



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

EVALUACIÓN IN VITRO DEL
POTENCIAL REGENERATIVO DE UN
GEL DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS
CON CÉLULAS EPITELIALES
AMNIÓTICAS HUMANAS

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN INMUNOLOGÍA

MARCO ANTONIO ISAÍAS CABELLO
NAPURÍ

LIMA – PERÚ

2019

Asesor: José Luis Aguilar Olano

Dedico la presente tesis a mis padres Isaías y Vilma por haber sido mi apoyo a lo largo de toda mi carrera universitaria, quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más. Gracias por inculcar en mi el ejemplo de esfuerzo, valentía, y enseñarme a no temer a las adversidades porque Dios esta siempre conmigo.

AGRADECIMIENTOS

Al iniciar esta etapa de la redacción, me puse a pensar en las anécdotas, bromas, consejos y palabras de apoyo de todas las personas que formaron parte de este trabajo, y se que al leerlo se sentirán parte de él y de que pudimos lograr este objetivo final.

En primer lugar, a Dios por haber escuchado mis oraciones, por brindarme la vida y darme las fuerzas para no desistir, y permitir que mis seres queridos y amigos puedan ser parte de la alegría de cumplir con este objetivo.

Al Dr. José Luis Aguilar Olano, por ofrecerme los conocimientos aprendidos y plasmados en este trabajo, así también por sus sabios consejos y sugerencias que hicieron que me desarrollara no solo académicamente sino como persona en valores.

A mis padres, Vilma y Isaías por su comprensión, dedicación e incondicional apoyo con sus consejos y constante aliento en cada paso de mi vida. A mi hermana Betty, mi sobrino Thiago y Silvia que fueron el motor para seguir luchando y demostrando con el ejemplo, que el esfuerzo es el mejor camino para conseguir nuestros objetivos.

No puedo olvidar y dejar de hacer mención a aquellas personas con los que compartimos alegrías y amarguras en el Laboratorio de Inmunología del LID - UPCH, y fueron un gran apoyo en la realización de esta tesis, Willy, Sandra Milagros, Kiomi, Debra, Alejandrina, gracias chicos. Y a todos aquellos que con una palabra de aliento y consejo permitieron llevar a cabo este trabajo.

A INNOVATE por impulsar el desarrollo científico y tecnológico del país, por incentivar y promover entre los investigadores la realización de estudios, para elevar el nivel de conocimientos profesionales, con el fin de mejorar la calidad de los trabajos de investigación.

RESUMEN

El daño de la piel se puede dar a nivel dérmico y epidérmico, por causas químicas, eléctricas, térmicas y metabólicas. Un desorden metabólico que genera un daño epidérmico crónico es la diabetes, que se ocasiona por deficiencia de producción o imposibilidad de uso de la insulina. La Diabetes Mellitus tipo 2 presenta como principal problema la formación de úlceras cutáneas en los miembros inferiores o “pie diabético” y de los cuales más del 50% terminan en amputación de la extremidad. OBJETIVOS: Evaluar *in vitro* el potencial regenerativo y proliferativo de un gel de plasma rico en plaquetas con células epiteliales humanas de amnios. METODOLOGÍA: Se obtuvo células epiteliales amnióticas humanas (hAEC) y fibroblastos a partir de tejidos como membrana amniótica y piel, utilizando técnicas en cultivo celular. Se estandarizó el cultivo de las células epiteliales amnióticas humanas (hAEC) y se cuantificó los factores de crecimiento (EGF, VEGF, PDGF, TGF- β , PGE2) liberados por el biocompuesto y hAEC a los 48h (MC48h). El Lisado Plaquetario Humano (HPL) (5%,10% y 20%) y MC48h como alternativa al uso de Suero Bovino Fetal, se analizó mediante curvas de crecimiento y doble proliferación en el tiempo, sobre fibroblastos dérmicos humanos. El efecto sinérgico (proliferativo, migratorio y afinidad) del biocompuesto, se realizó mediante ensayos de proliferación, migración celular, citotoxicidad y viabilidad celular sobre los fibroblastos dérmicos. RESULTADOS: El biocompuesto, producto biológico, formado de hAEC y plaquetas, libera factores de crecimiento como PDGF (3651 ± 881.5 pg/mL) y EGF (683.6 ± 462.2 pg/mL) ($p < 0.0001$) que intervienen en la proliferación de fibroblastos y queratinocitos, VEGF (389 ± 67.66 pg/mL) ($p < 0.0001$), principal mediador de la angiogénesis y linfangiogénesis, y TGF- $\beta 1$ (1611 ± 68.47 pg/mL) ($p = 0.002$) que permite la reepitelización, PGE2 (4393 ± 729.4 pg/mL) un principal inmunorregulador de linfocitos T y células dendríticas, y que en conjunto intervienen directamente en las etapas del proceso de reparación tisular. El biocompuesto presenta efectos proliferativos, migratorios y no citotóxicos para los fibroblastos *in vitro* con factores de crecimiento que permitirán mejorar el proceso de cicatrización en heridas crónicas. PALABRAS CLAVE: *Células Epiteliales Amnióticas Humanas, cicatrización, proliferación, fibroblastos, diabetes tipo II, pie diabético.*

ABSTRACT

Damage to the skin can occur at a dermal and epidermal level, due to chemical, electrical, thermal and metabolic causes. A metabolic disorder that generates a chronic epidermal damage is diabetes, which occurs due to production deficiency or inability to use insulin. Diabetes Mellitus type 2 presents as the main problem the formation of skin ulcers in the lower limbs or "diabetic foot", and more than 50% of the cases ends in amputation of the limb. OBJECTIVES: Evaluate *in vitro* the regenerative and proliferative potential of a platelet rich plasma gel with human amnion epithelial cells (hAEC). METHODOLOGY: hAEC and fibroblasts were obtained from tissues such as amniotic membrane and skin, using cell culture techniques. The culture of hAEC was standardized and the growth factors (EGF, VEGF, PDGF, TGF- β , PGE2) released by the biocomposite and hAEC were quantified at 48h (MC48h). The Human Platelet Lysate (HPL) (5%, 10% and 20%) and MC48h used instead of Fetal Bovine Serum (FBS) were analyzed by growth curves and double proliferation over time, on human dermal fibroblasts. The synergistic effect (proliferative, migratory and affinity) of the biocomposite is carried out through proliferation, cell migration, cytotoxicity and cell viability tests on the dermal fibroblasts.

RESULTS: The biocomposite, biological product, formed of hAEC and platelets, released growth factors such as PDGF (3651 ± 881.5 pg/mL) and EGF (683.6 ± 462.2 pg/mL) ($p < 0.0001$) that intervene in the proliferation of fibroblasts and keratinocytes. It also released VEGF (389 ± 67.66 pg/mL) ($p < 0.0001$), main mediator of angiogenesis and lymphangiogenesis, TGF- β 1 (1611 ± 68.47 pg/mL) ($p = 0.002$) factor that allows in reepithelialization, and PGE2 (4393 ± 729.4 pg/mL), the main immunoregulator of T lymphocytes and dendritic cells. All these factors released intervene directly in the stages of the tissue repair process. The biocomposite has proliferative, migratory and non-cytotoxic effects for fibroblasts *in vitro* with growth factors that improve the healing process in chronic wounds.

KEY WORDS: Human Amniotic Epithelial Cells, wound healing, proliferation, fibroblasts, type II diabetes, diabetic foot.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Células NK	= <i>natural killer cell</i> (células asesinas naturales)
EGF	= <i>Epidermal growth factor</i> (Factor de crecimiento epidermal)
ESC	= Células epiteliales embrionarias
Feeder layer	= Capa alimentadora de células
FGF	= <i>Fibroblast growth factors</i> (Factor de crecimiento fibroblástico)
hAEC	= <i>Human amniotic epithelial cells</i> (células epiteliales amnióticas humanas)
hAMSC	= <i>Human amniotic mesenchymal stromal cells</i> (células estromales mesenquimales amnióticas humanas)
hCMSC	= <i>Human chorionic mesenchymal stromal cells</i> (células estromales mesenquimales coriónicas humanas)
hCTC	= <i>Human chorionic trophoblastic cells</i> (células trofoblásticas coriónicas humanas)
HLA	= Antígenos leucocitarios humanos
MC	= Medio condicionado de la hAEC
MTT	= Sales de Bromuro de 3(45-demetiltiazol-2-yl)-2.5difeniltetrazolio)
PBMC	= <i>Peripheral blood mononuclear cell</i> (Células mononucleares de sangre periférica)
PDGF	= <i>Platelet-derived growth factor</i> (Factor de crecimiento plaquetario)
VEGF	= <i>Vascular endothelial growth factor</i> (Factor de crecimiento vascular endotelial)

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II: PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	4
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
2.2 JUSTIFICACIÓN	6
CAPÍTULO III: MARCO TEÓRICO	8
3.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	8
CAPÍTULO IV: OBJETIVOS	14
4.1 OBJETIVO GENERAL	14
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	14
CAPÍTULO V: HIPÓTESIS	14
CAPÍTULO VI: MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1 DISEÑO METODOLÓGICO	15
6.2 POBLACIÓN Y MUESTRA	15
CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD	15
6.3 PROCEDIMIENTO	16
6.3.1 AISLAMIENTO DE CÉLULAS	16
6.3.2 CURVA DE CRECIMIENTO CON HPL	21
6.3.3 ENSAYO DE DOBLE PROLIFERACIÓN	22
6.3.4 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CON MTT	23
6.3.5 ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR	26
6.3.6 PREPARACIÓN DE GEL PLAQUETARIO	27
6.3.7 ENSAYOS DE AFINIDAD DEL BIOCMPUESTO	28
6.3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
CAPÍTULO VII: RESULTADOS	32
CAPÍTULO VIII: DISCUSIÓN	59
CAPÍTULO IX: CONCLUSIONES	68
CAPÍTULO X: RECOMENDACIONES	70
CAPÍTULO XI: REFERENCIAS	71

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas la investigación en salud para el mejoramiento de la regeneración y/o cicatrización de heridas ha permitido implementar desde el uso de geles biológicos y sintéticos, hasta la infiltración celular de fibroblastos, queratinocitos, y células madre mesenquimales, para el tratamiento de enfermedades como quemaduras, epidermolisis ampollar, psoriasis, úlceras diabéticas, entre otras. Según datos publicados en el 2014 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la prevalencia mundial (normalizada por edades) de la diabetes se ha duplicado desde 1980, pues ha pasado del 4,7 al 8,5% en la población adulta⁽²⁾, debido al incremento en los factores de riesgo conexos, como el sobrepeso o la obesidad⁽¹⁾. En la última década, la prevalencia y la mortalidad causada por la diabetes han aumentado considerablemente más en los países de ingresos bajos y medianos que en los de ingresos altos⁽²⁾. En 2012, la diabetes provocó 1,5 millones de muertos, puesto que se requieren técnicas específicas para diferenciar entre diabetes tipo 1 (que exige inyecciones de insulina para la supervivencia del paciente) y diabetes tipo 2 (en la que el organismo no puede utilizar adecuadamente la insulina que produce)⁽³⁾. La mayoría de las personas afectadas tienen diabetes de tipo 2, que solía ser exclusiva de adultos, y que ahora también se da en niños. Todos los tipos de diabetes pueden provocar complicaciones en muchas partes del organismo e incrementar el riesgo de muerte. Entre las posibles complicaciones se incluyen: infarto de miocardio, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia renal, amputación de piernas, pérdida de visión y daños neurológicos.⁽²⁾

Las úlceras del pie diabético comparten varios factores causantes con otros tipos de heridas crónicas, que incluyen hipoxia local, isquemia, colonización bacteriana y respuestas alteradas de estrés celular y sistémico. Sin embargo, la úlcera del pie diabético es única en muchos aspectos.⁽⁴⁾ El factor más significativo exclusivo del desarrollo de la ulceración es la neuropatía periférica, que afecta a todos los tipos de fibras nerviosas del pie. La neuropatía de las fibras motoras conduce a debilidad, atrofia muscular y paresia. La piel seca puede conducir a la fisuración

(que sirve como un portal de entrada para las bacterias) y agrava la hiperqueratosis plantar en las áreas de fricción.^(5,6)

A nivel mundial se viene desarrollando diversas técnicas y estudios dirigidos a regenerar el tejido dañado en un menor tiempo, usando el cultivo celular y la ingeniería de tejidos como herramienta para la medicina regenerativa.

Las células estromales mesenquimales multipotentes, son muy estudiadas actualmente por sus propiedades regenerativas e inmunológicas. De particular interés son las células humanas epiteliales de tejido amniótico (hAEC), ya que presentan un comportamiento semejante a las células madre de origen embrionario expresando marcadores como Oct-4 (*octame binding transcription*), Sox-2 (*sex determining region Y-box 2*), Nanog y Rex-1 que son característicos de células pluripotentes, y presentan HLA-G que induce la apoptosis e inhibe la proliferación de las células TCD8⁺ y TCD4⁺ activadas reduciendo el rechazo inmunológico. Así mismo, no forman teratomas debido a que no presentan activación de la telomerasa. Por tal motivo, el uso de las hAEC como fuente de moléculas co-estimuladoras para la reparación tisular, genera un microambiente inmunológicamente importante para la cicatrización de heridas, brindándonos promisorios resultados como nueva alternativa de posibles aplicaciones clínicas en el tratamiento de úlceras cutáneas de pie diabético.

La obtención de la membrana amniótica no presenta complicaciones, debido a que al ser un tejido de desecho en el proceso de parto, no presenta contacto directo con la donante ni con el recién nacido. Las limitaciones estarían en la posibilidad de captar donadoras que se encuentren dentro de los criterios de inclusión y exclusión.

El presente estudio generará una serie de conocimientos acerca del efecto sinérgico de las hAEC y plasma rico en plaquetas (PRP) sobre los fibroblastos, principal componente en la cicatrización de heridas agudas y crónicas, como las úlceras diabéticas tipo II, quemaduras u otras dolencias. Asimismo se evaluará el efecto biológico e inmunológico del biocompuesto formado, y se cuantificará los factores de crecimiento como VEGF, EGF, PDGF, TGF- β y PGE2, que participan directamente en reparar en un menor tiempo la zona dañada, reduciendo la intervención quirúrgica y futuras amputaciones de extremidades inferiores.

Con este estudio esperamos una alta efectividad *in vitro* del efecto sinérgico de hAEC y PRP sobre los fibroblastos y la regeneración de tejido dañado, con expectativas de uso *in vivo* como terapia biológica, la cual mejorará en los pacientes con diabetes tipo 2 la calidad de vida, reincorporándose a la sociedad.

CAPÍTULO II: PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Diabetes Mellitus (DM) es considerada por la OMS como una de las cuatro principales enfermedades no transmisibles para intervenir con carácter prioritario a nivel global. En la actualidad la prevalencia de la diabetes ha aumentado debido al sobrepeso, a la mala alimentación y falta de actividad física⁽³⁾. Desde el año 1980 hasta la actualidad se ha duplicado su tasa de prevalencia de 4.7 a 8.5%, provocando en el 2012 la muerte de 1,5 millones de personas a nivel mundial. En 2013 el 96.9% de los casos corresponden a DM tipo 2, una de cuyas complicaciones severas es la formación de úlceras de pie diabético⁽⁷⁾. De acuerdo a la OMS, del 15 - 25% de los pacientes con DM desarrollará pie diabético, teniendo el riesgo de consecuencias patológicas incluido la infección, ulceración y/o destrucción de tejidos profundos. Provocando amputaciones en un 85% de los pacientes, ocasionando su discapacidad parcial o definitiva, con una incidencia de mortalidad a los 5 años en 44.3%⁽¹⁾. En el Perú, los estudios datan a 1999 donde Alcántara y *col.* reportaron que de 206 pacientes que padecían pie diabético, el 61.2% sufrió amputación⁽⁸⁾. Entre los años 2006 y 2008 el Hospital Nacional 2 de Mayo, reportó que de 179 pacientes que se internaron con diagnóstico de pie diabético, el 98.2% padecía DM tipo 2, y de todos ellos el 64% sufrieron al final algún tipo de amputación⁽⁹⁾. Los principales signos de úlceras de pie diabético son neuropatías periféricas (60-80%), isquemia (30-40%) y osteomielitis difusa que pueden llevar a la amputación del miembro inferior⁽⁹⁾.

Los tratamientos de pie diabético son a base de antibacterianos, desbridamiento quirúrgico, coberturas y reconstrucciones vasculares, llegando a amputar por encima del 50% a los pacientes tratados. Es por ello que el presente estudio plantea la evaluación *in vitro* del potencial regenerativo de un biocompuesto formado con células epiteliales de amnios humanas (hAEC) y gel de plasma rico en plaquetas (PRP), cuyos efectos sinérgicos liberen a los principales factores de crecimiento factor de crecimiento epidermal (EGF), vascular endotelial (VEGF), transformante beta (TGF- β), derivado de plaquetas (PDGF), y prostaglandina E2

(PGE2) que estimulen la proliferación y migración de fibroblastos, uno de los principales componentes dérmicos, como solución promisoría, para una rápida cicatrización con mínima fibrosis, baja inflamación y buena recuperación, aminorando los principales riesgos al tratar a un paciente con úlceras de pie diabético, reduciendo considerablemente la amputación, los costos de atención y fundamentalmente mejorar la calidad de vida del paciente con DM tipo 2.

