



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**Programa de Doctorado en Nanociencias y Nanotecnología**

**“Síntesis y aplicación de un nanocompósito de quitosano-glicidil metacrilato-colágeno tipo I y nanopartículas de oro sobre la cicatrización de heridas cutáneas”**

**T E S I S**

Que presenta

**M.C. HÉCTOR ALEXANDER LÓPEZ MUÑOZ.**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA**

Director de Tesis:

**Dr. Gabriel Luna Bárcenas.**

**Ciudad de México**

**Diciembre 2022**



# Agradecimientos

Es difícil poner en palabras lo agradecido que estoy con la vida y con la gente que estuvo a mi lado, y que de alguna manera ayudó a que llegara a este punto.

Quiero agradecerle al programa de nanociencias y nanotecnología, por aceptarme y permitirme llevar a cabo mi formación como doctor. Debo decir que el CINVESTAV-Zacatenco-Querétaro me ayudó en gran medida a que creciera, no sólo como investigador, si no como persona.

Quiero agradecer al Dr. J. Gabriel Luna Bárcenas por confiar en mí, por su paciencia, por su apoyo, por su guía como director de tesis y en especial por no perder su fe en mí, y ayudarme a recuperarla.

A mi comité de tesis: Dr. Juan Francisco Pérez Robles, Dr. José Gerardo Cabañas Moreno, Dr Mauricio Ortega López y Dr Jorge Herrera Ordoñez, por sus comentarios, sus aportaciones y principalmente, sus correcciones que me ayudaron en mi formación como doctor.

A la M.C. Reyna Araceli Mauricio Sánchez por su asesoría y apoyo a lo largo de estos años.

A Roxana Yasmin De Lorenz Santos, por todo su apoyo durante mi doctorado y proceso de titulación.

Al Coordinador del programa de Doctorado en Nanociencias y Nanotecnología de CINVESTAV, el Dr. Arturo Isaías Martínez Enriquez, por su apoyo.

A CONACYT por el apoyo económico durante mi formación doctoral.



A todos mis amigos y compañeros, que, a lo largo de estos cuatro años de doctorado, aportaron su granito de arena en mi vida, y que siempre estaré agradecido con ellos.

A la vida por todos los momentos buenos y malos, que gracias a todas esas situaciones pude llegar al lugar donde estoy, y crecer en todos los aspectos.

A mi familia, por estar a mi lado y mostrarme hacia donde quiero crecer como persona.

Y principalmente, a mi madre, Blanca Estela Muñoz Villanueva, por estar a mi lado en todo momento, y mostrarme que sin importar lo que pase, siempre se puede salir adelante.



Cinvestav



# Índice general

<b>Índice general</b>	<b>III</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>V</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>VII</b>
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>Capítulo I.- Introducción.</b>	<b>3</b>
1.1. Quitosano.	5
1.1.1. Propiedades.	6
1.1.2. Aplicación de CTS en cicatrización de heridas.	8
1.2. Nanopartículas en la cicatrización de heridas.	10
1.2.1. Aplicación de las nanopartículas de oro en regeneración de heridas cutáneas.	13
1.3. Objetivo general y específicos.	15
<b>Capítulo II.- Caracterización y evaluación de nanocompuestos basados en quitosano y nanopartículas de oro en la cicatrización de heridas cutáneas.</b>	<b>21</b>
2.1. Antecedentes	22
2.2. Materiales y metodología.	24
2.2.1. Preparación del nanocompuesto.	24
2.2.2. Caracterización.	25
2.2.3. Viabilidad celular.	26
2.2.4. Determinación de óxido nítrico.	26
2.2.5 Evaluación de la expresión de citoquinas por citometría de flujo.	27
2.2.6. Efecto cicatrizante de heridas cutáneas.	28
2.2.7. Análisis estadístico.	29



Cinvestav



2.3. Resultados y discusión	29
2.3.1. Espectroscopía Infrarroja.	29
2.3.2. Tamaño y estabilidad de las AuNP's.	32
2.3.3. Difracción de Rayos-X (XRD)	33
2.3.4. Mediciones de conductividad.	34
2.3.5. Viabilidad celular.	35
2.3.6. Producción de óxido nítrico	36
2.3.7. Citometría de flujo para la producción de citoquinas.	37
2.3.8. Prueba de regeneración de tejido cutáneo	40
2.4. Conclusiones	42
<b>APÉNDICES</b>	<b>46</b>
<b>Apéndice A - Información suplementaria del Capítulo II.</b>	<b>47</b>
Tabla S1. Diagrama de valoración de heridas: 1= recuperación, 4 = recuperación limitada. De acuerdo con puntuación la herida se puede clasificar en cuatro tipos.	47
<b>Bibliografía</b>	<b>48</b>
<b>ARTÍCULO</b>	<b>59</b>

# Índice de figuras

Figura 1.1.- Ejemplos de diferentes tipos de nanopartículas (cerámica, polimérica, metálica) y sus usos en diferentes aplicaciones de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa[3].	4
Figura 1.2.- Estructura de la quitina y quitosano.	5
Figura 1.3.- Diferentes tipos de nanopartículas[27].	11
Figura 2.1.- Proceso de cirugía. Las lesiones cerca de la cabeza fueron implantadas con nanocompósitos o TheraForm como control positivo y la localizada cerca de la cola del ratón fue usado como control negativo en el proceso de cicatrización de heridas.	29
Figura 2.2.a- Espectros infrarrojos obtenidos de quitosano puro (CTS) y nanocompósitos con quitosano y nanopartículas de oro (CTS-AuNP's), quitosano y glicidil metacrilato (CTS-g-GMA), quitosano, glicidil metacrilato y colágeno tipo I ((CTS-g-GMA)-Col) y nanocompósito compuesto ((CTS-g-GMA-AuNP's)-Col). b. Acercamiento a la región con mayor contribución de 1700 a 900 $\text{cm}^{-1}$ .	30
Figura 2.3- Reacción entre CTS y GMA.	31
Figura 2.4- Espectros UV-Vis de muestras líquidas de nanopartículas de oro sintetizadas con diferentes concentraciones de precursor.	32
Figura 2.5- Microscopía de AuNP's obtenidas desde una solución con a) 0.3 y b) 1.07 mM de $\text{HAuCl}_4$ . C) Histograma de distribución de tamaño de partícula obtenido desde micrografías SEM.	33
Figura 2.6- Micrografías de Microscopía Electrónica de Barrido de CTS-g-GMA-AuNP's-Col nanocompósitos, a) 0.3 mM, b) 0.6 mM, c) 1.07 mM.	33
Figura 2.7.a- Espectros de CTS comparados con CTS-g-GMA and (CTS-g-GMA-AuNP's)-Col. b. Difracción de Rayos X de nanocompósitos de quitosano y nanopartículas de oro con diferente concentración de $\text{HAuCl}_4$ .	34
Figura 2.8- Dependencia de la conductividad DC de las películas a temperatura ambiente con respecto a la concentración de $\text{HAuCl}_4$ .	35
Figura 2.9.- Viabilidad celular relativa de células PBMC, Macrófagos y HEP-G2 en presencia de diferentes concentraciones de AuNP's (0.6, 0.6, 2 and 3 mM).	36

Figura 2.10.- Producción de óxido nítrico de HEP-G2 y macrófagos debido a la exposición a diferentes concentraciones de AuNP's, en comparación a las células bajo un tratamiento de LPS con diferentes concentraciones de AuNP's. 37

Figura 2.11.- Recuperación de piel después de 40 días de tratamiento con Theraform (A), CTS-g-GMA (B), CTS-g-GMA-AuNP's a diferentes concentraciones, 0.15 mM (C), 0.3 mM (D), 0.6 mM (E), 1.07 mM (F); and CTS-g-GMA-AuNP's-Col a diferentes concentraciones, 0.15 mM (G), 0.3 mM (H), 0.6 mM (I), 1.07 mM (J). 42



Cinvestav



# Índice de tablas

Tabla 1.1.- Aplicaciones de CTS en células humanas <i>in vitro</i> , estudios preclínicos y clínicos, como biomaterial para recubrimiento y regeneración de heridas <sup>24</sup> .	9
Tabla 1.2.- Aplicaciones preclínicas de algunas nanopartículas y nanomateriales en la recuperación de heridas <sup>27</sup> .	12
Tabla 2.1.- Caracterización de grupos funcionales de quitosano puro	31
Tabla 2.2.- Inducción de citoquinas séricas debido a la exposición con Au/Nanocompuestos	39
Tabla 2.3.- Inducción de citoquinas de bazo por exposición con Au/Nanocompuestos.	40



## Resumen

Uno de los enfoques de la medicina regenerativa es el acelerar el proceso de recuperación de cualquier padecimiento, ya sea enfermedad o daño físico, y dentro del enfoque de daños físicos, se ha buscado estudiar la regeneración de órganos y tejidos, para poder permitir que los procesos de recuperación sean más rápidos, eficaces y “naturales”, esto último se refiere a que el aspecto final del tejido sea idéntico al original. En este trabajo, se buscó llevar a cabo la síntesis de nanopartículas de Au (AuNP) en solución de quitosano (CTS) mediante la reducción química de  $\text{HAuCl}_4$ , con la finalidad de una posterior funcionalización con metacrilato de glicidilo y colágeno tipo I para la obtención de un nanocompósito capaz de ayudar a acelerar y mejorar el proceso de regeneración de heridas cutáneas. El nanocompósito denominado ((CTS-g-GMA)-AuNP's)-Col I promueve una excelente viabilidad celular y tienen un efecto positivo en la regulación de citoquinas en la respuesta inflamatoria y antiinflamatoria de las células de la piel. Después de 40 días de exposición del nanocompósito a una herida en la piel, se logró comprobar que dicha película tiene una mayor capacidad de cicatrización de heridas en la piel que una película comercial (TheraForm®), y la presencia del colágeno permite mejores aspectos cosméticos en la regeneración de la piel en comparación con un nanocompuesto con ausencia de esta proteína. Con estos resultados se puede aseverar que los nanocompósito de con base en quitosano y oro muestran un gran potencial para la regeneración de heridas en la piel.

**Palabras clave:** Nanocompósito de oro-quitosano; nanopartículas de oro; herida de piel

## Abstract

One of the approaches of regenerative medicine is to accelerate the recovery process from any condition, be it a disease or physical damage, and within the focus of physical harm, it has sought to study the regeneration of organs and tissues, to allow the recovery processes are faster, more efficient, and "natural", the latter refers to the fact that the final appearance of the tissue is identical to the original. In this work, we sought to carry out the synthesis of Au nanoparticles (AuNP) in chitosan solution (CTS) through the chemical reduction of  $\text{HAuCl}_4$ , with the purpose of a subsequent functionalization with glycidyl methacrylate and type I collagen to obtain a nanocomposite capable of helping to accelerate and improve the regeneration process of skin wounds. The nanocomposite, called ((CTS-g-GMA)-AuNP's)-Col I, promotes excellent cell viability and positively affects the regulation of cytokines in the inflammatory and anti-inflammatory response of skin cells. After 40 days of exposure of the nanocomposite to a skin wound, it was possible to verify that said film has a greater capacity for healing skin wounds than a commercial film (TheraForm®), and the presence of collagen allows for better cosmetic aspects in skin regeneration compared to a nanocomposite with the absence of this protein. With these results, it can be asserted that chitosan and gold-based nanocomposites show great potential for the regeneration of skin wounds.

**Keywords:** Gold-chitosan nanocomposite; gold nanoparticles; skin wound



# Capítulo I.- Introducción.

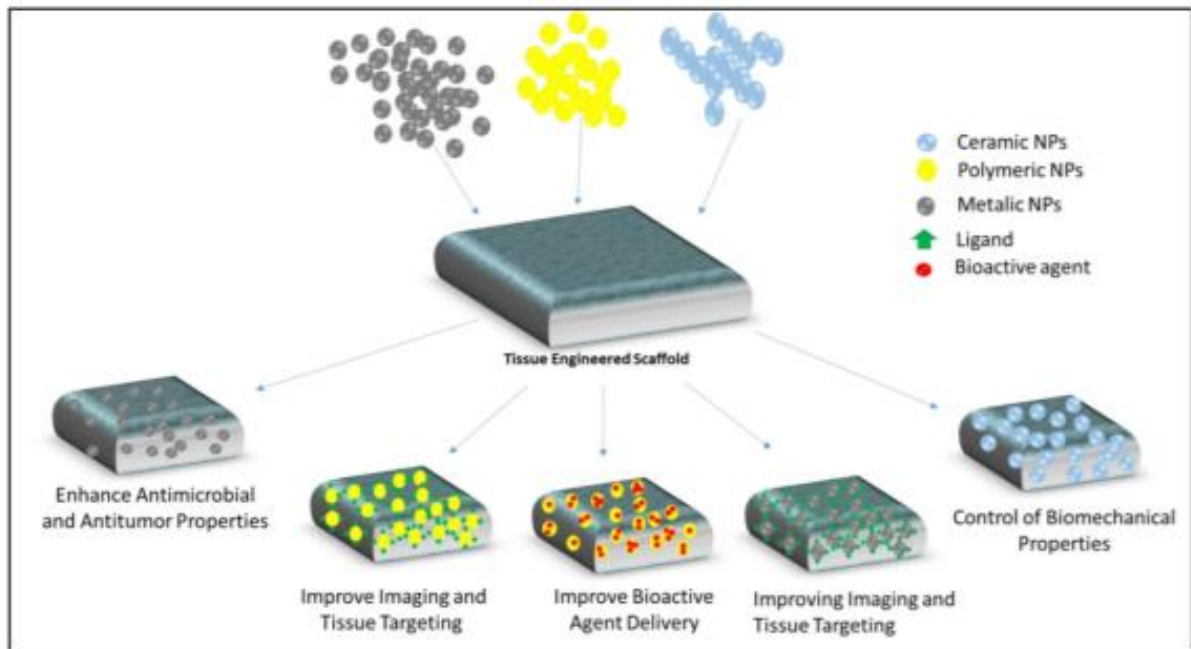
La medicina regenerativa es un área de estudio que se encarga tanto de la restauración o reemplazo de órganos perdidos o dañados, como de partes del cuerpo faltantes, a causa de enfermedades o heridas. Esto lo logran con el trasplante de nuevo tejidos en combinación con andamios celulares y biomoléculas. En la actualidad, la medicina regenerativa logra juntar los campos de la ingeniería de tejidos, investigación con células madre, terapia génica y clonación terapéutica [1,2], por lo cual se ha buscado el desarrollo de biomateriales funcionales para andamios celulares y acarreadores de nuevos medicamentos para medicina regenerativa.

Los polímeros naturales se han vuelto de interés en la medicina regenerativa, debido a su biocompatibilidad y similitud estructural a los componentes de la matriz extracelular. Con una disponibilidad abundante y una actividad biológica única para cada polímero natural, estos materiales son candidatos idóneos para el desarrollo de nuevos materiales naturales y/o semisintéticos, con estructura y funcionalidad similar a los tejidos, para una regeneración correcta. Algunos de estos biopolímeros son almidón, colágeno (Col), alginato, celulosa, ácido hialurónico, quitina y quitosano (CTS), entre otros.

Sin embargo, para poder emplear un material en medicina regenerativa o ingeniería de tejidos, este debe contar con características no solo de biocompatibilidad, biodegradabilidad y viabilidad celular, sino que debe tener buenas propiedades mecánicas. Este problema se ha resuelto en los últimos años con la aplicación conjunta de nanopartículas (NP's) con estos biomateriales, permitiendo alterar su resistencia mecánica y proveer de un control en la liberación de los agentes bioactivos. Además, las nanopartículas han mostrado

mejor desempeño para la administración de agentes bioactivos y monitoreo de aplicaciones que las moléculas convencionales, debido a los inconvenientes y factores limitantes propios de estas moléculas, tales como baja solubilidad, bioactividad inestable y vida media de circulación corta de dichas moléculas bioactivas (factores de crecimiento, citoquinas, inhibidores, genes, medicamentos, etc.) y agentes de contraste[3].

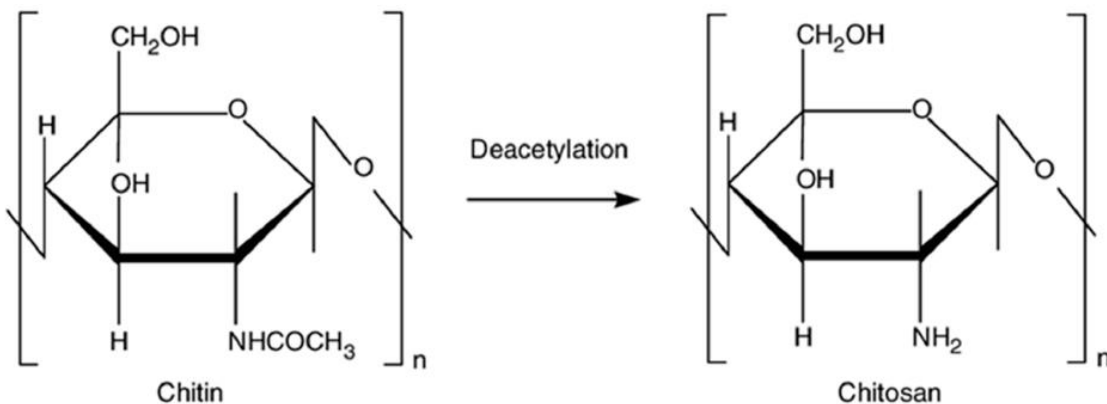
La composición y características propias de las NP's proveen de ventajas como una alta capacidad de penetración celular y tisular, gran área superficial con posibilidad de modificarse fácilmente, mejoras en resistencia mecánica, así como posible suplemento de biotinta, agente antimicrobianos y acarreadores de agentes bioactivos (Figura 1.1)[3].



**Figura 1.1.-** Ejemplos de diferentes tipos de nanopartículas (cerámica, polimérica, metálica) y sus usos en diferentes aplicaciones de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa[3].

## 1.1. Quitosano

El quitosano es un polímero parcialmente desacetilado de acetil glucosamina, obtenido después de la desacetilación alcalina de la quitina, el cual es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza y se encuentra como el principal componente de los exoesqueletos de los crustáceos e insectos, además de en la pared celular de algunas bacterias y hongos. Este biopolímero se compone de un copolímero de glucosamina y N-acetil glucosamina (Figura 1.2), y abarca una serie de polímeros con un peso molecular variado (desde 10 000 hasta 2 millones de Dalton)[4]. El número de grupos amino, la relación entre la D-glucosamina y la suma de D-glucosamina y N-acetil D-glucosamina se indica como el grado de desacetilación y debe ser de al menos 60% para el quitosano[5].



**Figura 1.2.-** Estructura de la quitina y quitosano.

El quitosano cuenta con tres tipos de grupos funcionales reactivos, un grupo amino, así como grupos hidroxilo primario y secundario en las posiciones C-2, C-3 y C-6 respectivamente. Estos grupos permiten las modificaciones químicas del quitosano tales como acilación, alquilación, formación de base de Schiff, alcalización reductiva, entre otras. Las modificaciones químicas de estos grupos resultan en la producción de numerosos derivados útiles para aplicaciones específicas[6].



El quitosano es semicristalino y el grado de cristalinidad está en función del grado de desacetilación. La cristalinidad es máxima tanto para la quitina como para el quitosano completamente desacetilado; mientras que la cristalinidad mínima se localiza en un grado de desacetilación medio[4]. La obtención de quitosano a través de hongos es preferible a escala industrial debido a su mayor distribución, control y variación en la masa molecular, viabilidad en todo el año, producción más controlada y escalable, y menos inmunogenicidad en comparación con una fuente de mariscos o crustáceos, lo que podría causar alergias y limitar las aplicaciones biomédicas[7].

### 1.1.1. Propiedades.

Las propiedades del CTS dependen de varios factores, tales como su peso molecular, grado de desacetilación y pureza del producto[8]. La solubilidad de CTS es dependiente del pH del medio, siendo insoluble en condiciones de pH neutro o básico y soluble en pH ácido. La solubilidad del quitosano depende de la distribución de grupos amino libres y N-acetilo, y es capaz de formar sales solubles en agua con algunos ácidos orgánicos e inorgánicos como glutámico, clorhídrico, láctico y acético. En ácido diluidos ( $\text{pH} < 6$ ), los grupos amino libres de los residuos de D-glucosamina son protonados haciendo la molécula soluble y cargada positivamente[4,9–11]. La disponibilidad de los grupos amino protonados permite al CTS formar complejos con iones metálicos[12,13], polímeros poli(ácido acrílico) aniónicos sintéticos o naturales[14], lípidos, proteínas y ADN. Andamios formados de CTS pueden generarse a partir de la reducción de la solubilidad del polímero mediante un entrecruzado químico de las macromoléculas con enlaces covalente empleando glutaraldehído, dextrano



oxidado u otros carbohidratos oxidados, 1,1,3,3-tetrametoxipropano y genipina[14–17]. La hinchazón de las películas de CTS disminuye con un incremento en la cantidad de entrecruzante empleado.

El CTS posee importantes propiedades como alta biocompatibilidad, biodegradabilidad, nula antigenicidad, actividad antibacterial y gran capacidad de absorción, y hace que el CTS sea un excelente candidato para ingeniería de tejidos y otras aplicaciones biomédicas[18]. Sin embargo, a pesar de que el quitosano tenga una capacidad intrínseca antimicrobiana contra bacterias y hongos, el mecanismo exacto de acción del polímero y sus derivados es desconocido, aunque algunos diferentes métodos se han propuesto. Su grupo amino catiónico se asocia con aniones en la pared celular bacteriana, suprimiendo la biosíntesis; además, el quitosano interrumpe el transporte de masa a través de la pared celular acelerando la muerte de las bacterias[19].

Una propiedad muy interesante del quitosano es la capacidad de ser moldeado en varias formas, tales como polvo, pasta, película, fibra, entre otras formas, dependiendo las necesidades de su aplicación. Además, el quitosano puede combinarse con una alta gama de biomateriales como alginatos, hidroxiapatita, ácido hialurónico, fosfato de calcio, polimetilmetacrilato (PMMA), poliácido L-láctico (PLLA) y factores de crecimiento para diferentes aplicaciones potenciales[20]. Debido a las buenas propiedades del CTS para la formación de películas, este biopolímero se ha empleado como acarreador para liberación de fármacos. Micropartículas recubiertas de quitosano tienen varias ventajas, tales como mejora en la optimización del fármaco, propiedades bioadhesivas y liberación prolongada de la molécula, en comparación de las partículas sin recubrimiento[21].

### 1.1.2. Aplicación de CTS en cicatrización de heridas.

La regeneración de piel es un proceso biológico específico relacionado con el fenómeno general del crecimiento y regeneración de tejido. Este proceso involucra varios factores, tales como elementos sanguíneos, componentes extracelulares, factores solubles y células que trabajan sobre un proceso complejo de cinco fases simultáneas: homeostasis, inflamación, migración, proliferación y fase de maduración[22–24]. Para el tratamiento de lesiones en la piel es necesario el emplear materiales que recubran la herida y, además de la protección física, estos deben proporcionar protección antimicrobiana, reducir la formación de cicatrices y mejorar o promover el proceso de regeneración del tejido cutáneo[25].

