

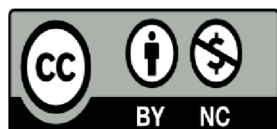
Rodas Rojas, Gisela Sabrina

Efecto inmunomodulador de membrana amniótica humana en células epiteliales de córnea infectadas con herpes simplex tipo 1 (HSV-1), causante de la queratitis estromal herpética

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:

Rodas Rojas, G. S. (2022). *Efecto inmunomodulador de membrana amniótica humana en células epiteliales de córnea infectadas con herpes simplex tipo 1 (HSV-1), causante de la queratitis estromal herpética* [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

**“Efecto inmunomodulador de membrana amniótica humana en células
epiteliales de
córnea infectadas con Herpes Simplex Tipo 1 (HSV-1), causante de la
Queratitis Estromal Herpética”**

Alumna: Rodas Rojas, Gisela Sabrina

Directora: Dra. Michelini, Flavia

Co-directora: Esp. Guerbi, María Ximena

Fecha de entrega: 31 de octubre de 2022

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecerle al grupo de investigación que amablemente y siempre predispuestos me brindaron su espacio y conocimientos para realizar este trabajo. A Ale por haberme dado la oportunidad. A Xime por toda su ayuda. Y especialmente a Flavia, mi directora, por siempre haber estado conmigo enseñándome y guiándome desinteresadamente, por su entrega a ayudar sin esperar nada, por generar un ambiente cómodo para trabajar y podría agregar muchas cosas más pero la lista de mis agradecimientos sería eterna, por eso simplemente gracias por permitirme conocer la gran persona que sos.

A la Universidad pública, a mis profesores y a todos mis compañeros de carrera por perseguir el mismo sueño.

A mi familia y especialmente a mi compañero incondicional de vida por siempre creer en mí, por su confianza, por su apoyo y por alentarme a seguir a pesar de mis inseguridades y mis altibajos emocionales. Sin vos no lo hubiese logrado, gracias por acompañarme en esta aventura que cambió nuestra vida entera.

Muchas gracias a todos.

Resumen

Las infecciones por el virus Herpes Simplex (HSV) son comunes y responsables de una amplia variedad de enfermedades. El virus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1) tiene tropismo por el tejido ocular. La respuesta inflamatoria que desencadena la infección con el fin de eliminar al virus provoca muchas veces lesiones a la córnea, lo que da lugar a inmunopatologías como la queratitis estromal herpética (QEH). La QEH se produce como consecuencia de la respuesta inflamatoria del sistema inmune a la infección recurrente por HSV-1 que ocurre en el estroma de la córnea y es una de las principales enfermedades que causan pérdida de la visión o incluso ceguera.

Los tratamientos convencionales para limitar la progresión de la enfermedad incluyen al Aciclovir (ACV), antiviral de elección para las infecciones herpéticas, y glucocorticoides, para reducir la inflamación. Sin embargo, los efectos adversos que provoca el uso de los glucocorticoides y la aparición de cepas de HSV resistentes al ACV resaltan la importancia de encontrar nuevos tratamientos que abarquen tanto la inhibición de alguna etapa de la replicación viral como también que puedan contrarrestar la respuesta proinflamatoria.

Los derivados de membrana amniótica humana (hAM) tienen propiedades biológicas antiinflamatorias, inmunomoduladoras, antimicrobianas, capacidad de regeneración de tejidos y baja inmunogenicidad. Su uso ha ido en aumento en diversas manifestaciones clínicas y se han vuelto una alternativa terapéutica eficaz en patologías de la córnea.

En el presente trabajo final caracterizamos los componentes biológicos de apósitos liofilizados hAM, estudiamos una potencial actividad inhibitoria de un extracto soluble de esos apósitos rehidratados de hAM sobre la replicación viral de HSV-1 en una línea celular continua de córnea humana (HCLE), también investigamos el efecto modulador de hAM sobre la producción de mediadores inflamatorios en células HCLE infectadas con HSV-1.

Los diferentes ensayos realizados arrojaron que los componentes biológicos presentes en la fase soluble del extracto de hAM no tendrían efectos benéficos sobre la inmunopatología QEH ya que no exhibieron actividad inhibitoria en la multiplicación viral de HSV-1, y además modularon la respuesta innata de las células epiteliales de la córnea a un estado inflamatorio.

Índice

- Abreviaturas.....	5
1- Introducción.....	6
1.1 Los virus.....	6
1.1.1 Generalidades de los herpesvirus.....	6
1.2 Virus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1).....	6
1.2.1 Infección viral - ciclo de replicación.....	6
1.2.2 Latencia de HSV-1.....	8
1.3 Infección de la córnea con HSV-1 - Queratitis estromal herpética.....	9
1.4 Tratamiento de la Queratitis estromal herpética.....	12
1.5 Membrana amniótica, una alternativa terapéutica.....	12
2- Objetivos.....	14
3- Materiales y Métodos.....	15
3.1 Homogenatos de Membrana Amniótica.....	15
3.1.1 Rehidratación de liofilizados de homogenatos de membrana amniótica....	15
3.2 Células.....	16
3.2.1 Condiciones de cultivo.....	16
3.3 Virus.....	17
3.3.1 Propagación viral y preparación del stock viral de trabajo.....	17
3.3.2 Titulación del stock viral de trabajo.....	17
3.4 Caracterización de los extractos de membrana amniótica.....	18
3.4.1 Cuantificación de proteínas totales.....	18
3.4.2 Cuantificación de citoquinas por ELISA.....	18
3.5 Evaluación de la viabilidad celular.....	19
3.5.1 Determinación de viabilidad celular por Azul Tripán.....	19

3.5.2	Determinación de viabilidad celular por MTT.....	21
3.6	Evaluación de la actividad antiviral de membrana amniótica.....	21
3.6.1	Ensayo del rendimiento viral.....	21
3.6.2	Titulación viral por plaqueo en medio semisólido.....	22
3.7	Evaluación de la actividad inmunomoduladora de membrana amniótica.....	23
3.7.1	Cuantificación de citoquinas.....	23
3.7.2	Cuantificación de la expresión de genes de citoquinas por RT-qPCR.....	23
3.7.2.1	Extracción y purificación de ARN total.....	23
3.7.2.2	Cuantificación de ARN.....	24
3.7.2.3	Síntesis de ADNc.....	25
3.7.2.4	q-PCR en tiempo real.....	25
3.8	Análisis estadístico	26
4-	Resultados y Discusión.....	28
4.1	Caracterización de los extractos de homogenatos de membrana amniótica.....	28
4.1.1	Cuantificación de proteínas totales por Bradford.....	28
4.1.2	Cuantificación de citoquinas por ELISA.....	29
4.2	Evaluación de la viabilidad celular de las HCLE en presencia de hAM.....	31
4.3	Determinación de la actividad antiviral de hAM sobre HSV-1 en las células HCLE.....	35
4.4	Evaluación de la actividad inmunomoduladora de hAM en las células HCLE.....	38
5-	Conclusiones.....	45
6-	Fuentes de información y referencias bibliográficas.....	47

Abreviaturas

ACV: aciclovir

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

CC: control de células

Cq: ciclo umbral

CV: control virus (células infectadas con HSV-1)

h: hora

hAM: membrana amniótica humana

HCLE: línea celular continua de córnea humana

HSV-1: virus Herpes Simplex tipo 1

IL: interleuquina

m: minutos

M.O.I: multiplicidad de infección

p.i.: post infección

PMN: polimorfonucleares

QEH: queratitis estromal herpética

s: segundos

SFB: suero fetal bovino

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa en tiempo real

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

UFP: unidades formadoras de placas

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

1- Introducción

1.1 Los virus

Los virus son parásitos genéticos intracelulares obligados, ya que carecen de maquinaria biosintética, sistema energético y ciertas enzimas. Por estas razones, necesitan utilizar los sistemas de las células que parasitan para poder realizar su ciclo de replicación (Carballal, 2015). Los virus pueden producir daño celular de diferentes maneras: provocando una lesión directa sobre el tejido al cual infectan debido al efecto citopático viral o en forma indirecta como consecuencia de la respuesta inmunoinflamatoria al virus (Wang y col, 2020), o induciendo la apoptosis (Knipe y col, 2001) o la malignización celular (Nevins y col, 2001).

1.1.1 Generalidades de los herpesvirus

Los herpesvirus son ubicuos, se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y logran infectar a diferentes especies animales, desde bivalvos hasta humanos. Hasta la fecha se encuentran identificados más de 200 y se han aislados nueve herpesvirus a partir de humanos: virus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1), virus Herpes Simplex tipo 2 (HSV-2), Citomegalovirus humano (HCMV), virus Varicela-Zoster (VZV), virus Epstein Barr (VEB), Herpesvirus humano 6A, 6B y 7 (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7) y el herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (HHV-8). Todos ellos tienen una ultraestructura similar compuesta por un núcleo o core que contiene el ADN lineal de doble cadena, una cápside icosaédrica, una capa amorfa de proteínas denominada tegumento, que rodea la nucleocápside y una envoltura procedente de membranas celulares que contiene glicoproteínas virales en forma de espícula en su superficie. Otra propiedad en común que comparten estos virus es su capacidad para establecer una infección latente luego de la infección primaria, pudiendo reactivarse por diversos estímulos, en especial en aquellos individuos con el sistema inmune comprometido (Knipe y col., 2013; Lobo Ann-Marie y col, 2020).

1.2 Virus del Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1)

1.2.1 Infección viral - ciclo de replicación

Las infecciones por los virus Herpes Simplex son comunes, y es sabido que el 90% de la población humana adulta es seropositiva (Biwas y col., 2005; Bauer y col. 2012; Murray y col., 2017). Los virus Herpes Simplex son responsables de una amplia variedad de enfermedades, que van desde infecciones en células mucocutáneas hasta infecciones del

sistema nervioso central (SNC) (Mandell y col., 2012). El HSV-1 tiene tropismo por la región orofacial y es el principal patógeno causante de la queratitis estromal herpética (QEH) cuando el sitio de infección es el tejido ocular (Wang y col., 2020; Bauer y col., 2012).

La infección viral comienza con la adsorción del virus a la célula por medio de la interacción de las glicoproteínas virales, principalmente gB, gC, gD, gH y gL, con los receptores celulares, cadenas de heparán sulfato de los proteoglicanos celulares (HS), presentes en la superficie de la célula y en la matriz extracelular (figura 1). La interacción desencadena cambios conformacionales que resultan en el ingreso del virus por endocitosis o en la fusión de la envoltura del virión y la membrana plasmática celular, lo que permite la penetración de la nucleocápside y las proteínas del tegumento al citoplasma. Luego, la nucleocápside es transportada por medio de los microtúbulos del citoesqueleto al poro nuclear, se asocia con los complejos del poro y libera el ADN viral dentro del núcleo para la transcripción y replicación (Li Wang y col., 2020; Lobo Ann-Marie y col., 2020). Las proteínas del tegumento, al menos 18 proteínas, generan un ambiente favorable para la replicación de los genes virales. La proteína más notable es la proteína transactivadora del virión (VP-16), que luego de ingresar al citoplasma se une a una proteína celular denominada HCF-1 que la ingresa al núcleo, lugar donde se forma un complejo tripartito con Oct-1 y se produce la activación transcripcional, además, la proteína VP-16 participa de la maduración y liberación de la progenie. La progenie viral se ensambla en el núcleo de la célula hospedadora, en este proceso el ADN viral es encapsidado en cápsides pre-formadas y luego ensambladas junto con proteínas del tegumento. Una vez que se forma la nucleocápside madura, sigue la brotación, lo que provoca en la célula hospedadora cambios morfológicos, denominado efecto citopático. La ruta hacia el espacio extracelular es controvertida (Knipe y col., 2013). Existen tres modelos propuestos para este último paso:

1- Vía doble envoltura, modelo más aceptado en la actualidad, implica una envoltura primaria de las nucleocápsides maduras con la membrana nuclear interna que luego se fusiona con la membrana nuclear externa, ingresan al sistema de endomembranas donde sufren una envoltura secundaria, y mediante vesículas llegan a la membrana plasmática donde, por fusión, se liberan.

2- Vía luminal, las nucleocápsides adquieren la envoltura de la membrana nuclear interna, ingresan en una vesícula al salir de la membrana nuclear externa y son transportadas a la membrana plasmática donde son liberadas por exocitosis.

3- Modelo de poro nuclear, las nucleocápsides maduras egresan del núcleo por poros nucleares agrandados, ingresan al sistema de endomembranas y se envuelven al brotar en vesículas citoplasmáticas que son transportadas a la membrana plasmática donde se liberan por exocitosis.

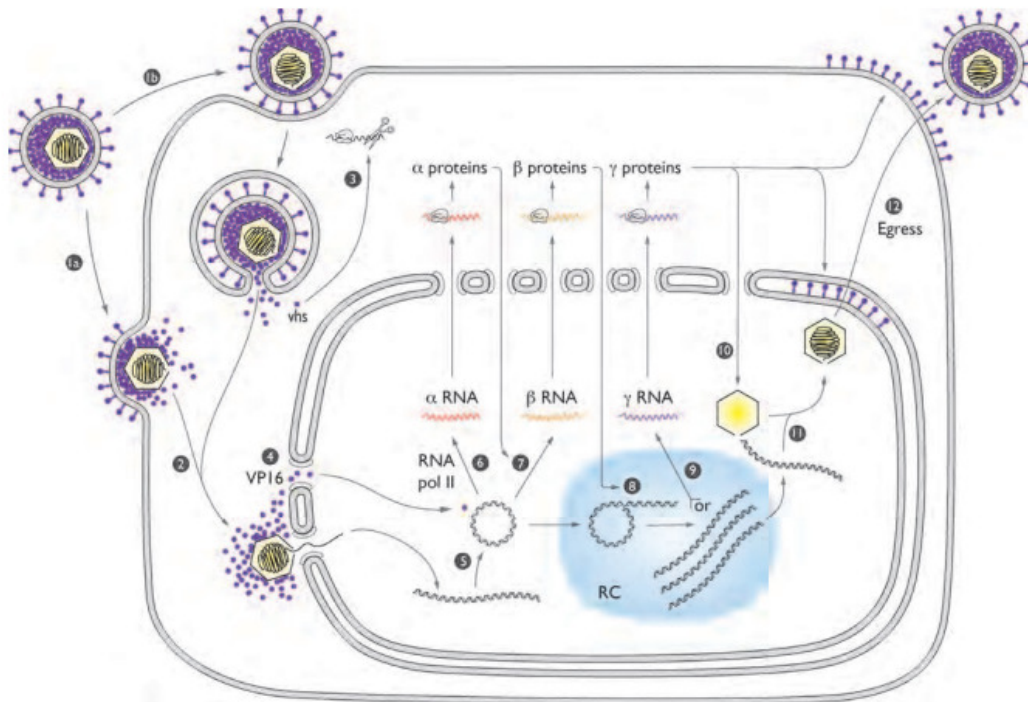


Figura 1. Esquema del ciclo replicativo del virus del Herpes Simplex Tipo 1. Imagen extraída de Knipe y col., 2013.

Además de propagarse entre las células a través del espacio extracelular (Lobo Ann-Marie y col., 2019), el HSV-1 puede infectar la célula vecina pasando por las uniones célula-célula de la membrana lateral (Knipe y col., 2013). En los cultivos celulares, el virus Herpes Simplex destruye la célula entre las 24 y las 48 h post infección (p.i.), las células se observan con una morfología redondeada y también se puede producir la formación de sincicios debido a la fusión de membranas que promueve el virus (Murray, 2017).