2.2 JUSTIFICACIÓN

Los tratamientos médicos a nivel mundial frente a úlceras cutáneas generadas por Diabetes Mellitus (DM), conocidas como pie diabético no logran reducir el riesgo de amputación de las extremidades inferiores del más del 60% de pacientes. Lo que genera de forma progresiva dentro de los 5 años post amputación una tasa de mortalidad de 44.3%⁽³⁾. Es por ello que surge la alternativa de tratar esta dolencia mediante terapia celular, con técnicas en cultivo celular e ingeniería de tejidos, que actualmente abarcan los principales tratamientos médicos con buenos resultados. El presente trabajo tiene como objetivo principal evaluar el efecto regenerativo y cicatrizante de un gel de células epiteliales de amnios humanas (hAEC) y PRP.

En los últimos años el tejido amniótico ha despertado un gran interés como fuente de células madre, y como apósitos liofilizados y frescos para el tratamiento de quemaduras, debido a sus propiedades regenerativas e inmunomoduladoras ampliamente estudiadas.

La estructura del amnios presenta estratos bien diferenciados y estudiados, una capa superficial que conforma el epitelio del tejido, denominada células epiteliales de amnios humana (hAEC), las cuales presentan un comportamiento semejante a las células madre, no expresando HLA A-B-C (clase Ia) y HLA DR (clase II), ni moléculas co-estimuladoras, presentan antígenos HLA-G, importantes en la inmunotolerancia del feto, que contribuye en la inmunomodulación de la inhibición de las células natural killer y macrófagos, así como la proliferación de los linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ (inmunoregulación). Estas características permitirían disminuir la inflamación en la úlcera, disminuyendo el riesgo de rechazo inmunológico del biocompuesto frente al huésped. Otra importante característica que limita a la terapia celular, es la formación de tumores. A diferencia de las células epiteliales embrionarias (ESC) y células madre mesénquimales adultas, las hAEC no expresan actividad de telomerasa, no forman teratomas, previniendo así la formación de tumores. El plasma rico en plaquetas (PRP) presenta una concentración de factores de crecimiento, liberados por las

plaquetas, como PDGF, VEGF, EGF, TGF- β que están vinculados estrechamente con la regeneración tisular.

En este estudio se medirá el efecto sinérgico a nivel molecular y celular de las células hAEC y el PRP en forma de gel sobre los fibroblastos, principales mediadores de la cicatrización, con la finalidad de que los resultados se conviertan en una posible aplicación tópica en un ensayo clínico en pacientes con esta dolencia. La posibilidad de criopreservar las células hAEC nos permitiría realizar estudios para el tratamiento de otras enfermedades dérmicas, cardíacas, neurológicas, hepáticas, vasculares, etc.

CAPÍTULO III: MARCO TEÓRICO

3.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

La medicina regenerativa tiene como objetivo posibilitar el reemplazo de tejidos y de órganos dañados por edad, enfermedad y trauma, así como normalizar defectos congénitos⁽¹⁰⁾. Esta línea de investigación se originó a mediados del XIX, con el descubrimiento de la capacidad que mostraban algunas células de dar origen a otras células. Al principio del siglo XX, se descubrió la existencia de células madres (SC) en la médula ósea, iniciándose así los primeros trasplantes y terapias en casos de leucemia⁽¹¹⁾. Desde que se iniciaron los estudios de las SC, se han descrito varias fuentes de obtención, de estas tanto en, tejido de origen embrionario (amnios, corion, gelatina de Warton, etc), como en tejido adulto (tejido adiposo, médula ósea, etc), con ligeras variantes en sus niveles de proliferación, antigenicidad y método de obtención⁽¹²⁻¹⁵⁾.

La membrana amniótica (MA) es la capa más interna de la placenta que carece de nervios, músculos y vasos linfáticos⁽¹⁶⁾, permitiendo al feto durante todo su desarrollo un ambiente de suspensión, con intercambio de sustancias, nutritivas y de desecho, con su medio exterior. Una de las principales características de la membrana amniótica es actuar como una barrera de defensa contra infecciones, traumatismos y toxinas.^(17,18) La membrana amniótica presenta una superficie de 700 a 1800 cm², con un peso de 15 a 35 g y espesor de 70 a 180 μm. Estructuralmente está compuesta de: epitelio, lámina basal, estroma de tejido conectivo avascular, y una capa esponjosa que la separa del corion. En los últimos años la MA ha despertado gran interés como fuente de células madre con diferencias en sus capas externas e internas. En el epitelio del amnios se encuentran las células epiteliales amnióticas humanas (hAEC). Estas células fueron descritas como pluripotentes por, Tamagawa y *col.* (2004) al crear quimeras xenogénicas *in vitro* a partir de células aisladas del amnios humano (epiteliales y mesénquimales) con células embrionarias de ratón. Ellos demostraron la contribución de las células humanas a la formación de células en las tres capas germinales (endodermo, ectodermo y mesodermo)⁽¹⁹⁾.

La obtención de las hAEC es por medio de procesos mecánicos y de digestión enzimática con tripsina – EDTA en diferentes concentraciones (0.25% y 0.05%), o usando dispasa, llegando a obtener por encima de 1×10^8 células⁽²⁰⁾. En cultivo forman una monocapa con un patrón típico de células epiteliales cuboides homogéneas que no necesitan de capa alimentadora para su crecimiento, que en muchos casos provienen de origen xenogénico, lo cual en terapias es muy poco aceptado por la OMS. Presentan adherencia al plástico y se cultivan en medios convencionales como RPMI-1640, α -MEM (Medio Mínimo Esencial), DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco), con alta o baja concentración de glucosa, Ham's F-12/DMEM, suplementados con 5 a 10% de Suero Bovino Fetal (SBF), L-glutamina, penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 μ g/mL, en presencia o no de e *EGF*.⁽²¹⁾

Las hAEC poseen origen epiblastico, expresando marcadores antigénicos o clusters de diferenciación (CD) muy heterogéneos, asociados al linaje de células madre embrionarias (ESC), como los antígenos embrionarios específicos SSEA-3 y SSEA-4, receptores alpha de células T TRA 1-60 y 1-81, y factores de transcripción como Oct-4 (*octame binding transcription*), Sox-2 (*sex determining region Y-box 2*), Nanog y Rex-1 que son característicos de células pluripotenciales^(14–16). Así - mismo expresan CD9⁺ (molécula de adhesión y migración), CD24⁺ (ligando de P-selectina), CD29⁺ (receptor para V-CAM, cadena β 1 integrina), CD73⁺ (ecto 5' nucleotidasa), CD90⁺ (Thy-1), CD166⁺ (molécula de adhesión), CD44⁺ (receptor del ácido hialurónico), E-caderina (CD324), integrinas α 6, c-met (receptor del factor de crecimiento de hepatocito: HGF)^(18–20). No expresan SSEA-1, CD105⁻ (endoglina), CD49e⁻ (integrina α -5), CD45⁻, CD13⁻, CD14⁻ (marcadores de células hematopoyéticas, excepto eritrocitos y plaquetas), CD34⁻ (marcador de células madre hematopoyéticas y células endoteliales), ni CD133⁻ (expresado en células madre hematopoyéticas, progenitores de células endoteliales, glioblastomas).^(19–21)

Las hAEC pueden secretar varias citoquinas y otras moléculas de señalización, incluyendo prostaglandina E, TGF- α , factor de necrosis tumoral, interferones, interleuquinas (IL-4, IL-8), acetilcolina, catecolamina y factores neurotróficos⁽²⁸⁾.

Koizumi *et al* 2000 demostraron que hAEC expresa mRNA para un número de factores de crecimiento, que incluye EGF y factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), lo cual puede beneficiar la epitelización⁽²⁹⁾. Ito *et al* 2003 mostraron que los factores de crecimiento secretados por hAEC pueden ser de tipo proteína y pueden promover la epitelización normal, controlando la diferenciación terminal e incrementando la estratificación de queratinocitos⁽²⁸⁾.

Actualmente existe una controversia con respecto al estatus inmunológico privilegiado de las células madre, de las cuales las hAEC no son ajenas. Algunos estudios afirman que todo el epitelio amniótico humano no expresa antígenos de leucocitos (HLA) - A, B o C (clase Ia) en la superficie celular, sugiriendo que el rechazo agudo no ocurriría después del trasplante celular^(27,30,31). Sin embargo, otros informes muestran que tendrían una expresión leve de HLA de clase I⁽²⁷⁻²⁹⁾.

A pesar de las discrepancias, es claro que las hAEC no expresan HLA DR (clase II) ni factores co-estimuladores CD80 y CD86⁽³⁵⁾, pero si expresan HLA-G⁽³⁶⁾, un antígeno leucocitario humano tipo I no clásico, que es utilizado como un marcador no invasivo para la selección de embriones en la reproducción asistida⁽³⁷⁾, y que en cultivos primarios tiende a disminuir según el grado de proliferación en los pasajes⁽³⁸⁾. Un posible papel de HLA-G es proteger al feto, del rechazo inmunológico de la madre⁽³⁹⁾. Por lo tanto, en una terapia de tipo alogénica, las células que expresan HLA-G pueden ser capaces de evadir la vigilancia inmune, inducir la apoptosis e inhibir la proliferación celular de las células TCD8⁺ y TCD4⁺ activadas^(12,35).

En el contexto del uso de estas células para la aplicación clínica, muchos autores consideran controversial el mecanismo de evasión del sistema inmune de las hAEC. Sin embargo estudios *in vitro* demuestran que en presencia de IFN- γ (presente en un ambiente inflamatorio), la expresión celular HLA-G se restaura^(35,38) estos resultados sugieren una mayor persistencia de las células en el hospedero, presentando mecanismos alternativos de evasión mediante secreción de factores inmunomoduladores capaces de inhibir y reducir vía apoptosis la proliferación de células T y B⁽⁴⁰⁾. Otras proteínas de interés actual son las alfa-fetoproteínas (AFP), producidas también por las células madre mesenquimales

(MSC)⁽⁴¹⁾ que reducen la reactividad de los linfocitos y modula la apoptosis de las células inmunes^(42,43). En co-cultivos, las células hAEC con células mononucleares periféricas de sangre (PBMC), estimuladas con fitohemaglutinina A (PHA)⁽⁴⁴⁾, se observa una supresión sobre las células TCD4⁺, reduciendo su proliferación y por ende la disminución de producción de citocinas Th1 y Th2⁽⁴⁵⁾. Así mismo las hAECs secretan factores como Fas, TRAIL, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor inhibidor de macrófagos (MIF), que inhiben la migración de neutrófilos y macrófagos *in vitro*, así como la actividad citolítica de las células NK⁽⁴⁰⁾. Los estudios clínicos con células hAEC trasplantadas presentan resultados prometedores, debido a la reducción de citoquinas pro-inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IFN- γ , MCP-1 y la interleucina 6 (IL-6), generando la reducción de la infiltración de células inflamatoria en la zona dañada⁽²¹⁾ y un aumento de citoquinas anti-inflamatoria como la IL-10⁽³¹⁾. Se han reportado casos donde las células hAEC han sido colocadas en la superficie ocular, modulando el entorno inflamatorio probablemente suprimiendo a las células presentadoras de antígeno⁽³²⁾. Así mismo, en un modelo de lesión inflamatoria pulmonar, fibrosis pulmonar, inducida con bleomicina, las hAEC modularon la respuesta inflamatoria y la fibrosis pulmonar previniendo la pérdida de la función pulmonar del hospedero.^(21,31)

Otro ámbito clínico donde las hAEC han sido estudiadas es en modelos de diabetes. Al ser trasplantadas en bazos de ratones diabéticos con inmunodeficiencia combinada severa (SCID), estas células fueron encontradas en el hígado y en el páncreas, llegando a producir mayores niveles de insulina, así como a transdiferenciarse a células β y normalizar los niveles de glucosa en sangre⁽⁴⁶⁾.

En el ámbito del tratamiento de trastornos relacionados con el Sistema Nervioso Central (SNC), las células hAEC son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica donde pueden injertarse, reducir la inflamación y regenerar tejidos dañados⁽⁴⁷⁾. Otra de las ventajas de las hAEC en la aplicación terapéutica, es no expresar actividad de telomerasa, una enzima que permite el alargamiento de los telómeros y la proliferación celular, que en sobreexpresión pueden llegar a

producir teratomas^(24,27). Los estudios de tumorigenicidad realizados por Tamagawa *et al.*, 2004 consistieron en un seguimiento por 7 meses de la inoculación de hAEC, comparada con la línea celular HepG2, en los músculos de las patas traseras y/o los testículos de ratones diabéticos con inmunodeficiencia combinada severa (SCID). Los ratones inculados con HepG2 desarrollaron tumores entre las 2-3 semanas, mientras que los inoculados con hAEC no presentaron evidencia de tumorigenicidad.

La expresión de marcadores (Oct-4, Sox-2, c-Kit, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81) que indican pluripotencialidad celular permiten a las hAEC, en presencia de los inductores adecuados, diferenciarse *in vitro*, hacia células derivadas de las tres capas germinales: ectodermo (neuronas, y células gliales), mesodermo (osteocitos, adipocitos, condrocitos, cardiomiocitos, miocitos) y endodermo (células pancreáticas y hepáticas)^(22,24,25). Las células expresan proteínas y marcadores neuronales como vimentina, nestina (NES), proteína asociada a microtúbulos (MAP2), proteína acida glial fibrilar, enolasa específica de neuronas (NSE), nogina (un polipéptido secretado que juega un papel importante en la inducción neural por inhibición de las señales de TGF- β), acetil colina, norepinefina, dopamina ^(25,26) así como marcadores específicos de endodermo como GATA-4 (Proteína 4 de unión a GATA), HNF-3 β (Factor nuclear hepatocítico 3 β)⁽⁴⁶⁾, ALB (Albumina), α FP (α -fetoproteína), GLUT2 (transportador de Glucosa 2), A1AT (Alfa 1 anti-tripsina), GS (Glutamina sintetasa), Citoqueratina 18 (*CK18*)^(48,49).

Es importante destacar la disponibilidad, el bajo costo y el sencillo procedimiento de obtención de membrana amniótica, así como la ausencia de aspectos éticos complicados en el uso de las hAEC como fuente de células madre, como las hAEC⁽⁵⁰⁾. Por lo que puede ser una fuente valorable de células para su empleo en la terapia celular y medicina regenerativa^(23,24).

Las hAEC se presentan como un complemento para terapias celulares en el tratamiento de diversas enfermedades de índole inflamatorio y degenerativo. Aunque su aplicación clínica en humanos requiere de mayor investigación pre clínica en modelos *in vitro* e *in vivo*, estas células que provienen de la membrana amniótica se han venido utilizado ampliamente en la clínica a lo largo de varias décadas, con buenos resultados y sin rechazo, en la reconstrucción de la superficie

ocular, en lesiones por quemadura y en traumatismos, , demostrando que es un tejido que se tolera fácilmente y ayuda con éxito en la curación de los tejidos dañados.

CAPÍTULO IV: OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial regenerativo y proliferativo de un gel de plasma rico en plaquetas con células epiteliales humanas de amnios (hAEC) *in vitro*.

4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Aislar, caracterizar y mantener las hAEC.
2. Evaluar el efecto anti - proliferativo *in vitro* de hAEC sobre PBMC.
3. Evaluar el efecto proliferativo *in vitro* de hAEC sobre fibroblastos.
4. Evaluar y cuantificar los factores de crecimiento liberados por el gel de hAEC (EGF, PDGF, VEGF, TGF- β).
5. Demostrar el efecto regenerativo y no citotóxico del biocompuesto *in-vitro*.
6. Demostrar el efecto proliferativo del biocompuesto *in-vitro*.

CAPÍTULO V: HIPÓTESIS

H₁: El gel de hAEC y PRP presenta efectos regenerativos, inmunomoduladores y proliferativos *in vitro*.

CAPÍTULO VI: MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 DISEÑO METODOLÓGICO

El planteamiento y desarrollo del estudio es de carácter experimental *in vitro*, donde todos los resultados fueron refutados bajo técnicas y pruebas en cultivo celular.

6.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

DONANTES: La donación de membrana amniótica se obtuvo de mujeres de 18 a 35 años de edad, programadas a un proceso de cesárea y que acepten las condiciones del consentimiento informado aprobado.

CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD

DONANTES:

MEMBRANA AMNIÓTICA

Criterios de inclusión

1. Madre sana, mayor de dieciocho años de edad, en pleno uso de sus facultades mentales.
2. Embarazo sano y controlado por un período no menor a 6 meses.
3. Feto sano, sin patología placentaria.
4. Parto por cesárea programada sin ruptura de bolsa.
5. Madre y feto libres de infecciones transmisibles (virales, bacterianas y de otros microorganismos).
6. Consentimiento materno, médico y de un testigo.
7. Serología del primer trimestre del embarazo negativa.

Criterios de exclusión

1. Factores de riesgo presentes (bisexualidad, drogadicción, tatuaje realizado hace menos de 6 meses, promiscuidad sexual, antecedentes carcelarios).
2. Portador de VIH, Hepatitis, Sífilis.
3. Infección materna crónica o aguda.