Se ha demostrado que el quitosano y sus derivados tienen un efecto positivo al acelerar la regeneración dérmica beneficiando cada etapa de la cicatrización de heridas cutáneas[5,20,23]. Dichos materiales mejoran la función de células inflamatorias, tales como leucocitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos y fibroblastos. Los efectos del CTS sobre las heridas se ven modificados en función de algunas propiedades del material, como es el peso molecular, el grado de desacetilación y el estado físico del CTS[23]. El número de grupos amino y el grado de desacetilación del CTS tiene un efecto sobre la coagulación de la sangre, donde un grado de desacetilación moderado (aproximadamente del 68.36%) causa la formación de estructuras tipo malla dentro del CTS, facilitando la interacción con los componentes de la sangre; mientras que grados de desacetilación mayores resultan en estructuras cristalinas con fuertes enlaces de hidrógeno en el CTS limitando su capacidad de interactuar con los glóbulos rojos. Un peso molecular alto incrementa los efectos pro-coagulatorios debido a



una elevada interacción entre polielectrolitos[5]. Algunas de las aplicaciones más relevantes del CTS en la regeneración y recuperación de heridas se enlistan en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1.-** Aplicaciones de CTS en células humanas *in vitro*, estudios preclínicos y clínicos, como biomaterial para recubrimiento y regeneración de heridas[24].

Tipo de aplicación	Resultados
<i>In vitro</i>	
Hidrogeles	Acelera la cicatrización de heridas por la proliferación de células de fibroblasto de piel de rata
Películas	Derivados de CTS de bajo grado de desacetilación inducen la adhesión y proliferación en queratinocitos y fibroblastos de prepucio de niños
<i>Estudios preclínicos</i>	
Hidrogeles	Homeostasis rápida en ratones Regeneración de herida acelerada y cesado del sangrado en ratones Reconstrucción de piel después de quemadura de tercer grado en piel del lomo de cerdo Disminución del tiempo de sanado y acelerada reepitelización en ratas
Gel	Terapia de reparación de cartílago en conejos
Polvos	Heridas laceradas en perros Trauma crónico de la ubre cerca de los pezones en vacas Daño por quemadura menor en ratas
Piel artificial	Casi completa vascularización y colonización de fibroblastos en ratas y ratones
<i>Estudios clínicos</i>	
Material de recubrimiento	Rápida recuperación de heridas en sujetos humanos
Membrana	Reepitelización veloz en sujetos humanos
Piel artificial	Vascularización y colonización rápida con fibroblastos en sujetos humanos Colonización completa de fibroblastos en sujetos humanos

Para mejorar el efecto antimicrobiano del CTS se han adicionado algunos agentes antimicrobianos, tales como cordicepina, clorhexidina, moxifloxacino, sulfadiazina de plata, nanopartículas metálicas, entre otros. Muchos compósitos de CTS con colágeno tienen una propiedad intrínseca para inducir la recuperación de la herida cutánea; sin embargo, en algunos casos puede darse

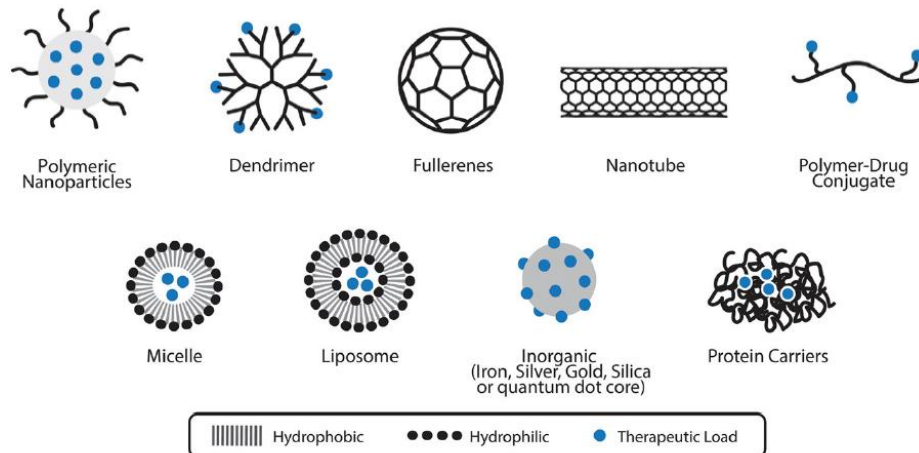
una reacción alérgica al colágeno no humano[5,20]. Algunas nanopartículas no solo tienen efectos antimicrobianos, sino que también pueden favorecer a la cicatrización de heridas cutáneas.

## *1.2. Nanopartículas en la cicatrización de heridas.*

En los últimos años se han buscado alternativas para contrarrestar los problemas principales que enfrentan los trasplantes de tejidos y órganos, tales como disponibilidad limitada de donadores, la necesidad de inmunosupresión y una tasa de éxito insuficiente (a razón del rechazo del trasplante). Para ello las ciencias biológicas, de ingenierías y de materiales, entre otras, han desarrollado y fabricado estructuras artificiales similares al tejido u órgano nativo, no sólo como sistemas de implante, sino como modelos de órganos miniaturizados[3]. Sin embargo, muchos de estos materiales se encuentran limitados debido a sus propiedades mecánicas, ausencia de capacidad antimicrobiana innata, o incapacidad de mejorar o acelerar el proceso de recuperación de la herida o daño.

Es por esto que los nanomateriales se han empleado para proporcionar un alto control en las propiedades de estas estructuras o andamios, ajustando su resistencia mecánica y proporcionando una liberación controlada de agentes bioactivos[3]. Además, nanomateriales como nanopartículas, nanofibras, nanotubos, liposomas, dendrímeros, puntos cuánticos, entre otros (Figura 1.3)[26,27], pueden usarse en conjunto con células madre para terapias que se enfoquen en reemplazar y restaurar las funciones de células, tejidos u órganos con la finalidad de recuperar las funciones normales del mismo[28].

Una de las características que hace a los nanomateriales óptimos para este tipo de trabajos es que sus propiedades mecánicas, térmicas, catalíticas, fisicoquímicas, biológicas y ópticas pueden ser manipuladas al modificar las características físicas del material, como el área superficial, forma, tamaño, entre otros[27,29].



**Figura 1.3.-** Diferentes tipos de nanopartículas[27].

Sin embargo, aún con todas estas características, para que un nanomaterial pueda ser considerado en la regeneración de tejidos y recuperación de heridas, estos deben cumplir con varias especificaciones[30]:

1. Biocompatibilidad con las células
2. Biodegradabilidad
3. Mantener sus propiedades físicas después de la modificación en su superficie
4. No afectar la diferenciación celular o características de las células madre
5. Efectividad a dosis terapéuticas
6. Idealmente tener un proceso regulatorio
7. Mínima o nula transferencia de subproductos al organismo
8. Químicamente estables bajo condiciones fisiológicas

Diferentes aplicaciones se han encontrado a los nanomateriales en la recuperación de heridas, y algunas de ellas se enlistan en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2.-** Aplicaciones preclínicas de algunas nanopartículas y nanomateriales en la recuperación de heridas[27].

Nanopartícula/ Nanomaterial	Modelo preclínico	Herida	Procedimiento	Resultado
NAC-SON-NPs	Ratón	Quemaduras	Examinación histológica de heridas por quemadura para la deposición de colágeno	Aceleración de la transición desde inflamación a proliferación en la recuperación de heridas
Nanopartículas de oro (AuNPs)	Rata	Quemaduras	Recuperación de heridas con AuNP's con microcorriente	Mejora en la reparación del tejido debido a una mejor función mitocondrial
Nanopartículas de Gelatina	Rata	Laceración de espesor total	Nanofibras de ácido hialurónico y colágeno equivalentes a la piel, con liberación controlada de factores angiogénicos	Aceleración en la velocidad de cerrado de la herida y elevada deposición de colágeno
Nanopartículas de plata (AgNP's)	Rata	Herida de escisión	Irradiación con microondas de extractos de hojas de <i>Naringi crenulata</i> para sintetizar AgNP's bioactivas	Muy eficiente reparación de heridas y potencial para heridas tropicales
AgNP's recubierto con nanofibras de BC	Rata	Heridas de espesor parcial	Investigación de AgNP-BC para uso antibacteriano y citocompatibilidad	Reducción en la inflamación y promoción de curación de heridas por escaldadura
Nanopartículas de hipericina (HYNP's)	Rata	Herida de escisión infectada	Actividad antibacteriana de la hipericina	Mejora en la epitelización, queratinización y deposición de colágeno
Nanofibras de gelatina	Rata	Herida de escisión	Desarrollo de estera de gelatina nanofibrosa embebido con galato de epigalocatequina / hidrogel de alcohol polivinílico	Incremento significativo en angiogénesis, reepitelización y síntesis de colágeno
Nanopartículas de pirfenidona	Rata	Quemadura alcalina en córnea	Evaluación de la reepitelización corneal, turbidez y depósito de colágeno	Reduce la síntesis de colágeno, previene cicatrización/fibrosis y mejora la recuperación de la córnea
Nanopartículas de cobre y zinc	Rata	Herida por escisión de capa completa de tejido blando	Las heridas estaban asépticas o infectadas.	Regeneración atribuida a las propiedades antibacterianas
Nanopartículas de fibrina recubiertas con quitosano	Rata	Herida de escisión	Hinchazón, biodegradación, porosidad, activación plaquetaria y coagulación sanguínea	Recuperación de herida rápida y reepitelización

NP's, nanopartículas; NAC-SON-NP's, nanopartículas de N-acetilcisteína S-nitrosotiol; BC, celulosa bacteriana.

Nanopartículas metálicas de plata, oro y zinc han exhibido excelentes propiedades como baja toxicidad *in vivo*, y actividad bactericida y bacteriostática[29].

### 1.2.1. Aplicación de las nanopartículas de oro en regeneración de heridas cutáneas.

A diferencia de otras nanopartículas metálicas, el oro no exhibe propiedades antimicrobianas por sí mismo, sino que debe incorporarse con otras biomoléculas para poder ser empleadas de forma eficiente en aplicaciones biomédicas. Los dos posibles mecanismos de acción antibacteriana de las AuNP's son los siguientes[31]:

1. Cuando las AuNP's entran en la célula bacteriana alteran su potencial de membrana y así inhiben la enzima ATP sintasa, reduciendo los niveles de ATP que conducen a un colapso en el metabolismo energético y la muerte de las células bacterianas.
2. Las AuNP's inducen la muerte celular en bacterias resistentes a múltiples fármacos mediante mecanismos independientes de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Las AuNP's entrecruzadas con colágeno pueden fácilmente ser integradas con otras biomoléculas como polisacáridos, factores de crecimiento, péptidos y moléculas de adhesión celular por unión a la superficie del nanomaterial sin cambiar la estructura del colágeno. Estas nanopartículas modificadas muestran propiedades como biocompatibilidad y biodegradabilidad, y pueden ser empleadas ampliamente en la regeneración de heridas. Además del colágeno,

gelatina y quitosano pueden ser fácilmente incorporados con AuNP's mostrando efectos seguros y positivos para mejorar la cicatrización de heridas[32,33].

Otra propiedad importante de las AuNP's es su propiedad inmunomodulatoria. Nanopartículas de silica-oro core-shell (SiO<sub>2</sub>-Au) aplicadas en heridas in vivo promueven la cicatrización de heridas, lo cual está relacionado con las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes de las AuNP's. Evaluación in vivo no mostró citotoxicidad algunas de los compósitos[34]. Por otro lado, AuNP's combinadas con galato de epigallocatequina y ácido  $\alpha$ -lipoico aplicados en la recuperación de heridas en ratones diabéticos, mostraron una aceleración significativa en el proceso de cicatrización a través de regulación de la angiogénesis y efectos antiinflamatorios. La inmunotransferencia mostró una disminución significativa de la expresión de CD68, mientras que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) aumentó significativamente después del tratamiento[35].

El compósito de quitosano-AuNP's aumenta varias veces la actividad de eliminación de radicales libres de las AuNP's y proporciona una biocompatibilidad mejorada. Además, en la síntesis de AuNP's, el quitosano policatiónico sirve como una molécula intermediaria importante. En un estudio donde se ha empleado un compósito de quitosano-AuNP's en un modelo de herida quirúrgica en rata, el material aumentó la homeostasis, incrementó la formación de tejido epitelial con una velocidad de recuperación más rápida, y un mejor cierre de heridas en contraste con los apósitos Tegaderm estándar o el apósito de quitosano solo[36].

Se ha reportado que los compósitos de colágeno y nanopartículas de oro producen una respuesta de curación de heridas en la piel de una manera

dependiente de la dosis[37]. Además, se ha realizado un estudio sobre cultivo de fibroblastos criopreservados junto con nanopartículas de oro para el tratamiento de quemaduras en ratas. Los efectos antimicrobianos y antioxidantes de las nanopartículas de oro demostraron ser muy efectivos en la cicatrización de heridas y la regeneración de tejidos de colágeno dañados[38]. Las nanopartículas de oro participan en la secreción de proteínas (IL-8, IL-12, VEGF y TNF- $\alpha$ ) que son candidatas importantes para la cicatrización de heridas a través de su actividad antiangiogénica y antiinflamatoria[39].

### *1.3. Objetivo general y específicos.*

En el presente trabajo se plantea el uso de quitosano, metacrilato de glicidilo y colágeno tipo I para generar un nanocompósito con buenas propiedades mecánicas, que permitan la regeneración epitelial de una herida generada en el lomo de ratas, como animales de prueba; evaluando su efecto sobre los procesos inflamatorios y antinflamatorios, además de su capacidad de apoyar a una regeneración más correcta del tejido cutáneo herido.

Los objetivos específicos del trabajo han sido:

- Realizar un nanocompósito conformado de quitosano, metacrilato de glicidilo, colágeno tipo I y nanopartículas de oro.
- Evaluar las propiedades mecánicas de los nanocompósitos obtenidos
- Evaluar la viabilidad celular del nanocompósito y su efecto sobre la regeneración de tejido cutáneo herido en el lomo de ratas, como animales de prueba.

## **Capítulo II.- Caracterización y evaluación de nanocompuestos basados en quitosano y nanopartículas de oro en la cicatrización de heridas cutáneas.**

Como se mencionó con anterioridad, las aplicaciones y estudios de las nanopartículas de oro han tenido un incremento en los últimos años. Principalmente se han buscado procesos con los cuales poder obtener nanopartículas con una forma y tamaño homogéneo[40–42], además que se han mejorado y evaluado varias propiedades ópticas, eléctricas, mecánicas, biomédicas, entre otras[43]. Dichas propiedades permiten aplicaciones como acarreadores de fármacos, desarrollo de sensores, catalizadores y remediación del medio ambiente[44,45].

Dentro de los modelos animales, el ratón es usado para la investigación en la cicatrización de heridas cutáneas, y se ha observado que a bajas concentraciones de nanopartículas de oro se incrementa la proliferación celular y la producción de citoquinas[39,46]. El pequeño tamaño de las partículas ofrece la posibilidad de anclar moléculas a su superficie para poder interactuar con la membrana lipídica y sean capaces de entrar en el estrato córneo de la piel[47].

Los componentes de oro se han usado como agentes antiinflamatorios debido a que pueden inhibir el factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Adicionalmente, se ha demostrado que reducen las especies reactivas de oxígeno y que el complejo





formado entre la vitamina E y las nanopartículas de oro puede aumentar la actividad antioxidante actuando como catalizador de las reacciones de transformación de NADH a NAD[48].

El quitosano (CTS) es un polímero natural biocompatible, biodegradable y no tóxico con propiedades antibacterianas. Además, debido a su estructura química y su superficie activa, es capaz de interactuar con diferentes moléculas orgánicas como aminoácidos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. El CTS se ha evaluado solo y con nanopartículas para ayudar a la regeneración de heridas.

El metacrilato de glicidilo (GMA) es un monómero sintético el cual puede ser funcionalizado con CTS en una solución acuosa, produciendo un hidrogel híbrido natural-sintético (CTS-g-GMA), el cual tiene una mejora de aproximadamente el 25% en sus propiedades mecánicas[49,50]. El GMA es usado con diferentes propósitos como la regeneración de diferentes tejidos, como hueso, cordón espinal y cartílago, con excelentes resultados[51–55].

Por último, el colágeno es una proteína principalmente encontrada en los componentes de la matriz extracelular de varios tejidos, tales como el hueso, tendones, piel y tejidos conectivos[56]. El colágeno tipo I está presente en la piel humana en concentraciones de entre 75-80%[57].

## *2.1. Antecedentes*

Cualquier material pensado para ser aplicado en ingeniería de tejidos debe tener las siguientes características: biocompatibilidad con los tejidos, buenas propiedades mecánicas, biodegradabilidad y carecer de toxicidad. En el 2009,



Muzarelli *et. al.* demostraron que el CTS induce la activación de macrófagos, regeneración epitelial y cicatrización. Otros estudios determinaron que el quitosano incrementa la fagocitosis, el TGF- $\beta$ , la producción del factor de crecimiento de plaquetas, el IL-8 y la proliferación de fibroblastos disminuyendo la producción de IL-1; todas estas propiedades inducen un tejido granular y regulan la deposición de fibras de colágeno lo cual contribuye a un proceso de cicatrización de herida cutánea[51].

Mientras que algunas nanopartículas con CTS se han empleado con el propósito de ser aplicadas en la regeneración e ingeniería de tejidos, se ha comprobado que el CTS con nanopartículas de plata puede ser empleado como un recubrimiento para heridas, tipo gasa, debido a su alta propiedad antibacteriana y biocompatibilidad celular con fibroblastos humanos[58]. Por otro lado, CTS con BaTiO<sub>3</sub> nanoestructurado mostró una excelente biocompatibilidad con el mismo tipo de células[59].

Nanocompuestos de CTS-AuNP's han mostrado unas excelentes propiedades para su aplicación en ingeniería y regeneración de tejidos, con el único inconveniente de carecer de buenas propiedades mecánicas. Elizalde *et. al.* comprobó que estos hidrogeles pueden cambiar sus propiedades mecánicas, su viscosidad y el índice de hinchazón del CTS, al emplear una relación molar correcta entre los componentes. Al hacer estas modificaciones, este material puede ser utilizado como soporte celular en aplicaciones biomédicas[49].

## 2.2. *Materiales y metodología.*

### 2.2.1. Preparación del nanocompósito.

Todos los reactivos fueron comprados en Sigma Aldrich® y fueron utilizados sin purificación previa. Los nanocompositos de oro (CTS-AuNP's) fueron sintetizadas por reducción química, disolviendo 2% w/v de quitosano (peso molecular promedio de 300,000 g/mol y un grado de desacetilación del 85%) en 0.4 M de solución de ácido acético. Después se adicionó una solución de HAcCl<sub>4</sub> a concentraciones de 0.15, 0.3, 0.6 y 1.07 mM. La solución fue agitada y calentada a 90°C bajo una agitación magnética hasta que la solución cambio de color de amarillo ligero a rojo-vino.

CTS-g-GMA fue sintetizado mediante una reacción donde los dos componentes con una relación masa de 1:4 (CTS:GMA) y 0.25 g de quitosano disuelto en ácido acético 0.4 M fueron mezclados, y 1 g de GMA fue agregado a la solución, junto a un 15% w/v de 0.05 M de KOH. La solución se conservó a 60°C por 2 horas, con agitación magnética constante y flujo de nitrógeno, para posteriormente inducir la precipitación del compuesto con acetonitrilo, según lo reportado por Elizalde *et. al.* (2013)[49].

Para elaborar los nanocompósitos de (CTS-g-GMA)-AuNP's, CTS-g-GMA fue disperso en agua destilada por 24 horas previo a agregar la solución de quitosano y H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> con diferentes concentraciones de oro, manteniendo la solución a 60°C por una hora para mantenerla en condiciones estables.

Por último, el tercer nanocompósito (CTS-g-GMA)-AuNP's-Col fue preparado usando el proceso descrito previamente con un paso adicional al final. Se incorporó una solución al 0.3% de colágeno tipo I en ácido acético, manteniendo

en agitación magnética constante por 2 horas a temperatura ambiente para estabilizarlo. Las películas delgadas de los diferentes compósitos (grosor de 30 mm) fueron preparadas por la técnica de Solvent Casting, en el cual se coloca la solución final en una caja Petri de plástico y son secados a 60°C por 24 horas para permitir la evaporación del solvente.

### 2.2.2. Caracterización.

Los nanocompósitos (CTS-g-GMA)-AuNP's fueron caracterizados por espectroscopia infrarroja (FTIR). Los espectros fueron obtenidos de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  usando un espectrofotómetro FTIR (Perkin Elmer Spectrum 1 Model). Todos los espectros fueron generados con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y 16  $\text{cm}^{-1}$  usando una técnica de transmisión[60].

La morfología y tamaño de las nanopartículas en las películas de (CTS-g-GMA)-AuNP's y CTS/AuNP's fue analizada mediante un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo JEOL JSM-7401F.

El análisis de estructura cristalina fue realizado usando un difractor Rigaku ULTIMA IV, equipado con una radiación de  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$ ).

El espectro ultravioleta-visible (Espectrómetro UV-Vis Agilent 8453) fue usado para determinar el tamaño de las nanopartículas de oro, mediante la detección de la banda de absorción máxima en la región visible.

La conductividad eléctrica DC fue calculada mediante medidas de impedancia según la metodología descrita por Heilmann (2003)[61].

### 2.2.3. Viabilidad celular.

Ratones Balb/c de 6 semanas de edad fueron sacrificadas por dislocación cervical, y los macrófagos peritoneales residentes fueron obtenidos por lavados repetidos y se recuperó la cavidad peritoneal con 10 mL de RPMI-1640 frío y estéril. Por otro lado, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fue aislada de la sangre periférica obtenida de donadores normales; la sangre fue diluida con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) en una relación 1:1 (vol/vol) y centrifugada en un gradiente de Ficoll-Paque por 30 minutos a 500 x g a temperatura ambiente, la capa de interfase que consiste en PBMC se lavó tres veces con un medio de cultivo. La línea de células cancerígenas HEPG2 derivadas de carcinoma hepatocelular de hígado humano fueron compradas de ATCC (American Tumor Cancer Collection, USA) y cultivado en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% solución antibiótica-antimicótica (GIBCO, Grand Island, NY, USA), en una atmósfera a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron diluidas a 5x10<sup>3</sup> células/mL y depositadas en los diferentes nanocompósitos previamente transferidas a placas de 96 pocillos (Corning, USA) e incubados por 72 horas en atmósfera ambiente a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. La viabilidad celular fue evaluada por MTT o tinción con azul de tripano, según las instrucciones del fabricante.

