

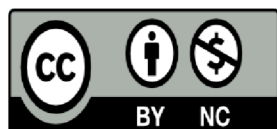
Rotela, Matias Fabián

Caracterización bioquímica y funcional de componentes de derivados de cordón umbilical

2022

Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
Atribución – no comercial 4.0
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Rotela, M. F. (2022). *Caracterización bioquímica y funcional de componentes de derivados de cordón umbilical* [tesis de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]

Disponible en RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital UNAJ <https://biblioteca.unaj.edu.ar/rid-unaj-repositorio-institucional-digital-unaj>



Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica

“Caracterización bioquímica y funcional de componentes de derivados de cordón umbilical”

Alumno: Rotela, Matias Fabian

Directora: Esp. Guerbi Maria Ximena

Co-director: Dr. Berra, Alejandro

Fecha de entrega: 31 de octubre del 2022.

Agradecimientos.

Agradezco a la educación pública que día a día me brinda la oportunidad de seguir soñando.

A mis maestr@s de la infancia a los cuales recuerdo en este momento con mucho cariño, y su enseñanza más importante: vivir en la búsqueda constante de nuevos proyectos.

A la Universidad Pública y a los profesores que la forman, la cual siempre me abrió sus puertas, me compartió sus enseñanzas y hoy me ve alcanzar una de mis metas en la vida.

Al Dr Berra Alejandro, la Dra Michelini Flavia y Esp. Guerbi María Ximena, que me acompañaron en esta última etapa, compartiéndome sus experiencias y conocimientos de forma desinteresada y con mucha calidez.

Y finalmente a mi compañera de vida Gisela que siempre está apuntalándome para seguir creciendo.

Resumen.

Las heridas crónicas son un problema transversal a múltiples enfermedades, por eso su tratamiento es abordado desde distintos enfoques.

Uno de los tratamientos innovadores surge de los derivados de la membrana amniótica, los cuales han demostrado ser seguros y eficientes en el tratamiento de tejidos dañados. En base a estos resultados, se propone que el cordón umbilical podría ser otro tejido placentario prometedor en el tratamiento de heridas.

A partir de esta propuesta se construyeron parches de homogeneizados de los cordones umbilicales donados, de igual forma que con membrana amniótica, que fueron liofilizados y esterilizados por radiación gamma.

Así obtenidos se hidrataron y disgregaron en medio RPMI 1640 los sobrenadantes de los centrifugados, se caracterizaron bioquímicamente mediante la cuantificación del contenido de proteínas totales por el ensayo de Bradford, se evaluó su perfil proteico mediante SDS-PAGE y se midieron sus citoquinas mediante ELISA.

Posteriormente, estos sobrenadantes se analizaron funcionalmente en una línea celular monocítica, THP-1. Después de un proceso de diferenciación con PMA a macrófagos de 72 h, evaluamos la modulación de la secreción de citoquinas inducida por LPS, por los productos del cordón umbilical, después de 24 h de tratamiento.

IL-6, IL-8 e IL-10 fueron evaluadas, mostrando una disminución significativa de citoquinas proinflamatorias y sugiriendo un aumento de IL-10 antiinflamatoria.

Índice.

1. Introducción.....	5
1.1. Reparación de heridas.....	5
1.2. Heridas crónicas.....	8
1.3. Papel de los macrófagos.....	9
1.4. Tratamiento de heridas crónicas.....	10
1.5. Nuevos tratamientos.....	12
2. Objetivo general y específicos.....	15
3. Materiales y métodos.....	16
3.1. Cultivo celular.....	18
3.2. Caracterización de los apósitos de cordón umbilical.....	18
3.2.1. Cuantificación de proteínas.....	19
3.2.2. SSD-Page.....	19
3.2.3. Cuantificación de citoquinas.....	20
3.3. Evaluación de la proliferación celular en línea celular de macrófagos.....	21
3.3.1. Recuento de células viables en cámara de Neubauer.....	21
3.3.2. Determinación de la viabilidad celular utilizando sales de formazán.....	23
3.4. Investigar in vitro la re-polarización de macrófagos M1 a M2.....	24
3.4.1. Cuantificación de citoquinas por ELISA en sobrenadantes de cultivos de macrófagos.....	24
3.4.2. Cuantificación de expresión de genes de citoquinas mediante RTqPCR.....	25
3.5. Análisis estadístico.....	29
4. Resultados y discusión.....	30
4.1. Caracterización de los apósitos de cordón umbilical.....	30
4.1.1. Cuantificación de proteínas.....	30

4.1.2. SSD-Page.....	31
4.1.3. Cuantificación de citoquinas por ELISA.....	32
4.2. Viabilidad celular.....	34
4.3. Investigar in vitro de la re-polarización de macrófagos M1 a M2.....	37
4.3.1. Cuantificación de citoquinas por ELISA en sobrenadantes de cultivos de macrófagos.....	37
4.3.2. Cuantificación de expresión de genes de citoquinas mediante RTqPCR.....	41
5. Conclusiones.....	44
6. Referencias bibliográficas.....	46

1. Introducción.

Las heridas crónicas son un problema central en los sistemas de salud, que afectan directamente la calidad de vida de los pacientes, y requieren intervenciones terapéuticas regulares y frecuentes, incrementando los gastos en salud.

En base a esta premisa nos propusimos abordar la caracterización de derivados de cordón umbilical y su hipotética capacidad de modificar el perfil fenotípico de macrofagos, pieza central en el proceso de curación de heridas. Así evaluar una de las aristas de su posible aplicación sobre heridas crónicas.

Para comprender a qué nos referimos con heridas crónicas, es importante conocer el proceso fisiológico natural que lleva a la reparación de los tejidos, definiendo a la herida como la pérdida de la integridad del tejido, resultado de una lesión o enfermedad, (Ramírez Hernández,2010). Y el papel que desempeñan los macrofagos en la reparación o perpetuidad de la lesión.

Además abordaremos los tratamientos actuales, para comprender la importancia de los nuevos desarrollos en salud como se presenta al apósitos derivados de cordón umbilical.

1.1. Reparación de heridas.

La reparación de heridas es uno de los procesos biológicos más complejos que ocurren durante la vida humana. Posterior a una lesión, múltiples vías biológicas se activan inmediatamente y se sincronizan para responder (Gurther, 2008). Para comprender el mecanismo de las heridas crónicas, es importante definir la cicatrización esperada sobre una lesión cutánea. Esta debe atravesar 5 procesos, los cuales ocurren en forma secuencial, pudiendo superponerse entre sí, hasta alcanzar el cierre total de la herida. Estos procesos comprenden:

- a. Hemostasia: Una vez ocurre la lesión se produce el daño en los vasos sanguíneos con la consiguiente pérdida de plasma, células y factores hacia el intersticio. La hemostasia y coagulación se inician con la activación de los elementos celulares de la sangre y llevan a

la formación del coágulo o tapón hemostático, proceso en el cual interfiere la cascada de los factores de la coagulación y el fenómeno de agregación plaquetaria.

- b. **Inflamatoria:** Esta fase se caracteriza por la migración de neutrófilos a la herida, atraídos por factores quimiotácticos específicos. Una vez en el intersticio, se dan interacciones célula-célula y célula-matriz, iniciando la función de fagocitosis de bacterias y proteínas de la matriz por medio de liberación de enzimas específicas (hidrolasas, proteasas y lisozimas) y radicales libres de oxígeno (ERO). Finalmente, los neutrófilos quedan atrapados en el coágulo disecándose con él. Los que permanecen en tejido viable mueren por apoptosis, para ser removidos por macrófagos o fibroblastos. Posteriormente, se produce el acúmulo de monocitos que reemplazan a los neutrófilos. Los monocitos en circulación migran al tejido diferenciándose a macrófagos con función fagocítica, para descontaminar el posible foco infeccioso o lesivo y realizar el desbridamiento autolítico de la herida. Al disminuir las señales proinflamatorias los macrófagos sufren un cambio fenotípico, que los lleva de un perfil inflamatorio (M1) a un perfil antiinflamatorio (M2). Estos secretan citoquinas y factores de crecimiento con un importante papel en la neoformación tisular.

- c. **Proliferativa o granulación:** Los fibroblastos constituyen las células más importantes en la producción de matriz dérmica, llegan a la herida desde músculo, tendón, fascia y una vez en el lecho de la lesión, migran sobre una matriz laxa de fibronectina. Los fibroblastos depositan una neomatriz provisoria de fibronectina y ácido hialurónico, estimulados por citoquinas y factores de crecimiento (TGF β , PDGF, TNF, FGF, IL1 e IL4) para comenzar a sintetizar la matriz de colágeno (tipos I, III y VI). La producción cesa una vez que se depositó suficiente cantidad. La angiogénesis y la formación de tejido de granulación se inician simultáneamente con la fibroplasia. Los vasos sanguíneos adyacentes a la lesión emiten yemas capilares, las células endoteliales de los extremos sufren un cambio fenotípico que les permite proyectar pseudópodos a través de las membranas basales fragmentadas y migrar al espacio perivascular, respondiendo a las señales del factor de crecimiento vascular-endotelial y angiopoyetinas. Los brotes capilares se dividen en sus extremos para dar origen a plexos capilares. Por último, se produce el reclutamiento de las células periendotheliales (pericitos y células de músculo liso) que estabilizan los vasos sanguíneos recién formados.

- d. Epitelización: Para que ocurra la epitelización de la herida, los queratinocitos deben migrar desde los bordes de la herida. Esto se produce gracias a cambios en el fenotipo que consisten en la pérdida del aparato de adhesión, la retracción de los tonofilamentos y disolución de los desmosomas, y su reemplazo por el aparato motor, que consiste en la proyección de lamelopodios hacia la herida. Estos procesos conllevan a la pérdida de unión entre las células epidérmicas, la membrana basal y la dermis subyacente, lo que permite su migración. La proliferación ocurre en forma superpuesta a la migración, mientras las células epiteliales migran a través de la herida, las células proximales proliferan por el estímulo de mediadores solubles y al efecto borde (ausencia de células vecinas en aposición que dispararía el estímulo proliferativo en los márgenes de la herida).
- e. Remodelación: Esta etapa, comienza al mismo tiempo que la fibroplasia y continúa por meses. La célula principal es el fibroblasto que produce fibronectina, ácido hialurónico, proteoglicanos y colágeno durante la fase de reparación, los cuales sirven como base para la migración celular y soporte tisular. Con el tiempo la fibronectina y el ácido hialurónico desaparecen por acción de proteasas y hialuronidasas respectivamente. Posteriormente, el colágeno tipo III es reemplazado por el de tipo I, siendo éste más estable y similar al original. Al finalizar la cicatrización los fibroblastos inician su proceso de apoptosis, estableciéndose una transición de una cicatriz rica en fibroblastos y tejido de granulación, a una cicatriz acelular. El tejido conjuntivo cicatricial se torna rico en colágeno, pobre en células y vasos. La dermis recupera la composición previa a la lesión y alcanza una resistencia máxima del 70% comparada con el tejido original y la reparación de la herida se considera finalizada (Ramírez Hernández 2010, Wilkinson y Hardman, 2020).

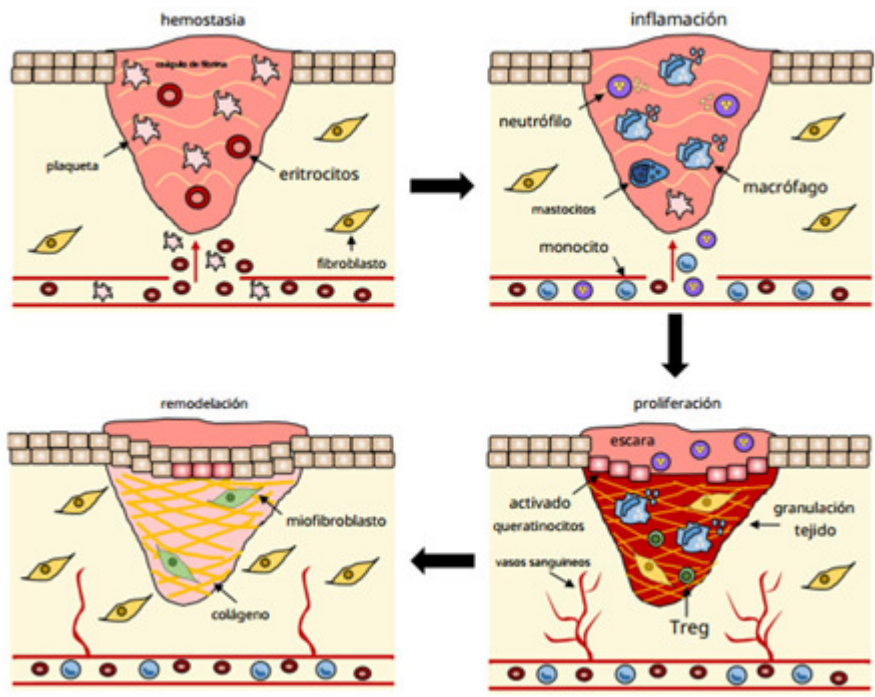


Figura 1. Proceso natural de cicatrización de heridas obtenido de Wilkinson y Hardman, 2020.

1.2. Heridas crónicas.

Se consideran como heridas crónicas a aquellas que permanecen sin cicatrizar luego de 12 semanas (Wilkinson y Hardman, 2020).

Las heridas crónicas generalmente son causadas por anomalías sistémicas como diabetes o insuficiencia venosa, donde el proceso de curación puede detenerse debido a la desregulación de la señalización de citoquinas y la actividad elevada de las proteasas (Bullard, y col., 2018).

El entorno de la herida crónica es la plataforma perfecta para la inducción de células senescentes debido a los altos niveles de inflamación y estrés oxidativo. Un contribuyente clave a la patología de la herida crónica es la inflamación excesiva, la cual se convierte en crónica, perpetuando la destrucción continua del tejido de la herida.