4. Infección fetal crónica o aguda.
5. Infección o inflamación de las membranas fetales.
6. Proceso legal en curso.

FIBROBLASTOS DERMICOS HUMANOS Y PBMC

El donante y las células (fibroblastos, PBMC), serán obtenidas en procesos previos del proyecto: FYNCIT 149-PNICP-PIAP-2015, siguiendo los criterios de exclusión e inclusión.

Criterios de inclusión

1. Donante sano mayor de dieciocho años de edad, en pleno uso de sus facultades mentales.

Criterios de exclusión

1. Factores de riesgo presentes (drogadicción, tatuaje realizado hace menos de 6 meses, promiscuidad sexual, privación de la libertad).
2. Portador de VIH, Hepatitis, Sífilis.
3. Infección dérmica crónica o aguda.

6.3 PROCEDIMIENTO

6.3.1 AISLAMIENTO DE CÉLULAS

A. CULTIVO DE PBMC

Se tomó 20mL sangre de un donante y se diluyó (1:2) con medio RPMI-1640 suplementado con antibiótico, penicilina/estreptomicina/amikacina (PSA), y se homogenizó por inversión. Luego se agregó cuidadosamente a un tubo Falcon que contiene 10 mL de Histopaque (d=1.077 g/mL), y se centrifugó a 1800 rpm a temperatura ambiente (TA) por 30 minutos. El anillo celular formado en la parte intermedia se recuperó con una pipeta de transferencia estéril de 2 mL y se traspasó a un tubo Falcon de 15 mL. Luego se lavó dos veces para retirar los restos de Histopaque, con RPMI P/S/A (Penicillin- Streptomycin-AmphotericinB) a TA, centrifugando por 10 minutos a 2500 rpm. Se eliminó el sobrenadante (SND) y se resuspendió el precipitado en 1mL de RPMI P/S a 4 – 8 °C, para luego

sembrar en una proporción de 1×10^5 células/cm² en un frasco de cultivo de 75 cm².

B. OBTENCIÓN DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS

El tejido epidérmico fue obtenido bajo un proceso de donación, de una biopsia de piel de 6 mm², de un paciente sano varón de 35 años de edad, en la sala de cirugía del Hospital Cayetano Heredia, previa firma del consentimiento informado derivado del proyecto FYNCIT 149-PNICP-PIAP-2015, y trasladado al Laboratorio de Inmunología LID-108 en solución salina con 1% de PSA, previa firma del consentimiento informado. La biopsia fue procesada dentro de las 2 primeras horas de obtención. El tejido epidérmico fue colocado en una placa petri estéril de 60 mm y se procedió a trozar en pedazos pequeños con la ayuda de tijeras y pinzas. Luego los fragmentos se incubaron con colagenasa tipo I (2 mg/mL) durante 2 horas en agitación constante a 37°C hasta que se digiera todo el componente dérmico. Luego los componentes dérmicos no digeridos se descartaron mediante el uso de filtros de 70 µm. Se agregó medio DMEM 10%SBF1%PSA (v:v) a la solución con colagenasa filtrada y se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado obtenido (fibroblastos) se sembró en frascos de cultivo de 25 cm² en una concentración aproximada de 5×10^5 células/mL, utilizando como medio de cultivo DMEM 10%SBF1%PSA.

C. OBTENCIÓN DE CÉLULAS hAEC

C.1. OBTENCIÓN DE MEMBRANA AMNIOTICA (MA):

El proceso de obtención de la membrana amniótica, como fuente de células hAEC, se realizó bajo un proceso de donación de mujeres entre 18 a 35 años de edad, programadas para parto por cesárea, de la Clínica Santa Isabel, previa firma del consentimiento informado aprobado por el INSNSB, y excluidas de procesos infecciosos como hepatitis B, hepatitis C, sífilis y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

La obtención de la membrana amniótica se realizó en la sala de parto y en completa esterilidad. Luego del proceso de parto, se procedió a ingresar a sala y

manipular la placenta, separando la membrana amniótica de la membrana coriónica mecánicamente con movimientos radiales. La membrana amniótica obtenida se colocó en un frasco de 250 mL con solución salina balanceada de Hanks (HBSS)+1%PSA, y luego se trasladó al Banco de Tejidos y Células del INSNSB a 4°C conservando la esterilidad (Figura 1).

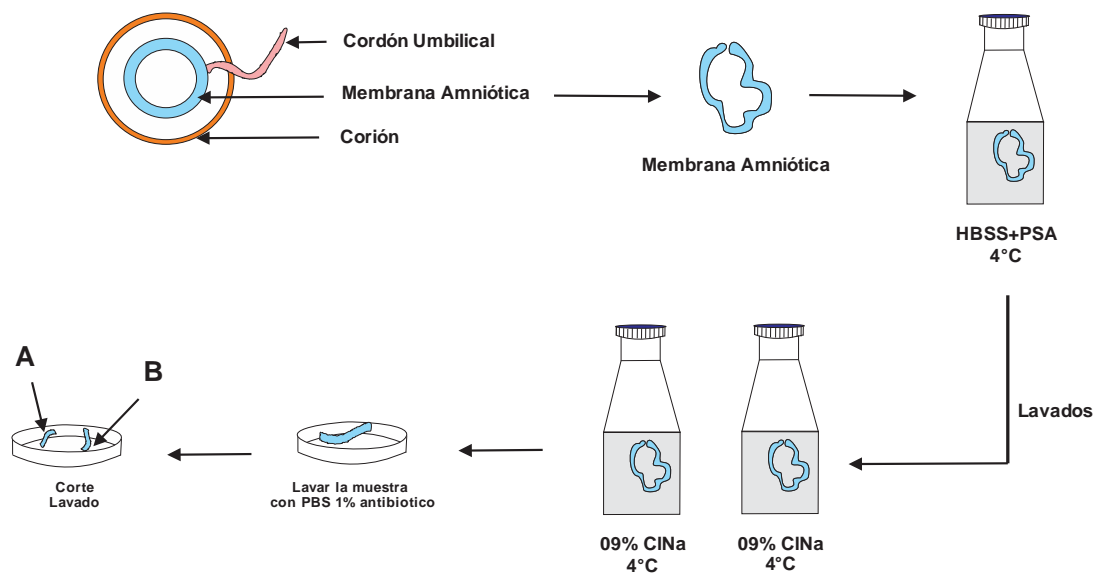


Figura. 1. Obtención de membrana amniótica. Proceso de lavados y corte de la membrana amniótica con Cloruro de Calcio (ClNa 0.9%).

C.2. AISLAMIENTO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES AMNIÓTICAS HUMANAS (hAEC):

La extracción de las células hAEC, se realizó en el Banco de Tejidos y Células del INSNSB, el cual bajo donación cedió las células para la realización del presente estudio. Para la obtención de las hAEC, se realizó todo el proceso en cabina de flujo laminar, se lavó dos veces la MA con 0.9% ClNa+1%PSA y se transfirió a una placa petri de 15 cm. Luego se cortó en pequeños fragmentos de 3x3 cm aproximadamente, descartando aquellos que presenten paquetes globulares.

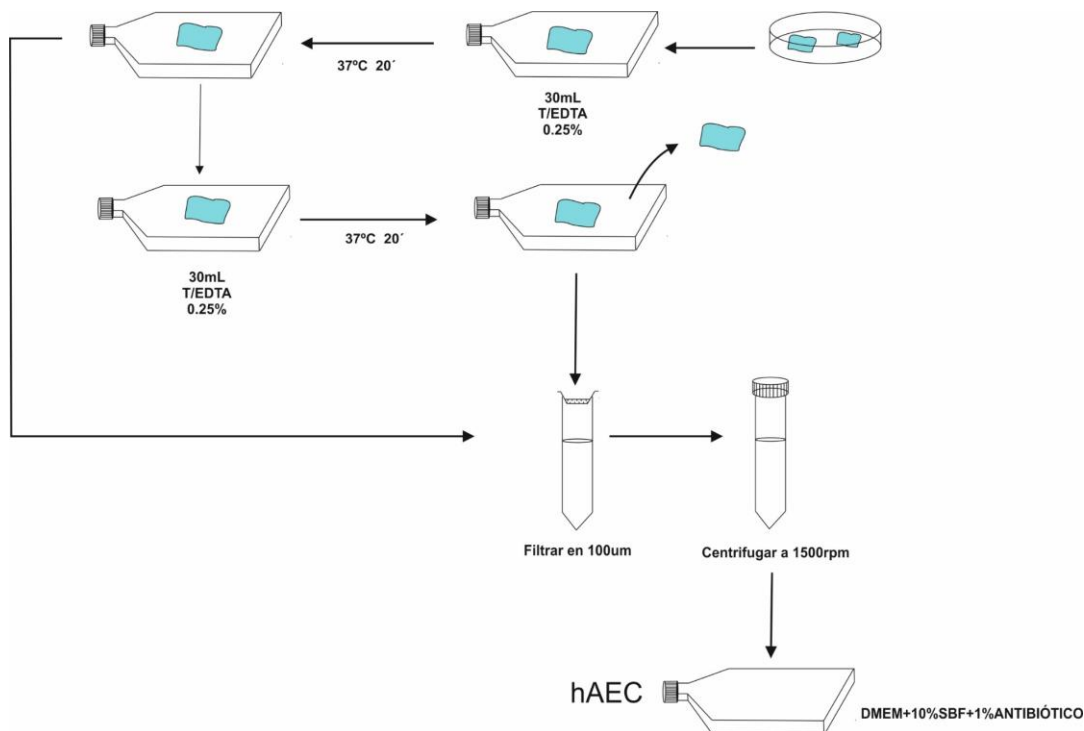


Figura 2. Aislamiento de células epiteliales amnióticas humanas (hAEC), mediante el uso de enzimas digestivas como la Tripsina/EDTA 0.25%.

Luego se transfirió todos los fragmentos en frascos de cultivo de 75 cm² y se agregó 30 mL de Tripsina/EDTA 0.25% (T/EDTA 0.25%), por 20 minutos en agitación constante a 37°C. Se retiró el sobrenadante y se eliminó el material no digerido con filtros de 100 µm. Se repitió dos veces el mismo procedimiento, y se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos. El precipitado se sembró en frascos de cultivo de 25 cm² con medio DMEM10%SBF1%PSA suplementando con 10 ng/mL de EGF y rotuladas como hAEC (Figura 2).

C.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS EPITELIALES AMNIÓTICAS HUMANAS DE ACUERDO A LA SOCIEDAD INTERNACIONAL DE TERAPIA CELULAR

Las células hAEC, se comportan como células madre expresando marcadores CD, (cluster de diferenciación), característicos en sus membranas celulares. Para el análisis de las hAEC, se consideró positivas a las muestras que expresen en su

mayoría ($\geq 95\%$), CD73 y CD90 y en su minoría ($\leq 2\%$) CD 105, CD11b, CD3, CD45 y HLA-DR.

Embryonic Markers	MSC markers	Neuronal Markers	Immune Markers
SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA 1-60, TRA 1-81, c-kit, STRO-1, OCT-4, GATA-4, nanog, SOX-2, PAX-6, GCTM-2	CD90, CD44, CD73, CD166, CD105, CD29	Nestin, musashi, RC-1, vimentin, A2B5, MAP-2, GFAP, CNPase, MBP, β 3-tubulin	MHC class 1, HLA-G

Figura 3. Caracterización de las células epiteliales amnióticas humanas (hAEC) según las normas internacionales de la sociedad de Terapia Celular. Tomado de: *Inflammation and Regeneration. Vol. 31 No. 3 May 2011*

C.4. DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA *IN VITRO*

Las células hAEC en pasaje 1, se sembraron en placas de cultivo de seis pocillos a proporción de 3000 células/cm², con medio de cultivo DMEM (10ng/mLLEGF+10%SBF1%PSA), hasta que adquirieran una confluencia del 80%. Los cambios de medio se realizaron cada 2 días. Luego se retiró el medio de cultivo y se reemplazó con 3 mL de medio diferenciador osteogénico (Invitrogen/Gibco). Las células se cultivaron durante 2 semanas con el medio osteogénico, este medio se reemplazó dos veces por semana. Al final de la segunda semana, la diferenciación osteogénica se evaluó por tinción con el colorante Rojo de Alizarina.

C.5. DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA *IN VITRO*

Las células hAEC en pasaje 1, se sembraron en placas de cultivo de seis pocillos en proporción de 3000 células/cm² con medio de cultivo DMEM (10ng/mLLEGF+10%SBF1%PSA), hasta que adquirieran una confluencia del 80%, se realizó los cambios de medio cada 2 días. Luego se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por 3 mL del medio diferenciador adipogénico (Invitrogen/Gibco). Las células se cultivaron durante 2 semanas con el medio osteogénico, este medio

se reemplazó dos veces por semana. Al final de la segunda semana, la diferenciación osteogénica se evaluó por tinción con el colorante Oil Red O.

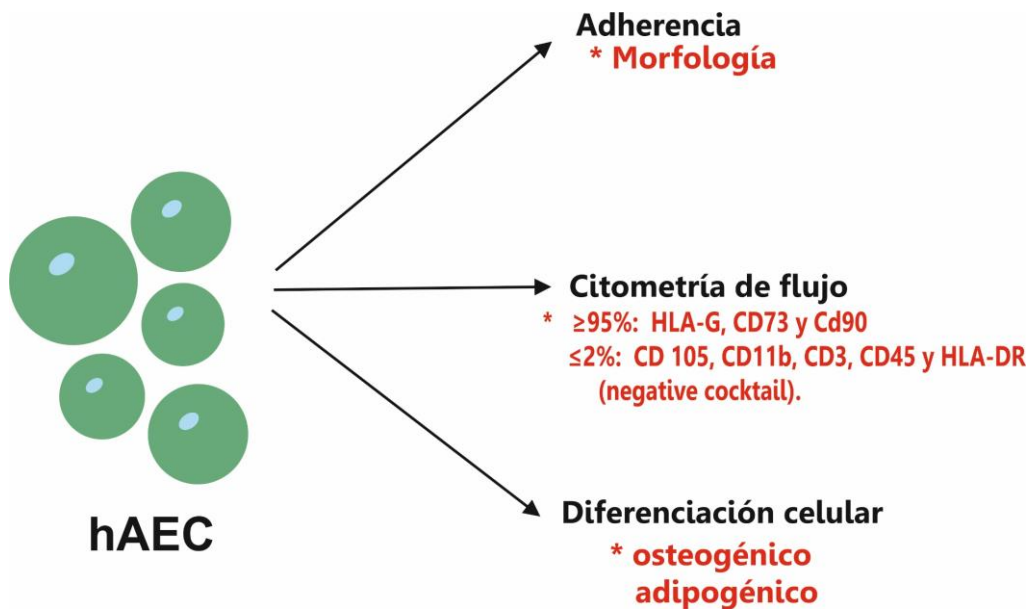


Figura 4. Normas básicas para la caracterización de las células epiteliales amnióticas humanas.

6.3.2 CURVA DE CRECIMIENTO CON HPL

Las células se sembraron en medios específicos enriquecidos con 5%, 10% y 20% de lisado plaquetario humano (HPL), MC48h de hAEC, y como control de ensayo SBF al 10%.

A. CURVA DE CRECIMIENTO DE hAEC

Las células hAEC en el pasaje 2, se sembraron por duplicado en placas de 48 pocillos en una proporción de 10^4 células/pocillo, e incubadas a 37°C y 5%CO₂. Las células hAEC fueron cultivadas con C: DMEM 10%SBF1%PSA+10ng/mLLEGF, T2: DMEM 5%HPL1%PSA, T3: DMEM 10%HPL1%PSA y T4: DMEM 20%HPL1%PSA. Luego se tripsinizó con T/EDTA, y se procedió a contar en cámara de Neubauer. La evaluación se realizó durante 9 días. El número medio de células se representó en función al tiempo de cultivo (Figura 5).

B. CURVA DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS

Los fibroblastos en el pasaje 3, fueron sembrados por duplicado en placas de 48 pocillos en una proporción de 10^4 células/pocillo, e incubados a 37°C y $5\%\text{CO}_2$. Los fibroblastos fueron cultivados con T1: DMEM 10%SBF1%PSA, T2: DMEM 5%HPL1%PSA, T3: DMEM 10%HPL1%PSA, T4: DMEM 20%HPL1%PSA y T5: MC48h de AEC. Luego se tripsinizó con T/EDTA, y se procedió a contar en cámara de Neubauer. La evaluación se realizó durante 9 días. El número medio de células se representó en función al tiempo de cultivo. (Figura 5).