### 2.2.4. Determinación de óxido nítrico.

Los sobrenadantes de cada tratamiento fueron usados para determinar la producción de óxido nítrico con un kit de ensayo colorimétrico nitrato-nitrito (Cayman Chemical, USA) acorde a las instrucciones del fabricante.



Para esto, 40  $\mu\text{L}$  de los sobrenadantes fueron mezclados con 40  $\mu\text{L}$  del amortiguador del ensayo, 10  $\mu\text{L}$  del cofactor de enzima y 10  $\mu\text{L}$  de nitrato reductasa e incubado a temperatura ambiente por 3 horas (para permitir la conversión de nitrato a nitrito). Después de 10 minutos de incubación con el reactivo de Griess a temperatura ambiente, la absorbancia fue medida de 560 nm en un lector de microplato (Winooski, VT, model EL311 USA).

### 2.2.5 Evaluación de la expresión de citoquinas por citometría de flujo.

La producción de citoquinas fue analizada mediante una matriz de gránulos citométrica BD (CBA) de citoquinas de ratón Th1/Th2/Th17. Para la evaluación, bazos sanguíneos fueron tomados de ratones 48 horas después de generar la herida cutánea, homogeneizada en PBS (500 $\mu\text{L}$ ) y el sobrenadante fue recolectado por centrifugación a 1600 rpm/10 minutos y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las citoquinas evaluadas fueron diferentes interleuquinas (IL) como IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, INF $\gamma$  y TNF.

La producción de citoquinas fue medida mediante una citometría de flujo (BD Accuri C6, BD Biosciences, San José California, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y el análisis de CBA fue realizado empleando un FCAP array v1.0 software (Soft Flow Inc., USA).

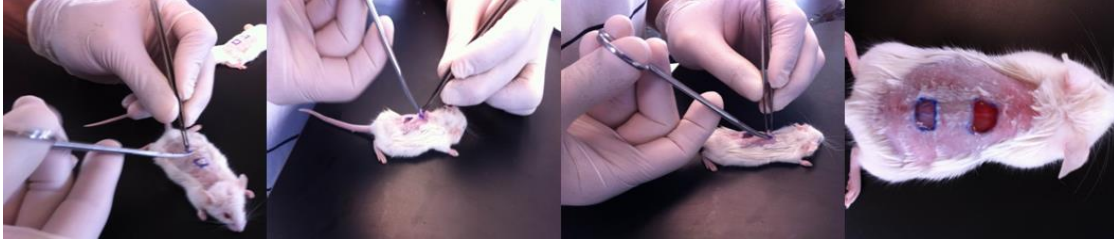
## 2.2.6. Efecto cicatrizante de heridas cutáneas.

El efecto cicatrizante de heridas cutáneas sobre piel de ratón fue investigado empleando nanocompuestos de CTS-g-GMA, (CTS-g-GMA)-AuNP's y (((CTS-g-GMA)-AuNP's)-Col) con diferentes concentraciones de  $\text{HAuCl}_4$  (0.15, 0.3, 0.6, 1.07, 2 y 3 mM). Adicionalmente, un material comercial TheraForm™ (matriz natural de cicatrización de heridas de atelocolágeno altamente purificado) (Regenerative Medical System Industry, Japan) fueron usados como control positivo. Las películas fueron cortadas en cuadrados con dimensiones de  $8 \times 8 \text{ mm}^2$ ; después, películas cuadradas fueron primeramente lavadas dos veces con 600  $\mu\text{L}$  de PBS por 5 minutos y posteriormente lavadas tres veces con 600  $\mu\text{L}$  de DMEM por 5 minutos, finalmente los materiales fueron esterilizados por luz ultravioleta (CL-100 UV) por 10 minutos.

Animales experimentales fueron tratados acorde a los criterios descritos en Política del PHS sobre el cuidado humano y el uso de animales de laboratorio y la “guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio”. Ratones hembra Balb/C de 6 semanas de edad (22 g de peso corporal) fueron criados en cajas de policarbonato a temperatura ambiente con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Cada animal fue anestesiado intramuscularmente con hidrocloreuro de ketamina 100mg/kg y xilacina 5mg/kg[62]. Después de esto, la espalda de los roedores fue rapado e hisopado con 70% de etanol tres veces antes de generar la herida.

Dos cuadros de piel de  $5 \times 5 \text{ mm}$  (dermis y epidermis) sobre la espalda fueron perforados en el área rapada. Los nanocompuestos o material control fueron implantados en la herida cercana a la cabeza, mientras que la herida cercana a la cola fue usada como control negativo sin material, tal como se muestra en la Figura 2.1).

Después de cirugía, las lesiones fueron evaluadas diariamente por 40 días acorde con los parámetros establecidos por el manual de heridas y úlceras en la guía OECD 404[63] (Tabla S1).



**Figura 2.1.-** Proceso de cirugía. Las lesiones cerca de la cabeza fueron implantadas con nanocompósitos o TheraForm como control positivo y la localizada cerca de la cola del ratón fue usado como control negativo en el proceso de cicatrización de heridas.

## 2.2.7. Análisis estadístico.

Todos los experimentos fueron evaluados por triplicado y el análisis estadístico fue realizado usando un análisis de variación (ANOVA). Los resultados fueron considerados estadísticamente significantes si el valor  $p$  fue  $<0.05$ .

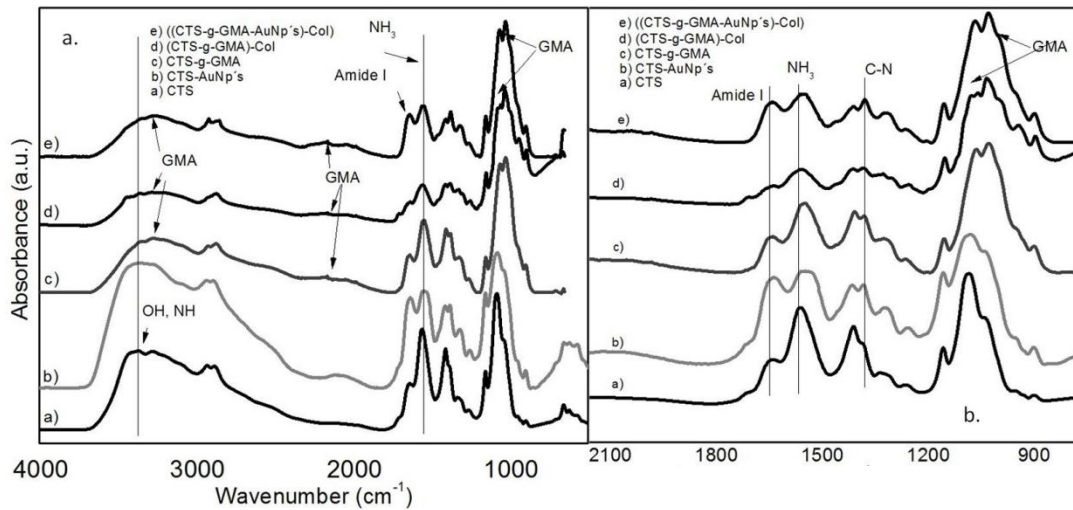
## 2.3. Resultados y discusión

### 2.3.1. Espectroscopía Infrarroja.

La Figura 2.2 muestra los espectros IR de los diferentes materiales CTS, CTS-AuNP's, (CTS-g-GMA)-AuNP's y (CTS-g-GMA)-AuNP's)-Col. Los espectros permiten observar la diferencia entre todos los materiales. La intensidad relativa de la banda ancha centrada alrededor de  $3300\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a los



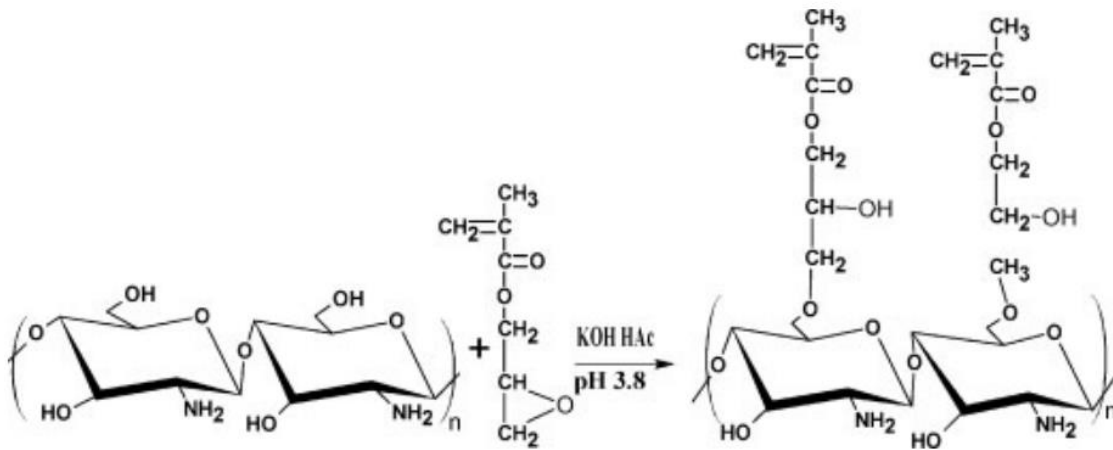
estiramientos de los grupos O-H, y de bandas a 1070 y 1020  $\text{cm}^{-1}$  relacionadas con las vibraciones de estiramiento asimétrico de los grupos éter de metacrilatos, disminuyen en los materiales con GMA.



**Figura 2.2.a-** Espectros infrarrojos obtenidos de quitosano puro (CTS) y nanocompuestos con quitosano y nanopartículas de oro (CTS-AuNP's), quitosano y glicidil metacrilato (CTS-g-GMA), quitosano, glicidil metacrilato y colágeno tipo I ((CTS-g-GMA)-Col) y nanocompuesto compuesto ((CTS-g-GMA-AuNP's)-Col). **b.** Acercamiento a la región con mayor contribución de 1700 a 900  $\text{cm}^{-1}$ .

La intensidad relativa de los grupos primarios amida relacionados con la vibración de estiramiento de enlaces C=O a 1650  $\text{cm}^{-1}$ , disminuyó específicamente para los nanocompuestos de (CTS-g-GMA)-Col y ((CTS-g-GMA-AuNP's)-Col). Las vibraciones de torsión de NH<sub>3</sub>, localizadas a 1550  $\text{cm}^{-1}$ , mostraron una disminución en su intensidad relativa y un cambio a longitud de onda mayor (cambio rojo) para las muestras de los compósitos, en comparación con el quitosano puro. Adicionalmente, podemos observar variaciones en las bandas a 1400 y 1421  $\text{cm}^{-1}$  producidas por el estiramiento de los grupos C-N y vibraciones de CH<sub>2</sub>-CO. El GMA tiene un grupo epoxi característico que no aparece en los espectros infrarrojos de los nanocompuestos,

debido a la reacción que ocurre entre el GMA y el CTS, siendo el grupo epoxi el grupo funcional que reacciona con un grupo OH del quitosano (Figura 2.3). Las características de las bandas de absorción del quitosano puro se enlistan en la Tabla 2.1.



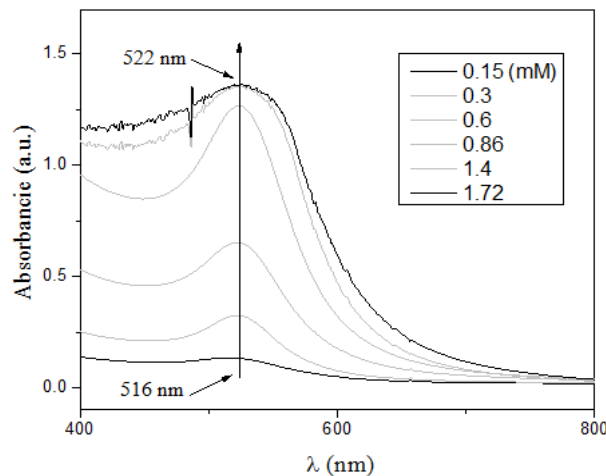
**Figura 2.3-** Reacción entre CTS y GMA.

**Tabla 2.1.-** Caracterización de grupos funcionales de quitosano puro

Functional group	Peak position (cm <sup>-1</sup> )
OH (Stretching S.)	3450
NH (Stretching S.)	3360
CH <sub>2</sub> (Stretching S.y As glucopyranose)	2870 y 2912 y 1430
C=O (Stretching As amide I)	1650
NH <sub>2</sub> (Deformation As.)	1560-1590
C=O	1730
CH <sub>2</sub> (amide II)	1420
CH <sub>3</sub> and C-CH <sub>3</sub> (amide III)	1380
C-O	1255
C-O-C (glycosidic bond)	1150-1040
C-H	838-850

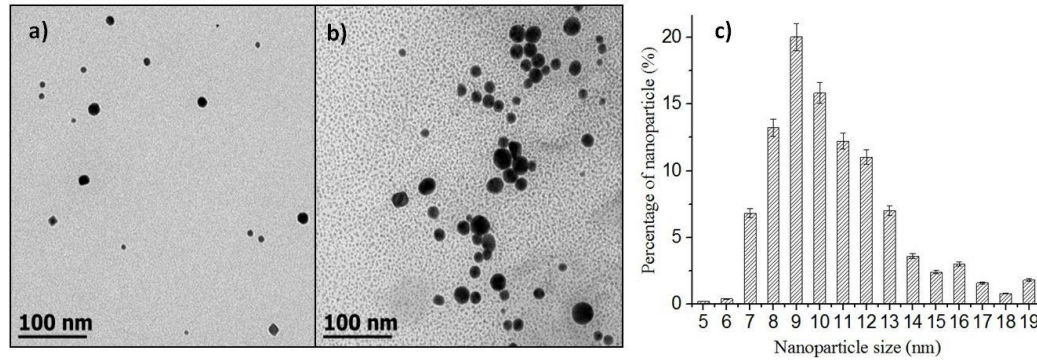
### 2.3.2. Tamaño y estabilidad de las AuNP's.

Los espectros UV-Vis de AuNP's puras en medio líquido, sintetizadas con diferentes concentraciones de  $\text{HAuCl}_4$  (Figura 2.4) muestran una banda de absorción máxima en un rango de 516 y 522 nm. Este ligero cambio de color puede deberse a una ligera variación en el tamaño de partícula.

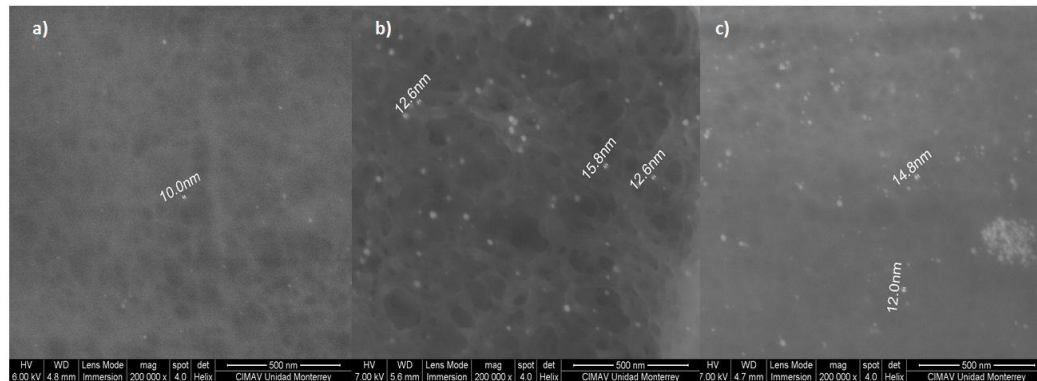


**Figura 2.4-** Espectros UV-Vis de muestras líquidas de nanopartículas de oro sintetizadas con diferentes concentraciones de precursor.

La Figura 2.5 muestra la micrografía SEM de AuNP's puras sintetizadas en medio líquido con las concentraciones mínima y máxima del precursor (0.3 mM y 1.72 mM correspondientemente). El tamaño promedio fue de 8 a 20 nanómetros, lo cual es consistente con la información obtenida en los espectros UV-Vis. La Figura 2.6 muestra la micrografía SEM de las películas con nanopartículas de oro, con concentraciones de 0.3 (a), 0.6 (b) y 1.07 (c) mM, embebidas dentro de una matriz de quitosano. En todos los casos, la distribución de nanopartículas es aparentemente homogénea en la matriz y no se observan clústeres.



**Figura 2.5-** Microscopía de AuNP's obtenidas desde una solución con a) 0.3 y b) 1.07 mM de HAuCl<sub>4</sub>. C) Histograma de distribución de tamaño de partícula obtenido desde micrografías SEM.

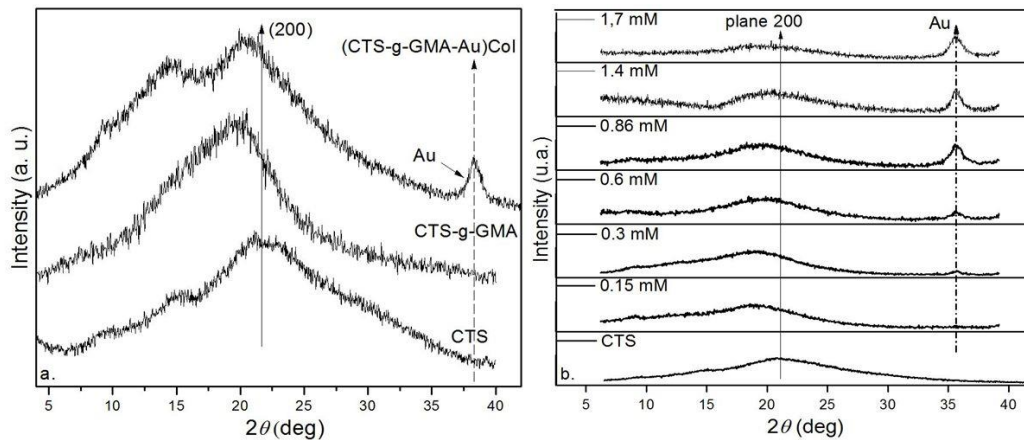


**Figura 2.6-** Micrografías de Microscopía Electrónica de Barrido de CTS-g-GMA-AuNP's-Col nanocompuestos, a) 0.3 mM, b) 0.6 mM, c) 1.07 mM.

### 2.3.3. Difracción de Rayos-X (XRD)

Quitosano puro es un biopolímero semicristalino y tiene un patrón XRD con picos anchos alrededor de  $2\theta^\circ = 15^\circ$  y  $20^\circ$ , indicando la distancia intermolecular promedio de las partes cristalinas del quitosano puro cristalizado en una celda unitaria ortorrómbica[64]. La Figura 2.7a, muestra la difracción de rayos-X de quitosano puro (CTS), de CTS-g-GMA y de (CTS-g-GMA-AuNP's)-Col. Las diferencias principales en los patrones de XRD son la amplia línea de difracción alrededor de 20 grados ((200) reflexión) y en la escala  $2\theta$ , la cual sufre un

incremento en la intensidad y disminuye en su posición en los compósitos con respecto al quitosano puro. Los planos de reflexión alrededor de los 20 grados tienen contribución tanto de la fase amorfa como de la cristalina II[65,66] (Figura 2.7). La línea de difracción cerca de los 37 grados corresponde a los planos (111) en la estructura cúbica de las AuNP's. En la Figura 6b, la intensidad de las líneas incrementa con la concentración de las AuNP's.



**Figura 2.7.a-** Espectros de CTS comparados con CTS-g-GMA and (CTS-g-GMA-AuNP's)-Col. **b.** Difracción de Rayos X de nanocompuestos de quitosano y nanopartículas de oro con diferente concentración de HAuCl<sub>4</sub>.

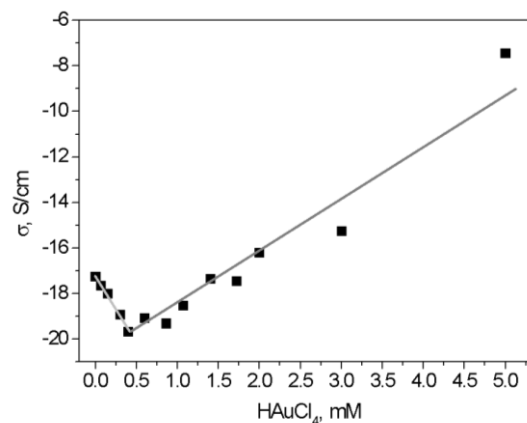
### 2.3.4. Mediciones de conductividad.

De acuerdo con la teoría de los medios efectivos, la conductividad de DC en una matriz dieléctrica debe aumentar con inclusiones conductoras[61]. En nuestros resultados, la incorporación de AuNP's resulta en una disminución en la conductividad para concentraciones debajo de 0.5 mM, mientras que incrementa conforme la concentración de AuNP's aumenta por arriba de dicho valor.

Para concentraciones por arriba de 5.0 mM, la conductividad tiene un incremento exponencial de más de 12 órdenes de magnitud. La disminución inicial en la

conductividad puede ser explicada debido a la interacción de las AuNP's con la matriz de quitosano. Esta interacción reduce la humedad (Figura 2.2) y, por lo tanto, del número de iones  $H^+$  y  $OH^-$  libres, los cuales son los responsables de la conductividad intrínseca en el quitosano puro[67].

El incremento exponencial en la conductividad con el incremento en la concentración de nanopartículas es debido a la percolación del sistema, con un incremento en el número de caminos conductores en la matriz del compuesto al aumentar la concentración de nanopartículas de oro, lo cual conlleva a un incremento en la conductividad. Estos valores mínimos de conductividad aparecen debido a la competencia de dos mecanismos: disminución del número de iones  $H^+$  y  $OH^-$  libres contra el incremento de conductancia metálica de las nanopartículas embebidas (Figura 2.8).

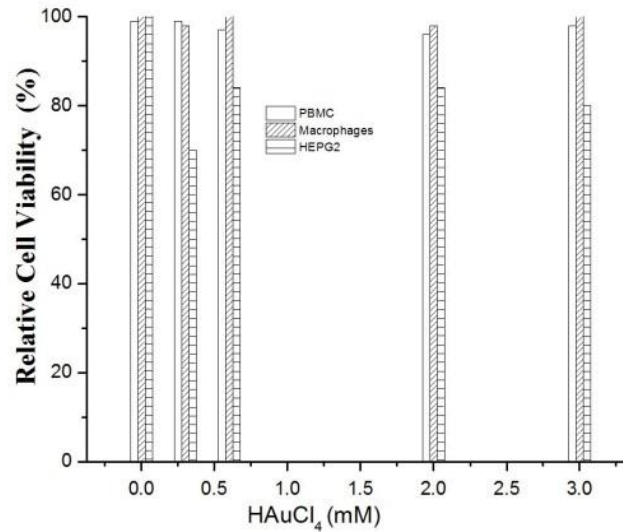


**Figura 2.8-** Dependencia de la conductividad DC de las películas a temperatura ambiente con respecto a la concentración de HAuCl<sub>4</sub>.