Las heridas crónicas se caracterizan por un alto número de neutrófilos y macrófagos proinflamatorios (M1), que contribuyen a una cicatrización deficiente (Kumar y col.,2015).

1.3. Papel de los macrófagos.

Las células predominantes en la mayoría de las reacciones inflamatorias crónicas son los macrófagos, estos contribuyen secretando citocinas y factores de crecimiento, que actúan sobre diversas células, como fibroblastos o linfocitos. Los macrófagos son fagocitos especializados que actúan como filtros de partículas, microbios y células senescentes, asimismo, funcionan como células efectoras que eliminan los microorganismos en las respuestas inmunitarias celulares y humorales.

Los macrófagos provienen de monocitos circulantes en sangre que migran a través de los tejidos y se diferencian. Este proceso se da en particular en sitios de inflamación, y además en otros contextos no inflamatorios como ocurre naturalmente en algunos tejidos como por ejemplo la piel o tubo digestivo. La semivida de los monocitos en sangre es de 1 día, mientras que los macrófagos pueden sobrevivir de meses a años.

En las reacciones inflamatorias, los monocitos comienzan a migrar al tejido extravascular diferenciándose en macrófagos, pasadas las 48 hs pueden ser el tipo de célula predominante, la extravasación de los monocitos es regulada por moléculas de adhesión y mediadores químicos con propiedades quimiotácticas y activadoras. Los monocitos devenidos en macrófagos son activados por dos vías:

La activación de macrófagos clásica o perfil M1 es inducida por productos microbianos como endotoxinas reconocidas por los receptores de reconocimiento de patrón de la respuesta inmune innata (PRR), principalmente los TLR4, TLR9 y NLR, o por señales derivadas de linfocitos T, sobre todo la citocina IFN γ , en respuesta inmunitarias adaptativa.

Los macrófagos M1 producen especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) al activarse el estallido respiratorio, además aumentan la producción de enzimas lisosómicas, las cuales mejoran su capacidad para inducir la muerte de los organismos ingeridos a la vez que secretan citocinas estimuladoras de la inflamación (IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12, IL-18 e IL-23).

La activación de macrófagos alternativa o M2, es inducida por diferentes factores dependiendo del subtipo de macrófago M2. Los macrófagos M2a son inducidos por IL-4 e IL-13, los macrófagos M2b se generan tras la exposición a complejos inmunitarios y

agonistas de IL-1R o TLR, los macrófagos M2c son inducidos por IL-10, y los macrófagos M2d son inducidos por agonistas de TLR e IL-6.

Estos macrófagos no son microbicidas de manera activa, muestran una menor capacidad para la presentación de antígenos y la producción de oxidantes, participan principalmente en, la inmunorregulación, la angiogenia, activación de los fibroblastos y estimulan la síntesis de colágeno. Estos hechos se dan mediante la secreción de niveles más altos de ciertos factores antiinflamatorios, como son IL-10, IL-1Ra y TGF- β . (Wang y col., 2020;Fainboim y col., 2017; Kumar y col.,2015).

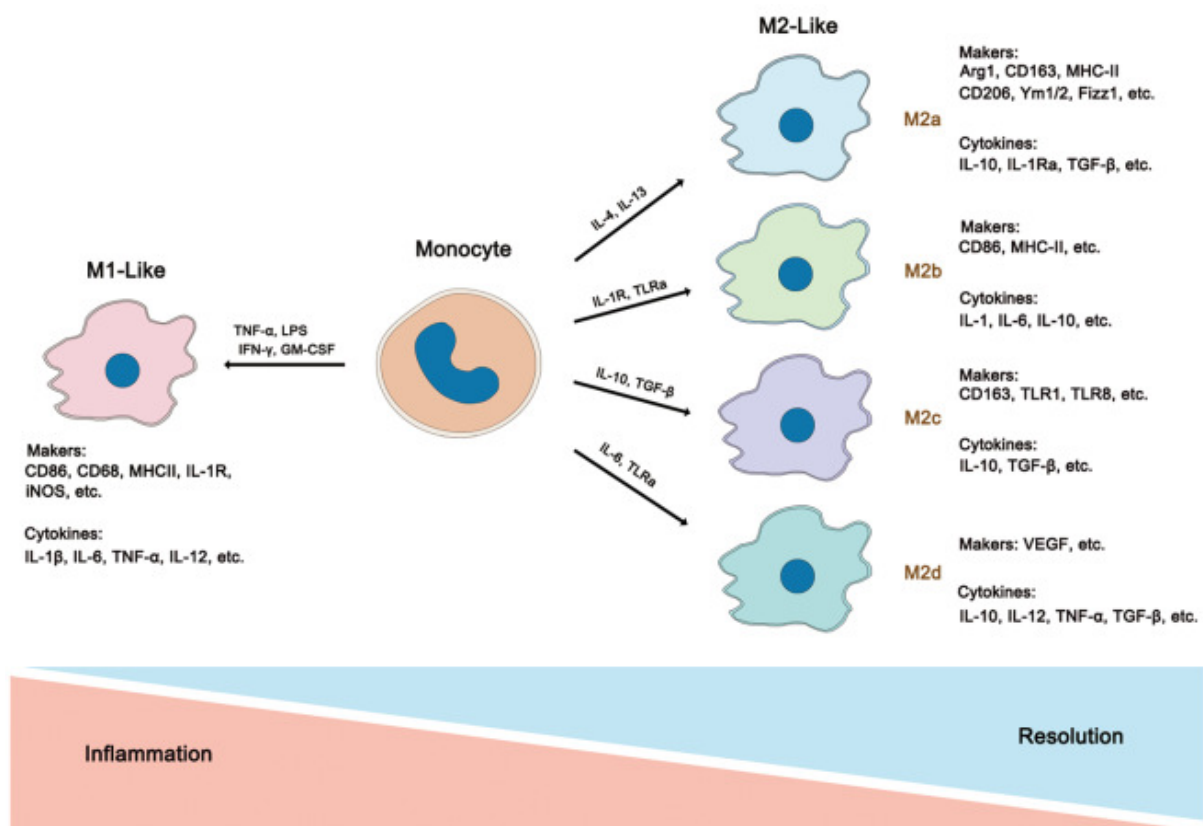


Figura 2. activación de macrófagos M1 y M2, y sus respuestas efectoras, obtenido de Wang y col., 2020.

1.4. Tratamiento de heridas crónicas.

El tratamiento convencional incluye varias terapias aplicadas juntas o por separado, con un alto costo en salud y necesidad de personal calificado para cada técnica. Ejemplos de estas incluyen:

Desbridamiento: Se lleva a cabo para eliminar los restos superficiales y los tejidos necróticos, y así mejorar la curación al promover la producción de tejido de granulación, esta práctica se puede realizar quirúrgicamente, enzimáticamente, biológicamente y mediante autólisis.

Control de la infección: las heridas crónicas poseen un amplio espectro de infecciones que abarcan desde celulitis localizada a infecciones profundas con fascitis necrotizante u osteomielitis, siendo el uso de antimicrobianos la terapia recomendada, que suele prolongarse en el tiempo por el difícil control celular y la existencia de reinfecciones por otros agentes.

Descarga: El procedimiento de descarga consiste en evitar la presión sobre la lesión o tejidos aledaños. Se aplica generalmente para la curación de las úlceras plantares en pacientes diabéticos, y consiste en la aplicación de prótesis externas (férulas) que distribuyen la carga al utilizar el miembro afectado.

Terapia de heridas con presión negativa: Implica el uso de presión subatmosférica intermitente o continua a través de una bomba especial (cierre asistido por vacío) conectada a un vendaje superficial. La bomba está conectada a un recipiente para recoger la secreción y el exudado de la herida. Los datos experimentales sugieren que la técnica optimiza el flujo sanguíneo, disminuye el edema tisular y elimina el exudado, las citocinas proinflamatorias y las bacterias del área de la herida. Esta técnica debe aplicarse posterior al desbridamiento de la herida y continuar hasta la formación de tejido de granulación sano en la superficie de la úlcera.

Tratamiento local de la herida con apósitos: el tratamiento local con apósitos busca aislar la herida de posibles contaminantes, absorber el exceso de exudados, y mantener un ambiente húmedo en la interfase entre el apósito y la herida.

Procedimientos de revascularización: Consiste en la restitución de la circulación hacia la zona de lesión. Se realiza por cirugía, incluye la reconstrucción arterial directa, la derivación arterial, o procedimientos endovasculares de angioplastia y colocación de endoprótesis (Alexiadou, Doupis, 2012; Margolis et Storm, 1999; Braun 2014; Margolis et Strom, 1999; Margolis et Berlin, 1999; Hinojosa y colaboradores 2016).

1.5. Nuevos tratamientos.

Frente a pacientes con alteración de la cicatrización, o a la necesidad de alternativas de tratamientos de difícil implementación por requerimientos de infraestructura o recursos humanos calificados y altos costos que de esto devienen (Alexiadou, 2012; Brownrigg, 2012), han surgido nuevos tratamientos.

Como alternativa a los tratamientos clásicos para heridas crónicas se presenta la membrana amniótica humana (hAM) ya empleada en procesos de curación de heridas con bases científicamente demostradas desde hace muchos años (Bapat 1964, Litwiniuk 2014, Dadkhah Tehrani 2021, Zelen 2013). La hAM posee una serie de características que la hacen única y apropiada para la cicatrización de heridas. Por ejemplo, estudios previos han demostrado que la hAM: proporciona una barrera biológica natural (Mermet, 2007; Niknejad, 2008), provee una matriz para la migración celular y su proliferación (Cornwell 2009), promueve una mejora del proceso de cicatrización (Kim, 2000), no es inmunogénica (Akle, 1981), reduce la inflamación (Hao 2000), reduce el tejido cicatricial (Tseng, 1999), tiene propiedades antibacterianas (King, 2007; Talmi, 1991) y reduce el dolor en el lugar de aplicación (Mermet, 2007; Adly, 2010). Se ha demostrado que la hAM puede inducir apoptosis (Hao, 2000; King, 2007), y que también es capaz de inducir la repolarización de macrófagos M1 proinflamatorios a M2 antiinflamatorios. promoviendo la disminución de factores proinflamatorios (TNF- α , IL-6, CD68 y MHC II) y el aumento de factores del tipo antiinflamatorios (IL-10) (King, 2007).

La membrana amniótica es la capa más interna de la placenta fetal, que rodea y protege al feto. Su estructura única, además de sus propiedades físicas y biológicas citadas anteriormente, la convierte en una sustancia útil en aplicaciones relacionadas con la medicina regenerativa de diversos tejidos blandos (Niknejab, 2008; Dadkhah, y col., 2021). Estudios prospectivos, randomizados, multicéntricos y controlados han mostrado la utilidad de la hAM

en el tratamiento de las úlceras de pie diabético, claro ejemplo de lesión crónica, respecto a la utilización del tratamiento estándar (Snyder,2016;Kraus,2017).

En la actualidad el principal uso de hAM en el tratamiento de úlceras crónicas, es a través de una presentación criopreservada la cual es de aplicación estrictamente quirúrgica. Esta modalidad trae inconvenientes similares a los tratamientos convencionales, ya que se requiere el ingreso del paciente al quirófano, con la demanda de Recursos Humanos pertinente. Imposibilitando la aplicación óptima cada 48/72 horas, con lo cual se interrumpe la transferencia continua de los factores biológicos de la hAM al lecho de la herida.

En la actualidad el mayor proveedor de hAM es el Hospital Garrahan, que provee la forma criopreservada de hAM, la cual debe ser transportada y almacenada a -80°C.

Buscando la solución, para la aplicación de hAM sobre heridas surge una estrategia innovadora que implica la liofilización de la hAM obteniendo los siguientes derivados: apósitos (hAM-pe: membrana amniótica homogeneizada, liofilizada y esterilizada) y parches (hAM-L: membrana amniótica liofilizada y esterilizada) de hAM completa y de las distintas áreas de hAM. Esta estrategia deviene en una terapéutica aplicable cada 48/72 hs, de manera que los factores biológicos propios de la hAM pueden ser transferidos a la herida en forma prácticamente constante, su aplicación resulta mucho más simple y es realizable en el consultorio médico. La misma está siendo aplicada en un estudio traslacional con resultados aún no publicados, pero preliminarmente arrojan datos de gran importancia donde se observa el cierre de la herida en un tiempo significativamente menor que con el tratamiento convencional. Los derivados de membrana amniótica han demostrado ser eficaces y seguros como terapia biológica para promover la curación de tejidos blandos; sin embargo, el cordón umbilical, otro tejido placentario que en nuestro país constituye un descarte biopatogénico, también ha despertado interés por su composición particular y su origen tisular común con la placenta (Tettelbach y col, 2019).

Resultados en derivados liofilizados de cordón umbilical, lo señalan como una terapia

prometedora debido a su alto contenido de factores de crecimiento, proteínas, componentes de matriz extracelular y su habilidad para inducir respuestas celulares como proliferación, migración y angiogénesis. También hay evidencia experimental en modelo animal (ratas), de que sus componentes no generan un efecto adverso y que son reabsorbidos completamente en el lecho de la herida (Bullard y col, 2019).

Mediante las técnicas que permiten la obtención hAM-pe, se desarrollaron recientemente apósitos derivados de cordón umbilical homogeneizados, liofilizados y esterilizados.

Este trabajo de grado busca aportar datos experimentales relevantes sobre los apósitos derivados de cordón umbilical, en especial sobre su fase soluble (extractos), ensayando su caracterización bioquímica y funcional. En particular intentará evaluar su posible capacidad de repolarizar macrófagos M1 a un perfil M2.