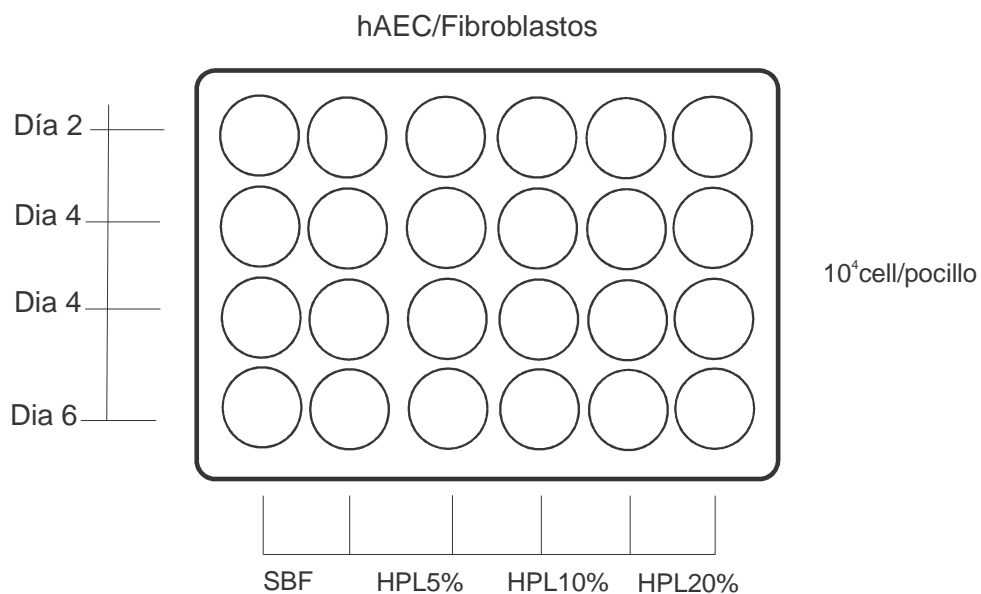


Figura 5. Esquema de ensayo de curva de crecimiento de los fibroblastos y las hAEC, usando como control al SBF10%, y lisado plaquetario humano (HPL) a concentraciones de 5%, 10% y 20%.

6.3.3 ENSAYO DE DOBLE PROLIFERACIÓN

Los fibroblastos, se sembraron en frascos de 25 cm^2 a concentraciones de 5×10^5 células/mL, y se usó con T1: DMEM 10%SBF1%PSA, T2: DMEM 5%HPL1%PSA, T3: DMEM 10%HPL1%PSA, T4: DMEM 20%HPL1%PSA y T5: MC48h de hAEC. Se realizó los cambios de medio cada 2 días, hasta que alcanzó la confluencia de 90 a 100%. La doble población se obtuvo mediante la fórmula $DPT = H \cdot \ln 2 / \ln(c_2 - c_1)$, donde c_2 es el número de células obtenidas, c_1 el

número de células sembradas, H las horas que se alcanzó la máxima confluencia (Figura 6).

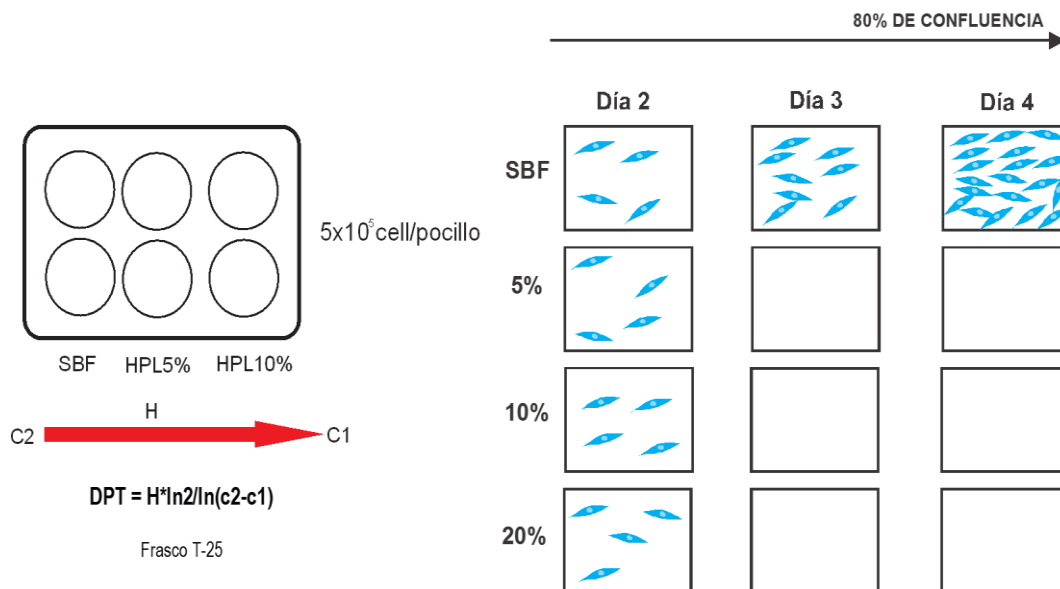


Figura 6. Esquema del ensayo de doble proliferación en el tiempo. Función logarítmica de las horas de proliferación de los fibroblastos, usando los inductores de crecimiento SBF10% y HPL (5%, 10% y 20%)

6.3.4 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CON MTT

A. USO DE MEDIO CONDICIONADO

A.1. OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS DE CÉLULAS hAEC:

Las hAEC se cultivaron en frascos de 75 cm² en medio DMEM (10ng/mL EGF+10%SBF1%PSA) por 3 días hasta que alcanzó la confluencia del 70%. Luego se retiró el medio, se lavó dos veces con 2 mL PBS estéril, y se agregó 8 mL de medio DMEM1%PSA. Los medios condicionados (MC), se retiraron a las 48h (MC) centrifugados a 10000 g por 10 minutos, el medio sobrenadante fue filtrado a través de un poro de 0.2 μm y congelado a -30°C hasta su uso (Figura 7A).

A.2. FIBROBLASTOS DÉRMICOS:

Los fibroblastos dérmicos, se sembraron en placas de 96 pocillos, por triplicado, a una densidad de 10^4 células/pocillo. Como control positivo CP(fibroblastos+DMEM 10%SBF+1%PSA), control negativo CN(fibroblastos+RPMI+1%PSA), como ensayos T1(fibroblastos+MC48h), T2(fibroblastos+5%HPL) y T3(fibroblastos+10%HPL). La proliferación celular se evaluó por 4 días cada 24h. Luego el medio condicionado liberado por cada pocillo se incubó por 4 h con 20 μ L de MTT (5 mg/mL) (bromuro de 3- (4,5 - dimetiltiazol - 2 - il) - 2,5 – difeniltetrazolio). Los cristales se disolvieron con 100 μ L de formol/HCL y se realizó la lectura a 450 nm y factor de corrección de 578 nm de absorbancia mediante un lector de ELISA (Figura 7B).

B. CO-CULTIVO CON CÉLULAS hAEC

B.1. CO-CULTIVO hAEC-FIBROBLASTOS:

Para evaluar el efecto proliferativo de las células hAEC sobre los fibroblastos dérmicos, las hAEC se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 10^4 células/pozo. Luego de 2 horas de incubación se sembraron los fibroblastos a una concentración de 10^5 células/pozo e incubadas durante 24, 48, 72 y 96 h a 37°C y 5% CO₂. Se usó como control positivo CP (fibroblastos+DMEM+10%SBF) y como control negativo CN (fibroblastos+RPMI). El efecto proliferativo de los fibroblastos dérmicos se determinó mediante incubación por 4 h del sobrenadante con MTT 5 mg/mL (bromuro de 3- (4,5 - dimetiltiazol - 2 - il) - 2,5 – difeniltetrazolio). Después de este tiempo se disolvieron los cristales de formazán con 100 μ L de formol/HCL y se realizó la lectura a 450 nm con factor de corrección de 578 nm de absorbancia, mediante un lector de ELISA. El índice de proliferación se calculó usando la siguiente fórmula: $OD (hAEC+fibroblastos+estimulador) - OD (hAEC) / OD (fibroblastos)$ (Figura 7C).

B.2. CO – CULTIVO hAEC-PBMC:

Para evaluar el efecto anti proliferativo de las células hAEC sobre las PBMC, las hAEC se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 10^4 células/pozo. Luego de 2 horas de incubación se sembraron los PBMC a una concentración de 2×10^6 células/pozo e incubadas durante 24, 48, 72 y 96 h a 37°C y 5% CO_2 . Se usó como control positivo CP (PBMC+DMEM) y control negativo CN (PBMC+RMPI+10%SBF+1%PSA). El efecto proliferativo de las PBMC se determinó mediante la incubación por 4h con $20\mu\text{L}$ de MTT (5 mg/mL) (bromuro de 3- (4,5 - dimetiltiazol - 2 - il) - 2,5 - difeniltetrazolio). Los cristales se disolvieron con $100\mu\text{L}$ de formazán o formol/HCl y se realizó la lectura a 450 nm y factor de corrección de 578 nm de absorbancia mediante un lector de ELISA. El índice de proliferación se calculó usando la siguiente fórmula: $\text{OD (hEAC+fibroblastos)} / \text{OD (CN)}$ (Figura 7C).

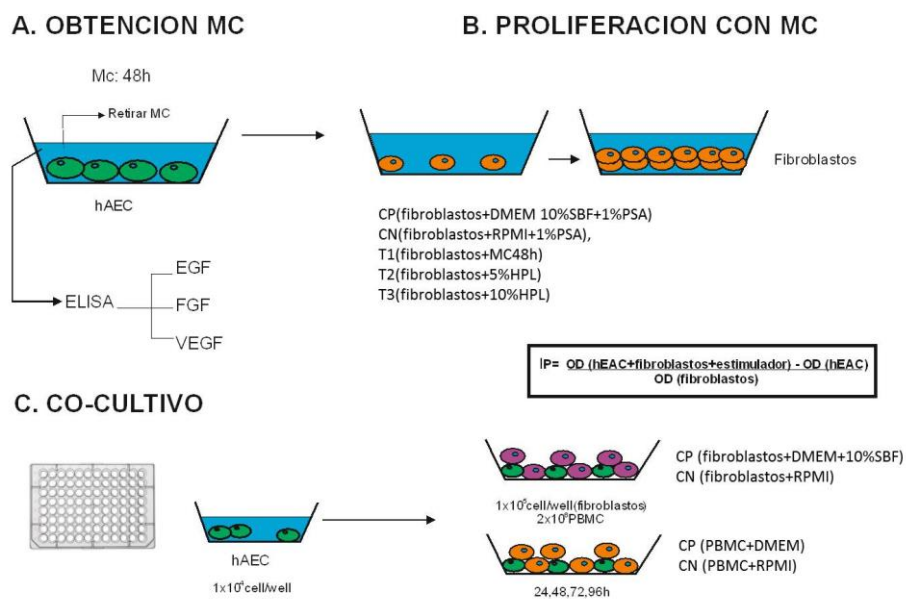


Figura 7. A. Obtención de medio condicionado (MC48h) de las células hAEC. B. Ensayo de proliferación de fibroblastos con medio condicionado 48h de hAEC (MChAEC). C. Ensayo de proliferación mediante el co-cultivo de las hAEC – fibroblastos y hAEC – PBMC.

6.3.5 ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR

Los fibroblastos fueron sembrados en placas de 12 pocillos en concentración de 5×10^5 células/cm², por triplicado e incubados a 37°C con 5% CO₂ hasta que alcanzaron la confluencia del 80%. Luego se retiró el medio y se realizó un raspado con una punta (Tip) en la parte central del pozo para desprender las células, generando un espacio físico entre los fibroblastos en los pocillos, y finalmente se realizó dos lavados con PBS 1X, para retirar las células desprendidas. Se trabajó con 4 grupos, se usó como control negativo CN(fibroblastos+RMPI), control positivo CP (fibroblastos +DMEM+10%SBF), T1 (fibroblastos+MC48h), T2 (fibroblastos+DMEM+5%HPL), T3 (fibroblastos +DMEM+10%HPL) y T4 (fibroblastos+DMEM+20%HPL). La evaluación se realizó cada 24 h a través de fotografías para realizar la medición de la migración celular a través del cierre del espacio físico generado en el tiempo (Figura 8).

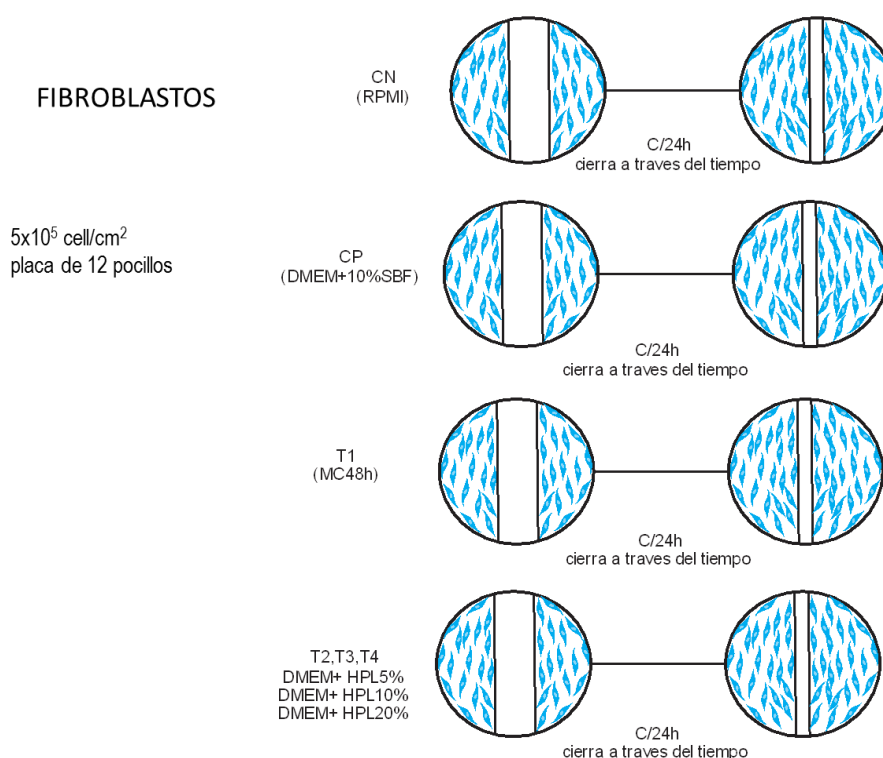


Figura 8. Ensayo de migración celular de fibroblastos versus el tiempo de cierre, expresado en horas. Se usó como inductores medio condicionado de hAEC a las 48h (MC48h), SBF10%, HPL (5%, 10% y 20%).

6.3.6 PREPARACIÓN DE GEL PLAQUETARIO

A. OBTENCIÓN DE PLAQUETAS POR AFÉRESIS:

Las muestras de plaquetas que se utilizaron en este ensayo fueron obtenidas bajo un proceso de donación bajo la firma de un consentimiento informado y de acuerdo a criterios de inclusión establecidos en un centro de hemoterapia tipo II (HIMATEC). Se tomó 400 mL de un donante del grupo sanguíneo tipo O, de 18 a 35 años edad, en un sistema automatizado. Para los controles se realizó el recuento de plaquetas, leucocitos y control microbiológico.

B. PREPARACIÓN DE LISADO PLAQUETARIO HUMANO

Las plaquetas obtenidas por aféresis grupo sanguíneo O, de 3 donantes fueron sometidos a un proceso de choque térmico (-70°C y 37°C) dos veces. Se realizó un pool y se centrifugó a 1400 rpm por 10 minutos para eliminar los restos celulares, y el sobrenadante se homogenizó V: V con suero AB, para disminuir la antigenicidad, y se conservó a -20°C hasta su uso.

C. PREPARACIÓN DEL BIOCOMPUESTO

Se descongelaron las plaquetas a 37°C en baño maría, y se agregó en proporciones de 75%, con 10% de CaCl₂, 1% de ácido tranexámico y 14% de hAEC, a una proporción de 10⁴ – 10⁵ células/cm². Luego se incubó a 37°C por 30 – 60 min hasta que se solidifique el gel a 37°C y 5% CO₂.

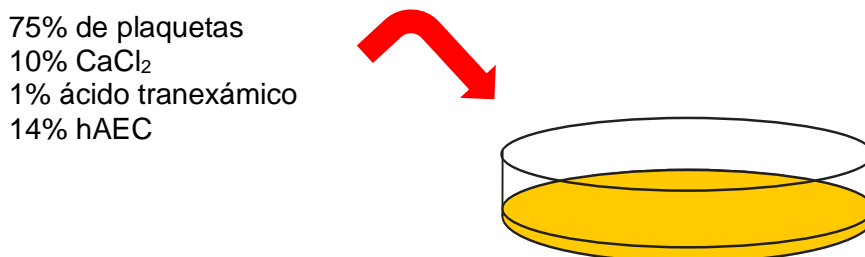


Figura 9. Preparación del biocompuesto usando plaquetas (plaquetaféresis), como activador Cloruro de calcio (CaCl₂), ácido tranexámico como antifibrinolítico y células hAEC.

6.3.7 ENSAYOS DE AFINIDAD DEL BIOCOMPUESTO

A. CINÉTICA DE FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento que libera el biocompuesto fueron evaluados mediante kits de ELISA cuantitativo de los factores EGF, PDGF, VEGF, PGE y TGF- β . Se prepararon los geles en una placa de 6 pocillos, respetando las concentraciones establecidas, con la varianza en el número de células de hAEC por cm^2 ($10^4 - 10^5$ células/ cm^2). Los medios condicionados y/o líquido exudado liberado por cada biocompuesto cada 24 h durante 4 días fueron recuperados y congelados a -20°C hasta su uso. Luego se evaluó, para determinar en base al tiempo, la liberación de factores de crecimiento (Figura 10).

