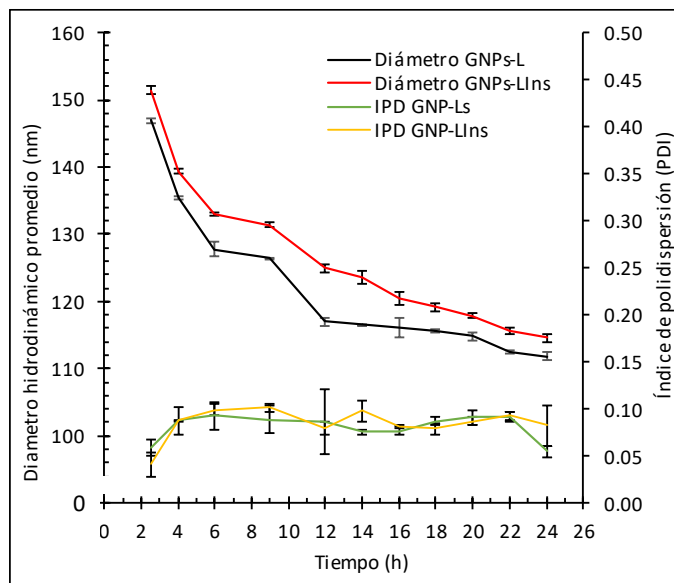


Figura 9. Diámetro hidrodinámico de las GNPs-L y GNPs-LIns y del índice de polidispersión (IPD) durante los diferentes tiempos de reacción. La síntesis se hizo con $5.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de enzima, 100 g l^{-1} de sacarosa a 37°C y 350 rpm . (Las barras de error representan la desviación estándar con una $n = 3$).

Una hipótesis que podría explicar el fenómeno de reducción de tamaño de las GNPs-L y GNPs-LIns es la compactación continua del polímero durante la síntesis enzimática y el proceso de autoensamblaje. Esta hipótesis se basa en la existencia de estudios de dinámica molecular que buscan explicar el plegamiento tridimensional de FOS y pequeñas cadenas de polímero de levana (34 residuos), proponiendo que las interacciones de tipo puente de hidrógeno son de gran importancia en el plegamiento tridimensional de la levana y sugiriendo que el aumento de la longitud de la cadena, incrementa la frecuencia de formación puentes de hidrógeno, lo cual favorece la torsión y reduce la longitud de la cadena, lo que impacta en la compactación del polímero (Kanjatanin, et al., 2016; Chunsriyot, et al., 2018), efecto observado con cierta similitud en estudios *in silico* sobre el plegamiento de FOS de inulina (Cooper, et al., 2015). Por lo anterior, hipotetizamos que durante la nanoestructuración los puentes de hidrógeno podrían causar estos fenómenos entre una o varias cadenas de levana y estar implicados en la formación de GNPs-L. De esta forma, podría ser explicada la reducción del diámetro hidrodinámico de las GNPs-L durante el incremento en la concentración de levana producida, como consecuencia de una compactación del polímero en formación.

Asimismo, al comparar el diámetro hidrodinámico promedio en la distribución poblacional de las GNPs-L (86 - 155 nm) y las GNPs-LIns (de 88 - 163 nm) producidas durante 24 h de reacción, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) (Anexo 6), aun cuando se

observó un cambio de aproximadamente 3 nm al encapsular la insulina en las GNPs-LIns (Figura 9 y Tabla 4). En contraste, Valdez-Echeverria (2021) reportó un incremento de 24 nm en el diámetro hidrodinámico de las GNPs-LIns. Sin embargo, existen diferencias metodológicas que podrían explicar este hecho, entre ellas se encuentran el uso de una insulina purificada mediante precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a diferencia de la insulina solubilizada en HCl 10 mM para su uso en este trabajo. En diversos estudios, el incremento en el tamaño de las GNPs se asocia a la encapsulación de compuestos, con base en el análisis comparativo de solo el diámetro hidrodinámico promedio (Al-Qadi, et al., 2012; Xu, et al., 2020; Sezer, et al., 2011). Sin embargo, este efecto no se observó en nuestro estudio al analizar el diámetro promedio con respecto a las distribuciones poblacionales de las GNPs-Ls y GNPs-LIns.

9.2. Características fisicoquímicas de las GNPs-L y GNPs-LIns

Para el estudio de las nanopartículas un parámetro importante es la determinación del índice de polidispersión (IPD), el cual funge como una medida de la variabilidad poblacional en el tamaño de las nanopartículas en suspensión. Se habla de una población monodispersa, cuando la distribución poblacional del diámetro hidrodinámico es angosta, indicando la similitud en su diámetro hidrodinámico. En cambio, una población polidispersa presenta variabilidad en el tamaño de las partículas en suspensión y por tanto una amplia distribución de tamaño. Un valor de $\text{IPD} \leq 0.1$ corresponde a una población monodispersa, mientras que valores de 0.1 a 0.4 y > 0.4 , hablan de una población moderada y altamente polidispersa, respectivamente. Para determinar el tipo de distribución poblacional del diámetro hidrodinámico, se calculó el índice de polidispersión (IPD) mediante la técnica de DLS. Las GNPs-L y GNPs-LIns presentaron un IPD de 0.05 a 0.08, después de 24 h de reacción lo que sugiere una población monodispersa, similar a lo reportado por Valdez-Echeverria (2021). El IPD durante los diferentes tiempos de reacción presentó resultados similares (Figura 9), por lo cual no existió un cambio significativo en la monodispersidad de la población de GNPs-L y GNPs-LIns. Se ha observado que las condiciones de síntesis determinan la homogeneidad de las partículas obtenidas (Auch, et al., 2019; Horák, 1999). Específicamente, durante la síntesis enzimática de la levana que forma las GNPs-L, las condiciones de relación (temperatura y pH) se encuentran controladas, por lo cual se propone que la síntesis de polímero es constante y por tanto también la formación de las GNPs, explicando la obtención de un PDI de una población monodispersa. Este resultado concuerda con otros reportes sobre la producción de GNPs-L mediante la síntesis enzimática del polímero (González-Garcinuño, et al., 2019; Nakapong, et al., 2013).

Con el objetivo de determinar la carga superficial de las GNPs-L y GNPs-LIns, se determinó el potencial ζ , mediante el análisis de dispersión de luz electroforética (ELS). El potencial ζ permite describir la interacción entre biomoléculas con base en interacciones electrostáticas de repulsión de cargas, clasificando a los sistemas de nanopartículas como: altamente inestables (-10 a $+10$ mV); relativamente estables (-10 a -20 y $+10$ a $+20$ mV), moderadamente estables (-20 a -30 y $+20$ a $+30$ mV); y muy estables ($> \pm 30$ mV) (Bhattacharjee, 2016). En este trabajo, se obtuvo un potencial ζ de -2.3 a -5 mV después de 24 h de reacción de la síntesis de GNPs-L y GNPs-LIns (Tabla 4), sin encontrar

diferencias significativas en la carga superficial, similar a lo reportado por Valdez-Echeverría (2021) (0.1 mV). El monitoreo del potencial ζ durante en los diferentes tiempo de síntesis de GNPs-L mostró el mismo comportamiento. Otros gliconanoconjugados de levana tienen un potencial ζ de +1.9 a +7 mV al encapsular BSA (Sezer, et al., 2011; Xu, et al., 2020) mediante el método de precipitación con sales. Esta variación en el promedio del potencial ζ (± 1 a 7 mV) de las GNPs encapsulando proteínas podría ser consecuencia de las características fisicoquímicas de la proteína encapsulada (carga), del pH y la concentración de sales presentes en el amortiguador utilizado para la determinación de este parámetro (Tabernero, et al., 2017). Es evidente que aunque el potencial ζ obtenido para las GNPs-L y GNPs-LIns es cercano a la neutralidad, clasificándose como nanopartículas inestables, son necesarios los estudios de estabilidad coloidal en almacenamiento con la finalidad de comprobar si existe aglomeración de las partículas en suspensión. Un resumen de las características de las GNPs-L y GNPs-LIns sintetizadas en este trabajo se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Características de las de GNPs-L y GNPs-LIns obtenidas después de 24 h de reacción. La síntesis se hizo con 5.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de enzima, 100 g l^{-1} de sacarosa a 37 °C y 350 rpm. (Desviación estándar obtenida de una $n = 3$).

Característica	GNPs-L	GNPs-LIns	Fuente
Peso molecular (kDa)	>2,300	>2,300	(Raga-Carbajal, et al., 2016)
Diámetro hidrodinámico (nm)	111.9 \pm 0.70	114.6 \pm 0.65	Este trabajo
Intervalo de distribución (nm)	86 - 155	88 - 163	Este trabajo
índice de polidispersión (PDI)	0.05 \pm 0.01	0.08 \pm 0.02	Este trabajo
Potencial Z (mV)	-3.46 \pm 0.78	-4.66 \pm 0.66	Este trabajo

10. PURIFICACIÓN DE GNPs-L Y GNPs-LINS MEDIANTE PRECIPITACIÓN CON SOLVENTES

En la mezcla de reacción de síntesis de GNPs-L y GNPs-LIns se encuentran presentes diferentes elementos como la levana, sacarosa (sustrato residual), glucosa, fructosa (subproductos de reacción) y 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de insulina en el caso de la síntesis de las GNPs-L y GNPs-LIns de los subproductos de reacción, para determinar sus características y propiedades. Para ello, se implementó un método de purificación de los conjugados usando solventes orgánicos (etanol o isopropanol) que permitan precipitar las GNPs-L y GNPs-LIns, y mantener solubles las especies químicas sin interés, como los azúcares remanentes y la insulina no encapsulada.

Como describimos, en la reacción de síntesis de GNPs-L se obtienen aproximadamente 20 g l^{-1} de levana. Para seleccionar la cantidad de solvente necesaria para precipitar esta concentración de levana, se utilizaron 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 volúmenes de etanol absoluto o isopropanol. Las mezclas se incubaron durante 1 h a 4° C y fueron centrifugadas. Se encontró que, para precipitar el 100 % de levana (20 g l^{-1}), se necesitó como mínimo 1 volumen de isopropanol o 1.5 volúmenes de etanol (Figura 10).

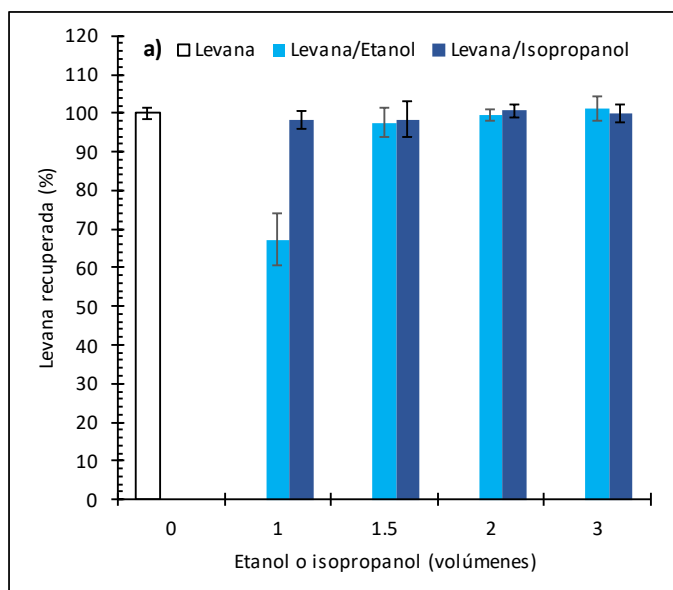


Figura 10. Porcentaje de levana recuperada (20 g l^{-1}), al utilizar diferentes volúmenes de etanol absoluto o isopropanol (0, 1, 1.5, 2 y 3). La precipitación se llevó a cabo durante 1 h a $4 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ y por centrifugación a $15,000 \text{ g}$ durante 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. (Las barras de error representan la desviación estándar con una $n = 3$).