2. Objetivo general.

- Caracterizar bioquímica y funcionalmente los componentes derivados de apósitos liofilizados de cordón umbilical.

Objetivos específicos.

1. Identificar, caracterizar y analizar cuali-cuantitativamente los componentes biológicos de apósitos liofilizados de cordón umbilical.
2. Evaluar la proliferación celular en línea celular de macrófagos (THP-1).
3. Investigar in vitro la re-polarización de macrófagos M1 (pro-inflamatorios) a M2 (anti-inflamatorios) tratados y sin tratar con extractos solubles derivados de apósitos liofilizados de cordón umbilical.

3. Materiales y métodos.

Muestra.

Los apósitos liofilizados de cordón umbilical con los que se realizó el trabajo experimental pertenece a dos homogenatos de cordón umbilical elaborados y provistos por el Banco de Tejidos de la Asociación Civil para el Progreso de la Tecnología Médica de Tejidos.

Se obtienen a partir de cordón umbilical humano, bajo consentimiento informado de la donante, siguiendo los lineamientos establecidos en la Resolución N° 187/01. Los apósitos se encuentran homogeneizados, liofilizados y esterilizados por radiación gamma. Los que se han utilizado en el trabajo pertenecen al lote 84022, disco 1 y disco 2.



Figura 3. Homogenatos de cordón umbilical disco 1 y disco 2.

Células empleadas.

Se utilizó para los ensayos células THP-1 TIB- 202TM ATCC, línea celular originaria de monocitos aislados de sangre periférica de paciente con leucemia monocítica aguda. Cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) inactivado al 10%. En los ensayos de modulación de la respuesta inflamatoria inducida por LPS se utilizó medio RPMI suplementado con SFB al 2%.

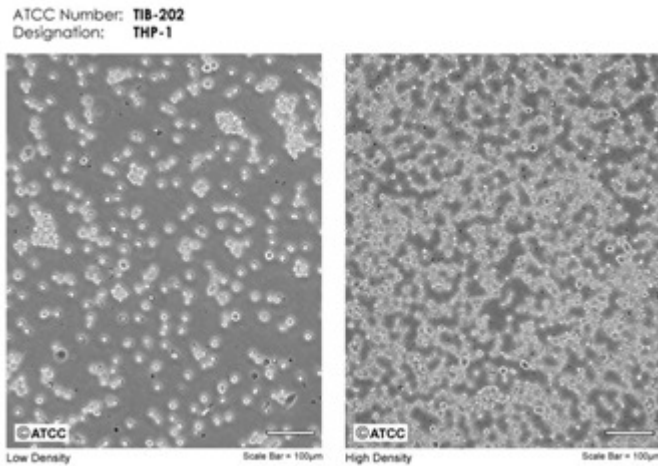


Figura 4. Células THP-1 en crecimiento, obtenidas de banco imágenes ATCC

Medio empleado.

Se utilizó para los ensayos el medio RPMI Medium 1640 gibco^R, el cual contiene entre sus características el agente reductor glutatión y altas concentraciones de vitaminas como biotina, vitamina B₁₂, ácido paraaminobenzoico, inositol y colina. No contiene proteínas, lípidos ni factores de crecimiento. Por lo tanto, requiere una suplementación, por lo general de suero fetal bovino (SFB). El medio RPMI 1640 utiliza un sistema buffer de carbonato/bicarbonato sódico, por lo tanto, requiere un ambiente con un 5–10 % de CO₂ para mantener el pH fisiológico.

Estímulos empleados.

PMA: Phorbol 12-miristato 13-acetato, es un activador de la proteína quinasa C (PKC) y agente promotor de tumores, también exhibe actividad clastogénica, puede inducir la actividad de fosfolipasa D1 pero no de fosfolipasa D2. En nuestro contexto se utiliza para generar la diferenciación de monocitos (THP -1) a macrófagos

LPS de *Escherichia coli*: Lipopolisacáridos (LPS) es el componente activo de las endotoxinas bacterianas gram negativas, el cual genera una inmunoestimulación pluripotencial manifestada por la activación de las células, como por ejemplo; macrófagos donde genera la diferenciación funcional a perfil M1.

3.1. Cultivo celular.

La línea celular THP-1 TIB- 202™ ATCC se cultivó en medio RPMI Medium 1640 gibco^R, suplementado con suero fetal bovino al 5% en botellas T75, incubadas en estufa (NuAire-PureCell NU-5100E CO₂ Incubator) con atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂ a 37°C. Antes de su plaqueo para realizar los ensayos, se contabilizaron en hemocitómetro y agregaron, medio de cultivo más 50 ng/ml PMA final, para luego ser incubadas por 72 horas más en estufa permitiendo su diferenciación a macrófagos.

El trabajo de cultivo celular se realizó manteniendo medidas de esterilidad, trabajando con elementos de protección personal, en cabina de bioseguridad clase II (Nuair, Modelo UN-540-300E).

3.2. Caracterización de los apósitos de cordón umbilical.

Para la caracterización de los componentes de los homogenatos de cordón umbilical, se partió de su rehidratación y obtención de su fase soluble en medio RPMI Medium 1640 gibco^R (RPMI).

Desde apósitos liofilizados de cordón umbilical, identificados como disco 1(C22/1) y disco 2 (C22/2), se procedió a su pesada en balanza analítica con su envoltura, luego se pesó la envoltura, para obtener el peso del disco por diferencia de pesado (se muestra su resultado en Tabla 7), se los rehidrata y disgrega con el empleo de homogeneizador en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 5%.

Se realizan cuatro extracciones sobre el material sedimentado por centrifugación obtenido Posterior a los resultados obtenidos en SDS-PAGE (sección 4.1.3.) se agrupan los tres primeros extractos, que serán identificados en adelante como muestra C22/1, proveniente de las primeras tres fases solubles extraídas del homogenato de cordón umbilical disco 1, y C22/2, proveniente de las primeras tres fases solubles extraídas del homogenato de cordón umbilical disco 2.

Los extractos obtenidos se analizaron para su caracterización mediante la técnica de Bradford para determinar proteínas totales, realizando un SDS-PAGE para observar el perfil proteico de

los extractos, y por cuantificación de citoquinas con reactivos comerciales para ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) evaluando TNF- α , IL8, IL-6 e IL-10.

3.2.1. Cuantificación de proteínas.

Para la determinación de proteínas totales se aplicó el método de Bradford, se realizó una curva patrón con stock comercial de albúmina bovina de 1 mg/ml (Sigma-Aldrich), y reactivo de Bradford compuesto por Coomassie Brilliant Blue G-250 en etanol 95%, ácido fosfórico 85% y agua destilada, se midió la absorbancia (Abs) a 595 nm en lector de absorbancia (BIO-RAD iMark™ Microplate Absorbance Reader).

Se realizó curva de calibración por triplicado obteniéndose valores de absorbancia para los puntos de concentración 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 62,5 $\mu\text{g/ml}$ y 31,25 $\mu\text{g/ml}$. Se construyó la recta de calibración correspondiente, mostrando logaritmo (log.) de Abs en función de log. de concentración ($\mu\text{g/ml}$) en Figura 5.

Para determinar la concentración de proteínas en las muestras se realizó una dilución de las mismas con agua destilada 1/10, obteniéndose valores por duplicado. Se interpolan en la curva de calibración, los Log de las Abs 595 obtenidas, y al realizar las operaciones matemáticas pertinentes se obtuvieron las concentraciones correspondientes. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

3.2.2. SDS-PAGE.

Para observar el perfil proteico de los extractos se utilizó separación electroforética de proteínas mediante SDS-PAGE. El gel utilizado se preparó con acrilamida al 12 % p/v. Se sembró 20 μl por calle, compuestos por 5 μl de buffer de siembra y 15 μl de muestra, con una masa final de 20 μg de proteína por calle, salvo que la concentración de la muestra no lo permitiera. Simultáneamente se siembra 5 μl de marcador de peso molecular (Blue Plus® II Protein Marker, 14-120 kDa). Las electroforesis se realizaron a 15mA por 15 minutos para la corrida en el gel de apilamiento y a 40mA constantes por 90 minutos aproximadamente para el gel separativo, con fuente PowerPac Universal Power Supply, en un sistema vertical Mini Protean Bio Rad.

Para su revelado se colocó el gel en solución de tinción: 0,1 % de azul de Coomassie Brilliant G-250 (Sigma-Aldrich), 50 % Metanol, y 10% Ácido Acético durante toda la noche y luego se utilizó solución de destinción 40 % metanol hasta evidenciar las bandas de proteínas. Finalmente se obtiene la fotografía mostrada en la Figura 6.

3.2.3. Cuantificación de citoquinas.

Se realizó ELISA de captura no competitivos, para la cuantificación de citoquinas en los pools de fase soluble de homogenatos de las muestras C22/1 y C22/2, utilizando los reactivos y protocolos comerciales para TNF- α , IL8, IL-6 e IL-10, provistos por Elisa BD OptEIA™ set Human, San Diego. U.S.A.

En todos los casos se sensibilizaron los pocillos a utilizar con 50 μ l de anticuerpo de captura (específicos para cada citoquina), en una dilución 1:250 de buffer de pegado (carbonato/bicarbonato pH 9,5), y se incubaron las placas en su cámara húmeda toda la noche en heladera. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS tween 20 al 0.05% (buffer de lavado). Se bloquearon los pocillos con 200 μ l de suero fetal bovino al 10% en PBS por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego se realizan 3 lavados con buffer de lavado. Se sembraron 50 μ l de las muestras C22/1 y C22/2 por duplicado y la curva patrón construida a partir de estándares de concentración conocida para cada citoquina estudiada, en igual condiciones que las muestras, y se incubaron las placas de ELISA en cámara húmeda por 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se realizaron 5 lavados con buffer de lavado, y se agregaron 50 μ l de anticuerpo de detección (anticuerpo de detección biotinilado más conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante). Se incubaron en cámara húmeda por 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 7 lavados con buffer de lavado, y se sembraron 50 μ l de solución de TMB (tetrametilbencidina), sustrato de la enzima peroxidasa que genera un producto coloreado detectable espectrofotométricamente. Se incubaron por 30 minutos en oscuridad y agitación suave a temperatura ambiente, y posteriormente se agregó 25 μ l de solución de parada (ácido fosfórico 1M) para finalizar la generación de producto coloreado. Por último, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm, en lector de microplacas (BIO-RAD iMark™ Microplate Absorbance Reader). Para obtener la concentración de las citoquinas presentes en las muestras C22/1 y C22/2, se interpolaron los Log de los valores de absorbancia obtenidas en la recta patrón. Se muestran

los resultados en las Figuras 7 y 8. Por último, se refirió la concentración de citoquinas a la masa total de proteínas presentes para estandarizar la expresión de resultados entre lotes. resultados que se muestran en la Tabla 8.

3.3. Evaluación de la proliferación celular en línea celular de macrófagos.

Para evaluar la existencia de posibles efectos citotóxicos de las muestras C22/1 y C22/2 se emplearon dos ensayos.

3.3.1. Recuento de células viables en cámara de Neubauer.

El recuento de células viables se realizó en cámara de Neubauer con Azul Tripán. Se mezcló un volumen de suspensión celular con uno igual de disolución de azul tripano (de 2 a 4 g/L), el cual solo puede penetrar las membranas plasmáticas de células no viables, diferenciándolas en azuladas (no viables) y refringentes blanquecinas (viables). Se aplicó la mezcla al hemocitómetro (cámara de Neubauer) y se observó al microscopio. Se contabilizaron en paralelo las células teñidas de azul y las no teñidas en los 4 cuadrantes externos de la cámara. La viabilidad celular de la muestra se calculó como:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{N_{\text{viables}}}{(N_{\text{viables}} + N_{\text{no viables}})} \times 100 \text{ (formula 1)}$$

Para realizar el ensayo, se partió de células THP1 cultivadas como se mencionó anteriormente en el punto 3.1.

El ensayo se realizó en dos oportunidades por dificultades en el desarrollo experimental.

En la primera oportunidad se utilizaron 48 pocillos de una placa de cultivo de 96 pocillos (BIOFIL®), para sembrar 100 µl de suspensión de células en medio de cultivo suplementado con PMA, con aproximadamente 80.000 células THP1 y se incubó durante 72 hs a 37° C y 5% CO₂, para permitir su diferenciación a macrófagos en la placa de cultivo.

Posteriormente se retiró el medio de cultivo suplementado con PMA, y se agregaron 100 µl de las muestras C22/1 y C22/2, en concentración de proteínas de; 1000 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml y 5 µg/ml, más blanco con RPMI SFB 2 %. Se realizaron duplicados de todas las condiciones. Se incubaron durante 24 hs a 37° C y 5% CO₂.

Transcurrido el tiempo se procedió a apartar los sobrenadantes, 100 µl, e identificarlos, para no perder posibles células en suspensión y unificarlas posteriormente con las células adheridas a la placa de cultivo. Para resuspender las células adheridas a los pocillos, se aplicaron 50 µl de tripsina sobre la monocapa, seguido de incubación en bloque térmico a 37° C durante 10 minutos condiciones adecuadas para promover la acción proteolítica de la tripsina. A continuación, se inactivó la tripsina con 50 µl de RPMI SFB al 10%. Se unificaron los 100 µl de sobrenadantes con los 100 µl de células en suspensión, obteniendo 200 µl por condición a evaluar.

Luego se tomaron 20 µl de cada condición para realizar dilución al medio con azul de tripano. Se monta la cámara de Neubauer y se agregan 10 µl de la dilución. Al observar en los cuadrantes el número de células fue ínfimo. Se logró identificar el error: al intentar resuspender los macrófagos adheridos a la placa de cultivo, no fue factible lograrlo y se generó error por defecto. Observamos células aún adheridas a la placa, por lo que concluimos que el tiempo de acción de la tripsina, o el volumen agregado no fueron suficientes para lograr la separación de todas las células. Se decidió realizar el ensayo modificando el protocolo empleado.