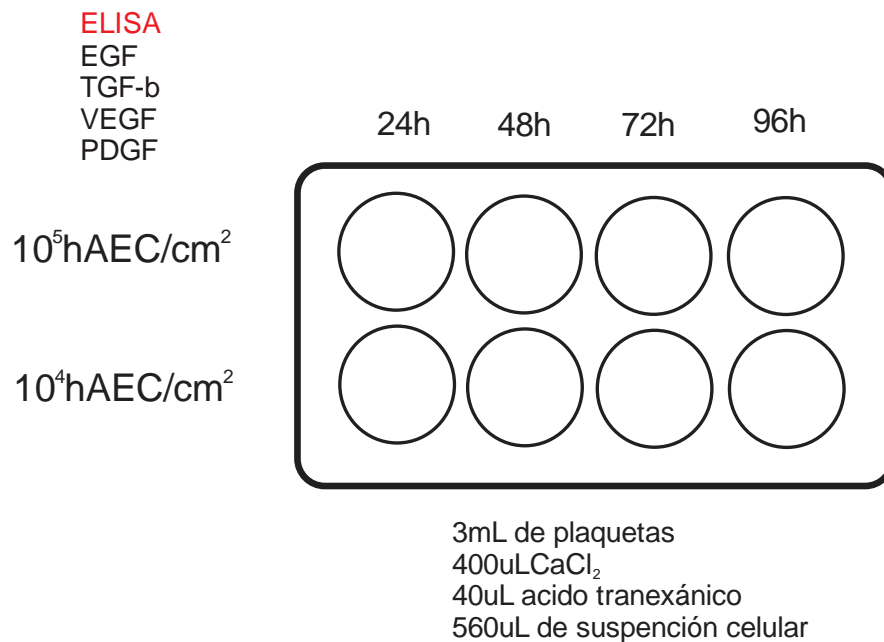
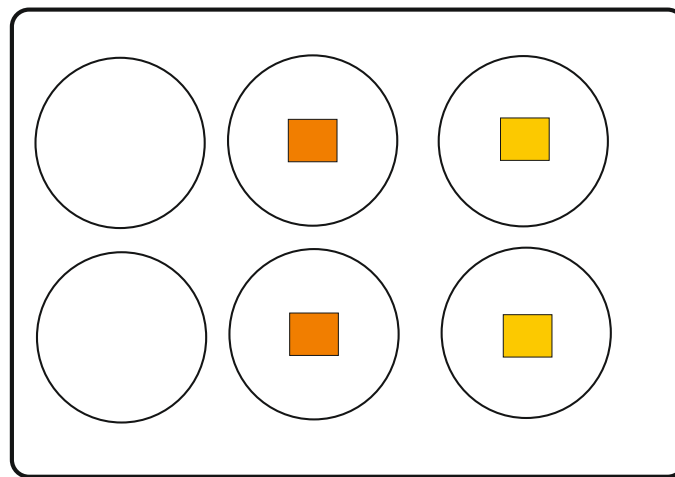


Figura 10. Cinética de factores de crecimiento liberados por el biocompuesto, evaluado cada 24h durante 4 días. La cuantificación de los factores de crecimiento se realizó mediante kits de ELISA R&D System.

B. ENSAYO CITOTÓXICO POR CONTACTO Y MORFOLOGÍA

Se cortó $1 \times 1 \text{ cm}^2$ del biocompuesto formado con la mayor concentración celular (10^5 células/ cm^2) en condiciones estériles, y se colocó en placas de cultivo de 6 pocillos. Luego se agregó una suspensión celular en promedio de 5×10^5 fibroblastos/pocillo de placa. Se utilizó como control negativo (CN) fibroblastos

sin gel plaquetario y como control positivo (CP) fibroblastos con una gasa empapada en alcohol yodado. Las células se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ hasta que se alcanzaron la confluencia del 70%. La morfología y la proliferación celular se observó durante el cultivo mediante microscopía invertida. Después de 48 h se tripsinizó con tripsina – EDTA al 0,25% y se contó el número de células utilizando una cámara de recuento Neubauer. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en paralelo (Figura 11).



CN: Fibroblastos CP: Alcohol yodado T: Gel 10⁵hAEC

Figura 11. Ensayo de citotoxicidad del biocompuesto preparado con 10⁵ hAEC. Se usó como CN: Fibroblastos con medio DMEM+10%SBF. CP: Fibroblastos con gasa embebida con alcohol yodado. T: Fibroblastos con Gel con 10⁵ hAEC.

C. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular de hAEC se determinó mediante el ensayo colorimétrico (MTT) que evalúa la actividad mitocondrial de las células vivas.

El biocompuesto formado por 10⁵ células/cm² se colocó en proporciones de 1x1 cm² en placas de cultivo de 12 pocillos en medio DMEM 10%SBF1%PSA durante 24, 48, 72, 96 h a 37°C, 5% CO₂. Luego los fibroblastos se sembraron en una microplaca de 96 pocillos con una concentración celular de 10⁴ células/pozo y 50 µL del sobrenadante liberado cada 24 h por el biocompuesto. Se usó como

control positivo (CP) de citotoxicidad, alcohol yodado, mientras que las células incubadas solo en medio de cultivo DMEM se utilizaron como control negativo (CN). Después de 48 h de incubación se determinó el índice de proliferación mediante la incubación por 4 h con 20 μ L de MTT (5 mg/mL) (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Figura 12). Los cristales se disolvieron con 100 μ L de formazán o formol/HCl y se realizó la lectura a 450 nm y factor de corrección de 578 nm de absorbancia mediante un lector de ELISA. El índice de proliferación se calculó usando la siguiente fórmula: OD (hEAC+fibroblastos)/OD (CN).

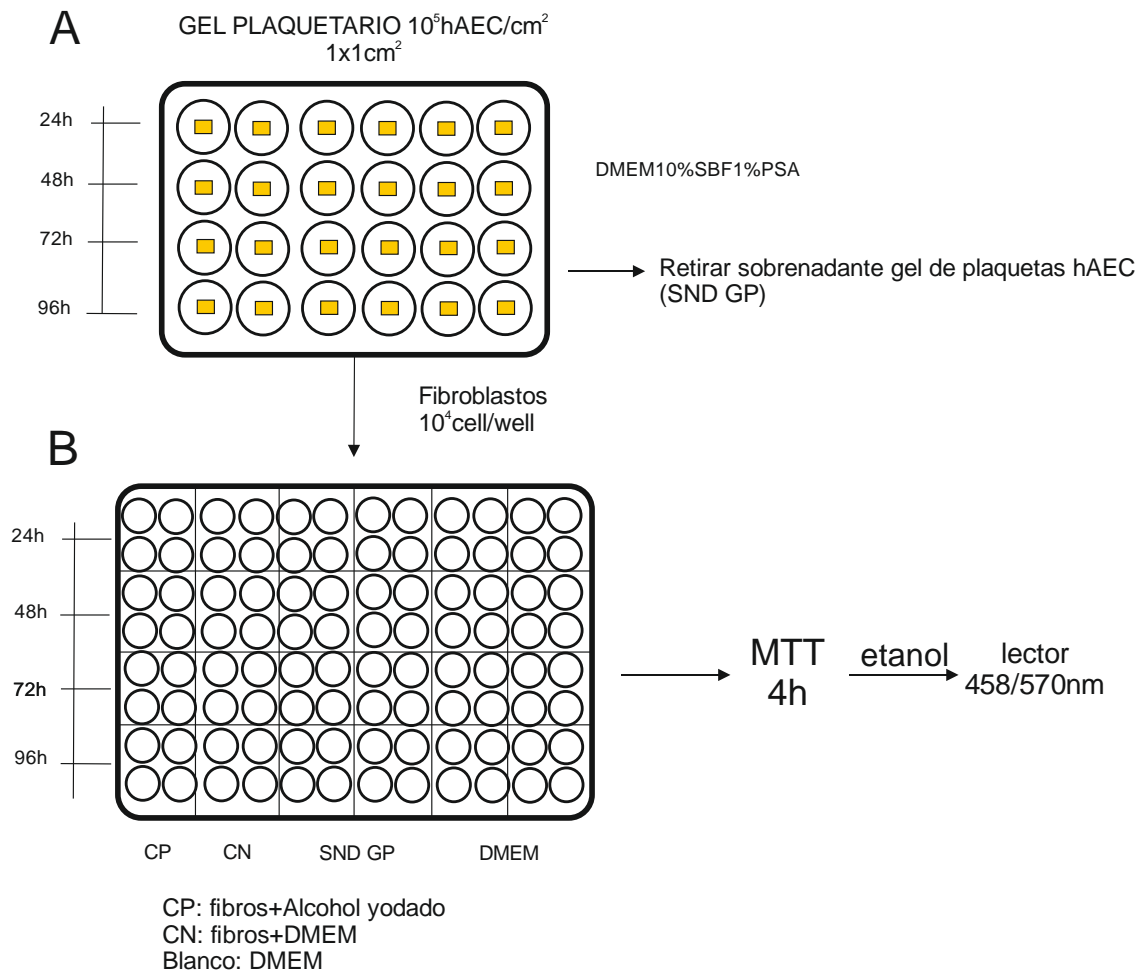


Figura 12. Ensayo de viabilidad celular. A. Obtención de sobrenadantes liberados por el biocompuesto 10^5 células hAEC, cada 24 h durante 4 días. B. Ensayo de MTT de fibroblastos con los sobrenadantes del biocompuesto. El análisis se realizó mediante la lectura de la absorbancia a 450/578 nm.

6.3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores se expresaron como media + DS (desviación estándar). El análisis estadístico fue realizado con el software GRAPHPAD PRISM versión 7. Las comparaciones entre grupos fueron hechas por el análisis de varianza ANOVA factorial. El test HSD de Tukey se utilizó para comparaciones múltiples. Un valor de probabilidad menor de 0,001 ($p < 0,001$) fueron considerados estadísticamente significativos.

CAPÍTULO VII: RESULTADOS

7.1 OBTENCIÓN DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS

El cultivo primario de los fibroblastos dérmicos extraídos, presentaron la característica morfología fusiforme y adherencia al plástico (Figura 13), con una proliferación del 70% dentro de las 48 h, y una doble proliferación a través del tiempo entre las 5 a 6 horas de cultivo, utilizando como medio DMEM 10%SBF1%PSA. La concentración celular obtenida fue de 5×10^5 células/mL. Todos los ensayos se trabajaron en pasaje 2 y los fibroblastos no utilizados se criopreservaron en proporción a 2×10^6 células/mL hasta su uso.

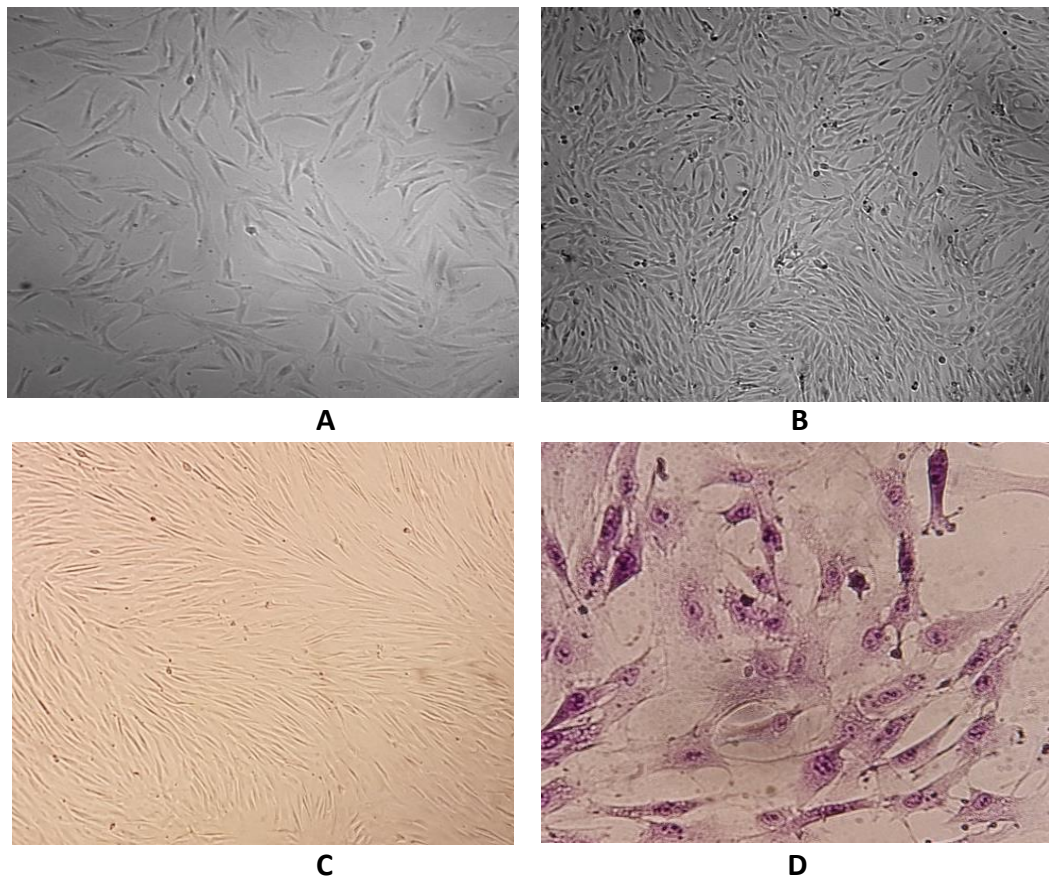


Figura 13. Fibroblastos en cultivo con medio DMEM 10%SBF1%PSA. Confluencia del A: 40%20x, B: 60% 10x, C:80 a 90% 10x, D: Coloración Giemsa 40x.

7.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE hAEC

Las células hAEC fueron extraídas de la membrana amniótica, previa firma del consentimiento informado, de partos por cesáreas programadas, mediante la acción mecánica de separación del tejido coriónico, de forma radial en lo posible sin fragmentarla.

En el proceso de aislamiento de las células hAEC de la membrana amniótica, resultó ser muy complejo en la estandarización de tiempos y uso de concentraciones de enzimas digestivas. Se obtuvo una alta pureza y con una concentración entre 50 a 80×10^6 células/mL, mediante 2 procesos continuos de 20 minutos con T/EDTA (0.25%) a 37°C y 5% CO_2 , con una ligera agitación constante.

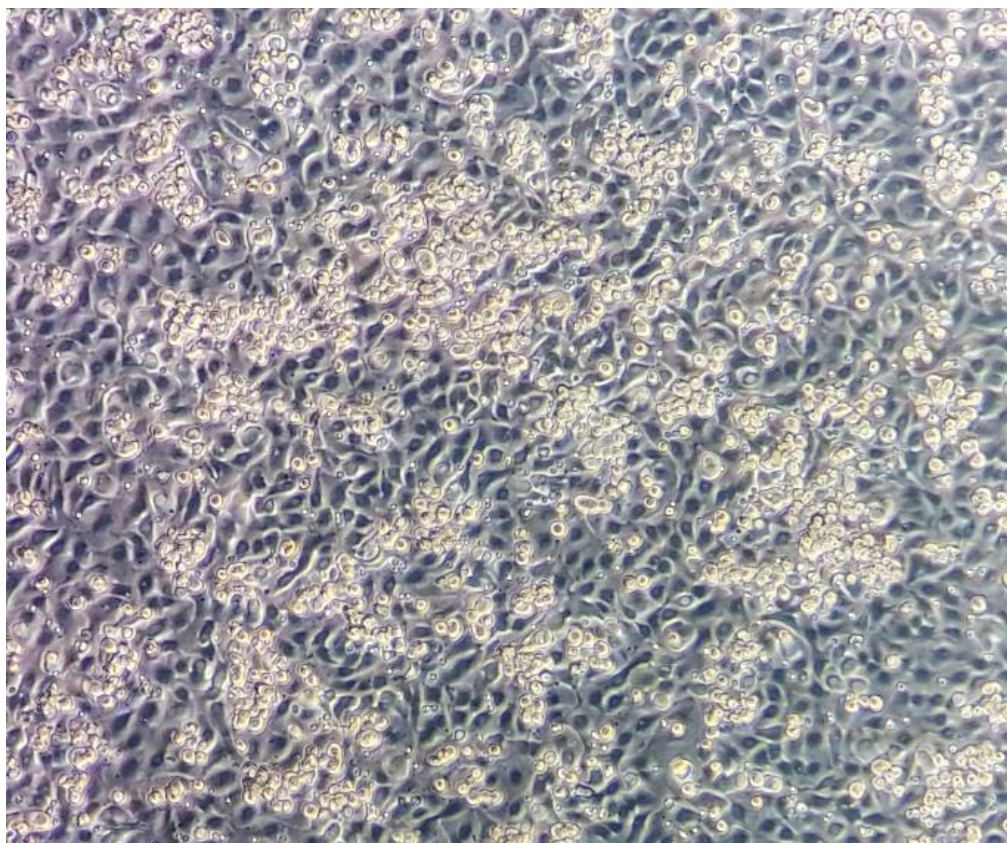


Figura 14. Células Epiteliales Amnióticas humanas adheridas al plástico, confluencia del 80%. 10x

Las hAEC aisladas, son células medianas con abundante citoplasma, que presentan una morfología homogénea redondeada, ovalada (Figura 14), y con

tendencia a formar colonias clonales en cultivos de baja densidad celular, entre 30 a 50 células/cm² con adherencia al plástico (Figura 15). Las células hAEC en el transcurso de su cultivo, no requieren de ninguna célula alimentadora, *feeder layer*, para su crecimiento, siendo el medio de cultivo adecuado, el medio DMEM suplementado con 10% de SBF, y 10 ng/mL de EGF, factor de crecimiento que induce la proliferación celular de diferentes células epiteliales como queratinocitos.

