

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

**“DESARROLLO DE UN FITOFÁRMACO NANOFUNCIONALIZADO
PARA EL TRATAMIENTO TÓPICO DE HERIDAS”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

M. en C. Adriana Martínez Cuazitl

DIRECTOR DE TESIS:

D. en .C David Guillermo Pérez Ishiwara

ASESORES:

D. en C. Virginia Sánchez Monroy

D. en C. María Del Consuelo Gómez García

D. en C. Marlon Rojas López

D. en C. Raúl J. Delgado Macuil

México, Ciudad de México, 2017.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 30 del mes de Noviembre del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía para examinar la tesis titulada:
Desarrollo de un fitofármaco nanofuncionalizado para el tratamiento tópico de heridas

Presentada por el alumno:

Martínez Cuazitl Adriana
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro:

A	1	4	0	2	1	9
---	---	---	---	---	---	---


aspirante de:


Doctorado en ciencias en Biotecnología

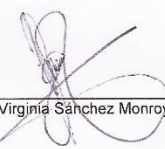
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


LA COMISIÓN REVISORA

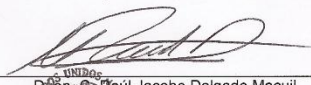
Director(a) de tesis


D. en. C. David Guillermo Pérez Ishiwara

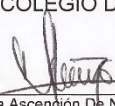

D. en. C. María del Consuelo Gómez García


D. en. C. Virginia Sánchez Monroy


D. en. C. Marlon Rojas López


D. en. C. Raúl Jacobo Delgado Macuil

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


D. en. C. Mónica Ascensión De Noya Ocampo

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA
Y HOMEOPATÍA
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

Prohibición de uso de obra

¶
¶
¶
¶

Instituto Politécnico Nacional
P-r-e-s-e-n-t-e

¶
¶

Bajo protesta de decir verdad el que suscribe **Adriana Martínez Cuazitl** manifiesto ser autora y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada **"Desarrollo de un fitofármaco nanofuncionalizado para el tratamiento tópico de heridas"**, en adelante "La Tesis" y de la cual se adjunta copia para efecto de su difusión, con fines académicos por el cual se hace entrega del ejemplar al IPN, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 de la Ley Federal del Derecho de Autor, se prohíbe el uso y/o explotación de "La Tesis" en las formas y medios descritos en el fundamento legal citado, en virtud de que cualquier utilización por una persona física o moral distinta del autor puede afectar o violar derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros distintos al autor de "La Tesis".

¶

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La Tesis" y limitarse a su uso en la forma arriba señalada.

¶

México, D. F., 30 de Noviembre de 2017.

Atentamente



¶

Adriana Martínez Cuazitl

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular I, de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara.

Los recursos empleados para desarrollar esta investigación fueron proporcionados por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICYTDF) con el número de proyecto 325/2011 y por la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP) con los proyectos 201231895 y 20140196. Adicionalmente la autora del trabajo disfrutó de la Beca de Posgrado del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) así como la Beca de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología en la maestría y el doctorado.

Parte de los experimentos se realizaron en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada Tlaxcala del Instituto Politécnico Nacional bajo la asesoría del D. en C. Marlon Rojas López y el D. en C. Raúl Jacobo Delgado Macuil.

Agradezco la asesoría y el apoyo brindado de la D. en C. Virginia Sánchez Monroy para la realización de diversos experimentos en la Escuela Militar de graduados de Sanidad

Agradezco el apoyo brindado en el Centro de Investigación en Ciencia Aplicada Y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional bajo la asesoría del D. en C. Eduardo San Martín Martínez

Agradezco el apoyo al patólogo José Ocampo de la UAEH por su valiosa aportación y orientación en el análisis de las muestras histopatológicas.

Agradezco al Dr. José Pérez González de la ESFM del Instituto Politécnico Nacional por brindarme el apoyo para usar el microscopio Nikon Eclipse LV100.

I. NDICE

I. NDICE	VII
II. ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
III. ÍNDICE DE TABLAS	XII
IV. ABREVIATURAS	XIII
V. RESUMEN.....	XIV
VI. ABSTRACT	XV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Piel.....	1
1.2. Cicatrización	1
1.2.1. Epidemiología de las heridas.....	2
1.3. Proceso de cicatrización.....	3
1.3.1. Fase inflamatoria	3
1.3.2. Fase proliferativa:	4
1.3.3. Fase de remodelación:	7
1.4. El papel de TGF β en el proceso de cicatrización	8
1.4.1. Latencia de TGF β	9
1.4.2. Activación de TGF β	10
1.4.3. Vías de señalización reguladas por TGF β	11
1.5. El papel de los miofibroblastos en el proceso de cicatrización	12
1.5.1. Regulación de la actina α -smooth muscle.....	12
1.6. Regulación de la matriz extracelular	14
1.6.1. El papel de las MMPs en el proceso de cicatrización.....	15
1.6.1.1. Regulación de la actividad de las MMP	16
1.7. Factores que influyen en la cicatrización.....	16
1.8. Tratamiento de las heridas.....	17
1.9. Nanomedicina en el tratamiento de heridas.....	18
1.10. Nanopartículas	19
2. ANTECEDENTES	19
2.1. Efecto cicatrizante de diferentes plantas de la familia Scrophulariaceae.....	20

2.2.	Características generales de la planta <i>Bacopa procumbens</i>	20
2.2.1.	Clasificación taxonómica.....	20
2.3.	Efecto <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de la planta <i>Bacopa procumbens</i> en el proceso de cicatrización.....	21
2.4.	Nanoparticulas de Oro en el tratamiento de heridas	21
3.	JUSTIFICACIÓN.....	22
4.	OBJETIVOS	24
4.1.	Objetivo general.....	24
4.2.	Objetivos específicos	24
5.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	25
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1.	Elaboración del extracto acuotánico de <i>Bacopa procumbens</i> incluida en un hidrogel.....	26
	➤ Recolección y obtención del extracto acuotánico de la planta <i>Bacopa procumbens</i>	26
	➤ Liofilización del extracto acuotánico.....	27
	➤ Preparación del extracto acuotánico incluido en un hidrogel para su administración tópica en el modelo <i>in vivo</i>	27
6.2.	Reproducción del modelo <i>in vivo</i> excisional de cicatrización.....	28
	➤ Desarrollo de la herida excisional	28
	➤ Obtención, preparación y almacenamiento de las muestras de tejido	29
	➤ Grupos de estudio del modelo <i>in vivo</i> excisional.....	29
6.3.	Evaluación de los cambios en la Matriz Extracelular.....	30
6.4.	Análisis de los cambios de expresión de marcadores moleculares a nivel génico en el modelo <i>in vivo</i>	30
	➤ RT-PCR cuantitativa	30
6.5.	Análisis del efecto proliferativo del extracto acuotánico de la planta <i>Bacopa procumbens</i> mediado por el receptor activado por proteasa-1 (PAR 1) en el modelo <i>in vitro</i>	33
	Ensayos <i>in vitro</i>	33
	➤ Cultivo de la línea celular NIH/3T3	33
	➤ Efecto del antagonista de PAR 1	34
6.6.	Efecto proliferativo de las fracciones del extracto	35
6.7.	Bionanoconjugación.....	36

➤ Síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs)	36
6.8. Caracterización del bionanoconjugado	37
➤ Caracterización espectrofotométrica UV-Vis	37
➤ Caracterización espectroscópica FTIR (espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier)	38
➤ Determinación del potencial Z	38
6.9. Evaluación del efecto cicatrizante del nanobioconjugado en el modelo in vivo	38
➤ Grupos de estudio del modelo <i>in vivo</i> excisional.....	38
6.10. Análisis estadístico	41
7. RESULTADOS.....	42
7.1. Elaboración del extracto acuoso de <i>Bacopa procumbens</i>	42
7.2. Evaluación de los cambios en la Matriz Extracelular (MEC)	42
7.3. Análisis de los cambios de expresión de marcadores moleculares a nivel génico en el modelo <i>in vivo</i>	44
➤ Estandarización de la RT-PCR cuantitativa	44
➤ Amplificación de genes por PCR en tiempo real	45
➤ Cambios de expresión de marcadores moleculares a nivel génico	48
7.4. Análisis del efecto proliferativo del extracto acuoetanólico de la planta <i>Bacopa</i> mediado por el receptor activado por proteasa-1 (PAR1) en el modelo <i>in vitro</i>	52
7.5. Efecto proliferativo de las fracciones y compuestos del extracto de <i>Bacopa procumbens</i>	54
7.6. Bionanoconjugación y caracterización del nanoconjugado con extracto de <i>Bacopa procumbens</i>	56
7.7. Efecto cicatrizante del bionanoconjugado en el modelo in vivo excisional.....	59
8. DISCUSIÓN.....	63
9. CONCLUSIÓN	78
10. PERSPECTIVAS	79
11. BIBLIOGRAFÍA	80
12. PRODUCTOS GENERADOS.....	89
12.1. Patentes	89
12.2. Artículos	98
12.2.1. Artículos publicados	98
12.2.2. Artículos enviados	106

12.2.3.	Artículos en preparación.....	144
12.3.	Congresos	145
12.4.	Ponencias	153

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fase Inflamatoria al tercer día.	4
Figura 2. Reepitelización y angiogenesis al 5to día..	7
Figura 3. Complejo pequeño y largo de Latencia de TGF β	9
Figura 4. Activación de TGF β durante el proceso de cicatrización	10
Figura 5. Vía canónica de TGF β	11
Figura 6. Sitios de regulación de α -SMA	13
Figura 7. Mecanismos post- transcripcionales de regulación de α -SMA	14
Figura 8. Liofilización del extracto	27
Figura 9. Ficha del Herbario de la especie <i>B. Procumbens</i> (Mill.) Greenm.....	42
Figura 10. Fotomicrografía representativa de la piel normal.....	43
Figura 11. Fotomicrografías representativas de las heridas a los 3, 5 y 7 días.....	44
Figura 12. Estandarización de MM9 primers 3/9.	46
Figura 13. Eficiencia de la reacción de MMP9.	47
Figura 14. Expresión relativa del mrna de Colágena tipo I.	48
Figura 15. Expresión relativa del mrna de Colágena tipo III.	49
Figura 16. Expresión relativa del mrna de α -SMA.....	50
Figura 17. Expresión relativa del mrna de TGF β 1.....	51
Figura 18. Expresión relativa del mrna de MMP9.....	52
Figura 19. Efecto del antagonista de PAR-1 en la proliferación inducida por <i>Bacopa</i>	53
Figura 20. Efecto dosis dependiente del antagonista de PAR-1 en la proliferación inducida por <i>Bacopa</i>	54
Figura 21. Efecto de las fracciones y compuestos de <i>Bacopa</i>	55
Figura 22. Espectro Uv-visible del nanoconjugado	57
Figura 23. Potencial Z.....	58
Figura 24. Caracterización espectroscópica vibracional del nanoconjugado.....	59
Figura 25. Cambios macroscópicos de las heridas.....	60
Figura 26. Efecto morfométrico en las heridas tratadas con el bioconjugado.....	60
Figura 27. Análisis histológico de las heridas.	61
Figura 28. Caracterización espectroscópica vibracional de las heridas 7 días postherida.	62
Figura 29. Análisis de α -hélice y estructura secundaria en lesiones 7 días post herida.	63
Figura 30. Modelo del mecanismo molecular inducido por el extracto de <i>Bacopa</i> y el efecto del nanobioconjugado.....	77

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los primers.....	44
Tabla 2. Condiciones de la qRT-PCR.....	44

IV. ABREVIATURAS

α -SMA	Del inglés α -Smooth muscle actin
AuNPs	Nanopartículas de oro
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Del inglés Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil-sulfoxido
EGF	Del inglés epidermal growth factor
ERK	Del inglés extracellular signal-regulated kinases
FGF	Del inglés fibroblast growth factor
FTIR	Del inglés fourier transformed infrared
<i>GADPH</i>	Gliceraldehído 3-fostafo deshidrogenasa
INF- γ	Interferón gama
JNK	Cinasa N- terminal c- Jun
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos
LAP	Proteína asociada a la latencia
LTBP	Proteína de unión tipo fibrilina de latencia
MAPK	Proteincinasas activadas por mitógeno
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramo
min	Minuto
μ l	Microlitro
ml	Mililitro
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
MMP	Metaloproteinasas de la matriz
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-bromuro difeniltetrazolio
PAR 1	Receptor activado por proteasa-1
PBS	Solución buffer de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Del inglés patelet derivative growth factor
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal bovino
SPR	Del inglés surface plasmon resonance
TGF β	Del inglés transforming growth factor
TSP	Trombospodina
U	Unidades
UV- vis	Ultravioleta-visible
VEGF	Del inglés vascular epidermal growth factor

V. RESUMEN

La cicatrización es un proceso altamente ordenado que consta de tres fases la fase inflamatoria, proliferativa y la de remodelación. Las heridas y sus complicaciones siguen siendo un problema de salud pública, para el cual en la actualidad no existe un tratamiento efectivo ni óptimo. Las plantas medicinales constituyen una fuente importante para el descubrimiento de nuevos compuestos activos para distintas patologías. En nuestro grupo de investigación hemos demostrado que componentes de la planta *Bacopa* promueven la proliferación celular y la cicatrización de las heridas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo doctoral demuestran que metabolitos del extracto de *Bacopa* activan el receptor de PAR1, a través de la fosforilación de ERK1/2, y de la inducción de la expresión de la MMP9. Esta vía libera y activa a TGF β -1, que se encuentra latente en la Matriz extracelular, promoviendo así la diferenciación a miofibroblastos muy probablemente vía la expresión de α -SMA. A los 5 días, la activación de TGF β -1 induce la expresión de los genes que codifican para TGF β -1, α -SMA y colágena tipo I. A partir de este tiempo, el extracto de *Bacopa* promueve la síntesis, depósito y ordenamiento de las fibras de colágena tipo I y modula la expresión de TGF β -1, α -SMA y colágena tipo I; y finalmente en la fase tardía (7 días), la expresión génica de TGF β -1, α -SMA y colágena tipo I disminuye casi a niveles basales. El regreso de TGF β -1 a un nivel basal de expresión sugiere que limitará la formación de cicatrices fibróticas o queloides. Por otro lado, aislamos y caracterizamos químicamente los componentes del extracto de *Bacopa*, y observamos que el compuesto GA induce el mismo efecto proliferativo que el extracto completo de *Bacopa*, sugiriendo que este es muy probablemente el compuesto responsable de los efectos cicatrizantes. Finalmente, en este trabajo reportamos la nanoconjugación del extracto con nanopartículas de oro, determinando que el uso del nanoconjugado disminuye 100 veces la concentración de extracto de *Bacopa* requerida para observar el mismo efecto cicatrizante a nivel macroscópico, histológico y bioquímico. Por lo que la nanoconjugación potencia el efecto del extracto de *Bacopa*, siendo un buen candidato para ser utilizado para el tratamiento tópico de heridas.

VI. ABSTRACT

Wound healing is a process highly ordered, involves three phases the inflammatory phase, the proliferative phase and the remodelling phase. Wounds and their complications still been a public health, for this problem currently there is not effective neither optimal treatment. Medicinal plants constitute an important source for the discovery of new active compounds for different pathologies. In our research group we have shown that components of the *Bacopa* plant promote cell proliferation and wound healing. The results obtained in the present doctoral work show that metabolites of the *Bacopa* extract activate the PAR1 receptor, through the phosphorylation of ERK1 / 2, and the induction of the expression of MMP9. This pathway releases and activates TGF β -1, that is latent in the extracellular matrix, thus promoting differentiation to myofibroblasts, most likely via the expression of α -SMA. After 5 days, the activation of TGF β -1 induces the expression of the genes that code for TGF β -1, α -SMA and type I collagen. From this time, the *Bacopa* extract promotes the synthesis, deposit and sorting of collagen type I fibers and modulating the expression of TGF β -1, α -SMA and collagen type I; and finally in the late phase (7 days), the gene expression of TGF β -1, α -SMA and type I collagen decreases almost to basal levels. The return of TGF β -1 to a basal level of expression suggests that it will limit the formation of fibrotic or keloid scars. On the other hand, we isolated and chemically characterized the components of the *Bacopa* extract, and we observed that the GA compound induces the same proliferative effect as the complete *Bacopa* extract, suggesting that this is very likely the compound responsible for the healing effects. Finally, in this work we report the nanoconjugation of the extract with gold nanoparticles, determining that the use of the nanoconjugate reduces 100 times the concentration of *Bacopa* extract required to observe the same healing effect at the macroscopic, histological and biochemical levels. Therefore, nanoconjugation enhances the effect of *Bacopa* extract, being a good candidate to be used for the topical treatment of wounds.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, el cual recubre todos los tejidos y órganos; este tiene diversas funciones, entre ellas la protección contra agentes físicos, químicos y biológicos del mundo exterior; el mantenimiento de la homeostasis por medio de la regulación de la temperatura; el mantenimiento del equilibrio hídrico por medio de la respiración, la absorción, la secreción y la dinámica vascular; la percepción sensitiva, la respuesta inmunitaria, además participa en la comunicación socio sexual (Gray, 1998. Geneser, 2003. Baum et al 2005. Arenas, 2006.).

1.2. Cicatrización

La cicatrización de heridas es un proceso complejo altamente ordenado y coordinado, modulado por interacciones biomoleculares complejas, caracterizado por tres fases: la inflamatoria, la proliferativa y la de remodelación, las cuales involucran procesos de proliferación, migración y diferenciación celular, angiogénesis, así como la remodelación de la matriz extracelular con la finalidad de restablecer cosméticamente y funcionalmente las características normales de la piel (Kinbara et al. 2002 y Kwan et al. 2011). Sin embargo, existen diversos factores internos y externos entre ellos la insuficiencia vascular, la inflamación prolongada, las infecciones y patologías agregadas como en el caso de la Diabetes Mellitus (DM) que pueden alterar el proceso, promoviendo el desarrollo de complicaciones tales como cronicidad de las heridas, infecciones complejas y la muerte.

1.2.1. Epidemiología de las heridas

En Estados Unidos alrededor de 3 millones de personas y el 2% de la población de zonas industrializadas sufren algún tipo de herida cada año. Además, el número de pacientes con heridas crónicas incrementará en los próximos 20 años (Yueh-Te Lin., et al 2015).

La causa más común de pérdida de tejido es por daño térmico, las cuales sumaron en el 2005 aproximadamente un millón de visitas a emergencias en Estados Unidos; otras causas de pérdida de piel incluyen trauma y úlceras secundarias por Diabetes Mellitus, úlceras por presión y estasis venosas.

Seiscientos mil pacientes sufren de úlceras venosas cuyo costo es de \$9,685 dólares por paciente; y otros 1.4 millones de personas en Estados Unidos sufren por úlceras por presión (Clark et al., 2007).

En México no se tienen estadísticas sobre la incidencia de las heridas, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica reportó que durante el año 2013 hubo 126 786 nuevos casos por quemaduras. La atención médica del paciente quemado es muy cara; se ha estimado que los costos por paciente varían de 30 mil a 500 mil pesos en casos de severidad leve sin disfunción orgánica, de 500 mil a 5 millones de pesos en casos de severidad moderada (con o sin disfunción orgánica) y de 5 a 40 millones, en casos severos (con o sin falla orgánica múltiple). En la mayor parte de las ocasiones el gobierno paga dicha atención médica en instituciones de salud pública ya que dichos montos no pueden ser solventados por los pacientes y sus familias (Moctezuma-Paz, et al. 2015).

1.3. Proceso de cicatrización

Para lograr el entendimiento del proceso de cicatrización es importante conocer las señales que desencadenan la proliferación de las células que se encuentran en la proximidad de la herida, y que permiten el depósito de nueva matriz extracelular en esta (Martin, 1997).

1.3.1. Fase inflamatoria

Una vez producida la lesión aguda del tejido, ocurre disrupción de vasos sanguíneos lo que promueve la formación del coágulo con la finalidad de mantener la hemostasia, para lo cual se requiere de la activación y agregación plaquetaria, lo que provoca la liberación de diversos factores (como el factor de crecimiento derivado de plaquetas) que promueven la quimioatracción de células del sistema inmune como los neutrófilos y macrófagos, a su vez estos liberan factores y citocinas que inducen el inicio de la reparación tisular ya que se forma una matriz extracelular provisional que favorece la migración celular de queratinocitos y fibroblastos (Martin, 1997, Baum et. al., 2005, Bielsa, 2006) (Figura 1).

Posteriormente a los 3 días de la lesión, los monocitos se transforman en macrófagos debido a la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y el factor transformante de crecimiento β (TGF- β); estos macrófagos inflamatorios además de fagocitar microorganismos y restos de tejido muerto adquieren la capacidad de liberar PDGF y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), lo cual es un estímulo para la formación de tejido de granulación (Singer and Clark, 1999., Martin, 1997. Tziotzio et al., 2012., Werner et al., 2003).

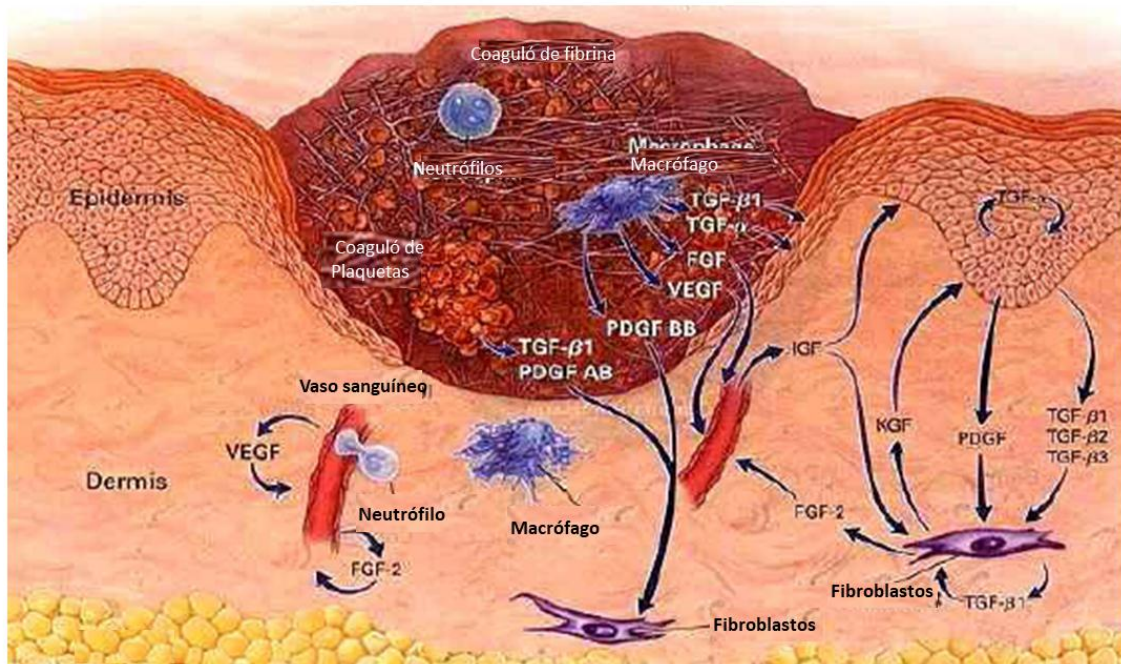


Figura 1. Fase Inflamatoria al tercer día. (Tomado de Clark, 1999).

1.3.2. Fase proliferativa:

Esta fase tiene como finalidad la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), la formación del tejido de granulación y la re-epitelización, para lo cual se induce la migración y proliferación de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales (Chistian et al., 2006, Landén et al., 2016) (Figura 2).

Esta fase inicia después de 4 días de la lesión, en este tiempo la MEC formada por las plaquetas es remplazada por tejido de granulación cuya principal característica es la presencia de nuevos capilares, además de un incremento y cambio de celularidad, ya que incrementa la presencia de fibroblastos que sintetizan fibras de colágena y disminuyen los macrófagos, sin desaparecer, ya que en esta fase continúan sintetizando factores de

crecimiento (VEGF, FGF, angiopoyetina 1, angiogenina, angiotropina, trombospondina y TGF β) y aunado a la presencia de componentes de la matriz extracelular (fibronectina, colágeno, vitronectina, lamininas 8 y 10), estimulan la migración y adhesión de las células endoteliales, las cuales a su vez expresan moléculas de adhesión como integrinas (Margadant y Sonnenberg 2010). Además de la influencia de la MEC, la ausencia de células vecinas en el margen de la herida (efecto de “borde libre”) potencia las señales de migración y proliferación de las células endoteliales (Singer et al., 1999., Martin, 1997., Baum et. al. 2005; Bielsa, 2006).

El proceso de migración y proliferación de los fibroblastos al igual que en las células endoteliales es altamente regulado por diversos factores de crecimiento (CTGF, Cyr61, por sus siglas en inglés *cystein riche* 61, PDGF, TGF- β 1) y por moléculas de la matriz extracelular como la fibronectina (Epstein et al., 1999., Baum et. al. 2005; Bielsa, 2006). En esta fase los fibroblastos actúan como una “maquinaria” ya que son los responsables de la síntesis, depósito y remodelación de la MEC, sustituyendo la matriz de fibronectina por fibras de colágena. En la capa de la dermis de la piel normal se encuentran distribuidas dos tipos de colágena, cuya proporción es el 80-90% tipo I y el 10-20 % colágena tipo III. Sin embargo, en heridas la proporción de colágena tipo III se incrementa hasta el 30 %, aunado a una falta de producción de las fibras elásticas provocando que las heridas tengan poca elasticidad. Las fibras de colágena en el proceso de cicatrización no solo restablecen la fuerza de las cicatrices, si no que participan en la migración celular. Además, los fibroblastos aproximan los bordes de la herida ya que tienen la capacidad de diferenciarse a miofibroblastos y adquirir propiedades contráctiles; esta diferenciación es estimulada por citocinas y factores de crecimiento como TGF β y el microambiente mecánico (Tomasek et al., 2002, Bielsa, 2006.,

Chistian et al., 2006., Epstein et al.,1999; Baum, et. al. 2005). Una desregulación en este proceso ocurre en los desórdenes fibroticos, como la formación de cicatrices queloides, cicatrices hipertróficas y el escleroderma (Bielsa, 2006., Epstein et al.,1999;).

La re-epitelización es esencial para el restablecimiento de la integridad tisular, para lo cual se requiere de la migración y proliferación de los queratinocitos adyacentes al sitio de la lesión y la restauración de la membrana basal. Este proceso es regulado por factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermoide (EGF), el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), TGF- α , TGF- β 1 y el factor de crecimiento epidermal de unión a heparina (HB-EGF); así como la expresión de integrinas ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_5\beta_5$, $\alpha_5\beta_6$), que les permite interactuar con las proteínas de la MEC como la fibronectina y vitronectina las cuales están intercaladas con las fibras de colágeno tipo I (Epstein et al., 1999.,Martin, 1997; Baum, et. al. 2005).

Por otro lado, para que se lleve a cabo el proceso de migración se requiere de la degradación de la matriz extracelular, este proceso está regulado por la producción de una familia de proteasas llamadas metaloproteinasas de la matriz (MMP) (Epstein et al., 1999). Dentro de las MMP, la MMP9 (gelatinasa B) tiene la capacidad de degradar la colágena tipo IV que se encuentra en la lámina basal, permitiendo la migración de los queratinocitos. La MMP1 es una colagenasa intersticial la cual se cree regula las interacciones entre células y matriz; la MMP10 (estromelisisna 2) tiene menor especificidad; la desregulación de estas MMPs puede contribuir a la cronificación de las heridas.

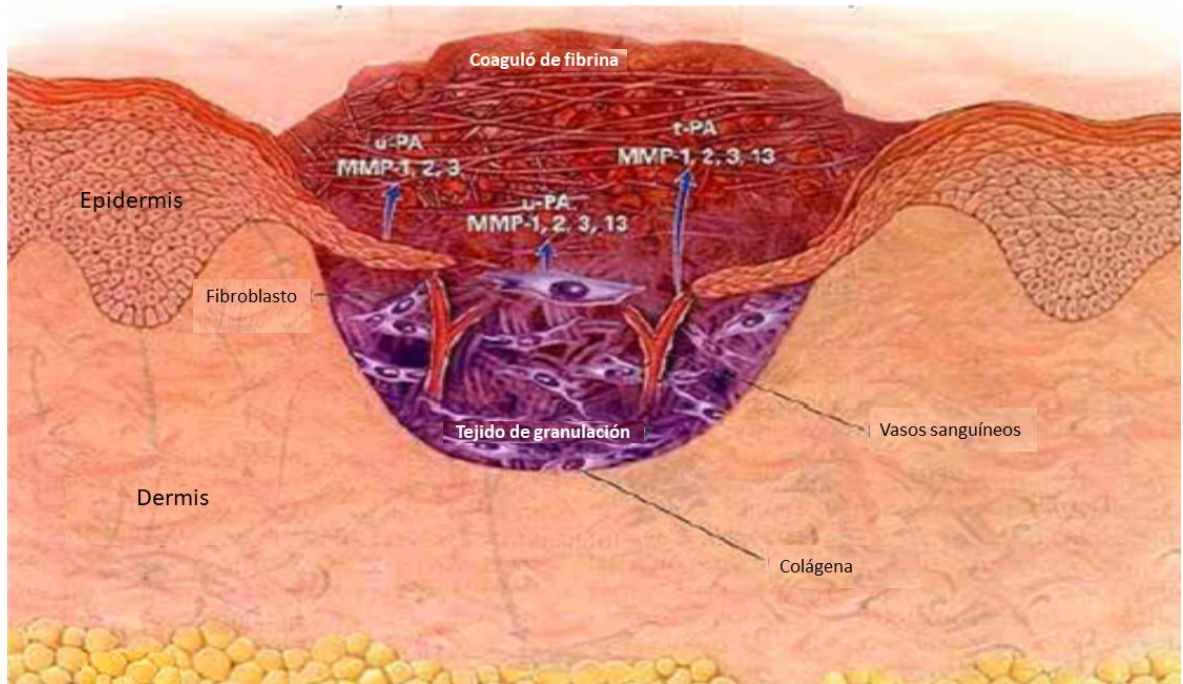


Figura 2. Reepitelización y angiogénesis al 5to día. (Tomado de Clark, 1999).

1.3.3. Fase de remodelación:

Finalmente, la fase de remodelación puede durar un período de semanas, meses e incluso años. En esta fase se lleva a cabo la contracción de la herida, para lo cual se lleva a cabo la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos, estos expresan una isoforma de filamentos de actina, del inglés “ α -smooth muscle actin” (α -SMA), que le da la cualidad de ser células contráctiles. Además, los miofibroblastos tienen mayor capacidad de síntesis de colágena.

Por lo que el incremento en la resistencia se debe a la producción de colágena y su arreglo, autorregulando la producción de la misma a través de factores como el interferón- γ (INF- γ) y el TNF- α . Este fenómeno requiere la remodelación de las fibras, es decir la disminución de la proporción de colágena III y el incremento de la colágena I, así como el ordenamiento de estas. Durante la formación de cicatriz, las fibras de colágena se encuentran dispuestas al azar, lo que explica que resulte poco resistente, a pesar de su elevada concentración.

Con el tiempo, las fibrillas aumentan su grosor, se incrementan las uniones interfibrilares y se distribuyen de manera ordenada, con lo que se maximiza su resistencia. Por otro lado, a medida que madura la cicatriz, disminuye la cantidad de vasos sanguíneos (por apoptosis) regulado por moléculas de la matriz, como las trombospondinas 1 y 2, y diversos factores antiangiogénicos, como la angiostatina, la endostatina y la angiopoyetina 2. Además, disminuye el número de fibroblastos y es característica la ausencia de apéndices cutáneos (Bielsa, 2006., Epstein et al., 1999; Baum, et. al. 2005).

1.4. El papel de TGF β en el proceso de cicatrización

El factor de crecimiento transformante β (TGF β) posee actividad pleiotropica, en los mamíferos se han identificado tres isoformas (TGF β 1–3), con una homología de 60-80% en su secuencia de aminoácidos (Ferguson, 1994). Este factor regula numerosas funciones celulares, incluyendo proliferación, diferenciación, apoptosis, transición mesenquimo-epitelial y síntesis de matriz extracelular, por lo cual modula las tres fases del proceso de cicatrización (Piek et al.,1999., Brunner et al., 2004).

En las fases tempranas de la lesión las plaquetas, macrófagos y neutrófilos son la principal fuente de TGF β -1, la activación del TGF β -1 liberado de las plaquetas estimula la respuesta celular inicial, así como la quimioatracción de células inflamatorias, la formación de nuevos vasos sanguíneos en el sitio de la lesión (Brunner y Blakytyn, 2004). En fases tardías del proceso de cicatrización el TGF β -1 induce la síntesis de matriz extracelular incluyendo fibronectina, colágena tipo I e integrinas y la actividad de miofibroblastos. Por lo que, TGF β -1 promueve la contracción de la herida y estimula un aumento de la fuerza tensil (Brunner y Blakytyn, 2004., Hayashi y Sakai, 2012).

1.4.1. Latencia de TGF β

El TGF β es secretado en forma de un complejo latente, conformado por el complejo pequeño de latencia TGF β , el cual está constituido por un dímero maduro de TGF β unido a la proteína asociada a la latencia de TGF β -1 (LAP). El LAP usualmente se une por un puente disulfuro con la proteína de unión tipo fibrilina de latencia de TGF β (LTBP 1, 3 o 4) para formar el complejo largo de latencia. Estas proteínas de unión unen al complejo de TGF β con la matriz extracelular, creando un reservorio en la matriz extracelular. (Brunner y Blakytyny, 2004) (Figura 3). LAP es el blanco de varios activadores de TGF β -latente, como proteasas, integrinas y trombospodina 1 (TSP-1).

La activación de TGF β extracelular es regulado por los niveles de biodisponibilidad (liberación de TGF β -latente de los reservorios de la MEC) y la latencia (liberación de la activación de TGF β del complejo latente).

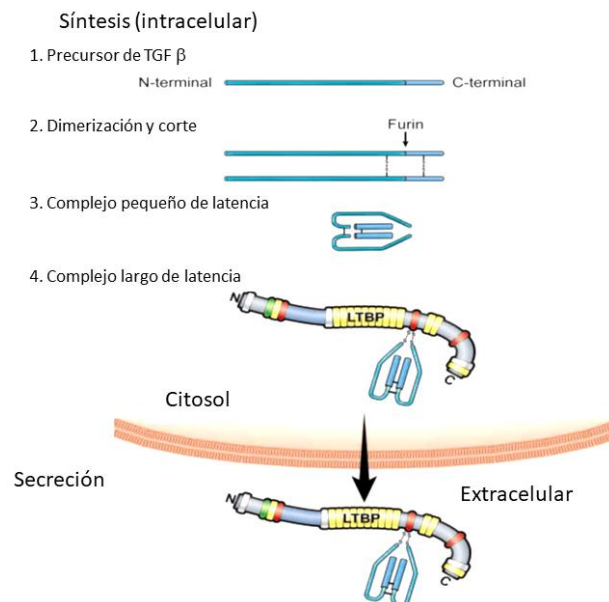


Figura 3. Complejo pequeño y largo de Latencia de TGF β (Tomado de Hayashi y Sakai, 2012).

1.4.2. Activación de TGF β

Mientras la expresión de las tres isoformas de TGF β durante el proceso de cicatrización han sido ampliamente demostradas en modelos *in vivo*, el mecanismo de depósito, movilización y activación de la forma latente durante este proceso no se conoce mucho.

Estudios en modelos animales de heridas incisionales sugieren que la activación del complejo mayor de latencia tiene dos picos en el tiempo, uno inmediatamente después de la lesión y el otro en la fase de re-epitelización (Figura 4).

El primer pico está relacionado con la activación de TGF β 1 en cual involucra enzimas tipo furina. La activación de este factor ayuda al reclutamiento de células inflamatorias que también secretan y activan al factor de crecimiento latente, contribuyendo al aumento en la actividad de TGF β durante este periodo de tiempo.

El segundo pico de activación de TGF β coincide con el cierre de la herida, sugiriendo que las interacciones epiteliales-mesenquimales están involucradas. En esta fase TGF β induce la diferenciación de las células epiteliales y fibroblastos, así como la regulación de la contracción de la herida. Las células epiteliales pueden activar TGF β mediante las interacciones de LAP con la integrina $\alpha v \beta 6$, la cual se encuentra sobre-expresada en este tiempo en los queratinocitos.

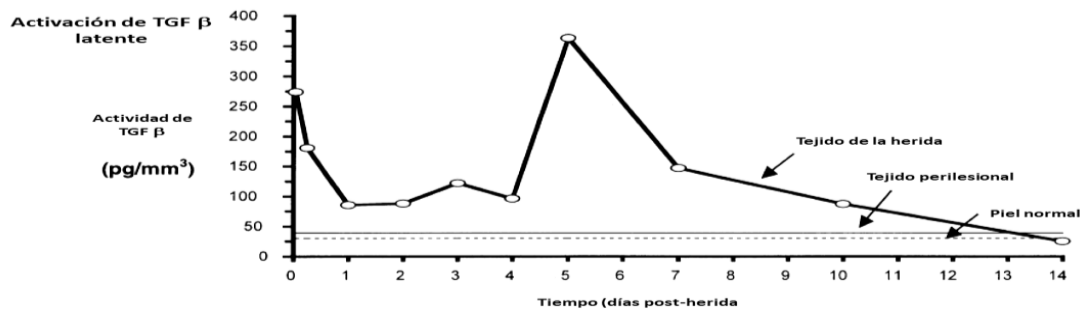


Figura 4. Activación de TGF β durante el proceso de cicatrización (Tomado de Hayashi y Sakai, 2012).

1.4.3. Vías de señalización reguladas por TGFβ

Las tres isoformas de TGFβ ejercen sus efectos mediante la unión dimérica de los receptores serina/treonina para TGFβ tipo I y II (TβRI y TβRII). Una vez unido el ligando a TβRII, este recluta a TβRI para formar un complejo heterotetramérico activado. TβRII mediante su actividad intrínseca de cinasa fosforila al TβRI en la región reguladora Gs, activando de esta manera al TβRI. Este último mediante su dominio activo de serina/treonina intra-citoplasmico, permite las subsecuentes fosforilaciones de sus efectores intracelulares como las proteínas SMAD (por la relación SMA/MAD), las cuales son importantes en su vía de señalización canónica (Figura 5).

TβRI fosforila a Smad2 y Smad3 (R-smad), lo cual permite la subsecuente unión con Smad4, formándose un complejo hetero-oligomérico, el cual se trasloca a núcleo donde regula la expresión de diversos genes, entre ellos colágena tipo I, colágena tipo III, PAI-I, TIMP-I y α-SMA (Verrecchia et al., 2002., Ashcroft et al., 1999., Schiller et al., 2004., Liu et al., 2012).