Para seleccionar el mejor solvente en la purificación de las GNP-L y GNP-LIns, estudiamos si el etanol absoluto o isopropanol ocasionan la precipitación de los mono- y disacáridos en suspensión, que son los subproductos de reacción (fructosa, glucosa y sacarosa) (Raga-Carbajal, et al., 2016). Para analizar esto, se utilizaron soluciones estándar de sacarosa 100 g l^{-1} y glucosa/fructosa 100 g l^{-1} , las cuales se mezclaron con diferentes volúmenes de cada solvente (1, 1.5, 2, 2.5 y 3 volúmenes) y se trataron bajo las condiciones previamente descritas. Se tomó el sobrenadante y se evaporó el solvente a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Después de este tratamiento los azúcares recuperados se suspendieron en el mismo volumen de agua y se cuantificaron. En el caso de la sacarosa, se hidrolizó y se cuantificó la concentración de azúcares libres por el método de DNS. Los resultados mostraron que con 1 volumen de isopropanol se precipita hasta un 50 % de sacarosa y un 60% de glucosa/fructosa (Figura 11). En cambio, ninguno de los tres sacáridos se precipitó en presencia de los diferentes volúmenes de etanol analizados. Estos resultados sugieren que el etanol es el mejor solvente para separar los azúcares en la mezcla de reacción de las GNP-L y GNP-LIns, debido a que permite mantener los azúcares residuales solubles para su posterior remoción y a su vez, precipitar la levana presente.

Con base en lo anterior, comprobamos que al producir el glicoconjugado de GNP-LIns es posible separar los sacáridos en suspensión. Sin embargo, es importante contar con un método que permita mantener soluble la insulina no encapsulada, para separarla del glicoconjugado. Por esta razón se estudió la concentración de hormona soluble residual utilizando diferentes concentraciones de insulina ($30, 60, 90$ y $120 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) en presencia de distintos volúmenes de etanol (0, 1.5 y 3 volúmenes). Las mezclas se incubaron a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h, seguido de una centrifugación a $15,000 \text{ g}$ durante 20 min, después de lo cual se separó el sobrenadante, se evaporó el solvente y se cuantificó la concentración de

proteína soluble recuperada. Se observó que 1.5 volúmenes de etanol promueven la precipitación de la insulina cuando esta se encuentra a una concentración de $120 \mu\text{g ml}^{-1}$, permitiendo mantener $90 \mu\text{g ml}^{-1}$ de insulina soluble residual (Figura 12a), mientras que al utilizar una concentración menor o igual a $90 \mu\text{g ml}^{-1}$, la hormona permaneció soluble. Estos resultados sugieren que la precipitación con 1.5 volúmenes de etanol nos permitiría mantener soluble la insulina no encapsulada, mientras a esta misma cantidad de etanol se precipitan las GNPs-LIns.

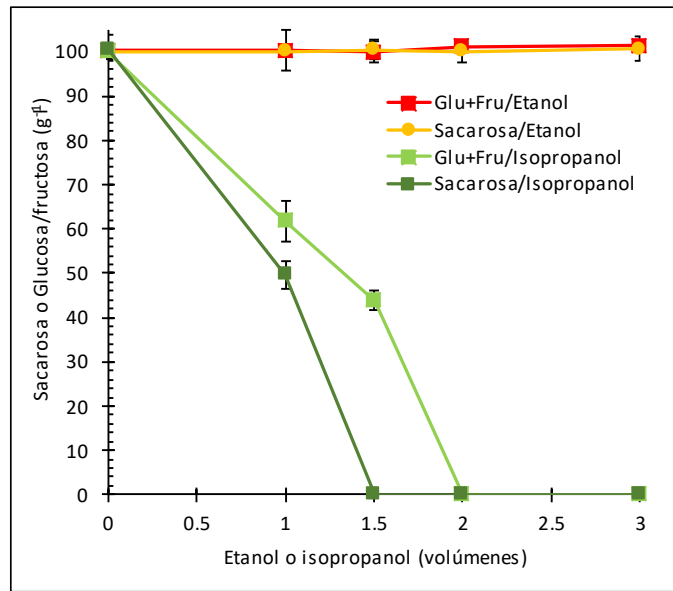


Figura 11. Concentración de sacarosa y glucosa/fructosa, a partir de una solución 100 g l^{-1} , solubles al utilizar diferentes volúmenes de etanol (0, 1, 1.5, 2 y 3). La precipitación se llevó a cabo durante 1 h a $4 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ y por centrifugación a $15,000 \text{ g}$ durante 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. (Las barras de error representan la desviación estándar con una $n = 3$).

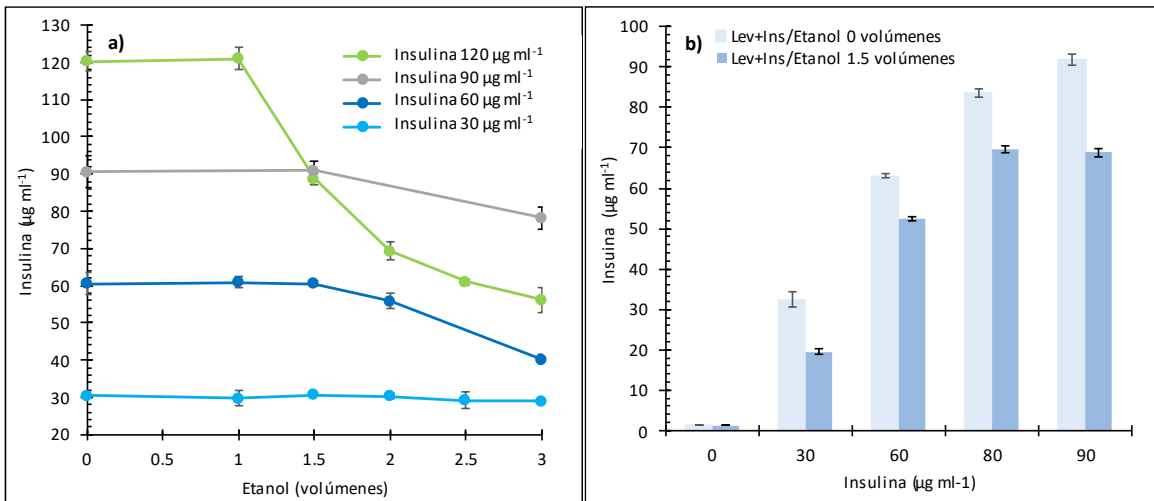


Figura 12. a) Concentración de insulina soluble al utilizar diferentes volúmenes de etanol (0, 1, 1.5, 2,5 y 3). La precipitación se llevó a cabo durante 1 h a $4 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ y por centrifugación a $15,000 \text{ g}$ durante 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Concentración de insulina soluble en presencia y ausencia de levana 20 g l^{-1} a diferentes concentraciones de insulina (30, 60, 80 y 90). La precipitación se llevó a cabo durante 1 h a $4 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ y por centrifugación a $15,000 \text{ g}$ durante 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. (Las barras de error representan la desviación estándar con una $n = 3$).

En la literatura se reporta que la precipitación de los polímeros influye en la precipitación por arrastre de proteínas (Knoll & Hermans, 1983; Valentini, et al., 2015). Para determinar si este fenómeno ocurre en nuestro sistema, se evaluó la precipitación conjunta de diferentes concentraciones de insulina (30, 60, 80 y 90 $\mu\text{g ml}^{-1}$) mezcladas con 20 g l^{-1} de LAPM pura, utilizando 1.5 volúmenes de etanol, bajo las condiciones descritas. Los datos obtenidos mostraron que al precipitar la mezcla insulina/levana, se precipita el 39.6, 16.7, 16.6 y 25 % en las diferentes concentraciones, respectivamente (Figura 12b), lo cual demostró que la presencia del polímero provocó la precipitación de la insulina.

Tomando en cuenta que la LAPM se encuentra nanoestructurada formando GNPs-L, se hipotetiza que la insulina puede asociarse a la nanopartícula de dos formas: 1) mediante el atrapamiento físico de la insulina entre la matriz de levana durante la síntesis enzimática y nanoestructuración del polímero (Figura 13-1), lo cual fue comprobado previamente por Valdez-Echeverría (2021); y 2) mediante la adsorción de la insulina en la superficie de las GNPs-L formadas (Figura 13-2), lo cual podría explicar el arrastre de la insulina al utilizar etanol como agente precipitante de la LAPM mezclada con la hormona. Adicionalmente es posible que durante la purificación de las GNPs-LIns, exista una cantidad de hormona que se arrastra durante la purificación del conjugado al precipitar el complejo. Sin embargo, es importante mencionar que de existir alguna cantidad de insulina atrapada, adsorbida o arrastrada en las GNP-Lns, ésta forma parte del complejo nanopartícula-insulina, por lo cual no es necesario retirarla o distinguirla para continuar con la caracterización de las GNPs-LIns y sus propiedades biológicas. Tomando en cuenta este hecho, en los siguientes apartados la insulina encapsulada será el conjunto de proteína atrapada, adsorbida y arrastrada.

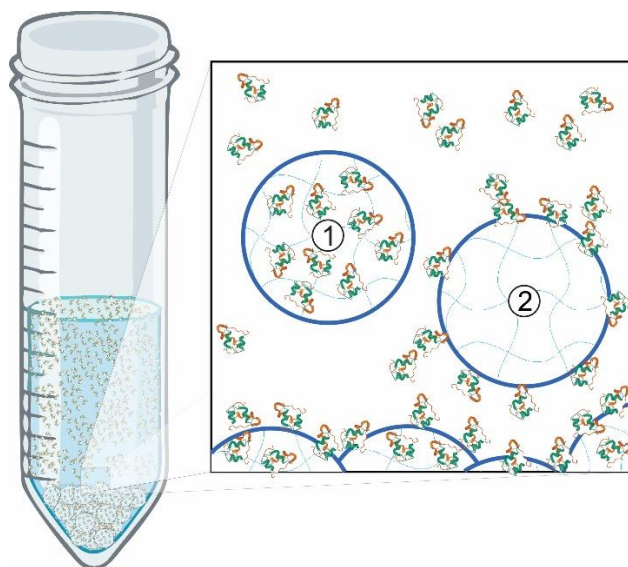


Figura 13. Modelo de la encapsulación de insulina durante la síntesis de las GNPs-LIns. 1) Atrapamiento físico, 2) adsorción.

Se comprobó que 1.5 volúmenes de etanol permitieron: 1) precipitar diferentes concentraciones de levana (5 a 30 g l^{-1}); 2) eliminar los subproductos de reacción como la sacarosa, glucosa y fructosa; y 3) retirar la insulina soluble (no encapsulada) al utilizar una

máxima concentración de $90 \mu\text{g ml}^{-1}$. En conjunto, los resultados nos permitieron proponer utilizar 1.5 volúmenes de etanol como la mejor opción para la precipitación de las GNPs-L y la purificación de las GNPs-LIns. El protocolo desarrollado para la purificación con etanol de las GNPs-LIns (PE/GNPs-LIns) se incluye en el Anexo 7. La Figura 14 muestra un esquema que resume los pasos de síntesis y purificación de las GNPs-L y GNPs-LIns.