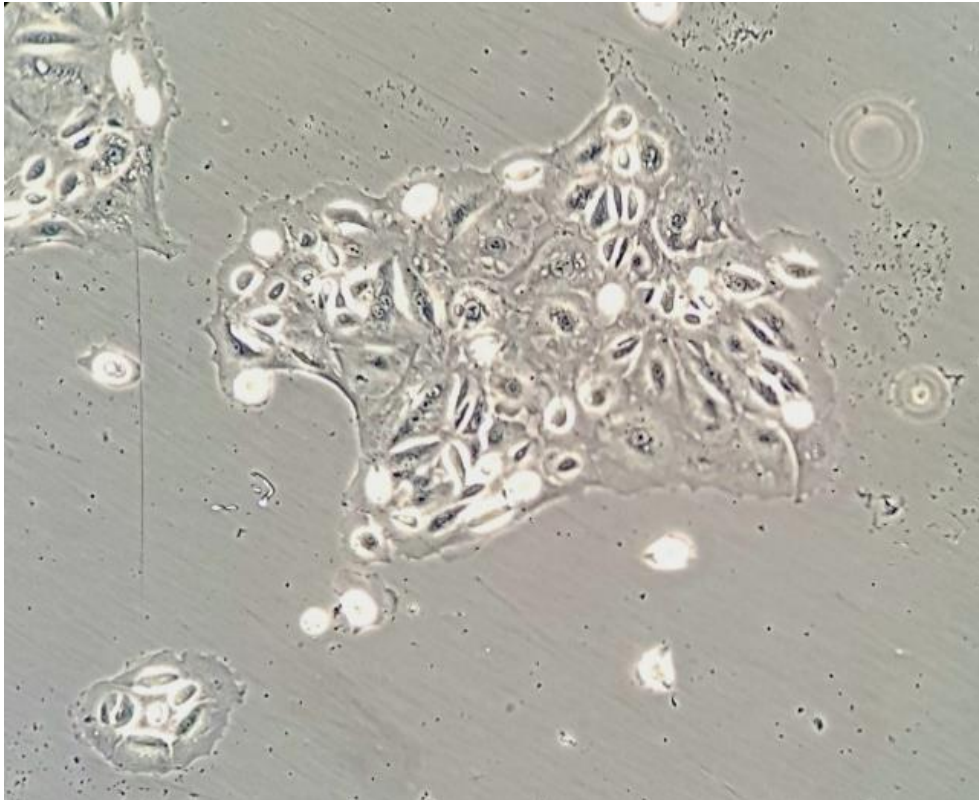


Figura 15. Células Epiteliales Amnióticas humanas formando colonias clonales. 40x

7.3 CARACTERIZACIÓN DE hAEC

7.3.1. ADHERENCIA

Las células hAEC presentan una adherencia dentro de las 4 primeras horas de cultivo, y luego de alcanzar la confluencia de 70 a 80%, se procedió a tripsinizar con 0,25%, T/EDTA, con un tiempo promedio de desprendimiento celular que oscila entre los 5 a 10 minutos, manteniendo su viabilidad (Figura 16).

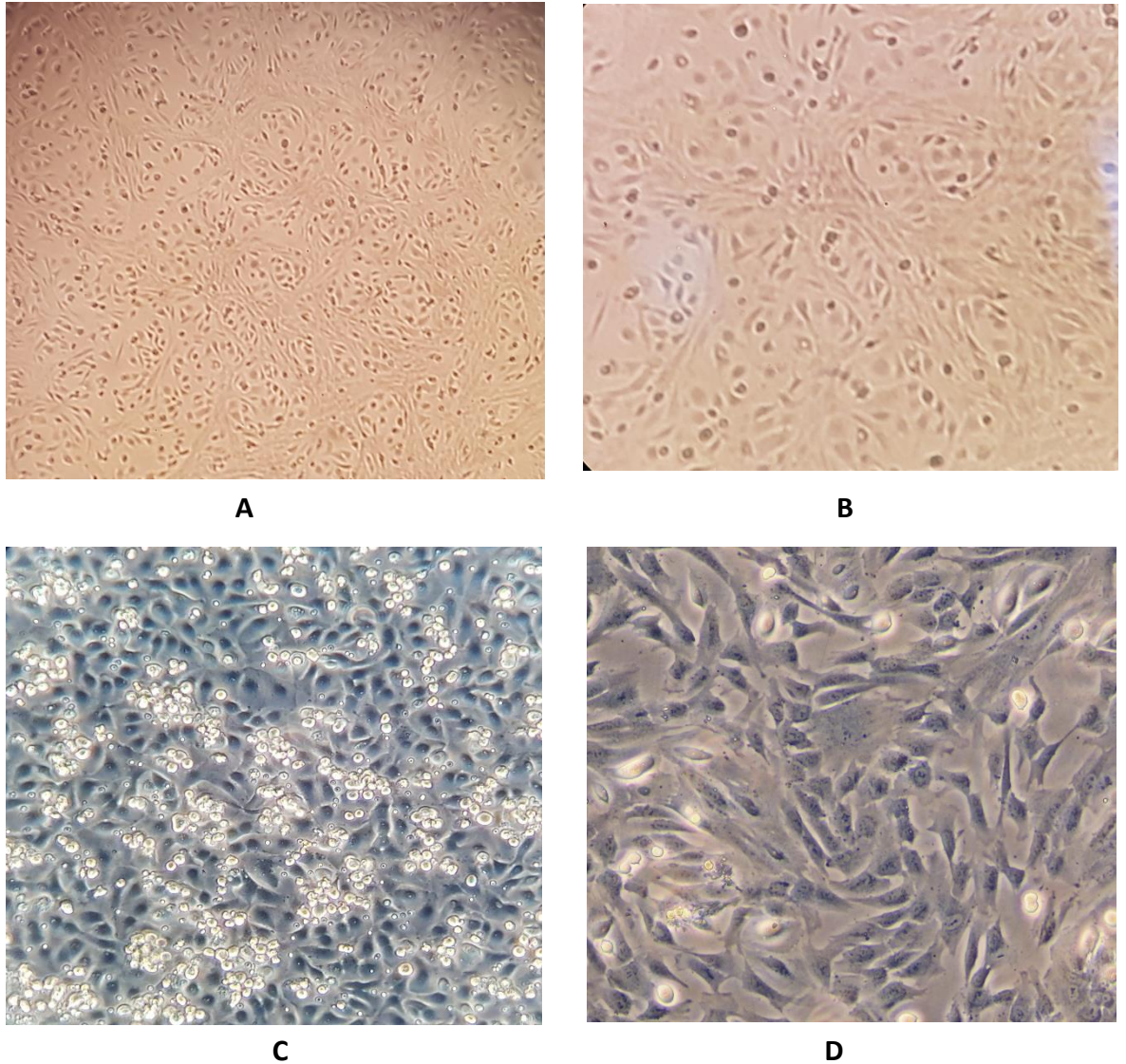


Figura 16. Células Epiteliales Amnióticas humanas. A: 10X. B: 40X. C: confluencia de 80% 40X. D: Tinción con Giemsa

7.3.2. FENOTIPIFICACIÓN

Las células hAEC en el pasaje 0 (P0) y 2 (P2), fueron analizadas por citometría de flujo, especialmente para el panel de células madre mesénquimales CD73, CD90, CD105, CD11b, CD3, CD45, HLA-DR. Todos los análisis fueron realizados en el equipo BD FACSCalibur™, usando el kit de mesénquimales Human MSC Analysis Kit BD 562245, mediante el software BD FACSDIVA 8.0.1.

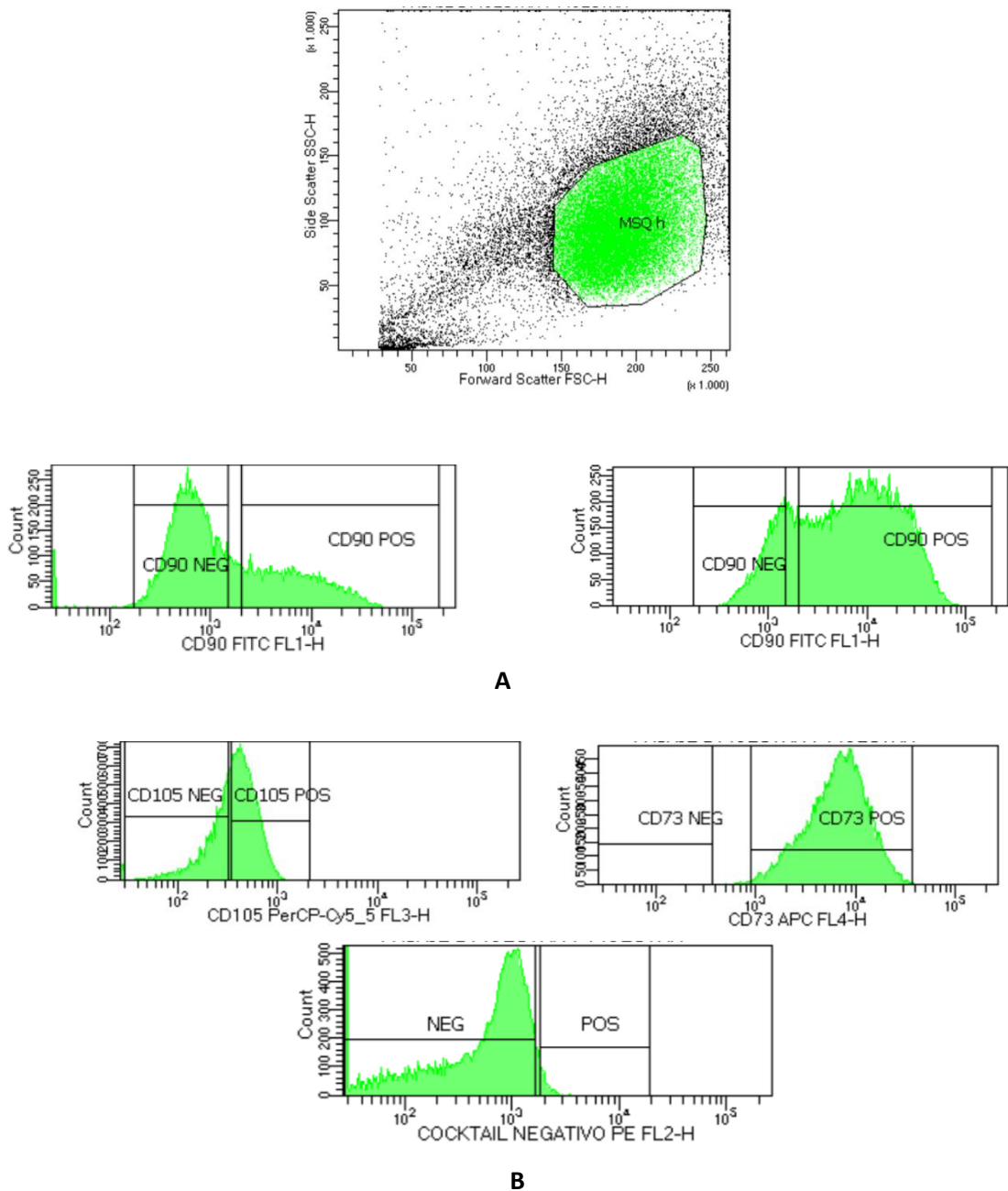


Figura 17. Caracterización fenotípica de las células Epiteliales Amnióticas humanas, mediante la citometría de flujo. A. Análisis de CD90 en P0 y P2. B. Análisis de CD105, CD73, CD34, CD11b, CD19, CD45 PE y HLA-DR (Cocktail negativo) en P2.

Las hAEC expresan consistentemente CD73 en ambos pasajes P0 (97.1%) y P2 (98.9%), con respecto al CD90, en el P0 expresan 33.8% incrementando en el P2 (75.5%). La expresión de CD105 en P0 (58.2%) y P2 (56.1) no tuvo variaciones significativas entre los pasajes. Como reportes previos, las células hAEC no

expresan CD34, CD11b, CD19, CD45 PE y HLA-DR (90.6%). Estos resultados inmunofenotípicos según la ISCT, indican que las hAEC analizadas se encuentran dentro del grupo de las células madre mesénquimales y expresan los marcadores necesarios para su caracterización (Figura 17).

7.3.3. DIFERENCIACIÓN *IN VITRO*

Las hAEC son células pluripotentes y de origen embrionario, es decir se encuentran en el linaje de las células troncales embrionarias humanas, que presentan la propiedad de diferenciarse a cualquier linaje embrionario. La ISCT considera actualmente la diferenciación al menos a un linaje (osteogénico, adipogénico o condrogénico), como una característica primordial para la clasificación de células madre. Para este proceso las hAEC fueron cultivadas en medios específicos de los kits StemPro™ Adipogenesis & Osteogenesis Differentiation Kit (A1007001/ A1007201 Gibco®, StemPro®).

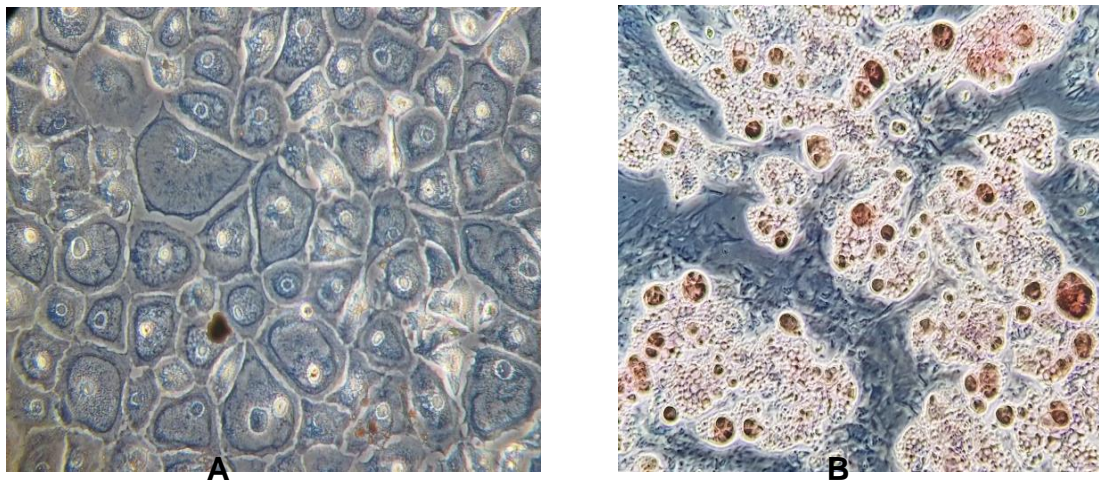
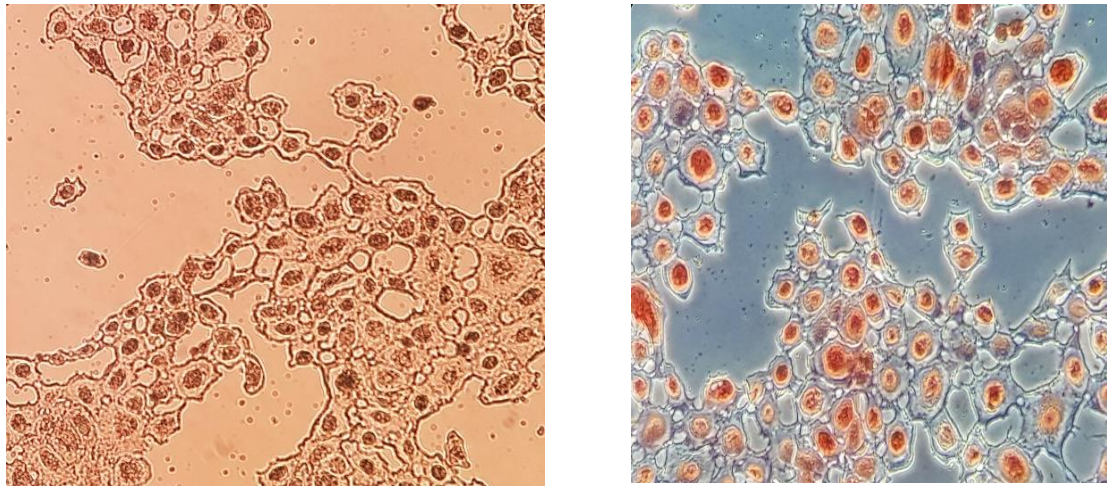


Figura 18. Diferenciación de las células Epiteliales Amnióticas humanas a Adipocitos. A. Adipocitos B. Coloración Oil Red O. 40x

La diferenciación adipogénica de las células hAEC fue analizada por la tinción con Oil Red O después de 14 días, mostrando tinción positiva a células redondeadas, adipocíticas, algunas multivacuolares y/o con vacuolas lipídicas que conforman el 95% de su citoplasma (Figura 18).