### 2.3.5. Viabilidad celular.

Los nanocompuestos con diferentes concentraciones de nanopartículas de oro (0.3, 0.6, 2 y 3 mM) no afectan la viabilidad celular de macrófagos peritoneales murinos y PBMC ( $p < 0.05$ ) comparado con células sin tratamiento (0%) (Figura

2.9). Por otro lado, los diferentes nanocompuestos afectan significativamente ( $p < 0.05$ ) la viabilidad de células HEP-G2 0.3 (30%), 0.6 (20%), 2 (16%), 3 (16%) en comparación con las células sin tratamiento (0%).

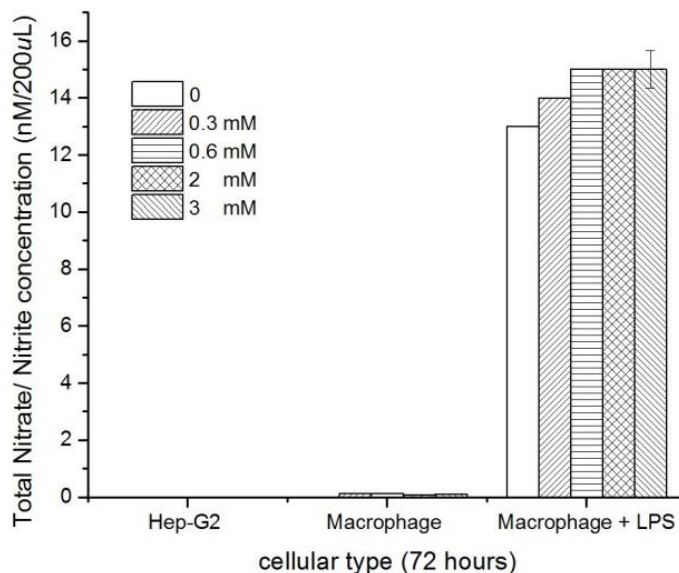


**Figura 2.9.-** Viabilidad celular relativa de células PBMC, Macrófagos y HEP-G2 en presencia de diferentes concentraciones de AuNP's (0.6, 0.6, 2 and 3 mM).

### 2.3.6. Producción de óxido nítrico

Los diferentes nanocompuestos evaluados no inducen ( $p < 0.001$ ) la producción de óxido nítrico en los macrófagos peritoneales murinos y células HEP-G2, comparado con el tratamiento de lipopolisacáridos (LPS) que inducen una respuesta inflamatoria y una alta producción de óxido nítrico (Figura 2.10).





**Figura 2.10.-** Producción de óxido nítrico de HEP-G2 y macrófagos debido a la exposición a diferentes concentraciones de AuNP's, en comparación a las células bajo un tratamiento de LPS con diferentes concentraciones de AuNP's.

### 2.3.7. Citometría de flujo para la producción de citoquinas.

En este estudio, se evaluó los efectos de algunos materiales sobre la respuesta inflamatoria en condiciones fisiológicas, mediante la evaluación de citoquinas proinflamatorias (TNF, IL-2 e IL-17A) y antiinflamatorias (IL-4 e IL-10). La citoquina IL-6 desempeña un efecto pro y antiinflamatorio[68–71].

Los resultados demuestran que TheraForm, el material comercial empleado como control, induce la producción de citoquinas, como era esperado. En comparación con dicho producto, el material sin nanopartículas, CTS-g-GMA, induce significativamente ( $p < 0.05$ ) una mayor producción de citoquinas IL-2 e IL-4, pero no existe diferencia significativa en los otros nanocompuestos evaluados.



La producción de IL-6 fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) para CTS-g-GMA, (CTS-g-GMA)-AuNP's 0.15 mM, ((CTS-g-GMA)-AuNP's)-Col 0.15 mM; mientras que es más significativo ( $p < 0.001$ ) para ((CTS-g-GMA)-AuNP's)-Col 0.6 mM, (CTS-g-GMA)-AuNP's 2 mM y (CTS-g-GMA)-AuNP's 3 mM. No se encontró diferencia significativa para los otros nanocompuestos. La producción de INF $\gamma$  fue inducida significativamente ( $p < 0.05$ ) en los ratones tratados con CTS-g-GMA y (CTS-g-GMA)-AuNP's 0.15 mM (Tabla 2.2).

Una diferencia significativa fue encontrada en la producción de TNF para los materiales CTS-g-GMA, (CTS-g-GMA)-AuNP's 0.15 mM, ((CTS-g-GMA)-AuNP's)-Col 0.15 mM, ((CTS-g-GMA)-AuNP's)-Col 0.6 mM, (CTS-g-GMA)-AuNP's 1.07 mM, ((CTS-g-GMA)-AuNP's)-Col 1.07 mM y (CTS-g-GMA)-AuNP's 2 Mm; mientras que los otros materiales no tienen diferencia significativa comparado con el material comercial TheraForm (Tabla 2.2).

La producción de IL-17A fue significativa ( $p < 0.05$ ) solo para CTS-g-GMA, (CTS-g-GMA)-AuNP's 0.15 mM, and ((CTS-g-GMA)-AuNP's)-Col 0.15 mM. Adicionalmente, hubo diferencia significativa entre los ratones tratados con CTS-g-GMA, (CTS-g-GMA)-AuNP's 0.15 mM, y ((CTS-g-GMA)-AuNP's)-Col 0.15 mM comparado con TheraForm (Tabla 2.2). Además, la expresión de citoquinas en el bazo no mostro diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los nanocompuestos evaluados y TheraForm (Tabla 2.3)

**Tabla 2.2.-** Inducción de citoquinas séricas debido a la exposición con Au/Nanocompósitos

Serum Cytokines (pg/mL)							
Treatment [mM]	IL-2	IL-4	IL-6	INFY	TNF	IL-17A	IL-10
TheraForm	0.28	2.87	2.04	2.97	2.12	0	1.84
CTS-g- GMA	3.94*	9.5*	26.15*	11.1*	39.84*	4.93*	31.12*
((CTS-g- GMA)-AuNP's [0.15])	0.53	2.47	17.27*	17.3*	6.4*	1.74*	7.5*
((((CTS-g- GMA)-AuNP's)-Col) [0.15])	0.32	3.3	11.2*	4.64	13.59*	0.93*	14.67*
((CTS-g- GMA)-AuNP's [0.6])	0.45	0	2.26	5.46	4.38	0.21	1.21
((((CTS-g- GMA)-AuNP's)-Col) [0.6])	0	0	94.06**	2.34	9.86*	0.65	0
((CTS-g- GMA)-AuNP's [1.07])	0	0	2.44	0.83	5.59*	0	0
((((CTS-g- GMA)-AuNP's)-Col) [1.07])	0	0	2.63	0.87	7.06*	0	0
((CTS-g- GMA)-AuNP's [2])	0	0	944.26**	2.44	27.21*	0.34	0
((CTS-g- GMA)-AuNP's [3])	0	0	174.58**	2.98	1.78	0.11	0

$p < 0.05^*$   $p < 0.001^{**}$

**Tabla 2.3.-** Inducción de citoquinas de bazo por exposición con Au/Nanocompuestos.

Treatment [mM]	Serum Cytokines (pg/mL)						
	IL-2	IL-4	IL-6	INF $\gamma$	TNF	IL-17A	IL-10
TheraForm	1.79	0	0.63	7.3	19.7	0	0
CTS-g- GMA	0.67	0	0.48	3.63	10.08	0	1.32
((CTS-g- GMA)-AuNP's [0.15])	1.23	0	1	8.58	19.95	0	3.23
((((CTS-g- GMA)-AuNP's)-Col) [0.15])	0.8	0	0.78	3.31	9.67	0.04	0
((CTS-g- GMA)-AuNP's [0.6])	0.9	0	0.88	3.42	29.52	0	0
((((CTS-g- GMA)-AuNP's)-Col) [0.6])	0.68	0	0	2.76	9.41	0.11	0
((CTS-g- GMA)-AuNP's [1.07])	0.71	0	0	4.9	7.91	0	4.91
((((CTS-g- GMA)-AuNP's)-Col) [1.07])	0.7	0	0.48	4.71	14.11	0	0
((CTS-g- GMA)-AuNP's [2])	1.25	0	1.35	2.06	7.56	0.16	0
((CTS-g- GMA)-AuNP's [3])	0.32	0	0	6.16	8.35	0	0

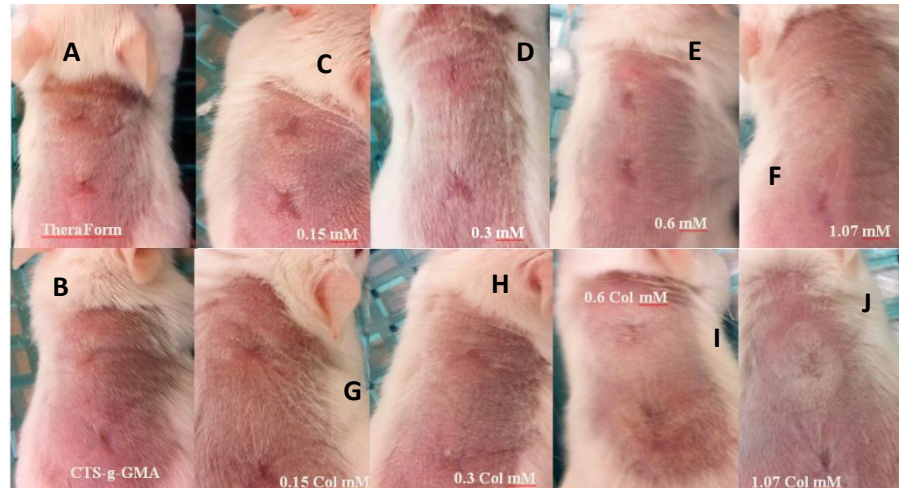
### 2.3.8. Prueba de regeneración de tejido cutáneo

Todos los nanocompuestos evaluados y TheraForm indujeron en los ratones un proceso de recuperación a los siete días, clasificados como herida puntuable tipo I (Table S1), caracterizadas por aspecto eritematoso, extensión de lesión <1cm, profundidad de lesión <1 cm, cantidad y calidad del exudado ausente, ausencia de tejido necrótico, tejido granular 100-75%, edema ausente, dolor 0-1, piel circundante sana. En el día uno, los porcentajes de recuperación en la herida, cicatrización de herida, no mostraron diferencia entre los tratamientos, pero al tercer día, los tratamientos con ((CTS-g-GMA)-AuNP's)-Col 0.3 y 0.6 mM

fueron más acelerados (25% ambos) que TheraForm y los otros nanocompuestos evaluados (12.5%).

Al séptimo día, el nanocompuesto ((CTS-g-GMA)-AuNP's)-Col 1.07 mM indujo 62.5% de cicatrización de herida comparado con los nanocompuestos que contenían menor concentración de nanopartículas de oro, 0.6, 0.15 y 0.3 mM (50%, 37.5% y 37.5% respectivamente). Incluso indujeron un mejor porcentaje que el producto comercial, TheraForm (37.5%). La ausencia de las nanopartículas de oro en el nanocompuesto CTS-g-GMA, retrasó el proceso de cicatrización de la herida (25%). Datos similares fueron observados a los 18 días. Otros trabajos usando diferentes matrices poliméricas y nanopartículas de oro han tenido resultados similares, pero la forma, modificación de superficie y el método de síntesis de las nanopartículas tienen un efecto crucial sobre la cicatrización de la herida cutánea[39,72].

Después de 21 días de tratamiento, no existe diferencia significativa entre la cicatrización total entre las heridas con y sin tratamiento. Las heridas tratadas con ((CTS-g-GMA)-AuNP's)-Col muestran mejor aspecto cosmético tal como menor profundidad y pigmentación de la piel. En general, todas las heridas tratadas y no tratadas permitieron el crecimiento de nueva piel sin infección o señales de inflamación durante la cicatrización de la herida durante los 40 días evaluados (Figura 2.11).



**Figura 2.11.-** Recuperación de piel después de 40 días de tratamiento con Theraform (A), CTS-g-GMA (B), CTS-g-GMA-AuNP's a diferentes concentraciones, 0.15 mM (C), 0.3 mM (D), 0.6 mM (E), 1.07 mM (F); and CTS-g-GMA-AuNP's-Col a diferentes concentraciones, 0.15 mM (G), 0.3 mM (H), 0.6 mM (I), 1.07 mM (J).

## 2.4. Conclusiones

La interacción entre quitosano y nanopartículas de oro fue demostrada por espectroscopía infrarroja; la relación entre la disminución de la intensidad en la banda a  $1550\text{ cm}^{-1}$  con el incremento en la concentración de oro fue atribuida a la interacción entre  $\text{NH}^{+3}$  y la superficie polarizada de la nanopartícula empleada en nanocompuestos de plata y oro usando quitosano como agente reductor[73,74].

La conductividad de los nanocompuestos depende fuertemente de la concentración de  $\text{HAuCl}_4$  y la humedad. Materiales con concentraciones superiores a 0.5 mM de AuNP's mostraron provocaron la percolación del sistema, dando en un aumento significativo de la conductividad; adicionalmente, la interacción de los grupos -OH y aminas protonadas disminuyó la cantidad de agua libre en el compuesto, lo cual se puede comprobar con los análisis termogravimétricos reportados previamente por nuestro grupo de trabajo[67]. Todos los nanocompuestos con colágeno mostraron mejores resultados que el

material control y los materiales de (CTS-g-GMA)-AuNP's, esto debido a que el uso de colágeno tipo I está mejorando el proceso de cicatrización del tejido, ya que es el componente principal de la dermis intacta y no lesionada[75].

A pesar de que los materiales (CTS-g-GMA)-AuNP's con concentraciones de 2 y 3 mM incrementan la producción de citoquinas IL-6 y disminuyen los niveles de la citoquina IL-17A, estos materiales no pueden ser considerados como óptimos para la reepitelización, debido a ser frágiles.

Es importante que cualquier material usado para cicatrización de heridas cutáneas debería impedir la infección por patógenos o respuesta alérgica, ya que componentes bacterianos, infecciosos o materiales alergénicos pueden contribuir en un deterioro del mecanismo de reparación del huésped por interferencia con las interacciones de la matriz celular o la atenuación de la respuesta inflamatoria[76]. Las nanopartículas de oro muestran una excelente capacidad antibacteriana, que cambia en respuesta a su forma y la modificación de su superficie[72,77], y la luz visible incrementa dicha capacidad[78]. En este trabajo, todos los nanocompuestos evaluados indujeron el proceso de cicatrización sin señales de fiebre, infección, alergia o toxicidad.

La cicatrización de heridas es un proceso dinámico que involucra tres fases superpuestas en el tiempo y espacio: inflamación, formación de tejido y remodelación de tejido; siendo la respuesta inflamatoria el primero de todos. Este primer paso suministra los factores de crecimiento y señales de citoquinas que dirigen el movimiento celular y del tejido necesario para su reparación[76]. El control positivo (TheraForm) presentó una baja producción de citoquinas (IL-2, IL-4, IL-6, INF $\gamma$ , TNF, e IL-10) y una ausencia de IL-17A.



Se esperaba obtener resultados similares a dicho material, sin embargo, se observaron diferencias en la producción de citoquinas de una manera dependiente del compuesto utilizado. No es posible para nosotros saber la producción normal de citoquinas para cada individuo y sería un error generalizar dicha información; esto es considerado en nuestro modelo y se comparó la cicatrización de las heridas entre cada individuo y entre cada grupo, incluyendo las dos heridas por ratón. Después de generar las lesiones, las citoquinas IL-1b, INF-g y TNF generadas en el sitio de la herida conducen a la expresión de varias clases de moléculas para la adhesión, esenciales para la adhesión y diapédesis de los leucocitos (P-and E-selectinas tales como ICAM 1, -2, LFA-1, MAC-1, gp150, quimiocinas y sus receptores).

El nanocompósito CTS-g-GMA-AuNP's-Col con concentración de 0.6 mM de Au fue considerado el mejor material para inducir la cicatrización de heridas cutáneas en menor tiempo, y con un aspecto estético funcional, a través de modular la producción de citoquinas entre inflamatorias y antiinflamatorias. La reparación exitosa de la piel, después de una lesión tisular, requiere la resolución de la respuesta inflamatoria. Mientras que el conocimiento con respecto a los mecanismos y moléculas que inducen y perpetúan la respuesta inflamatoria está constantemente en aumento, los mecanismos que limitan y suprimen dicho proceso son menos apreciados (supresión de expresión de quimiocinas por citoquinas inflamatorias como IL-10 o TGF-B1 o promoción de regulación de moléculas antiinflamatorias como antagonistas del receptor IL-1 o receptor TNF soluble).

McFarland *et. al.*, muestra que los ratones con macrófagos de capacidad disminuida tienen un exceso de fibrina y desechos celulares, lo que retrasa la cicatrización de heridas en comparación con los ratones no tratados, del mismo

modo que observó que en ratones IL-6 silenciados, la cicatrización de heridas fue alentada debido a una mala infiltración de los macrófagos y afectando la reepitelización[79]; adicionalmente, ratones silenciados en IL-7 e IL-10 muestran un proceso de cicatrización más rápido debido a que disminuye el proceso inflamatorio y promueve la angiogénesis[80,81].

La producción de citoquinas en bazo no fue diferente comparado con TheraForm, sugiriendo que este material carece de la capacidad de producir una respuesta sistemática inflamatoria que pueda comprometer la homeostasis del individuo. Los materiales con colágeno y AuNP's mostraron mejor capacidad de recuperación en relación con el control positivo TheraForm y CTS-g-GMA; además que el mejor proceso de cicatrización fue con una concentración 0.6 mM de nanopartículas de oro. Estos resultados demuestran que CTS-g-GMA-AuNP's-Col fue eficiente en acelerar la cicatrización de herida cutánea al mejorar la formación de tejido granulado, la migración de queratinocitos hiperproliferativos, lo cual podría estar asociado con el comportamiento eléctrico, y la concentración de nanopartículas de oro, lo cual hace que este material sea un candidato adecuado para la aplicación de cicatrización de heridas. Es necesario realizar más estudios sobre la correlación entre la producción de citoquinas y el proceso de cicatrización para una mejor comprensión de este mecanismo, además que en futuros trabajos se puede considerar determinar la participación de metaloproteasas de matriz, debido a que estas moléculas juegan un papel en el proceso de tejido de granulación modulando, la formación de tejido cicatricial mediante la producción de matriz extracelular y promoviendo la migración celular que es reducida y cambiada por colágeno tipo III y reemplazada por colágeno tipo I[82].



# APÉNDICES

# Apéndice A - Información suplementaria del Capítulo II.

Tabla S1. Diagrama de valoración de heridas: 1= recuperación, 4 = recuperación limitada. De acuerdo con puntuación la herida se puede clasificar en cuatro tipos.

Valor	1	2	3	4
Aspecto	Eritematoso	Enrojecido	Amarillo	Necrótico
Extensión de la lesión	0-1 Cm	>1-3cm	>3-6 cm	>6 cm
Profundidad de la lesión	0	<1 cm	1-3 Cm	>3 cm
Cantidad de exudado	Ausente	Insuficiente	Moderado	Abundante
Calidad del exudado	Sin exudado	Seroso	Turbio	Purulento
Tejido necrótico	Ausente	< 25	25-50 %	>50 %
Tejido granular	100-75%	< 75-50 %	< 50-25 %	<25 %
Edema	Ausente	+	++	+++
Dolor	0-1	2-3	4-6	7-10
Piel circundante	Sana	Descamada	Eritematosa	Macerada
<b>Clasificación de las heridas por puntuación</b>				
Tipo 1	10 a 15 puntos			
Tipo 2	16 a 21			
Tipo 3	22 a 27			
Tipo 4	28 a 40			

## Bibliografía

- [1] C. Conrad, R. Huss, Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery, *Journal of Surgical Research*. 124 (2005) 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.09.015>.
- [2] A.M. Wobus, K.R. Boheler, Embryonic stem cells: Prospects for developmental biology and cell therapy, *Physiological Reviews*. 85 (2005) 635–678. <https://doi.org/10.1152/physrev.00054.2003>.
- [3] M. Fathi-Achachelouei, H. Knopf-Marques, C.E. Ribeiro da Silva, J. Barthès, E. Bat, A. Tezcaner, N.E. Vrana, Use of Nanoparticles in Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 7 (2019) 1–22. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00113>.
- [4] S. Şenel, S.J. McClure, Potential applications of chitosan in veterinary medicine, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 56 (2004) 1467–1480. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.02.007>.
- [5] B. Sultankulov, D. Berillo, K. Sultankulova, T. Tokay, A. Saparov, Progress in the development of chitosan-based biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine, *Biomolecules*. 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/biom9090470>.
- [6] K.A. Athanasiou, A.R. Shah, R.J. Hernandez, R.G. LeBaron, Basic science of articular cartilage repair, *Clinics in Sports Medicine*. 20 (2001) 223–247. [https://doi.org/10.1016/S0278-5919\(05\)70304-5](https://doi.org/10.1016/S0278-5919(05)70304-5).
- [7] V. Ghormade, E.K. Pathan, M. V. Deshpande, Can fungi compete with marine sources for chitosan production?, *International Journal of Biological Macromolecules*. 104 (2017) 1415–1421. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.112>.
- [8] L. Balau, G. Lisa, M.I. Popa, V. Tura, V. Melnig, Physico-chemical properties of Chitosan films, *Central European Journal of Chemistry*. 2 (2004) 638–647. <https://doi.org/10.2478/BF02482727>.

- [9] M. Fan, Q. Hu, K. Shen, Preparation and structure of chitosan soluble in wide pH range, *Carbohydrate Polymers*. 78 (2009) 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.03.031>.
- [10] R.M.H. Verbeeck, M. Haiben, H.P. Thin, F. Verbeek, Solubility and Solution Behaviour of Strontiumhydroxyapatite, *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie*. 108 (1977) 203–215. <https://doi.org/10.1524/zpch.1977.108.2.203>.
- [11] S. V. Madihally, H.W.T. Matthew, Porous chitosan scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*. 20 (1999) 1133–1142. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00011-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00011-3).
- [12] D. Berillo, B. Mattiasson, H. Kirsebom, Cryogelation of chitosan using noble-metal ions: In situ formation of nanoparticles, *Biomacromolecules*. 15 (2014) 2246–2255. <https://doi.org/10.1021/bm5003834>.
- [13] D. Berillo, A. Cundy, 3D-macroporous chitosan-based scaffolds with in situ formed Pd and Pt nanoparticles for nitrophenol reduction, *Carbohydrate Polymers*. 192 (2018) 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.038>.
- [14] D. Berillo, L. Elowsson, H. Kirsebom, Oxidized Dextran as Crosslinker for Chitosan Cryogel Scaffolds and Formation of Polyelectrolyte Complexes between Chitosan and Gelatin, *Macromolecular Bioscience*. 12 (2012) 1090–1099. <https://doi.org/10.1002/mabi.201200023>.
- [15] D. Akilbekova, M. Shaimerdenova, S. Adilov, D. Berillo, Biocompatible scaffolds based on natural polymers for regenerative medicine, *International Journal of Biological Macromolecules*. 114 (2018) 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.116>.
- [16] H.T. Lu, T.W. Lu, C.H. Chen, K.Y. Lu, F.L. Mi, Development of nanocomposite scaffolds based on biomineralization of N,O-carboxymethyl chitosan/fucoidan conjugates for bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*. 120 (2018) 2335–2345. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.179>.