Producción y purificación de Gliconanopartículas de Levana (GNPs-L) y conjugado Levana-Insulina (GNPs-LIns)

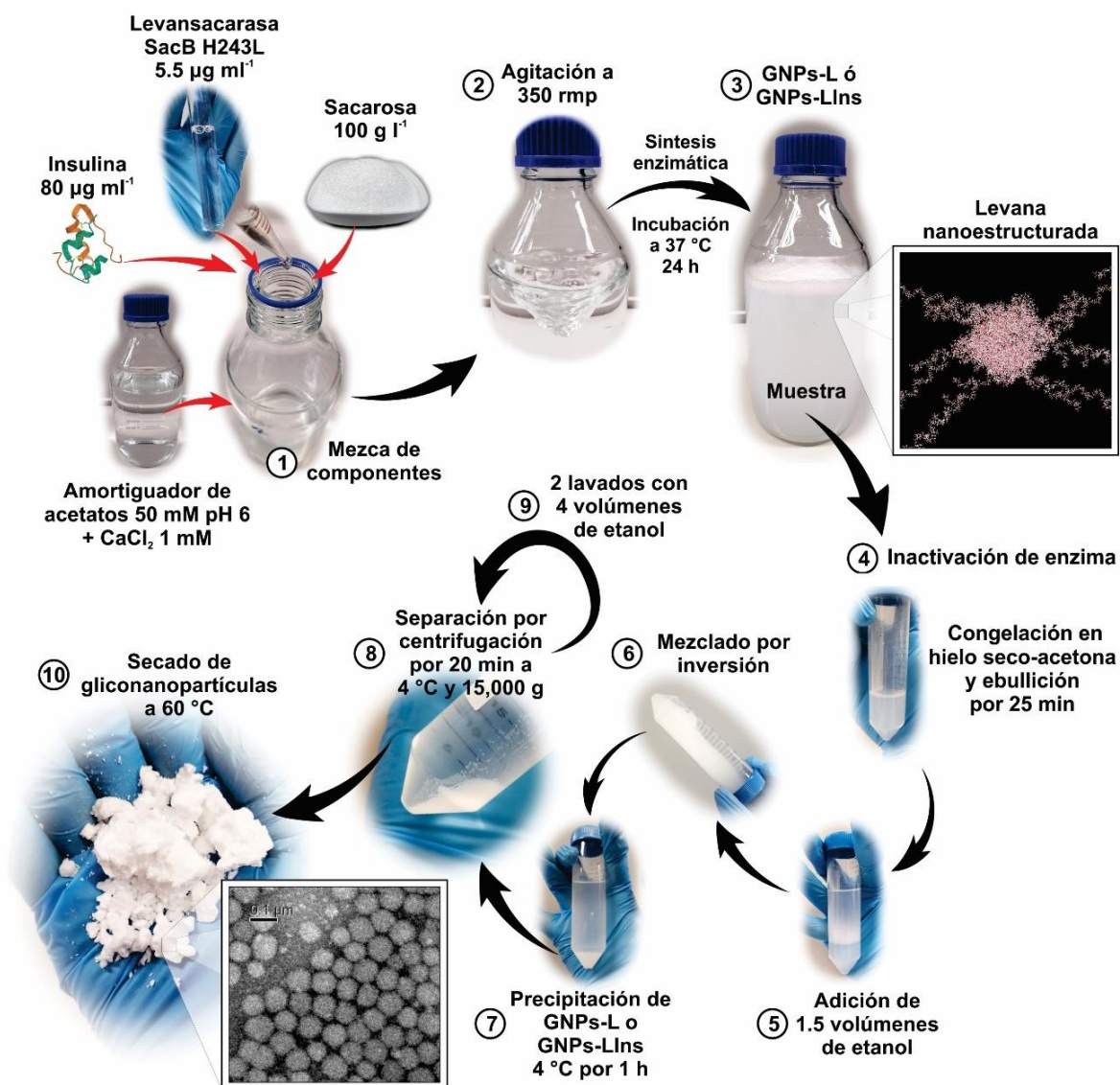


Figura 14. Producción y purificación de las gliconanopartículas de levana (GNPs-L) y del glicoconjugado de levana-insulina (GNPs-LIns).

11. DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN (EE) DE LAS GNPs-LINS

Con el objetivo de determinar la eficiencia de encapsulación (EE), la cual es la cantidad del principio activo encapsulado del total del principio activo agregado al inicio de la reacción

de encapsulación, se realizó la síntesis de GNPs-LIns con diferentes concentraciones de insulina (30, 60, 80 y 90 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Las GNPs-LIns producidas se purificaron utilizando el método PE/GNPs-LIns. Se cuantificó la cantidad de proteína libre y se calculó la EE como el cociente de la diferencia de proteína inicial y la proteína soluble, entre la proteína inicial en la reacción. Los resultados obtenidos mostraron que la EE para las diferentes concentraciones de insulina (30, 60, 80 y 90 $\mu\text{g ml}^{-1}$) fue de 49.6, 61.4, 63.6 y 62.3%, respectivamente (Figura 15), sugiriendo que con respecto a la EE se alcanzó un límite de encapsulación de proteína, el cual es de un 60 %. Previamente, Valdez-Echeverría (2021) había reportado una EE del 60 % al utilizar 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de insulina, la cual es 10 % mayor a la obtenida en este trabajo (49.6 %) utilizando la misma concentración de insulina. Sin embargo, existen diferencias notables entre los métodos de determinación de la EE, ya que este autor determinó la concentración de insulina libre en la mezcla de reacción, sin llevar a cabo un proceso de purificación del conjugado debido a la falta de un método de purificación de las GNPs-LIns, en cambio en nuestro trabajo implementamos este método para la determinación de la EE. Además, es importante resaltar que Valdez-Echeverría (2021) utilizó una solución de insulina comercial que sometió a un proceso de purificación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a diferencia de la insulina utilizada en nuestro trabajo, la cual solo se solubilizó en una solución de HCl 10 mM para su uso.

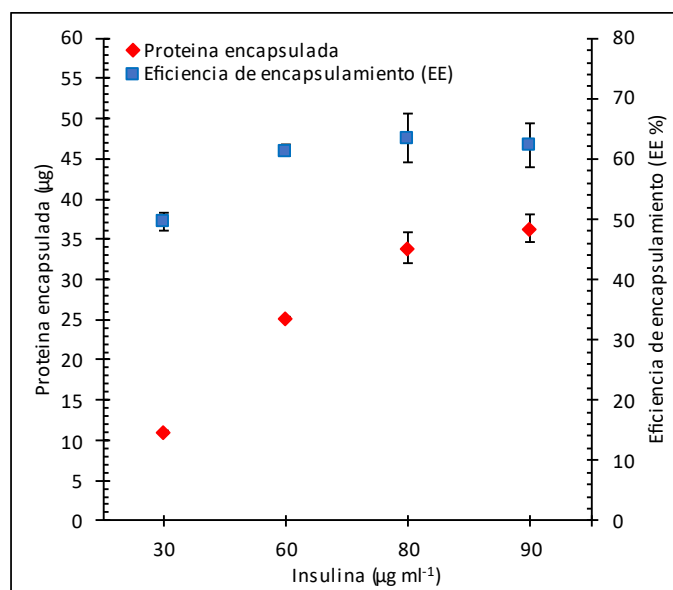


Figura 15. Eficiencia de encapsulación (EE) de las GNPs-LIns después de 24 h de incubación al utilizar distintas concentraciones de insulina (30, 60, 80 y 90 $\mu\text{g ml}^{-1}$) durante la síntesis. La purificación del gliconanoconjugado se llevó a cabo durante 1 h a 4 ± 0.5 °C y por centrifugación a 15,000 g durante 20 min a 4 °C. (Las barras de error representan la desviación estándar con una $n = 3$).

Jain, et al. (2008) propusieron la producción de GNPs mediante la formación de hidrogeles por reducción química y su posterior fragmentación por sonicación. Sin embargo, estos autores no reportan una EE, ya que dan por hecho que existe un 100 % de encapsulación de la hormona dentro de la matriz de polímero. En contraste, otros sistemas de encapsulación con polisacáridos cargados como el de quitosano-insulina, han reportado EE

cercanas al 100 %, con un 92.5 ± 4.5 (Fernández-Urrusuno, et al., 1999), 81.0 ± 5.6 (Grenha, et al., 2005), 83.0 ± 8.5 (Al-Qadi, et al., 2012) y 97.2 ± 2.2 (Ribeiro, et al., 2020). La alta EE obtenida con este polisacárido se atribuye a las características químicas del quitosano, ya que presenta un grupo funcional amino que le confiere una fuerte atracción electrostática por moléculas con carga negativa bajo las condiciones de síntesis del conjugado (Ribeiro, et al., 2020). Este efecto no ocurre en los polisacáridos neutros debido a la ausencia de grupos funcionales con carga formal que atraigan a la molécula cargo, por lo cual se propone que la encapsulación se lleva a cabo mediante el atrapamiento físico de la molécula de interés entre las cadenas de polímero y la adsorción del compuesto en la nanopartícula, explicando la baja EE obtenida (Valdez-Echeverría, 2021).

Al analizar la cantidad de proteína encapsulada en las GNPs-LIns, esta equivale a $10.91 \pm 0.22 \mu\text{g}$ ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$), $25.23 \pm 0.12 \mu\text{g}$ ($60 \mu\text{g ml}^{-1}$), $33.93 \pm 1.85 \mu\text{g}$ ($80 \mu\text{g ml}^{-1}$) y $36.37 \pm 1.65 \mu\text{g}$ ($90 \mu\text{g ml}^{-1}$) de proteína. Es evidente que el límite de encapsulación se alcanzó entre los 33 y 36 μg al utilizar insulina 80 y 90 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Figura 15). Este dato no había sido reportado para este sistema, ni ha sido reportado para otros gliconanoconjugados.

12. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CARGA (CC) DE LAS GNPs-LINS

La capacidad de carga (CC) es la cantidad del principio activo encapsulado por mg de GNPs-LIns, para determinar la CC de las GNPs-LIns es necesario cuantificar la cantidad de levana en las reacciones de encapsulación con diferentes concentraciones de insulina ($30, 60, 80$ y $90 \mu\text{g ml}^{-1}$). La cuantificación del polímero se hizo siguiendo el método HA/DNS. La concentración y cantidad de levana producida fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) al comparar las distintas reacciones de síntesis de GNPs-LIns con 30 a $90 \mu\text{g ml}^{-1}$ de insulina, contra la reacción de síntesis de GNPs-L. En cambio, la producción de polímero no se vio afectada por el incremento de la concentración de insulina en la reacción, ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Los resultados de la cuantificación de levana producida durante la síntesis de GNPs-L y GNPs-LIns se muestran en la Tabla 5. Para el cálculo de la cantidad total de levana obtenida se tomó en cuenta el volumen de la reacción de encapsulación (0.6 ml).

Tabla 5. Concentración y cantidad de levana producidos después de 24 h de la síntesis de las gliconopartículas de levana (GNPs-L) y levana insulina (GNPs-LIns) utilizando diferentes concentraciones de insulina $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ en la reacción durante la síntesis enzimática. La cuantificación de polímero se hizo mediante el método de hidrólisis ácida acoplado con DNS (HA/DNS). Las condiciones de reacción fueron: volumen de 0.6 ml , $5.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de enzima, 100 g l^{-1} de sacarosa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y 350 rpm . (desviación estándar $n = 3$).

	Insulina inicial ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Concentración de levana (g l^{-1})	Cantidad de levana (mg)
GNPs-L	-	22.77 ± 0.08	13.65 ± 0.05
	30	$18.27 \pm 0.45^*$	$10.96 \pm 0.31^*$
GNPs-LIns	60	$17.74 \pm 0.27^*$	$10.64 \pm 0.19^*$
	80	$17.39 \pm 0.28^*$	$10.43 \pm 0.19^*$
	90	$17.75 \pm 0.06^*$	$10.65 \pm 0.04^*$

La desviación estándar se obtuvo de una $n = 3$. La prueba Tukey mostró diferencias significativas en la producción de levana durante la síntesis de GNPs-LIns ($p < 0.05$) con respecto a la síntesis de GNPs-L (*).

Conociendo los datos de proteína encapsulada y la cantidad de levana en la reacción, se calculó la CC para cada concentración de insulina utilizada. En la Figura 16, se muestra la

CC obtenida al utilizar diferentes concentraciones de insulina (30, 60, 80 y 90 $\mu\text{g ml}^{-1}$), la cual fue de 0.99 ± 0.02 , 2.36 ± 0.05 , 3.24 ± 0.23 y 3.40 ± 0.16 μg de proteína / mg de GNPs-LIns, respectivamente. Los análisis estadísticos mostraron que existen diferencias significativas entre la CC obtenida en presencia de las distintas concentraciones de insulina utilizadas, con excepción de las concentraciones de 80 y 90 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que existe un límite de encapsulación de insulina en las GNPs-LIns, el cual es de 3.22 μg de proteína / mg de GNPs-LIns al utilizar las concentraciones de 80 y 90 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de insulina durante la síntesis enzimática, al menos bajo estas condiciones. La CC obtenida en este estudio al utilizar 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de insulina fue 47 % menor al valor estimado por Valdez-Echeverría (2021), el cual fue de 1.85 ± 0.25 μg de proteína / mg de GNPs-LIns.