1.2.2 Latencia de HSV-1

Luego de la infección primaria, los viriones de HSV-1 ingresan a las terminales nerviosas sensoriales y las nucleocápsides llegan al soma del ganglio por transporte axonal retrógrado, donde persisten en forma episomal circular, en una infección latente (figura 2) (Knipe y col., 2013). En este estadio no se produce progenie viral en el ganglio, pero hay expresión de transcritos asociados a latencia denominados LATS (Martínez Afanador y col., 2008). Los

periodos de latencia, pueden alternarse con períodos de reactivación, en donde el virus infeccioso, por vía anterógrada, vuelve a la superficie para iniciar su replicación, propagación y liberación (Knipe y col, 2013; Chigbu y Labib, 2022). Esto ocurre debido a múltiples factores ambientales como la radiación UV, fiebre, estrés emocional y físico, factores iatrogénicos como el uso de corticoides tópicos o el tratamiento con láser (Lobo y col., 2020). La reactivación puede ser asintomática o generar lesiones recurrentes de diversa severidad (Knipe y col, 2013).

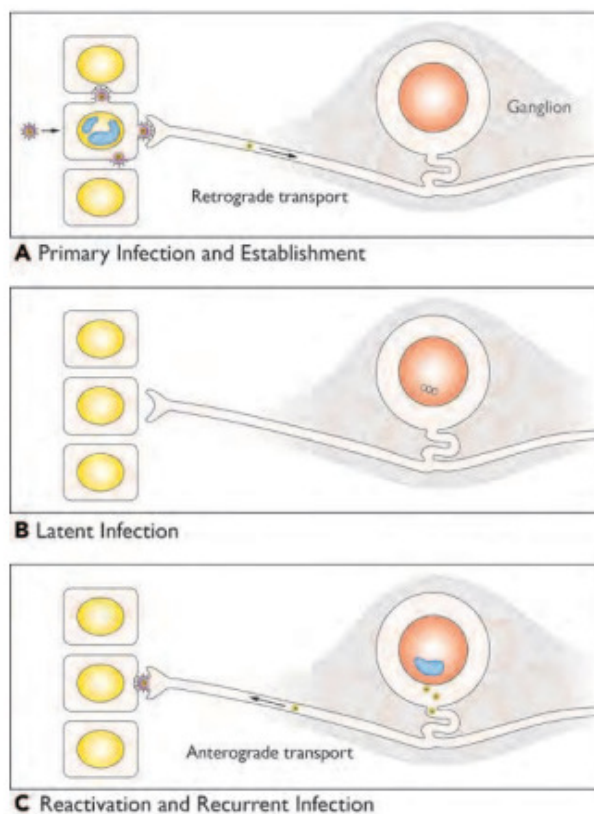


Figura 2. Esquema de los periodos de infección primaria (A), infección latente (B) y reactivación y recurrencia de la infección con el virus Herpes Simplex (C). Imagen extraída de Knipe y col., 2013.

1.3 Infección de la córnea con HSV-1 - Queratitis estromal herpética

La superficie ocular es una unidad anatómica funcional conformada por diversas estructuras que funcionan en conjunto para proveer protección al ojo. Incluye a la conjuntiva, el limbo esclerocorneal, la película lagrimal y la córnea. La córnea es un tejido transparente constituido por 5 capas diferenciadas (figura 3). La capa más superficial es el epitelio corneal, el cual se apoya sobre una membrana basal. Le sigue la capa de Bowman acelular formada por colágeno y contribuye a darle forma a la córnea, funciona como barrera para impedir el ingreso de

microorganismos y células malignas al estroma; esta capa no se regenera cuando se daña (Fernández y col., 2008). El estroma es la capa más gruesa de la córnea, representa el 90% de su espesor, constituida principalmente por colágeno y del 3-5% de queratinocitos, su transparencia se debe a que carece de vasos sanguíneos y linfáticos. Finalmente la membrana de Descemet, una membrana basal gruesa y, apoyado sobre ésta, el endotelio corneal, cuya función es mantener al estroma en un estado de turgencia (deshidratación) (Folberg, 2015). El estroma de la córnea es el sitio donde se desarrolla la queratitis estromal herpética (QEH) (Biwas y col., 2005).

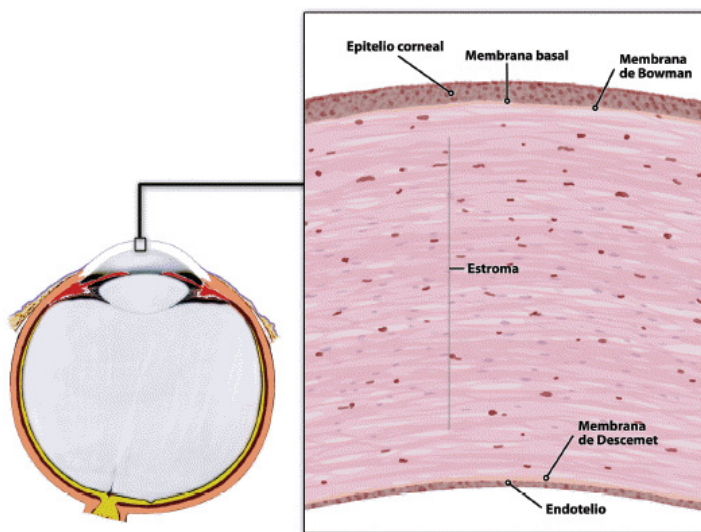


Figura 3. Esquema histológico de la córnea normal. Imagen extraída de Fernández y col., 2008.

La queratitis estromal herpética es una inmunopatología que se produce como consecuencia de la respuesta inflamatoria que desencadena la infección recurrente con HSV-1 del epitelio corneal, en la cual el virus alojado de forma latente en el ganglio trigémino, se reactiva y, por transporte anterógrado, vuelve a infectar la córnea. La QEH se desarrolla en el 2% de las primoinfecciones, mientras que representa del 20 al 48% de las infecciones recurrentes (Lobo y col., 2020; Martínez Afanador y col., 2008). La respuesta inflamatoria generada por el sistema inmune, en principio con el objetivo de eliminar al virus del sitio de la infección, más tarde se vuelve crónica y ocasiona serias lesiones en el estroma corneal, tales como opacidad, edema, cicatrización y neovascularización, lo que provoca dificultades en la visión y hasta incluso ceguera. Además, la patología cursa con enrojecimiento, lagrimeo, dolor ocular, sensibilidad a la luz y sensación arenosa. Las lesiones, por lo tanto, se deben a la reacción

inmunitaria frente a la infección con HSV, y no a los efectos citopáticos del propio virus (Biwas y col., 2005; Li y col., 2020; Lobo y col., 2020).

Los estudios experimentales en modelos de ratón con QEH permitieron comprender los procesos patogénicos implicados en el desarrollo de esta inmunopatología y los eventos tempranos que se producen en el ojo infectado anteriores a las lesiones que se manifiestan luego en la QEH (Biwas y col., 2005).

Los eventos tempranos que se producen en el ojo infectado comienzan con la infección de las células epiteliales y estromales de la córnea con HSV-1 lo que induce la respuesta inmune innata en el ojo, seguida de la respuesta inmune adaptativa. Esto resulta en un aumento de la cantidad de células inflamatorias, y de la producción de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias y antiinflamatorias que invaden el estroma. La QEH se produce cuando hay un desequilibrio que se desplaza a un estado inflamatorio (Wang y col., 2020). La respuesta inmune innata incluye barreras físicas, mecánicas y químicas, como el epitelio intacto, el lavado permanente de las lágrimas, diferentes proteínas con actividad antiviral como lisozima, inmunoglobulina A (IgA), complemento, interferones (INF), entre otros (Biwas y col., 2005). Además, los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), en particular, los receptores tipo Toll (TLR2, TLR3 y TLR9) reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) en las células epiteliales infectadas, como las glicoproteínas virales, ARNsc o los motivos CpG del ADN viral. En respuesta a la activación de los PRR, se producen citoquinas proinflamatorias y quimiocinas, como IL-8, INFs tipo I (INF α e INF β), IL-1, IL-6 y TNF- α . Las citoquinas pueden actuar sobre las células vecinas y las células inmunitarias para reducir la propagación viral (Smith y col., 2022). Los IFNs tipo I generan un ambiente antiviral al hacer que las células vecinas no infectadas sean menos permisivas a la entrada y replicación viral y también inducen la activación de las células NK (Chigbu y Bisant, 2022; Lobo y col., 2020). Las células NK limitan la replicación viral, por medio de la lisis y muerte de las células infectadas (Li y col., 2020). La propia infección y la IL-1 actúan en sinergia para inducir la expresión de IL-6, citoquina responsable de estimular la infiltración de los polimorfonucleares (PMN), principalmente neutrófilos, implicados en la eliminación inicial del virus, hacia el estroma de la córnea. También hay una afluencia de células presentadoras de antígenos profesionales: células dendríticas y macrófagos. Las células dendríticas son intermediarios necesarios para iniciar la respuesta inmune adaptativa a través de fagocitar y posteriormente presentar los antígenos virales en moléculas de histocompatibilidad tipo II a los linfocitos T helper (Biwas y col., 2005, Li y col., 2020; Lobo y col., 2020; Wang y col., 2020).

Se cree que los linfocitos T son los principales mediadores que dirigen la respuesta inflamatoria y están involucrados tanto en la protección frente a la infección viral, como en el desarrollo del daño corneal. Los linfocitos T (principalmente los T CD4+) mediante la secreción de IL-2 e IFN- γ atraen y activan a una segunda ola de neutrófilos en la córnea. Estos neutrófilos que se infiltran en la córnea en una etapa tardía de la infección contribuyen en gran parte a la destrucción del tejido en la córnea (Wang y col., 2020).

La infiltración de las células inflamatorias a la córnea se ve facilitada por la formación de nuevos vasos sanguíneos en la córnea normalmente avascular y transparente. El aumento de la neovascularización está asociado a la cascada de citoquinas, y principalmente a la participación de IL-6, que estimula la síntesis de factores angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). La síntesis de nuevos vasos sanguíneos para favorecer el ingreso de las células inflamatorias es característico de la fisiopatología de la QEH y es una manifestación clínica grave, al igual que la destrucción del tejido por parte de los PMN responsables de las lesiones y posterior deterioro de la visión. (Biwas y col., 2005; Lobo y col., 2020; Wang y col., 2020).

1.4 Tratamiento de la Queratitis estromal herpética

Hasta el día de hoy no existen vacunas para el HSV. El antiviral de elección para tratar las infecciones herpéticas es el Aciclovir (ACV), efectivo para frenar la diseminación viral pero que no cura la infección latente ni impide el desarrollo de la respuesta inflamatoria y la inmunopatología. Además, es común la aparición de cepas de HSV resistentes a ACV, la prevalencia es del 0,5% en pacientes inmunocompetentes y del 15% en pacientes inmunocomprometidos. El tratamiento de las manifestaciones inflamatorias oculares suele ser sintomático, con glucocorticoides (GC), para disminuir la inflamación y el dolor. El uso de estas drogas trae aparejados riesgos como cataratas, glaucoma y reactivaciones virales (Heiligenhaus y col., 2003; Azher y col., 2017; Lobo y col., 2019; Chigbu y col., 2022).

1.5 Membrana amniótica, una alternativa terapéutica

La membrana amniótica o amnios es una membrana fetal y es la capa más interna de la placenta. Es una membrana fina, semitransparente compuesta por una monocapa de células cuboides que forman la capa epitelial, una membrana rica en colágeno y laminina, y un estroma avascular de fibroblastos (Lacorzana, 2020). No tiene nervios, músculos ni vasos linfáticos (Toda y col., 2007).

Los derivados de membrana amniótica humana (hAM) han demostrado tener propiedades biológicas antiinflamatorias, inmunomoduladoras, antimicrobianas, capacidad de regeneración de tejidos y baja inmunogenicidad. Estas características la hacen útil en el tratamiento de diversas patologías. Sus primeros usos se remontan a 1910 por Davis, quien intentó injertarla en enfermedades de la piel. En los años que siguieron su uso se fue desplegando a diferentes especialidades médicas. En oftalmología fue utilizada por primera vez en 1940 por De Roth, aunque recién en 1995 cobró relevancia el trasplante de la misma para la reconstrucción de la superficie ocular (Toda y col., 2007), y en las últimas décadas se ha convertido en una eficaz alternativa terapéutica en patologías de la córnea (Castro y col., 2015; Lacorzana, 2020; Shayan Asl y col, 2020; Fénelon y col, 2021). En estudios realizados en pacientes con QEH y en modelos *in vivo* en animales, se ha descrito que el uso de hAM promueve la rápida epitelización y reducción de la inflamación del estroma corneal, acción que se atribuye al atrapamiento y posterior inducción de apoptosis de los polimorfonucleares e inhibición de las proteasas, entre otros (Bauer y col., 2009; Heiligenhaus y col, 2001; Chiaradía y col., 2010). Además, hay casos clínicos reportados acerca del uso de hAM para el tratamiento de queratitis herpética necrotizante en donde se observa la recuperación de la integridad de la superficie ocular, la reducción de la inflamación del estroma corneal, la limitación de la angiogénesis, disminución del dolor y una mejora de la agudeza visual (Heiligenhaus y col, 2003; Weiyun y col., 2007; Bauer y col, 2009; Bauer y col, 2012). Todas las características nombradas hacen del uso de la membrana amniótica una herramienta con grandes beneficios en las patologías de la superficie ocular.

En los últimos años el grupo de trabajo se ha enfocado en el estudio de la aplicación terapéutica de hAM sobre patologías oftálmicas. A la fecha, han determinado que la aplicación tópica de hAM líquida seis veces al día durante 60 días en pacientes con ojo seco con Síndrome de Sjögren (SS), induce una reducción de la lesión de la superficie ocular. Además, han publicado recientemente el uso de hAM en el tratamiento del desprendimiento de retina en 6 pacientes, con buenos resultados en la re-aplicación de la retina (Saravia y col, 2020). Sin embargo, aún no han ahondado sobre los posibles mecanismos involucrados en la actividad antiinflamatoria y regeneradora de tejidos de hAM.

Este trabajo busca aportar datos sobre los posibles mecanismos moleculares involucrados en el uso de la hAM en la infección herpética de las células epiteliales de córnea.

2- Objetivos

Objetivo General

- Evaluar el efecto de la membrana amniótica humana en células epiteliales de córnea infectadas con Herpes Simplex Tipo 1.

Objetivos Específicos

- A. Identificar, caracterizar y analizar cuali-cuantitativamente los componentes biológicos de apósitos liofilizados de hAM.
- B. Evaluar la viabilidad celular en una línea celular de córnea humana (HCLE) en presencia de hAM.
- C. Estudiar una potencial actividad inhibitoria de hAM sobre la replicación viral de HSV-1 en las células HCLE.
- D. Investigar el efecto modulador de hAM sobre la producción de mediadores inflamatorios por parte de las células HCLE infectadas con HSV-1.

3- Materiales y Métodos

3.1 Homogenatos de Membrana Amniótica

Los homogenatos de membrana amniótica humana (hAM) en presentación de apósito (figura 4) fueron elaborados y provistos por el Banco de Tejidos de la Asociación Civil para el Progreso de la Tecnología Médica de Tejidos. El hAM se extrae de placentas humanas bajo consentimiento informado de la donante y mediante diferentes procedimientos establecidos en la Resolución N° 187/01. Los productos finales, utilizados en este trabajo, fueron dos lotes (MC01240522 y MC00890222, referidos como 522 y 222 respectivamente) provenientes de diferentes donantes. Los apósitos se encuentran homogenizados, liofilizados y esterilizados por radiación gamma.



Figura 4. Apósitos de homogenatos de Membrana Amniótica Humana.