- [17] G.A. Vikhoreva, E.A. Shablyukova, Modification of Chitosan Films With Glutaraldehyde, *Fibre Chemistry*. 33 (2001) 38–42.
- [18] L. Grifoll-Romero, S. Pascual, H. Aragunde, X. Biarnés, A. Planas, Chitin deacetylases: Structures, specificities, and biotech applications, *Polymers*. 10 (2018) 1–29. <https://doi.org/10.3390/polym10040352>.
- [19] E.I. Rabea, M.E.T. Badawy, C. V. Stevens, G. Smagghe, W. Steurbaut, Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action, *Biomacromolecules*. 4 (2003) 1457–1465. <https://doi.org/10.1021/bm034130m>.
- [20] C. Shi, Y. Zhu, X. Ran, M. Wang, Y. Su, T. Cheng, Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine, *Journal of Surgical Research*. 133 (2006) 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2005.12.013>.
- [21] S.A. Agnihotri, N.N. Mallikarjuna, T.M. Aminabhavi, Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *Journal of Controlled Release*. 100 (2004) 5–28. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.010>.
- [22] P. Rousselle, M. Montmasson, C. Garnier, Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization, *Matrix Biology*. 75–76 (2019) 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.002>.
- [23] T. Dai, M. Tanaka, Y. Huang, Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 9 (2011) 857–880.
- [24] V. Patrulea, V. Ostafe, G. Borchard, O. Jordan, Chitosan as a starting material for wound healing applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 97 (2015) 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.08.004>.
- [25] T. Abdelrahman, H. Newton, Wound dressings: Principles and practice, *Surgery*. 29 (2011) 491–495. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2011.06.007>.

- [26] K. Riehemann, S.W. Schneider, T.A. Luger, B. Godin, M. Ferrari, H. Fuchs, Nanomedicine - Challenge and perspectives, *Angewandte Chemie - International Edition*. 48 (2009) 872–897.  
<https://doi.org/10.1002/anie.200802585>.
- [27] N. Naderi, D. Karponis, A. Mosahebi, A.M. Seifalian, Nanoparticles in wound healing; from hope to promise, from promise to routine, *Frontiers in Bioscience - Landmark*. 23 (2018) 1038–1059.  
<https://doi.org/10.2741/4632>.
- [28] C. Mason, P. Dunnill, A brief definition of regenerative medicine, *Regenerative Medicine*. 3 (2008) 1–5.  
<https://doi.org/10.2217/17460751.3.1.1>.
- [29] N.K. Rajendran, S.S.D. Kumar, N.N. Houreld, H. Abrahamse, A review on nanoparticle based treatment for wound healing, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 44 (2018) 421–430.  
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.01.009>.
- [30] H. Markides, M. Rotherham, A.J. El Haj, Biocompatibility and toxicity of magnetic nanoparticles in regenerative medicine, *Journal of Nanomaterials*. 2012 (2012) 13–15. <https://doi.org/10.1155/2012/614094>.
- [31] A.M. Gobin, D.P. O’Neal, D.M. Watkins, N.J. Halas, R.A. Drezek, J.L. West, Near infrared laser-tissue welding using nanoshells as an exogenous absorber, *Lasers in Surgery and Medicine*. 37 (2005) 123–129.  
<https://doi.org/10.1002/lsm.20206>.
- [32] R. Jayakumar, M. Prabakaran, P.T. Sudheesh Kumar, S. V. Nair, H. Tamura, Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications, *Biotechnology Advances*. 29 (2011) 322–337.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.005>.
- [33] O. Akturk, K. Kismet, A.C. Yasti, S. Kuru, M.E. Duymus, F. Kaya, M. Caydere, S. Hucumenoglu, D. Keskin, Collagen/gold nanoparticle nanocomposites: A potential skin wound healing biomaterial, *Journal of Biomaterials Applications*. 31 (2016) 283–301.  
<https://doi.org/10.1177/0885328216644536>.

- [34] X. Li, H. Wang, H. Rong, W. Li, Y. Luo, K. Tian, D. Quan, Y. Wang, L. Jiang, Effect of composite SiO<sub>2</sub>@AuNPs on wound healing: In vitro and vivo studies, *Journal of Colloid and Interface Science*. 445 (2015) 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.12.084>.
- [35] S.A. Chen, H.M. Chen, Y. Der Yao, C.F. Hung, C.S. Tu, Y.J. Liang, Topical treatment with anti-oxidants and Au nanoparticles promote healing of diabetic wound through receptor for advance glycation end-products, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 47 (2012) 875–883. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.08.018>.
- [36] S. hui Hsu, Y. Bin Chang, C.L. Tsai, K.Y. Fu, S.H. Wang, H.J. Tseng, Characterization and biocompatibility of chitosan nanocomposites, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 85 (2011) 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.029>.
- [37] O. Akturk, K. Kismet, A.C. Yasti, S. Kuru, M.E. Duymus, F. Kaya, M. Caydere, S. Hucumenoglu, D. Keskin, Collagen/gold nanoparticle nanocomposites: A potential skin wound healing biomaterial, *J Biomater Appl*. 31 (2016) 283–301. <https://doi.org/10.1177/0885328216644536>.
- [38] N. Volkova, M. Yukhta, O. Pavlovich, A. Goltsev, Application of Cryopreserved Fibroblast Culture with Au Nanoparticles to Treat Burns, *Nanoscale Res Lett*. 11 (2016) 1–6. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1242-y>.
- [39] M. Ovais, I. Ahmad, A.T. Khalil, S. Mukherjee, R. Javed, M. Ayaz, Wound healing applications of biogenic colloidal silver and gold nanoparticles : recent trends and future prospects, (2018) 4305–4318.
- [40] A. Sugunan, C. Thanachayanont, J. Dutta, J.G. Hilborn, Heavy-metal ion sensors using chitosan-capped gold nanoparticles, *Sci Technol Adv Mater*. 6 (2005) 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.stam.2005.03.007>.
- [41] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech, Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited, *Journal of Physical Chemistry B*. 110 (2006) 15700–15707. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>.

- [42] I. v. Bakeeva, Y.A. Kolesnikova, N.A. Kataeva, K.S. Zaustinskaya, S.P. Gubin, V.P. Zubov, Gold nanoparticles as structurizing agents for the formation of hybrid nanocomposites, *Russian Chemical Bulletin*. 57 (2008) 337–344. <https://doi.org/10.1007/s11172-008-0052-5>.
- [43] X.D. Zhang, H.Y. Wu, D. Wu, Y.Y. Wang, J.H. Chang, Z. bin Zhai, A.M. Meng, P.X. Liu, L.A. Zhang, F.Y. Fan, Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes, *Int J Nanomedicine*. 5 (2010) 771–781. <https://doi.org/10.2147/IJN.S8428>.
- [44] A.G. Rad, H. Abbasi, M.H. Afzali, Gold nanoparticles: Synthesising, characterizing and reviewing novel application in recent years, *Phys Procedia*. 22 (2011) 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.phpro.2011.11.032>.
- [45] H. Daraee, A. Eatemadi, E. Abbasi, S.F. Aval, M. Kouhi, A. Akbarzadeh, Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery, *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 44 (2016) 410–422. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.955107>.
- [46] P. Lau, N. Bidin, Ã.S. Islam, Influence of Gold Nanoparticles on Wound Healing Treatment in Rat Model : Photobiomodulation Therapy, 386 (2017) 380–386. <https://doi.org/10.1002/lsm.22614>.
- [47] Y. Huang, F. Yu, Y.S. Park, J. Wang, M.C. Shin, H.S. Chung, V.C. Yang, Co-administration of protein drugs with gold nanoparticles to enable percutaneous delivery, *Biomaterials*. 31 (2010) 9086–9091. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.046>.
- [48] J.G. Leu, S.A. Chen, H.M. Chen, W.M. Wu, C.F. Hung, Y. der Yao, C.S. Tu, Y.J. Liang, The effects of gold nanoparticles in wound healing with antioxidant epigallocatechin gallate and  $\alpha$ -lipoic acid, *Nanomedicine*. 8 (2012) 767–775. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.08.013>.
- [49] E.A. Elizalde-Peña, D.G. Zarate-Triviño, S.M. Nuño-Donlucas, L. Medina-Torres, J.E. Gough, I.C. Sanchez, F. Villaseñor, G. Luna-Barcenas, Synthesis and characterization of a hybrid (chitosan-g-glycidyl methacrylate)-xanthan hydrogel, *J Biomater Sci Polym Ed*. 24 (2013) 1426–1442. <https://doi.org/10.1080/09205063.2013.763526>.



- [50] E.A. Elizalde-Peña, N. Flores-Ramirez, G. Luna-Barcenas, S.R. Vásquez-García, G. Arámbula-Villa, B. García-Gaitán, J.G. Rutiaga-Quiñones, J. González-Hernández, Synthesis and characterization of chitosan-g-glycidyl methacrylate with methyl methacrylate, *Eur Polym J.* 43 (2007) 3963–3969. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.06.004>.
- [51] R.A.A. Muzzarelli, Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone, *Carbohydr Polym.* 76 (2009) 167–182. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.002>.
- [52] E.A. Elizalde-Peña, I.A. Quintero-Ortega, D.G. Zárate-Triviño, A. Nuño-Licona, J. Gough, I.C. Sanchez, D.I. Medina, G. Luna-Barcenas, (Chitosan-g-glycidyl methacrylate)-xanthan hydrogel implant in Wistar rats for spinal cord regeneration, *Materials Science and Engineering C.* 78 (2017) 892–900. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.005>.
- [53] J. García-López<sup>1</sup>, D. Garciadiego-Cázares, Y. Melgarejo-Ramírez, R. Sánchez-Sánchez, L. Solís-Arrieta, Z. García-Carvajal, J.I. Sánchez-Betancourt, C. Ibarra, G. Luna-Bárcena, C. Velasquillo, Chondrocyte differentiation for auricular cartilage reconstruction using a chitosan based hydrogel, *Histology and Histopathology.* 30 (2015) 1477–1485. <https://doi.org/10.14670/HH-11-642>.
- [54] I.M. Garnica-Palafox, F.M. Sánchez-Arévalo, C. Velasquillo, Z.Y. García-Carvajal, J. García-López, C. Ortega-Sánchez, C. Ibarra, G. Luna-Bárcenas, L. Solís-Arrieta, Mechanical and structural response of a hybrid hydrogel based on chitosan and poly(vinyl alcohol) cross-linked with epichlorohydrin for potential use in tissue engineering, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* 25 (2014) 32–50. <https://doi.org/10.1080/09205063.2013.833441>.
- [55] D.G. Zarate-Triviño, H. Pool, H. Vergara-Castañeda, E.A. Elizalde-Peña, V. Vallejo-Becerra, F. Villaseñor, E. Prokhorov, J. Gough, B. Garcia-Gaitan, G. Luna-Barcenas, (Chitosan-g-glycidyl methacrylate)-collagen II scaffold for cartilage regeneration, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials.* 69 (2020) 1043–1053. <https://doi.org/10.1080/00914037.2019.1655749>.

- [56] L. Wang, Q. Liang, Z. Wang, J. Xu, Y. Liu, H. Ma, Preparation and characterisation of type i and v collagens from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*), *Food Chem.* 148 (2014) 410–414.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.074>.
- [57] M.S. Ågren, R. Schnabel, L.H. Christensen, U. Mirastschijski, Tumor necrosis factor- $\alpha$ -accelerated degradation of type I collagen in human skin is associated with elevated matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 *ex vivo*, *Eur J Cell Biol.* 94 (2015) 12–21.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.10.001>.
- [58] A. Hernández-Rangel, P. Silva-Bermudez, B.L. España-Sánchez, E. Luna-Hernández, A. Almaguer-Flores, C. Ibarra, V.I. Garcia-Perez, C. Velasquillo, G. Luna-Barcenas, Fabrication and in vitro behavior of dual-function chitosan/silver nanocomposites for potential wound dressing applications, *Materials Science and Engineering C.* 94 (2019) 750–765.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.012>.
- [59] E. Prokhorov, G.L. Bárcenas, B.L. España Sánchez, B. Franco, F. Padilla-Vaca, M.A. Hernández Landaverde, J.M. Yáñez Limón, R.A. López, Chitosan-BaTiO<sub>3</sub> nanostructured piezopolymer for tissue engineering, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 196 (2020) 111296.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111296>.
- [60] M.L. Castilho, L.S. Vieira, A.P.C. Campos, C.A. Achete, M.A.G. Cardoso, L. Raniero, The efficiency analysis of gold nanoprobe by FT-IR spectroscopy applied to the non-cross-linking colorimetric detection of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sensors and Actuators, B: Chemical.* 215 (2015) 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.03.052>.
- [61] A. Heilmann, Electronic Properties, in: *Polymer Films with Embedded Metal Nanoparticles*, Berlin, 2003: pp. 129–148.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-662-05233-4>.
- [62] H. Sorg, C. Krueger, B. Vollmar, Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber, *J Anat.* 211 (2007) 810–818.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00822.x>.

- [63] OECD 404, Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 Health Effects. (2015) 1–8.
- [64] K. Okuyama, K. Noguchi, T. Miyazawa, T. Yui, K. Ogawa, Molecular and crystal structure of hydrated chitosan, *Macromolecules*. 30 (1997) 5849–5855. <https://doi.org/10.1021/ma970509n>.
- [65] K. Ogawa, S. Hirano, T. Miyanishi, T. Yui, T. Watanabe, A New Polymorph of Chitosan, *Macromolecules*. 17 (1984) 973–975. <https://doi.org/10.1021/ma00134a076>.
- [66] K. Ogawa, T. Yui, K. Okuyama, Three D structures of chitosan, *Int J Biol Macromol*. 34 (2004) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2003.11.002>.
- [67] E. Strupiechonski, M. Moreno-Ríos, E.O. Ávila-Dávila, R. Román-Doval, E. Prokhorov, Y. Kovalenko, D.G. Zárate-Triviño, D.I. Medina, G. Luna-Barcenas, Relaxation phenomena in chitosan-au nanoparticle thin films, *Polymers (Basel)*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/polym13193214>.
- [68] J. Cavaillon, Pro- versus anti-inflammatory cytokines: Myth or reality, *Cell Mol Biol*. 4 (2001) 695–702.
- [69] J.-M. Zhang, J. An, Cytokines, Inflammation and Pain, *Int Anesthesiol Clin*. 69 (2009) 482–489. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e.Cytokines>.
- [70] A. Soriente, I. Fasolino, A. Gomez-Sánchez, E. Prokhorov, G.G. Buonocore, G. Luna-Barcenas, L. Ambrosio, M.G. Raucci, Chitosan/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds to modulate osteogenic and inflammatory response, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. (2021) 1–7. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37283>.
- [71] J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, S. Rose-John, The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 1813 (2011) 878–888. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034>.

- [72] N.N. Mahmoud, S. Hikmat, D. Abu Ghith, M. Hajeer, L. Hamadneh, D. Qattan, E.A. Khalil, Gold nanoparticles loaded into polymeric hydrogel for wound healing in rats: Effect of nanoparticles' shape and surface modification, *Int J Pharm.* 565 (2019) 174–186.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.079>.
- [73] D. Wei, W. Qian, Chitosan-mediated synthesis of gold nanoparticles by UV photoactivation and their characterization., *J Nanosci Nanotechnol.* 6 (2006) 2508–2514. <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.530>.
- [74] D. Wei, W. Qian, Facile synthesis of Ag and Au nanoparticles utilizing chitosan as a mediator agent, *Colloids Surf B Biointerfaces.* 62 (2008) 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.09.030>.
- [75] B. Laverdet, A. Danigo, D. Girard, L. Magy, C. Demiot, A. Desmoulière, Skin innervation: Important roles during normal and pathological cutaneous repair, *Histol Histopathol.* 30 (2015) 875–892.  
<https://doi.org/10.14670/HH-11-610>.
- [76] S.A. Eming, T. Krieg, J.M. Davidson, Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms, *Journal of Investigative Dermatology.* 127 (2007) 514–525. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700701>.
- [77] M.G. Arafa, R.F. El-Kased, M.M. Elmazar, Thermoresponsive gels containing gold nanoparticles as smart antibacterial and wound healing agents, *Sci Rep.* 8 (2018) 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31895-4>.
- [78] A.A. Menazea, M.K. Ahmed, Wound healing activity of Chitosan/Polyvinyl Alcohol embedded by gold nanoparticles prepared by nanosecond laser ablation, *J Mol Struct.* 1217 (2020) 128401.  
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128401>.
- [79] M.M. McFarland-Mancini, H.M. Funk, A.M. Paluch, M. Zhou, P.V. Giridhar, C.A. Mercer, S.C. Kozma, A.F. Drew, Differences in Wound Healing in Mice with Deficiency of IL-6 versus IL-6 Receptor, *The Journal of Immunology.* 184 (2010) 7219–7228.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901929>.













- [80] A. King, S. Balaji, L.D. Le, T.M. Crombleholme, S.G. Keswani, Regenerative Wound Healing: The Role of Interleukin-10, *Adv Wound Care* (New Rochelle). 3 (2014) 315–323.  
<https://doi.org/10.1089/wound.2013.0461>.
- [81] A.S. MacLeod, J.N. Mansbridge, The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds, *Adv Wound Care* (New Rochelle). 5 (2016) 65–78.  
<https://doi.org/10.1089/wound.2014.0608>.
- [82] W. Ouyang, S. Rutz, N.K. Crellin, P.A. Valdez, S.G. Hymowitz, Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease, *Annu Rev Immunol*. 29 (2011) 71–109.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>.



# ARTÍCULO

## Article

# Chitosan-G-Glycidyl Methacrylate/Au Nanocomposites Promote Accelerated Skin Wound Healing

Héctor A. López-Muñoz <sup>1,2</sup>, Mauricio Lopez-Romero <sup>2</sup>, Moises A. Franco-Molina <sup>3</sup>, Alejandro Manzano-Ramirez <sup>2</sup>, Cristina Velasquillo <sup>4</sup>, Beatriz Liliana España-Sanchez <sup>5</sup>, Ana Laura Martinez-Hernandez <sup>6</sup>, Hayde Vergara-Castañeda <sup>7</sup>, Astrid Giraldo-Betancur <sup>8</sup>, Sarai Favela <sup>9</sup>, Rogelio Rodriguez-Rodriguez <sup>10</sup>, Juan Carlos Mixteco <sup>10</sup>, Juan Carlos Tapia-Picazo <sup>11</sup>, Diana G. Zarate-Triviño <sup>3,\*</sup>, Evgeny Prokhorov <sup>2,\*</sup> and Gabriel Luna-Barcenas <sup>2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Nanosciences Program, Cinvestav, Ciudad de Mexico 07360, CDMX, Mexico
  - <sup>2</sup> Cinvestav Queretaro, Queretaro 76230, QE, Mexico
  - <sup>3</sup> Immunology and Virology Department, Biological Sciences Faculty, Universidad Autonoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza 66450, NL, Mexico
  - <sup>4</sup> Instituto Nacional de Rehabilitacion, Ciudad de Mexico 14389, CDMX, Mexico
  - <sup>5</sup> CONACYT—CIDETEQ, SC, Pedro Escobedo 76703, QE, Mexico
  - <sup>6</sup> Tecnológico Nacional de Mexico-Instituto Tecnológico de Queretaro, Queretaro 76000, QE, Mexico
  - <sup>7</sup> Facultad de Medicina, Universidad Autonoma de Queretaro, Queretaro 76176, QE, Mexico
  - <sup>8</sup> CONACYT—Cinvestav Queretaro, Queretaro 76230, QRO, Mexico
  - <sup>9</sup> Instituto de Ingenieria y Tecnologia, Universidad Autonoma de Ciudad Juarez, Ciudad Juarez 38584, CHIH, Mexico
  - <sup>10</sup> Centro Universitario de los Valles, Universidad de Guadalajara, Ameca 46600, JA, Mexico
  - <sup>11</sup> Tecnológico Nacional de Mexico-Instituto Tecnológico de Aguascalientes, Aguascalientes 20256, AG, Mexico
- \* Correspondence: diana.zarater@uanl.edu.mx (D.G.Z.-T.); prokhorov@cinvestav.mx (E.P.); gabriel.luna@cinvestav.mx (G.L.-B.)



**Citation:** López-Muñoz, H.A.; Lopez-Romero, M.; Franco-Molina, M.A.; Manzano-Ramirez, A.; Velasquillo, C.; España-Sanchez, B.L.; Martinez-Hernandez, A.L.; Vergara-Castañeda, H.; Giraldo-Betancur, A.; Favela, S.; et al. Chitosan-G-Glycidyl Methacrylate/Au Nanocomposites Promote Accelerated Skin Wound Healing. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1855. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091855>

Academic Editors: Ewa Kłodzińska and Marek Konop

Received: 26 July 2022

Accepted: 22 August 2022

Published: 2 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Herein, we report the synthesis of Au nanoparticles (AuNPs) in chitosan (CTS) solution by chemically reducing H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>. CTS was further functionalized with glycidyl methacrylate (chitosan-g-glycidyl methacrylate/AuNP, CTS-g-GMA/AuNP) to improve the mechanical properties for cellular regeneration requirements of CTS-g-GMA/AuNP. Our nanocomposites promote excellent cellular viability and have a positive effect on cytokine regulation in the inflammatory and anti-inflammatory response of skin cells. After 40 days of nanocomposite exposure to a skin wound, we showed that our films have a greater skin wound healing capacity than a commercial film (TheraForm®), and the presence of the collagen allows better cosmetic aspects in skin regeneration in comparison with a nanocomposite with an absence of this protein. Electrical percolation phenomena in such nanocomposites were used as guiding tools for the best nanocomposite performance. Our results suggest that chitosan-based Au nanocomposites show great potential for skin wound repair.

**Keywords:** Au-chitosan nanocomposite; gold nanoparticles; skin wound

## 1. Introduction

The synthesis of gold nanoparticles for nanocomposite formulation has received considerable attention in the last decade. Several reports describe synthesis processes in which the produced nanoparticles have homogeneous sizes and shapes [1–3]. Gold nanoparticles (AuNPs) have attracted substantial attention due to their optical, electrical, mechanical, and biomedical properties [4], which make them potential candidates for applications in various areas such as drug delivery, development of sensors, catalysis, and environmental remediation [5,6]. Animal models, such as mice, are often used in wound healing research, and it has been observed that low concentrations of AuNPs increase cellular proliferation and the production of cytokines [7,8]. The nanosized Au particles offer the possibility of attaching molecules to their surface; these particles can



interact with membrane lipids and can penetrate the stratum corneum of the skin [9]. Au nanocomposites have been used as anti-inflammatory agents because they can inhibit the NF- $\kappa$ B transcription factor. Additionally, it has been shown that AuNPs can reduce reactive oxygen species and that a complex of vitamin E-gold nanoparticles can improve the antioxidant activity acting as a catalyst in nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen (NADH) to nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) complex reactions [10].