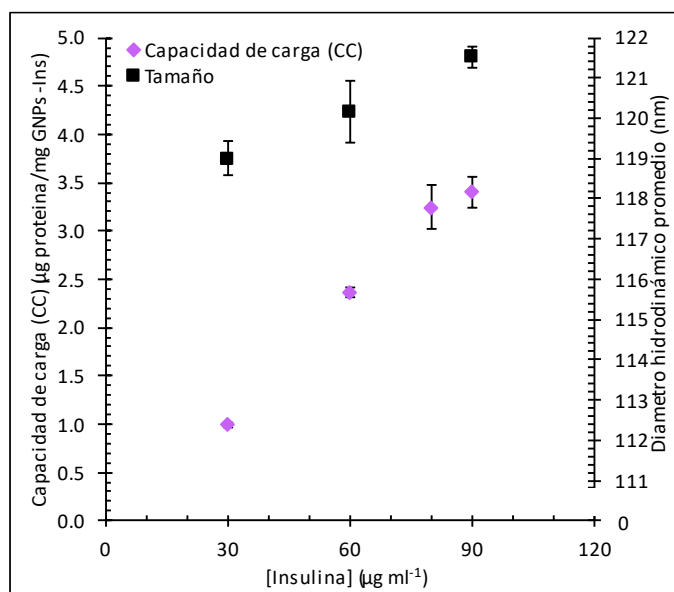


Figura 16. Diámetro hidrodinámico y capacidad de carga (CC) de proteína encapsulada sin purificación y con purificación de las GNPs-LIns con 1.5 volúmenes de etanol, producidas después de 24 h de incubación al utilizar distintas concentraciones de insulina (30, 60 y 90 $\mu\text{g ml}^{-1}$) durante la síntesis. La precipitación se llevó a cabo durante 1 h a 4 ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$ y por centrifugación a 15,000 g durante 20 min a 4 $^{\circ}\text{C}$. (Las barras de error representan la desviación estándar con una $n = 3$).

Al comparar nuestro conjugado con uno de almidón-insulina con una CC 3.0 μg de proteína por mg de complejo (Jain, et al., 2008), podemos ver que las GNPs-LIns presentan una CC ligeramente mayor. Sin embargo, estos autores no reportan un método cuantitativo para la determinación de la CC y reportan un valor teórico con base en las condiciones de síntesis del conjugado. En cambio, gliconanoconjugados como el de quitosano-insulina muestran una CC muy superior a la observada en las GNPs-LIns, siendo de 550 ± 0.04 (Fernández-Urrusuno, et al., 1999), 298 ± 0.01 (Grenha, et al., 2005), 370 ± 0.04 (Al-Qadi, et al., 2012) y 89 ± 2.32 (Ribeiro, et al., 2020) μg de proteína por mg de complejo, atribuyendo este resultado a la carga que posee el polímero y el efecto de la misma en la interacción de la insulina con el polímero bajo las condiciones de reacción de síntesis. En resumen, se obtuvo un conjugado de GNPs-LIns con una CC de 3.2 μg de proteína / mg de GNPs-LIns al utilizar insulina en una concentración de 80 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Aunque la CC de las GNPs-LIns difiere significativamente con respecto a la de otros conjugados utilizando distintos polisacáridos,

es importante contemplar la aplicación biológica del conjugado para determinar si la CC obtenida es suficiente para observar las respuestas esperadas y en caso de nuestro estudio si las GNPs-LIns presentan una relación de insulina/levana que permita aplicar la cantidad necesaria de ambos compuestos.

Acorde a lo anterior, al comparar únicamente el diámetro hidrodinámico promedio de las GNPs-LIns se observó un incremento al aumentar concentración de insulina en la reacción: 119.0 ± 0.43 , 120.2 ± 0.77 y 121.5 ± 0.26 nm para las concentraciones de insulina 30, 60 y $90 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente (Figura 16). Esta observación se observó en diferentes sistemas de encapsulación de biomoléculas de interés al analizar únicamente el diámetro promedio (Xu, et al., 2020; Valdez-Echeverría, 2021; Sezer, et al., 2011; Al-Qadi, et al., 2012). Este resultado, en conjunto con el incremento en la CC sugieren la hipótesis de que el aumento en el diámetro promedio de las GNPs se podría deber a un incremento en el atrapamiento físico, ya que la proteína cargo podrá ocasionar un impedimento físico entre las cadenas de levana durante la nanoestructuración, mientras que la proteína adsorbida podría incrementar el diámetro mediante la formación de una capa proteica superficial. Sin embargo, al tomar en cuenta en los análisis la distribución poblacional de las GNPs-LIns, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) (Anexo 6).

13. ANÁLISIS DE LA CC Y APLICACIÓN BIOLÓGICA DE LAS GNPs-LINS

Para poder continuar con la aplicación biológica del gliconanoconjugado, es importante contar con un sistema que contenga los dos principios activos (levana e insulina) en sus dosis adecuadas para promover la proliferación y migración celular al usar ambos compuestos y observar el efecto antiinflamatorio de las GNPs-L en un modelo biológico. En este sentido, Valdez-Echeverría (2021) determinó que la dosis necesaria de GNPs-L para observar una respuesta antiinflamatoria en presencia de un agente proinflamatorio como el LPS, es de 5 mg ml^{-1} , dosis que demostró la promoción de la proliferación celular bajo condiciones normales y de hiperglucemia inducida. En cuanto al uso de insulina en la promoción de la cicatrización, se reportó la aplicación de diferentes dosis del principio activo, las cuales se encuentran entre los 0.03 y 5 U (Negri, et al., 2017; Chen, et al., 2012), reportando resultados similares en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*.

Con el objetivo de determinar si nuestro sistema de encapsulación de GNPs-LIns contiene las cantidades reportadas de GNPs-L e insulina para observar las respuestas biológicas esperadas, nos dimos a la tarea de analizar los resultados sobre la encapsulación de insulina en las GNPs-LIns. Para esto, elegimos las GNPs-LIns producidas con insulina $80 \mu\text{g ml}^{-1}$ durante la síntesis enzimática de las GNPs-LIns, las cuales tienen una CC de $3.24 \mu\text{g}$ de proteína / mg de GNPs-LIns. De esta forma, sabiendo que:

$$35 \mu\text{g de insulina} = 1 \text{ U} ,$$

se calcularon las U presentes por mg de GNPs-LIns:

$$3.24 \frac{\mu\text{g de insulina}}{\text{mg de GNPs} \cdot \text{LIns}} = 0.092 \frac{\text{U}}{\text{mg de GNPs} \cdot \text{LIns}} ,$$

por lo cual se determinó que hay 0.092 U de insulina por mg de GNPs-LIns. Previamente se mencionó que se requieren 5 mg de GNPs-L para observar las respuestas biológicas deseadas, por lo cual se calcularon las U de insulina presentes en 5 mg de GNPs-LIns, obteniendo que:

$$\left(0.092 \frac{U \text{ de insulina}}{mg \text{ de GNPs} \cdot LIns}\right) (5 \text{ mg de GNPs} \cdot LIns) = 0.46 U \text{ de insulina total}$$

Con este resultado determinamos que en 5 mg de conjugado hay 0.46 U de insulina, cantidades suficientes para obtener las respuestas biológicas esperadas. En conclusión, la cantidad de U de insulina y de mg de levana son suficientes para observar una respuesta biológica, quedando abierta la posibilidad de utilizar concentraciones mayores de GNPs-LIns como 10, 15 y 20 mg ml⁻¹, que corresponden a 0.92, 1.38 y 1.85 U de insulina al utilizar este conjugado para estudiar su efecto en la promoción de la proliferación y migración celular, la regulación de la respuesta inflamatoria y por tanto el cierre de una herida en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Conclusiones

Este trabajo aportó información relevante sobre el efecto de la adición de insulina en la producción de nanopartículas durante la reacción de síntesis del nanoconjugado de GNPs-LIns. Se observó la reducción de aproximadamente el 5% de la levana sintetizada cuando la insulina está presente en la reacción de síntesis del polímero. Por otro lado, las GNPs-L y GNPs-LIns reducen su diámetro en un 24 % después de 24 h de reacción de síntesis de nanopartículas, probablemente debido a la compactación del polímero durante la formación de las nanopartículas, sin afectar la dispersión y carga superficial.

Adicionalmente, se implementó un método de purificación de las GNP-Ls y GNPs-LIns basado en la precipitación con 1.5 volúmenes de etanol, logrando la recuperación de más del 97 % de las nanopartículas producidas, sin precipitación de insulina, ni subproductos de la reacción como mono- y disacáridos.

Los resultados obtenidos permitieron determinar que $33.93 \pm 1.85 \mu\text{g}$ es la máxima cantidad de insulina que puede ser encapsulada en las GNPs-L. Además, se comprobó que la EE máxima de las GNPs-LIns es de aproximadamente el 63 % al utilizar de 60 a $90 \mu\text{g ml}^{-1}$ de insulina para la síntesis del conjugado. Con base en lo anterior, se determinó que el conjugado tiene una CC de $3.24 \mu\text{g}$ de proteína / mg de GNPs-LIns, la cual equivale a aproximadamente 0.5 U de insulina por cada 5 mg de levana, CC suficiente para mostrar un efecto en la promoción de la proliferación y migración celular, la regulación de la respuesta inflamatoria y por tanto el cierre de una herida en modelos *in vitro* e *in vivo*. Con base en estos resultados, aceptamos la hipótesis de este trabajo y proponemos el uso de este conjugado en ensayos biológicos que permitan demostrar su uso como tratamiento para el cierre de heridas crónicas.

Perspectivas

Corroborar el efecto de la adición de la solución de HCl 10 mM durante la reacción de síntesis de GNPs-LIns.

Optimizar el método de purificación de GNPs-L y GNP-LIns mediante las siguientes modificaciones:

- 1) Eliminar el tiempo de incubación (1 h) para la precipitación de las nanopartículas
- 2) Reducir el tiempo (20 min) de centrifugación para la recuperación de las nanopartículas precipitadas.
- 3) Reducir la cantidad de etanol absoluto utilizado (8 volúmenes) para el lavado de las GNPs-L recuperadas.
- 4) Reducir el tiempo de hidrólisis del polímero (2:20 min), utilizando una mayor concentración de HCl (> 617 M) y/o elevando la temperatura de incubación (60 °C) a un máximo de 70 °C.

Prospectivas

Caracterizar la cinética de liberación de insulina de las GNPs-LIns a lo largo del tiempo, bajo las condiciones fisiológicas de una piel sana (PBS pH 7.4, 37 °C y en agitación constante) y de una herida crónica (PBS pH 8.1 - 8.3, 37 °C y en agitación constante).

Demostrar la protección que confiere el sistema de encapsulación de GNPs-L a la insulina contra la proteólisis enzimática en las GNPs-LIns, utilizando quimotripsina para la degradación de la insulina libre, seguido del uso de una endolevanasa para la liberación de la proteína encapsulada y finalmente la visualización de la insulina remanente por electroforesis.

Determinar la estabilidad coloidal de las GNP-Ls y GNP-LIns en almacenamiento prolongado (60 días) a diferentes temperaturas (4, 25 y 37 °C) determinando el tamaño promedio, el IPD y el potencial Z de las GNP-LIns.

Demostrar que la insulina mantiene su actividad después del proceso de síntesis y purificación de las GNPs-LIns. Esto se puede lograr mediante el uso de controles necesarios de insulina sola, tratada bajo las mismas condiciones de síntesis y purificación de polímero, utilizando una mayor concentración de etanol para la precipitación de la hormona durante la purificación. Con la finalidad de emplear la insulina obtenida en los ensayos posteriores. De no observarse la respuesta deseada al utilizar esta insulina y compararla con un control de insulina sin tratamiento, se sugeriría la inactivación de la hormona durante el proceso de síntesis del conjugado.