3.1.1 Rehidratación de liofilizados de homogenatos de membrana amniótica

Los apósitos fueron pesados y rehidratados en baño de hielo con 1 ml de DMEM/F12 (GIBCO) por cada 50 mg de masa, en homogenizador y se homogeneizaron con mini torno Dremel. Seguidamente, se realizaron cuatro extracciones. Se transfirió la solución a tubo falcón estéril de 15 ml y se centrifugó durante 5 min en punto 5 de velocidad en centrífuga Presvac Dcs-16-Rv. Se reservó el sobrenadante en nuevo tubo, primera extracción. Al pellet se le agregó nuevamente igual volumen de DMEM/F12 que al inicio y nuevamente se centrifugó, segunda extracción. Las últimas dos extracciones se realizaron de igual forma que

la segunda extracción. Los sobrenadantes de todas las extracciones se unificaron y se cuantificaron las proteínas totales en la muestra, por el método de Bradford. Luego, el pool se fraccionó en distintos eppendorf y se congeló a -80°C hasta su uso.

3.2 Células

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares:

-Línea celular continua de córnea humana (HCLE), aislada de epitelio del limbo corneal humano, provista amablemente por Dres Ilene K. Gipson y Pablo Argüeso (The Schepens Eye Research Institute, Harvard Medical School, Boston, USA).

-Línea celular continua VERO, aislada del epitelio de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*, obtenidas de ATCC.

3.2.1 Condiciones de cultivo

La línea celular continua HCLE, fue cultivada en medio de queratinocitos libre de suero (KSFM) (GIBCO ®), catálogo # 17005-042 suplementado con 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ extracto pituitaria bovina (BPE) (GIBCO), 0,2 ng/ml factor de crecimiento epidérmico (EGF) (GIBCO) y 0,4 mM CaCl_2 , en estufa (NuAire-PureCell NU-5100E CO_2 Incubator) con atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO_2 a 37°C . Al alcanzar la monocapa un 50 % de confluencia, se realizaba un cambio de medio de cultivo, por una mezcla de 1:1 de GIBCO KSFM: DMEM/F12. Las células fueron subcultivadas semanalmente. Los ensayos en estas células se realizaron con medio DMEM/F12 sin suero, con baja concentración de calcio (medio de mantenimiento).

La línea celular continua VERO, fue cultivada en medio esencial mínimo Eagle (EMEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino, en estufa (NuAire-PureCell NU-5100E CO_2 Incubator) a 37°C y una atmósfera de aire con 5% de CO_2 . El medio EMEM contiene solución salina equilibrada de Earle, aminoácidos no esenciales, L-glutamina 2 mM , piruvato de sodio 1 mM y bicarbonato de sodio 1500 mg/L . Las células fueron subcultivas semanalmente. Los ensayos en estas células se realizaron con medio EMEM suplementado con 1,5% SFB.

Para cada ensayo se preparó una suspensión celular que contenía $\approx 8,8 \times 10^6$ células. Se utilizaron distintos volúmenes de esta solución para sembrar los diferentes tamaños de

pocillos en las placas: 0,5 ml en cada pocillo, para placas de 24 pocillos y 0,1 ml por pocillo, en placas de 96 pocillos.

3.3 Virus

Para los ensayos se utilizó el virus HSV-1 cepa KOS donada gentilmente por el Laboratorio de Virología- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

3.3.1 Propagación viral y preparación del stock viral de trabajo

El virus HSV-1 cepa KOS fue propagado en células VERO crecidas en botella T25 cm³. El stock viral de trabajo se obtuvo infectando las células con una multiplicidad de infección (M.O.I) de 0,6 UFP/célula. Luego de 1 h de adsorción a 37°C se descartó el inóculo, se cubrieron las células con EMEM 1,5% SFB y se incubó a 37°C con una atmósfera de 5% CO₂ durante 24 h. Transcurrido el tiempo y al observar al microscopio alrededor del 80-90% de las células con efecto citopático viral, (células redondeadas y formación de sincicios), la botella T25 cm³ se congeló en freezer a -80°C durante 24 h. A continuación, se realizaron 3 ciclos de descongelado en baño térmico digital a 36°C y congelado a -20°C, la suspensión viral se centrifugó 10 minutos a 2500 rpm y 4°C en centrifuga (Beckman Coulter™- Allegra 25R Centrifuge), el sobrenadante se fraccionó en alícuotas y almacenó a -80°C. Este proceso se realizó en cabina de seguridad biológica nivel II (NUAIRE, CLASS II, U.S.A).

3.3.2 Titulación del stock viral de trabajo

Monocapas de células Vero crecidas a confluencia en placas de 24 pocillos se infectaron con 100 µl de diluciones seriadas al décimo de HSV-1 cepa KOS. El proceso se realizó en cabina de seguridad biológica nivel II (NUAIRE, CLASS II, U.S.A.). Se dejó adsorber el virus durante 1 h a 37°C y 5% CO₂, luego se retiró el inóculo y las células fueron cubiertas con 500 µl de medio de plaqueo (EMEM en doble concentración, 2X, suplementado con 4% de SFB, mezclado con volúmenes iguales de metilcelulosa 1,4% (SigmaAldrich) e incubadas a 37°C y 5% CO₂ durante 48 h, tiempo en el que se observó efecto citopático al microscopio óptico (Life Technologies- EVOS FLc), formación de placas de lisis. Las células fueron fijadas con 500 µl de formol 10% y coloreadas con cristal violeta. Seguidamente, se contaron las Unidades Formadoras de Placas (UFP) en cada pocillo y se determinó el título viral del stock de trabajo con la siguiente fórmula:

$$\text{Título viral } \left(\frac{\text{UFP}}{\text{ml}} \right) = \frac{(\text{Promedio de UFP}) \times (\text{Factor de dilución})}{\text{Volumen del inóculo viral}}$$

3.4 Caracterización de los extractos de membrana amniótica

La caracterización de los extractos obtenidos se realizó a través de la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford y evaluación de diversas citoquinas por la técnica de ELISA.

3.4.1 Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas totales de los pools de extractos de membrana amniótica, se llevó a cabo por el método de Bradford. Se construyó una curva de calibración con 20 μ l de las diluciones seriadas al medio de un stock comercial de albúmina bovina de 1 mg/ml (Sigma-Aldrich) en agua destilada a los que se agregaron 180 μ l del reactivo de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250 en etanol al 99,5% (v/v), ácido ortofosfórico 85% (v/v) y H₂O bidestilada), por triplicado. Las muestras se sembraron en paralelo, se utilizaron 20 μ l de las mismas por duplicado. Se leyó la absorbancia en un lector de placas (BIO-RAD iMark™ Microplate Absorbance Reader) a 595 nm. La curva de calibración se graficó como el Logaritmo Absorbancia 595 nm en función del Logaritmo Concentración (μ m/ml). Luego, el dato del Log. A de las muestras incógnitas se interpoló en la curva para determinar la concentración de proteínas totales mediante las ecuaciones correspondientes (tabla 2).

3.4.2 Cuantificación de citoquinas por ELISA

Se realizaron inmunoensayos enzimáticos (ELISA) de captura no competitivos para cuantificar citoquinas en los extractos de homogenatos de membrana amniótica. Se utilizaron los protocolos y kit comerciales de TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 (Elisa BD OptEIA™ set Human, San Diego. U.S.A.), lector de absorbancia (BIO-RAD iMark™ Microplate Absorbance Reader) y microplacas de 96 pocillos (BIOFIL® ELISA Plates). Se realizaron de la siguiente manera:

Microplacas de 96 pocillos fueron sensibilizadas con 50 μ l por fosa (anti- humano IL6, anti- humano IL-8 y anti- humano TNF-a) y 100 μ l por fosa (anti- humano IL10) de un anticuerpo de captura diluido 1/250 con buffer de pegado (buffer carbonato/bicarbonato, pH 9,5). Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Luego, las microplacas fueron lavadas 3 veces con PBS Tween 20 0,05% y bloqueadas con 200 μ l de PBS suplementado con 10% SFB, durante 1 h a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Las placas fueron lavadas nuevamente 3 veces con PBS Tween 20 0,05% y se sembraron 50 μ l de cada muestra en las microplacas destinadas a la cuantificación de IL-6 e IL-8, mientras

que, se sembraron 100 μ l de cada muestra en la microplaca de IL-10 y TNF- α , por duplicado. En cada microplaca se realizó una curva de calibración con diluciones seriadas al medio del estándar de la citoquina patrón específica (Humana Recombinante), que se sembró en iguales condiciones que los sobrenadantes de la muestra incógnita. Las placas fueron incubadas durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron 5 veces con PBS Tween 20 0,05% y se colocaron 50 μ l de una dilución 1/250 de la solución de detección (anticuerpo de detección biotinilado más conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante), en los casos de IL-6 e IL-8, y 100 μ l/pocillo en la microplaca de cuantificación de IL-10 y TNF- α . Las placas fueron incubadas durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron 7 lavados con PBS Tween 20 0,05% y se sembraron 50 μ l de una solución sustrato (tetrametilbenzidina) en las fosas de las microplacas de IL-6 e IL-8 y 100 μ l para los pocillos de IL-10 y TNF- α . Las placas se incubaron en oscuridad y agitación durante 30 minutos, tiempo en el cual se visualizó el cambio de color de incoloro a azul. Se agregaron 50 μ l de una solución de stop (ácido fosfórico 1M) a cada pocillo y, por último, la densidad óptica (D.O.) fue medida a una longitud de onda de 450 nm, en lector de microplacas. Las lecturas obtenidas de las muestras fueron interpoladas en la curva estándar correspondiente y de esa manera se calculó la concentración de citoquinas en cada muestra. Los resultados se expresaron como pg de citoquina por mg de proteína total (tabla 3).

3.5 Evaluación de la viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad celular en la línea celular continua HCLE en presencia de hAM, se realizaron los ensayos de recuento de células viables en cámara de Neubauer con Azul Tripán y de viabilidad celular por MTT.

3.5.1 Determinación de la viabilidad celular por Azul Tripán

La determinación de la viabilidad celular se realizó mediante recuento de células viables en cámara de Neubauer (Neubauer improved- Superior) con Azul Tripán. El azul Tripán es un colorante vital que atraviesa la membrana de las células muertas, por lo que las células no viables se ven de un color azul al ser examinadas al microscopio, mientras que las células viables se observan sin teñir. Esto es así porque las células viables mantienen intacta su membrana plasmática, y el colorante no la atraviesa. La cámara de Neubauer, es un portaobjetos para contar células bajo el microscopio, está delimitado por líneas horizontales y verticales que forman una cuadrícula, lo que permite identificar 9 zonas cuadradas, de 1 mm de lado cada una.

Las células HCLE crecidas a confluencia en una placa de cultivo de 24 pocillos (BIOFIL®) fueron tratadas con 450 µl de diluciones seriadas al medio, con una concentración inicial de 100 µg/ml, del extracto de membrana amniótica por duplicado, durante 24 h a 37°C y 5% CO₂. Luego, se cosechó el sobrenadante de cada pocillo en diferentes eppendorfs. Se centrifugaron 5 min a 11000 rpm en centrífuga Presvac Dcs-16-Rv, se descartó el sobrenadante y el pellet se reservó. Los pocillos, de la placa de 24, se lavaron con 100 µl de tripsina (INVITROGEN). Seguidamente, se incubó la placa en bloque térmico a 37°C durante 15 min con 200 µl de tripsina. Transcurrido el tiempo y al observar al microscopio óptico las células redondeadas y en suspensión, se agregaron 200 µl de DMEM/F12 SFB 10%. Se cosecharon los sobrenadantes y se juntaron con los pellets correspondientes, de los cuales se mezclaron 100 µl con 100 µl de Azul Tripán. De la mezcla, se colocaron 10 µl en la cámara de Neubauer y se examinó al microscopio óptico. Se contabilizaron en paralelo tanto las células teñidas de azul como las no teñidas en la zona de recuento de leucocitos, las 4 zonas de la esquina que están divididas por 16 cuadrados pequeños (figura 5). Los resultados se muestran en la tabla 4. La viabilidad celular de la muestra se calculó con la siguiente ecuación:

$$N^{\circ} \text{ de células} = \left(\frac{L1+L2+L3+L4}{4} \right) \times 10^4 \times 2$$

Luego se expresó como porcentaje de la siguiente manera:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{N^{\circ} \text{ de células viables}}{(N^{\circ} \text{ de células viables} + N^{\circ} \text{ de células no viables})} \times 100$$

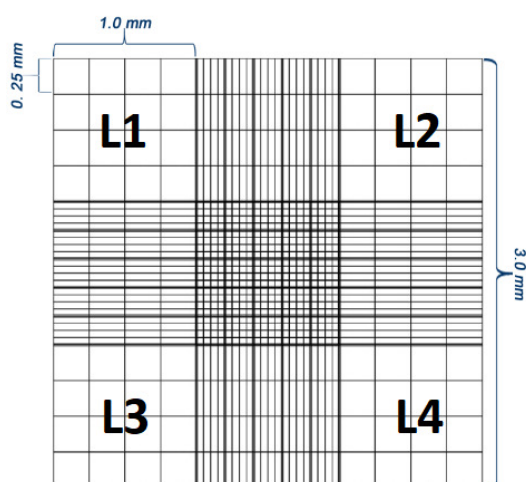


Figura 5. Dimensiones de la cuadrícula de la cámara de Neubauer. L1, L2, L3 y L4 son las 4 zonas para el conteo de leucocitos. Imagen extraída Sauer Ramirez y col., 2018, con modificaciones.

3.5.2 Determinación de la viabilidad celular por MTT

La viabilidad celular también fue evaluada por medio del ensayo del MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], un ensayo colorimétrico que permite evaluar la citotoxicidad a través de la actividad metabólica celular. El MTT es un compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua y de color amarillo. Este compuesto, es reducido principalmente por deshidrogenasas mitocondriales, en particular la enzima succinato deshidrogenasa, reductasas citosólicas o de otros compartimentos celulares convirtiéndose en un producto de la familia formazanos, de color violeta e insoluble en agua.

Se prepararon diluciones seriadas al medio de hAM. La concentración inicial fue de 200 µg/ml. Las células HCLE cultivadas en una placa de cultivo de 96 pocillos a una densidad aproximada de 6×10^4 células/pocillo fueron tratadas con las diluciones de hAM, en medio DMEM/F12, durante 24 h a 37°C y en atmósfera con 5% de CO₂, por cuadruplicado. Se incluyeron pocillos con monocapas de células sin tratamiento, únicamente con medio, como control. Pasado el tiempo de incubación, se observó la morfología celular mediante microscopio óptico, se agregaron 12,5 µl de una solución de MTT (4 mg/ml) (Sigma-Aldrich) a cada pocillo y se incubó la placa durante 3 h a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. A continuación, se descartaron los sobrenadantes y los cristales formados se disolvieron con 100 µl de etanol 70%. Finalmente, la densidad óptica (D.O.) fue medida en un lector de multiplacas (BIORAD iMark TM Microplate Absorbance Reader) a 595 nm.

Los resultados se expresaron en porcentajes de viabilidad celular (tabla 5) con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{\text{Absorbancia célula tratada}}{\bar{x} \text{ absorbancia células sin tratar}} \times 100$$

3.6 Evaluación de la actividad antiviral de membrana amniótica

Para determinar si la hAM tiene actividad inhibitoria de la multiplicación de HSV-1 en las células HCLE, se realizaron los ensayos de rendimiento viral y de titulación viral por plaqueo en medio semisólido.