Chitosan (CTS) is a natural-origin polymer that is biocompatible, biodegradable, and non-toxic, with antibacterial properties due to its chemical structure; a surface-active film can be generated that can interact with different organic molecules such as amino acids, lipids, nucleic acids, and proteins. Muzzarelli et al. (2009) demonstrated that CTS induces macrophage activation, re-epithelialization, and cicatrization. Other studies determined that CTS increases phagocytosis, TGF- $\beta$ , platelets growth factor production, IL-8, and fibroblast proliferation, and decreases IL-1 production; all these properties induce granular tissue and regulate collagen fiber deposition, which can contribute to the wound healing process. Some nanoparticles with CTS have been reported for tissue regeneration or engineering. For example, CTS with silver nanoparticles showed capacity as a wound dressing due to its significant antibacterial properties and cell biocompatibility with human fibroblast.

On the other hand, CTS with BaTiO<sub>3</sub> nanostructure showed excellent biocompatibility with the same kind of cells [11]. However, a general problem with CTS is its lack of mechanical properties, making it challenging to use these biomaterials for other cells. Therefore, the functionalization of the CTS with other types of synthetic and natural polymers is necessary to improve these properties.

Glycidyl methacrylate (GMA) is a synthetic monomer that can be functionalized with CTS in an aqueous solution; this produces two reactive functional groups that can react with amines, carboxylic acids, and hydroxides group to produce a hybrid natural-synthetic hydrogel (CTS-g-GMA), with an improvement of mechanical properties up to 25% compared to pristine CTS [12]. Our research group reported the first use of this biomaterial for cellular regeneration; we used the CTS-g-GMA to regenerate bone, spinal cord, and cartilage with promising results [13–15]. However, we want to improve the healing and regeneration process by including proteins that are naturally expressed during cellular repair; this change could improve the process and create a better or more natural healing or regenerative process. For instance, collagen is a protein mainly found in the extracellular matrix component of several tissues such as bone, tendons, and skin [16]. Type I collagen is present in human skin at 75–80% [17].

This study aims to synthesize, characterize, and assess the cellular viability and healing process in a rat model of different nanocomposites based upon GMA-functionalized chitosan and Au nanoparticles (CTS-g-GMA-AuNPs), and GMA-functionalized chitosan, Au nanoparticles, and type I collagen (col) ((CTS-g-GMA)-AuNPs-col). In addition, we attempt to correlate the structural properties of such nanocomposites with their efficacy in promoting a healing process; we also study the spectroscopic fingerprints and electrical percolation behaviors of such nanocomposites.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Nanocomposites Preparation

Reagents from Sigma Aldrich® were used as received and without further purification. First, the gold nanocomposites (CTS-AuNPs) were synthesized by chemical reduction, dissolving 1 mL of 2% *w/v* of CTS (with medium molecular mass 300,000 g/mol and 85% degree of deacetylation) in 0.4 M acetic acid solution; afterward, 3 mL of 0.15, 0.3, 0.6, 1.07 mM HAuCl<sub>4</sub> solutions were added to the mixture. The solutions were mixed and heated at 90 °C under magnetic stirring until the solution changed color from slightly yellow to red wine.

This material was synthesized at the stoichiometric mass ratio of CTS:GMA at 1:4; 0.25 g of CTS was dissolved in acetic acid solution at 0.4 M and 1 g of GMA was added to this solution. The solution was kept at 60 °C for 2 h at constant magnetic stir and nitrogen



flow; precipitation was induced with acetonitrile according to the methodology reported by Elizalde et al. (2013) [12].

To elaborate the (CTS-g-GMA)-AuNPs nanocomposite, CTS-g-GMA was dispersed in distilled water for 24 h. Then, the CTS-HAuCl<sub>4</sub> solutions with different concentrations of HAuCl<sub>4</sub> were added, and the solution was kept at 60 °C for one hour until a homogeneous solution was obtained. The CTS is a reduction and stabilizing agent [18–22].

On the other hand, a third nanocomposite (CTS-g-GMA)-AuNPs-Col was prepared by using the procedure described above with one additional step at the end of the process: the incorporation of 0.3% of solution of type I collagen in acetic acid under constant magnetic stirring for 2 h at room temperature.

Thin films with different composites (thicknesses varied from 0.3 mm to a few millimeters for the different spectroscopic and in vivo studies) were prepared by the solvent cast method, i.e., pouring the final solution into a plastic Petri dish; then, they were placed in an oven at 60 °C for 24 h to allow evaporation of the solvent.

## 2.2. Characterization Studies

All materials were characterized by infrared spectroscopy (FTIR). The spectra between 4000 and 400 cm<sup>-1</sup> were obtained using an FTIR spectrophotometer (Perkin Elmer Spectrum 1 Model). All spectra were recorded with a resolution of 4 cm<sup>-1</sup> and 16 cm<sup>-1</sup> times scanning using the transmission technique. Only one material for the HAuCl<sub>4</sub> concentration was measured.

The film morphology of (CTS-g-GMA)-AuNPs and CTS/AuNPs was analyzed using a JEOM JSM-7401F field emission scanning electron microscope.

Crystal structure analysis was performed using a Rigaku diffractometer ULTIMA IV, equipped with CuK $\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ).

The ultraviolet-visible spectrum (UV-vis spectrometer Agilent 8453) was used to determine the sizes of the Au nanoparticles by detecting the maximum absorption band in the visible region. The absorption range used on UV-vis measurements was in the visible spectrum, and we used a universal polystyrene cuvette of 0.8 mm.

The DC electrical conductivity ( $\sigma_{DC}$ ) was calculated from impedance measurements according to the methodology described by Heilmann (2003) [23]. Dielectric measurements in the frequency range from 40 Hz to 110 MHz were carried out with an Agilent Precision Impedance Analyzer 4249A (Santa Clara, CA, USA). The amplitude of the measuring signal was 100 mV. The nanocomposite was previously dried under a vacuum to eliminate the moisture, and measurements were conducted in a vacuum cell [24].

## 2.3. Cellular Viability

Six-week-old Balb/c mice were sacrificed by cervical dislocation, and resident peritoneal macrophages were obtained by repeated washings and retrieval of the peritoneal cavity with 10 mL of sterile and cold RPMI-1640. On the other hand, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from peripheral blood obtained from regular human donors; the blood was diluted with phosphate buffer solution (PBS) at a ratio of 1:1 (vol/vol) and then centrifuged on a Ficoll-Paque gradient for 30 min at 500 $\times g$  at room temperature; the interphase layer consisting of PBMC was washed three times with a culture medium. The HEPG2 cancer cell line derived from human liver hepatocellular carcinoma was purchased from ATCC (American Tumor Cancer Collection, Manassas, VA, USA) and cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic-antimycotic solution (GIBCO, Grand Island, NY, USA), in an atmosphere at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The cells were adjusted at 5  $\times 10^3$  cells/mL, seeded by triplicate on the different nanocomposites previously poured in 96-well plates (Corning, Corning, NY, USA) and incubated for 72 h in an atmosphere at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The cellular viability was evaluated by MTT or trypan blue staining according to the manufacturer's instructions [25].

#### 2.4. Nitric Oxide Determination

The supernatants of each treatment were used to determine the nitric oxide production by nitrate–nitrite colorimetric assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer’s instructions [26]. Briefly, 40  $\mu$ L of supernatants were mixed with 40  $\mu$ L of assay buffer, 10  $\mu$ L of enzyme cofactor, and 10  $\mu$ L of nitrate reductase and incubated at room temperature for 3 h (to allow the conversion of nitrate to nitrite); the samples were analyzed by triplicate. After 10 min of incubation in Griess reagent at room temperature, the absorbance was measured at 560 nm in a microplate reader (Winooski, VT, USA, model EL311).

#### 2.5. Evaluation of Cytokine Expression by Flow Cytometry

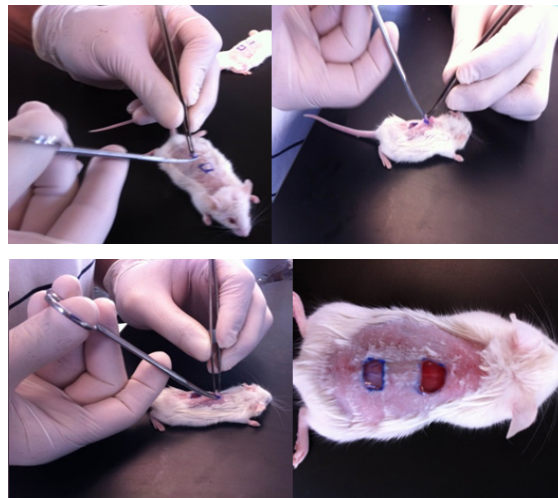
The cytokine production was analyzed by a BD cytometric bead array (CBA) Th1/Th2/Th17 CBA mice cytokines kit (BD, San Diego, CA, USA). For the evaluation, spleens were taken from mice 48 h after wounding. The spleens were crushed and homogenized in PBS (500  $\mu$ L); the supernatants of this mixture were collected by centrifugation at 1600 rpm/10 min and stored at  $-20$  °C until analysis according to the manufacturer’s instructions. The cytokines evaluated were different interleukins (IL) as IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, INF $\gamma$ , and TNF. The cytokine production was measured by flow cytometer (BD Accuri C6, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer’s instructions. CBA analysis was performed using FCAP array v1.0 software (Soft Flow Inc., St Louis Park, MN, USA).

#### 2.6. Wound Healing Effect

Wound healing effects on mouse skin were investigated using nanocomposites CTS-g-GMA, (CTS-g-GMA)-AuNPs, and ((CTS-g-GMA)-AuNPs-Col) with different HAuCl $_4$  concentrations (0.15, 0.3, 0.6, 1.07, 2 and 3 mM). A commercial material TheraForm<sup>®</sup> (natural wound healing matrix of highly purified atelocollagen) (Surgical Esthetics<sup>™</sup>, Northridge, CA, USA) was used as a positive control. First, the films were cut into squares with dimensions of 8  $\times$  8 mm $^2$ ; afterward, square films were washed twice in 600  $\mu$ L of PBS for 5 min and then washed three times in 600  $\mu$ L of DMEM for 5 min. Finally, the materials were sterilized by ultraviolet light (CL-100 UV) for 10 min.

All experimental protocols were approved by the ethics research and animal well-being committee (N $^{\circ}$ CEIBA-2013-013) of the Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, and were done according to NOM-062-ZOO-1999 (Mexican legislation). Experimental animals were treated according to the criteria described in the PHS Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals and the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication 86-23). Six-week-old female Balb/C mice (22 g body weight) were housed in polycarbonate cages at room temperature ( $21 \pm 2$  °C) on a 12-h light–dark cycle. Each was anesthetized intramuscularly with ketamine hydrochloride 100 mg/kg and xylazine 5 mg/kg. [27]. After that, the backs of the animals were shaved and swabbed with 70% ethanol three times before wounding.

Two skin squares of 5  $\times$  5 mm (dermis and epidermis) on the back were selected in the shaved area. The wound nearby the head of the mice was implanted with the nanocomposites or controls; the other wound nearby the tail was used as a negative control without material, as shown (Figure 1). After surgery, lesions were evaluated daily for 40 days according to established parameters by the manual of wounds and ulcers and the OECD 404 guide; 3 specimens per material were used according to the requirements of the animal ethics committee [28] (Table S1).



**Figure 1.** Surgery process. The lesion nearby the head was implanted with nanocomposites or TheraForm<sup>®</sup> as a positive control, and the location near the tail was an untreated wound as a basal control for wound healing.

### 2.7. Cytokine Production

Mice had the nanocomposite surgically implanted; after 48 h, 2 mL of blood was extracted and they were sacrificed. The blood was centrifuged at 1000 rpm to obtain serum, which was frozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis.

Additionally, each animal had its spleen extracted, which was homogenized with 200 mL of PBS sterile and centrifuged at 1600 rpm per 10 min to obtain the supernatant; it was frozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis.

The cytokines were analyzed using a flow cytometer model Accuri C6 (Biosciences Center, North Brunswick Township, NJ, USA) following the protocol of BD cytometric bead away Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, which was used to detect IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-17A, and IL-10 in all the samples.

### 2.8. Statistical Analysis

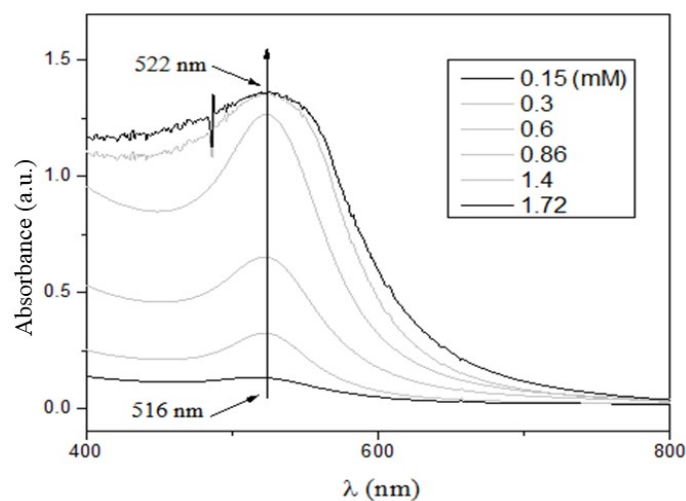
All experiments were performed in triplicate and statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA). The results were considered statistically significant if the  $p$ -value was  $< 0.05$ .

## 3. Results

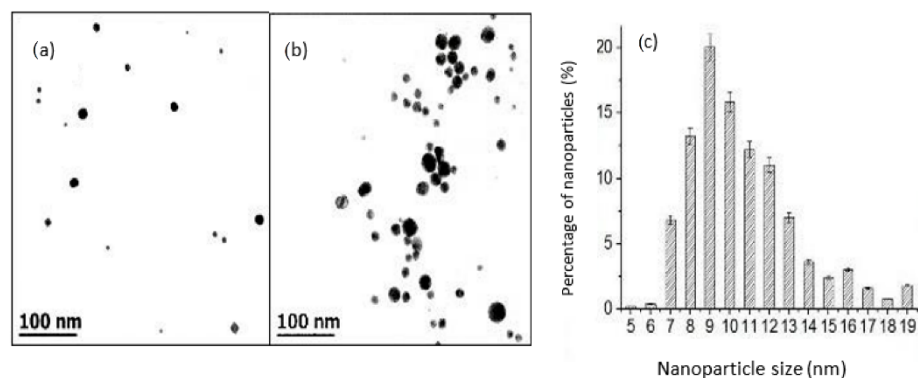
### 3.1. Size and Stability of AuNPs

The UV-vis spectra of the CTS-AuNPs in a liquid medium, synthesized with different concentrations of  $\text{HAuCl}_4$  (Figure 2), show absorption band maxima in the range of 516 and 522 nm. The slight redshift may be attributed to an increase in the average size of the particles due to the formation of clusters.

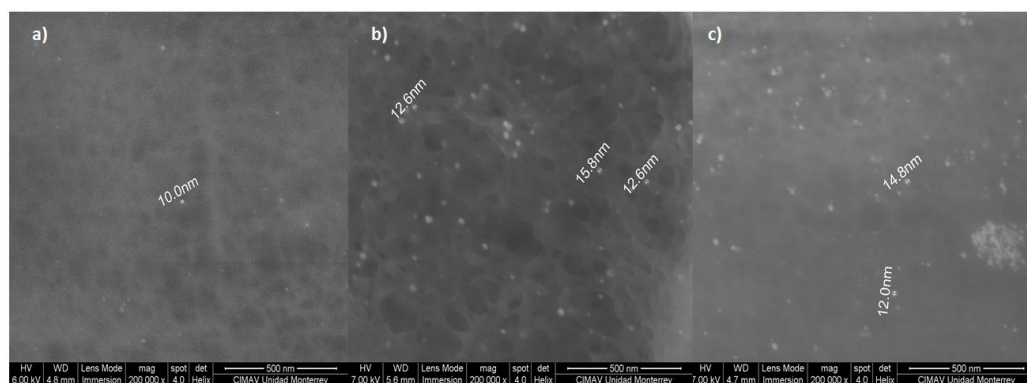
Figure 3 shows a TEM micrograph of the CTS-AuNPs synthesized in a liquid medium with the minimum (0.3 mM) and maximum (1.72 mM) precursor concentrations. The average size was from 8 to 20 nanometers. Figure 4 shows an SEM micrograph of films with gold nanoparticles, with a concentration of 0.3 (a), 0.6 (b), and 1.07 (c) mM, embedded into the CTS-based matrix.



**Figure 2.** UV-vis spectrum of the liquid samples of gold nanoparticles synthesized with different concentrations.



**Figure 3.** Transmission electron microscopy of CTS-AuNPs obtained from solution with (a) 0.3 and (b) 1.07 mM of  $\text{HAuCl}_4$ ; (c) the particle size distribution histogram of CTS-Au-NPs obtained from TEM micrographics.

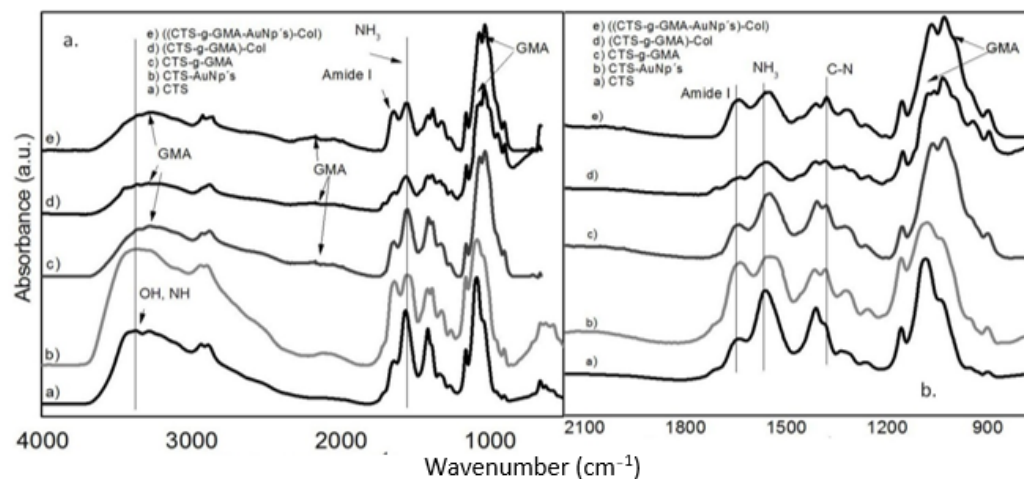


**Figure 4.** Scanning electron microscopy micrographs of CTS-g-GMA-Au-Col nanocomposites: (a) 0.3 mM, (b) 0.6 mM, (c) 1.07 mM. The increment of nanoparticles in the material induces the formation of clusters.

At a low concentration of  $\text{HAuCl}_4$ , the distribution of the nanoparticles was homogeneous in the matrix and no clustering was observed. A further increase in nanoparticle concentration (1.7 mM) resulted in the formation of some clusters.

### 3.2. Infrared Spectroscopy

Figure 5 shows the IR spectra of the different materials of CTS, CTS-AuNPs, CTS-g-GMA-AuNPs, and CTS-g-GMA-AuNPs-Col. The spectra permit observation of the difference between all materials. The relative intensity of the broadband centered at about  $3300\text{ cm}^{-1}$  corresponds to the stretching of the O-H group, and bands at  $1070$  and  $1020\text{ cm}^{-1}$  related with asymmetric stretching vibrations of the ether group of methacrylate decreased in materials with GMA. Therefore, we can assume that there is no effect or presence of acetic acid in the nanocomposite due to previous work [29].



**Figure 5.** (a) FTIR spectrum obtained for pure chitosan (CTS), nanocomposites with chitosan and gold nanoparticles CTS-AuNPs; chitosan, and glycidyl methacrylate (CTS-g-GMA); chitosan, glycidyl methacrylate, and type I collagen (CTS-g-GMA)-Col; and a nanocomposite (CTS-g-GMA-AuNPs)-Col; (b) zoom of the region of greatest contribution between  $1700$  to  $900\text{ cm}^{-1}$ .

The relative intensity of the primary amide group related to stretching vibration of C=O bonds at  $1650\text{ cm}^{-1}$  decreased, especially for (CTS-g-GMA)-Col and ((CTS-g-GMA-AuNPs)-Col) nanocomposites. The bending vibration of  $\text{NH}_2$  at  $1550\text{ cm}^{-1}$  showed a decrease in relative intensity and a redshift for composite samples compared with pure CTS. Additionally, observed variations of bands at  $1400$  and  $1421\text{ cm}^{-1}$  produced by stretching of C-N groups increased, along with vibrations of  $\text{CH}_2\text{-CO}$ . The characteristic absorption bands of pure CTS are presented in Table 1. Several have authors reported FTIR spectra of collagen type I and GMA [30–34].

**Table 1.** Characteristic functional groups of pure CTS.

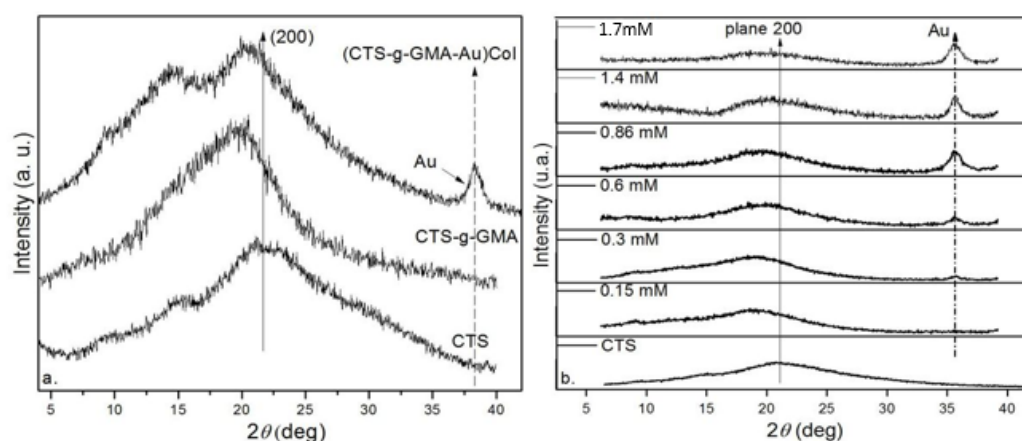
Functional Group	Peak Position ( $\text{cm}^{-1}$ )
OH (stretching S.)	3450
NH (stretching S.)	3360
$\text{CH}_2$ (stretching S.y as glucopyranose)	2870, 2912, 1430
C=O (stretching As amide I)	1650
$\text{NH}_2$ (deformation As.)	1560–1590
C=O	1730
$\text{CH}_2$ (amide II)	1420
$\text{CH}_3$ and C- $\text{CH}_3$ (amide III)	1380
C-O	1255
C-O-C (glycosidic bond)	1040–1150
C-H	838–850
OH (stretching S.)	3450



### 3.3. X-ray Diffraction (XRD)

Pure CTS is a semicrystalline biopolymer and has an XRD pattern with broad peaks at around  $2\theta = 15^\circ$  and  $20^\circ$ , indicating the average intermolecular distance of the crystalline part of pure CTS crystallizing in an orthorhombic unit cell [35]. Furthermore, the reflection at  $14.8$  and  $15$  degrees, with the diffraction line at  $20$  degrees, of the nanocomposite with gold nanoparticles and the pure CTS, respectively, is due to the absence of moisture in the material and the crystal form type I [36,37].