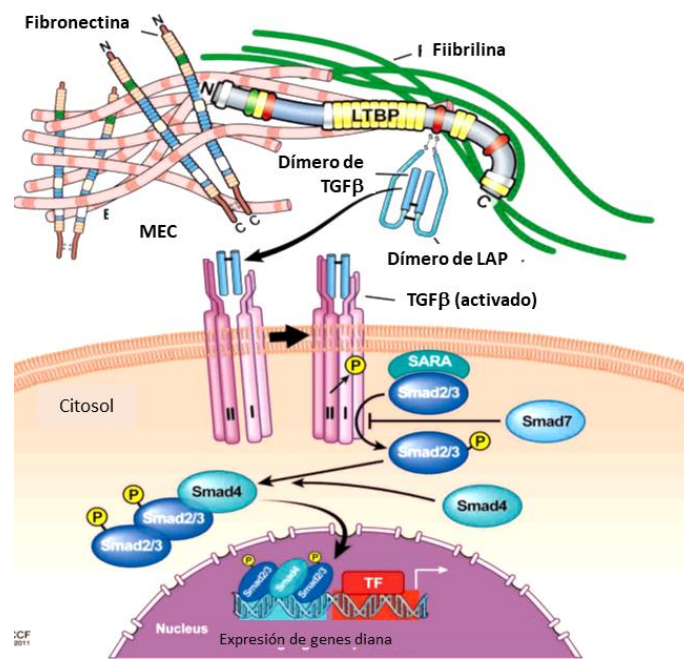


Figura 5. Vía canónica de TGFβ (Tomado de Hayashi y Sakai, 2012).

TGF β puede iniciar otras vías de señalización incluyendo la vía de la familia de proteincinasas activadas por mitógeno (MAPK). Esta familia consiste en la vía de señalización extracelular regulada por cinasa (ERK), la vía de JNK (cinasa N- terminal c- Jun) y la vía de p38 (Javelaud et al., 2003).

1.5. El papel de los miofibroblastos en el proceso de cicatrización

Los miofibroblastos son células que proveen la fuerza mecánica necesaria para el cierre y contracción de la herida (Tomasek et al, 2002). La formación de estos miofibroblastos es inducida por citocinas, factores de crecimiento como TGF β 1, y el microambiente mecánico (Darby et al., 2014; Scotton and Chambers, 2007; Tomasek et al., 2002).

1.5.1. Regulación de la actina α -smooth muscle

La actina es la proteína más abundante en eucariotas, la cual regula la forma, la dinámica y motilidad celular. Se han identificado 6 isoformas, identificadas como 2 isoformas sarcoméricas (actina α -esquelética y α -cardiaca), 2 isoformas de actina Smooth muscle (actina smooth muscle α y γ) y 2 isoformas de actina no musculares citoplasmáticas (actina esquelética β y γ). Las isoformas difieren en su secuencia amino terminal, sugiriendo su función entorno a la interacción proteína-proteína. Los fibroblastos quiescentes contienen solo las isoformas de actina citoplasmica β y γ (Khaitlina, 2001). Una vez que se activan, se modula el fenotipo miofibroblástico y comienza la expresión de la actina α smooth muscle (α -SMA). α -SMA se incorpora entre las fibras de estrés de los miofibroblastos generando la contracción durante el proceso de cicatrización (Tomasek et al, 2002).

La transcripción del gen α -SMA está regulado por factores de transcripción que se unen a los elementos de regulación *-cis* en el promotor del gen de α -SMA. El elemento específico de músculo MCAT (-182^a -176) es necesario para la unión de proteínas de activación transcripcional TEF1, la caja CArG (-120 a -11, -70 a -61), la unión de factor de Respuesta a Suero (SRF) y 6 elementos THR ricos en GC (-169 a -157) y TCE (-54 a -44) se unen a sitios Sp1/Sp3. TGF β 1 puede inducir α -SMA por su afinidad a la doble cadena SPUR (Subramanian et al 2004) (Figura 6).

Las proteínas Pur α y Pur β y la proteína de respuesta al estrés de unión 1 a Y-box (YB-1) tienen preferencia de unión a cadena de ácido nucleico monocatenario, copera e interactúa físicamente con 200 pb del promotor de α -SMA superponiendo y potenciando la unión con los trans-activadores TEF1, SRF, Sp1/3 y Smad (Strauch y Hariharan, 2013).

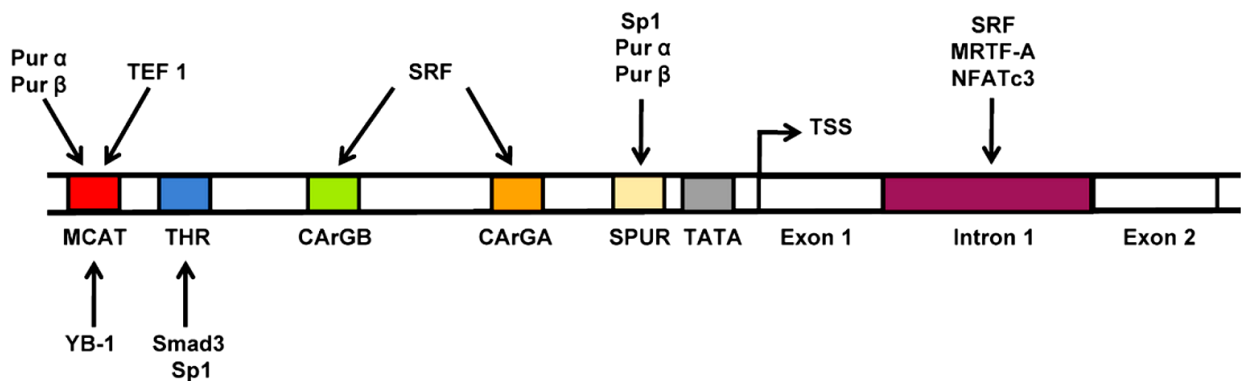


Figura 6. Sitios de regulación de α -SMA (Tomado de (Strauch y Hariharan, 2013).

Los mecanismos post-transcripcionales que modifican la estabilidad y o traducción del mRNA son importantes en la coordinación e iniciación, pero también en una resolución rápida de la respuesta del proceso de cicatrización. La coordinación de la respuesta transcripcional y traduccional del mRNA de α -SMA durante la diferenciación de miofibroblastos involucra

aspectos del control feed-forward y feed-back necesario para la regulación estrecha entre la acumulación y la regresión de la contractilidad de los miofibrobalstos, ya que una falla en la autoregulación de la diferenciación de miofibroblastos puede asociarse a fibrosis y fallas en la remodelación del tejido (Strauch y Hariharan, 2013).

Pur α y YB-1 pueden mediar aspectos del empaquetado del mRNA y su transporte intracelular del núcleo a los sitios de síntesis proteica en los polirribosomas. Jonson en 2013 sugiere que YB1 tiene funciones como portero en los miofibroblastos, este controla el tamaño del pool de mRNA y selecciona del almacenaje de transcritos lo que será guiado a los polirribosomas para biosíntesis rápida de proteínas especializadas como α -SMA (Strauch y Hariharan, 2013) (Figura 7).

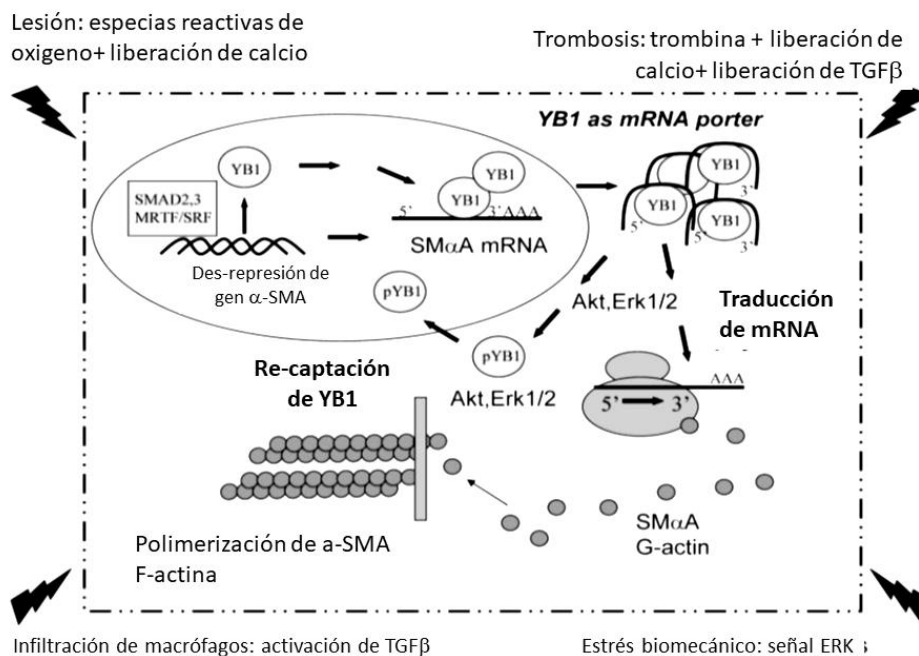


Figura 7. Mecanismos post- transcripcionales de regulación de α -SMA (Tomado de (Strauch y Hariharan, 2013).

1.6. Regulación de la matriz extracelular

Durante el proceso de cicatrización, la síntesis y distribución normal de la colágena contribuye al restablecimiento funcional de la piel, ya que la organización de la colágena es fundamental

para el restablecimiento de las propiedades mecánicas de la misma (Kinbara et al. 2002; Kwan et al. 2011; Yano et al. 2012; Leivonen et al. 2013).

Los miofibroblastos sintetizan componentes de la MEC como Colágena tipo I, III IV y V así como fibronectina y la variante ED-A FN (Serini et al., 1998).

En la fase de remodelación el contenido total de colágena disminuye, mientras que la fuerza tensil aumenta como resultado de la sustitución de fibras de colágena inmadura por fibras de colágena madura compactas. El incremento en el diámetro de las fibras está asociado con un aumento en la fuerza tensil. La degradación de colágena en el sitio de la lesión está controlada por enzimas proteolíticas llamadas metaloproteinasas de matriz (MMP) las cuales son secretadas por macrófagos y fibroblastos.

1.6.1. El papel de las MMPs en el proceso de cicatrización

La degradación de la matriz extracelular es necesaria para retirar el daño del tejido y eliminar la matriz provisional, permitiendo la formación de vasos y la migración celular durante el proceso de cicatrización. Este proceso de remodelación involucra la acción de proteinasas extracelulares.

Las MMPs componen una familia de 28 endopeptidasas dependientes de zinc, las cuales han sido subdivididas por su sustrato. La MMP-1 es producida por fibroblastos, macrófagos, durante el proceso de cicatrización degrada fibras de colágena permitiendo la migración de queratinocitos.

La MMP-2 y MMP-9 son gelatinasas que degradan colágena tipo IV y los componentes de la membrana basal. La expresión de MMP-9 en el sitio de la lesión promueve la migración de queratinocitos y la re-epitelización (Hattori et al, 2009., Austin et al, 2013).

Las MMP-2 y MMP9 también son capaces de activar la forma latente de TGF β , estimulando procesos de angiogenesis (Qin Yu y Stamenkovic, 2000).

1.6.1.1. Regulación de la actividad de las MMP

La actividad de las MMPs puede ser regulada en tres niveles: transcripción, activación de la pro-enzima, y la inhibición específica de TIMPs. En el tejido adulto, niveles bajos de expresión de MMPs media la remodelación de la matriz normal, mientras que, durante procesos de inflamación y lesión, aumenta los niveles de expresión de MMP.

La mayoría de los genes de MMP están regulados a nivel transcripcional, excepto la MMP-2, cuya expresión está controlada solo a nivel de la activación enzimática. La MMP-8 y MMP-9 están almacenadas en los gránulos de secreción de neutrófilos, cuya regulación esta mediada por la liberación de dichos gránulos. El promotor de la MMP-9 contiene dos sitios AP-I y su expresión está sujeta a modificaciones por signos fisiológicos.

Las MMPs se sintetizan en forma inactiva como pro-enzimas o zimógenos. Este estado inactivo se mantiene por la unión entre cisteínas en el prodominio y el átomo de zinc en el dominio catalítico. Tras la ruptura de la unión zinc-cisteina, se desencadenan una serie de cortes auto catalíticos que generan la liberación del prodominio permitiendo la actividad catalítica completa de la enzima. Esta activación extracelular puede ser iniciada por otras MMPs o por diversas serin proteasas.

1.7. Factores que influyen en la cicatrización

Dado la alta complejidad del proceso de cicatrización este puede estar modificado por diversos factores. Las principales causas que pueden alterar el proceso de cicatrización de las

heridas son la hipoxia, infecciones, edema y anormalidades metabólicas. Así las infecciones prolongan la fase inflamatoria impidiendo que las demás fases se lleven a cabo. El edema actúa como una barrera para el oxígeno y los nutrientes, ya que incrementa la distancia de difusión. Y los trastornos metabólicos afectan a la cicatrización en diversas formas (Broughton et al., 2006).

1.8. Tratamiento de las heridas

El objetivo principal en el tratamiento de las heridas es un rápido cierre de la herida y una cicatriz con funcionalidad y estética satisfactoria.

El primer paso en el manejo de las heridas consiste en saber identificarlas y clasificarlas de acuerdo con su etiopatogenia, conociendo las diferencias clínicas entre los diferentes tipos de heridas y determinar si la herida es aguda o crónica según temporalidad y orden. Una vez establecido el tipo de herida que se trata, se debe evaluar al paciente como un todo y no sólo por la herida que presenta, contemplando así todos los factores que influyen en el proceso de cicatrización, como son el estado nutricional y metabólico, el compromiso vascular periférico, las enfermedades asociadas, el uso de medicamentos y, muy importante, el entorno psicosocial del paciente (Jiménez, 2008., Fonder et al., 2008).

El tipo de curación de las heridas se clasifica en convencional y avanzada. La curación convencional de las heridas consiste en el uso de materiales de baja absorción y alta capacidad de desecación como lo son las compresas, gasas, torundas o apósitos. Estos materiales son pasivos, enlentecen y complican la cicatrización, aumentando costos, aumentando la incidencia de infección y generando más dolor (Jiménez., 2008). La curación avanzada se basa en mantener un ambiente húmedo utilizando apósitos o materiales capaces

de mantener el microambiente de la herida (condiciones de pH, temperatura y humedad) (Flores., 2006).

Además de los tratamientos convencionales, en la actualidad las personas recurren a terapias o tratamientos alternativos con la finalidad de que se lleve adecuadamente la reparación de las heridas, siendo las plantas una alternativa, la cual ha sido ampliamente utilizada de forma empírica en la medicina tradicional.

1.9. Nanomedicina en el tratamiento de heridas

Por otro lado, la nanotecnología se ha expandido rápidamente por su impacto en diversas disciplinas como en la creación de diversos agentes terapéuticos o de diagnóstico (de Lima et. al 2012). Las propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas y catalíticas únicas de las nanopartículas pueden ser moduladas cambiando su tamaño, forma o mediante la funcionalización de su superficie, sin cambiar la composición del material (Zanella 2012).

La interacción entre la nanotecnología y la medicina ha permitido el desarrollo de la nanomedicina, la cual comprende aquellas prácticas médicas, incluyendo la prevención, el diagnóstico y el tratamiento, que requieren tecnologías basadas en interacciones entre el cuerpo humano y materiales, estructuras o dispositivos cuyas propiedades se definen a escala nanométrica.

Los avances en medicina por el uso de la nanotecnología se concretan principalmente en mejoras en los métodos diagnósticos, la liberación de fármacos y en la medicina regenerativa.

El conseguir nuevos fármacos eficaces para la lucha contra las enfermedades es una tarea muy difícil y la nanomedicina constituye una oportunidad para diseñar nuevos tratamientos o mejorar los ya existentes, incrementando la potencia farmacológica y disminuyendo la

concentración del agente bioactivo, disminuyendo con ello los posibles efectos secundarios del producto. Por este motivo, la nanomedicina ofrece nuevas soluciones al tratamiento, generando tratamientos “inteligentes” que controlan la liberación de los fármacos, actuando y estimulando los propios mecanismos controladores y reparadores del cuerpo humano (González et al, 2006).

1.10. Nanopartículas

Dentro de los materiales utilizados en la nanomedicina se encuentran las nanopartículas, las cuales presentan un núcleo de un nano-biomaterial, este puede estar compuesto por materiales orgánicos o inorgánicos.

Las nanopartículas de oro (AuNPs) son las partículas de metales más estables y poseen características interesantes como su comportamiento individual, el tamaño y sus propiedades ópticas y magnéticas, así como su aplicación en catálisis.

La aplicación de estas nanopartículas involucra su bioconjugación con moléculas que por sus propiedades ópticas permiten su caracterización por el plasmon de superficie (SPR del inglés surface plasmon resonance). El SPR puede ser medido mediante su espectro de UV-Vis, ya que la frecuencia del SPR se encuentra en el rango del espectro visible y depende de diversos factores como el tamaño, la forma, las propiedades dieléctricas, el ambiente y la interacción interpartícula, así como de la densidad electrónica en el metal, permitiéndonos caracterizarlas (de Lima et al., 2012).

2. ANTECEDENTES

Dada la relevancia en el tratamiento efectivo y oportuno de las heridas se han buscado nuevas alternativas para el tratamiento de dicha patología, teniéndose en las plantas medicinales un blanco terapéutico.

2.1. Efecto cicatrizante de diferentes plantas de la familia Scrophulariaceae

En la literatura hay plantas pertenecientes a diversos géneros de la familia Scrophulariaceae usadas en la medicina tradicional que favorecen el proceso de cicatrización, tales como algunas plantas pertenecientes a los géneros *Euphrasia*, *Veronica*, *Scrophularia*, *Buddleja*, *Torenia*, *Castilleja*, *Verbascum*, etc., de las cuales no en todas ha sido validado su uso (Stevenson et al., 2002).

2.2. Características generales de la planta *Bacopa procumbens*

El género *Bacopa*, es uno de los 220 géneros que pertenecen a la familia Scrophulariaceae, es principalmente americano y comprende alrededor de 60 especies; sin embargo, la especie *B. procumbens* (Mill.) Greenm., es la misma que *Mecardonia procumbens* (Mill.) Small.

2.2.1. Clasificación taxonómica

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Scrophulariales

Familia	Scrophulariaceae
Género	<i>Bacopa</i>
Especie	<i>Bacopa procumbens</i> (Mill.) Greenm

2.3. Efecto *in vitro* e *in vivo* de la planta *Bacopa procumbens* en el proceso de cicatrización

Nuestro grupo de trabajo ha estudiado el efecto cicatrizante del extracto acuotanolico de la planta *Bacopa procumbens* mediante estudios *in vitro* evidenciando que el extracto acuotanolico de esta planta estimula eventos relevantes en el proceso de cicatrización, como la proliferación, la adhesión, la migración y diferenciación celular (Hidalgo, 2010). En el modelo *in vivo* se observó que aumenta la contracción de la herida, la re-epitelización, la formación y la orientación de los fibroblastos y un aumento en el contenido total y orientación de las fibras de colágena a 7 y 15 días (Ceja, 2013; Martínez et al. 2014); e interesantemente se observó que dicho extracto regula la expresión de diversos marcadores moleculares que participan en más de una de las fases del proceso de cicatrización (Martínez, 2013).

2.4. Nanopartículas de Oro en el tratamiento de heridas

Las nanopartículas de oro (AuNPs) pueden ser ampliamente aplicadas como nanotransportadores de medicamentos y genes; estas AuNPs han demostrado ser capaces de penetrar el estrato corneo de la piel. Estudios recientes han demostrado que la formulación de AuNPs con productos naturales pueden aumentar su actividad biológica; tal es el caso de la formulación de AuNPs con dos antioxidantes (epigallocatequina galeato y ácido α -lipoico)

las cuales aceleran la cicatrización en un modelo *in vivo* regulando el proceso inflamatorio y por su actividad antioxidante (Leu et. 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente las heridas siguen siendo un problema de salud pública cotidiano que requiere de atención hospitalaria y extra hospitalaria, generando gastos importantes, además de las complicaciones que se pueden presentar como ulceración y cronicidad de las heridas por diversos factores (diabetes, desnutrición, infección, isquemia, entre otros).

Aunque en la actualidad existen diversos tratamientos para la reparación y cuidado de heridas, algunos de ellos han demostrado tener efectos secundarios, además de su elevado costo, en la mayoría de los casos. Por lo que diversas investigaciones se han enfocado a la búsqueda de nuevos productos que favorezcan la cicatrización. Las plantas constituyen una opción viable para la búsqueda de metabolitos específicos que favorezcan dicho proceso.

En nuestro país hay una gran riqueza en flora, dentro de la cual existen plantas medicinales que son utilizadas por pobladores de manera empírica. Sin embargo, es importante demostrar esta actividad por métodos científicos que avalen su efecto terapéutico.

En el caso de la planta *Bacopa*, la cual ha sido utilizada para la curación de todo tipo de heridas por los pobladores de Huasca de Ocampo, se han obtenido resultados *in vitro* e *in vivo* que sustentan su uso terapéutico y que demuestran su acción en las tres fases del proceso de cicatrización estimulando diversos eventos como la proliferación, adhesión, migración y diferenciación celular modulando diversos marcadores moleculares; sin embargo,

es importante elucidar los mecanismos y vías de señalización involucrados en el proceso de cicatrización a nivel génico que pudieran estar siendo estimuladas por el extracto acuoetanólico de esta planta, además el fraccionamiento de los componentes químicos y los subsecuentes estudios funcionales nos permitirán determinar si el efecto terapéutico observado es atribuible a uno o algunos metabolitos en particular o depende de alguna actividad sinérgica de más de uno de ellos.

Con la fusión de la nanotecnología con la fitoterapia se buscará mejorar el efecto cicatrizante del extracto de esta planta, mediante la nanoconjugación y su formulación de aplicación tópica que mejore el proceso de cicatrización.

4. OBJETIVOS

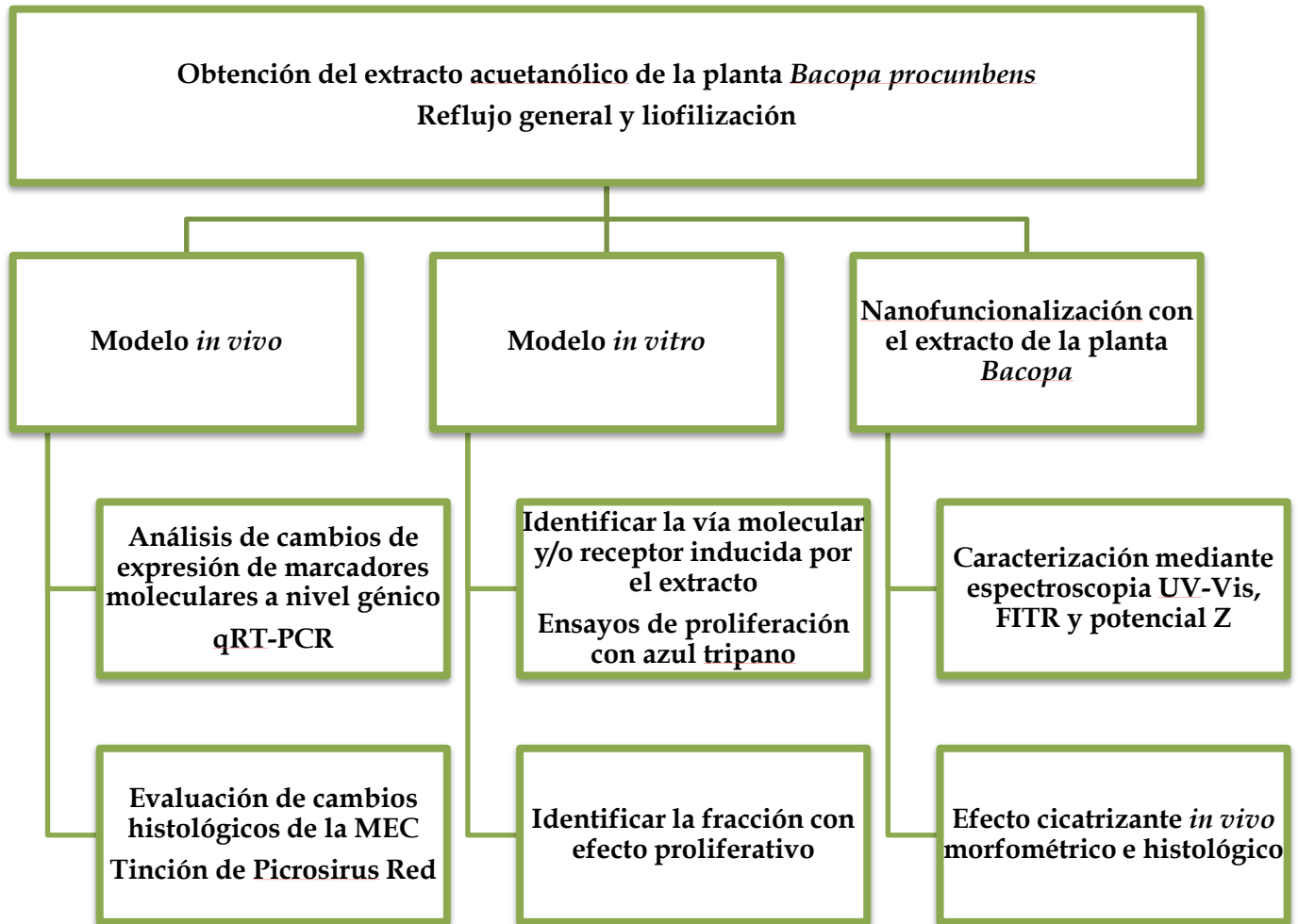
4.1. Objetivo general

Desarrollar un fitofármaco nanofuncionalizado de aplicación tópica para el tratamiento de heridas.

4.2. Objetivos específicos

1. Evaluar los cambios inducidos en la matriz extracelular por el extracto de la planta *Bacopa procumbens*.
2. Identificar la vía molecular inducida por el extracto de la planta en el proceso de cicatrización.
3. Analizar el efecto proliferativo de fracciones obtenidas a partir del extracto de la planta *Bacopa procumbens*.
4. Sintetizar, caracterizar y nanofuncionalizar nanopartículas de oro con el extracto de *Bacopa*.
5. Evaluar el efecto cicatrizante de las nanopartículas de oro funcionalizadas con el extracto de la planta en un modelo *in vivo*.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Elaboración del extracto acuotánico de *Bacopa procumbens* incluida en un hidrogel

➤ Recolección y obtención del extracto acuotánico de la planta *Bacopa procumbens*

La recolección de la planta metatera se realizó en el poblado de San Miguel Regla, Municipio de Huasca de Ocampo en el estado de Hidalgo, localizado entre los 20° 21' y 20° 06' de latitud norte; 98° 38' y 98° 27' de longitud oeste; con una altitud promedio de 2100 msnm y una superficie de 30,580 hectáreas (INEGI, 1998; COEDE, 1999). La clasificación taxonómica de la planta colectada se realizó en el herbario IZTA de la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala, UNAM, en donde ya se cuenta con dos ejemplares de la planta. La planta se extendió sobre papel de estraza y se colocó a la sombra para su secado, posteriormente la planta completa (raíz, tallo, hojas, flores y semillas) se trituró para disminuir su volumen antes de proceder a la molienda, la cual se realizó en un molino de martillos con la finalidad de aumentar la superficie de contacto. Una vez que se obtuvo el polvo de la planta este se utilizó para la extracción de los metabolitos mediante reflujo general, utilizando disolventes polares en proporción 50:50 (agua:etanol). Para lo cual se pesaron 40 g de la planta seca y molida, se colocó con 600 ml de solución agua:etanol en un matraz balón conectado a un condensador recto en agitación constante a 76 °C durante cuatro horas, posteriormente se centrifugó a 5,000 rpm durante 15 min recolectando la fase líquida (almacenada a 4 °C en frascos ámbar), la fase sólida se colocó en las mismas condiciones de reflujo y repitiéndose 3 veces. La fase líquida colectada se concentró en un rotavapor (EYELA, modelo N-1001S) acoplado a una bomba de vacío a una temperatura de 50 °C y 50 rpm, con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de los disolventes (agua:etanol).

➤ Liofilización del extracto acuoetanólico

La liofilización es el proceso de desecación, donde el solvente (agua) es congelado y eliminado por sublimación en ambiente de vacío, sin producir ningún cambio en su estructura o composición; para lo cual la muestra concentrada fue colocada en tubos falcón de 50 ml y congelada con nitrógeno líquido, posteriormente estos tubos fueron colocados en el liofilizador LABCONCO bajo las siguientes condiciones presión de vacío 0.250 mBar y -50 °C durante 48 horas, posteriormente, la muestra liofilizada fue colocada y almacenada en frascos ámbar a temperatura ambiente (Figura 8).

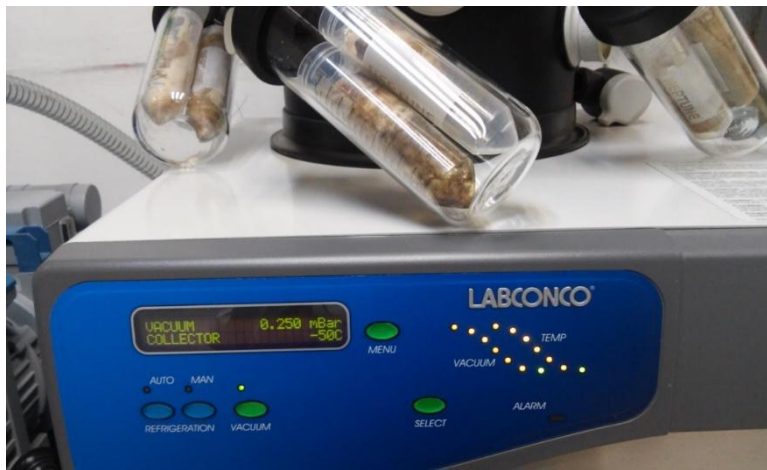


Figura 8. Liofilización del extracto.

➤ Preparación del extracto acuetanólico incluido en un hidrogel para su administración tópica en el modelo *in vivo*

El extracto acuoetanólico de la planta *Bacopa* liofilizado fue rehidratado con el vehículo a una concentración final de 160 mg/ml, el vehículo fue un hidrogel según se indica en la patente con folio MX/E/2016/092907.

6.2. Reproducción del modelo *in vivo* excisional de cicatrización

Se utilizaron ratas Wistar machos (obtenidas del Bioterio del IPN-CINVESTAV), de peso 220-240 g, las cuales se mantuvieron en cajas de polipropileno para su adaptación, con ciclos de luz oscuridad de 12 h, alimento y agua *at libitum*, a una temperatura entre 26 a 28 °C. Durante el estudio se excluyeron las ratas que manifestaron datos de infección o irritación. Este estudio fue sometido a la aprobación del Comité de Ética de la Sección de Postgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN.

➤ Desarrollo de la herida excisional

Antes de iniciar los experimentos las ratas fueron adaptadas a su medio durante 48 h. A cada rata se le realizó tricotomía en la región dorsal, posteriormente se dejaron en observación durante 24 h para verificar que no presentaran irritaciones en la piel previo a la realización de la herida excisional. (Morton, 1972; Gisely; *et. al.*, 2005; Shivananda; *et. al.*, 2009). Bajo anestesia utilizando Ketamina 50mg/Kg y Xilacina 5mg/Kg; se colocó a la rata en una superficie estéril y se procedió a realizar la asepsia y antisepsia de la región dorsal con jabón quirúrgico y solución estéril, la intervención quirúrgica se llevó a cabo bajo condiciones estériles, primeramente se delimitó las 4 zonas de escisión de 1cm², las primeras 2 marcas se realizaron cerca al área cervical, una marca a cada lado de la línea media de forma equidistante y un centímetro debajo de estas se realizaron las otras 2 marcas siguiendo el mismo patrón, posteriormente se realizaron las 4 escisiones, retirando la totalidad del espesor de la piel hasta antes de la capa de tejido muscular con hoja de bisturí del número 11, pinzas de disección sin dientes; posterior a la escisión, las heridas se irrigaron con solución fisiológica 0.9% estéril y posteriormente en las 4 heridas realizadas en cada rata se aplicaron

los tratamientos (Shivananda, *et. al.*, 2009). Se finalizó el procedimiento quirúrgico y se colocaron a las ratas en cajas individuales de polipropileno las cuales previamente fueron limpiadas con cloruro del benzalconio y a las cuales se les colocó aserrín estéril.

➤ Obtención, preparación y almacenamiento de las muestras de tejido

Los grupos de estudio fueron divididos al azar como se describe posteriormente, al finalizar los días de estudio se sacrificaron los animales en una cámara de CO₂. (Shivananda *et. al.*, 2009). Se obtuvieron biopsias del tejido al tiempo 0 (piel normal) y después del sacrificio a los 3, 5 ó 7 días del sitio de lesión siguiendo sus bordes, 3 de las 4 biopsias fueron almacenadas en trizol (en la fase de investigación básica), para posteriormente realizar la extracción de RNA; la otra biopsia, fue fijada en formol amortiguado e incluida en parafina, para realizar posteriormente la tinción correspondiente para los análisis histopatológicos.

➤ Grupos de estudio del modelo *in vivo* excisional

Los animales fueron divididos al azar en 3 grupos para determinar el mecanismo molecular inducido por el extracto acuotánico de la planta metatera en el modelo *in vivo*, el grupo 1, 2 y 3 corresponden a los días de tratamiento 3, 5 y 7 días respectivamente; cada uno de los grupos fue dividido en 3 subgrupos de 6 ratas cada uno; el subgrupo I corresponde al control negativo (no se le aplicó ningún tratamiento), el subgrupo II fue un control (tratado con la formulación farmacéutica comercial para el tratamiento de heridas, (KitosCell), el subgrupo III fue tratado con 160 mg /ml del extracto acuotánico de la planta. Se aplicaron 100µl en cada herida del extracto o el KitosCell diariamente por vía tópica. Al final del estudio las ratas se sacrificaron.

6.3. Evaluación de los cambios en la MEC

Para el análisis de los cambios en la MEC se evaluó histopatológicamente, para lo cual los cortes colocados previamente en las laminillas se tiñeron con la tinción de Picrosirius Red.

Tinción de PicroSirius Red

Se obtuvieron cortes de 4µm de las muestras incluidas en parafina, los cuales fueron desparafinados, hidratados y teñidos con la solución de PicroSirius Red (abcam) durante 60 min, posteriormente se realizaron 2 lavados con solución ácido acético (abcam), se lavó con etanol al 95% para posteriormente aclarar con etanol absoluto y finalmente se montó con resina. Dichas muestras fueron observadas y analizadas en el microscopio Nikon Eclipse LV100, con luz polarizada, se realizaron microfotografías al aumento 200x utilizando el software NIS-Elements a un aumento de 20x.

6.4. Análisis de los cambios de expresión de marcadores moleculares a nivel génico en el modelo *in vivo*

➤ **RT-PCR cuantitativa**

Para el análisis de los marcadores moleculares a nivel génico se extrajo RNA de las biopsias a los 0, 3, 5 y 7 días, los tejidos almacenados en trizol se homogenizaron, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm 10 min a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, al que se le adicionaron 0.2 ml de cloroformo (J.T. Baker), la mezcla se agitó vigorosamente durante 15 s y posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 3 min. Para separar la fase acuosa de la mezcla, se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Una vez separada la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se le adicionó 0.5 ml de isopropanol (J.T. Baker)

para precipitar el RNA, el cual una vez precipitado se lavó con 1 ml de etanol (J.T. Baker) al 75%, por cada ml de trizol adicionado. Posteriormente el RNA se secó al aire y se resuspendió con agua/DEPC (dietilpirocarbonato) al 0.05%. Una vez que se obtuvo el RNA este se cuantificó y se evaluó la integridad en un gel desnaturalizante, posteriormente se trató con DNAsa utilizando la metodología indicada por el proveedor, para posteriormente sintetizar el cDNA, lo cual se realizó utilizando el SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo el protocolo que se describe a continuación: se preparó la mezcla de 50µM de Oligo (dT)₂₀, 1000 ng de RNA y mezcla de dNTP (10 mM), ajustando el volumen a 12 µl con agua-DEPC. La mezcla se incubó a 65 °C por 5 min y se colocó a 4 °C. Después se adicionó la mezcla de reacción 4 µl de buffer de síntesis de cDNA, 1 µl 0.1 M DTT, 1 µl RNAsa OUT (40 U/ µl), 1 µl de agua DPC y 1 µl de RT (15 U/ µl), finalmente se incubó 50 min a 50 °C, seguido de 85 °C por 5 min en un Termociclador Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 9600. Una vez sintetizado el cDNA se almacenó a -20 °C hasta su uso para la amplificación en tiempo real. Los oligonucleótidos para estos ensayos se diseñaron utilizando el programa Primer Express 2.0 desarrollado por Applied Biosystems. La PCR en tiempo real se realizó en un equipo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System-SDS versión del programa 1.1 PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, utilizando SYBR Green como sistema de detección y el Kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 12.5µl los cuales contenían 6.25µl del Master Mix SYBR Green, 1.75µl de agua inyectable, 2.5µl del templado y 1.25µl de cada uno de los primers a concentraciones diferentes previamente estandarizadas para obtener la mejor amplificación. Las reacciones se realizaron por triplicado en placas ópticas de 96 pozos y se sometieron a las condiciones de 95 °C por 10 min y 40 ciclos de 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 min.

➤ Curvas de disociación de los genes amplificados

Con la finalidad de comprobar la especificidad de la reacción de PCR, finalizada la reacción de PCR, los productos se sometieron a incrementos de temperatura desde 60 °C a 95 °C para construir una curva de disociación de cada gen amplificado. Esta curva se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente después de la PCR, para monitorear la cinética de disociación de los fragmentos amplificados.

➤ Método de cuantificación

En la PCR de tiempo real, los valores de fluorescencia son medidos cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado en la reacción. Entre mayor cantidad de templado presente una reacción al inicio de la PCR, menor es el número de ciclos que se necesitan para alcanzar un punto en el que la fluorescencia es medida por encima de la fluorescencia normal de la reacción (C_T). Utilizamos el método de cuantificación relativa. En este método se comparó el C_T de la muestra desconocida contra una muestra calibradora que sirve como referencia fisiológica (muestras provenientes de ratas sin lesión). Todas las cuantificaciones, también fueron normalizadas con un control endógeno (gen que no modifica su expresión por el tratamiento), se utilizó el gen que codifica para Gliceraldehído 3-fosfo deshidrogenasa (*GADPH*) para tener en cuenta la variación en la concentración inicial, calidad de RNA y en la eficiencia de reacción en la transcripción reversa.

El método del $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al. 2001) es un método conveniente para analizar los cambios de expresión relativa.

➤ Eficiencia de la amplificación

Para que el método de cuantificación relativa sea válido, la eficiencia en la amplificación del gen problema y el control interno previamente seleccionado, deberán ser aproximadamente iguales. Para determinar esta eficiencia, se realizaron cinco diluciones decuples seriadas del producto de PCR, previamente cuantificado a 260 nm, el cual contiene el fragmento esperado para cada gen, posteriormente estas diluciones se amplificaron por triplicado bajo las condiciones antes descritas para obtener los valores de C_T . Estos, fueron graficados contra el logaritmo de la concentración total de fragmento de PCR y se calculó la regresión lineal. El valor de la pendiente fue utilizado para calcular la eficiencia (Rasmussen 2001) con la ecuación siguiente: $E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$

6.5. Análisis del efecto proliferativo del extracto acuotánico de la planta *Bacopa procumbens* mediado por el receptor activado por proteasa-1 (PAR 1) en el modelo *in vitro*

Ensayos *in vitro*

➤ Cultivo de la línea celular NIH/3T3

El cultivo de la línea celular NIH/3T3 de fibroblastos embrionarios de ratón se realizó en cajas de cultivo celular (Corning) de 60 mm² con medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (invitrogen) y una mezcla de antibióticos (estreptomina 10 mg/ penicilina 10000 U/anfotericina 0.23mg). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora a 37 °C con una atmosfera de CO₂ al 5% y 95% de humedad.