3.6.1 Ensayo de rendimiento viral

El rendimiento viral de HSV-1 se evaluó en dos condiciones diferentes: tratamiento con hAM previo a la infección viral (pretratamiento) y tratamiento con hAM inmediatamente luego de la infección viral (tratamiento). Los procedimientos se realizaron en cabina de seguridad

biológica nivel II (NUAIRE, CLASS II, U.S.A.). En ambos ensayos se utilizaron monocapas de células HCLE crecidas a confluencia en placas de cultivo de 24 pocillos, con una densidad celular de 250000 células/pocillo aproximadamente, en las condiciones mencionadas en el punto 3.3. En el pretratamiento, las células HCLE se incubaron con 500 µl de diferentes concentraciones de hAM por 24 h antes de la infección y, luego de la adsorción del virus, se agregó medio DMEM/F12 sin suero y se incubaron las células durante 24 h más. En el tratamiento, se infectaron las células y, luego de la adsorción viral, se les añadió 500 µl de diferentes diluciones de hAM y se incubaron las células durante 24 h. En ambos procesos, las células se infectaron con 100 µl de HSV-1 cepa KOS (25000 UFP), a una multiplicidad de infección (M.O.I) de 0,1, durante 1 h a 37°C y una atmósfera de 5% CO₂ para permitir la adsorción e internalización del virus a las células. Pasado el tiempo, se retiró el inóculo viral y las células fueron cubiertas con 500 µl de diferentes concentraciones de hAM en medio DMEM/F12 o medio solo, durante 24 h a 37°C y 5% CO₂. Las placas se congelaron a -80°C. Se incluyeron pocillos de monocapas de células sin infección y sin tratamiento, y monocapas de células infectadas sin tratamiento incubadas únicamente con medio de cultivo, como control.

Las placas se descongelaron 1 vez, luego se cosecharon las muestras tanto de los pocillos no infectados como de los infectados, de los que se recolectó el virus intra y extracelular. Se cuantificó el rendimiento viral por método de formación de placas en medio semisólido. El porcentaje del rendimiento viral en presencia de hAM se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ rendimiento viral} = \left(\frac{\text{UFP/ml muestra}}{\text{UFP/ml control}} \right) \times 100$$

3.6.2 Titulación viral por plaqueo en medio semisólido

Monocapas de células Vero crecidas a confluencia en placas de 24 pocillos fueron infectadas con 100 µl de diluciones seriadas al décimo de las muestras provenientes de la cosecha viral (pocillos infectados). El proceso se realizó en cabina de seguridad biológica nivel II (NUAIRE, CLASS II, U.S.A.). Se adsorbió el virus durante 1 h a 37°C y 5% CO₂, luego se retiró el inóculo y las células fueron cubiertas con 500 µl de medio de plaqueo (EMEM en doble concentración, 2X, suplementado con 4% de SFB, mezclado con volúmenes iguales de metilcelulosa 1,4% (SigmaAldrich)) e incubadas a 37°C y 5% CO₂ durante 48 h, al cabo de las cuales se observó efecto citopático viral al microscopio óptico. Las células se fijaron con 500 µl de formol 10% y fueron coloreadas con cristal violeta. Seguidamente, se contaron las UFP en cada pocillo y se determinó el título viral con la siguiente fórmula:

$$\text{Título viral } \left(\frac{\text{UFP}}{\text{ml}} \right) = \frac{(\text{Promedio de UFP}) \times (\text{Factor de dilución})}{\text{Volumen del inóculo viral}}$$

3.7 Evaluación de la actividad inmunomoduladora de membrana amniótica

Para estudiar si la hAM posee actividad inmunomoduladora en las células HCLE en presencia o ausencia de HSV-1, se evaluaron la producción y la expresión de ciertas citoquinas por medio de la técnica de ELISA y por RTq-PCR, respectivamente.

3.7.1 Cuantificación de citoquinas

Se evaluaron los niveles de citoquinas pro y antiinflamatorias (IL-6, IL-8 e IL-10) mediante reactivos comerciales para ELISA (Elisa BD OptEIA TM set Human, San Diego. U.S.A.) de los sobrenadantes de cultivo cosechados tanto de los pocillos sin infección como de los infectados. El procedimiento se realizó en iguales condiciones a la cuantificación de citoquinas mencionadas en el punto 3.4.2.

3.7.2 Cuantificación de la expresión de genes de citoquinas por RT-qPCR

Para cuantificar el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) expresado para IL-8 e IL-10 presente en la muestra, se extrajo el ARN celular total con un kit comercial para extracción en columna (Promega) según las indicaciones del fabricante y se determinó la concentración del ARN total extraído de cada muestra por medio de la lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm con espectrofotómetro (SmartSpec™ Plus, Bio-Rad). Luego se sintetizó el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) por la reacción de retrotranscripción con un kit comercial iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad) de acuerdo al protocolo del fabricante. Seguidamente, se amplificó el ADNc mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) en termociclador CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad), en presencia de cebadores específicos para IL-8, IL-10 y actina β, y reactivos iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad).

3.7.2.1 Extracción y purificación de ARN total

Las células HCLE crecidas a confluencia en placa de cultivo de 24 pocillos fueron infectadas con 100 μl de HSV-1 (M.O.I= 0,1) siguiendo dos esquemas de tratamiento: un pretratamiento en el que se agregaron 100 μg/ml de hAM durante 24 h previas a la infección, y un

tratamiento, en el que hAM fue agregada inmediatamente luego de la infección. Luego de 1 h de adsorción del virus a las células, las células sometidas al pretratamiento fueron incubadas 24 h más sólo con 500 µl de medio DMEM/F12 sin suero. En cambio, en el tratamiento, luego de la hora de adsorción las células fueron tratadas con 500 µl de hAM por 24h. Se añadieron pocillos control: células sin infección y sin hAM (CC) y células infectadas sin hAM (CV). Cada condición se realizó por triplicado. A las 24 h p.i., en cabina de bioseguridad nivel II (NUAIRE, CLASS II, U.S.A.), se realizó la extracción de ARN de todos los pocillos de la placa, cosechando juntos los triplicados de cada condición.

Se utilizó un kit comercial para extracción en columna (Promega) y se siguieron las instrucciones indicadas por el fabricante. Todo el proceso se realizó con material estéril y libre de ribonucleasas (RNasas). La extracción se realizó a partir de $7,5 \times 10^5$ células. Las células en cultivo se lavaron con 500 µl de solución fisiológica y se realizó el lisado y disolución de los componentes celulares con 175 µl de buffer de lisis y 3,5 µl de β-mercaptoethanol. La mezcla se colocó en un bloque térmico a 70°C durante 3 min y se centrifugó a 13000 x g durante 10 min. Al lisado se le agregaron 200 µl de etanol 95%, se mezcló por pipeteo, se transfirió la mezcla a una columna de separación SV Total RNA Isolation y se centrifugó a 13000 x g por 1 min para que el ARN se una a la membrana de sílica gel. Se descartó el eluido, se lavó la columna con 600 µl de solución de lavado ARN, se centrifugó a 13000 x g por 1 min y se volvió a descartar el eluido. Se continuó con el tratamiento con DNasa, que digiere el ADN y asegura una permanencia del ARN en la membrana. Para esto se añadió a la columna 50 µl de la mezcla de incubación de DNasa (40 µl de buffer amarillo, 5 µl MnCl 0,09 M y 5 µl enzima DNasa I) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Seguidamente se agregaron 200 µl de solución de parada DNasa y se centrifugó a 13000 x g por 1 min, para después descartar el eluido. Se realizaron dos lavados con 600 µl y 250 µl de solución de lavado ARN y se centrifugó a 13000 x g por 1 min la primera vez y por 2 min la segunda. Por último, se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se procedió a eluir el ARN en 100 µl de agua libre de RNasas mediante centrifugación a 13000 x g por 1 min.

3.7.2.2 Cuantificación de ARN

Cada muestra fué diluida 10 veces con agua libre de RNasas, para lo que se tomó 20 µl de la muestra y se llevó a un volumen final de 200 µl. Luego, 100 µl se colocaron en una cubeta de

cuarzo y se midió la absorbancia de los ácidos nucleicos de cada muestra a 260 nm y 280 nm con espectrofotómetro.

Los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm. El cociente de las absorbancias (A_{260}/A_{280}) da información sobre el grado de pureza del ARN, donde se busca un valor aproximado a 2 para un ARN de pureza óptima. La concentración del ácido nucleico extraído se puede calcular con la medida de la A_{260} con la siguiente ecuación:

$$ARN \left(\frac{\mu g}{ml} \right) = A_{260} \times 40 \times \text{factor de dilución}$$

3.7.2.3 Síntesis de ADNc

Se utilizó un kit comercial iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad) y la mezcla de reacción se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (1 μ l de Transcriptasa inversa iScript, 4 μ l 5x buffer iScript para cada muestra). El volumen final de la mezcla de reacción junto con la muestra fué de 20 μ l. El ADNc se sintetizó a partir de 1 μ g de ARN de cada muestra.

Se mezcló 15 μ l de cada muestra con 5 μ l de la mezcla de reacción y se incubó en bloque térmico a 25°C por 5 min seguido de 20 min a 46°C, y por último 1 min a 95°C. La incubación a 25°C permite la hibridación de los cebadores al ARN, a 45°C la síntesis del ADNc por la enzima transcriptasa inversa, y a 95°C la enzima se inactiva.

3.7.2.4 q-PCR en tiempo real

La q-PCR en tiempo real de los ADNc se realizaron en termociclador CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad), se utilizó el programa Bio-Rad CFX maestro y fluorocromo SYBR Green. La mezcla de reacción se preparó con 12 μ l de la mezcla maestra iQ™ SYBR Green Supermix (2x), 1 μ l de cada cebador específico (directo e inverso) (tabla 1) y 10 μ l de ADNc. Las muestras se amplificaron por triplicado y se incluyeron en la placa de PCR controles negativos sin ADNc. Las condiciones térmicas que se utilizaron en la amplificación fueron las siguientes: un ciclo inicial para activar la polimerasa a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos (desnaturalización a 95°C durante 15 s, hibridación de los cebadores y elongación a 60°C durante 30 s), por último una rampa de temperatura de 65°C a 95°C aumentando la temperatura 0,5°C cada 0,5 s (figura 6).

Luego se analizaron los resultados de la RT-qPCR por medio del método delta delta del ciclo umbral ($\Delta\Delta Cq$). El ciclo umbral (Cq) es una medida relativa de la concentración inicial del objetivo (IL-8, IL-10 y Actina β) que hay en la reacción de RT-qPCR. Cuanto menor sea el Cq

mayor es la cantidad de copias de ADNc del gen. El método $\Delta\Delta Cq$ normaliza los valores de expresión obtenidos del gen en estudio (IL-8 e IL-10) en relación a un gen control endógeno (Actina β) de la siguiente manera (Livak y col., 2001):

$$1) \Delta Cq = Cq \text{ gen estudio} - Cq \text{ gen endógeno}$$

$$2) \Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ muestra } x - \Delta Cq \text{ muestra CC}$$

$$3) \text{Fold Increase} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

Tabla 1: Cebadores utilizados en la reacción de PCR en tiempo real.

Gen	Cebador directo Cebador indirecto	Tamaño amplicón (pb)
Actina β	CCTGGCACCCAGCACAAT GCCGATCCACACGGAGTACT	70
IL-8	CACCGGAAGGAACCATCTC GGAAGGCTGCCAAGAGAGC	72
IL-10	TGCCTTCAGCAGAGTGAAGA GGTCTTGGTTCTCAGCTTGG	170

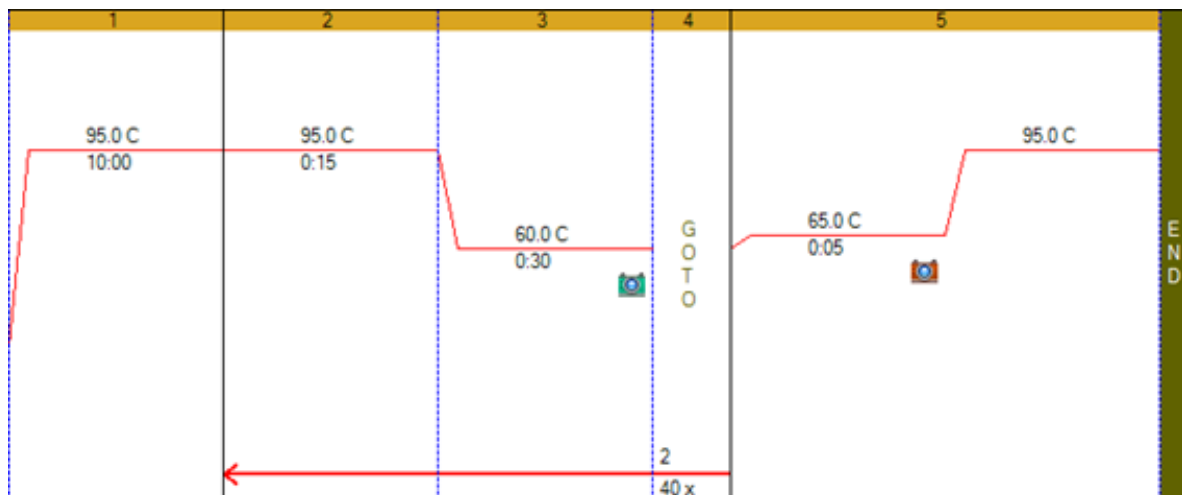


Figura 6. Esquema de condiciones térmicas para la amplificación de la q-PCR en tiempo real. Imagen extraída del programa Bio-Rad CFX maestro.

3.8 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar. Los análisis estadísticos de las variables cuantitativas con distribución normal se realizaron mediante análisis de

varianza de una vía y de dos vías (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 extractos de homogenatos de membrana amniótica

La membrana amniótica, como se mencionó anteriormente, es la capa más interna de la placenta. Este tejido durante el embarazo produce una amplia variedad de citoquinas y hormonas indispensables para mantener la tolerancia feto-materna, las cuales varían a lo largo del mismo. Al principio, es necesario un perfil supresor que permita el desarrollo de la placenta y el feto, mientras que hacia el final cambia a un perfil inflamatorio lo que favorece el parto (Rico-Rosillo y col., 2005). Por lo tanto, el perfil de citoquinas producidas en el embarazo es fluctuante y de ahí la importancia de caracterizar los extractos de membrana amniótica. Para cumplir este objetivo, se partió de los sobrenadantes de la rehidratación de los apósitos de dos lotes como se mencionó en el punto 3.1.1.

4.1.1 Cuantificación de proteínas totales por Bradford

La cuantificación de proteínas totales de los extractos se realizó por el método de Bradford (3.4.1). Los resultados se muestran en la tabla 2, la cual refleja la concentración de proteínas presente en los sobrenadantes de los apósitos rehidratados de hAM. Los valores fueron obtenidos a partir de la curva de calibración de albúmina bovina (figura 7) y los correspondientes cálculos matemáticos.

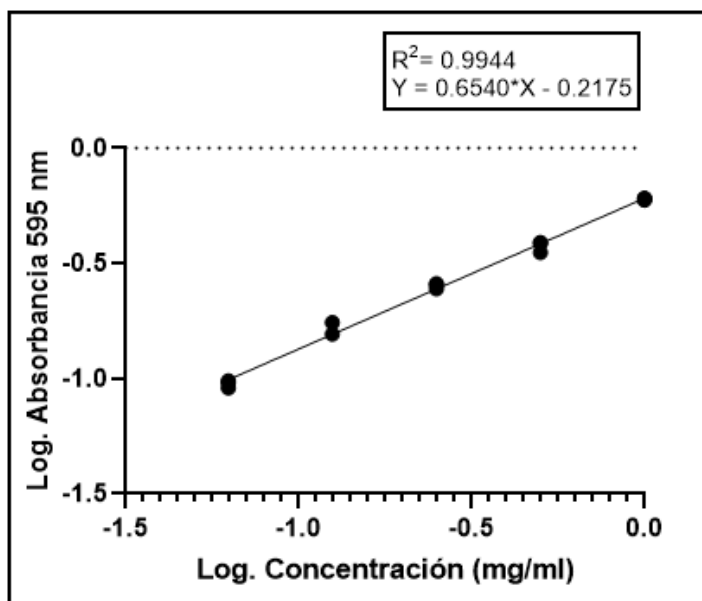


Figura 7. Curva de calibración de albúmina bovina comercial .