En la segunda oportunidad se parte de las mismas condiciones de cultivo, pero el ensayo se realizó en placa de 24 pocillos (BIOFIL®), sembrando la totalidad de la placa, se agregaron 250 µl de suspensión de células conteniendo aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células THP-1. Se incubó durante 72 hs a 37° C y 5% CO₂, para permitir su diferenciación a macrófagos en la placa de cultivo.

Posteriormente se retiró el medio de cultivo suplementado con PMA y se agregaron 450 µl de las muestras C22/1 y C22/2 en concentración de proteínas de 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml y 6,25 µg/ml más blanco con RPMI SFB 2 %. Todas las condiciones se agregan por duplicado. Se incubaron durante 24 hs a 37° C y 5% CO₂. Transcurridas las 24 horas se separaron los 450 µl de los sobrenadantes en colectores, y se procedió a centrifugarlos durante 5 minutos a 11000 rpm. Luego se descartó el sobrenadante y se conservó el pellet. Para resuspender las células adheridas a los pocillos, se realizó un lavado con 100 µl de tripsina que se descartó, posteriormente se aplicó 200 µl de tripsina y se incubó en bloque térmico a 37° C durante 15 minutos. A continuación, se inactivó la tripsina con 200 µl de RPMI SFB al 10%. Por último se unificaron los pellets con los respectivos 400 µl de células en suspensión de cada condición.

Luego se tomó 100 µl de cada condición para realizar una dilución al medio con azul de tripano. Se monta la cámara de Neubauer y se agregan 10 µl de la dilución. Se contabilizó las células en los cuadrantes mencionados y se aplicó Fórmula 1, los resultados se muestran en Tabla 9 y Figura 9.

3.3.2. Determinación de la viabilidad celular utilizando sales de formazán.

Para determinar la viabilidad celular por el método de sales de formazan, se empleó MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio), soluble en agua, con color amarillo, que al reducirse produce un compuesto de color violeta e insoluble en agua, perteneciente a la familia de los formazanos. El uso del MTT nos permitió estimar la actividad metabólica, ya que la acción sobre el MTT se debe principalmente a las deshidrogenasas mitocondriales de células viables. Las sales de formazán generadas se cuantificaron, tras su disolución en etanol 70%, a través de la medición de su absorbancia a 595 nm en lector de placas (BIO-RAD iMark™ Microplate Absorbance Reader). La viabilidad celular de la muestra se calculó como:

$\% \text{ viabilidad celular} = (\text{Abs de células tratadas} / \text{Abs promedio de células sin tratar}) \times 100$
(formula 2)

Para la determinación se usó una placa de 96 pocillos (BIOFIL®) de los cuales se emplearon 48 pocillos, sembrándolos con suspensión celular conteniendo aproximadamente 8×10^4 células THP-1 suplementadas con PMA, se incubó durante 72 hs, a 37° C y 5% CO₂.

Transcurrida las 72 horas se retiró el medio de cultivo, y se agregaron 200 µl de las muestras C22/1 y C22/2 en concentración de proteínas de; 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml y 6,25 µg/ml, mas blanco con RPMI SFB 2 %, y se incubaron durante 24 hs a 37° C y 5% CO₂. Todas las condiciones se agregaron por cuadruplicado.

Posterior a las 24 horas, se agregó a cada pocillo 12,5 µl de solución de MTT (4 mg/ml) se incubó durante 3 horas a 37°C y 5% CO₂. Se descartaron los sobrenadantes y se agregaron 100 µl de etanol 70% para disolver los cristales generados. Finalmente se midió la absorbancia en lector de placas a 595 nm. La viabilidad celular de la muestra se calculó utilizando la fórmula 2, los resultados se muestran en la Figura 10.

3.4. Investigar in vitro la re-polarización de macrófagos M1 a M2.

3.4.1. Cuantificación de citoquinas por ELISA en sobrenadantes de cultivos de macrófagos.

Para la cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de cultivo se emplearon placas de 24 pocillos (BIOFIL®), conteniendo aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células THP-1. cultivadas como se enuncia en el punto 3.1. Sobre esta se realizó un primer ensayo, donde se aplicaron por cuadruplicado los siguientes tratamientos.

Tabla 1. Tratamientos aplicados por columna.					
1) control celular (CC)	2) C22/1	3) C22/2	4) LPS	5) LPS C22/1	6) LPS + C22/2
RPMI 500 μ l	RPMI 250 μ l + C22/1 250 μ l	RPMI 250 μ l + C22/2 250 μ l	RPMI 250 μ l + LPS 250 μ l	LPS 250 μ l + C22/1 250 μ l	LPS 250 μ l + C22/2 250 μ l

*C22/1 y C22/2 concentración final de 50 μ g/ml

*LPS concentración final de 100 ng/ml.

Los sobrenadantes de cultivo se recogieron a dos tiempos, 6 y 20 horas, por duplicado para cada condición y tiempo. Luego fueron analizados con la metodología empleada en el punto 4.1.3. para la detección de IL-8, IL-6 e IL-10 utilizando kits Elisa BD OptEIA™ set Human, San Diego. U.S.A.

Frente a resultados similares entre las dos muestras ensayadas C22/1 y C22/2 y considerando que provienen del mismo lote. Se decidió continuar con la muestra C22/1 para la cuantificación de citoquinas a distintas concentraciones de proteínas. Para esto se empleó otra placa de cultivo de 24 pocillos con las mismas condiciones de cultivo mencionadas en el ensayo anterior, sobre esta se aplicaron por duplicado los siguientes tratamientos.

Tabla 2. Tratamientos aplicados.					
6h		20 h			
1) control celular (CC)	2) 1000 µl/ml	3) control celular (CC)	3) 50 µl/ml	4) 500 µl/ml	5) 1000 µl/ml
RPMI 500 µl	RPMI 250 µl + C22/1 250 µl	RPMI 500 µl	RPMI 250 µl + C22/1 250 µl	RPMI 250 µl + C22/1 250 µl	RPMI 250 µl + C22/1 250 µl
RPMI 250 µl + LPS 250 µl	C22/1 250 µl + LPS 250 µl	RPMI 250 µl + LPS 250 µl	C22/1 250 µl + LPS 250 µl	C22/1 250 µl + LPS 250 µl	C22/1 250 µl + LPS 250 µl

*LPS concentración final de 100 ng/ml

Los sobrenadantes de cultivo se recogieron a los tiempos mostrados en Tabla 2. Luego fueron analizados con la metodología empleada en el punto 3.2.3. para la detección de IL8, IL-6 e IL-10 utilizando kits Elisa BD OptEIA™ set Human, San Diego. U.S.A.

3.4.2. Cuantificación de expresión de genes de citoquinas mediante RTqPCR.

Para la cuantificación de ARN mensajero producto de la expresión de los genes de citoquinas IL-10, IL-8, TNFAIP3 y actina β, se utilizó kit comercial para extracción de ARN total en columna (General Electric), aplicando las recomendaciones del fabricante. Luego se determinó el ARN total extraído mediante su absorbancia a 260 nm. Y su pureza respecto a proteínas, mediante la relación de sus absorbancias a 260/280 nm.

Posteriormente se generaron cADN por reacción de transcripción reversa, utilizando protocolos y reactivos iScript cDNA synthesis (Bio-rad).

La expresión genética se determinó por real time PCR utilizando reactivos iQ SYBR Green Supermix (Bio-rad) y cebadores específicos para IL8, IL10, TNFAIP3 y actina β. Finalmente se cuantificó el ARNm normalizado con la expresión del transcrito de actina β presente en cada muestra.

Extracción de ARN.

Se utilizaron para el ensayo los macrófagos empleados en el punto 3.4.1. tratados como se indica en la Tabla 1. a las 6 hs de tratamiento. Las extracciones se realizaron unificando las condiciones duplicadas por lo que, se realizó la extracción del ARN de aproximadamente 5×10^5 células. Para esto se agregó sobre uno de los pocillos del duplicado 350 μ l de solución de lisis más 3,5 μ l de β -mercaptoethanol, se resuspendió con tips repetidas veces y se trasvaso al duplicado. Seguidamente se colocó el homogenato generado en Mini filtro introducido en tubo colector. se centrifugó a temperatura ambiente durante 1 minuto a 11000 g, se descartó el mini filtro. Posteriormente se agregó 350 μ l de etanol 70°, luego se transfirió los 700 μ l a Mini columna RNAspin colocada dentro de un nuevo colector, se centrifuga durante 30 segundos a 8000 g, se descartó el colector, y se colocó la Mini columna RNAspin en nuevo colector Se agregaron 350 μ l de Desalting Buffer, para centrifugar nuevamente 1 minuto a 11000 g. Posteriormente se aplicaron 95 μ l de mezcla de reacción DNAsa I, y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados, el primero con 200 μ l de Buffer de lavado I, se centrifuga 1 minuto a 11000 g y se transfiere Mini columna RNAspin a un nuevo colector. El segundo lavado se realiza con 600 μ l de Buffer de lavado II, se centrifuga 1 minuto a 11000 g, se descarta el fluido del colector. El tercer y último lavado se realiza con 250 μ l de Buffer de lavado II, se centrifuga por 2 minutos a 11000 g. Finalmente se colocó la Mini columna RNAspin en tubo de 1,5 ml, y se agregaron 30 μ l de agua libre de RNAsa. Se centrifugó por 1 minuto a 11000 g para obtener una solución de lARN presente en la muestra.

El procedimiento se realizó en cabina de bioseguridad clase II (Nuair, Modelo UN-540-300E).

Cuantificación de ARN extraído.

Para la cuantificación del ARN extraído y evaluación del rendimiento de extracción, se realizó la medición en espectrofotómetro a 260 y 280 nm de cada muestra. Estas fueron diluidas 1/10 con agua libre de RNAsas, para lo que se tomó 10 μ l de cada muestra de extracción, y se llevó a un volumen final de 100 μ l.

Los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción a 260 nm y las proteínas a 280 nm. El cociente de las absorbancias (260 nm/ 280 nm) nos permite conocer el rendimiento de la

extracción de material genético, un valor cercano a 2 nos habla de un buen rendimiento mientras que valores más pequeños indican una purificación ineficiente. Para conocer la concentración del ácido nucleico extraído se puede aplicar la siguiente ecuación:

$$\text{Ácidos nucleicos } (\mu\text{g/ml}) = \text{abs } 260 \times 40 \times \text{factor de dilución (fórmula 3)}$$

cDNA.

Para el pasaje a cDNA, del ARN extraído, se utilizó la siguiente proporción de reactivos por muestra:

Tabla 3.	
Mezcla de reacción	Volumen μl
Transcriptasa inversa iScript	1
Buffer iScript 5x	4
dNTPs 10 mM	1
Cebadores oligo (dT) (0,5ng/ml)	1
Muestras de ARN	13
Volumen	20

Se incubaron primeramente las muestras de extracción con los cebadores a 65°C durante 5 minutos para promover la apertura de interacciones inespecíficas de los RNA molde, seguido de 2 minutos a 4°C para promover el apareamiento de los cebadores aleatorios. Luego se agregaron los otros componentes de la mezcla de reacción y se incubó a 42°C durante 30 minutos para que ocurra la retrotranscripción Finalmente se colocó a 85°C durante 1 minuto para inactivar la enzima. Se obtuvieron 20 μl de cDNA por muestra.

Real time PCR.

Para realizar la real time PCR de los cDNA obtenidos, se utilizó la siguiente proporción de reactivos por muestra:

Tabla 4.	
Mezcla de reacción	volumen μ l
iQ TM SYBR Green Supermix 2X	12
Cebador directo	1
Cebador reverso	1
Muestra de cDNA	2,5
Agua libre de RNasa	7,5
Volumen final	24

Los cebadores utilizados corresponden a:

Tabla 5. Cebadores empleados y secuencias			
Cebador	Secuencia	b	pb
Actina β directo	CCTGGCACCCAGCACAAT	18	
Actina β reverso	GCCGATCCACAGGGAGTACT	20	
Amplicon Actina			70
IL-8 directo	CACCGGAAGGAACCATCTC	19	
IL-8 reverso	GGAAGGCTGCCAAGAGACC	20	
Amplicon IL-8			72
IL-10 directo	TGCCTTCAGCAGAGTGAAGA	20	
IL-10 reverso	GGTCTTGGTTCTCAGCTTGG	20	
Amplicon IL-10			170
TNFAIP3 directo	TCGTCTTGGCTGAGAAAG	18	
TNFAIP3 indirecto	GGAGGTGGAATGGCTCTGC	19	
Amplicon TNFAIP3			61

Las muestras se sembraron en placa de 96 pocillos para qPCR (Bio-Rad) sellada con película óptica, y colocadas en termo ciclador CFX96 (Bio-rad) donde se sometió al protocolo mostrado en Tabla 6.

Tabla 6. protocolo de ciclos térmicos		
3 minutos a 95° C	Activación de la polimerasa y desnaturalización de los cDNA	
15 segundos a 95° C	Desnaturalización	40 ciclos de amplificación
60 segundos a 55° C	Apareamiento y extensión	
Aumento cada 5 segundos de 0,5° C	Rampa de temperatura de 55-95 ° C obtengo temperatura de fusión (Tm)	

Los resultados obtenidos fueron tratados con el método Delta Delta Ct (Livak y col., 2001) se muestran en la Figura 15 y 16.

3.5. Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos de las variables cuantitativas con distribución normal se realizaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un post-test de comparación múltiples. Se evaluaron valores atípicos con test de Grubb. Todos los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism, versión 8.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego USA).