➤ Efecto del antagonista de PAR 1

En placas de 6 pozos se sembraron 2×10^5 fibroblastos por pozo en 3000 μl de DMEM al 10% de SFB, se incubaron 24 h como se describió previamente, posteriormente se retiró el medio y se colocaron los tratamientos como se describe a continuación:

- Controles
 - DMEM sin suero 24 h
 - DMSO 0.1% 24 h
- Agonista PAR1 100 μM
- Antagonista PAR1 a 1 μM , 35 nM, 70 nM y 150 nM 30 min /DMEM 24h
- Antagonista PAR1 a 1 μM 30 min /Agonista PAR1 100 μM 24 h
- Extracto acuético de la planta metatera 10 $\mu\text{g/ml}$
- Antagonista PAR1 a 1 μM , 35 nM, 70 nM y 150 nM 30 min /Extracto de la planta *Bacopa* 10 $\mu\text{g/ml}$ 24 h
- SFB 10% 24 h
- Antagonista PAR1 a 1 μM , 35 nM, 70 nM y 150 nM 30 min /SFB 10% 24 h

Análisis del efecto proliferativo mediante la técnica de azul tripano

Las células que fueron incubadas durante 30 min con el antagonista, posteriormente se lavaron dos veces con 500 μl de PBS antes de poner los tratamientos, los tratamientos se incubaron durante 24 h bajo las condiciones antes descritas, finalmente para realizar el conteo celular en una cámara de Neubauer, se tripsinaizaron las células con 1 ml de tripsina durante 3 min a 37 °C, se inactivó con DMEM con 10% SFB, se resuspendieron las células y se colocó

10 μ l con 10 μ l de azul tripan esta mezcla se homogenizó finalmente se colocó en la cámara de Neubauer.

Se observó al microscopio y se contaron las células de los 4 cuadrantes, posteriormente se calculó el promedio el cual se multiplicó por el factor de dilución (2) y por el factor de la cámara (10,000).

Se calculó el porcentaje de proliferación comparado con el número celular que se encontró en el control sin suero, considerando este como el 100% de proliferación celular.

6.6. Efecto proliferativo de las fracciones del extracto

➤ Obtención de las fracciones

El extracto acetanólico de la planta *Bacopa procumbens* se biparticionó con acetato de etilo y agua, la fracción de acetato de etilo se corrió en una columna de CH_2Cl_2 -MetOH, obteniendo 18 fracciones mayoritarias, las cuales se agruparon en dos fracciones la I y II. A partir de estas fracciones se probó el efecto proliferativo y se continuó subfraccionando hasta purificar 5 compuestos: GA, GBC, una saponina (S) y una cumarina (C).

➤ Efecto proliferativo de las fracciones y los compuestos

En placas de 96 pozos se sembraron 10×10^3 fibroblastos por pozo en 100 μ l de DMEM al 10% de SFB, se incubaron por 24 h a 37 °C con una atmosfera de CO_2 al 5% y 95% de humedad, posteriormente se retiró el medio y se colocaron los 100 μ l de cada tratamiento como se describe a continuación:

- Controles
 - DMEM sin suero

- DMSO 0.1%
- Extracto acuétanólico de la planta *Bacopa* 10 µg/ml
- Fracción I y II 10 µg/ml
- Compuesto GA 10 Y 0.1 µg/ml
- Compuesto GBC 10 Y 1 µg/ml
- Compuesto S 10 Y 0.5 µg/ml
- Compuesto C 10 µg/ml

Análisis del efecto proliferativo mediante la técnica de azul tripan

La técnica colorimétrica que emplea el colorante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-bromuro difeniltetrazolio) se utiliza en ensayos como proliferación, citotoxicidad, viabilidad, etc. La sal tetrazolium MTT amarilla es reducida por la actividad metabólica de las células, en parte por la acción de la enzima deshidrogenasa, generando los equivalentes de la reducción como NADH y NADPH. El resultado es la formación de formazan color púrpura intracelular, el cual es solubilizado y cuantificado por espectroscopia. El número de células es determinado aplicando la ley de Beer, la absorbancia es directamente proporcional al número de células (Doyle et al, 1998).

Posterior a las 24 h de incubación con los compuestos se adiciono 20 µl de MTT y se incubo durante 2 h en las mismas condiciones de incubación, posteriormente se decantó el sobrenadante sobre papel absorbente y se agregaron 100µl de DMSO para disolver los cristales de formazan, finalmente se leyó a 570 nm en un lector de ELISA. Con las absorbancias obtenidas se realizó el cálculo del porcentaje de proliferación, considerando el 100% de proliferación la absorbancia de las células incubadas con DMEM sin suero, dicho ensayo se realizó tres veces por triplicado.

6.7. Bionanoconjugación

- Síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs)

Se han reportado numerosos métodos de síntesis de nanopartículas, incluyendo la reducción química, descomposición térmica, ablación laser, sonicación, así como métodos amigables con el medio ambiente como la síntesis de estas mediado por extractos de plantas (Duncan et al. 2010; Brayner, 2008).

Método de Turkevitch modificado

Dentro de los métodos convencionales de síntesis de AuNPs por reducción de los derivados de Oro (III), uno de los más utilizados es el método de citrato reducción del HAuCl_4 descrito por Turkevitch en 1951 (Daniel and Astruc, 2004).

La síntesis de las nanopartículas de oro se realizó siguiendo la metodología descrita en la patente con folio MX/E/2016/092907.

Bioconjugación

Se mezclaron las nanopartículas de oro con el extracto acuotánico de la planta *Bacopa procumbens* a diferentes concentraciones (0.4 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.6 mg/ml, 3.2 mg/ml y 6.4 mg/ml), durante 24 h, posteriormente se centrifugaron a 1,000 rpm a 4 °C durante 15 minutos. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se mezcló con el hidrogel antes descrito, homogenizando dicha composición para su posterior caracterización y uso como se describió en la patente con folio MX/E/2016/092907.

6.8. Caracterización del bionanoconjugado

➤ Caracterización espectrofotométrica UV-Vis

Las nanopartículas de oro y el bionanoconjugado se caracterizaron mediante espectrofotometría UV-Vis utilizando el equipo Thermo Scientific Evolution 6000, el cual emplea el software Vision Pro, para la detección de la resonancia de plamon superficial (SPR)

debida a las nanopartículas de oro, para lo cual se colocaron 200 μ l de cada muestra en una celda de cuarzo.

- Caracterización espectroscópica FTIR (espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier)

Las características espectroscópicas de las nanopartículas y el bioconjugado se analizaron mediante el equipo Bruker modelo Vertex 70 en modo de muestreo por reflectancia total atenuada (ATR), utilizando los siguientes parámetros, resolución 4 cm^{-1} , rango 4000-400 cm^{-1} , número de barridos 120.

- Determinación del potencial Z

Se determinó el potencial Z en el equipo Zetasizer Nano-Zs/Malven, utilizando los siguientes parámetros: índice de refracción del Oro: 0.27049, constante dieléctrica del oro: $E' = 7.6494$ y $E'' = 1.5034$, absorción del oro: $5.943 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$, índice de refracción del agua: 1.333, viscosidad(cp): 0.8872, constante dieléctrica del agua: 78.3.

6.9. Evaluación del efecto cicatrizante del nanobioconjugado en el modelo *in vivo*

- Grupos de estudio del modelo *in vivo* excisional

Usando el modelo *in vivo* excisional descrito previamente, los animales fueron divididos al azar en 6 grupos de 6 ratas, el grupo 1 fue el control al cual no se le aplicó ningún tratamiento, el grupo 2 se le aplicaron nanopartículas de oro, el grupo 3 es el grupo vehículo ya que se le aplicaron las nanopartículas de oro incluidas en el hidrogel, el grupo 4 se le aplicó el extracto acuético de la planta metatera a 160 mg/ml incluido en el hidrogel y el grupo 5 y 6 se les aplicó el bionanoconjugado que contenía 16 y 1.6 mg /ml de extracto incluido en el

hidrogel respectivamente. Se aplicó 100µl de cada tratamiento cada 24 h durante 7 días, posteriormente se sacrificaron y se realizó la evaluación morfométrica y la toma de muestras, para lo cual se obtuvieron biopsias como se describió previamente, dos de las muestras se incluyeron en parafina y las otras se guardó a -20 °C para realizar el análisis espectroscópico FTIR.

Evaluación morfométrica de las heridas

El día de la cirugía (tiempo 0) y una vez sacrificados los animales (7 días post lesión) se tomaron fotografías con una cámara fotográfica digital a una distancia de 15 cm para analizar la forma y características macroscópicas de las heridas. Se midió la longitud y el ancho máximo de cada herida utilizando un vernier (Inox 222A) a los 0 y 7 días post-escisión; con estos datos se calculó el área de la herida, lo que nos permitió calcular el porcentaje del área de la herida utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ del área de la Herida} = \text{área final} \times 100 / \text{área inicial}$$

Los datos obtenidos del cálculo del porcentaje de reducción de la herida entre las heridas experimentales y los controles fueron comparados en cada grupo. (Gisely, *et. al.*, 2005; Shivananda, *et. al.*, 2009).

Evaluación histológica de las heridas

Para la evaluación histopatológica se utilizaron los cortes de las muestras obtenidas como se describió previamente y se realizarán la tinción de hematoxilina-eosina y la tinción de PicroSirus Red, la tinción de PicroSirus Red y la toma de microfotografías se realizó como se describió previamente.

* Tinción de Hematoxilina & Eosina.

Las biopsias se tiñeron con Hematoxilina y Eosina para observar los componentes de la piel. Para lo cual las biopsias se desparafinaron e hidrataron, posteriormente se realizó la tinción con Hematoxilina, por 15 min; pasado el tiempo se lavará el tejido en agua corriente por 5 min. Se realizaron 2 lavados con alcohol ácido al 1 % y se lavó brevemente en agua corriente. Se colocaron las laminillas en solución saturada de carbonato de litio hasta que las secciones se observaron de un color azul brillante, pasado lo anterior se lavó por 10 min en agua corriente y se colocaron en etanol al 80 % por 2 min. Se contratiñó con Eosina por 2 min, se deshidrato y aclaró con 2 lavados de etanol al 95 % cada uno, luego etanol absoluto y posteriormente xilol, 2 min en cada lavado. Finalmente fueron montadas con medio resinoso.

Análisis espectroscópico FTIR

Las biopsias del día 0 (piel normal) y día 7 se guardaron a -20 °C hasta su análisis mediante espectroscopia vibracional (FTIR), para lo cual se utilizó el equipo Bruker modelo Vertex 70 en modo de muestreo por reflectancia total atenuada (ATR) bajo los siguientes parámetros, resolución 4 cm^{-1} , rango $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, número de barridos por muestra 120. Una vez que se obtuvieron los espectros FTIR, se aplicaron 2 pretratamientos espectrales, los cuales consistieron en una normalización vectorial estándar (SNV) seguido de una segunda derivada empleando el software UnscramblerX 10.3. Posteriormente, se realizó un análisis de componentes principales con el mismo software, finalmente se graficaron los espectros y las nubes de puntos con el software Origin 6.0.

6.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos y los gráficos se realizaron utilizando los programas Graphpad 7.0, aplicando una ANOVA de una vía y un pos-test Tukey para comparar los cambios.

7. RESULTADOS

7.1. Elaboración del extracto acuoso de *Bacopa procumbens*

La planta *Bacopa procumbens* (metatera) fue recolectada e identificada taxonómicamente comparándola con especímenes de la planta *B. procumbens* (Mill.) Greenm, con número de registro 1792 (Figura 9). Posteriormente se procesó como se describió en la metodología hasta obtener un liofilizado el cual fue almacenado en frascos ámbar a temperatura ambiente hasta su uso. Inicialmente el extracto fue incluido en el hidrogel descrito en la patente en trámite (MX/E/2016/092907) con una concentración final de 160 mg/ml de extracto.



Figura 9. Ficha del Herbario de la especie *B. procumbens* (Mill.) Greenm.

7.2. Evaluación de los cambios en la Matriz Extracelular (MEC)

El efecto cicatrizante del tratamiento con el hidrogel del extracto de *Bacopa procumbens* se realizó en el modelo excisional en ratas Wistar macho. Posterior al tratamiento, las ratas fueron sacrificadas y se obtuvieron las muestras para el análisis histopatológico y para la tinción de PicroSirus Red. Bajo la luz polarizada la tinción de PicroSirus Red permite

diferenciar la colágena tipo I (colágena reticular madura), la cual presenta una birrifringencia amarilla-roja, mientras que la colágena tipo III, se observa verde (Velidandla *et al.*, 2014). En la figura 10 se muestra la piel normal, que presenta alrededor del 80 % de colágena tipo I y solo el 20 % de colágena tipo III.

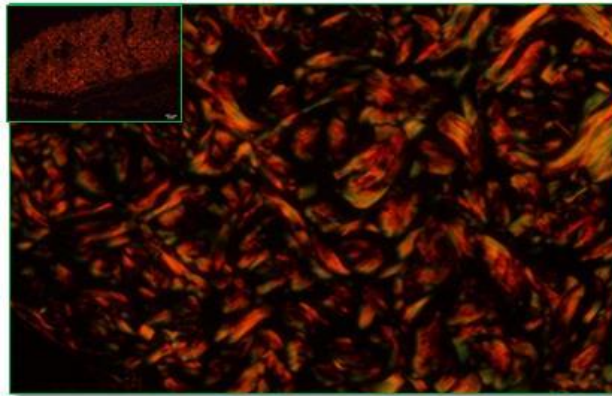


Figura 10. Fotomicrografía representativa de la piel normal. Tinción PicroSirus Red vistos con Luz polarizada Aumento 200x, recuadro superior izquierdo aumento 50x.

Como se observa en la figura 11, tres días después de haber realizado la herida, en los grupos no tratados o tratados con KitosCell, no se detectaron ninguno de los dos tipos de colágena. Mientras que en las heridas tratadas con el extracto de *Bacopa* se observaron evidentes fibras reticulares amarillas-rojas, dispuestas de manera desordenada. A los 5 días, el contenido de fibras de colágeno si bien fue evidente en todos los grupos, en los grupos no tratados o tratados con KitosCell las fibras aumentaron, pero se observaron desorganizadas, mientras que en el grupo tratado con *Bacopa* se observó un incremento y engrosamiento de las mismas, así como un mejor arreglo. A los 7 días en el grupo no tratado, el cual siguió el proceso natural de cicatrización, las fibras de colágena siguen siendo delgadas, mientras que en el grupo tratado con KitosCell, las fibras tienen ya un mejor ordenamiento, observándose fibras de colágeno tipo I y III. De manera interesante, en las heridas tratadas con *Bacopa*, el depósito y orientación de las fibras de colágena mejoró significativamente, ya que su arreglo tiende a ser paralelo a la superficie de la herida, con un predominio de las fibras amarillas-rojas (indicando predominio de las fibras de colágeno tipo I), semejante a la proporción observada en la piel normal (figuras 10 y 11).

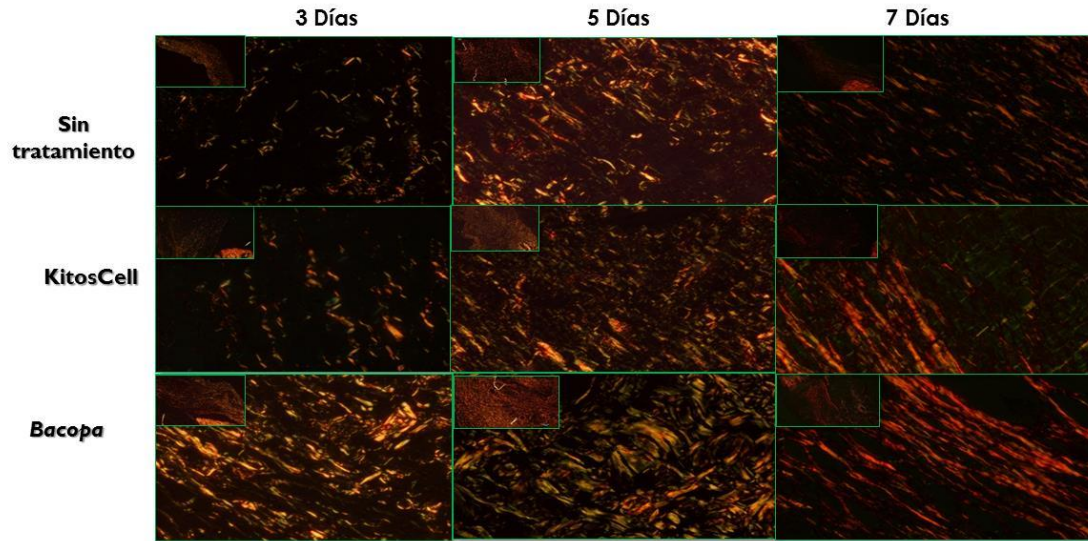


Figura 11. Fotomicrografías representativas de las heridas a los 3, 5 y 7 días. Tinción PicroSirus Red vista con Luz polarizada. Aumento 200x, recuadro superior izquierdo aumento 50x.

7.3. Análisis de los cambios de expresión de marcadores moleculares a nivel génico en el modelo *in vivo*.

➤ Estandarización de la RT-PCR cuantitativa

El análisis de los cambios de expresión de los genes inducidos por el extracto de la planta *Bacopa* se realizó mediante qRT-PCR. Para lo cual se realizó la extracción del RNA a los 0, 3, 5 y 7 días posteriores al desarrollo de la herida. El RNA fue cuantificado y purificado como se describió en la metodología y se corroboró su integridad y pureza en un gel desnaturalizante de agarosa. Se verificó la pureza y que estuviera libre de DNA contaminante, verificando por PCR que no generara un fragmento de amplificación del gen de *actina*. Posteriormente se sintetizó el cDNA. Para estandarizar la qRT-PCR, primeramente, se diseñaron los oligonucleótidos con el software Primer Express 2.0, cuyas secuencias se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1. Secuencia de los primers

Gen	Primer Sentido	Primer antisentido
TGFβ1	GCAGTGGCTGAACCAAGGAG	TCGGTTCATGTCATGGATGG
COLAGENA TIPO I	CAACCTGGATGCCATCAAGG	ATCGGTCATGCTCTCTCCAAA
COLAGENA TIPO III:	AGACCTGAAATTCTGCCACCC	CTTCCGCGGGACAGTCAT
α-SMA	AAGGCCAACCGGGAGAAA	CGTTGTGAGTCACGCCATCT
MMP9	TGCTGGTCCTTCTGAGGCC	GCTTCCTCCGTGATTCGAGA
GADPH	CACCACCAACTGCTTAGCCC	TCTGAGTGGCAGTGATGGCA

➤ Amplificación de genes por PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se realizó en el equipo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System-SDS. Se estandarizaron las condiciones de los primers para determinar la combinación adecuada, corroborado por la presencia de un pico único en la curva de disociación y el corrimiento del producto de PCR en un gel de agarosa al 2%. Los resultados se muestran en la tabla 2 y la figura 12 muestra un ejemplo de la estandarización para los primers de MMP9.

Tabla 2. Condiciones de la qRT-PCR

Gen	Primer Sentido/ Primer antisentido
	(μM)
TGFβ1	9/3
COLAGENA TIPO I	9/3
COLAGENA TIPO III	9/3
α-SMA	3/9
MMP9	3/9
GADPH	0.5/0.5

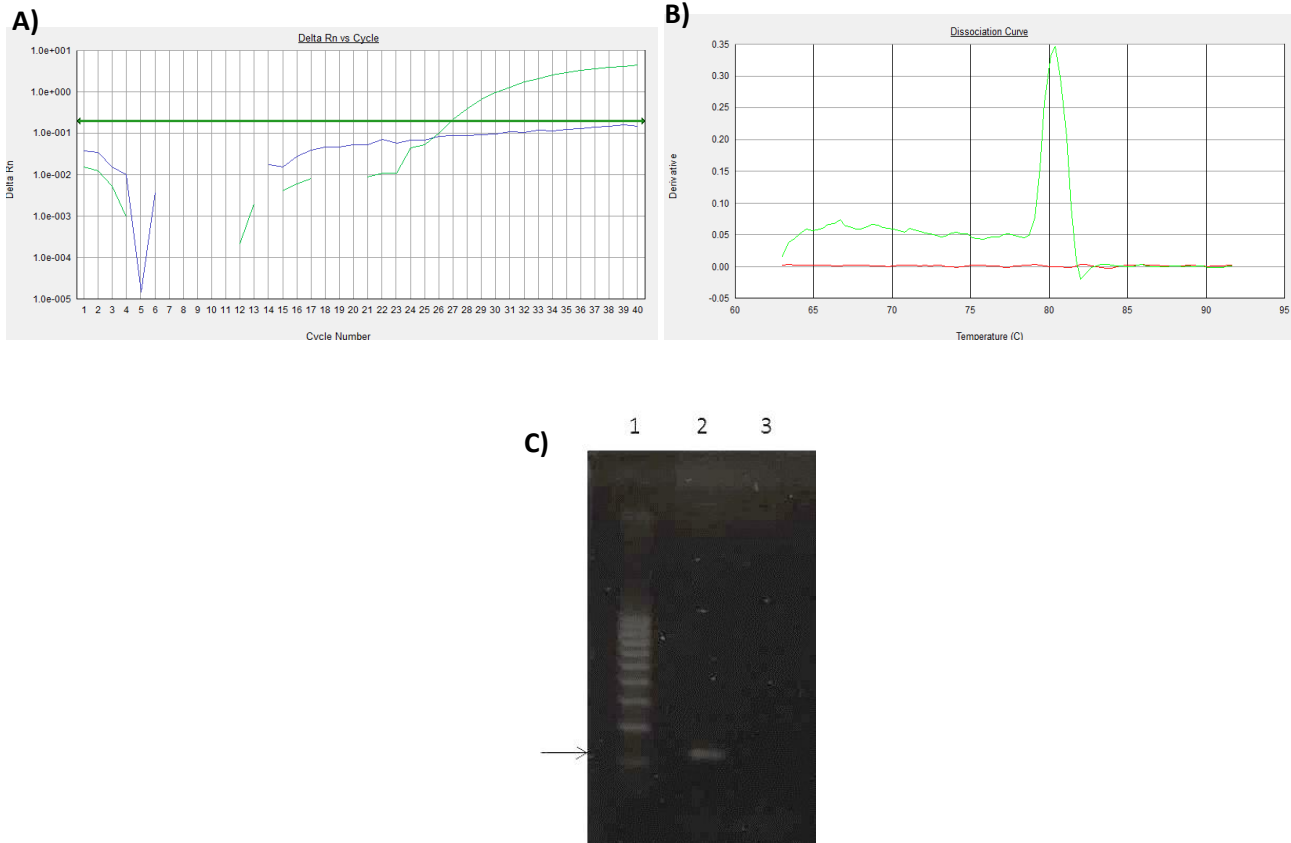


Figura 12. Estandarización de MM9 primers 3/9. A) Amplificación de la muestra con cDNA de piel normal (línea verde). **B)** Curva de disociación en la que solo se observa un pico único en el producto que contiene cDNA de muestra de grupo no tratado a los 3 días post-herida. **C)** Gel de agarosa 2%, carril 1 marcador molecular, carril 2 producto de PCR de amplificado MMP9 (150 pares de bases marcado con la flecha), carril 3 blanco correspondiente con primers 3/9.

Para validar el método de cuantificación se realizaron diluciones decuples seriadas del producto de la RT-PCR, estas fueron amplificadas por triplicado bajo las condiciones previamente descritas para obtener los valores de C_T los cuales se graficaron contra el logaritmo de la concentración del cDNA. La figura 13 muestra un ejemplo para la eficiencia de MMP9.

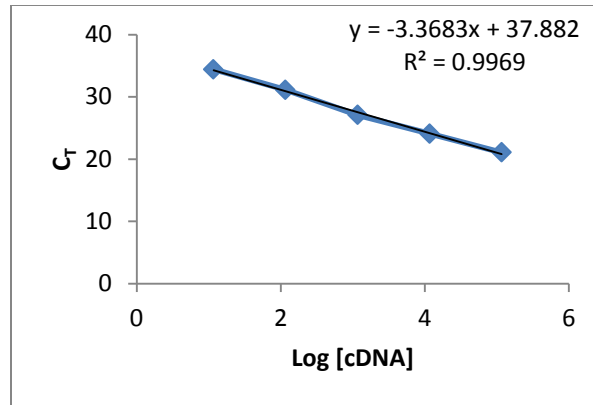


Figura 13. Eficiencia de la reacción de MMP9. Imagen representativa de las curvas de validación.

Una vez obtenida las curvas de validación se calculó la eficiencia de la reacción con la siguiente formula: $E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$

Gen	Eficiencia (%)
TGFβ1	116
COLAGENA TIPO I	98.8
COLAGENA TIPO III	120
α-SMA	100
MMP9	98.1
GADPH	100

Una vez estandarizado y validado el procedimiento de la PCR en tiempo real, se analizaron los cambios de expresión con el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. El análisis estadístico se realizó comparando con el grupo sin tratamiento en los días correspondiente a los días que se aplicó el tratamiento.

➤ Cambios de expresión de marcadores moleculares a nivel génico

Inicialmente evaluamos la expresión de genes relacionados con la matriz extracelular que corroboraran los hallazgos encontrados en el análisis histológico con la tinción de PicroSirius Red, por lo cual analizamos la expresión de las colágenas I y III.

Los ensayos de RT-PCR cuantitativa mostraron que en las heridas no tratadas los niveles de mRNA de colágena tipo I aumentaron paulatinamente, teniendo un pico de expresión máxima hasta los 7 días; el grupo tratado con KitosCell a los 3 días presentó menor expresión que el grupo no tratado, aumentando paulatinamente su expresión, con un pico máximo de expresión hasta los 7 días; en contraste el grupo tratado con *Bacopa* presentó el pico máximo de expresión a los 5 días, y de forma interesante disminuyó a los 7 días, de 1200 a 200 veces su expresión respecto a los niveles basales encontrados en piel normal (Figura 14).

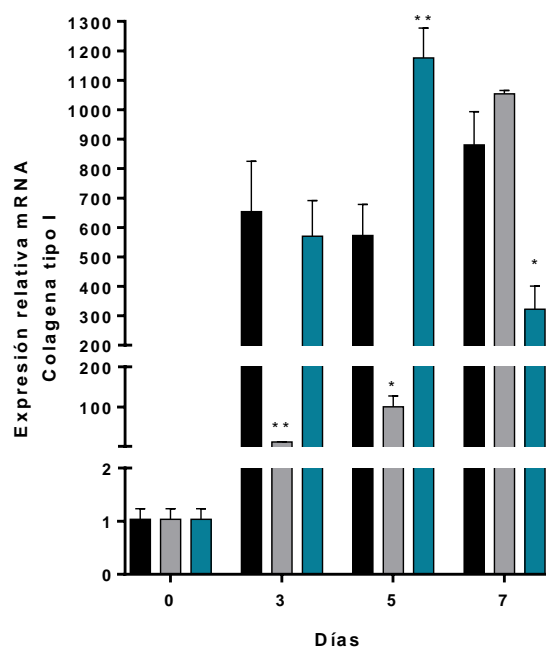


Figura 14. Expresión relativa del mRNA de Colágena tipo I. ■ Grupo sin tratamiento, ■ KitosCell, ■ grupo tratado con *Bacopa*, * $p < 0.02$, ** $p < 0.009$ $\bar{\pm}$ SEM.

El análisis de la expresión relativa del mRNA de colágena tipo III, mostró que en el grupo no tratado aumento a los 3 días disminuyendo su expresión paulatinamente hasta los 7 días, en tanto que en los grupos tratados con KitosCell y *Bacopa* disminuyó en todos los tiempos evaluados (Figura 15).

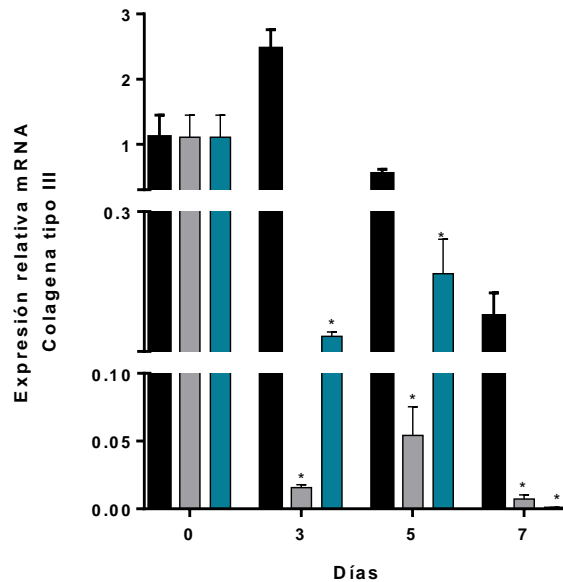


Figura 15. Expresión relativa del mRNA de Colágena tipo III. ■ Grupo sin tratamiento, ■ KitosCell, ■ Grupo tratado con Bacopa, * $p < 0.0001$ † SEM.

Dado que el proceso de cicatrización requiere de la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, y como se ha mencionado un marcador de este proceso es la expresión de α -SMA, analizamos la expresión de α -SMA.

El análisis del mRNA de α -SMA mostró que en el grupo no tratado y el tratado con KitosCell aumentó paulatinamente la expresión de este gen, con una expresión máxima hasta los 7 días, mientras que en el grupo tratado con *Bacopa*, se observó el pico máximo de expresión a los 5 días y una disminución al día 7 (Figura 16).

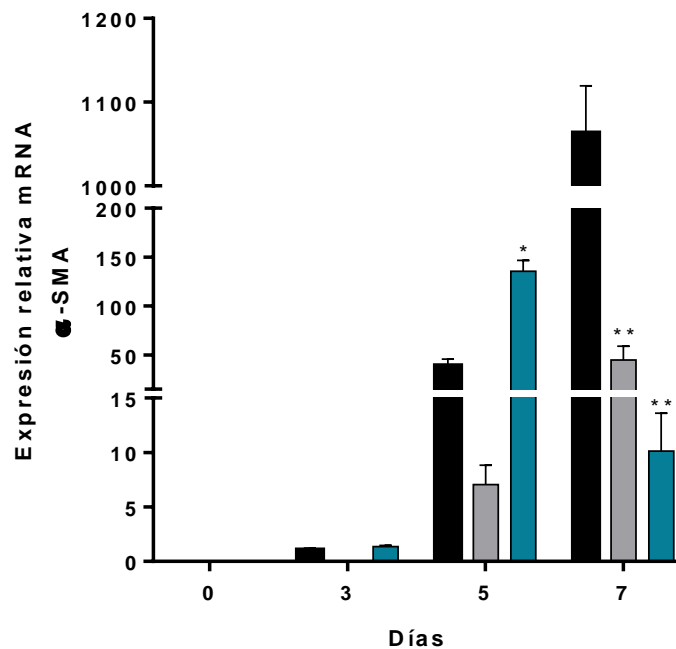


Figura 16. Expresión relativa del mRNA de α -SMA. ■ Grupo sin tratamiento, ■ KitosCell, ■ Grupo tratados con *Bacopa*, * $p < 0.03$, ** $p < 0.001$ \pm SEM.

Dado que la síntesis de colágenas y la diferenciación celular puede estar regulada por TGF β 1, analizamos la expresión de este gen. De manera interesante la expresión del mRNA de TGF β 1 fue mayor en el grupo no tratado a los 5 días, posteriormente disminuyó súbitamente a los 7 días. En el grupo tratado con KitosCell a los 3 días no se expresó TGF β 1, incrementando paulatinamente al día 5 hasta tener 4 veces la expresión basal a los 7 días. En contraste el grupo tratado con *Bacopa*, la expresión de TGF β 1 aumentó 2 veces al día 3, teniendo su pico máximo de expresión a los 5 días (4.5 veces) mientras que a los 7 días disminuyó su expresión, incluso por debajo de los niveles basales (Figura 17).

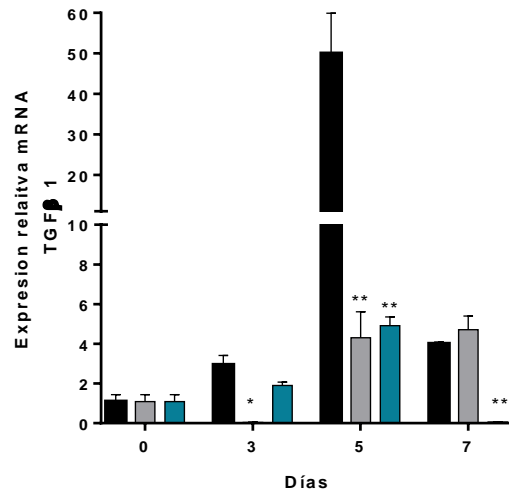


Figura 17. Expresión relativa del mRNA de TGFβ1. ■ Grupo sin tratamiento, □ KitosCell, ■ Grupo tratado con *Bacopa*, * $p < 0.025$, ** $p < 0.0001$ ⊥ SEM.

Al observar la expresión diferencial de TGFβ en los diferentes grupos experimentales, analizamos la expresión de MMP9, uno de los posibles activadores de TGFβ. En el grupo tratado con *Bacopa* observamos una sobre expresión de hasta 13.1 veces el mRNA de MMP9, respecto a los grupos no tratados a los tres días post-herida posteriormente los niveles de expresión del mRNA de MMP9 regresaron a los niveles basales a partir de los 5 días, mientras que en el grupo no tratado aumento paulatinamente, con un pico máximo a los 5 días, posteriormente disminuyo sin llegar a niveles basales. Mientras que el grupo tratado con KitosCell observamos un aumento 1.5 veces a los 3 días, posteriormente disminuyo a los 5 días para volver a aumentar a los 7 días 1.6 veces (Figura 18).

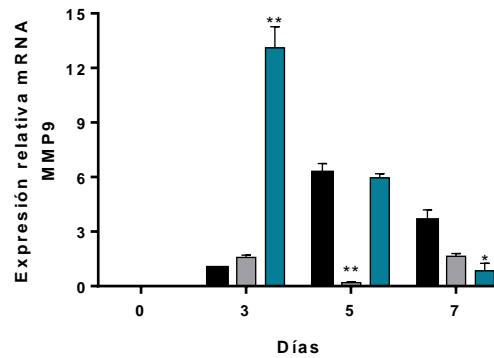


Figura 18. Expresión relativa del mRNA de MMP9. ■ Grupo sin tratamiento,, ■ KitoCell, ■ Grupo tratado con *Bacopa*, * $p < 0.0044$, ** $p < 0.0001$ † SEM.

7.4. Análisis del efecto proliferativo del extracto acuotánico de la planta *Bacopa* mediado por el receptor activado por proteasa-1 (PAR1) en el modelo *in vitro*

Con la finalidad de disectar los mecanismos moleculares inducidos por el extracto, que promueven la activación del proceso de cicatrización, se analizó en la línea celular NIH/3T3 el efecto del antagonista de PAR1 a las 24 h. Como se muestra en la figura 19, el antagonista a la concentración de $1\mu\text{M}$ disminuye la proliferación celular en un 20%, y de manera interesante, a esta concentración inhibe por completo el efecto proliferativo inducido por $100\mu\text{M}$ del agonista, pero no provoca ningún efecto en la proliferación inducida por el SFB al 10%. Interesantemente a esta concentración el antagonista de PAR1 bloquea el efecto proliferativo del extracto de *Bacopa* induciendo incluso una disminución en la proliferación del 20%.

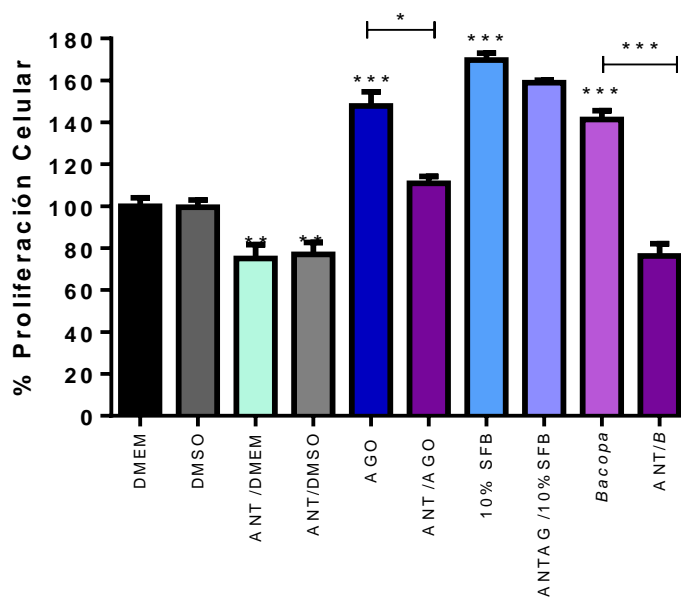


Figura 19. Efecto del antagonista de PAR-1 en la proliferación inducida por *Bacopa*. El antagonista de PAR1 1 μ M (ANT), es específico del receptor de PAR1, inhibiendo el efecto proliferativo del agonista de PAR1 100 μ M (AGO), y no presenta ningún efecto en las células tratadas con 10% de Suero Fetal Bovino 10% SFB); el antagonista de PAR1 bloquea el efecto proliferativo inducido por el extracto de *Bacopa procumbens* (*Bacopa/B*) * $p < 0.0157$, ** $p < 0.0059$, *** $p < 0.0001$ $\bar{\tau}$ SEM.

El antagonista a una concentración de 1 μ M disminuyó la proliferación celular, Serio et al 2007 demostró que este antagonista a altas concentraciones puede inducir apoptosis de los fibroblastos, por lo que para evaluar el efecto de este antagonista en el efecto proliferativo inducido por el extracto se evaluaron concentraciones menores que no indujeran disminución en la proliferación celular. Para lo cual se realizó una curva dosis – efecto dependiente entre el extracto y diferentes concentraciones del antagonista de PAR1. Las células adheridas se incubaron 30 min con las diferentes concentraciones del antagonista de PAR1, y posteriormente se incubaron 24 h con los controles (DMEM, DMSO) o tratamientos (Extracto o SFB al 10%).

El antagonista de PAR1 a concentraciones de 35, 70 y 150 nM no induce disminución en la proliferación, y si provoca bloqueo del efecto proliferativo del extracto de *Bacopa* de manera

dosis dependiente, ya que disminuye el efecto proliferativo de 145.5 a 125.7, 103.34 y 90.8 % respectivamente, como se observa en la figura 20.