Tabla 2: Concentración de proteínas en los sobrenadantes de los apósitos liofilizados rehidratados de hAM.

hAM	A595 nm		mg/ml		Promedio mg/ml
522	0,459	0,521	2,742	3,802	3,272
222	0,493	0,500	3,309	3,430	3,370

El contenido total de proteínas de los sobrenadantes de los apósitos rehidratados de membrana amniótica humana (hAM) expresada en mg/ml fue de 3,272 y 3,370 para el lote 522 y 222, respectivamente. No se observan diferencias considerables en la concentración de proteínas extraídas en la fase soluble de ambas muestras, por lo que el método de extracción muestra repetitividad.

4.1.2 Cuantificación de citoquinas por ELISA

La evaluación de la concentración de diferentes citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias presentes en la hAM se realizó por medio de la técnica de ELISA (3.4.2) con curvas estándar para cada citoquina (figura 8). La tabla 3 muestra las concentraciones calculadas para TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 y su respectiva relación con las proteínas totales.

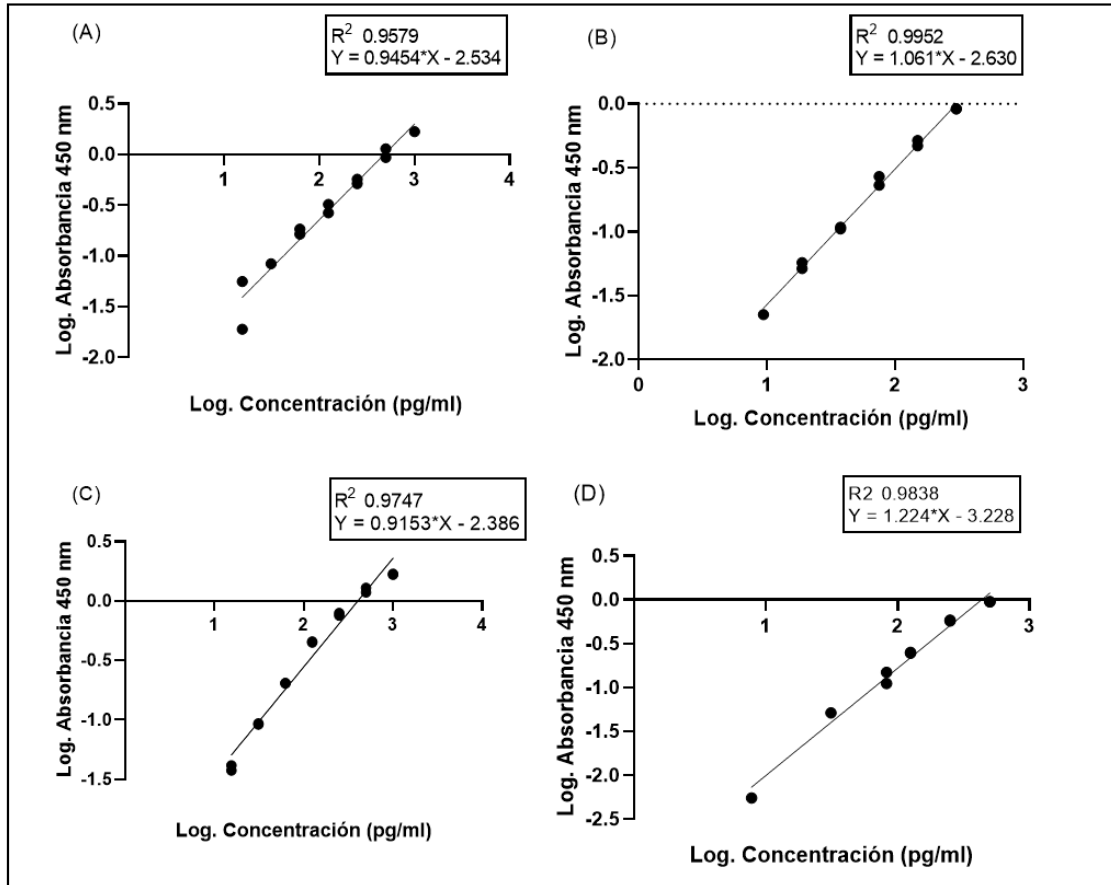


Figura 8. Curvas estándar de diferentes citoquinas. A: Curva estándar: kit comercial ELISA para TNF- α humano. B: Curva estándar: kit comercial ELISA para IL-6 humana. C: Curva estándar: kit comercial ELISA para IL-8 humana. D: Curva estándar: kit comercial ELISA para IL-10 humana.

Tabla 3: Concentración de citoquinas humanas obtenida de los sobrenadantes de los apósitos liofilizados de hAM.

Citoquina	hAM	A450 nm		pg/ml		Promedio pg/ml	pg citoquina/mg proteína total
TNF- α	522	0,081	0,075	ND*	ND*	ND*	ND*
TNF- α	222	0,061	0,065	ND*	ND*	ND*	ND*
IL-6	522	0,070	0,080	ND*	ND*	ND*	ND*
IL-6	222	0,064	0,060	ND*	ND*	ND*	ND*
IL-8	522	0,453	0,459	681,7	693,8	687,8	210,2
IL-8	222	0,317	0,303	412,9	385,9	399,4	118,5
IL-10	522	0,089	0,106	ND*	ND*	ND*	ND*
IL-10	222	0,101	0,080	ND*	ND*	ND*	ND*

*ND: no detectable.

Los datos obtenidos reflejan que ambos lotes de membrana amniótica contienen cantidades detectables de IL-8, mientras que las otras citoquinas analizadas (TNF- α , IL-6 e IL-10) se

encuentran por debajo del límite de detección del método empleado. Además, en el lote 522 la cantidad de IL-8 por mg de proteína total fue mayor con respecto al lote 222 y a otros lotes de hAM que analizó el equipo de trabajo anteriormente, esto puede deberse a variabilidad biológica entre los lotes. Aún así, los lotes se comportan de forma similar en cuanto a la presencia total de proteínas y de las citoquinas analizadas, por lo que se decidió utilizar para los ensayos sólo el extracto del lote 222.

4.2 Evaluación de la viabilidad celular de las HCLE en presencia de hAM

Antes de analizar si la hAM tiene propiedades antivirales e inmunomoduladoras, era importante evaluar si por sí misma presentaba algún efecto citotóxico en las células HCLE. Para esto, se trataron células HCLE crecidas en placas de cultivo con diferentes concentraciones de hAM durante 24 h, luego se determinó la viabilidad celular mediante dos ensayos: recuento de células viables en cámara de Neubauer y el ensayo del MTT. La tabla 4 muestra el recuento de las células viables y no viables en cámara de Neubauer y el porcentaje de células viables frente a diferentes concentraciones de hAM (figura 9).

Tabla 4: Recuento de células viables en cámara de Neubauer con Azul Tripán.

HCLE													
LÍNEA 1						LÍNEA 2							
		q1	q2	q3	q4	%			q1	q2	q3	q4	%
control células	azules	1	0	1	1		control células	azules	0	0	0	2	
	refringentes	5	6	7	9			refringentes	12	6	6	13	
	total	6	6	8	10	90.0		total	12	6	6	15	94.9
222 (100)	azules	1	1	0	1		222 (100)	azules	2		1	1	
	refringentes	7	6	4	10			refringentes	5	8	16	4	
	total	8	7	4	11	90.0		total	7	8	17	5	89.2
222 (50)	azules	3	1	1	0		222 (50)	azules	4	4	4	2	
	refringentes	7	5	8	6			refringentes	6	4	12	11	
	total	10	6	9	6	83.9		total	10	8	16	13	70.2
222 (25)	azules	5	2	1	1		222 (25)	azules	1	2	1	1	
	refringentes	9	7	6	8			refringentes	7	7	6	11	
	total	14	9	7	9	76.9		total	8	9	7	12	86.1
222 (12.5)	azules	0	0	0	0		222 (12.5)	azules	0	0	0	0	
	refringentes	3	1	2	2			refringentes	1	3	0	0	
	total	3	1	2	2	100.0		total	1	3	0	0	100.0
222 (6.2)	azules	0	1	0	0		222 (6.2)	azules	0	1	0	0	
	refringentes	3	3	5	3			refringentes	3	2	3	2	
	total	3	4	5	3	93.3		total	3	3	3	2	90.9

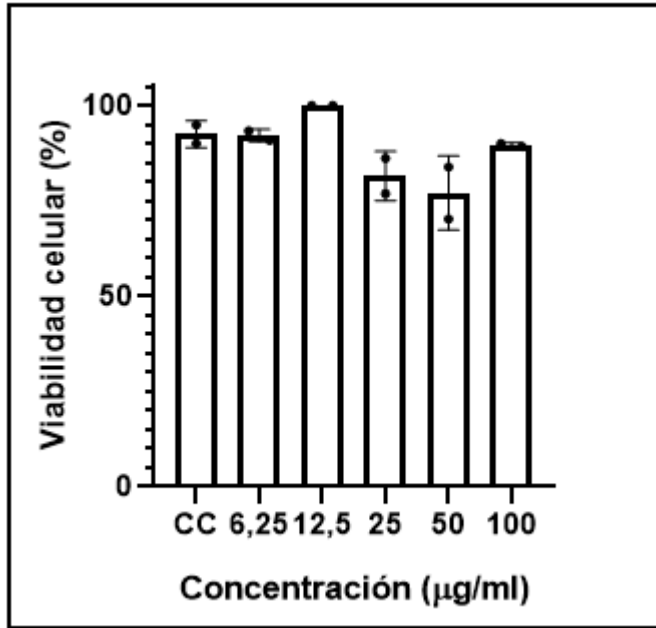


Figura 9. Porcentaje de viabilidad celular por recuento de células HCLE en cámara de Neubauer con azul tripán en presencia de hAM. Las células HCLE fueron tratadas con diferentes concentraciones (µg/ml) del homogenato de hAM durante 24 h. Luego, se realizó el recuento de células vivas y células muertas por tinción con colorante azul Tripan en cámara de Nuebauer y se calculó la viabilidad celular como el porcentaje de células viables sobre el total de células (viables + no viables) (%). Se representa la viabilidad celular (%) en función de distintas concentraciones de hAM. CC: control de células HCLE sin tratar. Resultados: no se observan diferencias estadísticamente significativas frente al control con $P < 0.05$.

Los resultados obtenidos en el ensayo demuestran que hAM no afectó de manera significativa la viabilidad de las células HCLE.

El posible efecto citotóxico de la hAM también fué evaluado por el ensayo del MTT, en el cual las células HCLE crecidas en placa de cultivo de 96 pocillos fueron tratadas con distintas concentraciones de hAM durante 24 h y, posteriormente, se evaluó la viabilidad celular a través del ensayo de las sales de formazán (MTT) descrito en el punto 3.5.2. La figura 10 muestra los resultados expresados como porcentaje de viabilidad celular en función de distintas concentraciones crecientes entre 6,2 µg/ml y 200 µg/ml del homogenato de hAM.

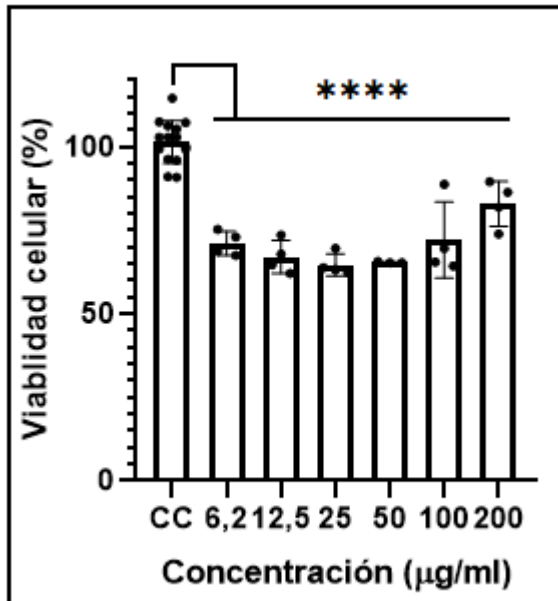


Figura 10. Viabilidad celular de HCLE en presencia de hAM por ensayo del MTT. Las células HCLE fueron tratadas con diferentes concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) del homogenato de hAM durante 24 h. Luego se agregó MTT y se midió la absorbancia a 595 nm. Se representa la viabilidad celular (%) como la relación de la Abs. de las células tratadas en función de la Abs. de las células sin tratar. CC: control, cultivo de células sin tratamiento. Se excluyeron dos valores atípicos por prueba Grubbs alfa 0,05. Resultados: se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en relación al control con **** $P < 0.0001$.

Como se puede observar en el gráfico, hubo una reducción significativa de la viabilidad celular en presencia de todas las concentraciones utilizadas de hAM con respecto al control. Ninguno de los tratamientos disminuyó el porcentaje por debajo del 50%.

El hecho de que en el recuento de viables no se habían observado diferencias significativas entre los controles y los tratamientos con hAM, pero sí se observó una reducción en las absorbancias en el ensayo del MTT para las células tratadas con hAM, sugería una disminución en el metabolismo celular en presencia de hAM. Por lo tanto, quisimos evaluar si dicho efecto era reversible.

Para ello, las células fueron incubadas 24 h con distintas concentraciones de hAM. Luego se retiró el tratamiento y se agregó medio DMEM/F12 sin suero a las células y se las incubó durante otras 24 h, con el objetivo de evaluar si el efecto de la disminución en el porcentaje de la viabilidad observado en el ensayo del MTT era permanente o si las células recuperaban su actividad metabólica luego de retirar la hAM. En paralelo se realizó nuevamente el tratamiento siguiendo los pasos anteriormente mencionados, como control, con el propósito

de comparar los dos ensayos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 11 A (tratamiento/remoción) y B (tratamiento).

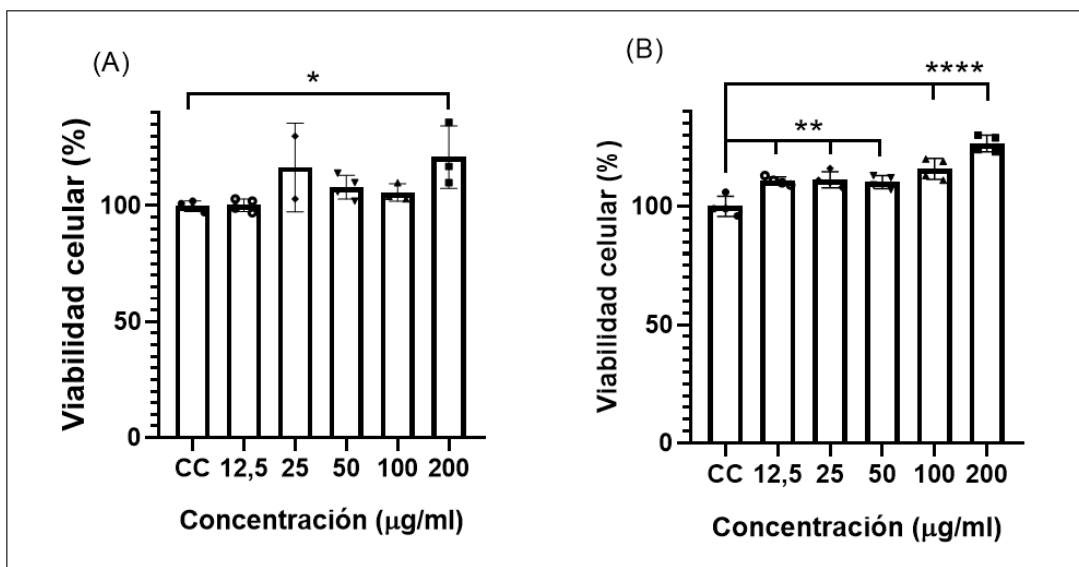


Figura 11. Viabilidad celular de HCLE en presencia de hAM por ensayo MTT. Las células HCLE crecidas en placa de 96 pocillos fueron estimuladas con diferentes concentraciones (µg/ml) de hAM durante 24 h y luego se retiró el tratamiento y se adicionó medio de mantenimiento durante 24 h más (tratamiento/remoción). En paralelo, otras monocapas de HCLE fueron estimuladas por 24 h con hAM (tratamiento). Luego de la incubación, se agregó MTT y se midió la absorbancia a 595 nm. Se representa la viabilidad celular (%) como la relación de la Abs. de células tratadas en función de la Abs. de células sin tratar. CC: cultivo de células sin hAM. A: tratamiento/remoción. B: tratamiento. * indica diferencias significativas respecto al CC. *P < 0,05, ** P < 0,01 y **** P < 0,0001.