Figure 6a shows the X-ray diffraction of pure chitosan (CTS), CTS-g-GMA, and (CTS-g-GMA-AuNPs)-Col. The main differences in the XRD patterns are that the broad diffraction line at around  $20$  degrees ((200) reflection) in the  $2\theta$  scale increases in intensity and decreases in position in composites, compared to the pure CTS. The reflection centered at around  $20$  degrees has contributions from the amorphous phase, but the diffraction line at  $15$  degrees corresponds to the crystal form type I (Figure 6). In contradistinction to the diffractogram of the pure CTS and the nanocomposite of (CTS-g-GMA-AuNPs)-Col, the material of CTS-g-GMA without the gold nanoparticles is completely amorphous due to the only diffraction line at  $20$  degrees [37].

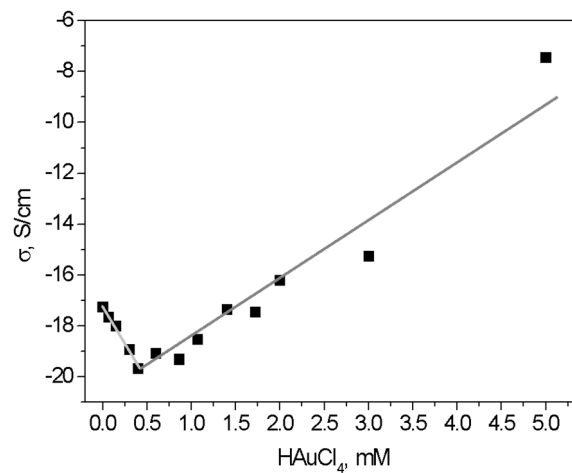


**Figure 6.** (a) CTS diffractograms compared with CTS-g-GMA and (CTS-g-GMA-AuNPs)-Col. (b) X-ray diffraction of nanocomposites of chitosan and gold nanoparticles with different concentrations of H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>.

The diffraction line at about  $38$  degrees corresponds to the (111) planes in the cubic structure of the AuNPs, which can only be seen in the (CTS-g-GMA-Au)-Col nanocomposite [38,39]. In Figure 6b, the intensity of this line increases with the concentration of AuNPs.

### 3.4. Conductivity Measurements

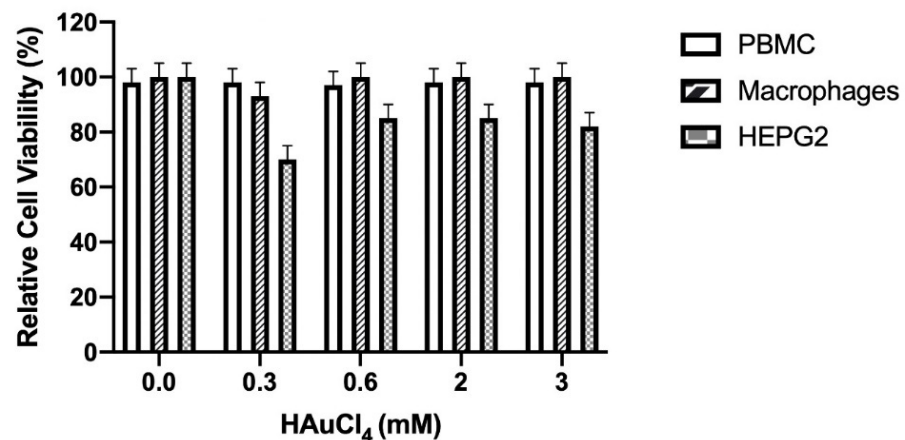
According to practical media theory, the DC conductivity of a system with conductive inclusions in a dielectric matrix must increase; all samples were dried under a vacuum [27]. In our results, the incorporation of AuNPs results in a decrease in the conductivity for concentrations below  $0.5$  mM; a further increase in AuNPs concentrations increases the conductivity. For concentrations above  $5.0$  mM, the conductivity has an exponential increase of more than 12 orders of magnitude. The initial decrease in conductivity can be explained due to the interaction of AuNPs with the CTS matrix (Figure 2) and, therefore, the number of free  $H^+$  and  $OH^-$  ions, which are known to be responsible for the intrinsic ionic conductivity in pure CTS [24]. The exponential increase in conductivity with the increase in nanoparticle concentration is due to the percolation of the AuNPs nanoparticles with an increasing number of conductive paths in the composite matrix. This minimum appears due to the competition of two mechanisms: a decreasing number of free  $H^+$  and  $OH^-$  ions and the increasing metallic conductance of the embedded nanoparticles (Figure 7).



**Figure 7.** Dependence of DC conductivity of films at room temperature on the concentration of HAuCl<sub>4</sub> (lines a guide to the eye).

### 3.5. Cellular Viability

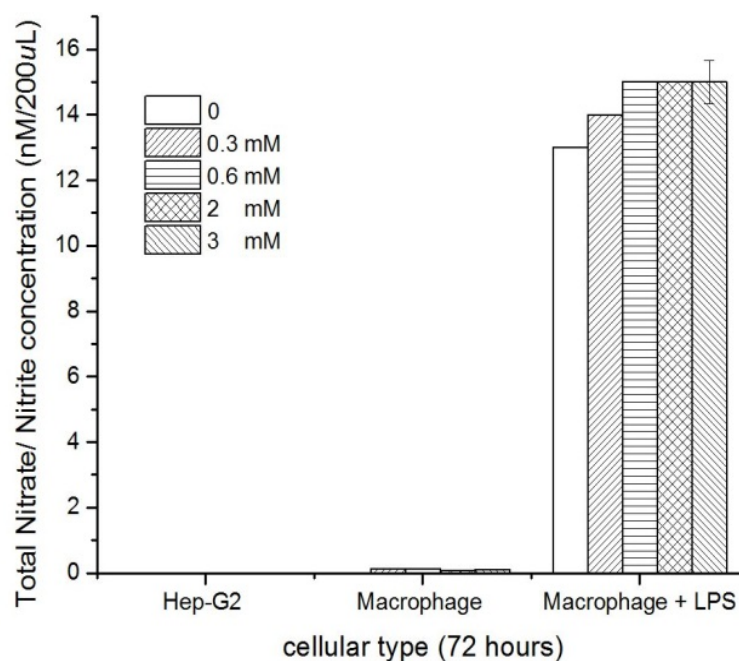
The nanocomposites containing different concentrations of gold nanoparticles (0.3, 0.6, 2, and 3 mM) did not show an effect on the cellular viability of murine peritoneal macrophages and PBMC ( $p < 0.05$ ) compared with untreated cells (0%) (Figure 8). On the other hand, the different nanocomposites significantly affected ( $p < 0.05$ ) the HEP-G2 cell viability at 0.3 (30%), 0.6 (20%), 2 (16%), and 3 (16%) mM, compared with untreated cells (0%).



**Figure 8.** Relative cell viability of PBMC, macrophages, and HEP-G2 cells in the presence of concentrations of CTS-AuNPs in a liquid medium (0.3, 0.6, 2, and 3 mM);  $n = 3$ ,  $SD \pm 0.5$ ,  $p < 0.05$ .

### 3.6. Nitric Oxide

The different nanocomposites evaluated did not induce ( $p < 0.001$ ) nitric oxide production in the murine peritoneal macrophages and HEP-G2 cells, compared with the lipopolysaccharide (LPS) treatment, which induced inflammatory response and high nitric oxide production (Figure 9).



**Figure 9.** Nitric oxide production of HEP-G2 and macrophages due to exposure to CTS-AuNPs in a liquid medium at different concentrations, in comparison with macrophages under an LPS treatment with different concentrations of CTS-AuNPs,  $n = 3$ ,  $SD \pm 0.5$ ,  $p < 0.001$ .

### 3.7. Cytokine Production by Flow Cytometry

In this study, some materials affected the inflammatory response in physiological conditions by affecting pro-inflammatory (TNF, IL-2, and IL-17A) and anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10). In addition, IL-6 is a pro and anti-inflammatory cytokine [40–42].

In this analysis, TheraForm<sup>®</sup> was used as a control to induce cytokine production. Compared with the commercial product, the CTS-g-GMA material induced significantly ( $p < 0.05$ ) more production of IL-2 and IL-4 cytokines, but no significant difference was found for other nanocomposites. IL-6 production was induced significantly ( $p < 0.05$ ) more for CTS-g-GMA, (CTS-g-GMA)-AuNPs 0.15 mM, and ((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col 0.15 mM, and highly significantly ( $p < 0.001$ ) more for ((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col 0.6 mM, (CTS-g-GMA)-AuNPs 2 mM, and (CTS-g-GMA)-AuNPs 3 mM. A significant difference was not found for the other materials. INF $\gamma$  production was induced significantly ( $p < 0.05$ ) more in the mice treated with CTS-g-GMA and (CTS-g-GMA)-AuNPs 0.15 mM (Table 2).

Additionally, a difference was found in the production of TNF for CTS-g-GMA, (CTS-g-GMA)-AuNPs 0.15 mM, ((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col 0.15 mM, ((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col 0.6 mM, (CTS-g-GMA)-AuNPs 1.07 mM, and ((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col 1.07 mM y (CTS-g-GMA)-AuNPs 2 mM, whereas for others materials, a significant difference compared with TheraForm<sup>®</sup> was not found (Table 2).

The production of IL-17A was significant ( $p < 0.05$ ) for CTS-g-GMA, (CTS-g-GMA)-AuNPs 0.15 mM, and ((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col 0.15 mM. Additionally, a significant difference was found between mice treated with CTS-g-GMA, CTS-g-GMA-AuNPs 0.15 mM, and ((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col 0.15 mM compared with TheraForm<sup>®</sup> (Table 2). Furthermore, the expression of cytokines in the spleen did not show a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the evaluated nanocomposites and TheraForm<sup>®</sup> (Table 3).



**Table 2.** Induction of serum cytokines due to exposition with Au nanocomposites and collagen.

Treatment [mM]	Serum Cytokines (pg/mL)						
	IL-2	IL-4	IL-6	INF $\gamma$	TNF	IL-17A	IL-10
TheraForm <sup>®</sup>	0.28	2.87	2.04	2.97	2.12	0	1.84
CTS-g-GMA	3.94 *	9.5 *	26.15 *	11.1 *	39.84 *	4.93 *	31.12 *
((CTS-g-GMA)-AuNPs [0.15])	0.53	2.47	17.27 *	17.3 *	6.4 *	1.74 *	7.5 *
((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col [0.15]	0.32	3.3	11.2 *	4.64	13.59 *	0.93 *	14.67 *
((CTS-g-GMA)-AuNPs [0.3])	0.47	2.23	20.54 *	4.73	5.32	0.4	16.3 *
((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col [0.3]	0.32	0	15.8 *	4.98	15.6 *	1.55 *	13.7 *
((CTS-g-GMA)-AuNPs [0.6])	0.45	0	2.26	5.46	4.38	0.21	1.21
((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col [0.6]	0	0	94.06 **	2.34	9.86 *	0.65	0
((CTS-g-GMA)-AuNPs [1.07])	0	0	2.44	0.83	5.59 *	0	0
((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col [1.07]	0	0	2.63	0.87	7.06 *	0	0
((CTS-g-GMA)-AuNPs [2])	0	0	944.26 **	2.44	27.21 *	0.34	0
((CTS-g-GMA)-AuNPs [3])	0	0	174.58 **	2.98	1.78	0.11	0

$p < 0.05$  \*;  $p < 0.001$  \*\*.

**Table 3.** Induction of spleen cytokines due to exposition with Au nanocomposites and collagen.

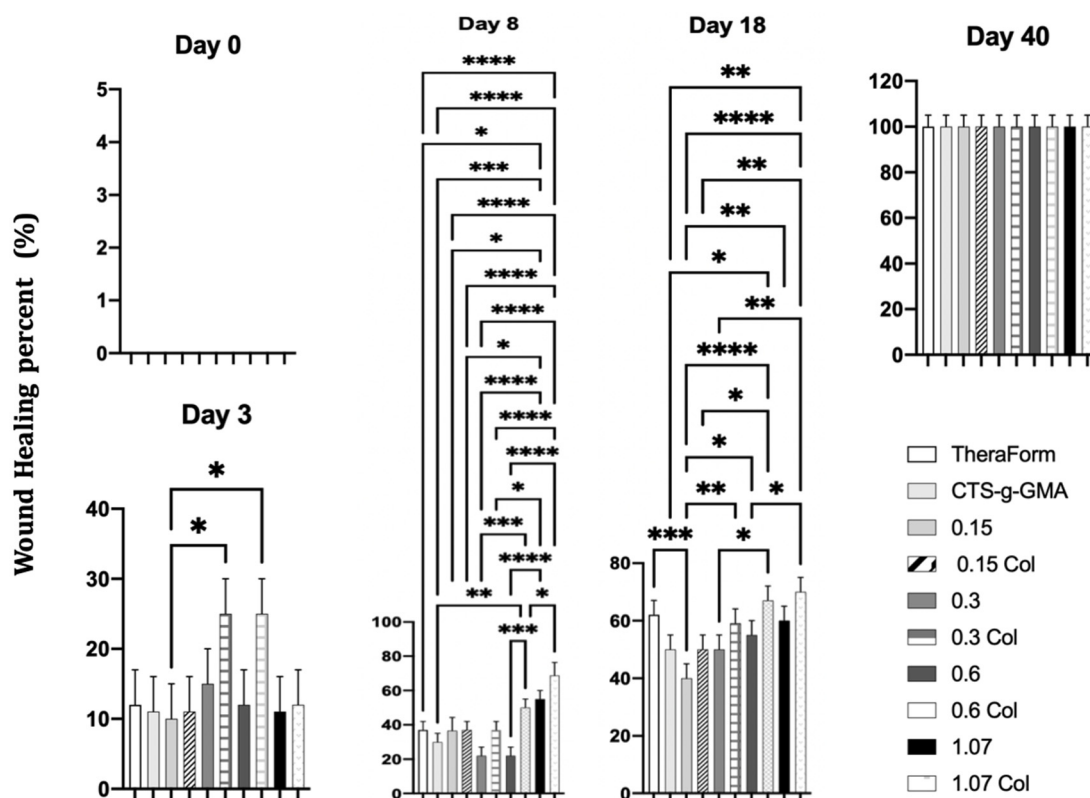
Treatment [mM]	Spleen Cytokines (pg/mL)						
	IL-2	IL-4	IL-6	INF $\gamma$	TNF	IL-17A	IL-10
TheraForm <sup>®</sup>	1.79	0	0.63	7.3	19.7	0	0
CTS-g-GMA	0.67	0	0.48	3.63	10.08	0	1.32
((CTS-g-GMA)-AuNPs [0.15])	1.23	0	1	8.58	19.95	0	3.23
((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col [0.15]	0.8	0	0.78	3.31	9.67	0.04	0
((CTS-g-GMA)-AuNPs [0.3])	1.46	0	0.92	4.86	22.2	0	0
((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col [0.3]	0.75	0	0	3.57	9.83	0.16	0
((CTS-g-GMA)-AuNPs [0.6])	0.9	0	0.88	3.42	29.52	0	0
((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col [0.6]	0.68	0	0	2.76	9.41	0.11	0
((CTS-g-GMA)-AuNPs [1.07])	0.71	0	0	4.9	7.91	0	4.91
((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col [1.07]	0.7	0	0.48	4.71	14.11	0	0
((CTS-g-GMA)-AuNPs [2])	1.25	0	1.35	2.06	7.56	0.16	0
((CTS-g-GMA)-AuNPs [3])	0.32	0	0	6.16	8.35	0	0

### 3.8. Wound Healing Test

All the nanocomposites and TheraForm<sup>®</sup> induced a process of recovery at seven days in the mice, with healthy classified as score wound type I (Table S1), characterized by erythematous aspect, lesion extension < 1 cm, lesion deep < 1 cm, exudate quantity and quality absent, necrotic tissue absent, granular tissue 75–100%, edema absent, pain 0–1, and surrounding skin healthy.

On day one, the recovery percentage in terms of wound closure was not different between treatments. However, on the third day, the treatments with ((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col 0.3 and 0.6 mM were accelerated (25% both) compared to TheraForm<sup>®</sup> and another nanocomposite (12.5%).

On the seventh day, the ((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col 1.07 mM nanocomposite induced 62.5% wound closure compared with nanocomposites that contained a lesser amount of gold nanoparticles concentrations—0.6, 0.15, and 0.3 mM (50%, 37.5%, and 37.5%, respectively). It even induced a better percentage than the commercial product, TheraForm<sup>®</sup> (37.5%). The absence of gold nanoparticles in the nanocomposite, CTS-g-GMA, decreased the process of wound closure (25%). Similar data were observed at 18 days. (Figure 10).

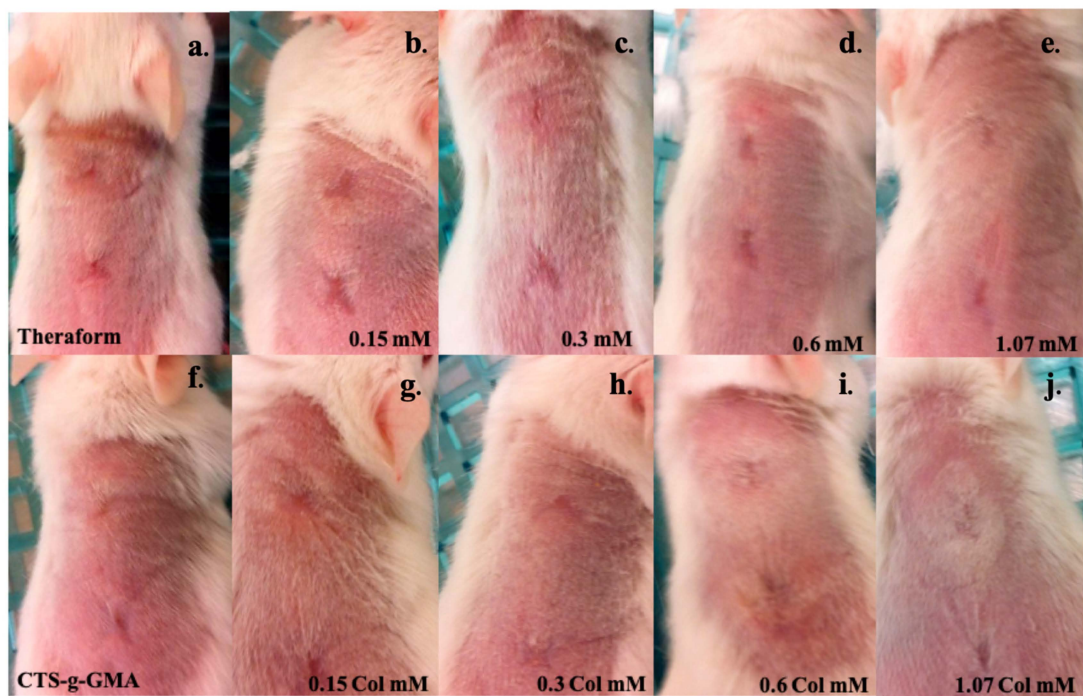


**Figure 10.** Wound healing percentage after 40 days, with TheraForm<sup>®</sup>; CTS-g-GMA; (CTS-g-GMA)-AuNPs at different concentrations—0.15, 0.3, 0.6, 1.07 mM; and ((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col at different concentrations—0.15, 0.3, 0.6, 1.07 mM. ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ ,  $SD \pm 0.5$ . The asterisk means that there are note significant differences between that samples.

On day three, the nanocomposites ((CTS-g-GMA)-AuNPs-col) at AuNP concentrations of 0.3 and 0.6 exhibited better wound healing percentages ( $p < 0.05$ ). On day eight, the nanocomposite with the highest concentration of AuNPs (1.07) induced superior wound healing percentages, followed by those nanocomposites with AuNP concentrations of 0.6 and 0.3, respectively ( $p < 0.05$ ). Furthermore, we found no significant difference ( $p < 0.05$ ) between composites with 0.3 AuNP containing or not collagen (day 8).

On day 18, the addition of collagen to the composites showed no significant differences ( $p < 0.05$ ) concerning wound healing between groups containing the same AuNP concentration. However, at the highest AuNP concentration (1.07), the wound healing was greatest ( $p < 0.05$ ). When compared with Theraform (positive control of wound repair), the only significant difference ( $p < 0.05$ ) was found with a composite of 0.15. On day 40, no significant difference was found between any group ( $p < 0.05$ ).

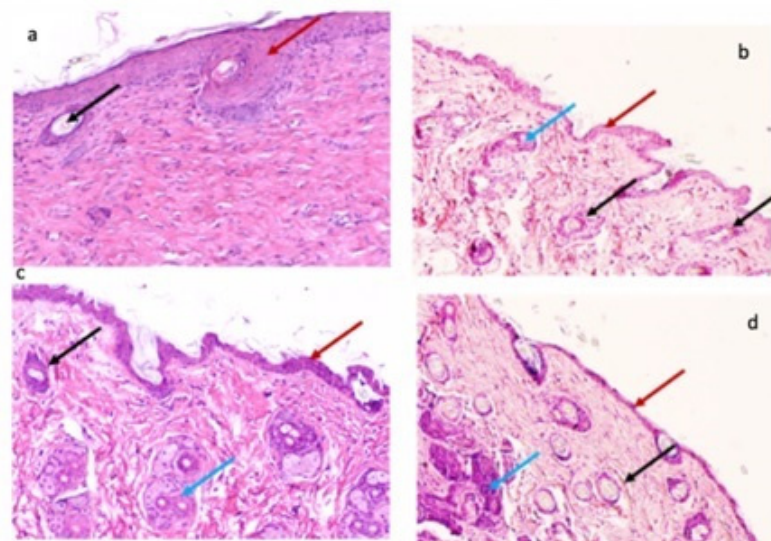
Other works using different polymer matrices and gold nanoparticles have had similar results; the nanoparticle's shape, surface modification, and synthesis method have a crucial effect on wound healing [7,43]. After 21 days, all treatments showed total recovery and cicatrization. The ((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col treatment showed better cosmetic appearance, such as less deep skin pigment. In general, all wounds, treated and untreated, allowed the growth of new skin without infection and inflammatory signs during the wound healing process for the 40 days evaluated (Figure 11).