4. Resultados y discusión.

4.1. Caracterización de los apósitos de cordón umbilical.

4.1.1. Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de proteínas sobre la fase soluble de los extractos, obtenidos de los homogenatos de cordón umbilical, se realizó mediante el método de Bradford como se indicó en el punto 3.2.1. Los resultados se muestran en la tabla 7.

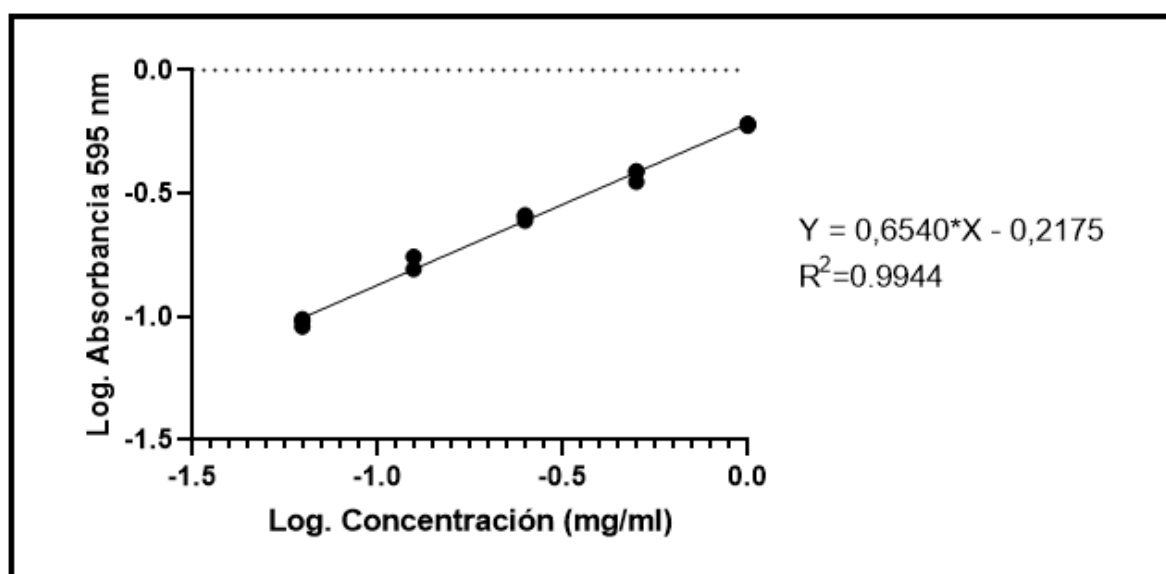


Figura 5. Curva de calibración de proteínas, albúmina bovina 1 mg/ml.

Tabla 7. Concentración de proteínas obtenidas de la fase soluble de los extractos de cordón umbilical humano.						
Muestra	Peso de homogenato g.	Abs. 585 nm		mg/ml		Promedio
C22/1	2,5943	0,651	0,672	6,489	6,846	6,616
C22/2	2,5452	0,635	0,667	6,044	6,740	6,492

Al comparar los resultados mostrados en la tabla 7 se puede establecer que no se observan diferencias considerables en la concentración de proteínas extraídas en la fase soluble de ambas muestras. Puede distinguirse un peso superior del homogenato disco 1 con respecto al disco 2, que es concordante con un ligero incremento de la concentración de las proteínas

extraídas en la muestra C22/1 con respecto a C22/2, mostrando uniformidad en el método de extracción.

4.1.2. SDS- PAGE.

Se realizó una corrida electroforética (figura 6) bajo las condiciones especificadas en el punto 3.2.2. sobre las extracciones sucesivas de las fases solubles de ambas muestras, con tres objetivos: en primer lugar, determinar si los perfiles proteicos de las extracciones coinciden entre sí dentro de la misma muestra; en segundo lugar, si los perfiles de extracción entre las diferentes muestras presentan diferencias; y finalmente evaluar la reducción del rendimiento de las sucesivas extracciones.

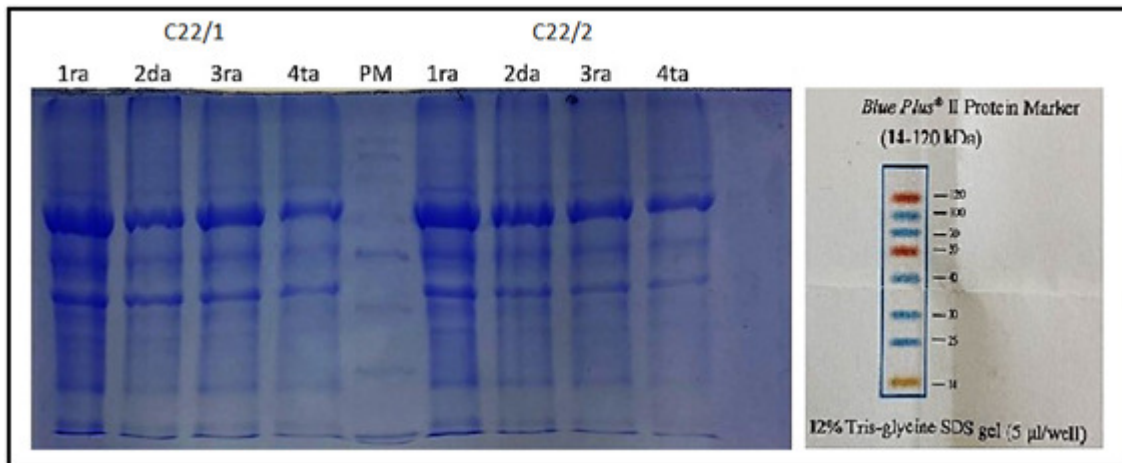


Figura 6. SDS-PAGE de fase soluble de extractos de homogenatos liofilizados de cordón umbilical. De izquierda a derecha número de extracción sobre el mismo pellet de muestras C22/1 y C22/2, calle PM patrón de peso molecular.

Al evaluar la Figura 6, se observó el mismo patrón en las sucesivas extracciones. Entre las muestras C22/1 y C22/2, no se observan diferencias entre los patrones de extracción. Y al cabo de las sucesivas extracciones se va observando menor intensidad en las bandeas de las calles. Para la última extracción, el volumen de muestra a sembrar limitó la masa de proteínas agregadas, por lo que la menor intensidad se debe a esto.

En base a estos resultados se decide realizar pool de las sucesivas extracciones de las muestras C22/1 y C22/2, con las primeras 3 extracciones por encontrarse las bandas de extracción con

mayor intensidad e igual patrón. Por lo que las Muestras C22/1 y C22/2 hacen referencia a los pools de estas tres extracciones.

4.1.3. Cuantificación de citoquinas por ELISA.

Para evaluar la presencia de citoquinas y su cuantificación en las muestras C22/1 y C22/2 se realizó ELISA de captura no competitivo en busca de, TNF- α , IL8, IL-6 e IL-10, se utilizó el procedimiento descrito en el punto 3.2.3. Se muestran las curvas estándares en las Figuras 7 y 8, y los resultados obtenidos en la tabla 8.

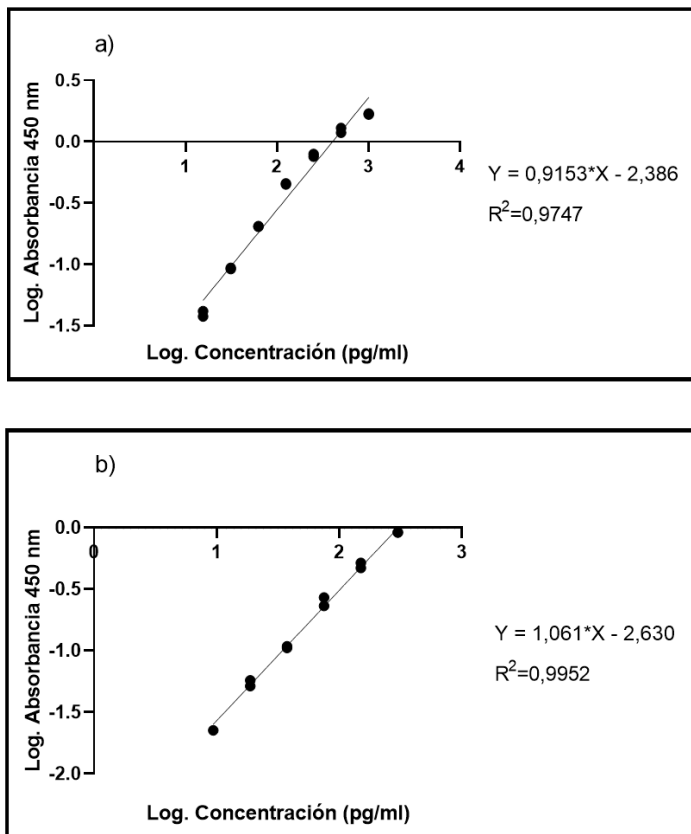


Figura 7. a) Curva estándar IL-8 humano kit comercial; b) Curva estándar IL-6 humano kit comercial.

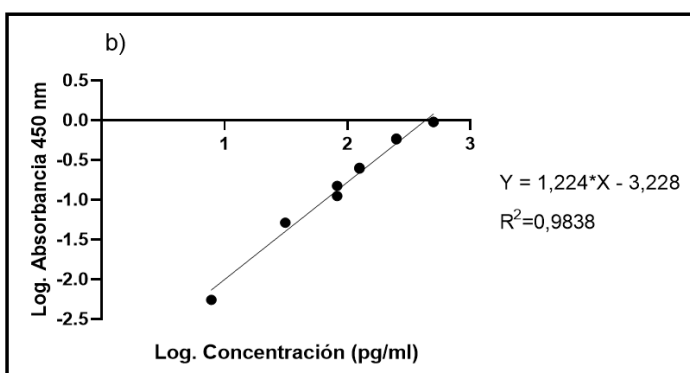
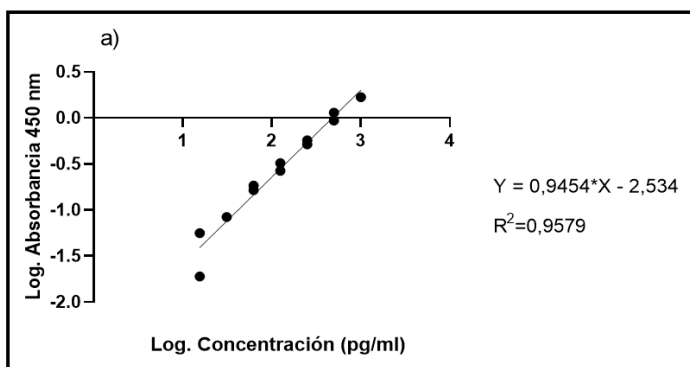


Figura 8. a) Curva estándar TNF- α humano kit comercial; b) Curva estándar IL-10 humano kit comercial.

Tabla 8. Concentración de citoquinas humanas, obtenidas de la fase soluble de los homogenatos de cordón umbilical, muestras C22/1 y C22/2							
Citoquina	Muestra	Abs 450 nm		pg/ml		Promedio pg/ml	pg citoquina/mg de proteína muestra
IL-8	C22/1	0,262	0,255	307,872	294,760	301,316	45,546
IL-8	C22/2	0,251	0,254	287,204	292,829	290,017	45,372
IL-6	C22/1	0,058	0,062	ND*	ND*	ND*	ND*
IL-6	C22/2	0,062	0,064	ND*	ND*	ND*	ND*
TNF- α	C22/1	0,063	0,065	ND*	ND*	ND*	ND*
TNF- α	C22/2	0,061	0,058	ND*	ND*	ND*	ND*
IL-10	C22/1	0,081	0,084	ND*	ND*	ND*	ND*
IL-10	C22/2	0,087	0,094	ND*	ND*	ND*	ND*

*ND: no detectable.

En la Tabla 8, se muestran los resultados de la caracterización de las citoquinas analizadas, obteniéndose que solo fue detectable, IL-8 y que no presentan diferencias entre las dos muestras para esta interleuquina, presentando un valor aproximado de 45,0 pg IL-8/mg proteína, mientras que; TNF- α no fue detectable por el método por lo tanto, de encontrarse en las muestras su concentración ha de ser menor a 15,6 pg/ml. Misma situación para IL-6 e IL-10 que de encontrarse en las muestras su concentración es menor a 9,4 pg/ml y 7,8 pg/ml, respectivamente.

4.2. Viabilidad celular.

Para evaluar la capacidad inmunomoduladora sobre macrófagos, como se propone en los objetivos, es importante considerar si las muestras C22/1 y C22/2 presentan efecto citotóxico sobre este tipo celular. Por lo tanto, se decidió evaluar la viabilidad celular mediante los métodos descritos en los puntos 3.3.1. Recuento de células viables en cámara de Neubauer y 3.3.2. viabilidad celular por sales de formazán (MTT). Los resultados del conteo frente a distintas concentraciones de las muestras, se visualizan en la Tabla 9 y Figura 9.