En la figura 11 se observa que en el tratamiento el porcentaje de viabilidad celular aumentó significativamente en las células tratadas con hAM respecto al control. En el caso de la condición de tratamiento/remoción de hAM, se produjo un aumento significativo de la viabilidad celular en presencia de la concentración de 200 µg/ml, mientras que las otras concentraciones empleadas no presentaron diferencias significativas.

Los resultados arrojados por el segundo ensayo de MTT (figura 11) son discordantes con el primer ensayo realizado con la misma técnica (figura 10), pero concuerdan con datos obtenidos anteriormente por el grupo de investigación en otras líneas celulares, y los datos evaluados en el ensayo de recuento celular en cámara de Neubauer con azul tripán (figura 9). Por lo que, la disminución observada en el primer ensayo de MTT podría atribuirse a errores en la aplicación del método.

A partir de los datos obtenidos en los diferentes ensayos podemos concluir que la presencia de las distintas concentraciones de homogenatos de hAM no afectan la viabilidad de las células

HCLE. Además, al considerar que el método MTT mide la actividad de las enzimas deshidrogenasas, sobre todo mitocondriales de las células viables, se podría inferir que los valores elevados de viabilidad observados en la figura 11B se relacionan con un aumento de la actividad metabólica de las células HCLE probablemente debido a la presencia de hAM. En particular, a su contenido de factores de crecimiento como factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento de hepatocitos y factor de crecimiento de fibroblastos básicos (Choi y col., 2009). Los mayores porcentajes de viabilidad celular se obtuvieron con las concentraciones más altas estudiadas: 100 $\mu\text{g/ml}$ y 200 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,0001$), lo que podría indicar que el aumento de la viabilidad de las células HCLE es dependiente de la concentración de hAM.

4.3 Determinación de la actividad antiviral de hAM sobre HSV-1 en las células HCLE

Como se mencionó en la introducción la QEHE es una inmunopatología producida por una respuesta inflamatoria en el estroma de la córnea causada por la reactivación e infecciones recurrentes del HSV-1 a nivel epitelial. La presencia reiterada de HSV-1 en la córnea es una fuente continua de antígenos virales que provocan una respuesta inmune. Si bien las lesiones presentes en la QEHE son a causa de la neovascularización y a la respuesta inflamatoria del sistema inmune provocada por la infección recurrente de HSV-1 y no al virus en sí, si se limita la multiplicación se verían reducidos los eventos que conducen al desarrollo de las lesiones presentes en la QEHE.

Por lo tanto, nos propusimos determinar si hAM presenta actividad inhibitoria de la multiplicación de HSV-1 en las células HCLE. Para ello, se realizaron los ensayos de reducción del rendimiento viral (3.6.1) y titulación del rendimiento viral por plaqueo en medio semisólido (3.6.2).

Las células HCLE crecidas en placa de 24 pocillos fueron infectadas con HSV-1 cepa KOS (M.O.I= 0,1) y tratadas con hAM en dos condiciones diferentes (pretratamiento y tratamiento). En el pretratamiento, las células fueron incubadas con dos concentraciones diferentes (200 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$) del homogenato de hAM durante 24 h antes de la infección con HSV-1 y, luego de la infección, se les agregó medio DMEM/F12 sin suero durante 24 h más. En cambio, en el tratamiento, las células fueron infectadas con HSV-1 y luego se adicionaron las mismas concentraciones de hAM utilizadas en el pretratamiento, durante 24 h. A las 24 h p.i. las placas se observaron al microscopio óptico y se vio focos de infección viral a través del efecto citopático viral (figura 12): redondeamiento de las células HCLE y

formación de células gigantes multinucleadas (sincicios). Los efectos citopáticos que provocó la infección de HSV-1 fueron los responsables del daño de la monocapa de células HCLE. Tanto el control infectado como los dos tratamientos presentaban cambios morfológicos en comparación con el control (células no infectadas). Al cabo de la incubación, se congelaron las placas a -80°C para luego titular la infectividad viral por el método de formación de placas en medio semisólido. Para ello, monocapas de células Vero fueron infectadas con diluciones seriadas al décimo de las muestras cosechadas. Se calcularon los porcentajes de reducción como se muestra en el punto 3.6.1.

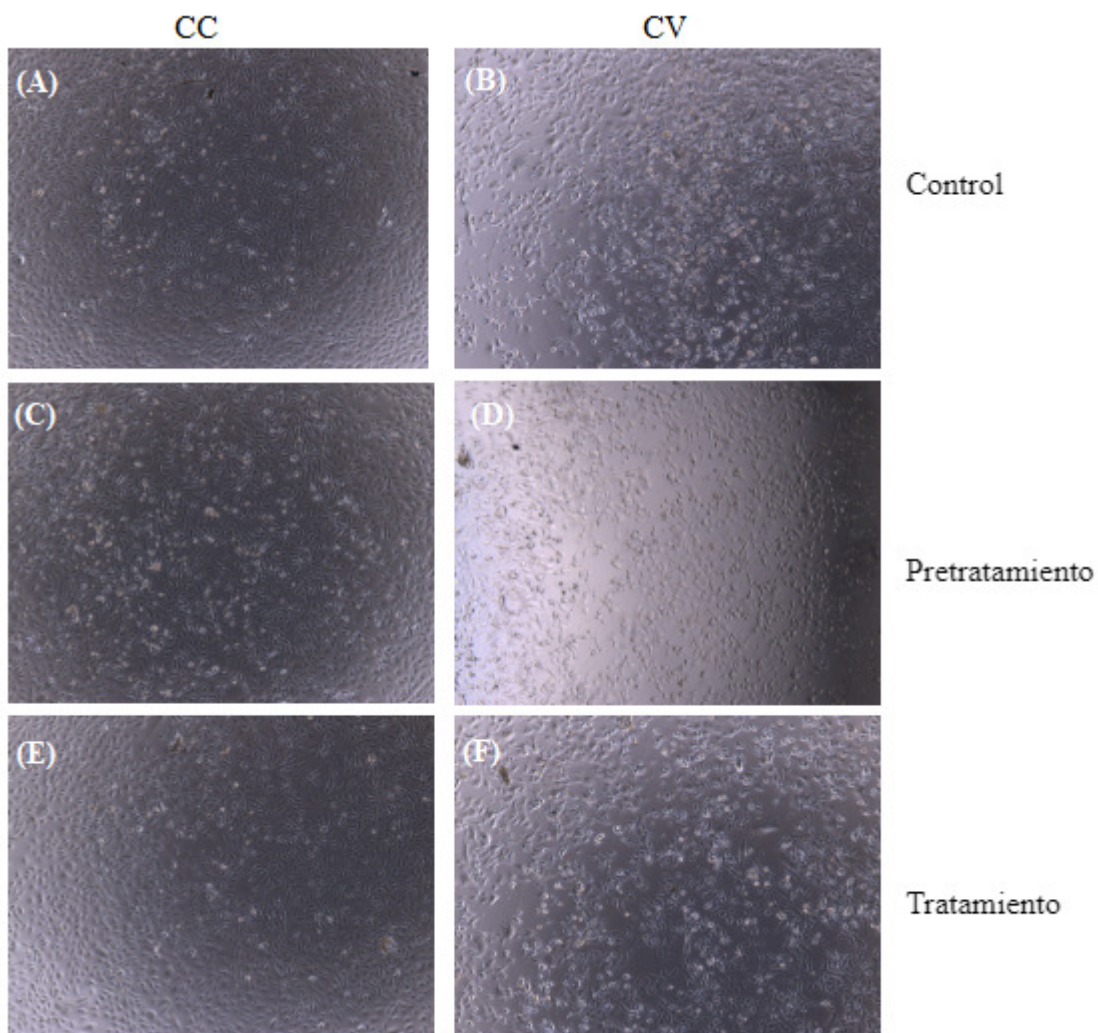


Figura 12. Microscopía de las monocapas de HCLE observadas con aumento de 400X. A: control de células no infectadas y no tratadas con hAM. B: control de células infectadas con HSV-1 y no tratadas. C: células no infectadas, pretratadas con hAM por 24h y cambio a medio fresco por 24h. D: células infectadas con HSV-1 y pretratadas con hAM por 24h y cambio a medio fresco por 24h. E: células no infectadas y tratadas con hAM por 24h. F: células infectadas con HSV-1 y tratadas con hAM por 24h.

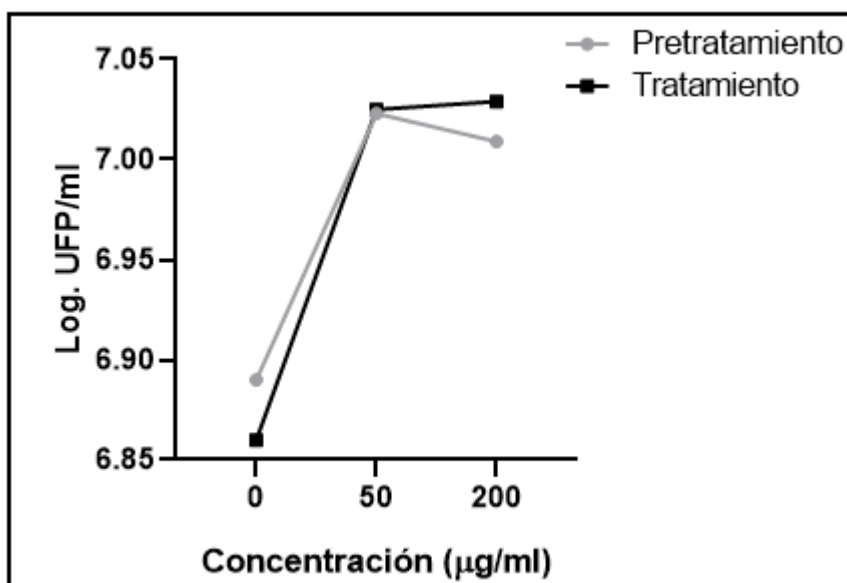


Figura 13. Efecto de hAM en la multiplicación de HSV-1 en células HCLE. Las células HCLE fueron tratadas con distintas concentraciones de hAM (200 µg/ml y 50 µg/ml) 24 h antes de la infección con HSV-1 (pretratamiento ●) o tratadas con hAM después de la infección (tratamiento ■). A las 24 h p.i., se cosecharon los sobrenadantes y se tituló el virus (UFP/ml) mediante el método de formación de placas en medio semisólido en monocapas de células Vero, por duplicado. 0: control basal, células infectadas sin hAM.

Tabla 5: Porcentajes del rendimiento viral.

Rendimiento viral (%)		
	Pretratamiento	Tratamiento
Control Basal	100	100
50 µg/ml	144	136
200 µg/ml	139	137

En la figura 13 se muestran los logaritmos de los títulos del rendimiento viral de HSV-1 en UFP/ml en función de distintas concentraciones de hAM. Además, se calcularon los porcentajes del rendimiento viral en función de las concentraciones de hAM de los dos ensayos realizados (pretratamiento y tratamiento) (tabla 5). Se puede observar que cuando las células HCLE infectadas con HSV-1 fueron pretratadas o tratadas con hAM, se registró un aumento en el porcentaje de rendimiento viral con respecto al control de infección, independientemente de la concentración empleada. Con lo cual, la aplicación de hAM no sólo no mostró inhibición de la multiplicación viral de HSV-1 en las células de HCLE, sino que la producción viral fue mayor que en los controles infectados y sin tratar. Estos resultados podrían atribuirse al mayor metabolismo en las células HCLE en presencia de hAM, lo que favorecería también la multiplicación viral. Podría tratarse también de un posible efecto

modulador de la hAM en la inhibición de la secreción de la citoquina antiviral IFN tipo 1 lo que generaría condiciones más permisivas en la maquinaria celular para la replicación viral en relación al control sin hAM.

A partir de estos datos podemos inferir que la hAM no presentó actividad inhibitoria sobre la multiplicación de HSV-1 en las células HCLE.

4.4 Evaluación de la actividad inmunomoduladora de hAM en las células HCLE

La infección de HSV-1 en células epiteliales corneales humanas tiene la capacidad de inducir la expresión y secreción de citoquinas proinflamatorias, como IFN tipo 1, IL-1, IL-6 e IL-8 (Li y col., 2005). Las citoquinas proinflamatorias participan en la patogenia de la QEH y en la evolución de las lesiones. La IL-6 es una citoquina proinflamatoria clave en la inmunopatología de QEH, estimula la infiltración de los neutrófilos a la córnea infectada y participa en el proceso de neovascularización. En estudios con ratones que carecían de IL-6 se demostró que la ausencia de esta citoquina disminuye la opacidad corneal, la inflamación y el reclutamiento de neutrófilos (Fenton y col., 2002). La IL-8 es un quimioatrayente tanto de neutrófilos como de linfocitos. La IL-10 es una citoquina antiinflamatoria, estudios en modelo de ratón con QEH han expuesto que reduce la infiltración de los neutrófilos a la córnea lo que disminuye el desarrollo de esta inmunopatología (Wang y col., 2020).

La membrana amniótica es utilizada ampliamente en patologías oculares por sus diversas propiedades biológicas, tales como su acción antiinflamatoria, cicatrización de heridas mediante la reepitelización y capacidad de reducir la neovascularización, que la hacen una herramienta útil en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Bauer y col., 2009). Estudios previos han encontrado que las células epiteliales amnióticas secretan y/o modulan la producción de una serie de citoquinas (Li y col., 2005). En la membrana amniótica se encontraron proteínas antiinflamatorias como IL-1ra e IL-10 (Bauer y col., 2011). Además, otro estudio demostró que homogeneizados de extractos de membrana amniótica humana tienen efectos antiinflamatorios al reducir la secreción de IL-6 e IL-8 en células epiteliales de córnea dañadas químicamente *in vitro* (Lee y col., 2016).

Teniendo en cuenta estos precedentes y el rol de las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en la patogenia de la QEH, nos propusimos estudiar el efecto de la hAM en la producción y la expresión de citoquinas por las células HCLE infectadas o no con HSV-1. Las concentraciones de IL-6, IL-8 e IL-10 fueron medidas a través de la técnica ELISA en los sobrenadantes cosechados de células HCLE infectadas o no con HSV-1 cepa KOS y

pretratadas o tratadas con diferentes concentraciones de hAM (3.7.1). Además, se estudió la expresión de IL-8 e IL-10 por la técnica de RT-qPCR detallada en el punto 3.7.2.

En la figura 14 se muestra la producción de IL-6 y en la figura 15 la producción de IL-8, determinadas por la técnica de ELISA, presentes en el sobrenadante del medio de cultivo de células HCLE infectadas o no con HSV-1 y tratadas 24 h antes de la infección (pretratamiento) o infectadas y tratadas inmediatamente después de la adsorción (tratamiento) con diferentes concentraciones de hAM.