Probar el efecto de las GNPs-LIns *in vitro* en cultivos celulares normo- e hiperglucémicos (macrófagos, queratinocitos y fibroblastos) para la promoción de la proliferación y migración celular, utilizando diferentes concentraciones de GNPs-LIns (5, 10, 15, 20 mg ml⁻¹). La proliferación celular podría analizarse mediante la determinación de la viabilidad y el conteo de células. Mientras que la migración celular se podría estudiar mediante ensayos de rasguño en monocapa, determinando el porcentaje y tasa de cierre del rasguño, mediante análisis de imagen.

Caracterizar el efecto de las GNPs-LIns en la respuesta inflamatoria *in vitro* en cultivos celulares normo- e hiperglucémicos, utilizando algunos de los modelos biológicos con mayor actividad durante la respuesta inflamatoria (macrófagos y células mononucleares periféricas), mediante la determinación del perfil de liberación de citocinas y factores de crecimiento pro- (ejemplo: IL-1 β , IL-6 y TNF- α), antiinflamatorios (IL-10, TGF- β y VEGF).

Estudiar el efecto de las GNPs-LIns en el cierre de heridas a diferentes tiempos de tratamiento (3, 6, 12, 15 y 18 días) en modelos murinos sanos y con diabetes inducida. En este estudio se podrían validar las respuestas observadas *in vitro* en la regulación de la respuesta inflamatoria y promoción de la proliferación y migración celular. Se podría determinar si el perfil de factores pro- y antiinflamatorios expresados depende del tiempo de tratamiento y de la fase de cicatrización, este análisis determinará si las GNP-Ls y GNPs-

Llms modulan esta respuesta de diferente forma en los diferentes estadios de la cicatrización. Los análisis propuestos podrían ser estudios histológicos inmunohistoquímicos para la detección de los diferentes tipos celulares implicados en la regeneración del tejido (macrófagos, fibroblastos y células endoteliales), combinado con análisis de imagen para determinar el grado de reepitelización, neovascularización y del cierre de la herida. De igual forma, para analizar los niveles de expresión de citocinas y factores de crecimiento pro- y antiinflamatorios durante el proceso de cierre de la herida se podrían llevar a cabo análisis de Western-Blot o q-PCR.

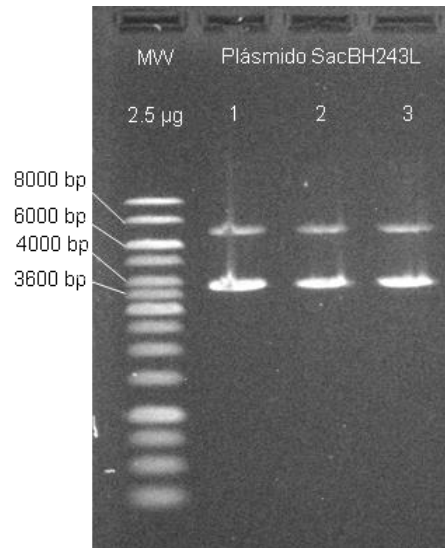
Anexos

Anexo 1. Resumen de diferentes trabajos en los que se reporta el uso de insulina como tratamiento en la cicatrización de heridas agudas y crónicas en modelos animales sanos y con diabetes inducida (modificado de Wang & Xu, 2020).

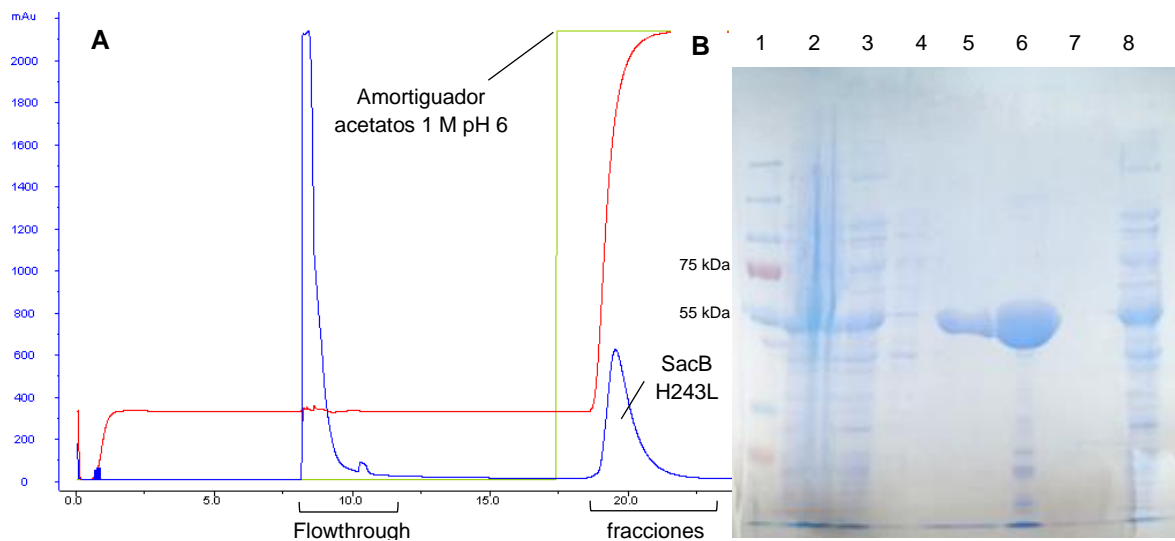
Tipo de herida	Modelo de estudio	Forma de insulina	Dosis (U diarias)	Ruta de aplicación	Tiempo o % de cierre de herida (insulina / control)	Tiempo de observación	Resultado al aplicar insulina en herida	Referencia
Herida inducida en piel	Conejo	Insulina humana de larga duración. Suspensión con Zinc	0.25 U	Inyección local subcutánea	11.2 ± 2.3 / 15.1 ± 4.1 días	Día 0 a 12	Acelera el cierre de la herida sin mostrar problemas de hipoglucemia.	(Zhang, et al., 2007)
Abrasión corneal diabética	Ratas Sprague-Dawley	Solución de insulina bovina	1, 2 y 5 U de insulina, 4 veces al día por 7 días	Tópica	-	A las 16, 24, 40 h y 14 días después del daño	Reducción de tamaño de la herida, promoviendo la re-epitelización.	(Zagon, et al., 2007)
Herida cutánea diabética y no diabética	Ratas Sprague-Dawley	Insulina humana regular	20 µl, dos veces al día por 15 días (no se conocen las unidades totales)	Tópica	Sin diabetes y con diabetes 8 / 11.5 días	Al día 15 post herida	Aceleración del cierre de herida en ratas con y sin diabetes.	(Apikoglu-Rabus, et al., 2010)
Herida de segunda intención	Tortuga (<i>Trachemys scripta elegans</i>)	Insulina porcina diluida en glicerol	5 U, diario por 7 días	Tópica	33.85 ± 13.89 / 8.59 ± 19.42 % a los 28 días	A los días 2, 7, 14, 21 y 28	Promoción del cierre de la herida e incremento de la presencia de heterófilos (día 7), macrófagos (días 2, 7 and 14) y fibroblastos (días 14 y 21), y reducir el número de linfocitos (21 días)	(Negrini, et al., 2017)
Herida de escisión	Ratones C57BL/6J	Insulina bovina	0.03 U, diario por 7 días	Tópica	7.8 ± 0.4 / 9 ± 0.63 días	A los días 1, 2, 3, 5 y 7	Promoción de re-epitelización y remodelación de colágeno. Incremento en la migración de macrófagos e interleucinas proinflamatorias.	(Chen, et al., 2012)
Herida de escisión diabética	Ratas Wistar	Crema con insulina humana regular	0.5 U/100 g, diario por 16 días (no se conocen las unidades totales)	Tópica	8 / 16 días	A los días 4, 8 y 16	Reducción de tiempo de cierre de la herida en ratas diabéticas	(Lima, et al., 2012)
Quemadura diabética	Ratas Wistar	Crema con insulina humana regular	0.35 g de crema con insulina 0.5 U/100 g (0.00175 U totales), diario por 26 días	Tópica	14 / 26 días	A los días 7, 14 y 26	Promoción de cierre de heridas y re-epitelización. Decremento de la infiltración de células inflamatorias e incremento de deposición de colágeno en ratas diabéticas.	(Azevedo, et al., 2016)

Anexo 2. Resumen de diferentes trabajos en los que se reporta el uso de nanoglicoconjugados con insulina como tratamiento en la cicatrización de heridas agudas y crónicas en modelos animales sanos y con diabetes inducida (modificado de Wang & Xu, 2020).

Tipo de herida	Modelo de estudio	Tipo de nanoconjugado	Dosis (U diarias)	Ruta de aplicación	Tiempo y/o % de cierre de herida (NP-insulina / control)	Tiempo de observación	Resultado al aplicar complejo con insulina	Referencia
Herida diabética de grosor completo	Ratas Sprague-Dawley	Hidrogel con insulina	0.5 ml, diarios por 18 días (no se conocen las unidades totales)	Tópica	>95 / > 85 % después de 18 días	A los días 6, 12 y 18	Promoción de neovascularización, deposición de colágeno y cierre de la herida.	(Zhao, et al., 2020)
Herida de escisión de espesor total	Ratas SD	Hidrogel de queratina conjugado con insulina	0.1 U ml ⁻¹ Una sola aplicación con liberación prolongada.	Tópica	>95 / > 70 % después de 14 días	A los días 7, 14 y 21	Promoción de cierre de herida por estimulación de la re-epitelización de la epidermis y la mejora en la calidad de la piel nueva.	(Li, et al., 2019)
Herida de escisión en piel	Ratas Wistar	Insulina humana recombinante acomplejada con ciclodextrinas	50 U, diarias por 14 días	Tópica	14 / >14 días	A los días 4, 7, 10 y 14	Estimulación de re-epitelización, neovascularización, alza en la deposición de colágeno y mejora de la humectación de la herida.	(Besson, et al., 2017)
Herida de escisión en piel diabética	Ratas Sprague-Dawley	Nanopartículas de PLGA con insulina humana recombinante	5.2 x 10 ⁻³ µM (8.62x10 ⁻⁴ U) Una sola aplicación con liberación prolongada.	Tópica	15 / >16 días 100 % / 80 % después de 16 días	A los días 12 y 16	Incremento en angiogénesis, granulación y reconstrucción completa de la epidermis.	(Abdelkader, et al., 2016)
Herida de escisión de espesor total	Ratas Wistar	Nanopartículas de quitosano con insulina	Unidades totales no determinadas. Una sola aplicación con liberación prolongada.	Tópica	14 / >14 días 96.90 ± 1.11 / 45.70 ± 4.06 %	A los días 7 y 14	Aceleración de cierre de herida con incremento en la re-epitelización por migración celular.	(Ehterami, et al., 2018)
Herida de escisión de espesor total en piel sana y diabética	Ratas Wistar	Nanopartículas de plata con insulina recombinante humana	50 µl de complejo (no se conocen las unidades totales). Una sola aplicación con liberación prolongada.	Tópica	Sin diabetes 13 / 19 días Con diabetes 15 / 19 días	A los días 5, 11 y 19	Promoción de remodelación de la herida mediante la modulación del balance de las citocinas inflamatorias.	(Kaur, et al., 2019)
Herida de escisión de espesor total en piel sana y diabética	Ratas Sprague-Dawley	Andamio de nanofibras de PLGA con insulina	98.4 U Una sola aplicación con liberación prolongada.	Tópica	92.9 ± 0.4 / 78.5 ± 0.3 % después de 14 días	A los días 3, 7 y 14	Promoción de la re-epitelización, infiltración de queratinocitos y deposición de colágeno tipo I.	(Lee, et al., 2020)
Herida de escisión en piel diabética	Ratas Wistar	Nanopartículas de quitosano con insulina	100 µl de crema con insulina 0.74 U ml ⁻¹ (0.0050.007 U totales), diario por 14 días	Tópica	14 / 14 días	A los días 3, 7 y 14	Estimulación de angiogénesis y proliferación celular, sin encontrar diferencias al utilizar nanopartículas de quitosano y quitosano-insulina.	(Ribeiro, et al., 2020)



Anexo 3. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% con la construcción pET22b+: SacB H243L. En cada carril se usaron 150 ng de plásmido.