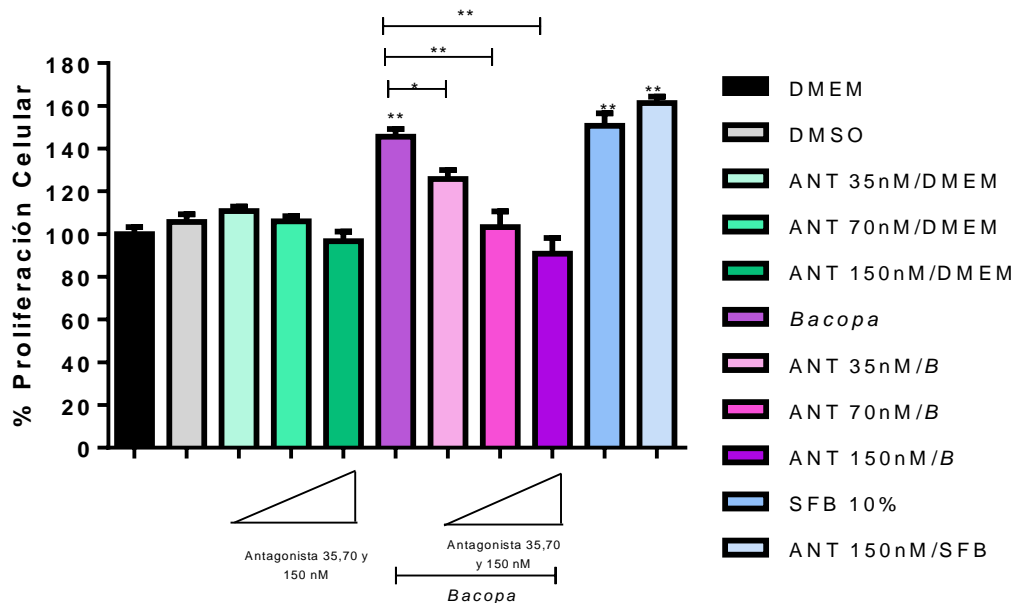


Figura 20. Efecto dosis dependiente del antagonista de PAR-1 en la proliferación inducida por *Bacopa*. El antagonista de PAR1 (ANTAG) a 35, 70 y 150 nM bloquea el efecto proliferativo inducido por el extracto de *Bacopa procumbens* (*Bacopa/B*) * $p < 0.0183$, ** $p < 0.0001$ $\bar{\text{T}}$ SEM.

7.5. Efecto proliferativo de las fracciones y compuestos del extracto de *Bacopa procumbens*

Las diferentes fracciones obtenidas por HPLC-masas según se describió en materiales y métodos, se agruparon por sus características físico-químicas en dos fracciones las cuales se denominaron F1 y F2; estas fracciones se probaron en las células NIH/3T3 a la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, teniendo como controles el suero fetal bovino al 10% y el extracto de la planta *Bacopa* a 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 h.

Como se puede observar en la figura 21 la fracción 1 presentó un efecto proliferativo similar al extracto completo de la planta, mientras que la fracción 2 no presentó dicho efecto. Posteriormente se aislaron los compuestos denominados GA, GBC, S y C los cuales fueron probados en la misma línea celular, en un periodo de incubación de 24 h. El compuesto GA a 10 $\mu\text{g/ml}$ presentó casi el mismo efecto proliferativo que la fracción 1 y que el extracto completo (Figura 21).

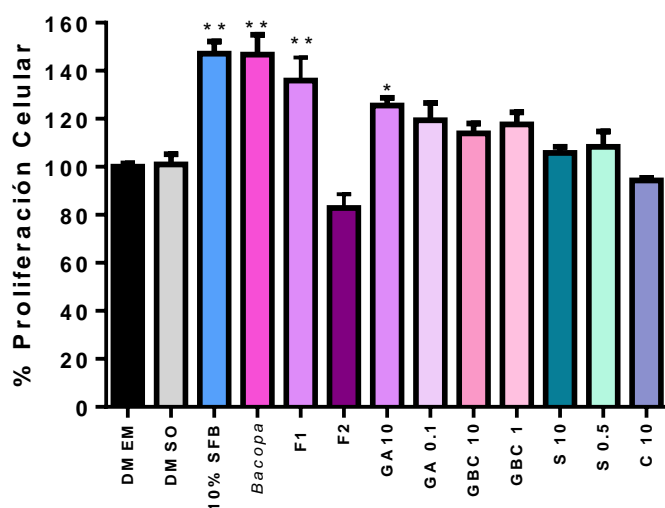


Figura 21. Efecto de las fracciones y compuestos de *Bacopa*. El suero fetal bovino (10%SFB) el extracto de *Bacopa procumbens* (*Bacopa*), la fracción I (F1) y el compuesto Gastrodina A a 10 $\mu\text{g/ml}$ (GA 10) inducen un efecto proliferativo. La fracción 2 (F2), los compuestos GA a 0.1 $\mu\text{g/ml}$ (GA 0.1), GBC a 10 y 1 $\mu\text{g/ml}$ (GBC 10 y 1 respectivamente), Saponina a 10 y 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (S 10 y 0.5 respectivamente) y la Cumarina a 10 $\mu\text{g/ml}$ (C 10) no presentaron ningún efecto proliferativo.* $p < 0.0063$, ** $p < 0.0001$ \pm SEM.

Por cuestiones de protección intelectual no se puede revelar el nombre de los compuestos y es por ello que se cita solo la nomenclatura utilizada.

7.6. Bionanoconjugación y caracterización del nanoconjugado con extracto de *Bacopa procumbens*

La síntesis y nanoconjugación se realizó siguiendo la metodología descrita en la patente en trámite con folio MX/E/2016/092907. Durante la síntesis se observó el cambio de la coloración de la solución pasando de incoloro a rubí, característica de la formación de nanopartículas monodispersas de oro. Para seleccionar la concentración adecuada de extracto/nanopartículas primero se utilizaron las siguientes concentraciones de extracto: 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 y 6.4 mg/ml. Dichos nanoconjugados fueron caracterizados por medio de espectroscopia UV-Vis.

La espectroscopia UV-Vis permite observar desplazamientos en la longitud de onda de la posición de la banda del SPR. Lo anterior se muestra en la figura 22, en la cual el espectro UV-Vis del conjugado con 0.4 mg/ml del extracto experimenta un corrimiento de la banda SPR hacia bajas energías (longitudes de onda grandes), lo cual sugiere la formación del nanoconjugado debido al recubrimiento de la superficie de la nanopartícula de oro con moléculas del extracto. Sin embargo, a partir de 3.4 mg/ml de extracto se observa una banda de absorción alrededor de los 660 nm lo cual puede ser un indicador de aglomeración de nanopartículas. Se determinó experimentalmente que la concentración de 1.6 mg/ml de extracto en la suspensión coloidal de nanopartículas de oro es la más adecuada para la elaboración del nanoconjugado debido a que su absorción SPR muestra el máximo corrimiento en longitud de onda, conservando además la forma de línea similar a la absorción SPR de las nanopartículas de oro y evitando también la agregación.

La intensidad máxima de la absorción SPR a 522 nm sirve para estimar la concentración y el tamaño de las nanopartículas. Se determinó que el tamaño de las nanopartículas era de 22

nm y tenían una concentración de 1.087×10^{12} partículas /ml. Además, dado que la absorción SPR tiene forma simétrica sugiere que estas nanopartículas y el bionanoconjugado poseen forma esférica o cuasi-esférica y se encuentran monodispersas (Figura 22).

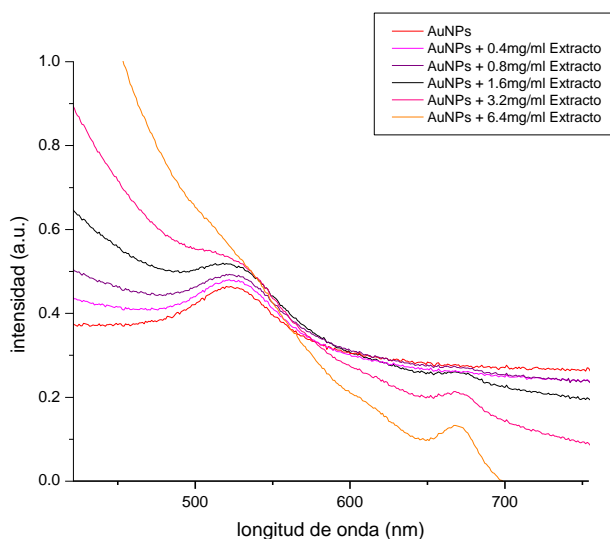
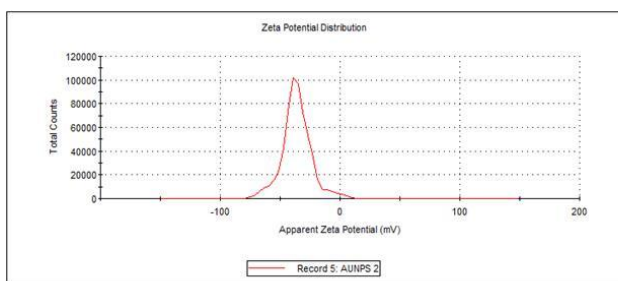


Figura 22. Espectro Uv-visible del nanoconjugado. Espectros de las nanopartículas de oro (AuNPs) y los conjugados a diferentes concentraciones 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 y 6.4 mg/ml de extracto de *Bacopa procumens* (AuNPs+0.4, 0. 8, 1.6, 3.2 y 6.4 mg/ml Extracto respectivamente).

Se determinó el potencial Z en el equipo Zetasizer Nano-Zs/Malven, las AuNPs sin conjugar tienen un potencial Z de -36.3 mV, el nanocomjugado tiene un potencial Z de -18.2 mV lo cual sugiere una menor reactividad y mayor estabilidad de las AuNPS conjugadas (Figura 23).

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -36.3	Peak 1: -36.3	100.0	12.3
Zeta Deviation (mV): 12.3	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0201	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

Result quality : See result quality report



	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -18.2	Peak 1: -18.2	100.0	7.02
Zeta Deviation (mV): 7.02	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.211	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

Result quality : Good

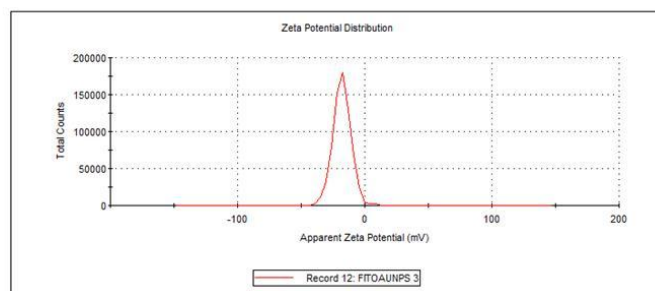


Figura 23. Potencial Z. Potencial Z de las nanopartículas sin conjugar (gráfico del lado izquierdo) y del nanoconjugado (gráfico del lado izquierdo), se observa el aumento en el potencial Z en el nanoconjugado.

De igual manera se realizó espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para analizar además de la absorción de las nanopartículas de oro, la fracción hidroetanólica del extracto de la planta *Bacopa procumbens* y el nanoconjugado. Los espectros fueron obtenidos en un rango de $4000-400\text{ cm}^{-1}$ con una resolución de 4 cm^{-1} (Figura 24).

Como se puede observar en la figura 24, el espectro FTIR correspondiente a las nanopartículas presenta las bandas 1589 y 1403 cm^{-1} asociadas a la deformación de los enlaces $\text{CH}_2\text{-O}$ y C=O del grupo citrato presente en la superficie de las nanopartículas de oro, producto de la síntesis de estas. Mientras que el nanoconjugado muestra un espectro con características similares al del extracto de la planta *Bacopa procumbens*.

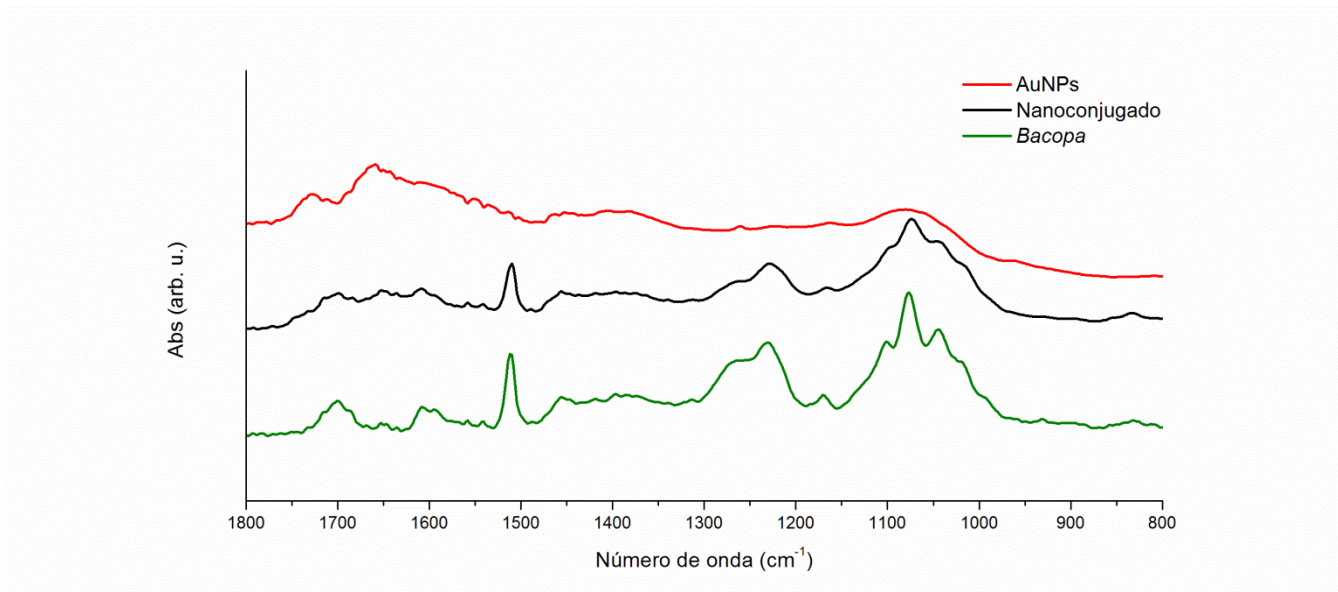


Figura 24. Caracterización espectroscópica vibracional del nanoconjugado. Espectro FTIR de las nanopartículas de oro (línea roja), el nanoconjugado (línea negra) y extracto de *Bacopa procumbens* (línea verde).

7.7. Efecto cicatrizante del bionanoconjugado en el modelo *in vivo* excisional.

Utilizando el modelo *in vivo* excisional se evaluaron los cambios macroscópicos de las heridas a los 7 días post-herida. Como se puede observar en la figura 25 la costra que se forma en los grupos control (sin tratamiento) es voluminosa y con bordes irregulares; en los grupos tratados con las nanopartículas, aunque es menos voluminosa sigue siendo irregular al igual que en los grupos tratados con el vehículo (AuNPs+ hidrogel); en tanto que las costras formadas en los grupos tratados con el extracto o el bionanoconjugado a 16 y 1.6 mg/ml, fueron de menor tamaño, uniformes y no voluminosas (Figura 25).

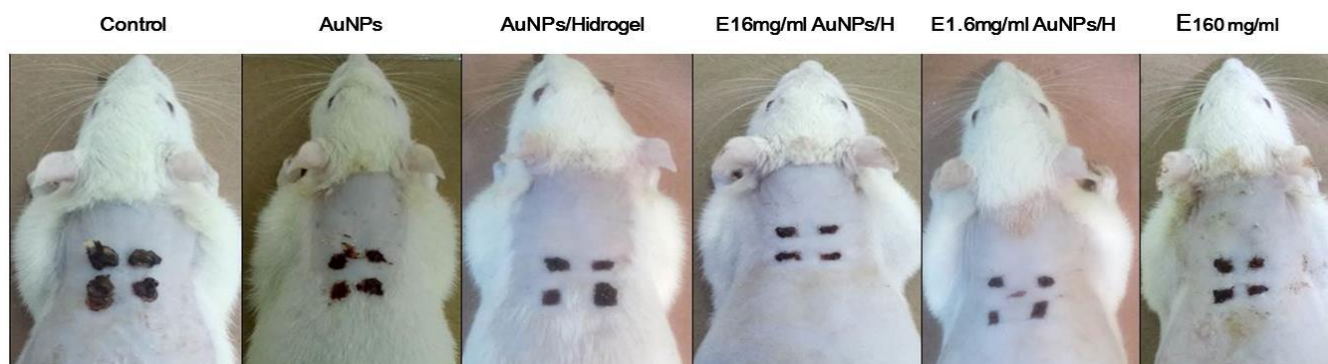


Figura 25. Cambios macroscópicos de las heridas. Fotografías representativas de las lesiones 7 días post-herida en el grupo control (sin tratamiento), los grupos tratados con AuNPs, el vehículo (AuNPs + hidrogel), bionanoconjugado 16 mg/ml compuesto por AuNPs+ 16 mg/ml de extracto hidroetanólico de *B. procumbens* + hidrogel (EB16mg/ml), bionanoconjugado 1.6 mg/ml compuesto por AuNPs+ 1.6 mg/ml de extracto hidroetanólico de *B. procumbens* + hidrogel (EB1.6mg/ml) o extracto hidroetanólico de *B. procumbens* a 160 mg/ml.

El análisis morfométrico mostró que el porcentaje de reducción de la herida en los grupos tratados con las nanopartículas solas es similar al observado en los grupos no tratados, el vehículo mejora ligeramente el cierre de la herida, y de manera interesante los grupos tratados con el bionanoconjugado que incluyen el extracto de la planta *B. procumbens* a 16 y a 1.6 mg/ml induce en más del 80% el cierre de la herida, de manera similar a como lo hace el extracto a 160 mg/ml a los 7 días de tratamiento (Figura 26). Como se puede observar en la figura 26, se observa el mismo efecto cicatrizante con el extracto a 160 mg/ml que con el bionanoconjugado utilizando 100 veces menos concentración.

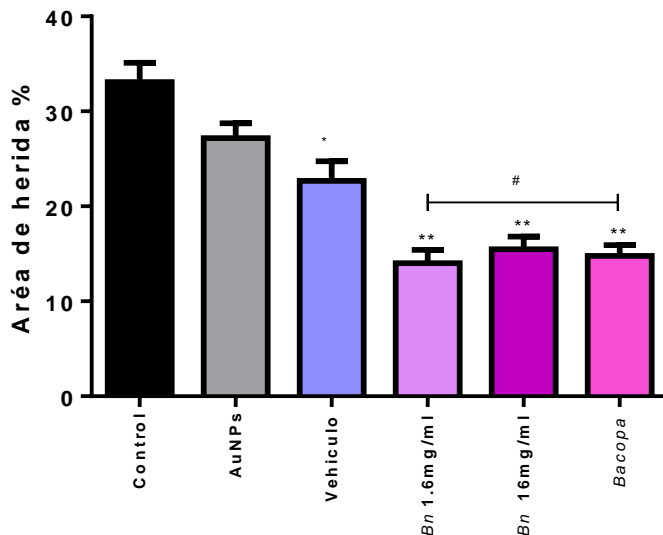


Figura 26. Efecto morfométrico en las heridas tratadas con el bioconjugado. Área de las heridas a los 7 días post-herida en el grupo control (sin tratamiento), el grupo tratado con nanopartículas de oro (AuNPs), el vehículo (AuNPs + hidrogel), el bioconjugado 16 mg/ml compuesto por AuNPs + 16 mg/ml de extracto de *B. procumbens* + hidrogel (*Bn*16mg/ml), bioconjugado 1.6 mg/ml compuesto por AuNPs+ 1.6 mg/ml de extracto de *B. procumbens* + hidrogel (*Bn*1.6mg/ml) o extracto de *B. procumbens* a 160 mg/ml (*Bacopa*). * $p < 0.0005$, ** $p < 0.0001$ vs control; # $p < 0.017$ † SEM.

El análisis histológico por H&E mostró que los grupos no tratados presentan abundantes vasos sanguíneos, con infiltración inflamatoria donde predominan los neutrófilos, así como fibroblastos; mientras que el grupo tratado con el bioconjugado presenta escasas células inflamatorias, y mayor cantidad de fibroblastos, así como un proceso importante de neo-vascularización (Figura 27 panel superior). En tanto que en la tinción de PicroSirius Red (Figura 27 panel inferior) podemos observar que las heridas no tratadas presentan escasa fibras de colágena y predomina las fibras verdes, mientras que en las lesiones tratadas con el bionanoconjugado a 1.6 mg/ml se observan abundantes fibras colágenas con predominio de las fibras amarillas y rojas con una disposición horizontal y semejante a lo observado en la piel normal (Figura 10).

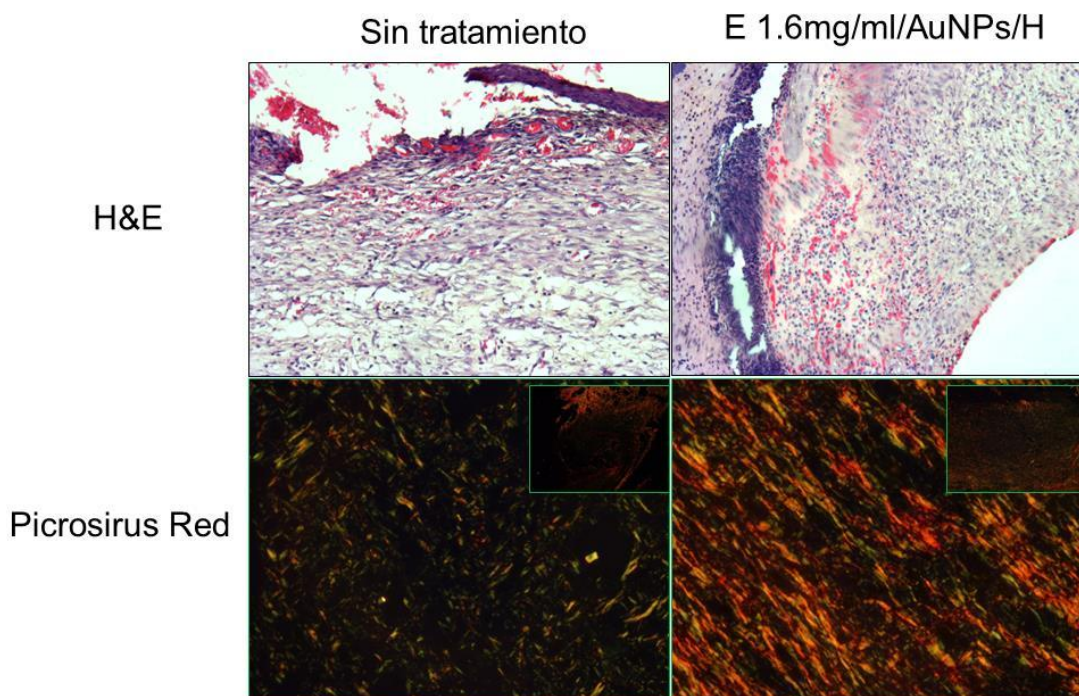


Figura 27. Análisis histológico de las heridas. Microfotografías con aumento de 100x de las heridas no tratadas (control) o tratadas con bionanoconjugado a 1.6 mg/ml. Panel superior tinción H&E, panel inferior tinción PicroSirius Red.

De manera paralela, se realizó espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) utilizando el equipo Bruker modelo Vertex 70 en modo de reflectancia total atenuada (ATR), midiéndose la absorción de las zonas de la lesión a los 7 días. Los espectros fueron obtenidos en un rango de $4000-400\text{ cm}^{-1}$ con una resolución de 4 cm^{-1} , posteriormente fueron normalizados utilizando el software UnscramblerX 10.3 (figura 28 A), observándose algunos cambios ligeros en los grupos amida I y amida II de las proteínas. Por lo que utilizando este software se calculó posteriormente la segunda derivada (Figura 28B).

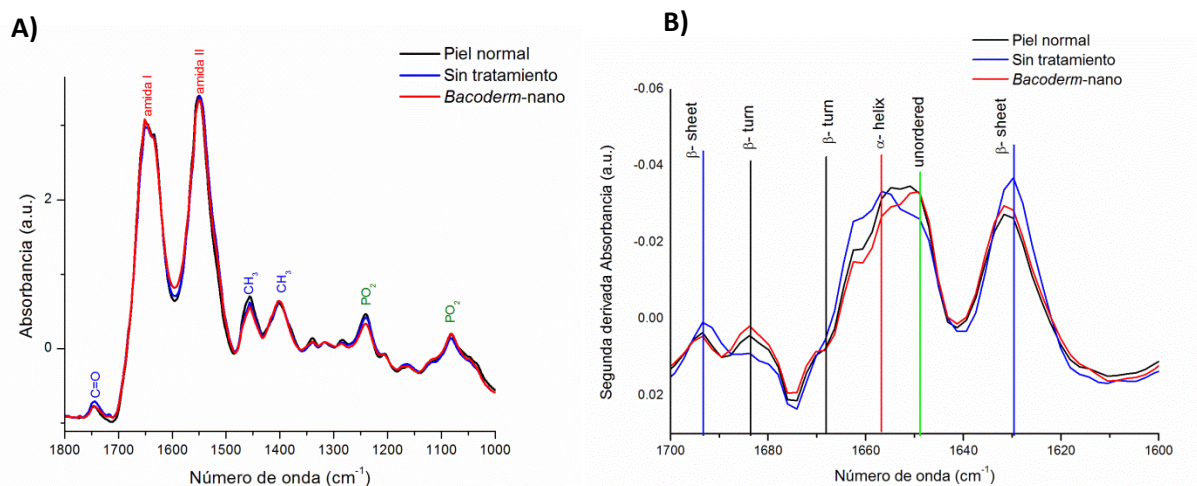


Figura 28. Caracterización espectroscópica vibracional de las heridas 7 días postherida. A) Espectro FTIR normalizado y **B)** y la segunda derivada de la piel no lesionada (normal- línea negra), de las heridas no tratadas (línea azul) y las heridas tratadas con bionanoconjugado (línea roja).

En la región espectral correspondiente al grupo amida I ($1658-1638\text{ cm}^{-1}$) de la segunda derivada se observan cambios en intensidad de las bandas asociadas a la estructura secundaria de las proteínas (α -hélices y estructura desordenada). Como se puede observar en la figura 29A la piel normal y el grupo tratado con el bionanoconjugado a 1.6 mg contienen mayor cantidad de α -hélices que, de estructura desordenada, lo cual se corroboró con el análisis de componentes principales (PCA). En el análisis de PCA podemos observar que las

muestras del grupo tratado con el bionanoconjugado a 1.6 mg en la región de α -hélices y estructura desordenada, se agrupan cerca de las señales generadas por la piel normal, en cambio las muestras del grupo no tratado se alejan (Figura 29B). De esta forma, el monitoreo de la intensidad FTIR de las α -hélices, así como el análisis de componentes principales (PCA), resulta ser una estrategia viable para la determinación del efecto benéfico del nanoconjugado aplicado a las zonas lesionadas.

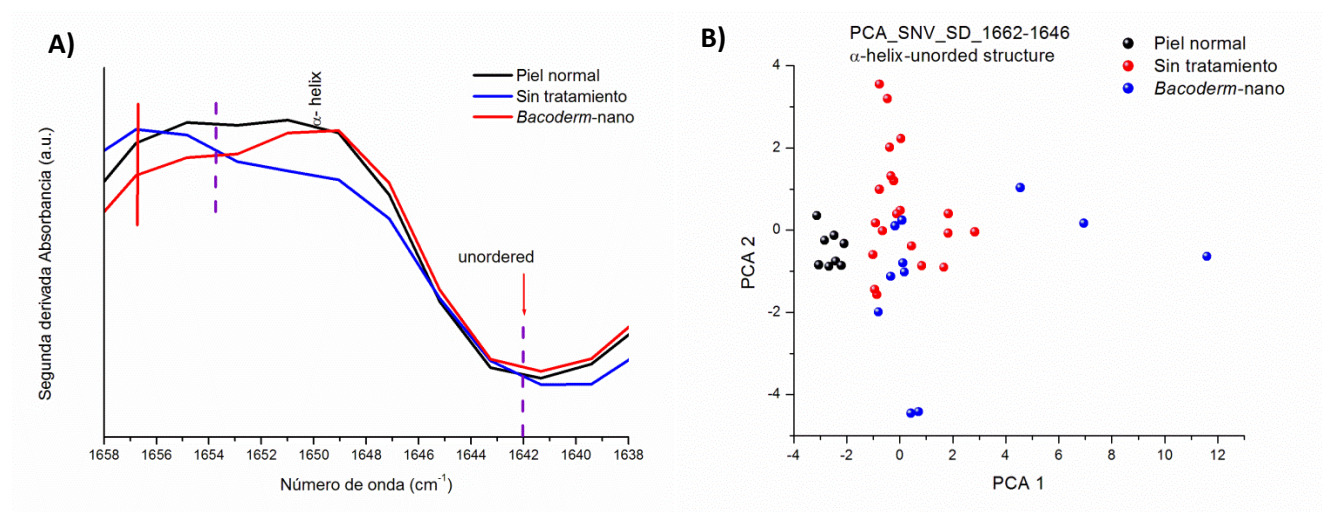


Figura 29. Análisis de α -hélice y estructura secundaria en lesiones 7 días post herida. A) Segunda derivada de la región 1658-1638 cm^{-1} y **B)** PCA de la segunda derivada de la región 1658-1638 cm^{-1} de la piel no lesionada (normal- línea o punto negro), de las heridas no tratadas (línea o punto azul) y las heridas tratadas con el bionanoconjugado a 1.6 mg (línea o punto rojo).

8. DISCUSIÓN

Las heridas y las alteraciones en el proceso de cicatrización constituyen un importante problema de salud pública a nivel mundial agravado por el incremento en la incidencia de

enfermedades degenerativas emergentes como la Diabetes Mellitus que genera diversas complicaciones relacionadas a la cicatrización, como las úlceras diabéticas.

En México se desconoce la estadística precisa sobre la morbi-mortalidad de las heridas. En la búsqueda de nuevos fármacos que coadyuven al proceso de cicatrización, se han estudiado diversas plantas que contienen compuestos que benefician el proceso y que presentan menos efectos secundarios (Huie et al., 2002, Abbasi et al., 2010). Nuestro grupo demostró que el extracto de la planta *Bacopa procumbens* estimula la proliferación, diferenciación y migración de fibroblastos en un modelo *in vitro*, sugiriendo su efecto cicatrizante; además hemos evidenciado en un modelo *in vivo* excisional que las heridas tratadas con el extracto a 160 mg/ml aceleran el proceso de cicatrización en al menos 48 h, disminuyendo la fase inflamatoria y estimulando la expresión de proteínas de la fase de proliferación como TGF β 1, α -SMA y PCNA. De manera interesante también acelera la fase de remodelación al restablecer casi por completo la expresión de colágena tipo I (Ceja et al., 2013, Martínez et al., 2013).

El proceso de cicatrización involucra la activación de células inflamatorias, la proliferación de las células endoteliales y la producción de la matriz extracelular, con la finalidad de restablecer las funciones estéticas y mecánicas de la piel (Murthy et al, 2013); este proceso fisiológico ha sido de gran interés desde el inicio de la humanidad y aunque se han estudiado los mecanismos biológicos así como diversas estrategias terapéuticas (Bochaton-Piallat, Gabbiani y Hinz, 2016), en la actualidad no se cuenta con un tratamiento eficaz, es por ello que nuestro grupo de trabajo ha buscado nuevas alternativas. Resultados previos demuestran que el tratamiento con el extracto de *Bacopa* inducen de forma más rápida y ordenada el depósito de matriz extracelular (ECM) en comparación con el proceso natural e incluso

comparado con el grupo tratado con el fármaco comercial utilizado para el cuidado de heridas (KitosCell). Durante este proceso, inicialmente se produce la colágena tipo III actuando como andamiaje para la fase tardía en la que se produce colágena tipo I, generando un soporte sólido (Chen et al., 2009). Mediante la tinción de PicroSirus Red demostramos que el extracto de *Bacopa* mejora la dinámica de remplazo de la colágena, su depósito y re-arreglo desde el tercer día posterior al desarrollo de la herida, a partir de los 5 días, las fibras de colágena tipo I se encuentran paralelas a la superficie de la herida, de manera similar a la disposición en la piel normal. Mientras que en las heridas no tratadas o tratadas con KitosCell predominan las fibras de colágena tipo III, las cuales están alineadas de forma aleatoria.

Estos resultados concuerdan con lo encontrado por RT-PCR, en donde observamos que los grupos tratados con *Bacopa* tienen un pico máximo de expresión del gen de la colágena tipo I a los 5 días y de manera interesante a los 7 días de haber generado el daño, comienza a disminuir su expresión; por su parte, el gen de la colágena tipo III se encuentra disminuido en todos los tiempos evaluados. En los grupos no tratados o tratados con el KitosCell en cambio, los niveles de gen que codifica para la colágena tipo I tienen su máxima expresión hasta los 7 días, mientras que la expresión del gen de la colágena tipo III en los animales no tratados está aumentada a los tres días y posteriormente disminuye. Xue y Jackson, 2015 refieren que en el proceso normal de cicatrización la colágena tipo III está sobre-expresada en etapas iniciales como lo encontrado en nuestros resultados, aumentando la relación colágena tipo III/ colágena tipo I en etapas iniciales lo que caracteriza la cicatriz inmadura. Este hecho correlaciona con los hallazgos de la tinción de PicroSirus Red, en el que se observó un incremento en las fibras de colágena tipo III (fibras verdes). Por otro lado, se sabe que la sobreexpresión de colágena tipo I en fases tardías está relacionada con la formación de

cicatrices queloides (Cheng et al, 2013, Zhang et al, 2012). Nuestros resultados sugieren que la disminución en la expresión de la colágena I en fases tardías (día 7), evitaría la formación de cicatrices queloides. Por otro lado, Volk et al, en el 2011 demostraron que la disminución de la expresión de colágena tipo III mejora el proceso de cicatrización, lo cual concuerda con nuestros resultados, ya que en los grupos tratados con *Bacopa* encontramos menor expresión de colágena tipo III. Aunado a esto, estos resultados son coincidentes con lo encontrado por inmunohistoquímica, ya que se había observado que los niveles de colágena tipo I se restablecían en un 80% a partir del quinto día posterior al desarrollo de la herida. Murthy et al, 2013, mostraron que después de 10 días del desarrollo de una herida en un modelo *in vivo* incisional (en el que no se elimina la dermis ni la epidermis), las ratas tratadas con el extracto de *B. monniera* incrementa el contenido de hidroxiprolina, incremento directamente relacionado con el contenido total de colágena, sin embargo, este grupo no demostró la organización de esta proteína en el tejido de reemplazo. Se sabe que la distribución correcta de las fibras de colágena en la piel contribuye al restablecimiento de las funciones mecánicas de esta (Kwan et al, 2011). Los hallazgos en el ordenamiento de las fibras inducido por el extracto de *Bacopa* correlaciona con lo encontrado por nuestro grupo (Martínez et al, 2014), en donde evidenciamos que las cicatrices tratadas con *Bacopa* después de 24 días presentaban un incremento en la fuerza mecánica de 22.56 % comparado con el proceso natural, lo que sugiere el mejor funcionamiento de la piel. *Alcalypa indica* contiene flavonoides y glicósidos que aceleran la contracción de la herida y aumenta la fuerza tensil debida a un incremento en el depósito de colágena a los 10 días post herida (Ganeshkumar et al, 2012), sugiriendo que este tipo de metabolitos, que también están presentes el extracto de *Bacopa*, son los que pudieran ser responsables de los efectos encontrados. Sharath et al, 2010,

sugieren que la administración oral del extracto de *B. monniera* (BME) y el compuesto Bacosido-A reduce el tiempo de epitelización e incrementa la fuerza tensil en un modelo *in vivo* incisional después de 10 días, proponiendo que dichos efectos son por el efecto de la disminución en la formación de los radicales libres en la zona de la herida (Murthy et al, 2013). Adicionalmente, una composición (NF3) de los extractos de *Radix astragali* y *Radix rehmanniae* mejora la cicatrización en un modelo de herida en ratas diabéticas. NF3 en ensayos *in vitro* induce proliferación de células endoteliales y angiogénesis reduciendo la producción de Óxido nítrico (Tam et al, 2011).

En etapas iniciales e intermedias del proceso de cicatrización, los fibroblastos del margen de la lesión proliferan y migran hacia el sitio de la lesión, posteriormente se diferencian en miofibroblastos, los cuales se caracterizan por expresar la proteína α -smooth muscle actin (α -SMA), estas células juegan un papel principal en la contracción de la herida (Hinz et al, 2001), además en etapas iniciales, estos miofibroblastos comienzan la síntesis de la matriz extracelular (Bochaton-Piallat, Gabbianni y Hinz, 2016). En los grupos tratados con *Bacopa* el pico máximo de expresión de mRNA de α -SMA fue a los 5 días, disminuyendo a los 7 días. Estos resultados contrastan con lo encontrado previamente mediante inmunohistoquímica, en la que habíamos encontrado un aumento en los grupos tratados con *Bacopa* a los 3 días, con una disminución a niveles basales a partir de los 5 días (Martínez et al, 2013). Se sabe que la fuerza generada por la actividad de contracción inducida por los miofibroblastos y la fuerza generada por la MEC alrededor de estas células es transmitida por moléculas de adhesión e integrinas, condición mecánica que genera un efecto de feedback positivo, induciendo la autoactivación y producción de α -SMA (Bochaton-Piallat, Gabbianni y Hinz, 2016). Nuestros resultados sugieren que el incremento en la presencia de miofibroblastos (detectados por

inmunohistoquímica) al tercer día, así como el incremento al quinto día de colágena tipo I (que incrementa la fuerza tensil), pueden ser responsables de la auto-activación y por lo tanto de la sobre-expresión de α -SMA a nivel de mensajero al día 7; por otro lado se sabe que en fases tardías del proceso de cicatrización, los miofibroblastos disminuyen por apoptosis, lo cual explicaría la disminución en la detección de α -SMA a partir del quinto día por inmunohistoquímica (Martínez et al, 2013), así como la menor expresión a nivel de mensajero a los siete días. Estos resultados sugieren que el extracto induce la presencia de miofibroblastos en etapa temprana y por lo tanto la contracción de la herida. Posteriormente, de manera interesante disminuye su presencia y activación en etapa tardía, lo cual es de suma importancia ya que la persistencia de miofibroblastos en cicatrices, están relacionadas con el desarrollo de cicatrices queloides o hipertróficas (Bochaton-Piallat, Gabbianni y Hinz, 2016). Kovác et al, 2015, demostraron que el extracto acuoso de *Plantago lanceolata L.* induce la presencia de α -SMA hasta el séptimo día en un modelo excisional en ratas, con una reducción de herida de 60 %. El extracto de esta planta contiene compuestos polares, con predominio de flavonoides, lo cual podría sugerir que este tipo de compuestos son capaces de inducir la presencia de miofibroblastos en la zona de la herida.

Por otro lado, en las heridas no tratadas o tratadas con KitosCell aumenta de forma paulatina la expresión del mRNA de α -SMA, con una expresión máxima a los 7 días, lo cual sugiere que en el tratamiento con kitosCell, las lesiones a los 7 días aún se encuentran en una fase temprana o intermedia.