**Figure 11.** Skin recovery after 40 days of treatment with (a) TheraForm®; (f) CTS-g-GMA; (CTS-g-GMA)-AuNPs at different concentrations: (b) 0.15 mM, (c) 0.3 mM, (d) 0.6 mM, (e) 1.07 mM; and ((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col at different concentrations: (g) 0.15 mM, (h) 0.3 mM, (i) 0.6 mM, (j) 1.07 mM.

### 3.9. Histological Tests

We tested our nanocomposites for hematoxylin and eosin staining in the wound area of the murine tissue. In Figure 12, we show the response to both stainings for CTS-g-GMA (a, c) and ((CTS-g-GMA)-AuNPs) 0.3 mM (b, d) at 15 and 30 days after surgery. Here, we observe the histological sections: red arrows denote the epidermis section; black arrows denote the neoformation of pilose follicles; blue arrows denote the neoformation of blood vessels.



**Figure 12.** Hematoxylin and eosin staining of tissue wound area. Murine tissue treated with CTS-g-GMA (a,c) and ((CTS-g-GMA)-AuNPs) 0.3 mM (b,d) at 15 and 30 days after surgery. The red arrows show the epidermis, black arrows show hair follicles, and blue arrows indicate the formation of new blood vessels. Magnification:  $10\times$  to improve visualization.

We found the best results for ((CTS-g-GMA)-AuNPs) 0.3 mM, with the greatest epidermis and blood vessel reconstitution.

#### 4. Discussion

For application in tissue engineering, a material should meet the following requirements: biocompatibility with the tissues, biodegradability, nontoxicity, and suitable mechanical properties. The CTS-AuNP nanocomposite responds to all these requirements but has relatively insufficient mechanical strength. However, Elizalde et al. showed that with a correct molar relation, this hydrogel can change the mechanical properties, viscosity, and swelling index of CTS and can be used for cellular support for biomedical applications, allowing the adhesion and growing of human fibroblasts [12].

The interaction between CTS and gold nanoparticles was demonstrated by infrared spectroscopy; the relative decrease in the intensity of the band at  $1550\text{ cm}^{-1}$  with the increase in the gold concentration has been attributed to interactions between  $\text{NH}_3^+$  and the polarizer surface of the nanoparticle for nanocomposites of silver and gold using CTS as reducing agent [18,19].

The conductivity of the nanocomposites strongly depends on the  $\text{HAuCl}_4$  concentration and moisture. Materials with concentrations above 0.5 mM showed the formation of nanoparticle clusters (Figure 5), producing percolation of nanoparticles followed by an increase in the number of conductive paths; additionally, the interaction of -OH groups and protonated amine can be corroborated by thermogravimetric analysis reported previously by our group [24]. All nanocomposites with collagen showed better results than controls and (CTS-g-GMA)-AuNPs; this is because the collagen type I used aids the process of scar tissue, which is the main component of the intact uninjured dermis [44].

Despite this, (CTS-g-GMA)-AuNPs at 2 and 3 mM increased the production of cytokines IL-6. They decreased levels of IL-17A; it has been reported that this concentration of cytokines promotes the healing of wounds [45]. These materials cannot be considered the best materials for re-epithelialization because they are breakable and fragile.

Any material used for skin wound healing must not permit pathogen infection or allergic response, because bacterial components, infections, or allergic materials may impair the repair mechanism of the host by interfering with cell-matrix interactions or attenuating the inflammatory response [46]. The gold nanoparticles show an excellent antibacterial capacity that changes in response to the shape and surface modifications of the nanoparticle [43,47]. All evaluated nanocomposites induced the cicatrization process without signals of fever, infection, allergy, or toxicity.

Wound healing is a dynamic process involving three phases overlapping in time and space: inflammation, tissue formation, and tissue remodeling; inflammatory response is the first of the several overlapping processes that constitute wound healing. The addition of collagen led to a higher percentage of healing at 3 and 8 days, compared with the commercial control and materials without collagen. The nanocomposites ((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col at 0.3 and 0.6 mM showed better performance at early healing times. The inflammatory response supplies growth factor and cytokine signals that orchestrate the cell and tissue movements necessary for repair [46]. The positive control (TheraForm<sup>®</sup>) presented low production of cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, INF $\gamma$ , TNF, IL-10) and an absence of IL-17A. We expected to obtain similar results from the nanocomposites evaluated; nevertheless, differences were observed in the production of cytokines in a material compound-dependent manner.

It is impossible to know the average production of cytokines per individual, and it would be a mistake to generalize; this is considered in our model, which compared wound healing between each individual and each group, including two injuries per mice. After injuries, the IL-1b, INF-g, and TNF at the wound site led to the expression of various classes of adhesion molecules essential for leukocytes adhesion and diapedesis (P- and E-selectins as well ICAM 1, -2, LFA-1, MAC-1, gp150, chemokines, and their receptors, including IL-8, growth-related oncogene-alpha, and monocyte chemoattractant protein-1).



The early stages (1 to 3 days) are the most critical factor in the tissue regeneration process due to the transcription factors and proteins produced by cells to activate the process of cell migration [48]. The ((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col nanocomposite at 0.6 mM was considered the best material to induce healing wounds in less time, along with an aesthetic, functional aspect, by modulating the cytokine production between the inflammatory and anti-inflammatory cytokines. Successful skin repair after tissue injury requires resolution of the inflammatory response. (CTS-g-GMA)-AuNPs at 1.07 mM with and without collagen showed an increase in wound healing percentage at 8 days; this stage is related to the second phase of wound healing, or granulation process [49].

Whereas knowledge about mechanisms and molecules inducing and perpetuating the inflammatory response is constantly increasing, mechanisms that limit and down-regulate this activity are less appreciated (down-regulation of chemokine expression by anti-inflammatory cytokines such as IL-10 or TGF- $\beta$ 1, or up-regulation of anti-inflammatory molecules such as IL-1 receptor antagonists or soluble TNF receptors). For example, McFarland et al. showed that mice with impaired capacity macrophages have an excess of fibrin and cellular debris, delaying wound healing compared with untreated mice; in the same way, it was observed that in IL-6 knockout mice, the wound healing was delayed because of poor infiltration of macrophages, affecting the re-epithelialization [50]. Additionally, IL-17 and IL-10 knockout mice showed a faster wound healing process because the inflammatory process was decreased, which improved the angiogenesis [51,52].

The production of spleen cytokines was not different compared with TheraForm<sup>®</sup>, suggesting that these materials cannot produce a systemic inflammatory response that can compromise the individual's homeostasis. For future studies with the best nanocomposite to induce the best aesthetic cicatrization, we are considering examining matrix metalloproteinases, because these molecules play a role in the process of tissue granulation, modulating the formation of scar tissue by the production of extracellular matrices and promoting cell migration, which is reduced and changed by type III collagen and replaced by type I collagen [45].

## 5. Conclusions

The chitosan-based Au nanocomposites presented here (with and without type I collagen) exhibit a superior ability to promote skin wound healing when compared to the positive controls TheraForm<sup>®</sup> and Chitosan-g-glycidyl methacrylate/Au nanocomposites ((CTS-g-GMA)-AuNPs) (with and without type I collagen). The best healing process was achieved using nanocomposites with 0.6 mM of gold nanoparticles. Our results demonstrated that ((CTS-g-GMA)-AuNPs)-Col is an efficient material for accelerating wound healing by improving the formation of granulation tissue and the migration of hyperproliferative keratinocytes; these observations are traceable to the nanocomposite's electrical behavior according to the electrical percolation phenomena. In this regard, our results suggest that the best performance nanocomposite is found with a nanoparticle concentration near the percolation threshold. The percolation threshold dictates when nanoparticles agglomerate, and the nanocomposite starts to fail. It is noteworthy that further studies are required to correlate cytokine production and the cicatrization process for a better understanding of this mechanism.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics14091855/s1>, Table S1: Valuation diagram of wounds: 1 = recover, 4 = limited recover. According with score the wound can be Valuation diagram of wounds: 1 = recover, 4 = limited recover. According with score the wound can be classified in four typesclassified in four types.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.A.L.-M., M.L.-R., A.M.-R. and C.V.; methodology, M.A.F.-M., B.L.E.-S. and A.L.M.-H.; investigation, original draft, and visualization, D.G.Z.-T., M.A.F.-M., G.L.-B. and E.P.; validation and formal analysis, H.V.-C., A.G.-B. and S.F.; writing—review and editing, H.A.L.-M., R.R.-R., J.C.M. and J.C.T.-P.; supervision and project administration, D.G.Z.-T., E.P. and G.L.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was partially funded by Conacyt Mexico, grant numbers A1-S-9557, CB2016-286926, and CB 2016-1 287405.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** We thank Araceli Mauricio Sanchez for the help provided in FTIR and sample preparation analyses; we also thank Martín Adelaido Hernández Landaverde for XRD analysis.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Sugunan, A.; Thanachayanont, C.; Dutta, J.; Hilborn, J.G. Heavy-Metal Ion Sensors Using Chitosan-Capped Gold Nanoparticles. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2005**, *6*, 335–340. [[CrossRef](#)]
2. Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 15700–15707. [[CrossRef](#)]
3. Bakeeva, I.V.; Kolesnikova, Y.A.; Kataeva, N.A.; Zastinskaya, K.S.; Gubin, S.P.; Zubov, V.P. Gold Nanoparticles as Structurizing Agents for the Formation of Hybrid Nanocomposites. *Russ. Chem. Bull.* **2008**, *57*, 337–344. [[CrossRef](#)]
4. Zhang, X.D.; Wu, H.Y.; Wu, D.; Wang, Y.Y.; Chang, J.H.; Zhai, Z.B.; Meng, A.M.; Liu, P.X.; Zhang, L.A.; Fan, F.Y. Toxicologic Effects of Gold Nanoparticles in Vivo by Different Administration Routes. *Int. J. Nanomed.* **2010**, *5*, 771–781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Daraee, H.; Eatemadi, A.; Abbasi, E.; Aval, S.F.; Kouhi, M.; Akbarzadeh, A. Application of Gold Nanoparticles in Biomedical and Drug Delivery. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2016**, *44*, 410–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Rad, A.G.; Abbasi, H.; Afzali, M.H. Gold Nanoparticles: Synthesising, Characterizing and Reviewing Novel Application in Recent Years. *Phys. Procedia* **2011**, *22*, 203–208. [[CrossRef](#)]
7. Ovais, M.; Ahmad, I.; Khalil, A.T.; Mukherjee, S.; Javed, R.; Ayaz, M. Wound Healing Applications of Biogenic Colloidal Silver and Gold Nanoparticles: Recent Trends and Future Prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 4305–4318. [[CrossRef](#)]
8. Lau, P.; Bidin, N.; Islam, A.S. Influence of Gold Nanoparticles on Wound Healing Treatment in Rat Model: Photobiomodulation Therapy. *Lasers Surg. Med.* **2017**, *386*, 380–386. [[CrossRef](#)]
9. Huang, Y.; Yu, F.; Park, Y.S.; Wang, J.; Shin, M.C.; Chung, H.S.; Yang, V.C. Co-Administration of Protein Drugs with Gold Nanoparticles to Enable Percutaneous Delivery. *Biomaterials* **2010**, *31*, 9086–9091. [[CrossRef](#)]
10. Leu, J.G.; Chen, S.A.; Chen, H.M.; Wu, W.M.; Hung, C.F.; Yao, Y.D.; Tu, C.S.; Liang, Y.J. The Effects of Gold Nanoparticles in Wound Healing with Antioxidant Epigallocatechin Gallate and  $\alpha$ -Lipoic Acid. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2012**, *8*, 767–775. [[CrossRef](#)]
11. Muzzarelli, R.A.A. Chitins and Chitosans for the Repair of Wounded Skin, Nerve, Cartilage and Bone. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *76*, 167–182. [[CrossRef](#)]
12. Elizalde-Peña, E.A.; Zarate-Triviño, D.G.; Nuño-Donlucas, S.M.; Medina-Torres, L.; Gough, J.E.; Sanchez, I.C.; Villaseñor, F.; Luna-Barcenas, G. Synthesis and Characterization of a Hybrid (Chitosan-g-Glycidyl Methacrylate)-Xanthan Hydrogel. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2013**, *24*, 1426–1442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Elizalde-Peña, E.A.; Flores-Ramirez, N.; Luna-Barcenas, G.; Vásquez-García, S.R.; Arámbula-Villa, G.; García-Gaitán, B.; Rutiaga-Quñones, J.G.; González-Hernández, J. Synthesis and Characterization of Chitosan-g-Glycidyl Methacrylate with Methyl Methacrylate. *Eur. Polym. J.* **2007**, *43*, 3963–3969. [[CrossRef](#)]
14. Elizalde-Peña, E.A.; Quintero-Ortega, I.A.; Zárate-Triviño, D.G.; Nuño-Licona, A.; Gough, J.; Sanchez, I.C.; Medina, D.I.; Luna-Barcenas, G. (Chitosan-g-Glycidyl Methacrylate)-Xanthan Hydrogel Implant in Wistar Rats for Spinal Cord Regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *78*, 892–900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Zarate-Triviño, D.G.; Pool, H.; Vergara-Castañeda, H.; Elizalde-Peña, E.A.; Vallejo-Becerra, V.; Villaseñor, F.; Prokhorov, E.; Gough, J.; Garcia-Gaitan, B.; Luna-Barcenas, G. (Chitosan-g-Glycidyl Methacrylate)-Collagen II Scaffold for Cartilage Regeneration. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **2020**, *69*, 1043–1053. [[CrossRef](#)]
16. Wang, L.; Liang, Q.; Wang, Z.; Xu, J.; Liu, Y.; Ma, H. Preparation and Characterisation of Type I and V Collagens from the Skin of Amur Sturgeon (*Acipenser Schrenckii*). *Food Chem.* **2014**, *148*, 410–414. [[CrossRef](#)]
17. Ågren, M.S.; Schnabel, R.; Christensen, L.H.; Mirastschijski, U. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Accelerated Degradation of Type I Collagen in Human Skin Is Associated with Elevated Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 Ex Vivo. *Eur. J. Cell Biol.* **2015**, *94*, 12–21. [[CrossRef](#)]

18. Wei, D.; Qian, W. Facile Synthesis of Ag and Au Nanoparticles Utilizing Chitosan as a Mediator Agent. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2008**, *62*, 136–142. [[CrossRef](#)]
19. Wei, D.; Qian, W. Chitosan-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles by UV Photoactivation and Their Characterization. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6*, 2508–2514. [[CrossRef](#)]
20. Da Silva, A.B.; Rufato, K.B.; De Oliveira, A.C.; Souza, P.R.; Da Silva, E.P.; Muniz, E.C.; Vilsinski, B.H.; Martins, A.F. Composite Materials Based on Chitosan/Gold Nanoparticles: From Synthesis to Biomedical Applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *161*, 977–998. [[CrossRef](#)]
21. Huang, H.; Yang, X. Synthesis of Chitosan-Stabilized Gold Nanoparticles in the Absence/Presence of Tripolyphosphate. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 2340–2346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Bhumkar, D.R.; Joshi, H.M.; Sastry, M.; Pokharkar, V.B. Chitosan Reduced Gold Nanoparticles as Novel Carriers for Transmucosal Delivery of Insulin. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1415–1426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Heilmann, A. Electronic Properties. In *Polymer Films with Embedded Metal Nanoparticles*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2003; Volume 52, ISBN 978-3-662-05233-4.
24. Strupiechonski, E.; Moreno-Ríos, M.; Ávila-Dávila, E.O.; Román-Doval, R.; Prokhorov, E.; Kovalenko, Y.; Zárate-Triviño, D.G.; Medina, D.I.; Luna-Barcenas, G. Relaxation Phenomena in Chitosan-Au Nanoparticle Thin Films. *Polymers* **2021**, *13*, 3214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kwok, A.K.H.; Yeung, C.K.; Lai, T.Y.Y.; Chan, K.P.; Pang, C.P. Effects of Trypan Blue on Cell Viability and Gene Expression in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Br. J. Ophthalmol.* **2004**, *88*, 1590–1594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Fidan, I.; Yüksel, S.; Ýmir, T.; Irkeç, C.; Aksakal, F.N. The Importance of Cytokines, Chemokines and Nitric Oxide in Pathophysiology of Migraine. *J. Neuroimmunol.* **2006**, *171*, 184–188. [[CrossRef](#)]
27. Sorg, H.; Krueger, C.; Vollmar, B. Intravital Insights in Skin Wound Healing Using the Mouse Dorsal Skin Fold Chamber. *J. Anat.* **2007**, *211*, 810–818. [[CrossRef](#)]
28. OECD. 404 Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Dermal Irritation/Corrosion. *OECD Guidel. Test. Chem. Sect. 4 Health Eff.* **2015**, 1–8. [[CrossRef](#)]
29. Mauricio-Sánchez, R.A.; Salazar, R.; Luna-Bárceñas, J.G.; Mendoza-Galván, A. FTIR Spectroscopy Studies on the Spontaneous Neutralization of Chitosan Acetate Films by Moisture Conditioning. *Vib. Spectrosc.* **2018**, *94*, 1–6. [[CrossRef](#)]
30. Zhao, J.; Wang, S.; Zhang, L.; Wang, C.; Zhang, B. Kinetic, Isotherm, and Thermodynamic Studies for Ag(I) Adsorption Using Carboxymethyl Functionalized Poly (Glycidyl Methacrylate). *Polymers* **2018**, *10*, 1090. [[CrossRef](#)]
31. Fajardo, A.R.; Fávoro, S.L.; Rubira, A.F.; Muniz, E.C. Dual-Network Hydrogels Based on Chemically and Physically Crosslinked Chitosan/Chondroitin Sulfate. *React. Funct. Polym.* **2013**, *73*, 1662–1671. [[CrossRef](#)]
32. Wang, K.; Ling, J.; Nie, B.; And, J.; Yu, Q. Synthesis and Characterization of Comb-Type Multifunctional Macromonomer as Alternative Monomers for Light-Cured Unfilled Dental Resins. *J. Polym. Mater* **2016**, *33*, 379–392.
33. Ungureanu, C.; Ioniță, D.; Berceanu, E.; Tcacenco, L.; Zuav, A.; Demetrescu, I. Improving Natural Biopolymeric Membranes Based on Chitosan and Collagen for Biomedical Applications Introducing Silver. *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *26*, 458–465. [[CrossRef](#)]
34. Belbachir, K.; Noreen, R.; Gouspillou, G.; Petibois, C. Collagen Types Analysis and Differentiation by FTIR Spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 829–837. [[CrossRef](#)]
35. Okuyama, K.; Noguchi, K.; Miyazawa, T.; Yui, T.; Ogawa, K. Molecular and Crystal Structure of Hydrated Chitosan. *Macromolecules* **1997**, *30*, 5849–5855. [[CrossRef](#)]
36. Baklagina, Y.G.; Klechkovskaya, V.V.; Kononova, S.V.; Petrova, V.A.; Poshina, D.N.; Orekhov, A.S.; Skorik, Y.A. Polymorphic Modifications of Chitosan. *Crystallogr. Rep.* **2018**, *63*, 303–313. [[CrossRef](#)]
37. Prokhorov, E.; Luna-Barcenas, G.; Kumar-Krishnan, S.; Mauricio Sánchez, R.A.; Castillo Reyes, B.E.; Hernández Vargas, J. Probing Molecular Interactions of Polysaccharides in the Presence of Water. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1218*, 128531. [[CrossRef](#)]
38. Ogawa, K.; Yui, T.; Okuyama, K. Three D Structures of Chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* **2004**, *34*, 1–8. [[CrossRef](#)]
39. Ogawa, K.; Hirano, S.; Miyanishi, T.; Yui, T.; Watanabe, T. A New Polymorph of Chitosan. *Macromolecules* **1984**, *17*, 973–975. [[CrossRef](#)]
40. Cavaillon, J. Pro-versus Anti-Inflammatory Cytokines: Myth or Reality. *Cell. Mol. Biol.* **2001**, *4*, 695–702.
41. Zhang, J.-M.; An, J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int. Anesth. Clin.* **2009**, *69*, 482–489. [[CrossRef](#)]
42. Scheller, J.; Chalaris, A.; Schmidt-Arras, D.; Rose-John, S. The Pro- and Anti-Inflammatory Properties of the Cytokine Interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2011**, *1813*, 878–888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Mahmoud, N.N.; Hikmat, S.; Abu Ghith, D.; Hajeer, M.; Hamadneh, L.; Qattan, D.; Khalil, E.A. Gold Nanoparticles Loaded into Polymeric Hydrogel for Wound Healing in Rats: Effect of Nanoparticles' Shape and Surface Modification. *Int. J. Pharm.* **2019**, *565*, 174–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Laverdet, B.; Danigo, A.; Girard, D.; Magy, L.; Demiot, C.; Desmoulière, A. Skin Innervation: Important Roles during Normal and Pathological Cutaneous Repair. *Histol. Histopathol.* **2015**, *30*, 875–892. [[CrossRef](#)]
45. Ouyang, W.; Rutz, S.; Crellin, N.K.; Valdez, P.A.; Hymowitz, S.G. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **2011**, *29*, 71–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Eming, S.A.; Krieg, T.; Davidson, J.M. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *J. Investig. Dermatol.* **2007**, *127*, 514–525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

47. Arafa, M.G.; El-Kased, R.F.; Elmazar, M.M. Thermoresponsive Gels Containing Gold Nanoparticles as Smart Antibacterial and Wound Healing Agents. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13674. [[CrossRef](#)]
48. Borges, G.Á.; Elias, S.T.; da Silva, S.M.M.; Magalhães, P.O.; Macedo, S.B.; Ribeiro, A.P.D.; Guerra, E.N.S. In Vitro Evaluation of Wound Healing and Antimicrobial Potential of Ozone Therapy. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **2017**, *45*, 364–370. [[CrossRef](#)]
49. Martínez, S.P.H.; González, T.I.R.; Molina, M.A.F.; Bollain Y Goytia, J.J.; Sanmiguel, J.J.M.; Triviño, D.G.Z.; Padilla, C.R. A Novel Gold Calreticulin Nanocomposite Based on Chitosan for Wound Healing in a Diabetic Mice Model. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 75. [[CrossRef](#)]
50. McFarland-Mancini, M.M.; Funk, H.M.; Paluch, A.M.; Zhou, M.; Giridhar, P.V.; Mercer, C.A.; Kozma, S.C.; Drew, A.F. Differences in Wound Healing in Mice with Deficiency of IL-6 versus IL-6 Receptor. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 7219–7228. [[CrossRef](#)]
51. King, A.; Balaji, S.; Le, L.D.; Crombleholme, T.M.; Keswani, S.G. Regenerative Wound Healing: The Role of Interleukin-10. *Adv. Wound Care* **2014**, *3*, 315–323. [[CrossRef](#)]
52. MacLeod, A.S.; Mansbridge, J.N. The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds. *Adv. Wound Care* **2016**, *5*, 65–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]