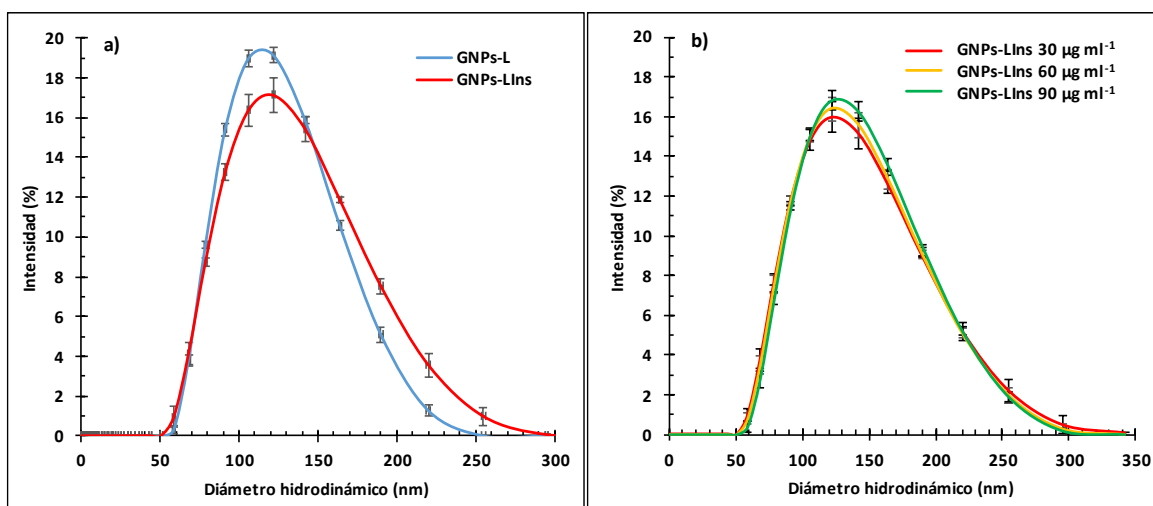


Anexo 4. Cromatograma de la purificación de SacB H243L mediante cromatografía de intercambio catiónico. A) La enzima eluyó a una concentración de amortiguador de acetatos 1 M pH 6. B) SDS-Page de poliacrilamida 10%: 1) marcador de peso molecular, 2) botón, 3) extracto, 4) flow through, 5) fracción 3, 6) enzima concentrada, 7) ultrafiltrado y 8) recirculado. Cada pozo contiene 10 µl de muestra. Se observó la presencia de una banda sobre expresada de aproximadamente 55 kDa en los diferentes pasos de purificación.

Anexo 5. Tabla de purificación de la mutante SacB H243L. La actividad de la enzima se tomó bajo las siguientes condiciones de reacción: amortiguador de acetatos 50 mM + CaCl₂ 1 mM, 100 g l⁻¹ de sacarosa, 37 °C, 350 rpm, durante 10 min.

Paso	Actividad volumétrica (U ml ⁻¹)	Proteína Total (mg)	Actividad total (U)	Actividad Específica (U mg ⁻¹)	Rendimiento (%)	Factor de Purificación (%)
Pellet	153.0 ± 7.29	24.5 ± 1.89	1530.0 ± 72.92	62.37 ± 1.86	-	-
Sonicado	131.0 ± 6.27	89.0 ± 9.34	3931.7 ± 188.24	44.17 ± 2.57	-	-
Extracto	112.5 ± 2.35	58.0 ± 2.68	3264.0 ± 68.38	56.20 ± 3.79	100	1.0
Recirculado	10.0 ± 0.06	21.4 ± 0.35	291.3 ± 2.01	13.57 ± 0.13	8.92	0.2
Flow through	3.1 ± 0.08	7.1 ± 0.08	62.6 ± 1.72	8.76 ± 0.14	1.92	0.2
Fracción 1	15.3 ± 0.03	4.1 ± 0.07	78.1 ± 0.16	19.10 ± 0.30	2.39	0.3
Fracción 2	200.8 ± 3.64	10.2 ± 0.53	1004.0 ± 18.23	97.92 ± 3.32	30.76	1.7
Fracción 3	49.7 ± 1.96	3.8 ± 0.28	248.9 ± 9.85	64.79 ± 2.13	7.63	1.2
Fracción 4	21.5 ± 1.31	1.4 ± 0.16	107.6 ± 6.59	73.66 ± 3.87	3.30	1.3
Fracción 5	13.7 ± 0.35	1.9 ± 0.23	68.8 ± 1.75	35.22 ± 3.41	2.11	0.6
Fracción 6	15.3 ± 0.76	1.3 ± 0.07	76.9 ± 3.84	59.05 ± 0.32	2.36	1.1
Fracción 7	3.3 ± 0.09	0.4 ± 0.02	17.4 ± 0.50	41.28 ± 3.50	0.53	0.7
Enzima concentrada	1049.9 ± 16.30	5.0 ± 0.01	839.9 ± 13.04	167.15 ± 2.96	25.73	3.0

* Enzima purificada de un pellet de 955.5 mg, proveniente de 250 ml de cultivo bacteriano *E. coli* BL21 (DE3) transformado con la construcción pET22b+: SacBH234L. Se obtuvo un concentrado de 6.3 mg ml⁻¹ a partir de un botón celular de 955.5 mg.



Anexo 6. Comparación de la distribución del diámetro hidrodinámico de las GNP-L y GNP-LIns: a) GNP-L y GNP-LIns producidas utilizando 30 µg ml⁻¹ de insulina; b) GNP-LIns producidas utilizando 30, 60 y 90 µg ml⁻¹ de insulina. La síntesis se hizo durante 24 h utilizando 5.5 µg ml⁻¹ de enzima, 100 g l⁻¹ de sacarosa a 37 °C y 350 rpm. (Las barras de error representan la desviación estándar con una n = 3).

Anexo 7. Método de purificación con etanol de las GNP-L y GNP-LIns (PE/GNP-LIns)

Procedimiento:

1. Colocar lenta y cuidadosamente 200 µl de la reacción de síntesis de GNP-L o GNP-LIns en un microtubo de 1.5 ml.
2. Agregar 1.5 volúmenes de etanol absoluto y mezclar vigorosamente por inversión hasta observar una coloración lechosa en la mezcla.
3. Incubar durante 1 h a 4 ± 0.5 °C.
4. Centrifugar a 15,000 g durante 20 min a 4 °C.

5. Retirar por completo el sobrenadante y lavar el botón añadiendo 4 volúmenes de etanol absoluto.
6. Agitar vigorosamente en un vortex y centrifugar a 15,000 hasta observar el desprendimiento del botón de la base del tubo.
7. Centrifugar a 15,000 g durante 20 min a 4 °C. (repetir pasos 5 a 7, dos veces)
8. Retirar la mayor cantidad posible de etanol y evaporar el solvente a 60 °C durante 10-20 min.
9. Almacenar botón de GNPs-L o GNPs-LIns purificadas a temperatura ambiente hasta su uso.

Referencias

- Abdelkader, D. H., M. A. Osman, S. A. Elgizawy, A. M. Faheem, y P. A. McCarron. 2016. The role of insulin in wound healing process: mechanism of action and pharmaceutical applications. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research* 2 (1): 1-6. <https://doi.org/10.15406/japlr.2016.02.00007>.
- Al-Qadi, S., A. Grenha, D. Carrión-Recio, B. Seijo, y C. Remuñán-López. 2012. Microencapsulated chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery: in vivo evaluation of insulin-loaded formulations. *Journal of Controlled Release* 157 (3): 383-390. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.008>.
- Apikoglu-Rabus, S., F. V. Izzettin, P. Turan, y F. Ercan. 2010. Effect of topical insulin on cutaneous wound healing in rats with or without acute diabetes. *Clinical and Experimental Dermatology* 35 (2): 180-185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2009.03419.x>.
- Aramsangtienchai, P., T. Kongmon, S. Pechroj, y K. Srisook. 2020. Enhanced production and immunomodulatory activity of levan from the acetic acid bacterium, *Tanticharoenia sakaeratensis*. *International Journal of Biological Macromolecules* 163: 574-581. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.001>.
- Arvidson, S. A., B. T. Rinehart, y F. Gadala-Maria. 2006. Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus sp.* *Carbohydrate Polymers* 65 (2): 144-149. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.12.039>.
- Auch, C., M. Harms, y K. Mäder. 2019. How changes in molecular weight and PDI of a polymer in amorphous solid dispersions impact dissolution performance. *International Journal of Pharmaceutics* 556: 372-382. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.012>.
- Augustin, M. A., y Y. Hemar. 2009. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews* 38 (4): 902-912. <https://doi.org/10.1039/B801739P>.
- Ávila-Fernández, Á., N. Galicia-Lagunas, M. E. Rodríguez-Alegría, C. Olvera-Carranza, y A. López-Munguía. 2011. Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans. *Food Chemistry* 129 (2): 380-386. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.088>.
- Azevedo, F., A. Pessoa, G. Moreira, M. Dos Santos, E. Liberti, E. Araujo, C. Calvalho, M. Saad, y M. H. Lima. 2016. Effect of topical insulin on second-degree burns in diabetic rats. *Biological Research for Nursing* 18 (2): 181-192. <https://doi.org/10.1177/1099800415592175>.
- Beidler, S. K., C. D. Douillet, D. F. Berndt, B. A. Keagy, P. B. Rich, W. A. Marston, y C. Hill. 2009. Inflammatory cytokine levels in chronic venous insufficiency ulcer tissue before and after compression therapy. *Journal of Vascular Surgery* 49 (4): 1013-1020. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2008.11.049>.
- Bekers, M., D. Upite, E. Kaminska, J. Laukevics, M. Grube, S. Vigants, y R. Linde. 2005. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry* 40 (5): 1535-1539. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.052>.
- Benigar, E., I. Dogsa, D. Stopar, A. Benigark, K. I. Cigic, y M. Tomsic. 2014. Structure and dynamics of a polysaccharide matrix: aqueous solutions of bacterial levan. *Langmuir* 30 (14): 4172-4182. <https://doi.org/10.1021/la500830j>.
- Besson, J. C. F., L. Hernandez, J. M. de Campos, K. A. Morikawa, C. A. Bersani-Amado, y G. Matioli. 2017. Insulin complexed with cyclodextrins stimulates epithelialization and neovascularization