Tabla 9 Recuento de células viables en cámara de Neubauer con Azul Tripán											
		Muestra C22/1					Muestra C22/2				
	Condición	q1	q2	q3	q4	%	q1	q2	q3	q4	%
Control	Azul	0	0	1	0		0	0	0	0	
	Refringente	10	9	16	13		19	12	21	17	
	Total	10	9	17	13	98,0	19	12	21	17	100,0
100 μ g/ml	Azules	3	0	2	0		0	0	0	0	
	Refringente	16	12	11	17		18	18	7	20	
	Total	19	12	13	17	91,8	18	18	7	20	100,0
50 μ g/ml	Azules	1	0	2	1		0	1	1	0	
	Refringente	4	7	10	3		15	9	15	13	
	Total	5	7	12	4	85,7	15	10	16	13	96,3
25 μ g/ml	Azules	1	0	2	2		3	1	1	2	

	Refringente	3	0	1	2		17	13	12	19	
	Total	4	0	3	4	54,5	20	14	13	21	89,7
12,5 µg/ml	Azules	2	2	2	3						
	Refringente	10	4	7	5						
	Total	12	6	9	8	74,3	11	12	23	12	100,0
6,25 µg/ml	Azules	1	2	3	1		0	1	1	1	
	Refringente	8	8	8	7		17	16	10	10	
	Total	9	10	11	8	81,6	17	16	11	11	95,2
Control	Azules	4	4	2	2		4	1	3	2	
	Refringente	8	14	11	7		24	10	17	22	
	Total	12	18	13	9	76,9	28	11	20	24	88,0
100 µg/ml	Azules	2	5	0	3		0	2	0	0	
	Refringente	18	17	19	19		7	9	7	13	
	Total	20	22	19	22	88,0	7	11	7	13	94,7
50 µg/ml	Azules	2	1	1	2		1	1	2	1	
	Refringente	16	8	15	9		14	16	16	22	
	Total	18	9	16	11	88,9	15	17	18	23	93,2
25 µg/ml	Azules	8	11	10	11		2	1	2	1	
	Refringente	28	52	31	25		10	9	6	9	
	Total	36	63	41	36	77,3	12	10	8	10	85,0
12,5 µg/ml	Azules	8	5	8	14		2	1	0	2	
	Refringente	22	30	23	30		15	19	15	23	
	Total	30	35	31	44	75,0	17	20	15	25	93,5
6,25 µg/ml	Azules	3	6	5	4		0	1	1	1	
	Refringente	21	19	18	16		17	16	10	10	
	Total	24	25	23	20	80,4	11	18	16	16	86,6

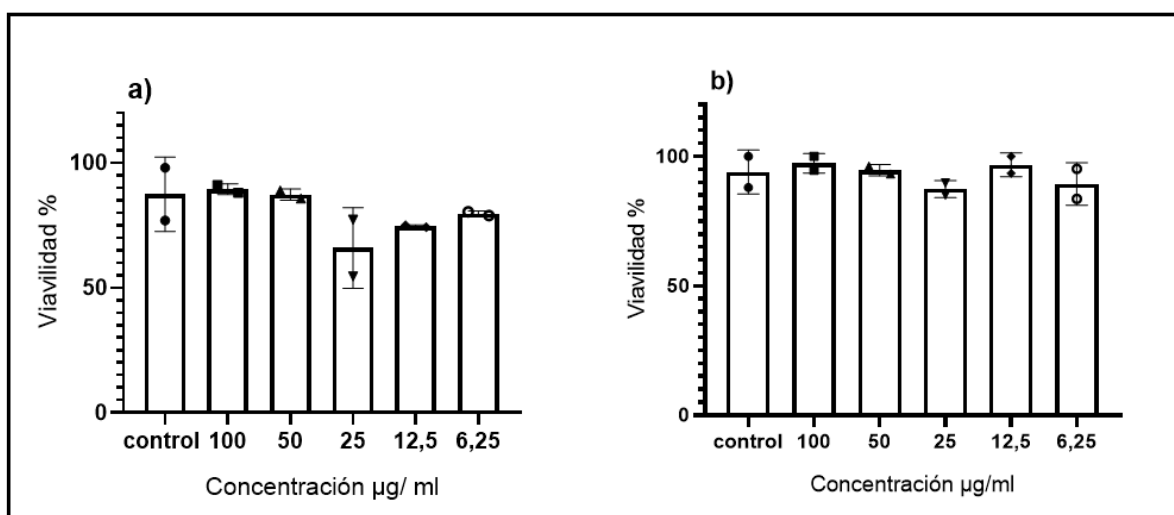


Figura 9. Viabilidad celular evaluada con azul Tripán, Células THP-1 diferenciadas con PMA y tratadas con diferentes concentraciones de muestra C22/1, gráfico a), y C22/2 gráfico b), expresado en porcentajes. No se encuentran diferencias significativas de los tratamientos frente al control con $P < 0,05$. $n=2$.

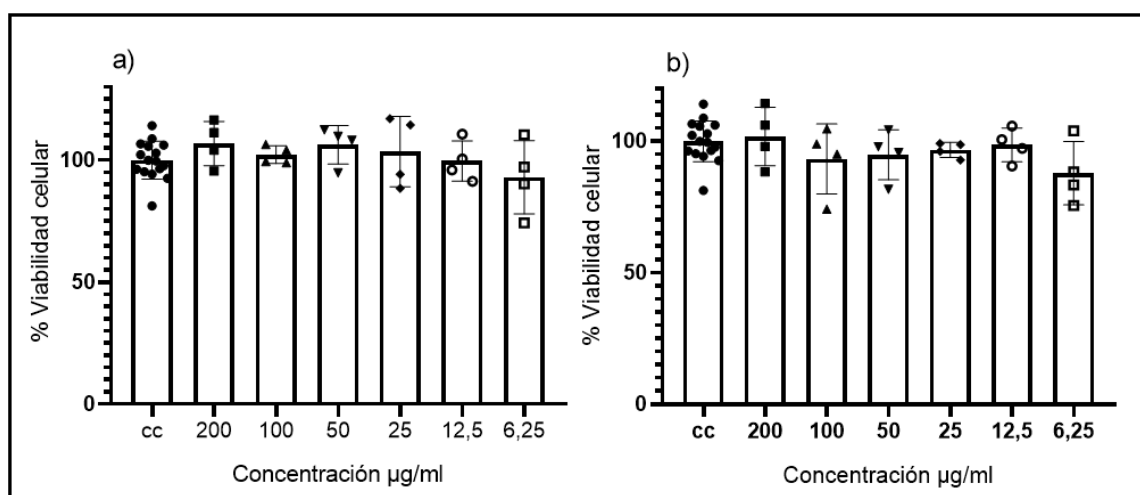


Figura 10. Viabilidad celular evaluada por sales de formazán, Células THP-1 diferenciadas con PMA y tratadas con diferentes concentraciones de muestra C22/1, gráfico a), Y C22/2 gráfico b), expresado en porcentajes de viabilidad, cc; control de células no tratadas. No se encuentran diferencias significativas de los tratamientos frente al control con $P < 0,05$.

Al evaluar los resultados mostrados en la Figura 9 y 10, se puede determinar que las muestras, C22/1 y C22/2, aplicadas sobre las células THP-1 tratadas con PMA, no presentan citotoxicidad, ya que no se ven afectadas negativamente por las distintas concentraciones de extractos de cordón umbilical ensayadas.

4.3. Investigación in vitro de la re-polarización de macrófagos M1 a M2.

Para esta sección se decidió evaluar la posible inmunomodulación de las muestras C22/1 y C22/2, mediante dos procedimientos, primero por la cuantificación de citoquinas por ELISA, de los sobrenadantes de cultivo de células THP-1 diferenciadas a macrófagos y expuestas a LPS. Y segundo, midiendo la expresión de ARN mensajero a las 6 horas de los tratamientos, para los genes de IL-8, IL-10 y TNFAIP3 sobre los mismos cultivos celulares.

4.3.1. Cuantificación de citoquinas por ELISA en sobrenadantes de cultivos de macrófagos.

Para evaluar si la fase soluble de los homogenatos de cordón umbilical, tiene propiedades inmunomoduladoras, se cuantificó las citoquinas IL-6, IL-8 e IL-10, generadas por los macrófagos diferenciados como se enunció en el punto 3.4.1. (Tabla 1), frente a una concentración de 50 µg de proteína/ml de ambas muestras a los tiempos de 6 y 20 horas, los resultados se muestran en la Figura 11 y 12.

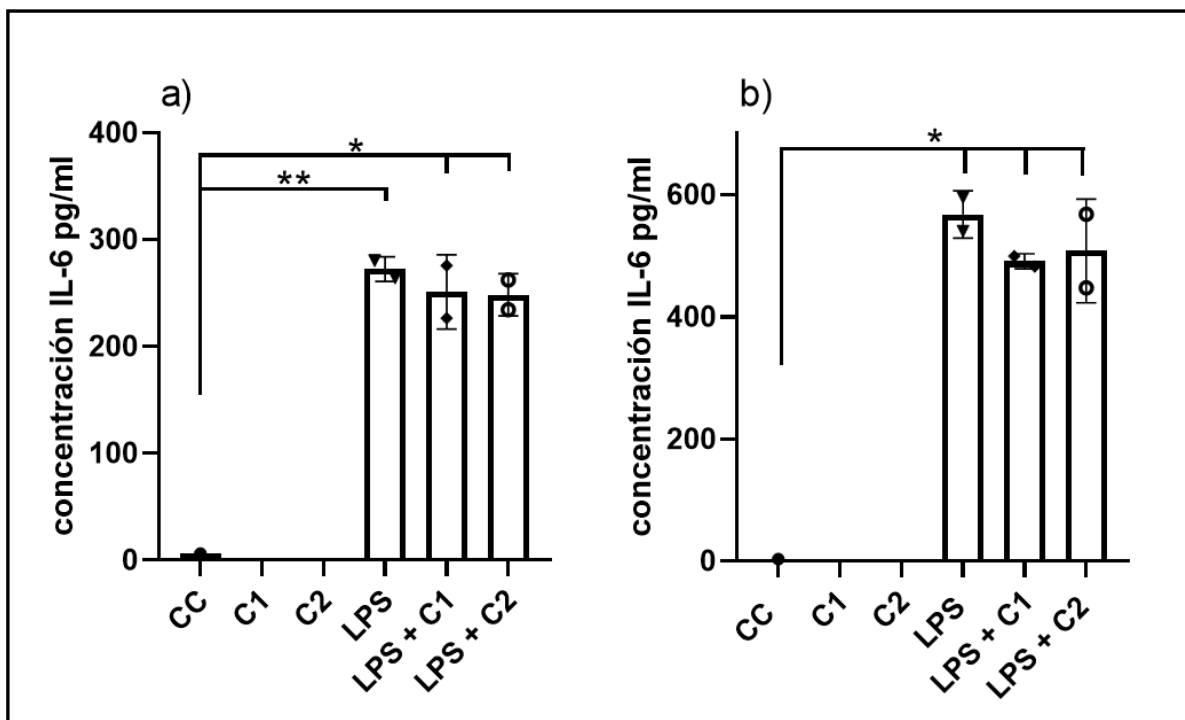


Figura 11. Se muestra en a) concentración de IL-6 a las 6 hs con los diferentes tratamientos, y b) concentración de IL-6 a las 20 hs con los diferentes tratamientos. CC: control de células; C1: 50 µg proteína/ml de C22/1.; C2: 50 µg proteína/ml de C22/2; LPS: 100 ng/ml LPS de *Escherichia coli*; LPS + C1: 50 µg proteína/ml de C22/1 + 100 ng/ml de LPS de *Escherichia coli*; LPS + C2: 50 µg proteína/ml de C22/2 + 100 ng/ml de LPS de *Escherichia coli*. * indica diferencias significativas respecto al CC. *P < 0,05, ** P < 0,01.n=2.

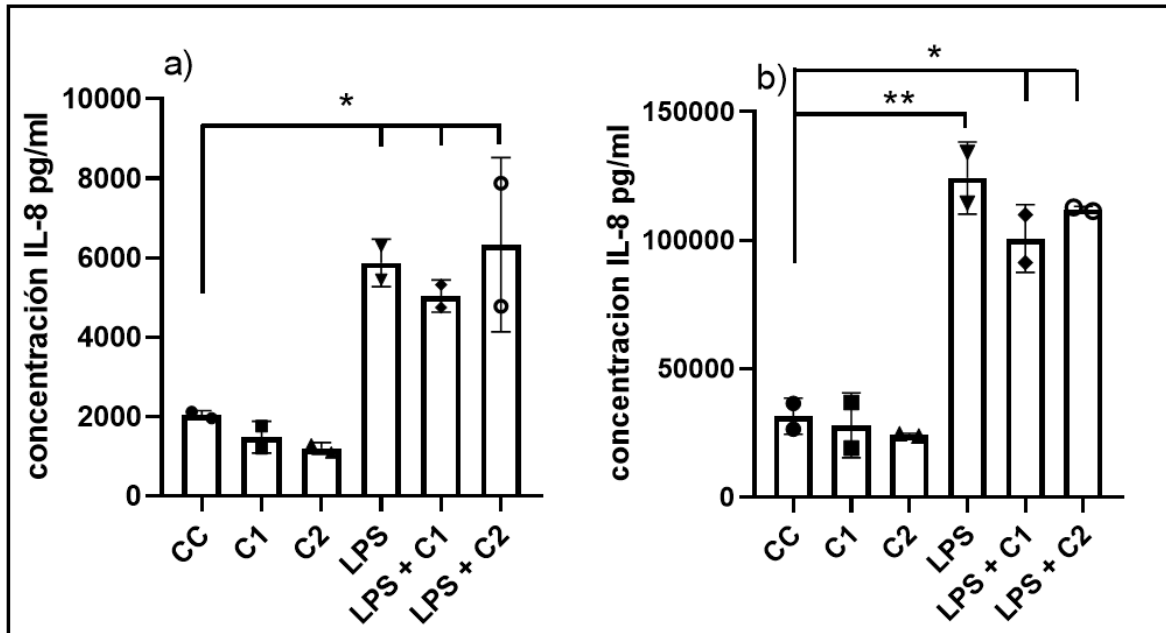


Figura 12. Se muestra en a) concentración de IL-8 a las 6 hs con los diferentes tratamientos, y b) concentración de IL-8 a las 20 hs con los diferentes tratamientos. CC: control de células; C1: 50 µg proteína/ml de C22/1.; C2: 50 µg proteína/ml de C22/2; LPS: 100 ng/ml LPS de *Escherichia coli*; LPS + C1: 50 µg proteína/ml de C22/1 + 100 ng/ml de LPS de *Escherichia coli*; LPS + C2: 50 µg proteína/ml de C22/2 + 100 ng/ml de LPS de *Escherichia coli*. * indica diferencias significativas respecto al CC. *P < 0,05, ** P < 0,01,n=2.