El potencial de diferenciación osteogénica de las hAEC fue examinado por la presencia de calcificación usando el colorante Rojo de Alizarina. En el proceso de diferenciación se observó depósitos cristales de Ca^{++} dentro de los 10 primeros días, evidenciando la predisposición de las hAEC a diferenciarse a osteocitos (Figura 19).



A

B

Figura 19. Diferenciación de las células Epiteliales Amnióticas humanas a Osteocitos. A. Osteocitos. B. Coloración Rojo de Alizarina. 40x

7.4 CURVA DE CRECIMIENTO CON HPL

7.4.1. FIBROBLASTOS

Los fibroblastos fueron sembrados en concentración inicial de 1×10^4 células/mL e incubados con sus respectivos inductores de crecimiento (SBF, MChAEC48h y HPL) a 37°C y 5% CO_2 . La evaluación se realizó durante 9 días, mediante el recuento celular en cámara de Neubauer cada 24 h. Todos los ensayos fueron comparados con el control, suero bovino fetal (SBF10%). Los resultados indican que la proliferación celular de los fibroblastos con los inductores plaquetarios HPL (lisado plaquetario humano), presenta un crecimiento directamente proporcional (DP) a su concentración 5%, 10% y 20%. El MC48 de hAEC no presenta diferencia significativa con el control SBF10%, lo que indica que el medio condicionado de las hAEC, liberan factores de crecimiento que permiten la

proliferación de fibroblastos con el mismo crecimiento exponencial que el control. El análisis de los inductores plaquetarios del 5%, 10% y 20% HPL, presentan una diferencia significativa a partir del día 4 ($p < 0.0001$) con respecto al crecimiento celular con SBF10%, indicando una elevada presencia de factores de crecimiento liberados por los gránulos alfa de las plaquetas que inducen a un mayor crecimiento de los fibroblastos.

Los inductores SBF10% (6.667 ± 0.577) $\times 10^4$, 5%HPL (15 ± 1) $\times 10^4$ y 10%HPL (29.6 ± 0.577) $\times 10^4$ llegan a su mayor densidad a partir del día 5 de la curva de crecimiento, e iniciando su declive a partir del día 6. El inductor 20%HPL (64 ± 2.828) $\times 10^4$ logró su máxima proliferación en el día 8 (Figura 20).

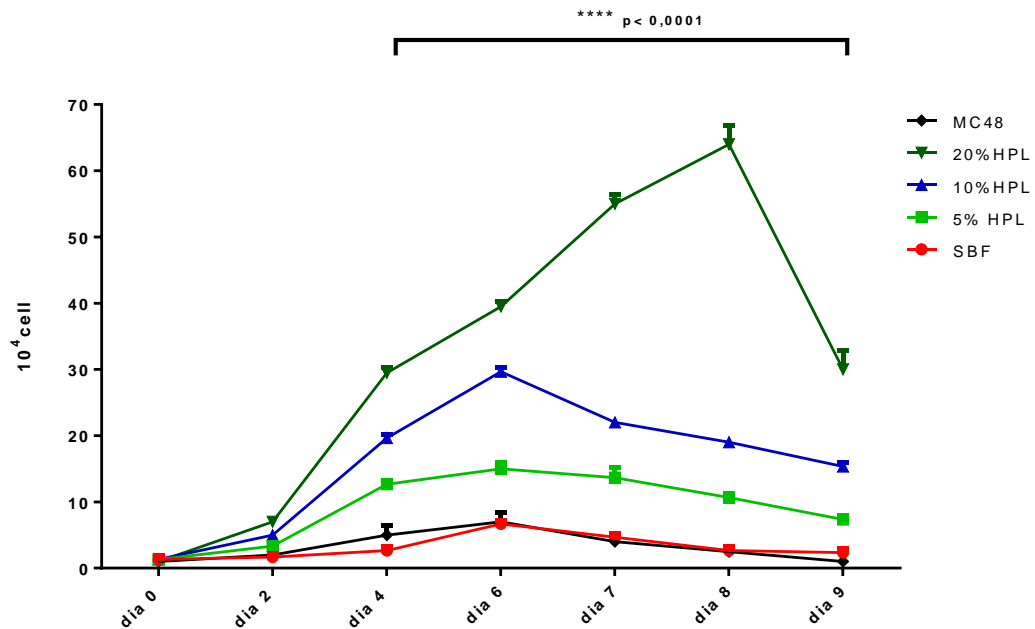


Figura 20. Curva de crecimiento de fibroblastos usando Medio Condicionado de hAEC (MC48h), HPL (lisado plaquetario humano) 5%, 10% y 20%, Suero Bovino Fetal (SBF10%). Según GraphPad Prism 7.0. ANOVA two-way. Tukey comparaciones múltiples $p \leq 0.0001$.

7.4.2. CÉLULAS EPITELIALES AMNIÓTICAS HUMANAS

Las células hAEC fueron sembradas en una concentración inicial de 1×10^4 células/mL e incubados con sus respectivos inductores de crecimiento (SBF10%, 5% y 10% HPL) a 37°C y $5\% \text{CO}_2$ durante 9 días. La inducción con el HPL 5% ($11 \pm 1.414 \times 10^4$) y 10% ($8.5 \pm 0.707 \times 10^4$) presentan diferencia significativa ($p < 0.0001$) con respecto al control SBF10% ($6.5 \pm 0.707 \times 10^4$) solo en el día 3 de crecimiento. Los inductores SBF10% (11×10^4) y HPL10% (10×10^4) presentan una mayor densidad a partir del día 4 hasta el día 6. El inductor de crecimiento 5% HPL ($11.5 \pm 0.707 \times 10^4$) expresa un declive a partir del día 4. Las hAEC presentan un crecimiento lento con respecto al ensayo realizado con los fibroblastos (Figura 21).

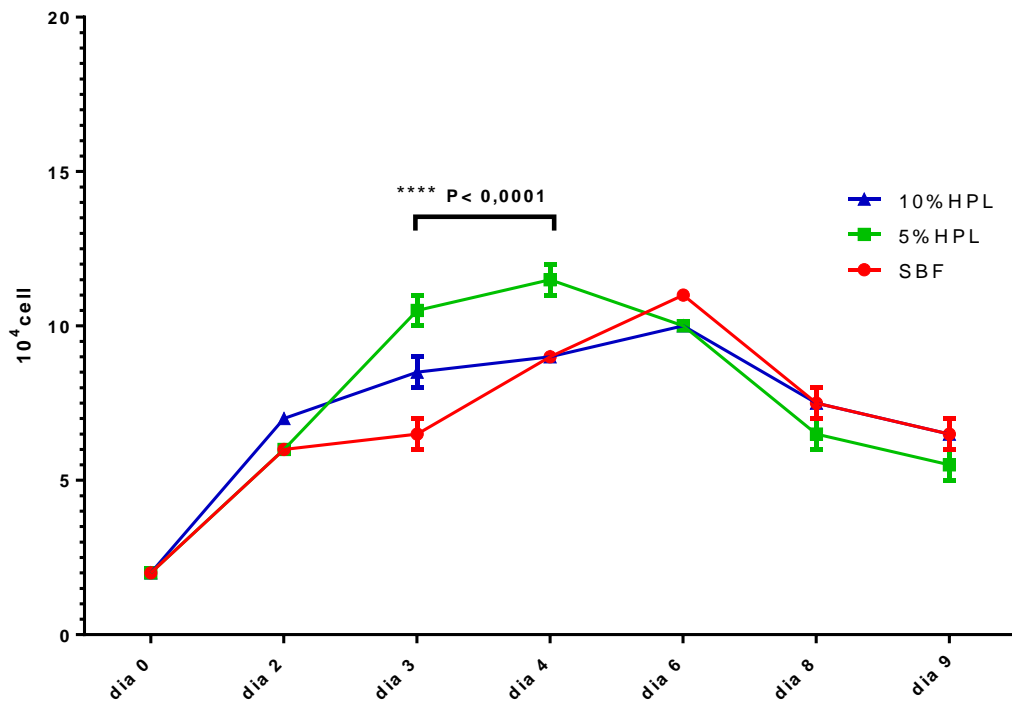


Figura 21. Curva de crecimiento de hAEC usando HPL (lisado plaquetario humano) 5%, 10% y Suero Bovino Fetal (SBF10%). Según GraphPad Prism 7.0. ANOVA two-way. Tukey comparaciones múltiples $p \leq 0.0001$.

7.5 ENSAYO DE DOBLE PROLIFERACIÓN

El ensayo de doble proliferación mide el tiempo en el cual los fibroblastos logran alcanzar el doble de su población inicial, en una escala logarítmica. Se observó que los fibroblastos inducidos a proliferación con HPL a 10% y 20% presentan una conformación más delgada, casi lineal, con respecto a la forma fusiforme que se observa en MC48h y el control SBF10% (Figura 22).

La doble proliferación celular de los inductores de crecimiento en estudio, HPL (5%, 10% y 20%), expresan una mayor diferencia significativa ($p < 0.0001$) con respecto al SBF10%, que obtiene su doble población a las 5.08 ± 0.269 horas de cultivo. El tiempo de proliferación entre las concentraciones de HPL, presentan una relación inversamente proporcional (IP) con respecto a su concentración, 5% HPL (3.68 ± 0.181 horas), 10% HPL (3.59 ± 0.159 horas) y 20% HPL (2.33 ± 0.054 horas). El MC48h (5.86 ± 0.288 horas) no presenta diferencia significativa con respecto al SBF10% (Figura 23).

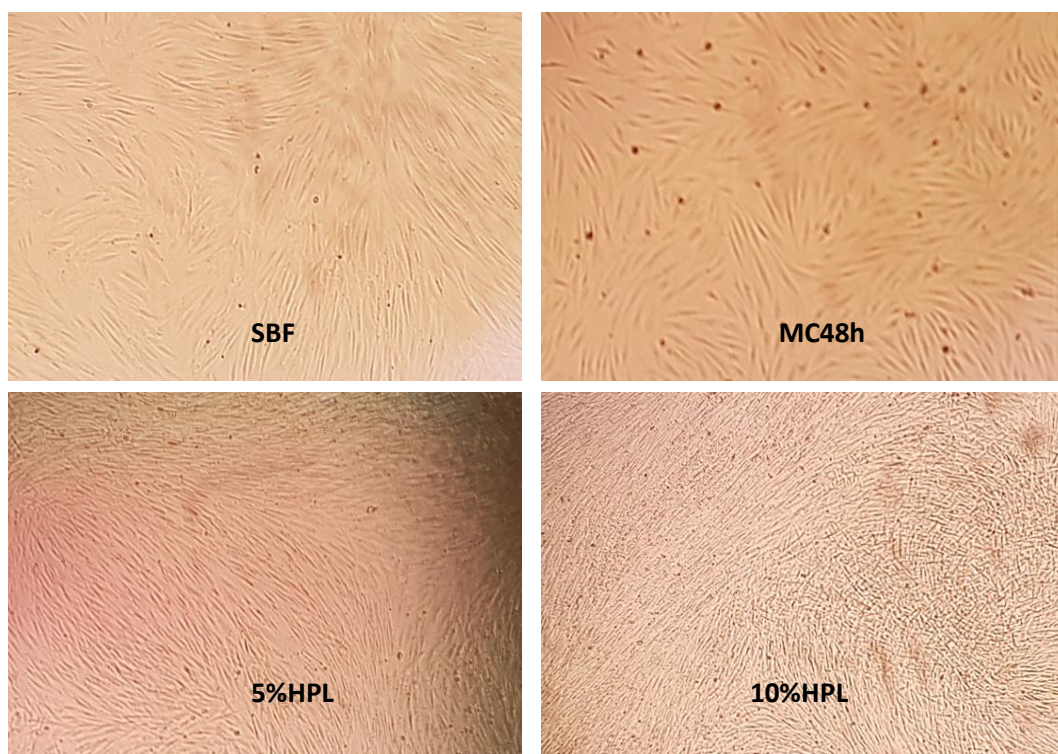


Figura 22. Ensayo de Doble proliferación en el tiempo de fibroblastos con los respectivos inductores. Medio Condicionado de hAEC (MC48h), HPL (lisado plaquetario humano) 5% y 10%, SBF10%. 80 – 90% de confluencia celular. 10X.

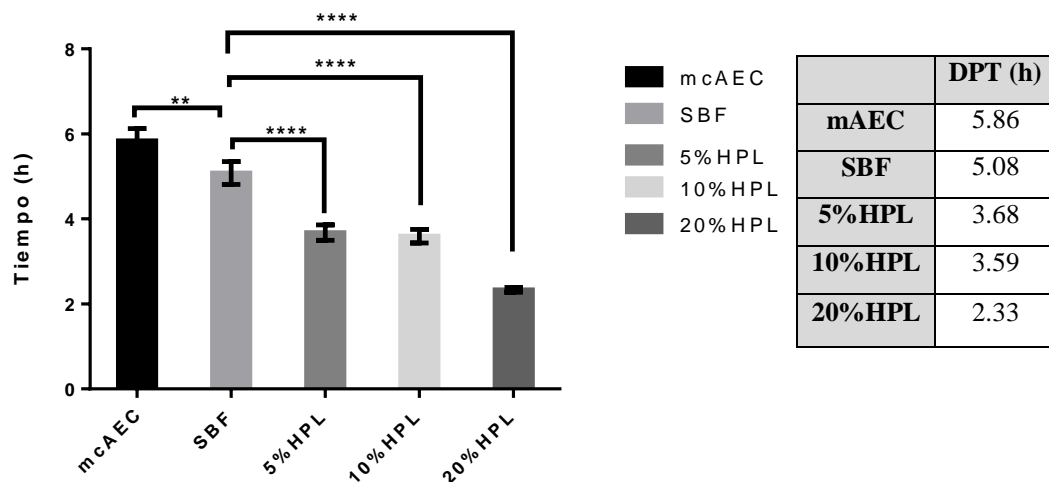


Figura 23. Ensayo de Doble proliferación en el tiempo (h) de fibroblastos. Se usó como inductores Medio Condicionado de hAEC (MC48h), HPL (lisado plaquetario humano) 5%, 10% y 20%, SBF10%. ANOVA one-way. Tukey comparaciones múltiples $p \leq 0.0001$.

7.6 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CON MTT

7.6.1. USO DE MEDIO CONDICIONADO EN LA PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS

La obtención del medio condicionado (MC) de las hAEC a las 48h, no presentó ningún inductor de crecimiento externo (SBF y HPL), solo antibiótico y medio DMEM. En el MC las células hAEC liberan por procesos metabólicos y mitóticos, factores de crecimiento y moduladores inmunológicos, que colaboran con la proliferación y crecimiento celular.

Los resultados de los índices de proliferación de los fibroblastos con MTT se realizaron por triplicado, y se tomó como control al SBF10% (1), estos indican que no existen diferencias significativas entre el SBF10%, MC48h (1.105 ± 0.1842) y HPL5% (1.218 ± 0.2298). El inductor de crecimiento HPL10% (1.281 ± 0.0224) presentan diferencia significativa ($p=0.0351$) con respecto al SBF10%.

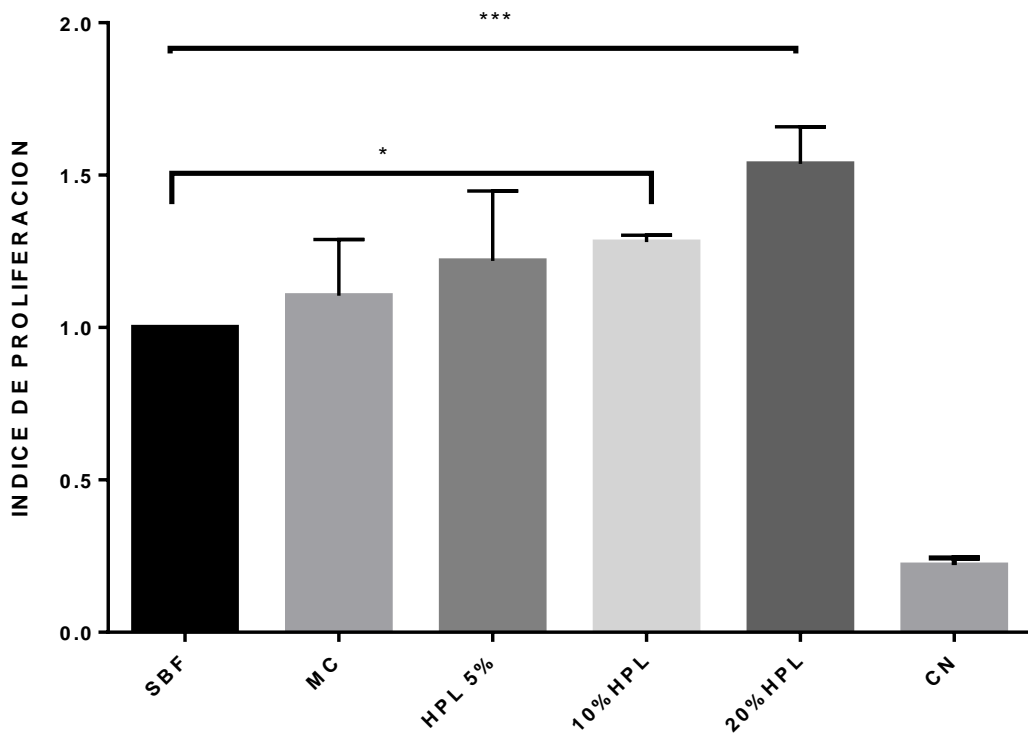


Figura 24. Proliferación con MTT usando Medio Condicionado de hAEC (MC48h), HPL (lisado plaquetario humano) 5%, 10% y 20%. CP: LPS (lipolisacárido). CN: Medio DMEM. Según GraphPad Prism 7.0. ANOVA one-way. Tukey comparaciones múltiples $p \leq 0.0001$.