- of skin wound healing in rats. *Injury* 48 (11): 2417-2425. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2017.08.046>.
- Bhattacharjee, S. 2016. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* 235: 337-351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- Bondarenko, O. M., A. Ivask, A. Kahru, H. Vija, T. Titma, M. Visnapuu, U. Josst, K. Pudova, S. Adamberg, y T. Visnapuu. 2016. Bacterial polysaccharide levan as stabilizing, non-toxic and functional coating material for microelement-nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 136 (20): 710-720. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.093>.
- Bostan, M. S., E. C. Mutlu, H. Kazak, S. S. Keskin, E. T. Oner, y M. S. Eroglu. 2014. Comprehensive characterization of chitosan/PEO/levan ternary blend films. *Carbohydrate Polymers* 102: 993-1000. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.096>.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2): 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Calazans, G. M. T., R. C. Lima, F. P. de Franca, y C. E. Lopes. 2000. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *International Journal of Biological Macromolecules* 27 (4): 245-247. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(00\)00125-2](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(00)00125-2).
- Cauerhff, A., y G. R. Castro. 2013. Bionanoparticles, a green nanochemistry approach. *Electronic Journal of Biotechnology* 16 (3): 1-11. <http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-3>.
- Chen, X., Y. Liu, y X. Zhang. 2012. Topical insulin application improves healing by regulating the wound inflammatory response. *Wound Repair and Regeneration* 20 (3): 425-434. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2012.00792.x>.
- Choi, W. I., Y. Hwang, A. Sahu, K. Min, D. Sung, G. Tae, y J. H. Chang. 2018. An injectable and physical levan-based hydrogel as a dermal filler for soft tissue augmentation. *Biomaterials Science* 6 (10): 2677-2638. <https://doi.org/10.1039/c8bm00524a>.
- Chunsrivirod, S., P. Kanjanatanin, y R. Pichyangkura. 2018. Unraveling the structural and molecular properties of 34-residue levans with various branching degrees by replica exchange molecular dynamics simulations. *PLoS one* 13 (8): 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202578>.
- Cooper, P. D., K. H. Rajapaksha, T. G. Barclay, M. Ginic-Markovic, A. R. Gerson, y N. Petrovsky. 2015. Inulin crystal initiation via a glucose-fructose cross-link of adjacent polymer chains: Atomic force microscopy and static molecular modelling. *Carbohydrate Polymers* 117: 964-972. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.022>.
- Dahoumane, S. A., M. Mechouet, K. Wijesekera, C. D. Filipe, C. Sicard, D. A. Bazylinski, y C. Jeffryes. 2016. Algae-mediated biosynthesis of inorganic nanomaterials as a promising route in nanobiotechnology—a review. *Green Chemistry* 19 (3): 552-587. <https://doi.org/10.1039/C6GC02346K>.
- de Siqueira, E. C., J. de S. Rebouças, I. O. Pinheiro, y F. R. Formiga. 2020. Levan-based nanostructured systems: an overview. *International Journal of Pharmaceutics* 580 (March): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119242>.
- Dickinson, A. M., J. M. Godden, K. Lanovyk, y S. S. Ahmed. 2019. Assessing the safety of nanomedicines: A mini review. *Applied In Vitro Toxicology* 5 (3): 114-122. <https://doi.org/10.1089/aivt.2019.0009>.
- Ehterami, A., M. Salehi, S. Farzambar, A. Vaez, H. Samadian, H. Sahrapeyma, M. Mirzaii, S. Ghorbani, y A. Goodarzi. 2018. In vitro and in vivo study of PCL/COLL wound dressing loaded with insulin-chitosan nanoparticles on cutaneous wound healing in rats model. *International*

- Journal of Biological Macromolecules* 117: 601-609.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.184>.
- Ehud, G. 2007. Introducción: nanobiotechnology and bionanotechnology. Cap. 1 de *Plenty of room for biology at the bottom: An introduction to Bionanotechnology*, de G. Ehud, 677. Imperial College Press. ISBN 978-1-86094.
- Eming, S. A., M. Hammerschmidt, T. Krieg, y A. Roers. 2009. Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20 (5): 517-527.
<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2009.04.009>.
- Eming, S. A., M. Koch, A. Krieger, B. Brachvogel, S. Kreft, L. Bruckner-Tuderman, T. Krieg, J. D. Shannon, y J. W. Fox. 2010. Differential proteomic analysis distinguishes tissue repair biomarker signatures in wound exudates obtained from normal healing and chronic wounds. *Journal of Proteome Research* 9 (9): 4758-4766. <https://doi.org/10.1021/pr100456d>.
- Eming, S. A., P. Martin, y M. Tomic-Canic. 2014. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine* 6 (265): 1-16.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>.
- Falanga, V. 2005. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 366 (9498): 1736-1743. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67700-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67700-8).
- Feldmeyer, L. F., M. Keller, G. Niklaus, D. Hohl, S. Werner, y H. D. Beer. 2007. The Inflammasome Mediates UVB-Induced Activation and Secretion of Interleukin-1b by Keratinocytes. *Current Biology* 17 (13): 1140-1145. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.05.074>.
- Fernández-Urrusuno, R., P. Calvo, C. Remuñán-López, J. L. Vila-Jato, y M. J. Alonso. 1999. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharmaceutical research* 16 (10): 1576-1581. <https://doi.org/10.1023/a:1018908705446>.
- Gojgic-Cvijovic, G. D., D. M. Jakovljevic, B. D. Loncarevic, N. M. Todorovic, M. V. Pergal, J. Ciric, K. Loos, V. P. Beskoski, y M. M. Vrvic. 2019. Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium. *International Journal of Biological Macromolecules* 121: 142-151. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.019>.
- González-Garcinuño, Á., A. Tabernero, G. Marcelo, V. Sebastián, M. Arruebo, J. Santamaría, y E. Martín del Valle. 2019. Differences in levan nanoparticles depending on their synthesis route: microbial vs cell-free systems. *International Journal of Biological Macromolecules* 137: 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.128>.
- Grenha, A., B. Seijo, y C. Remunán-López. 2005. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 25 (4-5): 427-437. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.04.009>.
- Han, Y. W., y M. A. Clarke. 1990. Production and characterization of microbial levan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38 (2): 393-396. <https://doi.org/10.1021/jf00092a011>.
- Heinemann, L., K. Braune, A. Carter, A. Zayani, y L. A. Krämer. 2021. Insulin storage: a critical reappraisal. *Journal of Diabetes Science and Technology* 15 (1): 147-159. <https://doi.org/10.1177/1932296819900258>.
- Hiss, J., J. J. Bubis, y M. Wolman. 1981. The effect of levan on the migration of different white blood cells across blood-vessel walls. *British Journal of Experimental Pathology* 62 (5): 437-439. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7295537>.
- Horák, D. 1999. Effect of reaction parameters on the particle size in the dispersion polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate. *Journal of Polymer Science* 37 (20): 3785-3792. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0518\(19991015\)37:20%3C3785::AID-POLA7%3E3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0518(19991015)37:20%3C3785::AID-POLA7%3E3.0.CO;2-U).

- Huus, K., S. Havelund, H. B. Olsen, M. van de Weert, y S. Frokjaer. 2005. Thermal dissociation and unfolding of insulin. *Biochemistry* 44 (33): 11171-11177. <https://doi.org/10.1021/bi0507940>.
- ICH. 1996. ICH Harmonised tripartite guideline: validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (4): 1-13.
- Ishida, R., K. Sakaguchi, C. Matsuzaki, T. Katoh, N. Ishida, K. Yamamoto, y K. Hisa. 2016. Levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 produces a levan exopolysaccharide with immunomodulating activity. *Biotechnology letters* 38 (4): 681-687. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-2024-9>.
- Jain, A. K., R. K. Khar, F. J. Ahmed, y P. V. Dinwan. 2008. Effective insulin delivery using starch nanoparticles as a potential trans-nasal mucoadhesive carrier. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69 (2): 426-435. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.12.001>.
- Jiménez-Sánchez, M., R. Pérez-Morales, F. M. Goycoolea, M. Mueller, W. Praznik, R. Loeppert, V. Bermúdez-Morales, G. Zavala-Padilla, M. Ayala, y C. Olvera. 2019. Self-assembled high molecular weight inulin nanoparticles: enzymatic synthesis, physicochemical and biological properties. *Carbohydrate Polymers* 2015: 160-169. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.060>.
- Jutz, G., y A. Böker. 2011. Bionanoparticles as functional macromolecular building blocks - a new class of nanomaterials. *Polymer* 52 (2): 211-232. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.11.047>.
- Kanjanatanin, P., R. Pichyangkura, y S. Chunsrivirod. 2016. Replica exchange molecular dynamics simulations reveal the structural and molecular properties of levan-type fructo-oligosaccharides of various chain lengths. *BMC Bioinformatics* 17 (306). <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1182-7>.
- Kaur, P., A. K. Sharma, D. Nag, A. Das, S. Datta, A. Ganguli, V. Goel, y otros. 2019. Novel nano-insulin formulation modulates cytokine secretion and remodeling to accelerate diabetic wound healing. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 15 (1): 47-57. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.08.013>.
- Khan, H., H. R. Mirzaei, A. Amiri, E. Kupeli Akkol, S. M. Ashhad Halimi, y H. Mirzaei. 2019. Glyco-nanoparticles: new drug delivery systems in cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology* 0-1. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2019.12.004>.
- Kim, K. H., C. B. Chung, Y. H. Kim, K. S. Kim, C. S. Han, y C. H. Kim. 2005. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Cosmetic Science* 56 (6): 395-406. https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2006.00314_2.x.
- Kim, S. J., P. K. Bae, y B. H. Chung. 2015. Self-assembled levan nanoparticles for targeted breast cancer imaging. *Chemical Communications* 51 (1): 107-110. <https://doi.org/10.1039/C4CC07679F>.
- Kim, S. J., y B. H. Chung. 2016. Antioxidant activity of levan coated cerium oxide nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 150: 400-407. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.021>.
- Knoll, D., y J. Hermans. 1983. Polymer-protein interactions. Comparison of experiment and excluded volume theory. *Journal of Biological Chemistry* 258 (9): 5710-5715. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81951-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81951-6).
- Lauren, M. D., S. S. Stivala, W. S. Bahary, y L. W. Long. 1975. Levans. V. Kinetics of the acid hydrolysis of *Streptococcus salivarius* levan. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* 14 (11): 2373-2385. <https://doi.org/10.1002/bip.1975.360141111>.

- Lee, C. H., K. C. Hung, M. J. Hsieh, S. H. Chang, J. H. Juang, I. C. Hsieh, M. S. Wen, y S. J. Liu. 2020. Core-shell insulin-loaded nanofibrous scaffolds for repairing diabetic wounds. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 24: 102123. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102123>.
- Lei, X. J., Y. M. Kim, J. H. Park, D. H. Baek, C. M. Nyachoti, y I. H. Kim. 2018. Effects of levan-type fructan on growth performance, nutrient digestibility, diarrhoea scores, faecal shedding of total lactic acid bacteria and coliform bacteria, and faecal gas emission in weaning pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98 (4): 1539-1544. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8625>.
- Li, W., F. Gao, J. Kan, J. Deng, B. Wang, y S. Hao. 2019. Synthesis and fabrication of a keratin-conjugated insulin hydrogel for the enhancement of wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 175 (1): 436-444. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.020>.
- Lima, M. H. M., A. M. Caricilli, L. L. de Abreu, E. P. Araújo, F. F. Pelegrinelli, A. C. P. Thirone, D. M. Tsukumo, y otros. 2012. Topical insulin accelerates wound healing in diabetes by enhancing the AKT and ERK pathways: A double-blind placebo-controlled clinical trial. *PLoS ONE* 7 (5): 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036974>.
- Liu, C., S. Koida, D. Charalampopoulos, y R. A. Rastall. 2020. An evaluation of the prebiotic potential of microbial levans from *Erwinia* sp. 10119. *Journal of Functional Foods* 64: 103668. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103668>.
- Liu, X., J. Zheng, y H. Zhou. 2011. TLRs as pharmacological targets for plant-derived compounds in infectious and inflammatory diseases. *International immunopharmacology* 11 (10): 1451-1456. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.04.027>.
- Medrano-Villagomez, C. A. 2018. Desarrollo de un método de encapsulación de biomoléculas en nanopartículas de inulina. [Tesis para optar un grado de Licenciado, Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, Guanajuato, 64].
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31 (3): 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Nagamune, T. 2017. Biomolecular engineering for nanobio/bionanotechnology. *Nano Convergence* 4 (9): 1-56. <https://doi.org/10.1186/s40580-017-0103-4>.
- Nakapong, S., R. Pichyangkura, K. Ito, y M. Iizuka. 2013. High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* 54: 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.11.017>.
- Namgung, R., M. Y. Lee, J. Kim, Y. Jang, B. H. Lee, I. S. Kim, P. Sokkar, Y. M. Rhee, A. S. Hoffman, y W. J. Kim. 2014. Poly-cyclodextrin and poly-paclitaxel nano-assembly for anticancer therapy. *Nature Communications* 5: 3702. <https://doi.org/10.1038/ncomms4702>.
- Negrini, J., E. Mozos, A. Escamilla, J. Pérez, R. Lucena, R. Guerra, y P. J. Ginel. 2017. Effects of topical insulin on second intention wound healing in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta elegans*) – a controlled study. *BMC Veterinary Research* 13 (160): 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1082-8>.
- Newbrun, E., y S. Baker. 1968. Physico-chemical characteristics of the levan produced by *Streptococcus salivarius*. *Carbohydrate Research* 6 (2): 165-170. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)81506-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)81506-2).
- Ortiz-Soto, M. E., M. Rivera, E. Rudiño-Piñera, C. Olvera, y A. López-Munguía. 2008. Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Engineering, Design and Selection* 21 (10): 589-595. <https://doi.org/10.1093/protein/gzn036>.