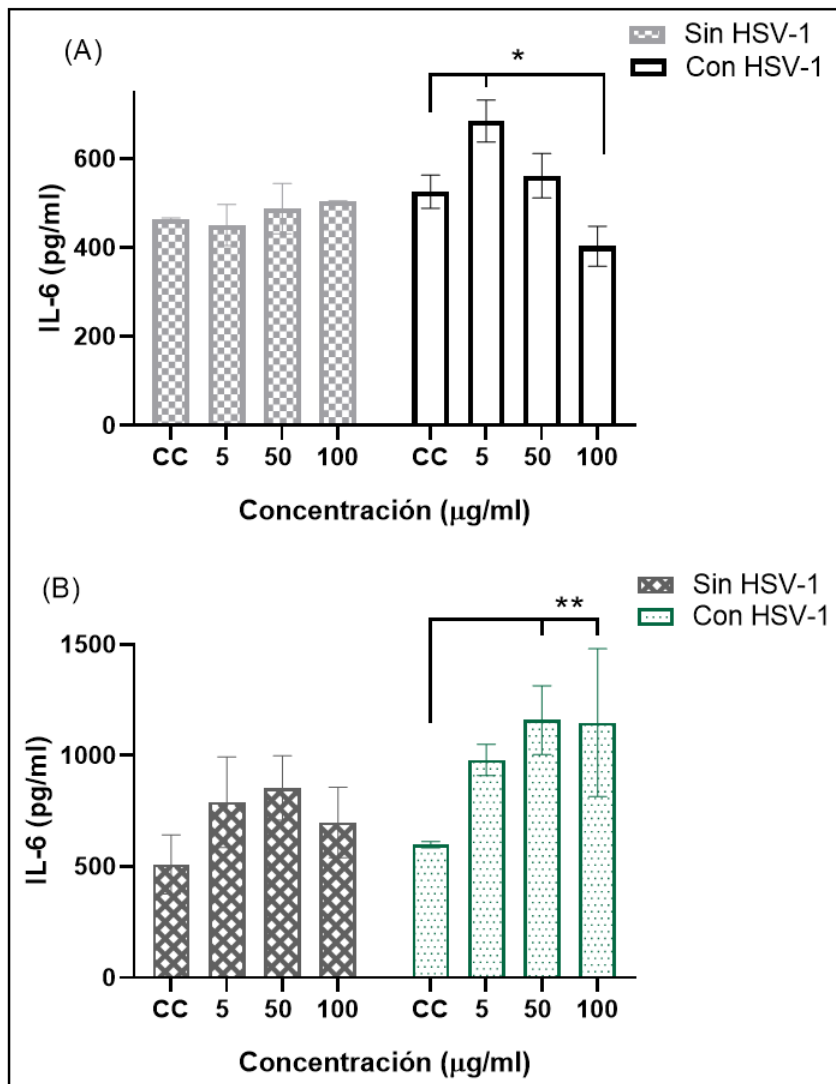


Figura 14. Efecto de hAM sobre la producción de IL-6 en células HCLE infectadas o no con HSV-1. Las células HCLE infectadas o no con HSV-1 (M.O.I= 0,1) fueron pretratadas con diferentes concentraciones (5, 50 y 100 µg/ml) de hAM por 24 h y luego incubadas con medio de mantenimiento por 24 h más (A) o tratadas por 24 h con las mismas concentraciones de hAM (B). A las 24 h p.i. se cosecharon las células y se cuantificó IL-6 con la técnica de ELISA. Se representa la concentración de IL-6 (pg/ml) como el promedio de duplicados. CC: control de células sin hAM. * indica diferencias significativas respecto al CC. *P < 0,05, ** P < 0,01.

En las células HCLE no infectadas y pretratadas o tratadas con hAM no se detectaron diferencias significativas en la concentración de IL-6 con respecto al control sin hAM. En cambio, en el caso de las células HCLE infectadas con HSV-1 cepa KOS que fueron tratadas con el protocolo del pretratamiento, la concentración de IL-6 aumentó significativamente con la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ y disminuyó significativamente con la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ respecto al control infectado ($P < 0,05$), mientras que con el protocolo de tratamiento la concentración de IL-6 aumentó significativamente en las células tratadas con la concentración de 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ del homogenato de hAM con respecto al control de células infectadas sin hAM ($P < 0,01$).

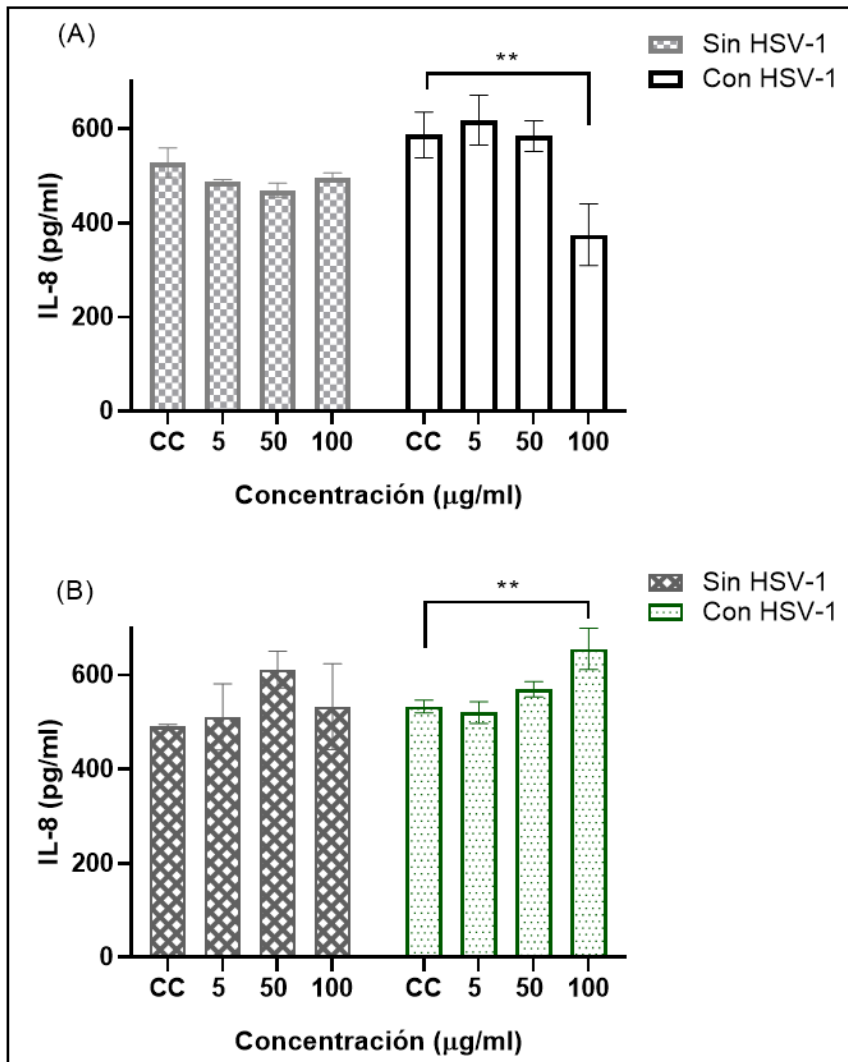


Figura 15. Efecto de hAM sobre la producción de IL-8 en células HCLE infectadas o no con HSV-1. Las células HCLE infectadas o no con HSV-1 (M.O.I= 0,1) fueron pretratadas con diferentes concentraciones (5, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$) de hAM por 24 h y luego incubadas con medio de mantenimiento por 24 h más (A) o tratadas por 24 h con las mismas concentraciones de

hAM (B). A las 24 h p.i. se cosechó el sobrenadante de cultivo y se cuantificó IL-8 con la técnica de ELISA. Se representa la concentración de IL-8 (pg/ml) como el promedio de duplicados. CC: control de células sin hAM. ** indica diferencias significativas respecto al CC. ** $P < 0,01$.

Cuando se analizó la concentración de IL-8, se encontró que la hAM no afectó significativamente la producción basal de IL-8 ni en el pretratamiento ni en el tratamiento de las células HCLE no infectadas con respecto al control sin hAM. En cambio, cuando las células HCLE fueron infectadas con HSV-1 cepa KOS, la concentración de IL-8 en el pretratamiento disminuyó significativamente en presencia de 100 $\mu\text{g/ml}$ de hAM respecto al control infectado ($P < 0,01$), mientras que cuando se las trató luego de la infección, la concentración de IL-8 aumentó significativamente en presencia de 100 $\mu\text{g/ml}$ del homogenato de hAM, con respecto al control de células infectadas sin hAM ($P < 0,01$).

En relación a la cuantificación de IL-10 por medio de la técnica ELISA, no se detectó la presencia de esta citoquina antiinflamatoria ni en los sobrenadantes de las células control ni en las células que fueron pretratadas o tratadas con hAM, por lo que, de estar presente en los sobrenadantes de las muestras, su concentración sería menor a 7,8 pg/ml (límite de detección determinado por la curva standard).

A partir de estos datos podemos inferir que la hAM no afectó la síntesis basal de IL-6, IL-8 e IL-10 en las células HCLE sin infección. Sin embargo, en las células infectadas la presencia de hAM exhibió propiedades moduladoras en la producción de IL-6 e IL-8, ya que con la concentración más alta ensayada de hAM se redujo la secreción celular de estas citoquinas en las condiciones de infección con un pretratamiento con hAM, mientras que aumentó la producción de las mismas en el tratamiento luego de la infección viral. Además, no indujo la secreción detectable por el método de ELISA de IL-10 en las células infectadas. La disminución observada en las citoquinas IL-6 e IL-8 en las condiciones de infección con un pretratamiento podría ser consecuencia del aumento del metabolismo celular en presencia de hAM, en principio se exacerbaría la actividad de la maquinaria celular que llevaría al agotamiento de nutrientes necesarios para la producción de las proteínas, por lo que estos eventos podrían ser los responsables de que las células reduzcan la síntesis proteica. Para evaluar lo propuesto se podría planificar un ensayo donde el tiempo del pretratamiento sea más corto de lo ensayado.

Para comprender en detalle el efecto de la modulación de hAM observado en la producción de citoquinas nos propusimos evaluar el efecto de hAM a nivel de la expresión transcripcional de los genes de citoquinas. Para ello se realizó la extracción de ARN a partir de células HCLE

crecidas a confluencia en placa de cultivo de 24 pocillos que fueron estimuladas con 100 $\mu\text{g/ml}$ de hAM bajo las mismas dos condiciones de los ensayos anteriores: pretratamiento y tratamiento, infectadas o no con HSV-1. Se midió la absorbancia a 260 nm y 280 nm para cuantificar la concentración del ARN aislado y estimar su grado de pureza (tabla 6). Luego, se realizaron las reacciones de RT-qPCR y al finalizar se comprobó la presencia de productos de amplificación únicos y específicos. Por lo tanto, se cuantificó la expresión de los genes IL-8, IL-10 y Actina β a partir de los valores Cq y el método $\Delta\Delta\text{Cq}$ hasta obtener los valores de fold increase (figura 16).

Tabla 6: Absorbancia de cada muestra a las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm y grado de pureza del ARN aislado a través del cociente de las longitudes de onda (A260/ A280) .

Condiciones	A260	A280	A260/ A280
Células sin HSV-1 y hAM (PC)	0,194	0,099	1,96
Células con HSV-1 sin hAM (PV)	0,195	0,093	2,10
Células sin HSV-1 pretratadas con 100 $\mu\text{g/ml}$ (P100)	0,212	0,097	2,19
Células con HSV-1 pretratadas con 100 $\mu\text{g/ml}$ (PV100)	0,232	0,104	2,23
Células sin HSV-1 y hAM (TC)	0,130	0,060	2,16
Células con HSV-1 sin hAM (TV)	0,170	0,079	2,15
Células sin HSV-1 tratadas con 100 $\mu\text{g/ml}$ (T100)	0,183	0,086	2,13
Células con HSV-1 tratadas con 100 $\mu\text{g/ml}$ (TV100)	0,161	0,079	2,04

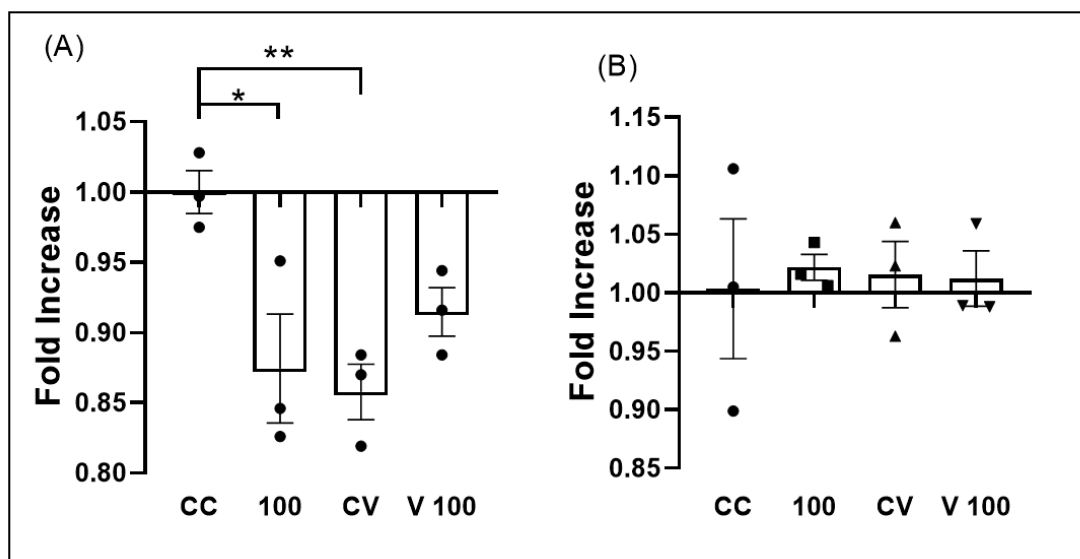


Figura 16. Efecto de hAM sobre la expresión de IL-8 en células HCLE infectadas o no con HSV-1. Las células HCLE fueron tratadas con 100 $\mu\text{g/ml}$ de hAM, 24 h previas a ser infectadas o no con HSV-1 (M.O.I= 0,1). Luego de la infección, las células fueron incubadas

con medio de mantenimiento por 24 h más (pretratamiento) (A). Las células HCLE fueron tratadas con 100 µg/ml de hAM después de la infección con HSV-1 (M.O.I= 0,1) (tratamiento) (B). A las 24 h p.i. se extrajo y purificó el ARN total de las células de cultivo y se cuantificó el ARNm de IL-8 e IL-10 con la técnica de RT-qPCR. Se representa el fold increase de la expresión de citoquinas en distintas condiciones con respecto a CC, las muestras se amplificaron por triplicado. CC: control de células sin hAM. CV: células infectadas con HSV-1, sin hAM. 100: células tratadas con 100 µg/ml de hAM. V 100: células infectadas con HSV-1 y tratadas con 100 µg/ml de hAM. * indica diferencias significativas respecto al CC. * P < 0,05. ** P < 0,01.

En el esquema de tratamiento (16B) la hAM no indujo por sí sola la expresión de IL-8 en las células HCLE no infectadas, y tampoco se observó mayor expresión de la citoquina en las células infectadas con HSV-1 tratadas con hAM, ya que no se observan diferencias significativas entre el fold increase del valor basal de expresión de IL-8 (CC: células no infectadas sin hAM) y el valor de fold increase obtenido en las células tratadas con hAM: 100 y V 100. Sorprendentemente, tampoco se observan diferencias significativas entre el valor basal y las células infectadas con HSV-1 sin hAM (CV), a pesar de que se esperaban valores mayores de expresión de IL-8 en las células infectadas. Por lo que, no se observó un efecto modulador de la hAM en este esquema a diferencia de los resultados obtenidos en la producción de IL-8 medido por ELISA.