El factor transformante beta uno (TGF- β 1) es capaz de regular diversos eventos a lo largo del proceso de cicatrización (Rybinski, 2014), incluyendo la estimulación de la expresión de α -

SMA y de colágena tipo I en los miofibroblastos, por lo cual evaluamos la expresión de este gen y encontramos que el patrón de expresión de TGF- β 1 en las heridas tratadas con *Bacopa* es similar al encontrado de α -SMA, estos resultados contrastan con lo encontrado previamente, ya que al igual que α -SMA, TGF- β 1 esta sobre-expresado por inmunohistoquímica a los tres días, mientras que a nivel de mensajero esta sobre-expresado a los 5 días. Zhang et al, 2012, sugieren que el extracto de *Radix astragali* y *Radix rehmanniae* inducen la sobreexpresión de TGF- β 1 en un modelo *in vivo*. Suh et al, 2003 reportaron que algunos triterpenoides pueden mimetizar la acción de TGF- β 1 en macrófagos activando la vía canónica de este factor. Dado que el extracto de *Bacopa* contiene compuestos similares, estos podrían ser los inductores de la activación de TGF- β 1, y concuerdan con nuestros resultados previos en los que demostramos que el extracto de *Bacopa* induce la expresión en la fosforilación de smad2/3 a los 3 días. Por otro lado, la disminución en la expresión de TGF- β 1, al quinto día por inmunohistoquímica y al séptimo día en la expresión del mensajero en los grupos tratados con *Bacopa*, pueden estar dados por la presencia de los miofibroblastos, ya que estos en la fase de remodelación producen la proteína decorina, la cual regula la fibrilógenesis debido a que es capaz de neutralizar la actividad de TGF- β 1, disminuyendo a su vez la formación de colágena, fibronectina y glucosaminoglucanos (GAG)(Xue y Jackson, 2016).

Además, dado que este factor se encuentra en la matriz extracelular en su forma latente acoplado a un péptido asociado a latencia y la proteína de latencia de TGF- β 1; la liberación y por ende activación de este depende de enzimas proteolíticas y mecanismos dependientes de integrinas que están relacionadas con las propiedades mecánicas. Dentro de las enzimas

capaces de activar a TGF- β 1, se encuentra las metaloproteasas (MMP), las cuales en piel normal casi no se expresan. La MMP9 está relacionada con la migración de queratinocitos, y la remodelación del tejido de granulación (Xue y Jackson, 2016). Nosotros encontramos una sobre-expresión del mensajero de MMP9 en las heridas tratadas con *Bacopa* a los tres días, con una disminución a partir del quinto día; esto concuerda con lo encontrado por Zhang et al, 2005 quienes han observado que este factor (TGF- β 1) es liberado de su forma latente al sitio de la lesión mediante la activación del infiltrado de monocitos /macrófagos y por la adhesión de las MMPs 2 y 9; así como con Gawronska-Kozak, 2012 quien encontró que la sobreexpresión de MMP9 en etapas tempranas inducía una mayor síntesis de colágena tipo I, la cual disminuía en etapas tardías evitando la formación de cicatrices. Este hallazgo también había sido encontrado por Chia et al, 2002, quienes demostraron que la sobre-expresión, nueve veces mayor de la MMP9, en fetos de ratas de 16 semanas disminuye la formación de cicatrices.

Estos resultados sugieren que el extracto de *Bacopa* induce patrones de expresión temporales diferenciales entre el mensajero y la proteína, siendo la máxima expresión proteica de α -SMA y TGF- β 1 a los 3 días y a nivel de mensajero a los 5 días, por lo que *Bacopa* pudiera estar induciendo su expresión proteica sin necesidad de inducir su transcripción. Como se ha mencionado previamente la regulación de la expresión de α -SMA y TGF- β 1 es altamente controlada e influyen diversos factores, se sabe que los mecanismos pro-fibroticos después de una lesión responden por la pérdida de sangre con la finalidad de restablecer la hemostasia; en el citosol hay una acumulación del mensajero de α -SMA, lo cual hace eficiente la cicatrización, ya que este reservorio permite su traducción rápida promoviendo la contracción de la herida; además existe un control “fast-track” por el reservorio extracelular de

TGF- β 1 en la matriz extracelular, la cual se puede activar rápidamente por proteólisis y mediado por un mecanismo de mecanotransducción (Strauch y Hariharan et al 2013). Aunado a esto, al inicio del proceso de cicatrización se desencadena el proceso de coagulación. Dentro de las principales moléculas que regulan y estimulan este proceso se encuentra la trombina, la cual es una serin proteasa, que no solo inicia el proceso de coagulación, sino además es capaz de activar las reservas de TGF- β 1 y regular la diferenciación de los miofibroblastos (Strauch y Hariharan et al 2013). Zhang et al, en 2005 demostraron que TGF- β 1 induce la expresión de α -SMA induciendo su expresión de *nov*o, mientras que trombina aumenta α -SMA utilizando el reservorio citosólico de mRNA, por lo que la traducción y por lo tanto la expresión de α -SMA es más rápida. Trombina actúa a través de receptores PAR, en células vasculares y fibroblastos y se sabe que su principal receptor es PAR-1 (receptor acoplado a proteína G); una vez que lo activa este induce una cascada de activación promoviendo la fosforilación de ERK1/2 (Chang et al, 2009, Asokanathan et al, 2015). En nuestros resultados previos observamos que el extracto de *Bacopa* inducía la fosforilación de ERK1/2 a los tres días y disminuía posteriormente, lo que refuerza la posibilidad de que el extracto de *Bacopa* siga una vía semejante a la de trombina; además se sabe que la trombina es capaz de inducir la expresión y activación de la MMP9 (Wang et al, 2007, Chang et al, 2009) como lo observado en este trabajo.

Nuestros resultados en ensayos *in vitro* muestran que el efecto proliferativo inducido por el extracto de *Bacopa* se ve completamente abolido por la presencia del antagonista de PAR-1 (1 μ M), y que este efecto es dosis dependiente (35-150 nM), lo cual demuestra que el extracto contiene algún metabolito o metabolitos que actúan a través del receptor PAR-1, induciendo la traducción del reservorio citosólico de mRNA de α -SMA, induciendo la expresión de MMP9 la

cual activa el reservorio de TGF β 1 de la matriz extracelular, induciendo de forma rápida la diferenciación de los miofibroblastos. Fujimoto et al, 2010 demostraron que este antagonista de PAR-1 inhibe el efecto proliferativo de trombina.

Nuestros resultados muestran que la fracción I y en especial el compuesto que denominamos GA (y que por cuestiones de protección no podemos revelar su identidad) inducen el mismo efecto proliferativo que el extracto completo de la planta *Bacopa*; este compuesto es un compuesto fenólico, los fenoles han sido estudiados por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas, algunas plantas contienen estos metabolitos como *Populus nigra*, la cual ha mostrado una inducción en la proliferación, diferenciación y mayor estabilidad del DNA en fibroblastos de la dermis de humanos (DZialo et al, 2016), *P. cyanescens* contiene flavonoides glicósidos como la rutina y quercetina que inducen proliferación y migración de fibroblastos *in vitro*, por su parte, el extracto de *Stewartia koreana* y su compuesto hyperina (glicósido) inducen la migración y proliferación de los fibroblastos (Lee et al, 2014). *Plinia peruviana* la cual es rica en antioxidantes y polifenoles mostro tener un efecto proliferativo en una línea celular de fibroblatos (Pitz et al, 2016).

En el trascurso de esta investigación y como parte del macro-proyecto asociado al desarrollo de un fármaco para cicatrización, se evaluaron de forma paralela los efectos tóxicos del extracto, encontrando un leve efecto hepatotóxico. Motivo por el cual, como parte de la investigación de esta tesis decidimos desarrollar la tecnología para por un lado potenciar el efecto cicatrizante del extracto de *Bacopa* con una concentración menor del componente bioactivo y a la vez disminuir los leves efectos secundarios observados.

El desarrollo de la nanomedicina y su conjugación con productos naturales puede potenciar el efecto de estos, disminuyendo las dosis innecesarias y posibles efectos adversos. Las nanopartículas de oro han sido utilizadas en aplicaciones biomédicas ya que poseen características fisicoquímicas que permiten caracterizarlas, modificar su tamaño y son biocompatibles (Yi –Cheun Yeh et al 2012).

En este trabajo se mostró la conjugación de las nanopartículas de oro con el extracto hidroetanólico de la planta *B. procumbens* mediante el desplazamiento espectral de la banda SPR hacia bajas energías, sugiriendo la nanoconjugación; el SPR es la oscilación colectiva de los electrones de la superficie de los metales excitados por protones; la posición y anchura del pico de absorción del SPR depende del tamaño y aglomeración de las nanopartículas de oro. Por otro lado, analizando la intensidad máxima de la banda SPR, se determinó el tamaño y la concentración de las AuNPs para su conjugación ya que se sabe que la intensidad del pico del SPR está relacionado con la concentración de las nanopartículas; por lo que la combinación entre el número de onda y la forma e intensidad del SPR permitió caracterizar las nanopartículas y su conjugación (Zuber et al. 2016).

El potencial Z indica la fuerza de repulsión y nos permite predecir el tiempo de estabilidad de las nanopartículas y su reactividad con el medio de dispersión (Lee et al, 2011), nuestros resultados sugieren que al bioconjugarse las AuNPs con el extracto hidroetanólico de la planta *B. procumbens* se disminuye esta reactividad, por lo que da mayor estabilidad al bionanoconjugado.

La espectroscopia Infrarroja mostró dos bandas características de la síntesis de AuNPs por el citrato de sodio, las cuales corresponden a 1589 y 1403 cm^{-1} (Nghiem et al. 2010). Se sabe que los grupos carboxilados de las AuNPs pueden actuar como absorbentes de diversos

compuestos bioactivos de los extractos naturales de las plantas. Se puede observar que las bandas de 1076, 1231 y 1513 cm^{-1} son características de los grupos funcionales del extracto hidroetanólico (probablemente fenoles) y se encuentran presentes en el bionanoconjugado. Oliveira et al 2016, caracterizó mediante espectroscopia FTIR diversos extractos de plantas, encontrando en el extracto de Propolis (BeeHealth, United Kingdom), las bandas 1076 cm^{-1} que corresponde a la estructura secundaria de alcoholes y la vibración C-O-, la banda 1231 cm^{-1} la relaciono con C-O- de los polifenoles y la banda de 1513 cm^{-1} relacionada con las deformaciones de anillos aromáticos y flavonoides (extensión de grupos aromáticos C=C). Estos grupos funcionales también se encuentran en el nanoconjugado, demostrando así la bionanoconjugación. Esta conjugación puede establecerse mediante interacciones electrostáticas entre los grupos anionicos $-\text{COO}-$ de las nanopartículas y las cargas positivas de los grupos de moléculas del compuesto del extracto (por ejemplo fenoles o flavonoides) como lo demostró Sanna et al en el 2014, conjugando AuNPs con Epigallocatequina-galeato, resveratrol y fisetin.

En el modelo *in vivo* excisional nuestro grupo de trabajo había demostrado que la concentración óptima del extracto hidroetanólico de la planta *B. procumbens* para mejorar el proceso de cicatrización era de 160 mg/ml, aplicado diariamente de forma tópica. Tomando este dato como valor de referencia, se evaluaron 2 concentraciones del bionanoconjugado para determinar su efecto cicatrizante y determinar las posibles vías moleculares inducidas por él mismo. Nuestros resultados demostraron que la concentración de 1.6 mg/ml del bionanoconjugado (100 veces menor concentración) presentó un mejor efecto cicatrizante que el extracto sin conjugación, lo cual sugiere que la conjugación del extracto hidroetanólico con las AuNPs potencio su efecto, reduciendo la concentración. Estos resultados concuerdan con

los datos de Leu et al 2012 quienes demostraron que la formulación de AuNPs con dos antioxidantes (epigallocatequina galeato y ácido α -lipoico) (Leu et. 2012) potencia el efecto de los antioxidantes.

Estos resultados sugieren que el bionanoconjugado a 1.6 mg/ml no solo disminuye el área de la herida, si no también mejora las características histológicas disminuyendo el proceso inflamatorio y mejorando los datos de neoformación, así como mayor depósito y organización de las fibras de colágena, similar a lo encontrado con una concentración 100 veces mayor del extracto sin conjugar. Este hecho debido a que los cambios relacionados con el depósito y organización de la colágena, así como la relación entre colágena tipo I y III están relacionados con el restablecimiento de las propiedades mecánicas de la piel. Dado que histológicamente demostramos que el bionanoconjugado induce este ordenamiento, analizamos estos cambios biomoleculares mediante espectroscopia vibracional, ya que mediante la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se pueden caracterizar los componentes biológicos. Encontramos que el grupo tratado con el bionanoconjugado presenta mayor cantidad de α -hélices como estructura secundaria de las proteínas, se ha demostrado que el grado de organización de las fibras de colágena está relacionado con la cantidad de α -hélices (1656 cm^{-1}) determinado por FTIR-ATR (Nogueira et al, 2016), por lo que mayor cantidad de esta estructura corresponde a mayor cantidad de colágena tipo I, lo cual corrobora nuestros hallazgos y además concuerda con lo encontrado por Nogueira et al, en 2016, quienes mostraron que el tratamiento con LED (Diodo emisor de luz) y un vendaje semipermeable incrementa histológicamente las fibras de colágena así como el aumento en las α -hélices.

Estos resultados demuestran que la nanoconjugación del extracto hidroetanólico de *B. procumbens* disminuye 100 veces la concentración necesaria del extracto, potenciando así su efecto cicatrizante, generando una cicatriz de calidad funcional. Por lo que este bioconjugado incluido en el vehículo tiene un potencial uso en el tratamiento de heridas.

Nuestros resultados demuestran que el extracto de *Bacopa* contiene metabolitos que activan el receptor de PAR1, activando la vía de ERK1/2, induciendo la expresión de la MMP9, lo cual activa a TGF β 1 que se encuentra en la MEC de forma latente, al activarse TGF β 1 induce la expresión génica de TGF β 1, α -SMA y colágena tipo I; sin embargo, al activarse PAR1 y ERK1/2 se induce la traducción de α -SMA del reservorio citosólico, esto induce la formación de miofibroblastos y aunado a la síntesis de colágena tipo I y el ordenamiento de estas fibras, regula la expresión de TGF β 1, α -SMA y colágena tipo I en la fase tardía, disminuyendo la expresión génica de estos, por lo que sugiere que evitara la formación de cicatrices queloides. Los efectos cicatrizantes observados con el extracto a 160 mg/ml se observan con el nanobioconjugado usando solo 1.6 mg/ml, lo que reduce 100 veces la concentración necesaria, potenciando así el efecto del extracto de *Bacopa* (Figura 30).

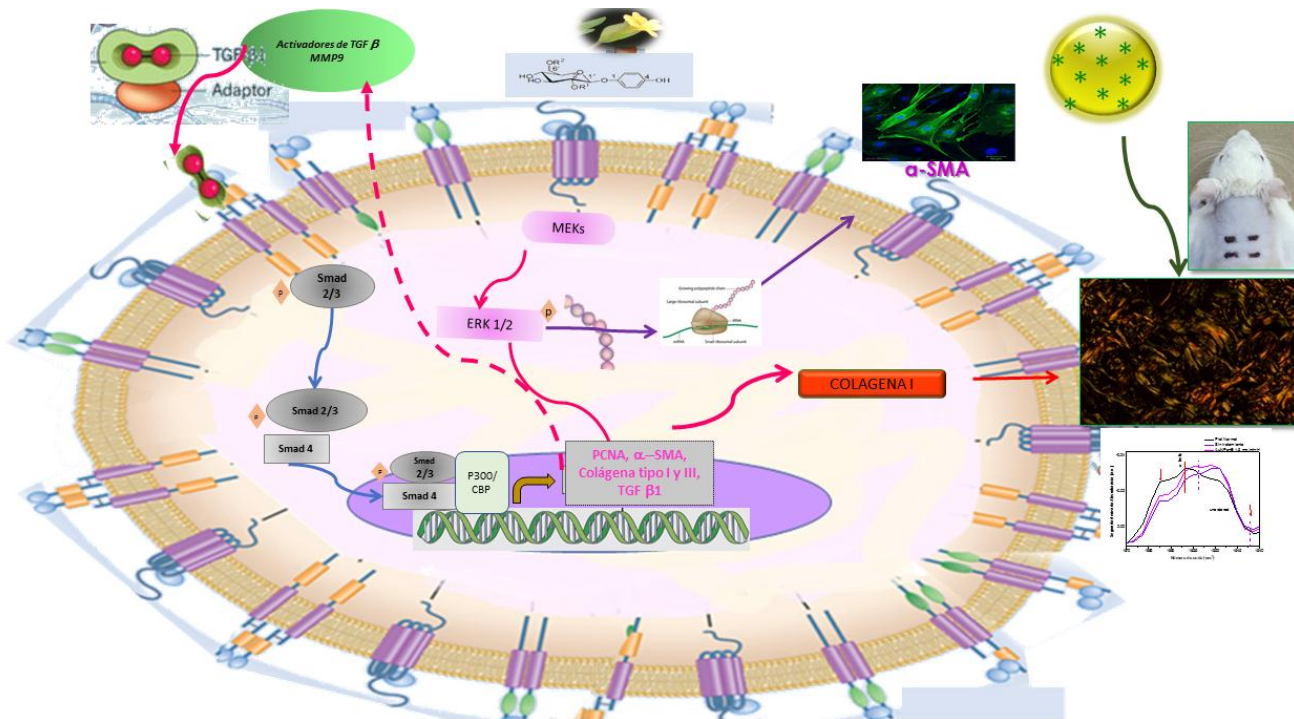


Figura 30. Modelo del mecanismo molecular inducido por el extracto de Bacopa y el efecto del nanobioconjugado. Estudios en progreso analizan el efecto toxicológico y citotóxico *in vitro* e *in vivo* del bionanoconjugado, así como la estabilidad del bionanoconjugado incluido en el hidrogel.

9. CONCLUSIÓN

- El extracto acuétanolico de la planta *Bacopa procumbens* regula la expresión de genes como TGF β 1, α -SMA y colágena tipo I, disminuyendo su expresión en la fase tardía.
- El extracto de *Bacopa* induce la traducción de α -SMA utilizando los reservorios citosólicos
- El extracto induce la activación de TGF β a partir del reservorio de la matriz extracelular induciendo la expresión de la MMP9
- El extracto tiene compuestos que activan el receptor PAR1, mediante el cual induce la proliferación de los fibroblastos
- El compuesto GA induce el mismo efecto proliferativo *in vitro* que el extracto completo de *Bacopa* por lo que este compuesto puede ser el responsable de los efectos biológicos
- La espectroscopia Uv-vis y FTIR demuestran la bionanoconjugación del extracto de *Bacopa procumbens* con las nanopartículas de oro
- La bionanoconjugación disminuye la reactividad de las nanopartículas
- La nanobioconjugación disminuye 100 veces la concentración necesaria del extracto, conservando el efecto cicatrizante de este
- La espectroscopia FTIR confirma el efecto del bionanoconjugado, en la calidad de la herida a los 7 días de tratamiento, correlacionado con depósito y ordenamiento de las fibras de colágena tipo I.

10.PERSPECTIVAS

Analizar los cambios histológicos y bioquímicos mediante FTIR de la cicatriz generada por el bionanoconjugado

Realizar los ensayos clínicos de fase I del bionanoconjugado.

Evaluar el efecto del antagonista de PAR1 en la proliferación inducida por el compuesto GA

Cultivar la planta *Bacopa*, obtener el extracto de esta planta cultivada y evaluar el efecto cicatrizante de este

11. BIBLIOGRAFÍA

- * Abbasi, A. M. et al. (2010) 'Ethnopharmacological application of medicinal plants to cure skin diseases and in folk cosmetics among the tribal communities of North-West Frontier Province, Pakistan', *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier Ireland Ltd, 128(2), pp. 322–335. doi: 10.1016/j.jep.2010.01.052.
- * Ashcroft, G. S., Yang, X., Glick, a B., Weinstein, M., Letterio, J. L., Mizel, D. E., ... Roberts, a B. (1999). Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nature cell biology*, 1(5), 260–6. doi:10.1038/12971
- * Asokanathan, Nithianathan, Rommel S Lan, Peter T Graham, Anthony J Bakker, Ana Tokanović, and Geoffrey A Stewart. 2015. "Activation of Protease-Activated Receptors (PARs)-1 and -2 Promotes Alpha-Smooth Muscle Actin Expression and Release of Cytokines from Human Lung Fibroblasts." *Physiological Reports* 3 (2):1–14. <https://doi.org/10.14814/phy2.12295>.
- * Austin, Karyn M., Lidija Covic, and Athan Kuliopulos. 2013. "Matrix Metalloproteases and PAR1 Activation." *Blood* 121 (3):431–39. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-355958>.
- * Baum, C. L. and Arpey, C. J. (2005) 'Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events', *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]*, 31(6), p. 674–86; discussion 686. doi: 10.1111/j.1524-4725.2005.31612.
- * Bielsa Marsol, I. (2006) 'Proceso de cicatrizaci??n de las heridas', *Piel*, 21(4), pp. 207–212. doi: 10.1016/S0213-9251(06)72470-4.
- * Bochaton-Piallar, Gabbiani, G. and Hinz, B. (2016) 'The myofibroblast in wound healing and fibrosis : answered and unanswered questions [version 1 ; referees : 2 approved] Referee Status ', 5(0), pp. 1–8. doi: 10.12688/f1000research.8190.1.
- * Brayner R. The toxicological impact of nanoparticles. *Nano Today*. 2008;3:48-55.
- * Broughton G., Janis J. E., Attinger C. E. (2006). The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 117:12S-34S
- * Brunner, G. and Blakytyn, R. (2004) 'Extracellular regulation of TGF- β activity in wound repair: Growth factor latency as a sensor mechanism for injury', *Thrombosis and Haemostasis*, 92(2), pp. 253–261. doi: 10.1160/TH04-05-0324.
- * Ceja, L. J. A. (2013). "Evaluación del efecto cicatrizante del extracto acuoso de la planta *Bacopa procumbens* (Mill.) Greenm en un modelo murino". Tesis de Maestría en Biomedicina Molecular. ENMH IPN. México, D.F.

- * Chang, C. J. et al. (2009) 'Thrombin regulates matrix metalloproteinase-9 expression in human monocytes', *Biochem Biophys Res Commun.* Elsevier Inc., 385(2), pp. 241–246. doi: S0006-291X(09)00971-1 [pii]\r10.1016/j.bbrc.2009.05.049.
- * Chen, Clarice Z C, and Michael Raghunath. 2009. "Fibrogenesis & Tissue Repair Antifibrosis _ State of the Art" 10:1–10. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-2-7>.
- * Chen, X. et al. (2013) 'Astragaloside IV-loaded nanoparticle-enriched hydrogel induces wound healing and anti-scar activity through topical delivery', *International Journal of Pharmaceutics*, 447(1–2), pp. 171–181. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.02.054.
- * Chia, Soo, and Ting Kang. 2002. "Scarless Fetal Wounds Are Associated with an Increased Matrix Metalloproteinase to Tissue- Derived Inhibitor of Metalloproteinase Ratio," 2273–85. <https://doi.org/10.1097/01.PRS.0000060102.57809.DA>.
- * Clark, R. A. F., Ghosh, K. and Tonnesen, M. G. (2007) 'Tissue Engineering for Cutaneous Wounds', *Journal of Investigative Dermatology*, 127(5), pp. 1018–1029. doi: 10.1038/sj.jid.5700715.
- * Consejo Estatal de Ecología del Estado de Hidalgo (COEDE), 1999, <http://coedehidalgo.gob.mx>
- * Daniel, M. C. M. and Astruc, D. (2004) 'Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology', *Chemical Reviews*, 104, pp. 293–346. doi: 10.1021/cr030698.
- * Darby, I. A. et al. (2014) 'Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing', *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 7, pp. 301–311. doi: 10.2147/CCID.S50046.
- * Doyle A, Griffith JB, 1998. *Cell and tissue culture: Laboratory procedures in biotechnology*. John Wiley and Sons, Chichester.
- * Duncan, Bradley, Chaekyu Kim, and Vincent M. Rotello. 2010. "Gold Nanoparticle Platforms as Drug and Biomacromolecule Delivery Systems.148 (1). Elsevier B.V.:122–27. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.06.004>.
- * Działo, M. et al. (2016) 'The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders', pp. 1–41. doi: 10.3390/ijms17020160.
- * Ferguson M. W. and Shah, M., Foreman, D. M. (1994). Neutralising antibody to TGF-beta 1,2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. *Journal of cell science*, 107.5, 1137–57.
- * Flores Montes, I. (2006) 'Manejo avanzado de heridas', *Revista Mexicana de enfermería*

cardiologica, 14(1), pp. 24–28. doi: 10.3390/ma3031863.

- * Fonder, M. a, Lazarus, G. S., Cowan, D. a, Aronson-Cook, B., Kohli, A. R., & Mamelak, A. J. (2008). Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58(2), 185–206. doi:10.1016/j.jaad.2007.08.048
- * Fujimoto, D. et al. (2010) 'The activation of Proteinase-Activated Receptor-1 (PAR1) mediates gastric cancer cell proliferation and invasion.', *BMC cancer*, 10, p. 443. doi: 10.1186/1471-2407-10-443.
- * Ganeshkumar, M. et al. (2012) 'Topical application of *Acalypha indica* accelerates rat cutaneous wound healing by up-regulating the expression of Type I and III collagen', *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier, 142(1), pp. 14–22. doi: 10.1016/j.jep.2012.04.005.
- * Gawronska-kozak, B. (2012) '(Nude) Mice Is Associated With Distinctive Matrix', 30(4), pp. 290–300. doi: 10.1016/j.matbio.2011.04.004.SCARLESS.
- * Gisely C. Lopes , Andr´eia C.C. Sanches , Celso V. Nakamura, Benedito P. Dias Filho, Luzmarina Hernandez, Jo˜ao Carlos P. Mello. (2005). Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. And *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005; 99(46): 265-268
- * González, J. M., López, M. and Ruiz, G. (2006) 'Informe de Vigilancia Tecnológica: Nanomedicina'.
- * Hayashi, H. and Sakai, T. (2012) 'Biological significance of local TGF-?? activation in liver diseases', *Frontiers in Physiology*, 3 FEB(February), pp. 1–11. doi: 10.3389/fphys.2012.00012.
- * Hidalgo A. O. (2010). "Determinación del efecto cicatrizante del extracto acuotánico de la planta *Bacopa procumbens* en la línea celular 3T3 de fibroblastos de ratón". Tesis de Maestría en Biomedicina Molecular. ENMH IPN.
- * Hinz, B. et al. (2001) 'Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity', *Molecular Biology of the Cell*, 12(9), pp. 2730–2741. doi: 10.1091/mbc.12.9.2730.
- * Hinz, B. et al. (2001) 'Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation', *American Journal of Pathology*, 159(3), pp. 1009–1020. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61776-2.
- * Huie, C. W. (2002) 'A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373(1–2), pp. 23–30. doi: 10.1007/s00216-002-1265-3.

- * Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 1998, www.inegi.org.mx
- * Javelaud, D., Laboureau, J., Gabison, E., Verrecchia, F., & Mauviel, A. (2003). Disruption of basal JNK activity differentially affects key fibroblast functions important for wound healing. *The Journal of biological chemistry*, 278(27), 24624–8. doi:10.1074/jbc.M301942200
- * Jiménez C. E; Curación avanzada de heridas. (2008). *Rev Colomb Cir.* 23(3):146-155.
- * Khaitlina, S. Y. (2001). Functional specificity of actin isoforms. *Int. Rev. Cytol.* 202, 35-98.
- * Kinbara, T. et al. (2002) 'Transforming growth factor-beta isoforms differently stimulate proalpha2 (I) collagen gene expression during wound healing process in transgenic mice.', *Journal of cellular physiology*, 190(3), pp. 375–81. doi: 10.1002/jcp.10046.
- * Kováč, I. et al. (2015) 'Plantago lanceolata L. water extract induces transition of fibroblasts into myofibroblasts and increases tensile strength of healing skin wounds', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(1), pp. 117–125. doi: 10.1111/jphp.12316.
- * Kwan, K. H. L. et al. (2011) 'Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing', *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. Elsevier Inc., 7(4), pp. 497–504. doi: 10.1016/j.nano.2011.01.003.
- * Landén, N. X., Li, D. and Ståhle, M. (2016) 'Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(20), pp. 3861–3885. doi: 10.1007/s00018-016-2268-0.
- * Lee, J, Kim H.Y.H., Zhou H., Hwang S., Koh K., Han D-W., and Lee J. Green synthesis of phytochemical-stabilized Au nanoparticles under ambient conditions and their biocompatibility and antioxidative activity *J. Mater. Chem.*, 2011,21, 13316-13326. DOI: 10.1039/C1JM11592H
- * Lee, M.-J. et al. (2014) 'YAP and TAZ Regulate Skin Wound Healing', *Journal of Investigative Dermatology*. Nature Publishing Group, 134(2), pp. 518–525. doi: 10.1038/jid.2013.339.
- * Lee, Tae Hoon, Guy Wilhem Lee, Keun Hyung Park, Mohamed Antar Aziz Mohamed, Myun Ho Bang, Yun Soo Baek, Youngsook Son, Dae Kyun Chung, Nam In Baek, and Jiyoung Kim. 2014. "The Stimulatory Effects of Stewartia Koreana Extract on the Proliferation and Migration of Fibroblasts and the Wound Healing Activity of the Extract in Mice." *International Journal of Molecular Medicine* 34 (1):145–52. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1753>.
- * Leivonen, S. K. et al. (2013) 'TGF- β -Elicited Induction of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP)-3 Expression in Fibroblasts Involves Complex Interplay between Smad3, p38 α , and ERK1/2', *PLoS ONE*, 8(2). doi: 10.1371/journal.pone.0057474.

- * Leu, J. G. et al. (2012) 'The effects of gold nanoparticles in wound healing with antioxidant epigallocatechin gallate and α -lipoic acid', *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. Elsevier Inc., 8(5), pp. 767–775. doi: 10.1016/j.nano.2011.08.013.
- * De Lima, R., Seabra, A. B. and Durán, N. (2012) 'Silver nanoparticles: A brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles', *Journal of Applied Toxicology*, 32(11), pp. 867–879. doi: 10.1002/jat.2780.
- * Lin, Yueh-Te, Jhih-Sian Chen, Ming-Heng Wu, I-Shan Hsieh, Chen-Hsien Liang, Cheng-Lung Hsu, Tse-Ming Hong, and Yuh-Ling Chen. 2015. "Galectin-1 Accelerates Wound Healing by Regulating the Neuropilin-1/Smad3/NOX4 Pathway and ROS Production in Myofibroblasts." *Journal of Investigative Dermatology* 135 (1). Nature Publishing Group:258–68. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.288>.
- * Livak KJ. Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- * Margadant, C. and Sonnenberg, A. (2010) 'Integrin–TGF- β crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing', *EMBO reports*, 11(2), pp. 97–105. doi: 10.1038/embor.2009.276.
- * Martin, P. (1997) 'Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration', *Science*, 276(5309), pp. 75–81. doi: 10.1126/science.276.5309.75.
- * Martínez A. 2013. Tesis "Evaluación del mecanismo molecular en el proceso de cicatrización estimulado por *Bacopa procumbens* (Mill.) Greenm en el modelo in vivo" IPN. LBMI.
- * Martínez, A; Ceja, A; Gómez, C; Buenrostro, B; San Martín, E; Paz, F; García, M and Pérez, G. 2014. Effect of *Metatera* Extract on Wound Closure. *Journal of Chemical , Biological and Physical Sciences*. 4(5), 18–24.
- * Moctezuma-Paz, Páez-Franco, Jiménez-González, Miguel-Jaimes, Foncerrada-Ortega, Sánchez-Flores, González-Contreras Albores-de la Riva y Nuñez-Luna. *Epidemiología de las quemaduras en México*. *Rev Esp Méd Quir* 2015;20:78-82
- * Morton J. J., Malone M. H. (1972). Evaluation of vulnerary activity by open wound procedure in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther*; 196:117–20.
- * Murthy, M. K. Gautam, ShaliniGoel, V. Purohit, H. Sharma, and R. K. G. (2013) 'Evaluation of In Vivo Wound Healing Activity of *Bacopa monniera* on Different Wound Model in Rats', *Indian Journal of Pharmacology*, 2013. doi: 10.5455/2319-2003.ijbcp20150225.
- * Nghiem, T. H. L. et al. (2010) 'Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to

proteins', *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 1(2), p. 25009. doi: 10.1088/2043-6254/1/2/025009.

- * Nogueira, V. C. et al. (2016) 'Comparative Study of Morphometric and Fourier Transform Infrared Spectroscopy Analyses of the Collagen Fibers in the Repair Process of Cutaneous Lesions.', *Advances in wound care*, 5(2), pp. 55–64. doi: 10.1089/wound.2015.0641.
- * Pitz, H. D. S. et al. (2016) 'In Vitro Evaluation of the Antioxidant Activity and Wound Healing Properties of Jaboticaba (*Plinia peruviana*) Fruit Peel Hydroalcoholic Extract', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Publishing Corporation, 2016. doi: 10.1155/2016/3403586.
- * Rasmussen, R (2001) Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K (eds) *Rapid cycle real-time PCR, methods and applications*. Springer Press, Heidelberg
- * Rybinski, B., Franco-Barraza, J. and Cukierman, E. (2014) 'The wound healing, chronic fibrosis, and cancer progression triad.', *Physiol. Genomics*, 46(7), pp. 223–244. doi: 10.1152/physiolgenomics.00158.2013.
- * Sanna, V. et al. (2014) 'Single-step green synthesis and characterization of gold-conjugated polyphenol nanoparticles with antioxidant and biological activities', *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), pp. 4935–4951. doi: 10.2147/IJN.S70648.
- * Scotton CJ1, Chambers RC. (2007), Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest*. 2007 Oct;132(4):1311-21. DOI:10.1378/chest.06-2568.
- * Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, Gabbiani G. (1998), The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol*. 1998 Aug 10;142(3):873-81. PMID:PMC2148176.
- * Serio, Claudia Di, Silvia Pellerito, Maria Duarte, Daniela Massi, Antonella Naldini, Giuseppe Cirino, Igor Prudovsky, et al. 2007. "Protease-Activated Receptor 1-Selective Antagonist SCH79797 Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis by a Protease-Activated Receptor 1-Independent Mechanism." *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 101 (1):63–69. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00078.x>.
- * Sharath, R. et al. (2010) 'Wound healing and protease inhibition activity of bacoside-A, isolated from *Bacopa monnieri* Wettst', *Phytotherapy Research*, 24(8), pp. 1217–1222. doi: 10.1002/ptr.3115.
- * Shivananda N., Sandiford S. and Maxwell A, (2009) Evaluation of the Wound-healing Activity of Ethanolic Extract of *Morinda citrifolia* L. Leaf, *Evid Based Complement Alternat Med*. September; 6(3): 351–356

- * Singer, A. J. and Clark, R. A. F. (1999) 'Cutaneous wound healing', *New England Journal of Medicine*, 341(10), pp. 738–746. doi: doi:10.1056/NEJM199909023411006.
- * Stevenson, P. C. *et al.* (2002) 'Wound healing activity of acylated iridoid glycosides from *Scrophularia nodosa*', *Phytotherapy Research*, 16(1), pp. 33–35. doi: 10.1002/ptr.798.
- * Strauch, A. and Hariharan, S. (2013) 'Dynamic Interplay of Smooth Muscle α -Actin Gene-Regulatory Proteins Reflects the Biological Complexity of Myofibroblast Differentiation', *Biology*, 2(2), pp. 555–586. doi: 10.3390/biology2020555.
- * Subramanian SV, Polikandriotis JA, Kelm RJ, Jr., David JJ, Orosz CG, Strauch AR. Induction of vascular smooth muscle {alpha}-actin gene transcription in transforming growth factor {beta}1-activated myofibroblasts mediated by dynamic interplay between the pur repressor proteins and Sp1/Smad coactivators. *Mol Biol Cell*. 2004;15:4532-4543.
- * Suh, N. *et al.* (2003) 'Synthetic triterpenoids enhance transforming growth factor beta/Smad signaling', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 63(6), pp. 1371–1376. Available at: <http://pm>.
- * Tam, J. C. W. *et al.* (2011) 'The in vivo and in vitro diabetic wound healing effects of a 2-herb formula and its mechanisms of action', *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier Ireland Ltd, 134(3), pp. 831–838. doi: 10.1016/j.jep.2011.01.032.
- * Tian, Jun, Kenneth K.Y. Wong, Chi Ming Ho, Chun Nam Lok, Wing Yiu Yu, Chi Ming Che, Jen Fu Chiu, and Paul K.H. Tam. 2007. "Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing." *ChemMedChem* 2 (1):129–36. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200600171>.
- * Tomasek, J. J. *et al.* (2002) 'Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(5), pp. 349–363. doi: 10.1038/nrm809.
- * Tziotzios, C., Profyris, C. and Sterling, J. (2012) 'Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics: Part II. Strategies to reduce scar formation after dermatologic procedures', *Journal of the American Academy of Dermatology*. Elsevier Inc, 66(1), pp. 13–24. doi: 10.1016/j.jaad.2011.08.035.
- * Velidandla, S. *et al.* (2014) 'Histochemical analysis of polarizing colors of collagen using Picrosirius Red staining in oral submucous fibrosis.', *Journal of international oral health : JIOH*, 6(1), pp. 33–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3959134&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
- * Verrecchia, F. and Mauviel, A. (2002) 'Transforming growth factor-beta signaling through the

Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation', *J Invest Dermatol*, 118(2), p. 211–5. doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.01641.x.

- * Volk, S. W. *et al.* (2011) 'Diminished type III collagen promotes myofibroblast differentiation and increases scar deposition in cutaneous wound healing', *Cells Tissues Organs*, 194(1), pp. 25–37. doi: 10.1159/000322399.
- * Wang, L., Luo, J. and He, S. (2007) 'Induction of MMP-9 release from human dermal fibroblasts by thrombin: involvement of JAK/STAT3 signaling pathway in MMP-9 release', *BMC Cell Biology*, 8(1), p. 14. doi: 10.1186/1471-2121-8-14.
- * Werner S, G. R. (2003) 'Regulation of wound healing by growth factors and cytokines.', *Physiol Rev.*, 83, pp. 835–70.
- * Xu, J., Lamouille, S. and Derynck, R. (2009) 'TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition', *Cell Research*, 19(2), pp. 156–172. doi: 10.1038/cr.2009.5.
- * Xue, M. and Jackson, C. J. (2008) 'Autocrine actions of matrix metalloproteinase (MMP)-2 counter the effects of MMP-9 to promote survival and prevent terminal differentiation of cultured human keratinocytes.', *The Journal of investigative dermatology*, 128(11), pp. 2676–85. doi: 10.1038/jid.2008.136.
- * Xue, Meilang, and Christopher J. Jackson. 2015. "Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring." *Advances in Wound Care* 4 (3):119–36. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0485>
- * Yang, J. *et al.* (2015) 'Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis.', *Nature reviews. Nephrology*, 4(1), pp. 1465–75. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62533-3.
- * Yano, Hiroyuki, Ryoji Hamanaka, Miki Nakamura, Hideaki Sumiyoshi, Noritaka Matsuo, and Hidekatsu Yoshioka. 2012. "Smad, but Not MAPK, Pathway Mediates the Expression of Type I Collagen in Radiation Induced Fibrosis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 418 (3). Elsevier Inc.:457–63. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.039>.
- * Yi-Cheun Yeh, Brian Creran and Vincent M. Rotello (2012) Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology, *Nanoscale*, 2012,4, 1871-1880 doi: 10.1039/C1NR11188D.
- * Yu, Q. and Stamenkovic, I. (2000) 'Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis', *Genes and Development*, 14(2), pp. 163–176. doi: 10.1101/gad.14.2.163.