En la Figura 11 se observa que el agregado de las muestras (C1 y C2) sobre las células no genera aumento de IL-6 a las 6 y 20 hs. Con la adición de LPS se observa un aumento esperado de la secreción de IL-6 coherente con su polarización a M1. Al evaluar LPS + muestras (C1 y C2) a las 6 y 20 hs, se observa una tendencia a una menor secreción de IL-6, pero que no es evidente significativamente.

En la figura 12 se observa que el control de células presenta secreción basal de IL-8, que no se ve afectada significativamente con el agregado de las muestras de cordón, ante la adición de LPS se observa un aumento considerable de la secreción de IL-8, al igual que lo observado para IL-6 a las 6 y 20 hs se observa una tendencia a la baja de la secreción de IL-8 con el agregado de las muestras, que se torna más visible a las 20 hs.

Con respecto a la IL-10 no fue posible obtener resultados mediante el método de ELISA, por lo que se considera que su secreción se encuentra por debajo de 7,8 pg/ml que es el límite inferior de la curva estándar.

Ante los resultados similares con las dos muestras utilizadas, se decide continuar sólo con una de las mismas, la muestra C22/1, y así ensayar distintas concentraciones de la muestra sobre las células para determinar si se presentan diferencias ante el aumento de la concentración de la muestra C22/1. Los resultados se muestran en las Figuras 13 y 14.

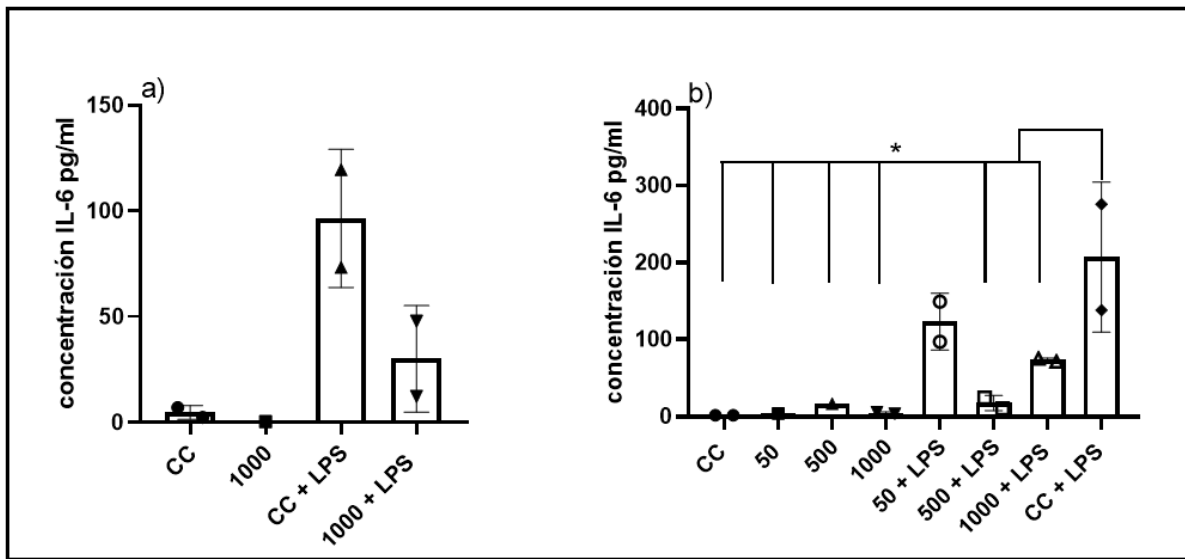


Figura 13. Se muestra en a) concentración de IL-6 a las 6 hs con los diferentes tratamientos, y b) concentración de IL-6 a las 20 hs con los diferentes tratamientos. CC: control de células; 1000: 1000 µg proteína/ml de C22/1; 500: 500 µg proteína/ml de C22/1; 50: 50 µg proteína/ml de C22/1; CC + LPS: 100 ng/ml LPS de *Escherichia coli*; LPS + 1000; 1000 µg proteína/ml de C22/1 + 100 ng/ml de LPS de *Escherichia coli*; 500 + LPS 500 µg proteína/ml de C22/1 + 100 ng/ml de LPS de *Escherichia coli*; 50 + LPS; 50 µg proteína/ml de C22/1 + 100 ng/ml de LPS de *Escherichia coli*; * indica diferencias significativas respecto al CC + LPS. *P < 0,05.n=2

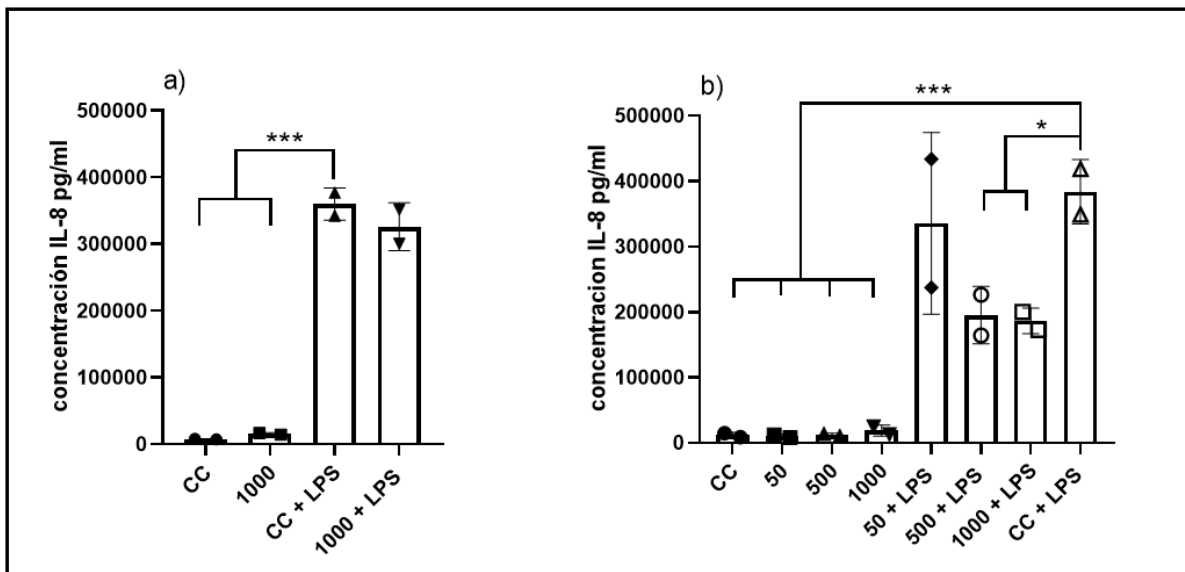


Figura 14. Se muestra en a) concentración de IL-8 a las 6 hs con los diferentes tratamientos, y b) concentración de IL-8 a las 20 hs con los diferentes tratamientos. CC: control de células; 1000: 1000 µg proteína/ml de C22/1; 500: 500 µg proteína/ml de C22/1; 50: 50 µg proteína/ml de C22/1; CC + LPS: 100 ng/ml LPS de *Escherichia coli*; LPS + 1000; 1000 µg proteína/ml de C22/1 + 100 ng/ml de LPS de *Escherichia coli*; 500 + LPS 500 µg proteína/ml de C22/1 + 100 ng/ml de LPS de *Escherichia coli*; 50 + LPS; 50 µg proteína/ml de C22/1 + 100 ng/ml de LPS de *Escherichia coli*; * indica diferencias significativas respecto a CC + LPS. *P < 0,05, ***P < 0,0001 n=2

En la Figura 13a se observa a las 6 hs del tratamiento que el estímulo de 1000 µg proteína/ml de C22/1 sobre los macrófagos no genera aumento de IL-6. Con respecto a la adición de LPS, se observa un aumento de la secreción de IL-6 de acuerdo a lo esperado en un perfil inflamatorio M1, al evaluar LPS + 1000 µg proteína/ml de C22/1 no se observa diferencias significativas por los test estadísticos aplicados, aunque se observa una tendencia a la disminución de secreción de IL-6. A las 20 hs (Fig. 13.b) podemos observar que los controles celulares más las distintas concentraciones de muestra C22/1 no presentan diferencias entre sí por lo que el agregado de las distintas concentraciones de C22/1 no aumentan la secreción de IL-6. Sí se observa diferencias significativas de CC + LPS, frente a los controles celulares y las muestras de 1000 µg proteína/ml de C22/1 más 100 ng/ml de LPS, y 500 µg proteína/ml de C22/1 más 100 ng/ml de LPS, por lo que se puede establecer que las concentraciones de 500 µg/ml y 1000 µg/ml, generan el descenso significativo de la secreción de IL-6.

En la Figura 14a se observa, a las 6 hs del tratamiento que el estímulo de 1000 µg proteína/ml de C22/1 sobre los macrófagos no generan un aumento de IL-8 comparado con el control (CC). Con respecto a la adición de LPS se observa un aumento significativo de la secreción de

IL-8, al evaluar LPS + 1000 μg proteína/ml de C22/1 frente a CC + LPS, no se observan diferencias considerables. A las 20 hs (b) podemos observar igual situación que lo acontecido con IL-6, los controles celulares más las distintas concentraciones de muestra C22/1 no presentan diferencias entre sí. Si es posible observar diferencias estadísticamente significativas entre CC + LPS y las condiciones 1000 + LPS y 500 + LPS, por lo que al igual que para IL-6, las concentraciones de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en presencia de LPS, generan el descenso significativo de la secreción de IL-8.

Con respecto a la IL-10 no fue posible mediante el método de ELISA obtener resultados, por lo que se considera que su secreción se encuentra por debajo de 7,8 pg/ml , que es el límite inferior de la curva estándar.

Por lo expuesto anteriormente se puede establecer que el agregado de las muestras no provoca la polarización de los macrófagos. El agregado de LPS genera la polarización de los macrófagos a un perfil M1 proinflamatorio, Y finalmente ante el agregado de las muestras sobre los macrófagos estimulados con LPS, se observa la modulación de la secreción de citoquinas hacia su descenso significativo, considerándose a este suceso como a la repolarización de lo macrófagos.

4.3.2. Cuantificación de expresión de genes de citoquinas mediante RTqPCR.

Se cuantificó la expresión de genes de citoquinas mediante cuantificación del ARN mensajero para IL-8, IL-10, TNFAIP3 y Actina β , por parte de los macrófagos expuestos por 6 hs a los tratamientos enunciados en la Tabla 1. Se muestra en Tabla 10, las absorbancias de los productos de extracción a 260 y 280 nm y su grado de pureza relativa al cociente de Abs 260/280. Luego en las Figuras 15 y 16 se observan los resultados de la RTqPCR tratados por el método delta delta Ct.

Tabla 10. Absorbancias de productos de extracción. y su pureza relativa.			
Condición	Abs 260	Abs 280	260/280
Control células, macrofagos	0,457	0,212	2,16
Macrofagos + 50 µg/ml C22/1	0,433	0,213	2,03
Macrofagos + 100 ng ml LPS	0,418	0,205	2,04
Macrofagos + 50 µg/ml de C22/1 + 100 ng/ml LPS	0,410	0,192	2,14

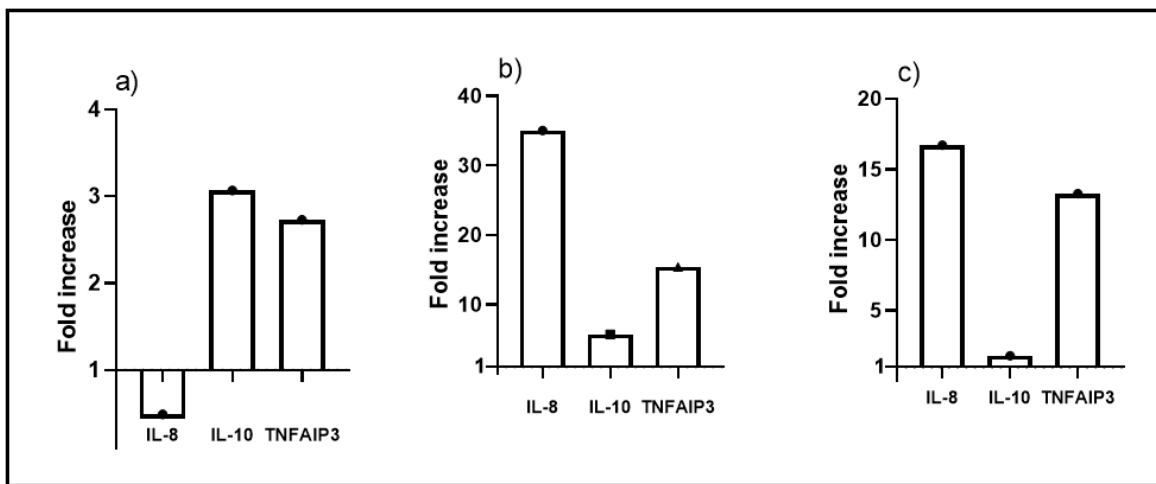


Figura 15. Se muestra el Fold increase (incremento en veces) de distintos tratamientos en relación a la condición basal de expresión de ARNm en células no tratadas. En a) macrofagos mas 50 µg proteína/ml de C22/1; en b) macrofagos mas 100 ng/ml de LPS; en c) macrofagos mas 50 µg proteína/ml de C22/1 más 100 ng/ml de LPS.