- Papazoglou, E. S., y A. Parthasarathy. 2007. Nano Drug Delivery. En *Bionanotechnology*, 31-35. Synthesis lectures on biomedical engineering.
- Pastar, I, A. Nusbaum, J. Gil, S. B. Patel, J. Chen, J. Valdes, O. Stojadinovic, L. R. Plano, M. Tomic-Canic, y S. C. Davis. 2013. Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. *PLOS one* 8 (2): e56846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056846>.
- Peshev, D., y W. Van den Ende. 2014. Fructans: prebiotics and immunomodulators. *Journal of Functional Foods* 8: 348-357. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.005>.
- Polito, L. 2020. Glyconanoparticles as versatile platforms for vaccine development: A minireview. En *Recent Trends in Carbohydrate Chemistry*, 381-411. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820954-7.00011-6>.
- Primožič, M., Ž. Knez, y M. Leitgeb. 2021. Nanotechnology in food science—food packaging. *Nanomaterials* 11 (2): 292. <https://doi.org/10.3390/nano11020292>.
- Quiñónez-Vázquez, O. O. 2015. *Caracterización de nanopartículas de fructanas de diversos orígenes*. Tesis de Licenciatura, Departamento de ingeniería química y biocatálisis, Zacatepec: Instituto Tecnológico de Zacatepec, 63.
- Raga-Carbajal, E. 2019. Bases moleculares del mecanismo de elongación de levanas de SacB de *Bacillus subtilis*. [Tesis para optar un grado de Doctor en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, 173]. *TESIUNAM*. <https://tesiunam.dgb.unam.mx/>
- Raga-Carbajal, E., E. Carrillo-Nava, M. Costas, J. Porrás-Dominguez, A. López-Munguía, y C. Olvera. 2016. Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Glycobiology* 26 (4): 377–385. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv112>.
- Ramsden, J. J. 2016. Bionanotechnology. En *Nanotechnology*, de J. J. Ramsden, editado por J. J. Ramsden, 263-278. Oxford, UK: Micro and Nano Technologies; Publishing; William Andrew. ISBN 978-0-323-39311-9.
- Ribeiro, M. C., V. L. R. Correa, F. K. L. da Silva, A. A. Casas, A. D. L. das Chagas, L. P. de Oliveira, M. P. Miguel, D. G. A. D. Diniz, A. C. Amaral, y L. B. de Menezes. 2020. Wound healing treatment using insulin within polymeric nanoparticles in the diabetes animal model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 150: 105330. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105330>.
- Robertson, T. A., J. M. Papadimitriou, M. N. Walters, y M. Wolman. 1977. Effects of exposure of murine peritoneal exudate and resident macrophages to high molecular levan: a morphological study. *The Journal of Pathology* 123 (3): 157–164. <https://doi.org/10.1002/path.1711230305>.
- Roche, E. D., P. J. Renick, S. P. Tetens, S. J. Ramsay, E. Q. Daniels, y D. L. Carson. 2012. Increasing the presence of biofilm and healing delay in a porcine model of MRSA-infected wounds. *Wound Repair and Regeneration* 20 (4): 537-543. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2012.00808.x>.
- Rojas-Aguirre, Y., K. Aguado-Castrejón, y I. González-Méndez. 2016. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educacion Quimica* 27 (4): 286-291. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.07.002>.
- Sarkar, A., V. Ademuyiwa, S. Stubbley, N. H. Esa, F. M. Goycoolea, X. Qin, F. Gonzalez, y C. Olvera. 2018. Pickering emulsions co-stabilized by composite protein/ polysaccharide particle-particle interfaces: Impact on in vitro gastric stability. *Food Hydrocolloids* 84 (February): 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.019>.

- Semyonov, D., O. Ramon, Y. Shoham, y E. Shimoni. 2014. Enzymatically synthesized dextran nanoparticles and their use as carriers for nutraceuticals. *Food & Function* 5 (10): 2463-2474. <https://doi.org/10.1039/C4FO00103F>.
- Sezer, A. D., H. Kazak, E. T. Öner, y J. Akbua. 2011. Levan-based nanocarrier system for peptide and protein drug delivery: optimization and influence of experimental parameters on the nanoparticle characteristics. *Carbohydrate Polymers* 84 (1): 358-363. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.046>.
- Soares, S., J. Sousa, A. Pais, y C. Vitorino. 2018. Nanomedicine: principles, properties, and regulatory issues. *Frontiers in Chemistry* 6 (360). <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00360>.
- Srikanth, R., C. H. S. Reddy, G. Siddartha, M. J. Ramaiah, y K. B. Uppuluri. 2015. Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate Polymers* 120: 102–114. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.003>.
- Srikanth, R., G. Siddartha, C. H. S. Reddy, B. S. Harish, M. J. Ramaiah, y K. B. Uppuluri. 2015. Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. *Carbohydrate polymers* 123: 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.079>.
- Stojadinovic,, O., I. Patar, A. G. Nusbaum, S. Vukelic, A. Krzyzanowska,, y M. Tomic-Canic. 2014. Deregulation of epidermal stem cell niche contributes to pathogenesis of non-healing venous ulcers. *Wound Repair Regen* 22 (2): 220-227. <https://doi.org/10.1111/wrr.12142>.
- Sturzoiu, C., M. Petrescu, B. Galateanu, M. Anton, C. Nica, G. I. Simionca, A. Dinischiotu, y G. Stoian. 2011. *Zymomonas mobilis* levan is involved in metalloproteinases activation in healing of wounded and burned tissues. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies* 44 (1): 453–458.
- Tabernerero, A., A. González-Garcinuño, J. M. Sánchez-Álvarez, M. A. Galán, y E. M. Martín del Valle. 2017. Development of a nanoparticle system based on a fructose polymer: stability and drug release studies. *Carbohydrate Polymers* 160: 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.025>.
- Tarnuzzer, R. W., y G. S. Schultz. 1996. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair and Regeneration* 4 (3): 321-325. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.1996.40307.x>.
- Taylan, O., M. T. Yilmaz, y E. Dertli. 2019. Partial characterization of a levan type exopolysaccharide (EPS) produced by *Leuconostoc mesenteroides* showing immunostimulatory and antioxidant activities. *International journal of biological macromolecules* 136: 436-444. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.078>.
- Tinkle, S., S. E. McNeil, S. Mühlebach, R. Bawa, G. Borchard, Y. Barenholz, L. Tamarkin, y N. Desai. 2014. Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1313 (1): 35-56. <https://doi.org/10.1111/nyas.12403>.
- Valdez-Echeverría, R. D. 2021. Nanomedicina: gliconanopartículas como una terapia innovadora para el tratamiento de heridas. [Tesis para optar un grado de Maestro en Ciencias en Biotecnología, Universidad Politécnica del Estado de Morelos (Upemor). Cuernavaca, Morelos, 80].
- Valentini, S. R., A. C. Nogueira, V. C. Fenelon, F. Sato, A. N. Medina, R. G. Santana, M. L. Baesso, y G. Matioli. 2015. Insulin complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: spectroscopic evaluation of molecular inclusion and use of the complex in gel for healing of pressure ulcers. *International Journal of Pharmaceutics* 409 (1-2): 229-239. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.037>.

- Ventola, C. L., D. J. Bharali, y S. A. Mousa. 2010. The nanomedicine revolution: part 1: emerging concepts. *Pharmacology & Therapeutics* 128 (9): 512-525. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725810001506>.
- Vina, I., A. Karsakevich, S. Gonta, R. Linde, y M. Bekers. 1998. Influence of some physicochemical factors on the viscosity of aqueous levan solutions of *Zymomonas mobilis*. *Acta Biotechnology* 18 (2): 167-174. <https://doi.org/10.1002/abio.370180214>.
- Vogt, L., U. Ramasamy, D. Meyer, G. Pullens, K. Venema, M. M. Faas, H. A. Schols, y P. de Vos. 2013. Immune modulation by different types of $\beta 2 \rightarrow 1$ -fructans is toll-like receptor dependent. *PloS one* 8 (7): e68367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068367>.
- Volkin, D. B., y A. M. Klibanov. 1987. Thermal destruction processes in proteins involving cystine residues. *Journal of Biological Chemistry* 262 (7): 2945-2950. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)61451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)61451-6).
- Wang, J., y J. Xu. 2020. Effects of topical insulin on wound healing: a review of animal and human evidences. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 13: 719-727. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S237294>.
- Wangpaiboon, K., C. Pitakchatwong, P. Panpetch, T. Charoenwongpaiboon, A. R. Field, y R. Pichyangkura. 2019. Modified properties of alternan polymers arising from deletion of SH3-like motifs in *Leuconostoc citreum* ABK-1 alternansucrase. *Carbohydrate Polymers* 220: 103-109. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.002>.
- Wlaschek, M., D. Peus, V. Achterberg, W. Meyer-Ingold, y K. Scharffetter-Kochanek. 1997. Protease inhibitor protect growth factor activity in chronic wounds. *British Journal of Dermatology* 137 (4): 646-663. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1997.tb03804.x>.
- Xu, Q., T. Yajima, W. Li, K. Saito, Y. Ohshima, y Y. Yosikai. 2006. Levan (β -2, 6-fructan), a major fraction of fermented soybean mucilage, displays immunostimulating properties via Toll-like receptor 4 signalling: induction of interleukin-12 production and suppression of T-helper type 2 response and immunoglobulin E production. *Clinical & Experimental Allergy* 36 (1): 94-101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02401.x>.
- Xu, W., J. Peng, D. Ni, W. Zhang, H. Wu, y W. Mu. 2020. Preparation, characterization and application of levan/montmorillonite biocomposite and levan/BSA nanoparticle. *Carbohydrate Polymers* 234 (115921): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115921>.
- Young, I. D., D. Latousakis, y N. Juge. 2021. The immunomodulatory properties of β -2, 6 fructans: a comprehensive review. *Nutrients* 13 (4): 1309. <https://doi.org/10.3390/nu13041309>.
- Zagon, I. S., M. S. Klocek, J. W. Sassani, y P. J. McLaughlin. 2007. Use of topical insulin to normalize corneal epithelial healing in diabetes mellitus. *Archives of Ophthalmology* 125 (8): 1082-1088. <https://doi.org/10.1001/archophth.125.8.1082>.
- Zhang, J., T. J. Elder, Y. Pu, y A. J. Ragauskas. 2007. Facile synthesis of spherical cellulose nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 69 (3): 607-611. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.01.019>.
- Zhang, L., S. Gao, F. Zhang, K. Yang, Q. Ma, y L. Zhu. 2014a. Activatable hyaluronic acid nanoparticle as a theranostic agent for optical/photoacoustic image-guided photothermal therapy. *American Chemical Society Nano* 8 (12): 12250-12258. <https://doi.org/10.1021/nn506130t>.
- Zhang, L., Y. Li, C. Wang, G. Li, Y. Zhao, y Y. Yang. 2014b. Synthesis of methyl prednisolone loaded ibuprofen modified inulin based nanoparticles and their application for drug delivery. *Materials Science and Engineering C* 42: 111-115. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.025>.

- Zhang, X., X. Wu, S. E. Wolf, H. K. Hawkins, D. L. Chinkes, y R. R. Wolfe. 2007. Local insulin-zinc injection accelerates skin donor site wound healing. *Journal of Surgical Research* 142 (1): 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.10.034>.
- Zhao, L., L. Lu, A. Wang, H. Zhang, M. Huang, H. Wu, B. Xing, Z. Wang, y R. Ji. 2020. Nanobiotechnology in agriculture: use of nanomaterials to promote plant growth and stress tolerance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68 (7): 1935-1947. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06615>.