- * Zanella, R. (2012) 'Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño', *Www.Mundonano.Unam.Mx*, 5(1), pp. 69–81. Available at: www.mundonano.unam.mx.
- * Zhang, A.; Liu, X.; Cogan, J.G.; Fuerst, M.D.; Polikandriotis, J.A.; Kelm, R.J.J.; Strauch, A.R. YB-1 coordinates vascular smooth muscle α -actin gene activation by TGF β 1 and thrombin during differentiation of human pulmonary myofibroblasts. *Mol. Biol. Cell* 2005, 16, 4931-4940.
- * Zhang, Q. *et al.* (2012) 'Herbal formula Astragali Radix and Rehmanniae Radix exerted wound healing effect on human skin fibroblast cell line Hs27 via the activation of transformation growth factor (TGF-??) pathway and promoting extracellular matrix (ECM) deposition', *Phytomedicine*. Elsevier GmbH., 20(1), pp. 9–16. doi: 10.1016/j.phymed.2012.09.006.
- * Zuber, A. *et al.* (2016) 'Detection of gold nanoparticles with different sizes using absorption and fluorescence based method', *Sensors and Actuators, B: Chemical*. Elsevier B.V., 227, pp. 117–127. doi: 10.1016/j.snb.2015.12.044.

12. PRODUCTOS GENERADOS

12.1. Patentes

1. Patente aprobada de forma: “Composición farmacológica que comprende extracto de *Bacopa Procumbens* acoplado a nanopartículas de oro para la regeneración tisular”
2. Patente en preparación: “Aislamiento, caracterización química y actividad biológica del compuesto promotor de la regeneración tisular”



Noviembre 30, 2016
D*SEPI/4026/11/16

**UNIDAD POLITÉCNICA PARA EL DESARROLLO
Y LA COMPETITIVIDAD EMPRESARIAL**
Presente

Por este medio solicito a usted, de no existir inconveniente, gire sus finas instrucciones a quien corresponda, a fin de iniciar los trámites de registro de solicitud de **patente**, ante el IMPI de la invención denominada **"COMPOSICIÓN FARMACOLÓGICA QUE COMPRENDE EXTRACTO DE BACOPA PROCUMBENS ACOPLADO A NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA LA REGENERACIÓN TISULAR"**, desarrollada por: los investigadores Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara, Dra. María del Consuelo Gómez García y Dr. Marlon Rojas López trabajadores académicos del IPN y la estudiante de Doctorado M. en C. Adriana Martínez Cuazitl adscritos al Laboratorio de Biomedicina Molecular I de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, así como Departamento de Instrumentación Analítica y Biosensores en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Parte de la invención fue apoyada por el proyecto multidisciplinario 1619 2014-1015 de la Secretaría de Investigación y Posgrado y el proyecto 20164892 de la convocatoria Proyectos para la Innovación 2016.

Por lo anterior, adjunto encontrará la siguiente documentación:

1. Descripción de la Invención, resumen y reivindicaciones
2. Cartas de cesión de derechos de los investigadores
3. Ficha de identificación de los inventores
4. Copia del comprobante de percepciones de los inventores

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,

LP.N. FOLIO _____
UNIDAD POLITÉCNICA PARA EL
DESARROLLO Y LA
COMPETITIVIDAD EMPRESARIAL

"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
IPN
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA
Y HOMEOPATÍA



01 DIC 2016



M. EN C. LORENA GARCÍA MORALES
DIRECCIÓN

HORA _____

RECEPCIÓN DE DOCUMENTOS

ANEXO SI NO

Responsable de la Información: M. en C. MARIO MENDOZA GARRIDO.-Je fe del departamento de Posgrado-ENMyH

DIRECCIÓN

"PROGRAMA DE ESTUDIOS DE LA CARRERA DE MÉDICO CIRUJANO Y HOMEÓPATA ACREDITADO POR COMAEM 2014/2019"

"PROGRAMA DE ESTUDIOS DE LA CARRERA DE MÉDICO CIRUJANO Y PARTERO ACREDITADO POR COMAEM 2011/2016"

Guillermo Massieu Helguera, No. 239, Fracc. "La Escalera", Ticomán, C.P. 07320 México, D.F.

Tels. 55-86-94-49 RED IPN 57-29-60-00 ext. 46111 y 55563

www.cnmh.ipn.mx

LGM/MMG/MCCU

7237



Instituto Politécnico Nacional
Unidad Politécnica para el Desarrollo
y la Competitividad Empresarial



80
1936-2016
AÑOS IPN



ACUSE

UPDCE/STDT/846/2016

Ciudad de México, a 2 de Diciembre de 2016

LIC. LAURA INÉS HARA VALERO
DIRECTORA DE NORMATIVIDAD, CONSULTA Y DICTAMINACIÓN
DE LA OFICINA DEL ABOGADO GENERAL
PRESENTE

Por este medio solicito a usted, de no existir inconveniente, realizar el ingreso de la **solicitud de registro de patente** ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI), de la invención denominada **"COMPOSICIÓN FARMACOLÓGICA QUE COMPRENDE EXTRACTO DE BACOPA PROCUMBENS ACOPLADO A NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA LA REGENERACIÓN TISULAR"** desarrollada por: Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara, Dra. María del Consuelo Gómez García y Dr. Marlon Rojas López, trabajadores académicos adscritos a la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, así como la M. en C. Adriana Martínez Cuazitl, alumna de la misma. Por lo anterior, adjunto encontrará la siguiente información:

- Memoria descriptiva y figuras, por triplicado.
- Formato de reconocimiento de derechos de los inventores, por duplicado y con firma autógrafa.
- Ficha de identificación de los inventores del IPN.
- Factura con folio 10028981891 por un monto de \$4,381.31 (Cuatro mil trescientos ochenta y un pesos 31/100 M.N.) por concepto del artículo 1a de la tarifa de servicios del IMPI, por duplicado.

El correo para contactar al Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara es dperez@ipn.mx.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

ATENCIÓN "LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"

C. P. EDUARDO TORRES VALME
ENCARGADO DEL DESPACHO DE TANCUPDCEAL



- c.c.p. M. en C. Lorena García Morales. Directora de la ENMyH. Para su conocimiento.
- c.c.p. Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara. Profesor de la ENMyH. Para su conocimiento.
- c.c.p. Dra. María del Consuelo Gómez García. Profesor de la ENMyH. Para su conocimiento.
- c.c.p. Dr. Marlon Rojas López, Profesor de la ENMyH. Para su conocimiento.
- c.c.p. M. en C. Adriana Martínez Cuazitl. Alumna de la ENMyH. Para su conocimiento recibe notificación el Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara

ETJ/AGS/gdpd/gpam*

Av. Wilfrido Massieu s/n, Edificio "Adolfo Ruíz Cortines". Unidad Profesional "Adolfo López Mateos", Zacatenco, C.P. 07738, Delegación Gustavo A. Madero, Ciudad de México Tel. 57 29 60 00 exts. 57000 y 57001. www.updce.ipn.mx, Correo electrónico: updce@ipn.mx



Instituto Politécnico Nacional
Unidad Politécnica para el Desarrollo
y la Competitividad Empresarial



"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"
"50 Aniversario del CECyT 14 "Luis Enrique Erro"
"60 Aniversario del Patronato de Obras e Instalaciones"
"50 Aniversario de la COFAA-IPN"
"30 Aniversario de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología"



UPDCE/STDT/ 870/17

Ciudad de México, a 16 de Octubre de 2017.

M. EN C. LORENA GARCÍA MORALES
DIRECTORA DE LA ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA
Y HOMEOPATÍA, DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
PRESENTE

Para darle seguimiento al trámite de solicitud de registro de Patente de la invención denominada **"COMPOSICIÓN FARMACOLÓGICA QUE COMPRENDE EXTRACTO DE BACOPA PROCUMBENS ACOPLADO A NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA LA REGENERACIÓN TISULAR"**, desarrollada por el Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara, la Dra. María del Consuelo Gómez García, el Dr. Marlon Rojas López, trabajadores académicos adscritos a la Escuela a su digno cargo y la M. en C. Adriana Martínez Cuaztl, alumna de la misma; a la cual recayó el número de expediente MX/a/2016/017179, adjunto encontrará copia fotostática del oficio DNCyD-03-17/2991, emitido por la Directora de Normatividad, Consulta y Dictaminación de la Oficina del Abogado General, mediante el cual nos indica que la Dirección Divisional de Patentes del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) ha notificado que se tiene **satisfecho el examen de forma** y hace referencia sobre la publicación y el examen de fondo que se le realizará a dicha invención, por lo que en cuanto se reciba alguna notificación, se hará de su conocimiento a la brevedad posible.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"

C. P. EDUARDO TORRES JAIME
ENCARGADO DEL DESPACHO DE LA UPDCE



En concordancia con el oficio SAD/DRF/C/19/2016, suscrito por el Secretario de Administración, relativo a las medidas de ahorro, austeridad y eficiencia, con el fin de fomentar el cuidado del medio ambiente, se emiten copias de conocimiento vía correo electrónico.

- c.c.p. Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara. Profesor de la ENMyH. Para su conocimiento.
- c.c.p. Dra. María del Consuelo Gómez García. Profesora de la ENMyH. Para su conocimiento.
- c.c.p. Dr. Marlon Rojas López. Profesor de la ENMyH. Para su conocimiento.
- c.c.p. M. en C. Adriana Martínez Cuaztl. Alumna de la ENMyH. Para su conocimiento.

ETJ/epd/com



"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"
"60 Aniversario del CECyT 14 Luis Enrique Erro"
"50 Aniversario del Patronato de Obras e Instalaciones"
"50 Aniversario de la COFAA-IPN"
"30 Aniversario de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología"

Oficio número DNCyD-03-17/ 2991

Ciudad de México, a 5 de octubre de 2017.

DR. FRANCISCO JOSÉ PLATA OLVERA
SECRETARIO DE EXTENSIÓN E INTEGRACIÓN SOCIAL
P R E S E N T E

Con fundamento en el artículo 42 fracción XV del Reglamento Orgánico, me refiero a la solicitud de patente denominada "COMPOSICIÓN FARMACOLÓGICA QUE COMPRENDE EXTRACTO DE BACOPA PROCUMBENS ACOPLADO A NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA LA REGENERACIÓN TISULAR", presentada ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) el 20 de diciembre de 2016, con número de expediente MX/a/2016/017179, desarrollada por los inventores David Guillermo Pérez Ishiwara, María del Consuelo Gómez García, Marlon Rojas López y Adriana Martínez Cuazitl, sobre el particular, me permito comunicarle lo siguiente:

Con fecha 2 de octubre de 2017, la Dirección Divisional de Patentes del IMPI notificó a la Oficina del Abogado General a través del oficio con número de folio 68567 de fecha 28 de agosto de 2017, que se tiene por satisfecho el examen de forma realizado a la solicitud de patente en comento.

De conformidad con el artículo 52 de la Ley de la Propiedad Industrial (LPI), 39 y 40 de su Reglamento, una vez concluido el examen de forma, y después del vencimiento del plazo de 18 meses, contado a partir de la fecha de presentación de la solicitud de patente, o en su caso, de prioridad reconocida, toda solicitud de patente será publicada en la Gaceta, conteniendo los datos bibliográficos comprendidos en la solicitud presentada, el resumen de la invención y, en su caso el dibujo más ilustrativo de la misma o la fórmula química que mejor la caracterice.

No obstante, se podrá gestionar mediante escrito la publicación anticipada de la solicitud de patente y enterando al Instituto el pago de la tarifa correspondiente al artículo 1d), establecida en la Tarifa, la cual, puede ser consultada a través de la página electrónica del IMPI: <https://www.gob.mx/imp/acciones-y-programas/servicios-que-ofrece-el-imp-tarifas?state=published>.



Asimismo, de conformidad con el artículo 52 BIS de la LPI, una vez publicada la solicitud, cualquier persona podrá dentro de un plazo de seis meses posteriores a aquella, presentar ante el IMPI información concerniente a los requisitos de patentabilidad y sus excepciones de acuerdo a lo establecido en los artículos 16 y 19 de la LPI, por lo que el IMPI dará inicio al examen de fondo hasta haber transcurrido los plazos especificados.

El Instituto de conformidad con el artículo 55 de la LPI, podrá requerirnos por escrito para que dentro de un plazo de dos meses, presentemos información o documentación adicional o complementaria que sea necesaria, modifiquemos las reivindicaciones, descripción, dibujos, o hagamos las aclaraciones que consideremos pertinentes.

De acuerdo con el artículo 56 de la LPI, en caso de que el IMPI niegue la patente, lo comunicará por escrito, expresando los motivos y fundamentos legales de su resolución.

De conformidad con el artículo 57 de la LPI, cuando proceda el otorgamiento de la patente, el Instituto comunicará por escrito para que, dentro del plazo de dos meses cumplamos con los requisitos necesarios para la expedición del título.

Finalmente me permito comunicarle que en el momento que esta Oficina reciba alguna notificación, se hará de su conocimiento a la brevedad para los efectos conducentes.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"La Técnica al Servicio de la Patria"



LIC. LAURA INÉS O'HARA VALERO
DIRECTORA
ABOGADO GENERAL
DIRECCIÓN DE NORMATIVIDAD
CONSULTA Y DIFUSIÓN

Anexo: Copia del Oficio del IMPI con número de folio 68567.

En concordancia con el oficio SAD/DRF/C/19/2016, suscrito por el Secretario de Administración, relativo a las medidas de ahorro, austeridad y eficiencia, con el fin de fomentar el cuidado del medio ambiente, se emiten copias de conocimiento vía correo electrónico.

c. c. p. Unidad Politécnica para el Desarrollo y la Competitividad Empresarial: updec@ipn.mx, con anexos.
Ing. Daniela Pacheco Díaz, Encargada del Centro de Patentamiento: cpatentamiento@ipn.mx, con anexos.



Certificado de acuse
de recibo registro(s):
MX/2017/041870

DIRECCION DIVISIONAL DE PATENTE
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE PROCESAMIENTO ADMINISTRATIVO DE PATENTE
COORDINACION DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FORM
Expediente de Patente MX/a/2016/01717

Asunto: Resultado del Examen de Forma.

Ciudad de México, a 28 de agosto de 2017

No. Folio: 68567

Claudia Alejandra BLANCO SALAZAR
Apoderado de
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
Edificio De La Direccion General, Av. Luis Enrique Erro S/N,
Unidad Profesional "Adolfo Lopez Mateos"
Zacatenco
07738, GUSTAVO A. MADERO, Ciudad de México, México

REF: Se da acuse de recibo a su(s) escrito(s) presentado(s): 09/06/2017

Se tiene por satisfecho el examen de forma señalado por la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento.

Cabe señalar que de conformidad con los artículos 52 de la Ley de la Propiedad Industrial; 39 y 40 del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial vigentes, una vez concluido el examen de forma y, después del vencimiento del plazo de 18 meses, contado a partir de la fecha de presentación de la solicitud de patente, o en su caso, de prioridad reconocida, toda solicitud de patente será publicada en la Gaceta, conteniendo los datos bibliográficos comprendidos en la solicitud presentada, el resumen de la invención y, en su caso, el dibujo más ilustrativo de la misma o la fórmula química que mejor la caracterice.

No obstante, la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento también prevén que, a petición del solicitante mediante escrito, la solicitud de patente podrá ser publicada de manera anticipada, siempre que la misma haya aprobado el examen de forma y el solicitante entere al Instituto el pago de la tarifa correspondiente (artículo 1d).

Así, una vez publicada la solicitud, de conformidad al artículo 52 BIS de la Ley de la Propiedad Industrial, cualquier persona podrá dentro de un plazo de seis meses posteriores a aquella, presentar ante el Instituto, información concerniente a los requisitos de patentabilidad y sus excepciones (artículos 16 y 19 de la Ley de la Propiedad Industrial), por lo que el Instituto dará inicio al examen de fondo hasta haber transcurrido los plazos especificados.

El suscrito firma el presente oficio con fundamento en los artículos 6º fracciones III y XI y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 2º, 3º fracción V, inciso a), sub inciso i), segundo guión, 4º, 5º y 12º fracciones I, II, III, IV y VI del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 07/09/2007); artículos 1º, 2º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a) sub inciso i), segundo guión, 16 fracciones I, II, III, IV y VI y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); artículos 1º, 3º y 5º inciso e) e i) y penúltimo párrafo del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).



MX/2017/68567

"2017. Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"



Asimismo, el presente oficio se signa con firma electrónica avanzada (FIEL), con fundamento en los artículos 7° BIS 2 de la Ley de la Propiedad Industrial; 3° de su Reglamento, y 1° fracción III, 2° fracción V, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se establecen los lineamientos para el uso del Portal de Pagos y Servicios Electrónicos (PASE) del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican.

ATENTAMENTE
COORDINADOR DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FORMA
OMAR SANTIAGO GALVEZ CASTILLO.
OSGC/RCC/2017



Cadena Original

OMAR SANTIAGO GALVEZ CASTILLO|00001000000401472906|Servicio de Administración Tributaria|1796|FOR|MX/2017/68567|MX/a/2016/017179|Favorable|1856|RCC|Pág(5)
2|-EjXN7jOe1M7fq5MAeeLl9tkOI=

Sello Digital

SohaYHkX6TGL0eq983iWCW+GVEBpzr77rDFXLWRCnMxD7uaUScH2mWqhoiBA1yP1ABDGFnRCberf36D1
DY70HSUUxuKebonwub2LKBIVCkapuczDLP0v4QcYHfaUJa+iFULgus4lghJAqdONFZxsSHbjamL/q6j9
iM7NinXh2I+RU3G8QAGUbWc6p/SyHeWfVKWdleVg2/YOsFhTQvtGAXULpjMrx0QduR8a98UOhf/14J+X
7srGIF04kU3lnNURvYGIHhO98VHVH91W4dzgcbB19o/o6TXhQGqUTEKYZmf2kFCPNEk82dEMaD8a911
iZVhThLbdwdyNVR4Zgu1yw==

12.2. Artículos

12.2.1. Artículos publicados

1. Effect of Metatera extract on wound closure, Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences. JCBPS; special Issue, Section C; 30 Nov. 2014 Vol. 4, No. 5, 18-24

Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences



An International Peer Review E-3 Journal of Sciences

Available online at www.jcbpsc.org

Section C: Medical and Pharmaceutical Biotechnology

CODEN (USA): JCBPAT
Article

Research

Effect of Metatera Extract on Wound Closure

Adriana Martínez Cuazitl¹, Julia Antonia Ceja de León¹, María del Consuelo Gómez García¹, Blanca Rosa Buenrostro Espinosa¹,
Eduardo San Martín Martínez², Francisco Javier Paz Bermudez³, Mario García Solís⁴,
David Guillermo Pérez Ishiwara^{1,5}.

¹ Biomedicine Molecular Laboratory, ENMyH-IPN, Mexico;

² Research Center of Applied Science and Advanced Technology, IPN, Mexico;

³ Dept. of Physiology, Biophysics and Neuroscience, CINVESTAV, Mexico

⁴ Dept. of Pathology, General Hospital of Tlahuac, Mexico;

⁵ Research Center for Applied Biotechnology, IPN, Mexico.

Abstract : Wounds represent a major health problem, in terms of morbidity and mortality, the primary goals of wound treatment are the rapid wound closure and a functional scar. There are medicinal plants used empirically for treatment of wounds such as metatera plant (Scrophulariaceae family). Our group demonstrated *in vitro* that metatera extract (ME) induces important events for wound closure as proliferation, migration and differentiation of fibroblast. The main objective of this work was to determinate the wound closure effect induced by metatera extract in an excisional *in vivo* model. Metatera extract included in a hydrogel (ME-H) was optimized for dairy topical application during 15 days. We analyzed the wound closure rate effect, the histopathology changes and the total collagen content in tissues treated with ME-H. The morphometric analysis showed that ME clearly improve wound closure. Moreover, histopathology changes induced by this extract suggest that ME induced different cellular events, such as fibroblast maturation and fibroblast and collagen fibers arrangement. Our results supported the ethnobotanic use of this plant for wound care in Mexico.

INTRODUCTION

The primary function of the skin is to serve as a protective barrier against the environment. Loss of the integrity of the skin as a result of injury or illness may lead to major disability or even death. Every year in the United States more than 1.25 million people have burns and 6.5 million have chronic skin ulcers caused by pressure, venous stasis, or diabetes mellitus.

The primary goals of wound treatments are rapid wound closure and a functional and aesthetically satisfactory scar^{1,2}.

Despite the considerable advances in the pharmaceutical industry, the availability of drugs capable of stimulating the process of wound healing is still limited. Only 1–3% of the drugs listed in Western pharmacopoeias are used on the skin or wounds; by comparison, at least one-third of herbal remedies are applied for this purpose³.

Moreover, medicinal plants are rich sources of new efficacious wound-healing substances⁴. Nowadays, Traditional Mexican Medicine is widely practiced and is viewed as an alternative to conventional medicine for wound healing in Mexican population.

In Hidalgo state (Mexico) a plant known as Metatera (Scrophulariaceae family) was used for wound healing. In our group we demonstrated *in vitro* that metatera extract induced different important events for wound healing such as proliferation, migration and differentiation of fibroblast⁵.

However, no systematic studies have been carried out about the clinical evaluation of the wound healing activity of metatera plant. The main research goal of this study was to determinate the wound closure, the wound healing histological properties and the total content of collagen induced by the metatera extract-hydrogel (ME-H) which was prepared and optimized for a excisional *in vivo* model in rats.

METHODS

Animals: Male Wistar rats of 220-240 g were maintained at 26°C under 12:12 hours light/dark cycle. Animals received food and water *ad libitum*. The ethic committee of the postgraduate section of ENMyH approved the experimental procedure of this study.

Metatera formulation: Metatera plant was collected from Hidalgo State, Mexico; and identified with the voucher specimen (IZTA-Flora Útil-UAM herbarium).

The aquoethanolic extract, was obtained by continuous reflux method described by Hidalgo⁵. The solvent was evaporated under reduced pressure in a rotary vaporator at 45°C. The extract yield was 81.97%. Then, the metatera extract (ME) was included into a hydrogel elaborated by Dermopharma enterprise at 20, 40 and 80 mg/ml (final concentrations) (ME-H).

***In vivo* excisional skin wound model:** Animals were anesthetized, the dorsal region was harvested and four full-thickness skin excision wounds of 1cm² were removed by surgery and covered with a commercial film (Tegaderm).

Then, experimental animals were divided into six random groups: control group without treatment (WOT); group treated with the hydrogel (vehicle); group treated with a commercial product for wound care (Kitoscell); and three experimental groups which were treated with the formulation at 20, 40 and 80 mg/ml of metatera extract-hydrogel (ME-H).

The healings were treated daily and animals were sacrificed at 15 days post-injure. A minimum of six rats were used for each experimental group.

Morphometric analysis: The healings were observed, photographed and measured immediately (day 0), and at 15 days post-surgery by Vernier caliper, calculating percentage of wound reduction of the original area.

Histopathology analysis of wound tissue : At 15 days post wounding, wound lesions with adjacent normal skin were removed and fixed in 4% buffered paraformaldehyde; the samples were then embedded in paraffin and sectioned at thickness of 5 μ m.

The sections were stained with hematoxylin-eosin and Masson's Trichome staining, and then samples were analyzed and photographed using the Olympus system CX31.

Hydroxyproline (Hyp) detection: Collagen concentrations were determined by measuring hydroxyproline content in fresh skin samples after digestion with acid^{6,7}.

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical significance was analyzed using two tailed Student's t test. Data that tested significantly different using analysis of variance ($p < 0.05$). All analysis was performed using software NCSS (Statistica 10.0).

RESULTS

Metatera extract improve wound closure rate: The *in vivo* excisional model used give us clean healings reducing the infection risk and let us observe the cellular, histological and morphometric changes that occurs during wound healing process⁸. Four full 1cm² thickness were done on the dorsal shaved of male Wistar rats, and monitored for 15 days post wounding. For this work the ME was included in a hydrogel for topical application to maintain the microambient⁹. Macroscopically, we observed wound reduction in all groups, although, we found that almost all the healings treated with 80 mg/ml of ME-H were closed (>90%, data not showed), without scab and scarless, in comparison with the other groups (Figure 1). These results correlated with the percentage of wound reduction; while in controls groups the percentage of wound reduction was only 96-97 %, using 40 and 80 mg/ml ME-H, the reduction was 99.8-99.9 % (Figure 1).

These results demonstrated that ME-H improved wound closure at 40 and 80 mg/ml per day in comparison with the + Control, vehicle and with the WOT groups. Our results are similar to other studies with plants of the same family; Lau *et al.*^{10,11} in a diabetic model of rats observed that healings treated with the extract of *R. rehmanniae* (Scrophulariaceae family) showed wound reduction between 8 to 18 days, in comparison with control group. Murthy *et al.*¹² in a *in vivo* model observed that the percent rate of wound contraction in rats, treated orally with *B. monniera* extract (25mg/kg), was from 32.2% on day 4 to 85.4% on day 12 and 92.1% to 100% from day 14 to day 20, respectively, the effect was better than in control groups.

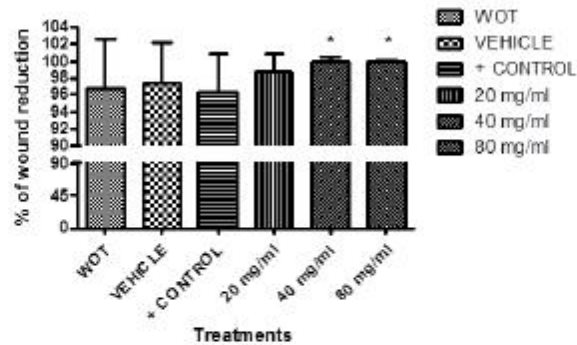


Figure 1: Wound closure rate. Percentage of wound reduction at 15 days post-wound healing in wounds without treatment (WOT), wounds treated with hydrogel (vehicle), wounds treated with KitosCell (+control), and wound treated with 20, 40 and 80 mg/ml of ME-H respectively, * $p < 0.05$.

Histopathology changes induced by metatera extract: Due ME-H improve the wound closure, we analyzed the histopathology changes induced by this plant at 15 days; at this time, all wounds showed the presence of fibroblast and reduction of inflammatory cells. In WOT, vehicle, + control, and 20 mg/ml ME-H, the epidermis was not clearly formed, while in 40 and 80 mg/ml ME-H the epidermis was obvious (**Figure 2. upper panel**). Harish *et al.*,¹³ evaluated lupeol isolated from the *Paniculatus celastrus* extract, they found that lupeol at 8 mg/ml has a wound healing activity, it stimulated reepithelization, with increase in granulation tissue and collagen. Moreover, in our work, groups treated with ME-H at 40 and 80 mg/ml showed large and orientated fibroblast into the tissue (**Figure 2. Upper panel**).

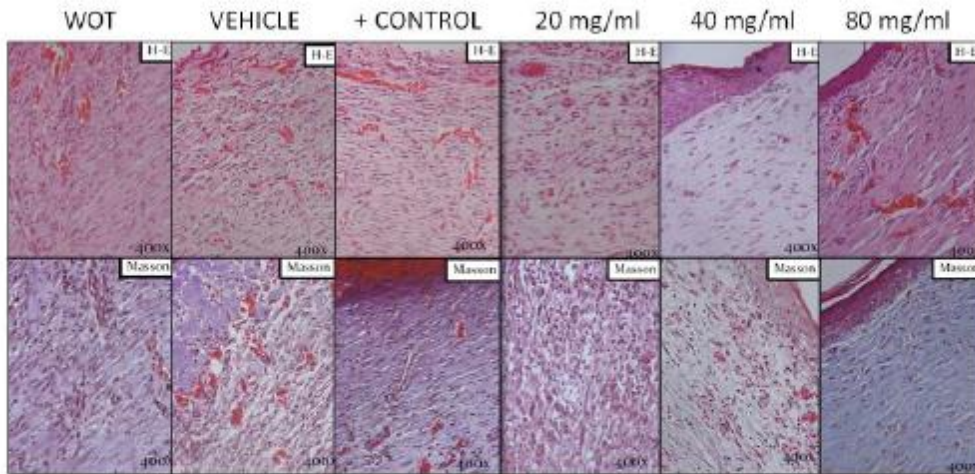


Figure 2: Histopathology analysis. Representative photomicrographs of H&E (upper panel) and Masson's trichome (lower panel) staining at 15 days post-wound healing in wounds without treatment (WOT), treated with hydrogel (vehicle), treated with KitosCell (+control), and treated with 20, 40 and 80 mg/ml of ME-H.

Metatera extract modulate collagen arrangement: Furthermore, collagen is a major protein of the extracellular matrix and is the component that contributes to wound strength. Interestingly, analysis of collagen content showed that healings treated with 80 mg/ml ME-H displayed mature collagen fibers, which had a better arrangement in comparison with the other groups. Although the + Control group also showed oriented collagen fibers, this collagen was immature. In the other groups collagen fibers was disorganized and immature (Figure 2. lower panel). These findings suggest that the 80 mg/ml ME-H induce deposition, maturation and better arrangement of collagen fibers. The decreased collagen content in the other groups might be due to prolonged inflammatory phase, where the degradation of collagen is more important than the synthesis *per se*¹⁴. Healings treated with *Acalypha indica* extract exhibited dense and parallel arrangement of thick collagen fibers on day 14 in comparison with control groups in which undifferentiated keratinocytes and irregular packing of collagen fibers were found¹⁵. However, assessment of collagen content in wound tissues from control and the ME-H treated groups did not show an augment in total collagen in comparison with controls groups (Figure 3). These results suggest that ME-H improve wound closure regulating different cell and molecular pathways in early phases of the process.

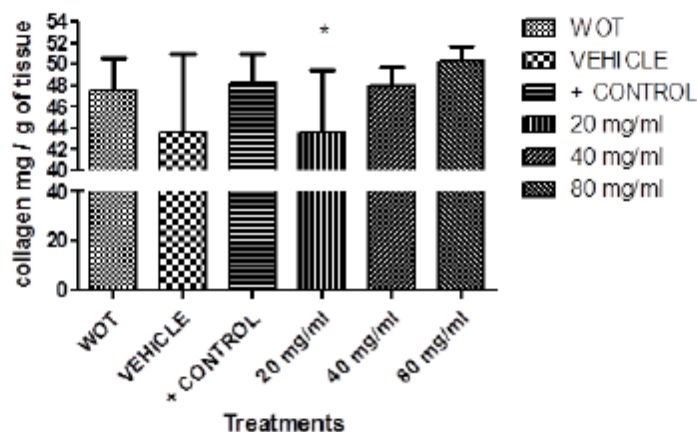


Figure 3: Total content of collagen mg/ g of tissue determinate by hydroproline measure. at 15 days post-wound healing in wounds without treatment (WOT), wounds treated with hydrogel (vehicle), wounds treated with KitosCell (+control), and wound treated with 20, 40 and 80 mg /ml of ME-H respectively * $p < 0.05$.

CONCLUSIONS

Metatera extract included in a hydrogel for topical application, clearly improve wound closure, these two concentrations induced different cellular events, such as the maturation and arrangement of fibroblast, the re-epithelialization enhanced, the modulation of collagen fibers arrangement. The result of the present study supported the ethnobotanic use of this plant for healing of wound in Mexico. Further experiments currently under study let us know the metabolites responsible of the healing effect, and the cellular and molecular pathways induced by this extract.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is funded by the ICyT project and SIP-IPN given to C.G.C and G.P.I.

REFERENCES

1. A. Singer and R. Clark. Cutaneous Wound Healing. *N. Engl. J Med*, 1999, 341(10):738-746.
2. R. Clark, K. Ghosh and M. Tonnesen. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(October 2006):1018–1029.
3. B. Kumar, M. Vijayakumar, R. Govindarajan and P. Pushpangadan, Ethnopharmacological approaches to wound healing-exploring medicinal plants of India. *J. Ethnopharmacol.*, 2007, 114:103–13.
4. G. Blazso, M. Gábor, F. Schönlau and P. Rohdewald. Pycnogenol accelerates wound healing and reduces scar formation. *Phytother Res.* 2004, 18: 579-581.
5. A. Hidalgo. Determinación del efecto cicatrizante del extracto acuoso de la planta *Bacopa procumbens* en la línea celular 3T3 de fibroblastos de ratón. Tesis de Maestría en Biomedicina Molecular. ENMH IPN. 2010.
6. D. Prockop and S. Underfriend. A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissues and urine. *Anal. Biochem*, 1960,1: 228-239.
7. P. Muriel and R. Deheza. Fibrosis and glycogen stores depletion induced by prolonged biliary obstruction in the rat are ameliorated by metadoxine. *Liver Int.*, 2003, 23: 262-268.
8. X. Liu, P. Lee, C. Ho, V. Lui, Y. Chen, C. Che and K. Wong. Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing. *ChemMedChem.*, 2010, 5(3):468–75.
9. P. Martini, C. Mazzatenta and G. Saponati. Efficacy and tolerability of fitostimoline in two different forms (soaked gauzes and cream) and citrizan gel in the topical treatment of second-degree superficial cutaneous burns. *Dermatol. Res. Pract.*, 2011, 2011: 978291.
10. T. Lau, Y. Chan, C. Lau, C. Chan, C. Lau, K. Fung and Y. Ho. Investigation of the Effects of Chinese Medicine on Fibroblast Viability: Implications in Wound Healing. *Phytother Res.*, 2007, 21(10):938–947
11. T. Lau, F. Lam, K. Lau, Y. Chan, K. Lee, D. Sahota and C. Lau. Pharmacological investigation on the wound healing effects of *Radix Rehmanniae* in an animal model of diabetic foot ulcer. *J. Ethnopharmacol*, 2009, 123(1):155-62.
12. S. Murthy, M. Gautam, S. Goel, V. Purohit, H. Sharma and R. Goel. Evaluation of in vivo wound healing activity of *Bacopa monniera* on different wound model in rats. *Biomed Res. Int.*, 2013, 2013:972028.
13. B. Harish, V. Krishna, H. Santosh Kumar, B. Khadeer Ahamed, R. Sharath and H. Kumara Swamy. Wound healing activity and docking of glycogen-synthase-kinase-3-beta-protein with isolated triterpenoid lupeol in rats. *Phytomedicine*, 2008, 15(9):763–7.

14. S. Sasidharan, S. Logeswaran and L. Latha. Wound Healing Activity of *Elaeis guineensis* Leaf Extract Ointment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, 13:336–47.
15. M. Ganeshkumar, T. Ponrasu, R. Krithika, K. Iyappan, V. Gayathri and L. Suguna. Topical application of *Acalypha indica* accelerates rat cutaneous wound healing by up-regulating the expression of Type I and III collagen. *J. Ethnopharmacol.*, 2012, 142 (1):14–22.

* Corresponding author: David Guillermo Pérez Ishiwara;
Biomedicine Molecular Laboratory, ENMyH-IPN, Mexico;
ishiwaramx@yahoo.com.mx

12.2.2. Artículos enviados

1. Topical administration of *Bacopa procumbens* extract modulate wound healing process in an excisional rat model
2. *In vitro* wound healing effect of *Bacopa procumbens* Green Mill extract
3. Improved cutaneous wound healing using phytochemical conjugated of gold nanoparticles

17-Nov-2017

JID-2017-0974 - Topical administration of *Bacopa procumbens* extract enhance wound healing process in an excisional rat model

by MARTÍNEZ-CUAZITL, ADRIANA; Gómez García, Ma. del Consuelo; SÁNCHEZ MONROY, VIRGINIA; ROJAS LÓPEZ, MARLON; MARTÍNEZ SÓLIS, JÉSUS ARIEL; PÉREZ SOTO, ELVIA; Paz Bermudez, Francisco Javier; PEREZ-ISHIWARA, DAVID GUILLERMO

Dear Author:

Dr. DAVID GUILLERMO PEREZ-ISHIWARA has submitted a manuscript entitled "Topical administration of *Bacopa procumbens* extract enhance wound healing process in an excisional rat model" to the Journal of Investigative Dermatology. You are receiving this email because you are listed as an author on this submission. The author list is as follows:

MARTÍNEZ-CUAZITL, ADRIANA; Gómez García, Ma. del Consuelo; SÁNCHEZ MONROY, VIRGINIA; ROJAS LÓPEZ, MARLON; MARTÍNEZ SÓLIS, JÉSUS ARIEL; PÉREZ SOTO, ELVIA; Paz Bermudez, Francisco Javier; PEREZ-ISHIWARA, DAVID GUILLERMO

The manuscript has been assigned the tracking number JID-2017-0974. You can keep track of your manuscript by logging on to Manuscript Central

(<https://nam03.safelinks.protection.outlook.com/?url=http%3A%2F%2Fmc.manuscriptcentral.com%2Fjid&data=02%7C01%7Cadyta0%40hotmail.com%7Cd0ba6ad12d624b5f42d808d52db6bc21%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C636465185216517823&sdata=xq2niC3%2FqfLDd3d0aWdJ%2BH%2F0IkIZmW5tIFaGl8IDTUU%3D&reserved=0>), where the status will be displayed in your Author Center. It will appear under the "Manuscripts I Have Co-Authored" tab.

All future correspondence about the review process will be directed to the contact author, Dr. DAVID GUILLERMO PEREZ-ISHIWARA. If you have any questions about the status of the manuscript, please contact Dr. DAVID GUILLERMO PEREZ-ISHIWARA.

Thank you for submitting your work to The Journal of Investigative Dermatology.

Sincerely,

Journal of Investigative Dermatology
Editorial Office

Topical administration of *Bacopa procumbens* extract enhance wound healing process in an excisional rat model

A. Martínez-Cuazitl¹, M.C. Gómez García¹, V. Sánchez Monroy¹, M. Rojas López², J.A. Martínez Solis¹, Francisco Javier Paz Bermudez³ E, Pérez-Soto¹, D.G. Pérez Ishiwara¹*

1. Biomedicine Molecular Laboratory, ENMyH-Instituto Politécnico Nacional

2. Research Center for Applied Biotechnology- Instituto Politécnico Nacional

3. Center for research and advanced Studies- Instituto Politécnico Nacional

* Dr. David Guillermo Perez Ishiwara (Ph.D).

orcid.org/0000-0001-9368-3717

National Polytechnic Institute

Tel: 5255 57296000 ext 55534

e-mail: ishiwaramx@yahoo.com.mx

ABSTRACT

Healing of the skin wound is a complex process involving three overlapping phases: inflammatory, proliferative and remodeling. Nowadays, a topically effective medicine has not been developed. New alternatives have been sought for the treatment of wounds. Taking in consideration that plants represent important resources for the discovery of new active compounds, here we report the effect of topical administration of *Bacopa procumbens* extract in an incisional rat model. The aqueous extract of *Bacopa* accelerates wound closure in at least 48 h; reduce inflammation and increase the proliferative phase, increasing cell proliferation and deposition and organization of collagen in earlier times. These changes result in the formation of a scar with better tensile properties. Our results demonstrated that in the initial phase *Bacopa* extract induces: i) overexpression of transforming growth factor beta (TGF- β); and ii) the phosphorylation of Smad 2/3 and ERK1/2, suggesting the activation of TGF- β .