En la Figura 15.a) se observó que el agregado por 6 hs de una concentración de 50 µg proteína/ml de C22/1 generó un descenso de la expresión del gen para IL-8, y un aumento de la expresión de los genes de IL-10 y TNFAIP3 con respecto a la condición basal o control. En 15. b) se observó un marcado aumento de la expresión del gen de IL-8 generado por la adición de LPS, al mismo tiempo que aumentó en menor medida la expresión de genes para IL-10 y TNFAIP3 con respecto a la condición basal. Y en 15.c) se apreció un aumento de la expresión de genes con respecto al basal, pero en menor medida a lo observado en 15.b) (notar diferentes ejes y), hecho que podría ser atribuible al efecto modulador de la muestra C22/1.

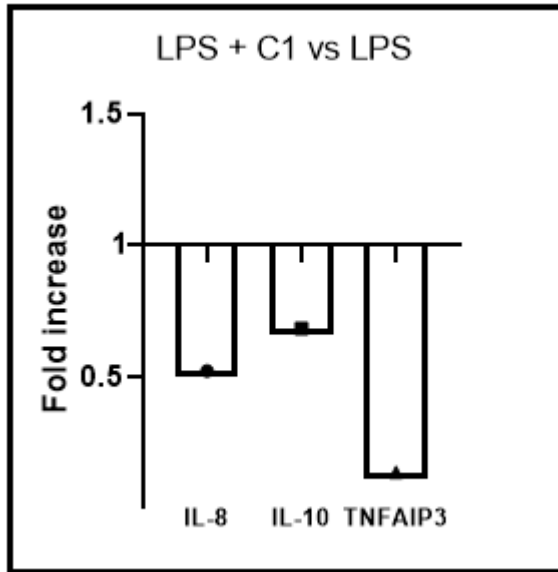


Figura 16. Se muestra el fold increase de la condición macrofagos mas 50 μ g proteína/ml de C22/1 más 100 ng/ml de LPS, en relación a la condición macrofagos mas 100 ng/ml de LPS.

En la Figura 16 se evidencia que al comparar la condición macrofagos tratados con derivados de cordón y LPS, en relación a la condición macrofagos tratados solo con LPS, hay una disminución de la expresión de genes para todas las citoquinas analizadas.

Por lo tanto, la presencia de la muestra C22/1 genera una modulación de la expresión de los genes estudiados sobre los macrofagos expuestos o no a LPS.

5. Conclusiones.

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir:

La metodología de extracción empleada para obtener los componentes solubles en medio RPMI, de los homogenatos de cordón umbilical liofilizados, muestra consistencia, hecho sustentado en la uniformidad de los valores obtenidos para la concentración de proteínas totales evaluado por método de Bradford y los perfiles de extracción observados en el SDS-PAGE. Con respecto a la concentración de citoquinas evaluadas solo pudo ser detectada IL-8 mediante ELISA, en una concentración de 45 pg/mg de proteína extraída.

A futuro se debería caracterizar el material sedimentado y no incluido en los ensayos, en busca de ácido hialurónico y los diferentes tipos de colágeno, por su importante participación en la reparación de heridas.

Se ha podido demostrar que las concentraciones ensayadas de C22/1 y C22/2 sobre macrófagos, no presentan citotoxicidad.

Con respecto a la investigación in vitro de la re-polarización de macrófagos M1 (pro-inflamatorios) a M2 (anti-inflamatorios) mediante el tratamiento con los extractos solubles de apósitos liofilizados de cordón umbilical. Se ha arribado a las siguientes conclusiones.

El agregado de 50 µg proteína/ml de las muestras no modifica la secreción basal de las citoquinas evaluadas. Además no logra modular significativamente la producción de citoquinas tras el agregado de LPS de *Escherichia coli* para generar el fenotipo M1, en ninguno de los tiempos evaluados.

Al realizar los tratamientos de macrófagos con una concentración mayor de derivados de cordón, como lo son 500 y 1000 µg proteína/ml de muestra C22/1, se concluye que la secreción basal de citoquinas no se ve afectada en esta condición, pero sí logra generar una modulación sobre los macrófagos expuestos a LPS, provocando a las 20 horas una disminución significativa en la secreción de IL-6 e IL-8, lo que podría estar indicando un cambio fenotípico, a un perfil antiinflamatorio o M2.

En ninguno de los casos estudiados fue posible mediante ELISA detectar IL-10.

Al evaluar la expresión genética de los ARN mensajeros para las citoquinas IL-8, IL-10 y TNFAIP3, se concluye que la presencia de 50 µg proteína/ml genera una disminución de la expresión de las mismas en macrófagos expuestos a 100 ng/ml de LPS de *Escherichia coli*.

Por lo tanto, en base a estos resultados es posible afirmar que la fase soluble extraída de los homogenatos de cordón umbilical liofilizados posee la capacidad de modular el perfil inflamatorio tipo M1 clásicamente inducido por LPS. El perfil de repolarización conseguido requiere una mayor caracterización. Aun así, el alejamiento del perfil M1 podría explicar los beneficios observados en el tratamiento de heridas prolongadas, en donde ocurre un desequilibrio de las señales para finalizar la etapa inflamatoria en el proceso natural de reparación de heridas.

Como nuevos objetivos generados a partir de los resultados obtenidos se podría evaluar:

- Evaluar la viabilidad de las células expuestas a dosis mayores de muestra.
- Ensayar la relación dosis/respuesta en la modulación de las citoquinas en un rango más amplio, y con mayor n.
- Lograr la clasificación del perfil M2 al cual viró el fenotipo de los macrófagos, mediante la detección de sus marcadores de superficie o sus productos de secreción.

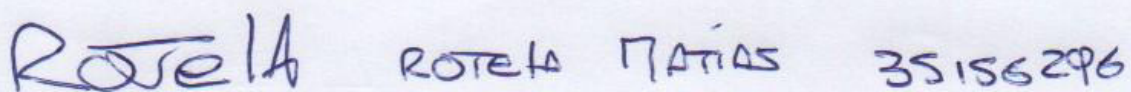
6. Referencias Bibliográficas

- Akle, C. A., Adinolfi, M., Welsh, K. I., Leibowitz, S. & McColl, I. (1981). Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *The Lancet*, 2(8254),1003-5. DOI: 10.1016/s0140-6736(81)91212-5.
- Alexiadou, K. & Doupis, J. (2012). Management of diabetic foot ulcers. *Diabetes Ther*, 3(1), 4. PMID: 22529027; PMCID: PMC3508111.
- Bapat, C. V., & Kothary, P. M. (1974). Preliminary report on acceleration of wound healing by amnion membrane graft. *The Indian journal of medical research*, 62(9), 1342-1346. PMID: 4613648.
- Braun, L. R., Fisk, W. A., Lev-Tov, H., Kirsner, R. S. & Isseroff, R. R. (2014). Diabetic foot ulcer: an evidence-based treatment update. *Am J Clin Dermatol*, 15(3), 267-81. PMID: 24902659.
- Brownrigg, J. R., Davey, J., Holt, P. J., Davis, W. A., Thompson, M. M., KK, R., et al. (2012). The association of ulceration of the foot with cardiovascular and all-cause mortality in patients with diabetes: a meta-analysis. *Diabetologia*, 55(11), 2906-2912. doi: 10.1007/s00125-012-2673-3.
- Bullard, J. D., Lei, J., Lim, J. J., Masee, M., Fallon, A. M., & Koob, T. J. (2019). Evaluation of dehydrated human umbilical cord biological properties for wound care and soft tissue healing. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 107(4), 1035-1046. doi: 10.1002/jbm.b.34196.
- Cornwell, K. G., Landsman, A. & James, K. S. (2009). Extracellular matrix biomaterials for soft tissue repair. *Clin Podiatr Med Surg*, 26(4), 507-23. doi: 10.1016/j.cpm.2009.08.001.
- Dadkhah Tehrani, F., Firouzeh, A., Shabani, I. & Shabani, A. (2021). A review on modifications of amniotic membrane for biomedical applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 1444. doi: 10.3389/fbioe.2020.606982.
- Eming, S. A., Koch, M., Krieger, A., Brachvogel, B., Kreft, S., Bruckner-Tuderman, L., et al. (2010). Differential proteomic analysis distinguishes tissue repair biomarker

- signatures in wound exudates obtained from normal healing and chronic wounds. *J Proteome Res*, 9(9), 4758-66. doi: 10.1021/pr100456d.
- Fainboim, L. & Geffner, J. (2017). Inmunidad innata, Extravasación leucocitaria. Neutrófilos. Macrófagos. Células natural killer en A. Trevani & N. W. Zwinrer (Eds.), *Introducción a la Inmunología Humana* (6° ed., pp. 65-108). Panamericana.
- Galiano, R. D., Tepper, O. M., Pelo, C. R., Bhatt, K. A., Callaghan, M., Bastidas, N., et al. (2004). Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol*, 164(6), 1935-47. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)63754-6.
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314-21. doi: 10.1038/nature07039.
- Hao, Y., Ma, D. H., Hwang, D. G., Kim, W. S. & Zhang, F. (2000). Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*, 19(3), 348-52. doi: 10.1097/00003226-200005000-00018.
- Kim, J. S., Kim, J. C., Na, B. K., Jeong, J. M. & Song, C. Y. (2000). Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res*, 70(3), 329-37. doi: 10.1006/exer.1999.0794.
- King, A. E., Paltoo, A., Kelly, R. W., Sallenave, J. M., Bocking, A. D. & Challis, J. R. (2007). Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta*, 28(2-3), 161-9. doi: 10.1016/j.placenta.2006.01.006. Epub 2006 Feb 28.
- Kraus, I., Sabolinski, M. L., Skornicki, M. & Parsons, N. B. (2017). The Comparative Effectiveness of a Human Fibroblast Dermal Substitute versus a Dehydrated Human Amnion/Chorion Membrane Allograft for the Treatment of Diabetic Foot Ulcers in a Real-world Setting. *Wounds*, 29(5), 125-132. PMID: 28570252.
- Kumar, V., Abbas, A. K. & Aster, J. C. (2015). *Inflamación y reparación*. Elsevier.
- Litwiniuk, M. & Grzela, T. (2014). Amniotic membrane: new concepts for an old dressing. *Wound Repair Regen*, 22(4), 451-6. doi: 10.1111/wrr.12188.

- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Method. Methods*, 25(4), 402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Margolis, D. J., Berlin, J. A. & Strom, B. L. (1999). A comparison of sensitivity analyses of the effect of wound duration on wound healing. *J Clin Epidemiol*, 52(2), 123-8. doi: 10.1016/s0895-4356(98)00150-4.
- Margolis, D. J., Berlin, J. A. & Strom, B. L. (1999). Risk factors associated with the failure of a venous leg ulcer to heal. *Arch Dermatol*, 135(8), 920-6. doi: 10.1001/archderm.135.8.920.
- Margolis, D. J., Kantor, J. & Berlin, J. A. (1999). Healing of diabetic neuropathic foot ulcers receiving standard treatment. A meta-analysis. *Diabetes Care*, 22(5), 692-5. doi: 10.2337/diacare.22.5.692.
- Mermet, I., Pottier, N., Sainthillier, J. M., Malugani, C., Cairey-Remonnay, S., et al. (2007). Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen*, 15(4), 459-64. doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00252.x.
- Morrison, D.C. & Ryan, J.L. (1979). Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv.Immunol*, 28, 293-450. DOI: 10.1016/s0065-2776(08)60802-0
- Niknejad, H., Peirovi, H., Jorjani, M., Ahmadiani, A., Ghanavi, J., et al. (2008). Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater*, 15, 88-99. doi: 10.22203/ecm.v015a07.
- Ramírez Hernández, G. A. (2010). Fisiología de la cicatrización cutánea. RFS Revista Facultad De Salud, 2(2), 69-78. <https://doi.org/10.25054/rfs.v2i2.57>.
- Saitoh, T. & Dobkins, K. R. (1986). Protein kinase C in human brain and its inhibition by calmodulin. *Brain Res*, 379(1), 196-9. doi: 10.1016/0006-8993(86)90277-5.
- Snyder, R. J. & Hanft, J. R. (2009). Diabetic foot ulcers--effects on QOL, costs, and mortality and the role of standard wound care and advanced-care therapies. *Ostomy Wound Manage*, 55(11), 28-38. PMID: 19934461.

- Snyder, R. J., Shimozaki, K., Tallis, A., Kerzner, M., Reyzelman, A., et al. (2016). A Prospective, Randomized, Multicenter, Controlled Evaluation of the Use of Dehydrated Amniotic Membrane Allograft Compared to Standard of Care for the Closure of Chronic Diabetic Foot Ulcer. *Wounds*, 28(3), 70-7. PMID: 26978860.
- Tettelbach, W., Cazzell, S., Sigal, F., Caporusso, J. M., Agnew, P. S., Hanft, J., & Dove, C. (2019). A multicentre prospective randomised controlled comparative parallel study of dehydrated human umbilical cord (EpiCord) allograft for the treatment of diabetic foot ulcers. *International wound journal*, 16(1), 122-130. doi: 10.1111/iwj.13001. Epub 2018 Sep 24.
- Zelen, C. M., Serena, T. E., Denoziere, G., & Fetterolf, D. E. (2013). A prospective randomised comparative parallel study of amniotic membrane wound graft in the management of diabetic foot ulcers. *International wound journal*, 10(5), 502-507. PMID: 23742102, PMCID: PMC4232235.
- Wang, Y., Zhao, M., Liu, S., Gou, J., Lu, Y. et al.(2020). Macrophage-derived extracellular vesicles: diverse mediators of pathology and therapeutics in multiple diseases. *Cell Death Dis* 11, 911- 924. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03127-z>
- Wilkinson, H. N. & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol.* 10: 200223. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.200223>



ROTELA ROTELA ΠΑΤΙΑΣ 35156296