Por otro lado, el análisis obtenido de los resultados de la RT-qPCR con el esquema de pretratamiento (16A) reveló una disminución significativa de la expresión del gen de IL-8 en dos de las tres condiciones con respecto a las células no infectadas sin hAM. Los niveles de expresión de IL-8 fueron significativamente menores en las células pretratadas con 100 µg/ml de hAM (P < 0,05) y en las células infectadas con HSV-1 sin hAM (P < 0,01) en relación a las células no infectadas sin hAM. La posible explicación de la reducción de la expresión de IL-8 en las células infectadas podría ser el hecho de que el HSV-1 produce lisis celular al multiplicarse, con lo cual la cantidad de células HCLE viables para la expresión de IL-8 es menor que en la condición basal. Podría tratarse también de diferentes estrategias de multiplicación viral en las cuales la infección de HSV-1 inhibe la transcripción y la traducción de proteínas celulares, de forma tal que la expresión del ARNm de la célula hospedadora se encuentra interrumpida, además de inducir la degradación de muchos ARNm preexistentes (Knipe y col., 2013).

La otra condición donde se observó la disminución significativa en la expresión del gen de IL-8 fue en las células pretratadas con hAM (figura 16A) con respecto a la condición basal. Sin embargo, la cuantificación de la concentración de la producción de IL-8 medido por

ELISA no se vió afectada por la presencia de hAM en las mismas condiciones ensayadas. La discrepancia en el efecto de hAM observado entre la expresión y la secreción de IL-8 probablemente se deba al tiempo seleccionado para la toma de las muestras en la extracción del ARN y al posible agotamiento de nutrientes como se discutió anteriormente. Además las citoquinas medidas luego de varias horas de incubación podrían ser el resultado de una secreción continua y que se acumulen en el sobrenadante de cultivo, y es posible que las citoquinas sean más estables que sus respectivos ARNm.

En lo que respecta al análisis de la expresión de IL-10, no se detectaron productos de amplificación del gen de IL-10 luego de 40 ciclos de PCR.

La cuantificación de la expresión de los genes se realizó a las 24 h p.i. Es probable que ese tiempo no represente la máxima expresión de los productos transcripcionales de los genes IL-8 e IL-10, ya que los resultados de la producción de IL-8 cuantificado por ELISA mostró una tendencia a valores mayores en la concentración de IL-8 en las células infectadas respecto a las células sin infección y los niveles de secreción de IL-8 aumentaron significativamente entre las células infectadas tratadas con 100 $\mu\text{g/ml}$ de hAM y el control de células infectadas. Por lo tanto, en ensayos futuros se podrían realizar determinaciones a tiempos más tempranos para la confección de una curva de expresión de las citoquinas en función del tiempo, y de ese modo determinar el tiempo en el cual se produce el máximo de expresión, para luego evaluar el efecto de la hAM.

5- Conclusiones

Sobre la base de los resultados y el análisis presentado en este trabajo arribamos a las siguientes conclusiones:

El método de rehidratación utilizado para obtener el extracto soluble de hAM muestra repetitividad entre los diferentes lotes ya que la cantidad total de proteínas extraídas, cuantificadas por el método de Bradford, no presentan diferencias significativas. Además, los extractos mantienen en solución componentes de interés biológico como las citoquinas y posibles factores de crecimiento.

Las variaciones detectadas en IL-8 podrían deberse a variabilidad biológica entre las mujeres embarazadas, premisa que podría demostrarse aumentando el número de lotes caracterizados.

Con respecto a la evaluación de la viabilidad celular en células HCLE en presencia de hAM, se concluye que el extracto de hAM no muestra citotoxicidad sobre las células HCLE e induce un aumento en el metabolismo celular.

Los ensayos de actividad antiviral demostraron que la hAM no posee actividad inhibitoria en la replicación viral, además su presencia aumenta la multiplicación del virus. Este resultado podría atribuirse al aumento del metabolismo celular demostrado, lo que podría favorecer la producción de componentes virales, o a un posible efecto modulador de la hAM sobre la producción de la citoquina antiviral IFN tipo 1, lo que generaría condiciones más permisivas en la maquinaria celular para la replicación viral, o la sumatoria de ambas posibilidades. A futuro podrían realizarse ensayos para evaluar la presencia de IFN tipo I en células infectadas con HSV-1, en presencia y ausencia de hAM.

Los estudios del efecto modulador de hAM sobre la producción de mediadores inflamatorios por parte de las células HCLE indicaron que en las células HCLE no infectadas la presencia de hAM no induce el aumento o la reducción de la producción de las citoquinas IL-6 e IL-8, en ninguno de los dos esquemas empleados. Sin embargo, en las células infectadas con HSV-1 la presencia de hAM modula la secreción de las citoquinas IL-6 e IL-8. En el caso del pretratamiento la hAM redujo la secreción de las citoquinas, mientras que aumentó la producción de las mismas durante el tratamiento. Los resultados obtenidos en las células HCLE tratadas con hAM nos permiten inferir un aumento de la respuesta inflamatoria en presencia de hAM, lo que podría favorecer la atracción e infiltración de las células

inflamatorias a la córnea necesarias para eliminar al virus. Para evaluar esto, nos proponemos explorar en futuros ensayos los efectos de hAM sobre las células inflamatorias que responden a la infección viral.

En el caso de la cuantificación de la expresión de los genes de IL-8 e IL-10 por RT-qPCR, los resultados no fueron los esperados en relación a los obtenidos en la producción de citoquinas. Sería interesante evaluar el tiempo en el cual la infección con HSV-1 induce el máximo de expresión de dichas citoquinas, para luego analizar el efecto de hAM sobre las mismas. Se propone para ello realizar las determinaciones a tiempos más cortos (menores a las 24 h.p.i.) y evaluar además otras citoquinas y factores de crecimiento de importancia en la infección con HSV-1 y en el desarrollo de la QEH, como IL-1, IFN tipo I y VEGF.

La citoquina IL-10 no pudo ser detectada por ninguno de los ensayos realizados, podría inferirse que las HCLE no secretan dicha citoquina.

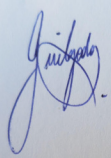
Los componentes presentes en la fase soluble del extracto de hAM no tendrían efectos benéficos sobre la inmunopatología QEH ya que aumentan el rendimiento viral y modulan la respuesta innata de las células epiteliales de la córnea a un estado inflamatorio. Sin embargo, y para tener una idea más completa de los posibles efectos de hAM en el contexto de la infección con HSV-1 y el desarrollo de la QEH, quedaría evaluar el efecto de hAM sobre las células inflamatorias de la inmunidad innata involucradas en la inmunopatología de la QEH. Además, un estudio basado en investigar el efecto del trasplante de hAM sobre la respuesta inmune adaptativa de las células T realizado in vivo en córneas de ratones con QEH sugieren una mejora de la QEH luego del trasplante al inducir la apoptosis de los linfocitos T helper (Bauer y col., 2009), por lo que resultaría interesante también estudiar el efecto del extracto de hAM sobre las células de la inmunidad adaptativa en modelos in vivo. Por otro lado, en los ensayos realizados, fueron evaluados los componentes y actividades de la fase soluble del extracto de hAM solamente. Sería de gran interés encarar en un futuro la evaluación de la parte no soluble del extracto, en la que los componentes mayoritarios (colágeno, ácido hialurónico y otros) participan activamente en la reparación de heridas y regeneración de tejido.

6- Fuentes de información y referencias bibliográficas

- Azher, T. N., Yin, X. T., Tajfirouz, D., Huang, A. J. & Stuart, P.M. (2017). Herpes simplex keratitis: challenges in diagnosis and clinical management. *Dove Press Journal: Clinical Ophthalmology*, 11, 185-191. <http://dx.doi.org/10.2147/OPHTH.S80475>.
- Bauer, D., Wasmuth, S., Hennig, M., Baehler, H., Steuhl, K. P., & Heiligenhaus, A. (2009). Amniotic membrane transplantation induces apoptosis in T lymphocytes in murine corneas with experimental herpetic stromal keratitis. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(7), 3188-3198.
- Bauer, D., Hennig, M., Wasmuth, S., Baehler, H., Busch, M., Steuhl, K. P., Thanos, S. & Heiligenhaus, A. (2012). Amniotic membrane induces peroxisome proliferator-activated receptor- γ positive alternatively activated macrophages. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(2), 799-810.
- Biswas, P. S., & Rouse, B. T. (2005). Early events in HSV keratitis—setting the stage for a blinding disease. *Microbes and infection*, 7(4), 799-810.
- Choi, J.A., Jin, H.J., Jung, S., Yang, E., Choi, J.S., Chung, S.H. & Joo, C.K. (2009). Effects of amniotic membrane suspension in human corneal wound healing in vitro. *Mol Vis*, 15, 2230-8. PMID: 19907665; PMCID: PMC2774451.
- Carballal, G. & Oubiña, J. R. (2015). Introducción al estudio de la Virología humana en G. Carballal (Ed.), *Virología Médica* (pp. 37-46). Corpus.
- Chiaradía, P., Tytiun, A., Botta, M. J., Albornoz, S., Huarte, L. & Abuin, L. (2010). Use of amniotic membrane in ocular surface reconstruction: preliminary results. *Oftalmol Clin Exp*, 4(2), 64-68.
- Fenton, RR., Molesworth-Kenyon, S., Oakes, JE., Lausch, RN. (2002). Linkage of IL-6 with neutrophil chemoattractant expression in virus-induced ocular inflammation. *Invest Ophthalmol Visual science*, 43(3), 737-43.
- Fénelon, M., Catros, S., Meyer, C., Fricain, J. C., Obert, L., Auber, F., Louvrier, A. & Gindraux, F. (2021). Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering. *Membranes*, 11, 387. <https://doi.org/10.3390/membranes11060387>
- Fernández, A., Moreno, J., Prósper, F., García, M., & Echeveste, J. (2008). Regeneración de la superficie ocular: stem cells/células madre y técnicas reconstructivas. *Anales Del Sistema Sanitario De Navarra*, 31(1), 53-69. <https://recyt.fecyt.es/index.php/ASSN/article/view/1994>.
- Heiligenhaus, A., Bauer, D., Meller, D., Steuhl, K. P., & Tseng, S. C. (2001). Improvement of HSV-1 necrotizing keratitis with amniotic membrane transplantation. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(9), 1969-1974.

- Heiligenhaus, A., Li, H., Hernandez Galindo, E. E., Koch, J. M., Steuhl, K. P. & Meller D. (2003). Management of acute ulcerative and necrotising herpes simplex and zoster keratitis with amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol*, 87, 1215–1219.
- Knipe, D. M., Samuel, C. E. & Palese, P. (2001). Virus-Host cell interactions en D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams and Wilkins, versión electrónica.
- Knipe, D.M. & Howley, P.M. (2013). Herpesviridae en E. Pellet & B. Roizman (Eds.), *Fields Virology* (pp. 1802- 1822). Lippincott Williams and Wilkins.
- Knipe, D.M. & Howley, P.M. (2013). Herpes Simplex Viruses en B. Roizman, D. M. Knipe & R. J. Whitley (Eds.), *Fields Virology* (pp. 1823- 1895). Lippincott Williams and Wilkins.
- Labib, B. A. & Chigbu, D. I. (2022). Clinical Management of Herpes Simplex Virus Keratitis. *Diagnostics*, 12, 2368. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12102368>.
- Lacorzana, J. (2020). Amniotic membrane, clinical applications and tissue engineering. Review of its ophthalmic use. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 95, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.oftal.2019.09.010>.
- Lee, H. N., Bernardo, R., Han, G. Y., Kim, G., Kim, J. S., Jung, W., Kim, K. N., Kim, J. C. & Kim, C. (2016). Human Amniotic Membrane Extracts have Anti-Inflammatory Effects on Damaged Human Corneal Epithelial Cells In Vitro. *Journal of Hard Tissue Biology*, 25[3], 282-287.
- Li, H., Niederkorn, JY., Neelam, S., Mayhew, E., Word, RA., McCulley, JP., & Alizadeh, H. (2005). Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 900-907.
- Li, H., Zhang, J., Kumar, A., Zheng, M., Atherton, S. S., & Yu, F. S. X. (2006). Herpes simplex virus 1 infection induces the expression of proinflammatory cytokines, interferons and TLR7 in human corneal epithelial cells. *Immunology*, 117(2), 167-176.
- 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, 402-8.
- Lobo, A. M., Agelidis, A. M., & Shukla, D. (2019). Pathogenesis of herpes simplex keratitis: The host cell response and ocular surface sequelae to infection and inflammation. *The ocular surface*, 17(1), 40-49.
- Mandell, G. L., Bennett, J. E. & Dolin, R. (2012). Virus del herpes simple en J. T. Schiffer & L. Corey (Eds.), *Enfermedades infecciosas*. Elsevier.
- Martínez Afanador, A. M., Santacruz Valdés, C. & Climent Flores, A. (2008). Queratitis Herpética. *Revisión. Sociedad Colombiana de Oftalmología*, 41 (2), 580- 592.

- Murray, P. R., Rosenthal, K. S. & Pfaller, M. A. (2017). *Virus del herpes humanos*. Elsevier.
- Nevins, J. R. (2001). Cell transformation by viruses en D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams and Wilkins, versión electrónica.
- Rico-Rosillo, M. G. & Vega-Robledo, G.B. (2012). Mecanismos inmunológicos involucrados en el embarazo. *Ginecol Obstet Mex*, 80(5), 332-340.
- Saravia, M., Zeman, L., & Berra, A. (2020). Lyophilized amniotic membrane patch (LAMPatch) as a replacement of tamponades in the treatment of primary rhegmatogenous retinal detachment. *International Journal of Retina and Vitreous*, 6(1), 1-5.
- Sauer Ramirez, C., Escalera Zuñiga, E., Rodriguez, J.L.,... & Hernandez Isaac, M. (2018). *Cámara de Neubauer*. Blog del Manual del Laboratorio. <https://blogceta.zaragoza.unam.mx/manualbct2/anexo-2-camara-de-neubauer/>
- Shayan Asl N., Nejat F. & MohMAmadi P. (2019). Amniotic Membrane Extract Eye Drop Promotes Limbal Stem Cell Proliferation and Corneal Epithelium Healing. *Cell J*, 20(4), 459-468. doi:10.22074/cellj.2019.5423 18.
- Smith, J. B., Herbert, J. J., Truong, N. R. & Cunningham, A. L. (2022). Cytokines and chemokines: The vital role they play in herpes simplex virus mucosal immunology. *Frontiers in Immunology*, 13:936235. doi:10.3389/fimmu.2022.936235.
- Toda, A., Okabe, M., Yoshida, T. & Nikaido, T. (2007). The Potential of Amniotic Membrane/ Amnion-Derived Cells for Regeneration of Various Tissues. *Pharmacological Sciences*, 105, 2015-228. doi:10.1254/jphs.CR0070034.
- Usatine, RP., Tinitigan, R. (2010). Nongenital Herpes Simplex Virus. *American Family Physician*. 82, 1075-1082.
- Wang, L., Wang, R., Xu, C., & Zhou, H. (2020). Pathogenesis of herpes stromal keratitis: immune inflammatory response mediated by inflammatory regulators. *Frontiers in Immunology*, 11, 766.
- Weiyun, S., Min, C. & Lixin, X. (2007). Amniotic membrane transplantation combined with antiviral and steroid therapy for herpes necrotizing stromal keratitis. *Ophthalmology*, 114 (8), 1476- 1481. doi: 10.1016/j.ophtha.2006.11.027.



Rodas Rojas Gisela
36.286.260