INTRODUCTION

Wound healing is a highly ordered and synchronized process; tissue repair progresses sequentially through three overlapping phases: inflammatory, proliferative and remodeling; this process requires different cell types, cytokines; growth factors and interaction with the extracellular matrix (ECM) (Singer and Clark., 1999; Baum *et al.*, 2005; Gurtner *et al.*, 2008; Kwan *et al.*, 2011).

Transforming growth factor beta (TGF- β) is a crucial cytokine during wound healing, has widespread effects on cell growth, differentiation, migration and deposition of extracellular matrix, regulation of inflammation and the promotion of connective tissue regeneration (Border *et al.*, 1992; Verrecchia and Mauviel, 2002, Zheng *et al.*, 2011). De-regulation of TGF- β produce abnormal wound healing, including scar formation. TGF- β stimulate Smad proteins and Smad-independent signal transducers such as mitogen-activated protein kinases (MAPK), implicating it in the pro-fibrotic effects of this factor (Massague *et al.*, 2005, Verrecchia *et al.*, 2007).

However, today, no topically effective medication has been developed to prevent abnormal wound healing. New alternatives have been sought for the treatment of wounds. Nowadays, the additional trend to the use of pharmaceutical herbs occurs due to fewer side effects and effective compounds. In Mexico, different ethnic groups in the state of Hidalgo have used *Bacopa procumbens* (Mill) Green to treat skin wounds (Molina, 2007). We have demonstrated *in vitro* that *Bacopa procumbens* extract induced proliferation of fibroblasts, migration, and adhesion (*). However, the *in vivo* effect on the healing process of wounds and the molecular mechanism involved in it have not been explored. The present investigation was conducted to evaluate the efficacy of *Bacopa procumbens* in the treatment of wound healing in the skin. The study determined the morphometric, histological and mechanical effects as well as the molecular effectors and signaling pathways induced by *B. procumbens* in an excisional rat model *in vivo*.

RESULTS

Macroscopic analysis of wound healing showed improved wound reduction at all monitored times in animals treated with *Bacopa procumbens* extract as compared to WOT animals or animals treated with a control product used for wound care, KitosCell (KC). On day 0 in all groups, the wounds were almost the same. At day 3, wounds WOT and the treated with KC wounds were larger compared to the wounds treated with *Bacopa*, presenting fine scabs (Figure 1a). On days 5 and 7, WOT and wounds treated with *Bacopa* showed a moderate scab, while in the KC group the scab was prominent, at this time the area of wound reduction was evident in the *Bacopa* group compared to other groups (Figure 1a). Comparison of the wound reduction area of each group (Figure 1b) showed that reduction of the wound area to 50% was achieved in the WOT and KC groups on days 6 and 7 respectively, while the animals treated with 160 mg/ml *Bacopa* extract achieved the same reduction on day 4, suggesting that *Bacopa* treatment accelerates wound closure by at least 48 h (Figure 1b).

The lesions at 3, 5 and 7 days after the injury were removed for histopathological analyzes. At day 3, WOT and KC groups showed significant edema and fibrin, infiltration of mononuclear cells and few fibroblasts. On the other hand, wounds treated with *Bacopa* extract had less edema and fibrin; the infiltration of mononuclear and polymorphonuclear cells and the presence of disorganized fibroblasts was evident (Figure 2a). After 5 days, wounds from all groups showed less edema; in the WOT and KC controls, we found a significant amount of disorganized fibroblasts and some collagen fibers. However, in wounds of animals treated with *Bacopa*, we observed a greater quantity of elongated fibroblasts and a better organization of collagen fibers (supplement of figure 1). On day 7, wounds from all groups showed a remarkable amount of fibroblasts and a substantial reduction of inflammatory cells. In the WOT and KC groups, the collagen fibers were moderately organized. Interestingly, only in *Bacopa*

group, the collagen fibers were thicker and oriented perpendicularly (Figure 2b and supplement of Figure 1).

To determine the types of collagen in the ECM of the scar tissues, staining was performed with Picrosirius Red. Under polarized light microscopy, type III collagen, first produced by fibroblasts during wound healing, was found in greenish birefringence, whereas mature reticular collagen (type I collagen) is in yellow red (Velidandla et al., 2014). At day 3 both collagens were almost undetectable in the WOT and KC control groups, observing abundant interfibrillar spaces (figure 2b); while in wounds treated with *Bacopa* the greenish and yellow-red reticular signs were evident and detected in disorder (Figure 2b). Five days after wounding, the collagen fiber content increased in all groups, in the WOT and KC control groups the fibers were thin and still disorganized; while in wounds treated with *Bacopa* extract, both types of collagen increased, observing thicker and arranged fibers. After 7 days, collagen fibers tended to be better organized; in WOT the collagen fibers were still thin, whereas, with the treatment with KC, the fibers tend to be arranged in the dermis layer, constituting thicker collagen fibers composed of type I and type III collagens. Interestingly, in the wound treated with *Bacopa* extract, the deposition, and orientation of the collagen fibers were improved; the arrangement of the collagen fibers tended to be parallel to the surface of the wound and the fibers were stained mainly yellowish red, indicating that the coarse fibers are composed predominantly of type I collagen.

To determine the expression patterns of type I collagen, an immune-histochemical analysis (Figure 3a) was performed, the results showed that neither the WOT nor KC treated groups restored normal levels of type I collagen, but interestingly, after 5 days, *Bacopa* treatment restored almost normal levels of skin type I collagen (Figure 3a). Real-time quantitative RT-PCR assays showed in the WOT group that the levels of type I collagen mRNA increased, having a maximum expression after seven days; in the group

treated with KC, its expression was incipient at day 3, increasing slowly with the maximum levels until day 7. In contrast, the treatment with *Bacopa* generated the maximum levels of type I collagen at 5 days, and interestingly, in on day 7 collagen expression drops 1200 fold expression to 200 fold (Figure 3b).

To evaluate the mechanical properties of the scar, a tensile test was performed 24 days after the wound, after complete wound healing was achieved in all groups. The performance load represents the point of failure that is directly proportional to the physical strength of the healed skin. Wounds treated with KC showed a mechanical strength of 222.82 N/mm², whereas the scar treated with *Bacopa* had a mechanical force of 229,967 N/mm², representing an increase of 18.76% and 22.56%, respectively, of the values of WOT group (Figure 4a). These findings were correlated with collagen deposition and fiber alignment observed in the *Bacopa*-treated groups after 24 days (Figure 4b).

We then investigated the proliferative effect of *B. procumbens* extract on wound tissue by analyzing expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Figure 5a). PCNA expression slowly increases in WOT with maximal expression 7 days after wounding. In the KC group, the maximal expression was day 5, decreasing slightly on day 7. While, in the *Bacopa* treatment, the expression was improved earlier, on day 3; Interestingly, after five days, PCNA expression began to decline and by day seven was almost at basal levels of expression (Figure 5a).

To identify key molecular effectors and signaling pathways induced by *B. procumbens* extract that could modulate the changes observed, we performed immunohistochemistry and RT- qPCR analyses for TGFβ1, smad 2/3-p and ERK 1/2 -p. TGFβ1 protein expression (Figure 5b) reached the maximum expression levels at 7, 5 and 3 days in WOT, KC and *Bacopa* treatments, respectively. At day 7 the TGFβ1 expression was down-regulated in KC and *Bacopa* treated groups. On the other hand, analysis of TGFβ1 mRNA expression showed (Figure 5c) the highest values in WOT at day 5 decreasing suddenly

at day 7; while in KC group, TGF β 1 was not expressed at day 3, increasing slowly at day 5, having 4 folds maximal expression at day 7. In contrast, in *Bacopa* treated group, TGF β 1 mRNA expression augment 2 folds at day 3, having its maximal expression (4.5 fold) at day 5; but it was downregulated in comparison with the expression observed in WOT, and suddenly it was almost turned off at day 7 (Figure 5c).

TGF β activates the cascade signaling of canonical pathway mediated by Smads proteins which include the phosphorylation of Smad 2/3 (Xu 2009; Baum *et al.*, 2005; Massagué, 2005). Our results showed that smad 2/3 phosphorylated is expressed at day 3, 1.3 and 1.4 folds in KC and *Bacopa* treated groups respectively, in comparison to WOT group. At day 5, its expression increased in all groups and finally at day 7 its expression almost returned to the basal levels (Figure 6a).

TGF β also acts by an alternative pathway that involves the MAPK, which provokes ERK1/2 phosphorylation (Zhang, 2009). Our results showed in WOT that ERK 1/2 phosphorylated was remained at basal levels at day 3, while at days 5 and 7, its expression was slightly down-regulated. In KC group at days 3 and 5, it was expressed only 1.3 and 1,2 folds and it was downregulated at day 7. Interestingly, *Bacopa* increase the ERK 1/2 phosphorylated 1.7 folds at day 3, and its expression gradually goes down at day 5 (1.4 fold), returning almost to basal levels at day 7 (Figure 6b).

DISCUSSION

It has been discovered that medicinal resources obtained from plants play an important role in the management of skin disorders (Kumar et al., 2007, Abbasi et al., 2010); Our group has shown that *Bacopa procumbens* extract could stimulate the proliferation, differentiation, and migration of fibroblasts *in vitro* with a wound healing effect (*); This work was done to complete a gap knowledge on the improvement of wound healing *in vivo* and the mechanisms and molecular pathways exerted by

Bacopa extract. Our findings suggest that the *Bacopa procumbens* improves wound healing regulating the activation of key molecules such as TGF- β 1 and ERK 1/2 and the synthesis of collagen improving the mechanical properties of the scar.

Sharath et al., 2010, suggested that *B. monniera* extract (BME) and Bacosido-A compound reduce epithelization time and increase tensile strength in the incisional model *in vivo* after 10 days, by decreasing free radicals (Murthy et al., 2013). In addition, NF3 extract from *Radix astragali* and *Radix rehmanniae* improved the healing of diabetic wounds. NF3 in *in vitro* assays suggested a proliferation and angiogenesis effects that reduce NO production (Tam et al., 2011).

Here we show the wound healing activity of the *B. procumbens* extract using 160 mg/ml topically, demonstrating that the rate of wound reduction was faster (at least 48 h) compared to the WOT or KC groups, this effect was statistically significant at all times evaluated, suggesting that *Bacopa* has a roll in all three stages. Süntar et al., 2013 demonstrated that apigenin flavonoid improved wound healing after 12 days, whereas Sharath et al., 2010, using Bacoside-A isolated from *B. monniera* found that it improved healing after 16 days. Our results strongly suggest a better action of *B. procumbens* compared to other plant extracts or compounds using a similar excisional model. In addition, *Bacopa procumbens* also had a better effect than KitoCell drug used for wound care. Although *Bacopa* has been regulating the process since three days, the wound care effect of the commercial product (KC) was observed after seven days, corroborating that KC only regulates mainly the tissue remodeling phase. The wound healing process involves cell proliferation and extracellular matrix production, resulting in re-epithelialization (Murthy et al., 2013); we have shown here that the histological changes due to treatment with *Bacopa* were evident earlier in comparison to WOT or KC, showing a faster and better ECM deposition in the *Bacopa*-treated groups. During the wound healing process, type III collagen is the first to emerge; acts as a bridge to the wound later, type I collagen appears at the junction with type

III to construct a solid support (Nazac et al., 2015). We have demonstrated here by staining with Picro Sirius and by immune-histochemical methods that *Bacopa* extract improved the dynamics of collagen replacement, deposition, and arrangement from day 5 post-injury, the arrangement of type I collagen fibers tended to be parallel to the surface of the wounds, normal skin arrangement. Meanwhile, in the WOT or KC groups the collagen fibrils constituted mainly type III were aligned at random. Murthy et al. 2013, showed that after 10 days post-wound "wound incision model", rats treated with *B. monniera* extract increased the hydroxyproline content, relating it to the total collagen content, but did not demonstrate the disposition of collagen. The correct distribution of collagen in the skin contributes to restoring skin functionality and strength of rupture (Kwan et al., 2011). We found here that after 24 days of wounding, the tensile strength within the scar increased by 22.56% in the group treated with *Bacopa* compared to WOT, which also suggests better functional performance. *Acalypha indica* has been shown to have flavonoids and glycosides that accelerate wound contraction and increased tensile strength due to increased collagen deposition during the day 10 post-wound (Ganeshkumar et al., 2012), suggesting that this type of metabolites also present in our extract could be responsible for the effects of the wound. In parallel, we searched for the proliferative effects by measuring PCNA expression, our results suggest that *Bacopa* improved cell proliferation in earlier times, while it is downregulated in the late phase, suggesting that *Bacopa* modulates the proliferative process in the replacing tissue, avoiding excess dermal fibrosis and scarring, which are known to produce hypertrophic and keloid scars (Landén, Li, and Stahle, 2016). This reduction of the proliferative effect in the late phase could be related to the reduction of the inflammatory phase in the group treated with *Bacopa*, correlating with the induction of collagen synthesis at day 3.

TGF β represents a key molecule that regulates many events around the complete wound healing process (Finsson et al, 2013; Brunner et al.,2004), we evaluated it, showing that *Bacopa* treatment

stimulates an earlier expression of TGF β 1, however, its expression is turned off during resolution phase. Zhang et al. 2012, have suggested by *in vitro* studies that extract from *Radix astragali* and *Radix rehmanniae* induced overexpression of TGF β 1. Suh et al., in 2003 reported that some synthetic triterpenoids could mimic TGF β 1 action in macrophages, activating the Smad2 pathway. Using specific IHCs assay, our results suggested that *Bacopa* extract activated both TGF β 1 pathways, the canonical activating Smad2/3 complex, and ERK 1/2 phosphorylation; this complex regulated cell proliferation and differentiation, cytoskeletal structure, apoptosis and other biological reaction (Hug et al., 2011, Zhang, 2009). Kim et al. 2017, showed *in vitro* that *S. chamaejasme* extract (SCE) induced the proliferation of keratinocytes by activating ERK and Akt signaling; this extract also induced mRNA expression of collagen type I and III *in vitro*, suggesting that these pathways were involved in the wound healing activity. *In vivo* results demonstrated that *Bacopa* treatment regulates ERK 1/2 activation in earlier phases, similarly as the TGF β 1 expression, strongly suggesting that *Bacopa* components could activate MAPK pathway, resulting in the improvement of wound healing effects; our results were in concordance with Kim findings, even though they only showed ERK activation in *in-vitro* model. The specific interaction between *Bacopa procumbens* components and its putative receptor(s) is currently in progress. Also, works in progress are a focus on the identification and purification of the active compound (s) underlying wound healing effect.

CONCLUSION

All the results presented here, suggest that *Bacopa* extract treatment improve wound healing process regulating more than one event of different wound phase process, reducing the inflammatory phase, modulating TGF β 1 action, modulating proliferative effect, enhancing collagen synthesis and deposition, resulting in an optimal mechanical proprieties of scar tissue repaired.

MATERIALS AND METHODS

Animals

220-240 g male Wistar rats were maintained at 26°C under 12:12 hours light/dark cycle. Animal received chow and water *ad libitum*. The ethics committee of ENMyH postgrad section approved the experimental procedure of this study.

Preparation of aquoethanolic extract and hydrogel formulation

The *Bacopa procumbens* (Mill) Greenm plant was harvested from the state of Hidalgo, Mexico; and identified with the voucher specimen (record number 1972, Herbolaria IZTA-Flora Útil-UAM). The aquoethanolic extract was previously standardized and characterized by Hidalgo, 2017 (*). Briefly, phytochemical investigations performed by our group revealed the presence of coumarins, saponins, flavonoids, quinine and terpenoids (*). The aquoethanolic extract was included in a hydrogel (water, carbopol 0.7%, glycerin (1%), hydantoin, methylchloroisothiazolinone, and methylisothiazolinone (0.2%) and triethanolamine (1%)) at 160 mg/ml final concentration.

***In vivo* skin wound model**

The animals were divided into three randomized groups: untreated group (WOT), control group using a wound care product, KitosCell (Cellpharma) (KC) and the experimental group treated with 160 mg/ml *B. procumbens* extract. The animals were anesthetized, the dorsal region was harvested and four

complete thickness excision surgeries of 1 cm² were performed. The wounds were treated topically, 100 µl of KC or extract of *Bacopa* hydrogel was applied daily to each wound. Animals were sacrificed at 3, 5, 7 and 24 days after injury. Six rats were used for each experimental time examined.

Morphometric analysis

The healings were observed, photographed and measured immediately after surgery and at 3, 5 and 7 days using a Vernier caliper to calculate the percent reduction of wounds.

Histopathological analysis of wound tissue

At 3, 5 and 7 days, wound lesions were removed with adjacent healthy skin, fixed in 4% buffered paraformaldehyde; embedded in paraffin and with a thickness of 5 mm sectioned. Sections were stained with hematoxylin/eosin and staining with Trichome Masson, using a standard protocol (Suvik A. and Effendy A, 2012). Finally, the samples were analyzed and photographed using the Olympus DP74 system (Olympus, Tokyo, Japan).

Tensile test

At 24 days after the injury, the skin tissue was cut with a dumbbell shape using a custom-made metal template. The tensile test was performed using the Texture Analyzer ta-xt2/1 (Stable Microsystems, Vienna Cour, England) with a 100N load cell at a constant strain rate of 1 mm/sec

Determination of Collagen types by PicroSirus Red stain

Sections of wound lesions (5 µm) were stained with PicroSirus-Red reagent (Abcam, USA) according to manufacturer instructions, and then the tissues were observed and photographed using a polarizing light microscope (Nikon, Tokio, Japan).

Immunohistochemistry

Sections of wound lesions (5 µm) and non-damaged skin from the same location (normal skin) was deparaffinized and rehydrated as described previously (Ocadiz et al., 2008). Protein detection was

performed using the PolyDetector HRP / DAB Mouse / Rabbit Detection System (Bio SB, USA). Tissues were rinsed with PBS and epitope retrieval was performed in a pressure cooker using the Immuno Retrивever Citrate Solution (Bio SB, USA). Slides were cooled at room temperature and incubated in Peroxidase Block quenching buffer (Bio SB, USA) for 20 min to block endogenous peroxidase activity. After sections were washed with PBS, nonspecific binding sites were blocked for 30 min with BSA, Cohn fraction V, pH 7.0; then, sections were incubated 16-18 h at 4 °C with primary antibodies: mouse monoclonal anti-Collagen type I (Calbiochem, USA); PCNA (Santa Cruz Biotechnology, USA); TGFβ1(Santa Cruz Biotechnology, USA); Smad 2/3-p (Santa Cruz Biotechnology, USA) and ERK1/2-p (Santa Cruz Biotechnology, USA) all diluted 1:100. Following three washes with PBS, samples were incubated for 30 min with secondary antibody (PolyDetector HRP label; Bio SB, USA), counterstained with hematoxylin and mounted in GVA-mount reagent (Zymed, USA). Negative controls without primary antibody were carried out. The slides were observed and photographed using the Olympus system. Quantification of expression protein was performed by pixel measure using the Image-Pro Premier software (Media Cybernatics, Inc. USA).

Quantitative real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from unwound and wound tissues using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, USA). For reverse transcription SuperScript II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, USA) was used in order to obtained cDNAs for qRT-PCR assays. Primers used for qRT-PCR were: collagen type I 900nM forward 5'-CAACCTGGATGCCATCAAGG-3' and reverse 300 nM 5'-ATCGGTCATG-CTCTCTCCAAA-3'; TGFβ1 900nM forward 5'-GCAGTGGCTGAACCAAGGAG-3' and 300nM reverse 5'-TCGGTTCATGTC-ATGGATGG-3', GADPH 50nM forward 5'-CACCACCAACTGCTTAGCCC-3' and reverse 50nM 5'-

TCTGAGTGGCAGTGATGGCA-3'. All reactions were performed using SYBR-Green PCR master mix (Applied Biosystems, USA) in 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). As an internal control, glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) was used in parallel to the target genes. Normalization and fold changes were calculated using $\Delta\Delta C_t$ method. Each sample was assessed by independent triplicates.

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical significance was analyzed using ANOVA post hoc Turkey's test. All analyses were performed using Graph Pad Prism software version 7.0.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the ICyT project, SIP-IPN, and innovación-IPN given to C.G.C and G.P.I. We would like to acknowledge Dr. José Pérez González of ESFM for the use of Nikon Eclipse LV100 microscope.

REFERENCES

- Abbasi, A. M. *et al.* (2010) 'Ethnopharmacological application of medicinal plants to cure skin diseases and in folk cosmetics among the tribal communities of North-West Frontier Province, Pakistan', *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier Ireland Ltd, 128(2), pp. 322–335. doi: 10.1016/j.jep.2010.01.052.
- Baum, C. L. and Arpey, C. J. (2005) 'Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and

molecular events', *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]*, 31(6), p. 674–86; discussion 686. doi: 10.1111/j.1524-4725.2005.31612.

Border, W. A. and Ruoslahti, E. (1992) 'Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair.', *Journal of Clinical Investigation*, 90(1), pp. 1–7. doi: 10.1172/JCI115821.

Brunner, G. and Blakytyn, R. (2004) 'Extracellular regulation of TGF- β activity in wound repair: Growth factor latency as a sensor mechanism for injury', *Thrombosis and Haemostasis*, 92(2), pp. 253–261. doi: 10.1160/TH04-05-0324.

Finsson, K. W. *et al.* (2013) 'Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring', *Advances in Wound Care*, 2(5), pp. 195–214. doi: 10.1089/wound.2013.0429.

Ganeshkumar, M. *et al.* (2012) 'Topical application of *Acalypha indica* accelerates rat cutaneous wound healing by up-regulating the expression of Type I and III collagen', *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier, 142(1), pp. 14–22. doi: 10.1016/j.jep.2012.04.005.

Gurtner, G. C. *et al.* (2008) 'Wound repair and regeneration', *Nature*, 453(7193), pp. 314–321. doi: 10.1038/nature07039.

Huh, J. E. *et al.* (2011) 'Formononetin accelerates wound repair by the regulation of early growth response factor-1 transcription factor through the phosphorylation of the ERK and p38 MAPK pathways', *International Immunopharmacology*. Elsevier B.V., 11(1), pp. 46–54. doi: 10.1016/j.intimp.2010.10.003.

Kim, M. *et al.* (2017) 'Stellera chamaejasme and its constituents induce cutaneous wound healing and anti-inflammatory activities', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(February), p. 42490. doi: 10.1038/srep42490.

Kumar, B. *et al.* (2007) 'Ethnopharmacological approaches to wound healing-Exploring medicinal plants of India',

Journal of Ethnopharmacology, 114(2), pp. 103–113. doi: 10.1016/j.jep.2007.08.010.

Kwan, K. H. L. *et al.* (2011) 'Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing', *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. Elsevier Inc., 7(4), pp. 497–504. doi: 10.1016/j.nano.2011.01.003.

Landén, N. X., Li, D. and Ståhle, M. (2016) 'Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(20), pp. 3861–3885. doi: 10.1007/s00018-016-2268-0.

Lau, T. W. *et al.* (2009) 'Pharmacological investigation on the wound healing effects of Radix Rehmanniae in an animal model of diabetic foot ulcer', *Journal of Ethnopharmacology*, 123(1), pp. 155–162. doi: 10.1016/j.jep.2009.02.010.

Liu, M. *et al.* (2014) '12-hydroxyheptadecatrienoic acid promotes epidermal wound healing by accelerating keratinocyte migration via the BLT2 receptor', *The Journal of Experimental Medicine*, 211(6), pp. 1063–1078. doi: 10.1084/jem.20132063.

Massagué, J., Seoane, J. and Wotton, D. (2005) 'Smad transcription factors', *Genes and Development*, 19(23), pp. 2783–2810. doi: 10.1101/gad.1350705.

Molina, M. J. (2007). Plantas Medicinales y Listado florístico Preliminar del Municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N. México, D.F. 97 pp.

Nazac, A. *et al.* (2015) 'Optimization of Picrosirius red staining protocol to determine collagen fiber orientations in vaginal and uterine cervical tissues by Mueller polarized microscopy', *Microscopy Research and Technique*, 78(8), pp. 723–730. doi: 10.1002/jemt.22530.

S. Murthy, M. K. Gautam, ShaliniGoel, V. Purohit, H. Sharma, and R. K. G. (2013) 'Evaluation of In Vivo Wound Healing Activity of Bacopa monniera on Different Wound Model in Rats', *Indian Journal of Pharmacology*, 2013. doi: 10.5455/2319-2003.ijbcp20150225.

- Sharath, R. *et al.* (2010) 'Wound healing and protease inhibition activity of bacoside-A, isolated from *Bacopa monnieri* Wettst', *Phytotherapy Research*, 24(8), pp. 1217–1222. doi: 10.1002/ptr.3115.
- Singer, A. J. and Clark, R. A. F. (1999) 'Cutaneous wound healing', *New England Journal of Medicine*, 341(10), pp. 738–746. doi: doi:10.1056/NEJM199909023411006.
- Stevenson, P. C. *et al.* (2002) 'Wound healing activity of acylated iridoid glycosides from *Scrophularia nodosa*', *Phytotherapy Research*, 16(1), pp. 33–35. doi: 10.1002/ptr.798.
- Suh, N. *et al.* (2003) 'Synthetic triterpenoids enhance transforming growth factor beta/Smad signaling', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 63(6), pp. 1371–1376. Available at: <http://pm>.
- Süntar, I. *et al.* (2013) 'Exploration of the wound healing potential of *Helichrysum graveolens* (Bieb.) Sweet: Isolation of apigenin as an active component', *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier, 149(1), pp. 103–110. doi: 10.1016/j.jep.2013.06.006.
- Tam, J. C. W. *et al.* (2011) 'The in vivo and in vitro diabetic wound healing effects of a 2-herb formula and its mechanisms of action', *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier Ireland Ltd, 134(3), pp. 831–838. doi: 10.1016/j.jep.2011.01.032.
- Velidandla, S. *et al.* (2014) 'Histochemical analysis of polarizing colors of collagen using Picrosirius Red staining in oral submucous fibrosis.', *Journal of international oral health : JIOH*, 6(1), pp. 33–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3959134&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Verrecchia, F. and Mauviel, A. (2002) 'Transforming Growth Factor- β Signaling Through the Smad Pathway: Role in Extracellular Matrix Gene Expression and Regulation THE TGF- β SUPER-FAMILY, STRUCTURE AND ACTIVATION', *J Invest Dermatol*, 118, pp. 211–215. doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.01641.x.

Verrecchia, F. and Mauviel, A. (2007) 'Transforming growth factor- β and fibrosis', 13(22), pp. 3056–3062.

Worthington, J. J., Klementowicz, J. E. and Travis, M. A. (2011) 'TGF β : A sleeping giant awoken by integrins', *Trends in Biochemical Sciences*, 36(1), pp. 47–54. doi: 10.1016/j.tibs.2010.08.002.

Xu, J., Lamouille, S. and Derynck, R. (2009) 'TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition', *Cell Research*, 19(2), pp. 156–172. doi: 10.1038/cr.2009.5.

Yang, L. *et al.* (1999) 'Active transforming growth factor-beta in wound repair: determination using a new assay.', *The American journal of pathology*, 154(1), pp. 105–11. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65256-X.

Zhang, Q. *et al.* (2012) 'Herbal formula Astragali Radix and Rehmanniae Radix exerted wound healing effect on human skin fibroblast cell line Hs27 via the activation of transformation growth factor (TGF- β) pathway and promoting extracellular matrix (ECM) deposition', *Phytomedicine*. Elsevier GmbH., 20(1), pp. 9–16. doi: 10.1016/j.phymed.2012.09.006.

Zhang, Y. E. (2009) 'Non-Smad pathways in TGF- β signaling', *Cell Research*, 19(1), pp. 128–139. doi: 10.1038/cr.2008.328.

Zheng, Z. *et al.* (2011) 'Delayed Wound Closure in Fibromodulin-Deficient Mice Is Associated with Increased TGF- β 3 Signaling', *Journal of Investigative Dermatology*. Nature Publishing Group, 131(3), pp. 769–778. doi: 10.1038/jid.2010.381.

***In vitro* wound healing effect of *Bacopa procumbens* Green Mill extract**

Oriana Hidalgo-Alegria^a, David Guillermo Pérez-Ishiwara^a, Adriana Martínez-Cuazitl^a, Eduardo San Martín Martínez^b, Valentin López Gayou^c, Alejandro Zamilpa Álvarez^d, Olivia Medel Flores^a, María del Consuelo Gómez-García^{a*}

^a Biomedicine Molecular Laboratory, ENMyH- Instituto Politécnico Nacional, Mexico

^b Research Center of Applied Science and Advanced Technology-Legaria, Instituto Politécnico Nacional, Mexico

^c Research Center of Investigation of Applied biotechnology-Tlaxcala, Instituto Politécnico Nacional, Mexico

^d Centro de Investigación Biomédica del Sur (IMSS), Argentina No. 1 Xochitepec Morelos, México

***Corresponding author:** Biomedicine Molecular Laboratory, ENMyH- Instituto Politécnico Nacional, Mexico; Av. Guillermo Massieu Helguera 239, La Escalera, 07320 Ciudad de México, México.
consuelogg22@yahoo.com.mx

1. Introduction

Wound healing is a physiological dynamic complex process involving soluble mediators, blood cells, extracellular matrix and parenchymal cells (Adam 1999). This process involves three overlapping and synchronized inflammatory, proliferative, and remodeling phases (Rhett. 2008). During the healing process, many kinds of cells are recruited (Werner and Grose 2003). Fibroblasts that play a critical role in the process, proliferate from the wound margin and migrate into the provisional matrix composed of fibrin clot (Clark 1999; Hinz 201, Spyrou et al. 1998). Then, fibroblasts are differentiated to myofibroblast, expressing α -smooth muscle actine (α -SMA) (Hinz 2007). These specialized fibroblasts provide the force for wound contraction (Darby, 2007). The ideal wound treatment should accelerate healing process avoiding complications (Chen 2012). Diverse plant extract preparations have been used to accelerate wound healing processes since ancient times (Reddy et al., 2014; Reuter et al., 2008). Plants of Scrophulariaceae family have been studied and their beneficial wound healing effect have been reported. *Radix rehmanniae* and *Radix astragli* extracts induced Hs27 fibroblast proliferation in a dose dependent manner; umbilical vein endothelial cells migration; and anti-inflammatory activity (Wing Tam et al 2011, Lau et al., 2012); *Bacopa monnieri* extract has antioxidant proprieties *in vitro* and *in vivo* incisional model increasing tensile strength (Sharath et al. 2010 and Murthy et al. 2013). In Hidalgo state, Mexico, *Bacopa procumbens* Green Mill has been traditionally used for wound healing care (Molina, 2007); usually, the whole plant is boiled, and the infusion is used for external treatment. Due the importance of documenting the scientific basis of Mexican traditional medicine, the main goal of this study was to evaluate the effects of *Bacopa procumbens* extracts in the proliferation, differentiation and migration of 3T3 fibroblast in an *in vitro* model.

2. Material and methods

2.1 Plant material

The *Bacopa procumbens* (Mill.) Greenm plant was collected in San Miguel Regla, Hidalgo. Voucher specimens were deposited in the herbarium IZTA at the Facultad de Estudios Superiores Iztacala (voucher no. IZTA 1792). San Miguel Regla is in the municipality of Huasca de Ocampo which is located at 20° 21' to 20° 06' north and 98° 38' to 98° 27' west, 2100 m above sea level (INEGI, 1998; COEDE, 1999).

2.2 Preparation of plant material and extraction

Whole plant of *Bacopa procumbens* (Mill.) Greenm was dried and grinded, 40 g of this powdery were extracted with aquoethanolic solution 50:50 (600 ml) at 76°C for 4 h for three times using a reflux system (Dhanani, et al 2012). Total aquoethanolic extract (TAE) was obtained after removal of solvent under vacuum at 50°C. Using 10 g of HAE, secondary extractions were carried out, resuspending it in 100 ml each of water, hexane or chloroform for 2 h at room temperature. Then, each fraction was filtered and concentrated using a rotary evaporator under vacuum conditions to obtain aqueous (9.187g); n-hexane (0.61g) and chloroform (0.203 g) fractions, respectively. All dried extracts were stored at 4 °C for biological evaluation.

2.3 Phytochemical screening of the extract and fractions of *Bacopa procumbens*

The chemical constituents in the TAE and the fractions that presents the activity of proliferation, differentiation and migration of 3T3 fibroblast in an in vitro model were screening using chromatographic techniques, chemical protocols and methodologies as previously describes (Dominguez 1998).

2.4 HPLC analysis of the aqueous fraction

Chromatographic analysis was performed on a Waters 2695 Separation module system equipped with a Waters 996 photodiode array detector and Empower Pro software (Waters Corporation, USA). Chemical separation was achieved using a Supelcosil LC-F column (4.6 mm × 250 mm i.d., 5-µm particle size), (Sigma-Aldrich, Bellefonte, USA). The mobile phase consisted of 0.5% trifluoroacetic acid aqueous solution (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The gradient system was as follows: 0-1 min, 0% B; 2-4 min, 10% B; 5-7 min, 20% B; 8-14 min, 30% B; 15-18 min, 40% B; 19-22 min, 80% B; 23-26 min, 100% B; 27-28 min, 0% B. Initial flow rate conditions were maintained (0%B, 0.9 mL/min) during 29-30 min. The injection volume was 10 µL.

TLC analysis

Thin-layer chromatography was performed using TLC Silica gel 60 F254, aluminium sheets 20 x 20 cm (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

2.3. Cell culture

The mouse embryonic fibroblast cell line NIH 3T3 (3T3), obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), was grown in Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM), supplemented with 10 % heat inactivated Fetal Bovine Serum (FBS), penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 µg/ml). All media and supplements for 3T3 maintenance were obtained from Invitrogen. Cells were maintained at 37 °C, in a 5 % CO₂ humidified atmosphere, and passaged after being detached from culture dishes P60 with 0.05% trypsin and 0.002% EDTA solution. Cells at 80%–90% confluence were used for seeding and experiments

2.3. Cell viability assay

Murine fibroblasts 3T3 cells were seeded onto a 96-well plate at a density of 5×10^3 cells per well and grown for 24 h. Thereafter, the medium was removed and replaced with DMEM fresh medium supplemented with 2% SFB (C). 0.2% DMSO (v), 0.2 % hexane or 0.2% chloroform (Hx or chl) were used as TAE vehicle as solvent fractions control respectively. TAE and hexane, chloroform and aqueous

fraction were tested at 1, 10, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$; incubating it for 24, 48 and 72 h. then, 20 μl of MTT solution (5 mg/ml) was added to each well, incubating it for 4 h. The supernatants were removed and 100 μl of DMSO were added to each well to solubilize the formazan crystal. Absorbances were quantified at 570 nm using an ELISA reader (Labsytem Multiskan Ms). Experiments were performed by triplicate. The results were expressed as the percentage of cell proliferation with respect to control.

2.4. Cell adhesion assay

Ninety-six well plates were coated with serum purified fibronectin (10 mg/ml), incubated overnight at 4°C for 12 h and blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in phosphate buffered saline (PBS) at 4°C for 2 h. Fibroblasts (10^4 cells/well) were incubated with DMEM medium supplemented with 2% FBS and with different concentrations (1, 10, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$) of aqueous fraction during 30, 60, 120 and 180 min. After incubation, nonadherent cells were eliminated by PBS washing. Adhered fibroblasts were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min. Cells were stained with 0.1% crystal violet (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) for 10 min, washed with water and crystals were solubilized by 33% acetic acid glacial. The absorbance of samples was measured in an ELISA reader (Labsystem Multiskan MS) 570 nm wavelength.

2.5. *In vitro* scratch wound-healing assay

3T3 fibroblasts were seeded in 6-well plates and grown until reached a confluence of 90-95% were reached, using culture conditions described above; media was replaced by mitomycin (10 $\mu\text{g/ml}$) (MITOLEM, Leremy) supplemented medium for 2 h. The scratch wound assay was performed as previously described (Rodriguez et al., 2005). Briefly, in the middle of cell monolayer, a scratch was made by a P200 pipette tip, to mimic a wound, and cell debris were removed by PBS washing. Then, cultures were incubated with DMEM fresh medium (2% FBS) and with the different concentrations of

aqueous fraction (1, 10, 50, 100 and 200 µg/ml) for 48 h during 30, 60, 120 and 180 min. Scratch wound closure was analysed capturing microscope images.

2.6. Western blotting analysis

3T3 fibroblasts were seeded in P60 culture dishes (at density 2×10^4 per cm^2) for 24 h. Thereafter, the cells were treated with 50 µg/ml of the aqueous fraction for 24, 48 and 72 h, in 2% FBS fresh medium. The cells were then washed with PBS, harvested by trypsinization, centrifuged, and the pellets were re-suspended in ice -cold lysis buffer (10 mM/L Tris-HCL, 5 mM EDTA, 150 mM/L NaCl, 0.1 % SDS, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate containing a protease inhibitor cocktail (1 mml/L phenylmethyl sulfonyl fluoride, 100 µg/L leupeptin, and 2 µg/L aprotinin).

The protein lysates were centrifugated at 10,000 rpm for 10 min at 4°C to remove insoluble material and the protein concentration in the supernatant was determined using Bradford protein quantification assay. Protein lysates (30 µg) were subjected to electrophoresis on 10% SDS- polyacrylamide gels and transferred to 0.45 µm nitrocellulose membranes. The membranes were stained with 0.2 % Ponceau S red to ensure equal protein loading. After blocking with 5% milk in PBS- Tween, membranes were incubated with primary rabbit antibodies targeting α -SMA (1:200, Santa Cruz, CA), PCNA (1:200, Santa Cruz, CA) or β - actin (1:1500, Santa Cruz, CA) for 2 h. Membranes were finally incubated with horseradish peroxidase-conjugate secondary antibody (1:200), and the immunocomplexes were visualized by ECL Western blotting detection reagents. All experiments were performed by triplicate.

2.6. Statistical analysis

Statistical significance was analyzed using ANOVA post hoc Turkey's test. All analyses were performed using Graph Pad Prism software version 7.0.

Results

3.1. Effect of TEA aqueous, hexane and chloroform fractions on 3T3 proliferation

To determine the proliferation effect of TAE, aqueous, hexane and chloroform fractions, 3T3 cells were treated with 1, 10, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ each. Results showed that fibroblast proliferation increased using HAE in a dose-dependent manner at 24 and 48 h while at 72 h the proliferative effect diminished displaying at 100 $\mu\text{g/ml}$ 38%, 45% and 0% of proliferation respectively compared with a control (figure 1A). At the same concentration (100 $\mu\text{g/ml}$) the hexane fraction induced a proliferative increment of 18%, 40% and 30% at 24 and 48 and 72 h, respectively compared with a control (figure 1B). In contrast, the chloroform fraction only had a discrete effect displaying 1%, 20%, and 0% using 100 $\mu\text{g/ml}$ at the same evaluated times, at higher concentration inhibited fibroblast proliferation (figure 1C). Interestingly, the aqueous fraction had the highest fibroblast proliferation effect having the maximum effect between 100 $\mu\text{g/ml}$ and 200 $\mu\text{g/ml}$ displaying 65%, 92% at 24 and 48 h respectively, while at 72 h proliferation was lower (40%) (figure 1D).

Due the aqueous fraction showed the highest proliferative effect, the subsequent analyses were performed using this fraction. To corroborate the proliferative effect of the aqueous fraction, we evaluated PCNA expression by Western Blot assay. We found that this fraction induced PCNA relative expression increment, displaying 160, 210 and 200% at 24, 48 and 72 h, respectively. In comparison, control cells without treatment showed a delay in the PCNA expression displaying 100%, 155% at 24 and 48 h. While PCNA expression at 72h increased over 220% (figure 1E).

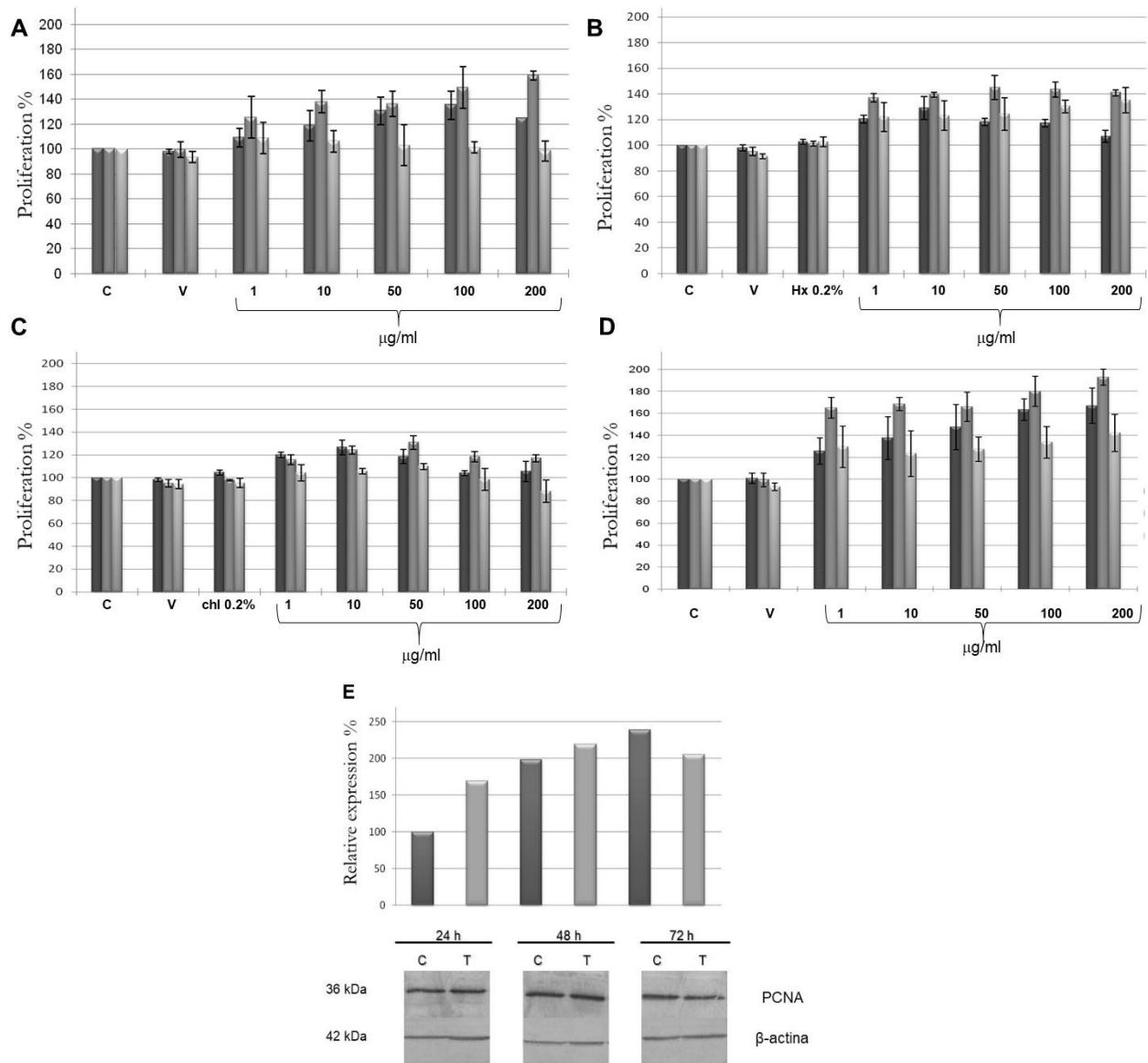


Figure 1. Proliferation effect of *Bacopa procumbens* on 3T3 fibroblast. Cell proliferation was evaluated by MTT assay in 3T3 cells, treated with 2% SFB supplemented media as control (C); DMSO vehicle (v), 0.2% hexane(Hx) or 0.2% chloroform (chl) as solvent controls for each respective fractions: TAE (A); hexane (B); chloroform (C); or aqueous (D) at 1, 10, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ for 24, 48 and 72 h. Total protein extracts from 3T3 fibroblast treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ of aqueous fraction was extracted and WB was carried out using anti-PCNA antibodies to analyse the PCNA expression (E).

3.4. Effect of aqueous fraction on 3T3 adhesion

To evaluate adhesion effect on 3T3 fibroblast cells were incubated into a fibronectin covered flasks and treated with 10, 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of aqueous fraction. The best observed effect was using 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of aqueous extract, displaying 125% increment of cell adhesion at 30 min (figure 2).

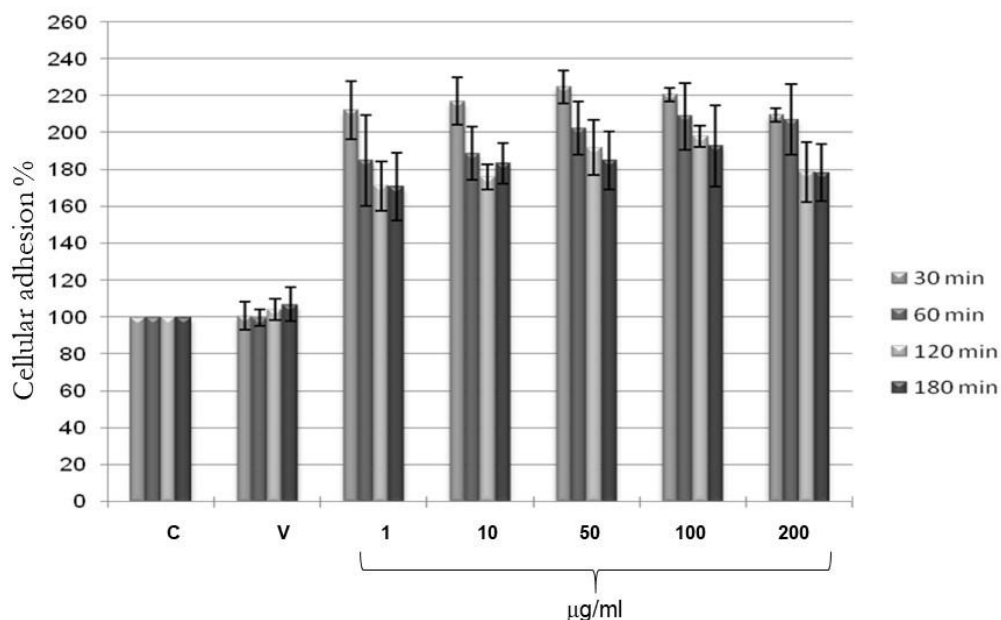


Figure 2. Adhesion effect of aqueous fraction of *Bacopa procumbens* on 3T3 fibroblast. Flasks were covered with serum fibronectin as described in methodology and later cells were treated with media 2% SFB supplemented as control (C), DMSO vehicle (v), and aqueous fraction using 1, 10, 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ at 30, 60, 120 and 180 min.

3.5. Effect of aqueous fraction on 3T3 *in vitro* wound healing

Wound healing effect of aqueous fraction was studied on murine fibroblast by *in vitro* scratch wound healing assay. The aqueous fraction induced fibroblast migration from 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ at 48 h, as shown in figure 3, while at higher concentrations, using 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, the migration was less evident.

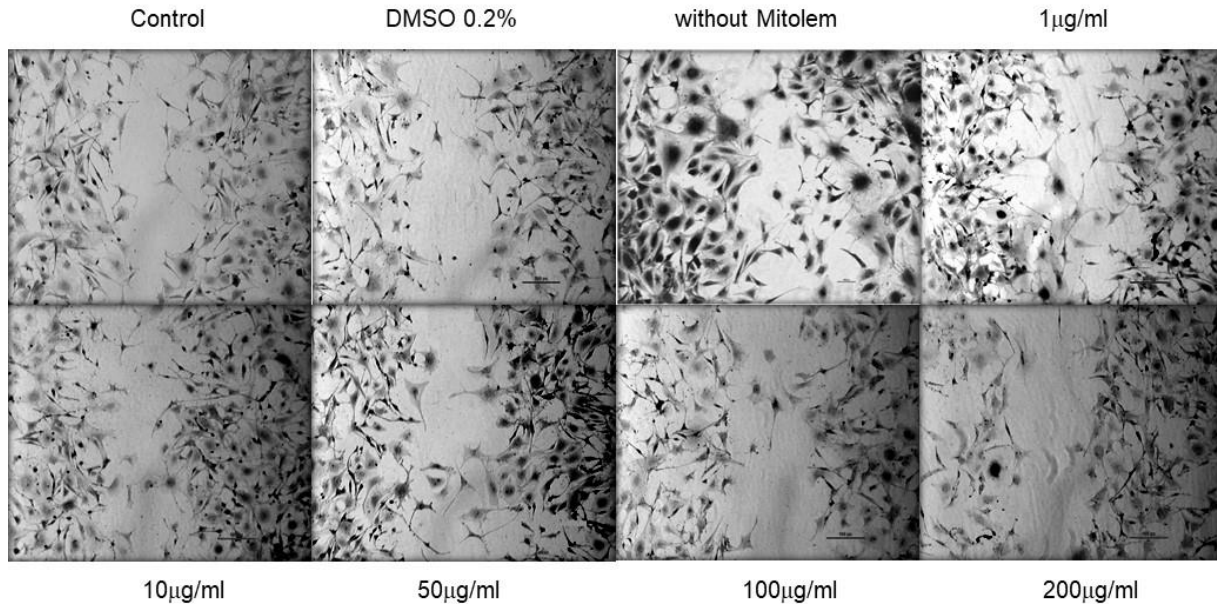


Figure 3. Migration effect of aqueous fraction from *Bacopa procumbens* on 3T3 fibroblast. Cells were treated 2% SFB supplemented media as control, 0.2% DMSO vehicle, and as positive control cells without Mitolelem treatment. Aqueous fraction at 1, 10, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ at 48 h.

3.6 Effect of aqueous fraction on 3T3 fibroblast differentiation

The differentiation of fibroblast was done evaluating the expression of α -SMA protein. Results showed that expression of α -SMA increased significantly after 48 h of aqueous extract incubation displaying a relative increment of about 100%. After that, it was down-regulated going back to basal levels at 72 h post incubation. This effect contrasted with its expression in the control group cultured only with DMEM medium supplemented with 2% FBS in which the maximum amount of α -SMA was detected after 72 h (figure 4), 24 h later than the fibroblast treated with aqueous extract of *Bacopa*.

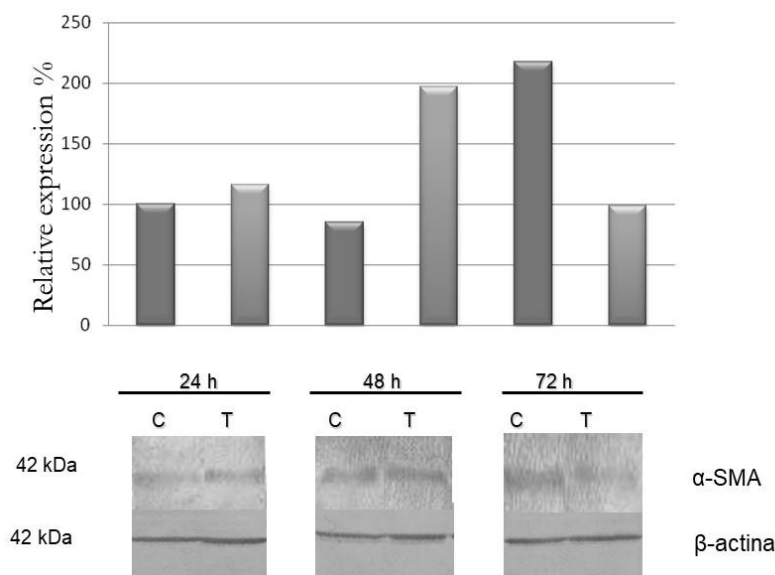


Figure 4. Myofibroblast differentiation measured by α -SMA protein detection. Cells were treated with 2% SFB supplementary media (C) or with 50 mg/ml of aqueous fraction (T) for 24, 48 and 72 h. Total protein extracts were prepared and analysed by WB for α -SMA expression.

3.1. Phytochemical screening of aqueous fraction of *Bacopa procumbens*

Phytochemical screening of aqueous fraction of *Bacopa procumbens* was carried out through HPLC. In the figure 5 we show the spectre of aqueous fraction observing four peaks in 4.46, 9.50, 10.01 and 10.33Minutes. In our case, the spectre shows us that the most abundant compounds in the aqueous fraction are of the polyphenolic type (derivatives of hydroxycinnamic acid).

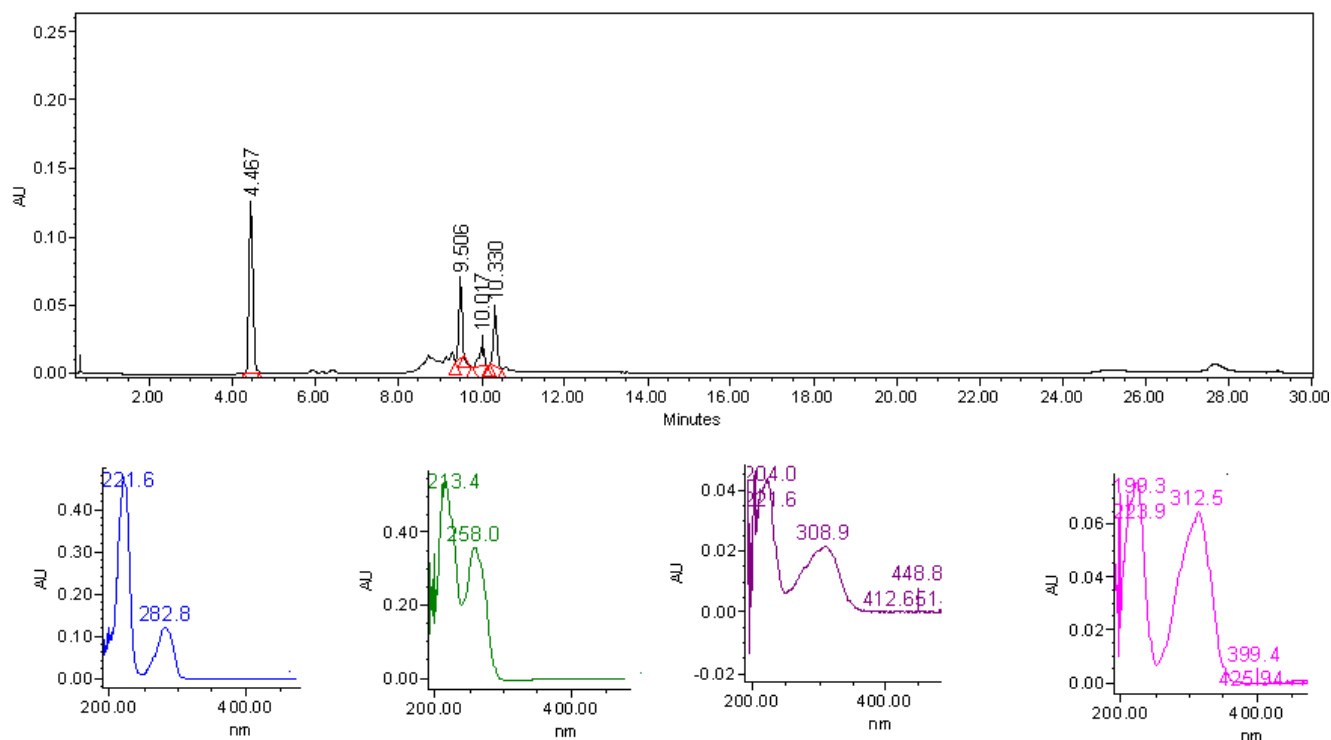


Fig. 4. Fingerprint of the F-Aq. Uv spectra of major compounds are related with phenolic derivatives ($\lambda=220, 282 \text{ nm}$; $213, 258 \text{ nm}$) and p-hydroxycinnamic derivatives ($\lambda= 204, 308; 223, 312 \text{ nm}$).

Identification of compounds present in the polyphenolic compounds was carried out by comparing their UV-vis spectra with available literature and retention times relative to available external standards as well as through peak spiking whenever possible to support the identification. In the figure 4 we can observe four spectra UV-Vis attributed to four different compounds. The first two spectra can be attributed to phenolic derivatives ($\lambda=220, 282 \text{ nm}$; $213, 258 \text{ nm}$) and the last two p-hydroxycinnamic derivatives ($\lambda= 204, 308; 223, 312 \text{ nm}$).

Of the phytochemical screening carried out to detect secondary metabolites present in aqueous fraction *Bacopa procumbens* using standard chemical reagents were the following compounds: flavonoids, polyphenols, coumarins, saponins and quinones.

4. Discussion

In recent years, interest in natural or herbal remedies has appeared, due it has been demonstrated that medicinal plants contains compounds that provide unique proprieties with less undesirable side-effects (Huie. 2002). Several plants and its derived products have been used in traditional medicine for empirical treatment of wounds (Agra et al. 2015). Ethnobotanical wound healing effect of *Bacopa procumbens* was reported by Molina in 2007. Here we standardized the extraction *Bacopa* chemical components using 50:50 ethanol:water v/v to evaluate the wound healing effect in a *in vitro* 3T3 fibroblast model. The characterization showed that the aqueous fraction of *B. procumbens* contains four major compounds are related with two phenolic derivatives and two p-hydroxycinnamic derivatives

Skin wound healing is an essential biological process that involves sequential steps to repair the damage tissue and to restore the function (Cordeiro and Jacinto, 2013). This process involves fibroblast cells proliferation (Song et al.,2017). Our results demonstrated by MTT assay and Western blot that the aqueous fraction specially at 50 µg/ml induced fibroblast proliferation at earlier times and this effect decreased in later times, suggesting a fine regulation of this process, considered as important factor in dermis regeneration (Freiesleben et al., 2017). Similar results were found with hydroalcoholic extract of *Plinia peruviana* at 100 µg/ml displaying a fibroblast proliferative effect at 24 h, that decreased after 48 h. Interestingly contrast with our result, *Plinia peruviana* extract at 200 µg/ml had a toxic effect (Pitz et al. 2016). We analysed the PCNA expression as a proliferative cell marker, it is known that this protein is expressed only in cells committed to DNA synthesis (Sidhu et al. 1999); Ki-67 also is a proliferative cell marker; Alerico et al. in 2015 showed that *Achyrocline satureioides* ethanolic extract using 1 µg/ml stimulated keratinocyte and fibroblast proliferation by MTT assay and by the Ki-67 expression but they do not show the effect after 24 h.

Cell – cell interaction and cell –matrix interaction is relevant in the wound healing process; in normal wound repair key molecules such as fibronectin, promotes cell adhesion and migration and serves as a binding site for a number of growth factors (Yamada, 2000, Johnson et al., 2017). We found here that aqueous fraction of *B. procumbens* improved cell adhesion at 30 min and interestingly after this time the adhesive effect decreased; in contrast with our results Raimoidin et al., 2000 showed that *Sedum telephium* and its polysaccharid fraction, inhibited cell adhesion in fibroblast, whereas the flavonoids fraction does not contribute to this effect. On the other hand, *Atropa belladonna L.* aqueous extract at 1% induces in human dermal fibroblast galectin and fibronectin expression, but did not stimulate any transition from fibroblast to myofibroblast (Gál et al., 2012). In tissue explants, Martino et al., 2017 demonstrated that *Hibiscus syriacus* ethanolic extract induces fibronectin and filaggrin expression and that this extract has flavonoids and coumarins (Martino et al., 2017), suggesting that this kind of components could be the responsible of adhesion effect. It is known that fibronectin and collagen constitute a key element in tissue regeneration and that can also be associated with an increment of fibroblast migration (Martino et al., 2017). **In this work, we evaluated the migration process, using the scratch assay, demonstrating that *B. procumbens* extract enhanced fibroblast migration at 48 h; similar effect was found with *P. cyanescens* extract, that has glycoside flavonoid, rutin, and quercetin-triglycosid (Freiesleben et al., 2017) or using *Stewartia koreana* ethyl acetate extract at 100 µg/ml increasing the migration of human fibroblast (Lee et al., 2014). Talekar et al., 2017, showed that a formulation based on aqueous extract of *Vitex negundo L.*, *Embllica officinalis Gaertn.*, and *Tridax procumbens L.* has important content of flavonoids and that this formulation at 3 µg/ml induced keratinocytes and fibroblast migration. In contrast *Plinia peruviana* hydroalcoholic extract**

had not effect in the migration rate at 24 h, although this extract had cryoprotective effect and an important antioxidant effects (Pitz et al., 2016).

Skin fibroblast differentiates to myofibroblast, inducing the actin gene expression acquiring some contractile proprieties of smooth cells, to produce wound contraction, moreover the participation of myofibroblast are related to composition, organization, and mechanical proprieties of ECM (Yang et al., 2015). Our results showed that *B. procumbens* extract induced myofibroblast differentiation at 48 h diminishing the effect at 72 h. These results suggest that *B. procumbens* extract regulates a finely the wound contraction activity, an important fact to lead non-healing wounds (Ibrahim, et al.,2015). Weter and co-workers have suggested that myofibroblast probably sense alteration in the mechanical microenvironment and translate these into changes in gene expression to produce a proper contraction, it is well known that temporally limited myofibroblast function is necessary for normal acute wound healing (Weter et al., 2013)

5. Conclusions

Nowadays, due has not been developed effective wound care products, natural products represent a potential options due well care effects and less side effects. *B. procumbens* has been used empirically in Hidalgo state for wound care. To give evidences of its practice wound care proprieties, here we standardized the extract obtention, and partial compound characterization, determining that hydroalcoholic extract contains flavonoids, polyphenols, coumarins, steroids, terpenes, saponins and quinones. The aqueous fraction had the most important wound care activity regulating fibroblast proliferation, adhesion, migration and differentiation in shorter times, interestingly these effects decrease significative the last phase of the wound healing, this fraction contains four major compounds are related with two phenolic derivatives and two p-hydroxycinnamic derivatives. Experiments in progress would

determinate its effect in an *in vivo* excisional model studying the molecular mechanism exerted by aqueous extract.

6. References

1. Agra, L. C. *et al.* (2015) 'Triterpenes with healing activity: A systematic review', *Journal of Dermatological Treatment*. Informa UK Ltd, 26(5), pp. 465–470. doi: 10.3109/09546634.2015.1021663.
2. Cordeiro, J. V. and Jacinto, A. (2013) 'The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 14(4), pp. 249–262. doi: 10.1038/nrm3541.
3. Darby, I. A. and Hewitson, T. D. (2007) 'Fibroblast Differentiation in Wound Healing and Fibrosis', *International Review of Cytology*, 257(7), pp. 143–179. doi: 10.1016/S0074-7696(07)57004-X.
4. Freiesleben, S. H. *et al.* (2017) 'Determination of the Wound Healing Potentials of Medicinal Plants Historically Used in Ghana', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, pp. 1–6. doi: 10.1155/2017/9480791.
5. Gál, P. *et al.* (2012) 'Atropa Belladonna L. water extract: Modulator of extracellular matrix formation in vitro and in vivo', *Physiological Research*, 61(3), pp. 241–250.
6. Hinz, B. (2007) 'Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair', *Journal of Investigative Dermatology*, 127(3), pp. 526–537. doi: 10.1038/sj.jid.5700613.
7. Ibrahim, M. M. *et al.* (2015) 'Myofibroblasts contribute to but are not necessary for wound contraction', *Laboratory Investigation*. Nature Publishing Group, 95(12), pp. 1429–1438. doi: 10.1038/labinvest.2015.116.
8. Johnson, M. B. *et al.* (2017) 'Topical Fibronectin Improves Wound Healing of Irradiated Skin', *Scientific Reports*, 7(1), p. 3876. doi: 10.1038/s41598-017-03614-y.
9. Lau, K. M. *et al.* (2012) 'Synergistic interaction between Astragali Radix and Rehmanniae Radix in a Chinese herbal formula to promote diabetic wound healing', *Journal of Ethnopharmacology*, 141(1), pp. 250–256. doi: 10.1016/j.jep.2012.02.025.
10. Lee, T. H. *et al.* (2014) 'The stimulatory effects of *Stewartia koreana* extract on the proliferation and migration of fibroblasts and the wound healing activity of the extract in mice', *International Journal of Molecular Medicine*, 34(1), pp. 145–152. doi: 10.3892/ijmm.2014.1753.
11. de Martino, L. *et al.* (2012) 'In Vitro phytotoxicity and antioxidant activity of selected flavonoids', *International Journal of Molecular Sciences*, 13(5), pp. 5406–5419. doi: 10.3390/ijms13055406.
12. Morath, C. *et al.* (2008) 'Effects of mycophenolic acid on human fibroblast proliferation, migration and adhesion in vitro and in vivo.', *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 8(9), pp. 1786–97. doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02322.x.
13. Pitz, H. D. S. *et al.* (2016) 'In Vitro Evaluation of the Antioxidant Activity and Wound Healing Properties of Jaboticaba (*Plinia peruviana*) Fruit Peel Hydroalcoholic Extract', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Publishing Corporation, 2016. doi: 10.1155/2016/3403586.
14. Raimondi, L. *et al.* (2000) 'Sedum telephium L. polysaccharide content affects MRC5 cell adhesion to laminin and fibronectin.', *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 52(5), pp. 585–91. doi: 10.1211/0022357001774237.
15. S. Murthy, M. K. Gautam, ShaliniGoel, V. Purohit, H. Sharma, and R. K. G. (2013) 'Evaluation of In Vivo Wound Healing Activity of *Bacopa monniera* on Different Wound Model in Rats', *Indian Journal of Pharmacology*, 2013. doi: 10.5455/2319-2003.ijbcp20150225.
16. Sharath, R. *et al.* (2010) 'Wound healing and protease inhibition activity of bacoside-A, isolated from *Bacopa*

- monnieri Wetteest', *Phytotherapy Research*, 24(8), pp. 1217–1222. doi: 10.1002/ptr.3115.
17. Sidhu, G. S. *et al.* (1999) 'Arnebin-1 accelerates normal and hydrocortisone-induced impaired wound healing', *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier Masson SAS, 113(5), pp. 773–781. doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00761.x.
 18. Singer, A. J. and Clark, R. A. F. (1999) 'Cutaneous wound healing', *New England Journal of Medicine*, 341(10), pp. 738–746. doi: doi:10.1056/NEJM199909023411006.
 19. Song, Q. *et al.* (2017) 'Periplaneta americana Extracts Promote Skin Wound Healing via Nuclear Factor Kappa B Canonical Pathway and Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Hindawi, 2017, pp. 1–12. doi: 10.1155/2017/5821706.
 20. Tam, J. C. W. *et al.* (2011) 'The in vivo and in vitro diabetic wound healing effects of a 2-herb formula and its mechanisms of action', *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier Ireland Ltd, 134(3), pp. 831–838. doi: 10.1016/j.jep.2011.01.032.
 21. Velidandla, S. *et al.* (2014) 'Histochemical analysis of polarizing colors of collagen using Picrosirius Red staining in oral submucous fibrosis.', *Journal of international oral health : JIOH*, 6(1), pp. 33–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3959134&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 22. Werner S, G. R. (2003) 'Regulation of wound healing by growth factors and cytokines.', *Physiol Rev.*, 83, pp. 835–70.
 23. Yamada, K. M. (2000) 'Fibronectin peptides in cell migration and wound repair', *Journal of Clinical Investigation*, 105(11), pp. 1507–1509. doi: 10.1172/JCI10119.
 24. Yang, J. *et al.* (2015) 'Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis.', *Nature reviews. Nephrology*, 4(1), pp. 1465–75. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62533-3.
 25. Zhang, Q. *et al.* (2012) 'Herbal formula Astragali Radix and Rehmanniae Radix exerted wound healing effect on human skin fibroblast cell line Hs27 via the activation of transformation growth factor (TGF-??) pathway and promoting extracellular matrix (ECM) deposition', *Phytomedicine*. Elsevier GmbH., 20(1), pp. 9–16. doi: 10.1016/j.phymed.2012.09.006.

Improved cutaneous wound healing using phytochemical conjugated of gold nanoparticles

A. Martínez-Cuazitl¹, M. Rojas López², M. D.C. Gómez García¹, V. Sánchez Monroy¹, R. Delgado Macuil², M.M. Mata-Miranda³, D.G. Pérez Ishiwara¹

1. Biomedicine Molecular Laboratory, ENMyH-Instituto Politécnico Nacional

2. Research Center for Applied Biotechnology- Instituto Politécnico Nacional

3. Secretaría de la Defensa Nacional, Centro Militar de Ciencias de la Salud, Escuela Médico Militar, México

Keywords

Gold nanoparticles, *B. procumbens*, wound healing

12.2.3. Artículos en preparación

1. *In vitro* studies to evaluate a metabolites effectors of wound healing activity of *Bacopa procumbens* extract and its molecular mechanism.

12.3. Congresos

Nombre del trabajo	Congreso internacional y modalidad de presentación
Changes in expression of molecular effectors induced by aqueous extract of metatera plant in excisional <i>in vivo</i> model	62 nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research –GA2014 (Guimaraes, Portugal) Poster
Synthesis of silver nanoparticles using extract of <i>Bacopa procumbens</i>	International Congress on Applications of Nanotechnology 2014 and 6 th Annual Meeting of the Nanoscience and Micro-nanotechnology Network of the National Polytechnic Institute (Mexico, México) Oral
Modulation of collagen by metatera extract results in better mechanical proprieties in skin wound healing in a <i>in vivo</i> model	1 st Biotecnology World Symposium and 9 ^o encuentro Nacional de Biotecnología del IPN (2014) (Tlaxcala, México) Oral
Molecular effectors induced by metatera extract during skin wound healing in a <i>in vivo</i> model	1 st Biotecnology World Symposium and 9 ^o encuentro Nacional de Biotecnología del IPN (2014) (Tlaxcala, México) Poster
<i>Bacopa procumbens</i> extract enhance wound healing process regulating molecular effectors in a <i>in vivo</i> model	27 th Conference of the European Wound Management Association (2017)(Amsterdam, Netherlands) Oral
Gold nanoparticles conjugate with <i>Bacopa procumbens</i> extract improve wound healing in <i>in vivo</i> model	27 th Conference of the European Wound Management Association (Amsterdam, Netherlands) Poster
Nombre del trabajo	Congreso nacional y modalidad de presentación
Efectores moleculares inducidos por el extracto acuético de la planta metatera durante el proceso de cicatrización en el modelo <i>in vivo</i>	V Congreso de transducción de señales 2015 de la Sociedad Mexicana de Bioquímica (Oaxaca, México) Poster
Desarrollo e investigación de un fitofármaco para la regeneración tisular	1ras jornadas de Ciencias médicas en investigación mayo 2016 (México, México) Oral

Certificate of Participation

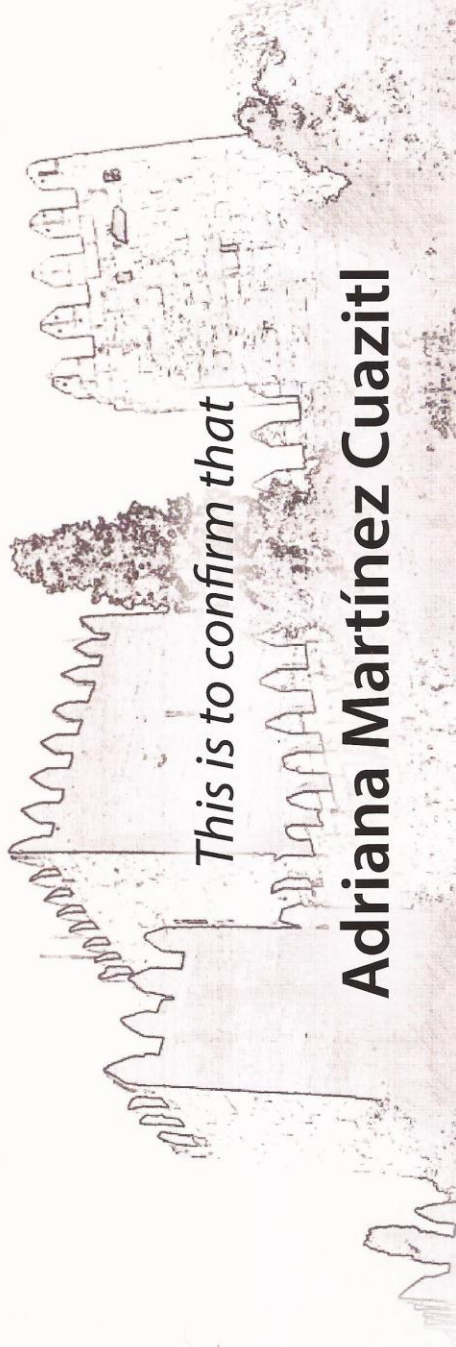
62nd International Congress and Annual Meeting
of the Society for Medicinal Plant and Natural
Product Research - GA2014

<http://ga2014.bio.uminho.pt/>



Universidade do Minho
Escola de Ciências

31st August - 4th September 2014
University of Minho
Guimarães, Portugal



This is to confirm that

Adriana Martínez Cuaziti

*attended the 62nd GA meeting, held at the University of Minho, Campus of
Azurém, Guimarães, Portugal.*

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alberto Dias'.

Alberto Dias
Conference Chair



Instituto Politécnico Nacional

Centro de Investigación en Biología Aplicada Tlaxcala



to:

IN THE

AWARDS THIS

CERTIFICATE OF PRESENTATION

Adriana Martínez Cuaziti; Jesús Ariel Martínez Solís; Eduardo San Martín Martínez; Olivia Medel Flores, Consuelo Gómez García; Francisco Javier Paz Bermudez; Mario García Solís and David Guillermo Pérez Ishiwara

for presenting the contribution entitled:

MODULATION OF COLLAGEN BY METATERA EXTRACT RESULTS IN BETTER MECHANICAL PROPERTIES IN SKIN WOUND HEALING IN A IN VIVO MODEL

1ST BIOTECHNOLOGY & 9^º ENCUENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA DEL IPN

Atlihuetzia Tlaxcala, México, October 13 to 16, 2014.

Dra. Myrna Solís Oba
Presidente del comité organizador

~~Dra. Norma~~ Patricia Muñoz Sevilla
Secretaría de Investigación y Posgrado

Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara
Director CIBA Tlaxcala



Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada Tlaxcala

Instituto Politécnico Nacional



Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada Tlaxcala

AWARDS THIS

CERTIFICATE OF PRESENTATION

Adriana Martínez Cuaziti, Consuelo Gómez García, Virginia Sánchez Monroy, Eduardo San Martín Martínez, Mario García Solís and David Guillermo Pérez Ishiwara

for presenting the contribution entitled:

Molecular effectors induced by metatera extract during skin wound healing in a in vivo model

1ST BIOTECHNOLOGY & 9^O ENCUENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA DEL IPN

Atlihuetzia Tlaxcala, México, October 13 to 16, 2014.

Dra. Myrna Solís Oba
Presidente del comité organizador

Dra. Norma Patricia Muñoz Sevilla
Secretaría de Investigación y Posgrado

Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara
Director CIBA Tlaxcala



Constancia

A la Estudiante de Doctorado

Adriana Martínez Cuazitl

Por su participación en la **presentación de Carteles** en las **"1ras Jornadas de Ciencias Médicas en Investigación"** efectuadas en la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del I.P.N., del 16 al 20 de Mayo del 2016.

"LA TECNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"

Dra. en C. Ana Laura Luna Torres
Jefa Interina de la Sección de Estudios de
Posgrado e Investigación, de la ENMH.





CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This is to certify that

Adriana Martínez

attended the 27th Conference of the
European Wound Management Association

**CHANGE, OPPORTUNITIES AND CHALLENGES
- WOUND MANAGEMENT IN CHANGING HEALTHCARE SYSTEM**

Amsterdam, Netherlands · May 03-05, 2017

EWMA 2017 is organised in cooperation with WCS Knowledge Centre Wound Care.



Kenniscentrum Wondzorg

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'S. Läubli'.

Severin Läubli
President of EWMA



CERTIFICATE

This is to prove that Adriana Martínez

has presented the free paper:

*BACOPA PROCUMBENS EXTRACT ENHANCE WOUND HEALING PROCESS
REGULATING MOLECULAR EFFECTORS IN A IN VIVOMODEL*

A. Martínez Cuazitl, M.D.C. Gómez Garcia, V. Sánchez Monroy, E. San Martin Martinez, M. Rojas López, R.J. Delgado Macuil, J.S. Salas Benito and D.G. Pérez Ishiwara

at the 27th Conference of the European Wound Management Association.

The conference was organised in cooperation with the cooperation with Knowledge Centre Wound Care, WCS.

Amsterdam, The Netherlands, 3-5 May 2017,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'S. Läuchli'.

Severin Läuchli
President, EWMA



CERTIFICATE

This is to prove that Adriana Martínez

has presented the e-poster:

*GOLD NANOPARTICLES CONJUGATE WITH BACOPA PROCUMBENSEXTRACT
IMPROVE WOUND HEALING IN IN VIVO MODEL*

A. Martínez Cuazitl, M.D.C. Gómez Garcia, V. Sánchez Monroy, E. San Martín Martínez, M. Rojas López, R.J. Delgado Macuil, J.S. Salas Benito and D.G. Pérez Ishiwara

at the 27th Conference of the European Wound Management Association.

The conference was organised in cooperation with the cooperation with Knowledge Centre Wound Care, WCS.

Amsterdam, The Netherlands, 3-5 May 2017,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'S. Läuchli'.

Severin Läuchli
President, EWMA

12.4. Ponencias

Ciencia e innovación para el desarrollo de productos medicinales derivados de plantas: la fusión de un conocimiento empírico y la nanotecnología para generar un fármaco para regeneración tisular 12 FORO PIFI 2017 **(México)**



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Otorga el presente

Reconocimiento

a

ADRIANA MARTÍNEZ CUAZITL

Por haber impartido la conferencia titulada "Ciencia e innovación para el desarrollo de productos medicinales derivados de plantas: La fusión de un conocimiento empírico y la nanotecnología para generar un fármaco para regeneración tisular" en el 12 FORO PIFI 2017 celebrado los días jueves 10 y viernes 11 de agosto de 2017 en las instalaciones de la Unidad Politécnica para el Desarrollo y la Competitividad Empresarial (UPDCE) del IPN.

Ciudad de México, 11 de Agosto del 2017
"La Técnica al Servicio de la Patria"

Dra. Laura Arzobla Mendoza
Directora de Investigación