La concentración de HPL20% (1.537 ± 0.1213) presenta un mayor proliferación de fibroblastos con una diferencia significativa ($p < 0.0001$) comparados con el control SBF10%. Estos resultados nos indican que la concentración de MC48h, HPL5%, HPL10% y 20% representan un buen inductor proliferativo sobre los fibroblastos, lo cual servirían como reemplazo alogénico al uso de SBF10% xenogénico (Figura 24).

7.6.2. PROLIFERACIÓN DE PBMC Y FIBROBLASTOS DÉRMICOS (CO – CULTIVOS)

A. PBMC

El co-cultivo de las células hAEC con las PBMC, se realizó con la finalidad de determinar si las hAEC presentan efectos anti proliferativos con respecto a las PBMC. Los resultados estadísticos indican que existe una disminución en la proliferación de las PBMC+hAEC (4.488 ± 1.940), pero no significativos comparados con PBMC+RPMI+SBF10% (4.632 ± 0.9741) (Figura 25).

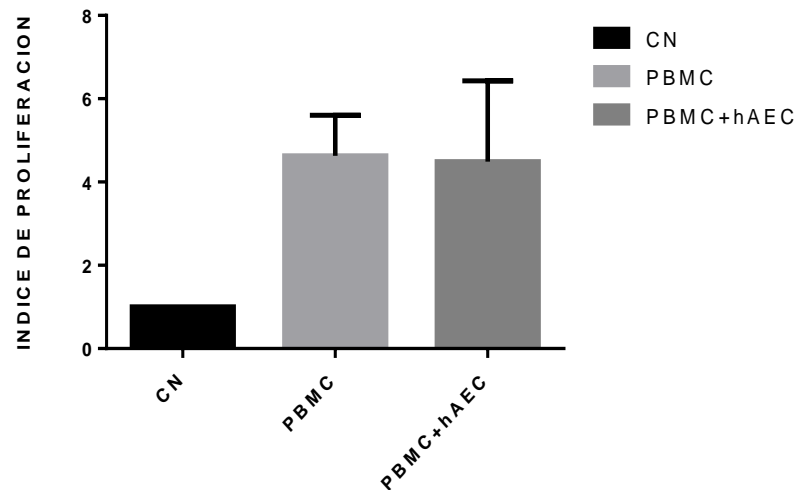


Figura 25. Co-cultivo de hAEC con PBMC. CN: medio RPMI. PBMC: PBMC con medio RPMI SBF10%. Según GraphPad Prism 7.0. ANOVA one-way. Tukey comparaciones múltiples $p \leq 0.0001$

B. FIBROBLASTOS

Los fibroblastos y las hAEC se co – cultivaron. Los fibroblastos en contacto celular con hAEC (0.9816 ± 0.1331) proliferan en proporciones no significativas con respecto al índice de proliferación del control, fibroblastos con SBF10%. Lo que indica que para los fibroblastos no es indispensable el contacto directo con las células hAEC para inducir su proliferación, pero si el metabolismo de los factores de crecimiento que son liberados por las células hAEC, como se indica en los

resultados obtenidos en la curva de crecimiento y proliferación celular (Figura 26).

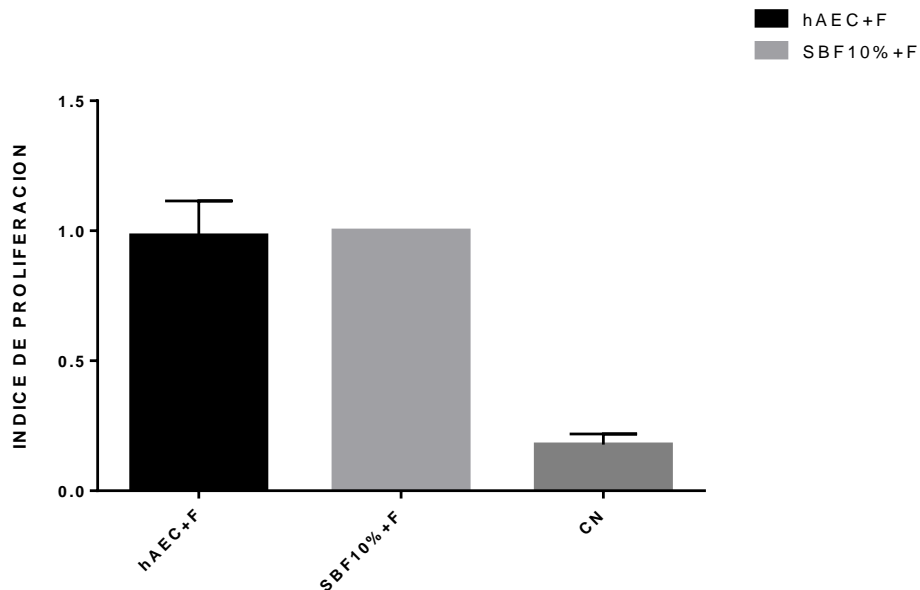


Figura 26. Co-cultivo de hAEC con FIBROBLASTOS. CN: medio DMEM. Células hAEC co – cultivadas con Fibroblastos y como control de índice proliferación fibroblastos cultivados con medio DMEM con 10% SBF. Según GraphPad Prism 7.0. ANOVA one-way. Tukey comparaciones múltiples $p \leq 0.0001$

7.7 ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR

El ensayo de migración celular se realizó para simular *in vitro* la acción de los fibroblastos en el cierre de una herida *in vivo*. El raspado realizado para todos los ensayos fue de 1.5 mm de longitud, aproximadamente, a lo largo del diámetro de la placa de cultivo de 12 pocillos. Los resultados de migración celular de los fibroblastos obtenidos con las concentraciones de HPL5% y 10% muestran un cierre parcial a las 24h de cultivo, siendo el cierre total a las 48h de cultivo. La concentración de HPL 20% presenta un cierre total a las 24 h, corroborando en todas las concentraciones de lisado plaquetario humano (HPL) una alta capacidad regenerativa y proliferativa *in vitro* sobre los fibroblastos. Con respecto al MC48h de hAEC, no presenta efectos migratorios sobre los fibroblastos, pero si mantienen la viabilidad celular durante todo el ensayo (96 h), con respecto al

grupo CN (medio DMEM sin ningún inductor), que se observó a las 48 h desprendimiento y muerte celular (Figura 27 - 29).

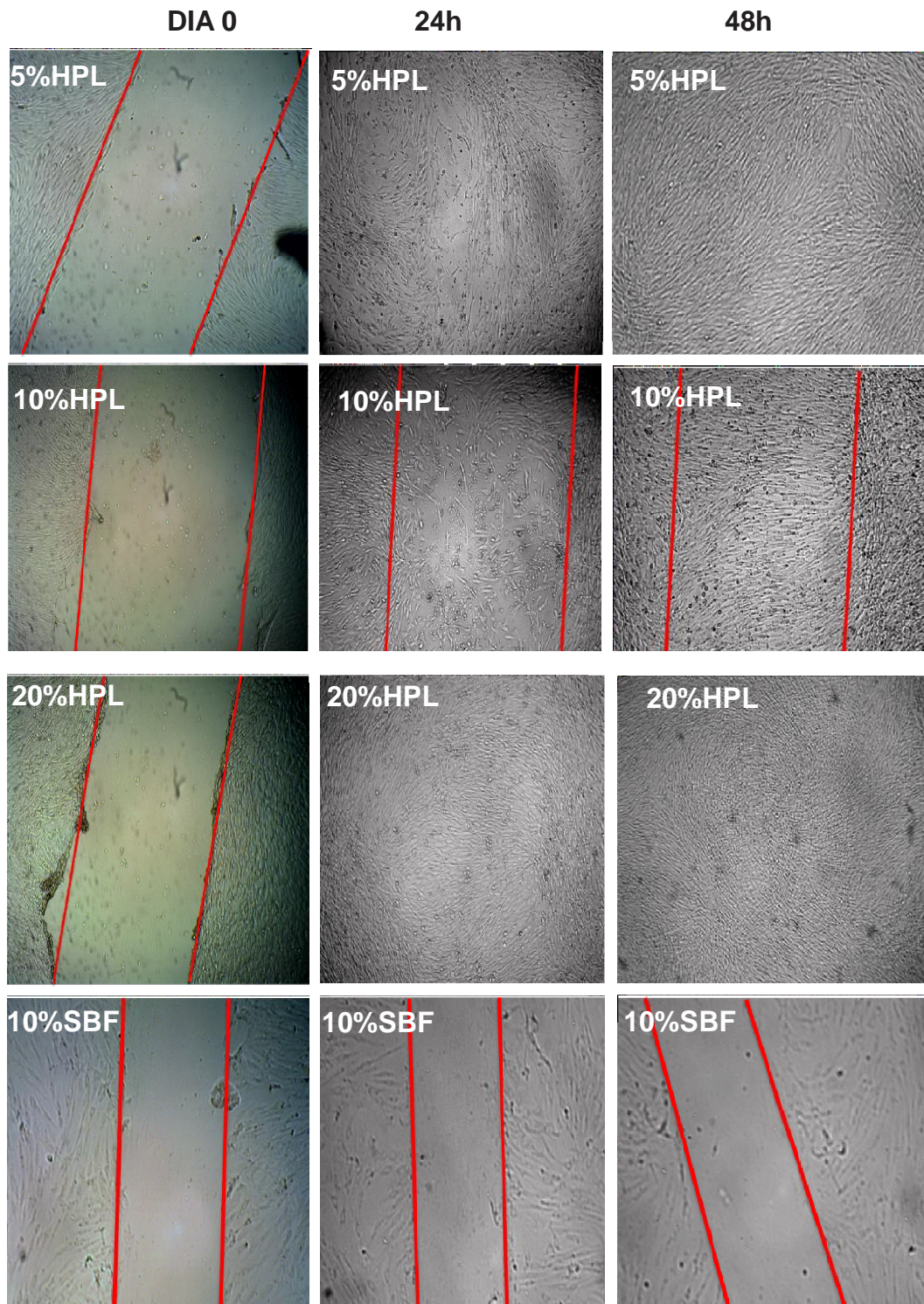


Figura 27. Ensayo de migración celular de fibroblastos dérmicos. Inductores de migración suero bovino fetal al 10% (SBF10%), Lisado Plaquetario Humano (HPL) al 5%, 10% y 20%. Análisis fotográfico cada 24 h.

CN

SBF10%

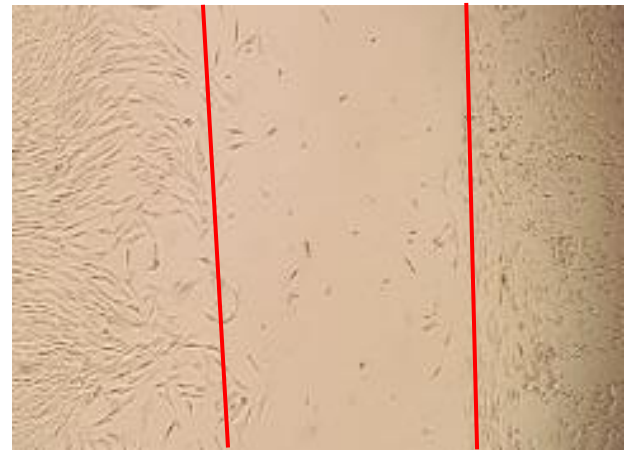
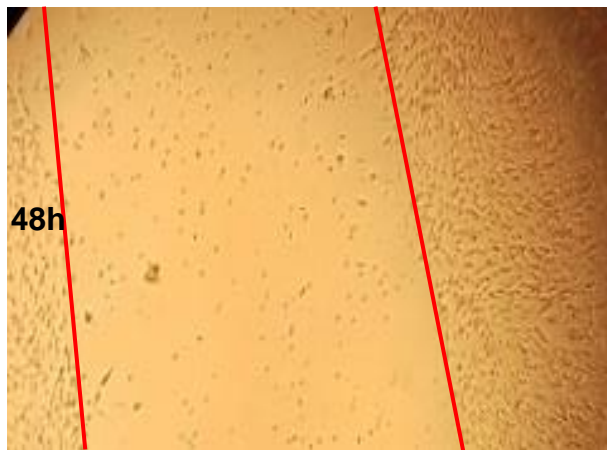


Figura 28. Ensayo de migración celular de fibroblastos dérmicos. Inductores de migración CN: Medio RMPI. Suero Bovino Fetal al 10% (SBF10%). Análisis fotográfico cada 24 h.

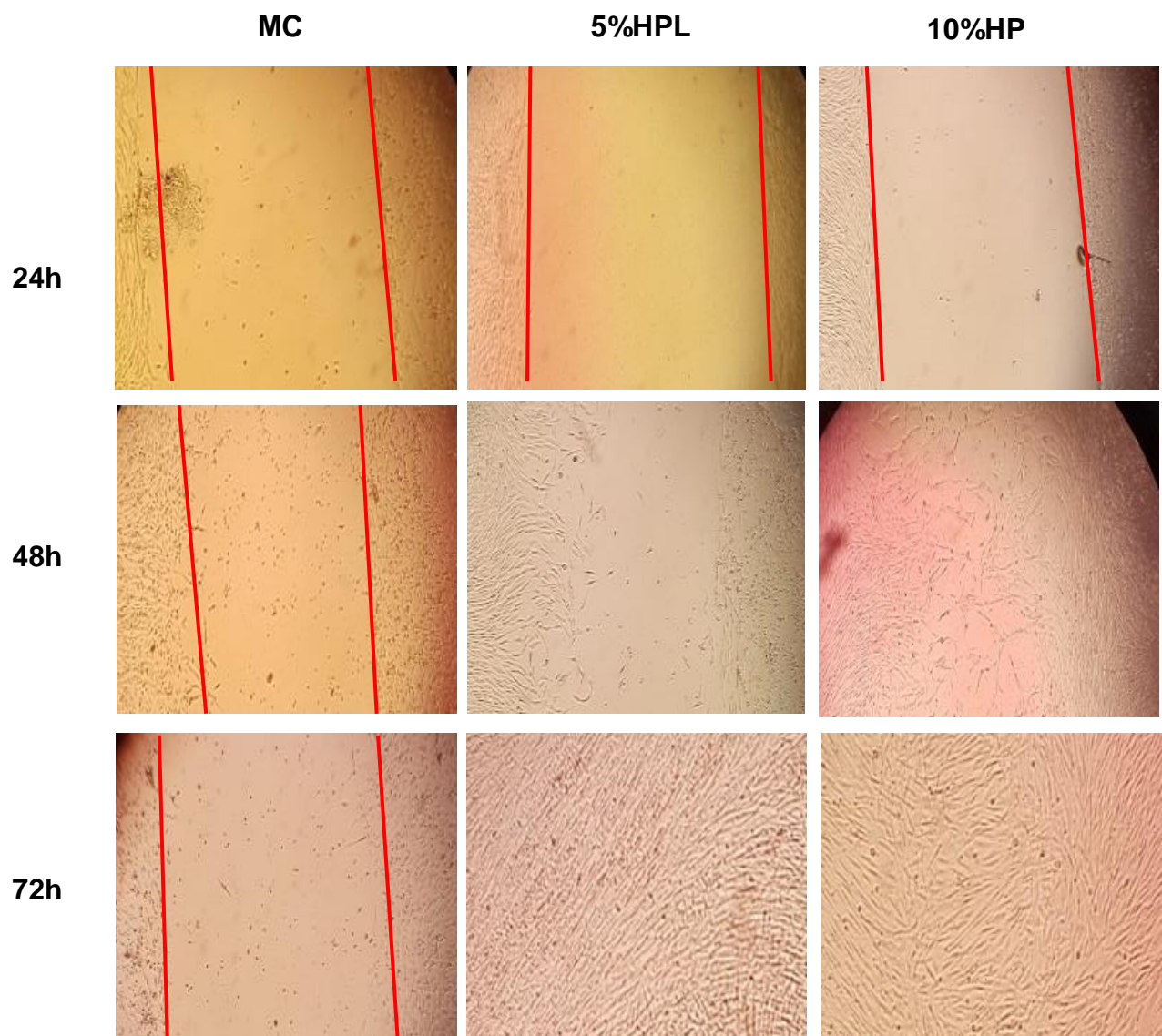


Figura 29. Ensayo de migración celular de fibroblastos dérmicos. Inductores de migración: MC: Medio condicionado de hAEC 48h y HPL5%/10%: Lisado Plaquetario Humano (HPL) 5%y 10%. Análisis fotográfico cada 24 h.

7.8 PREPARACIÓN DE GEL PLAQUETARIO O BIOCMPUESTO

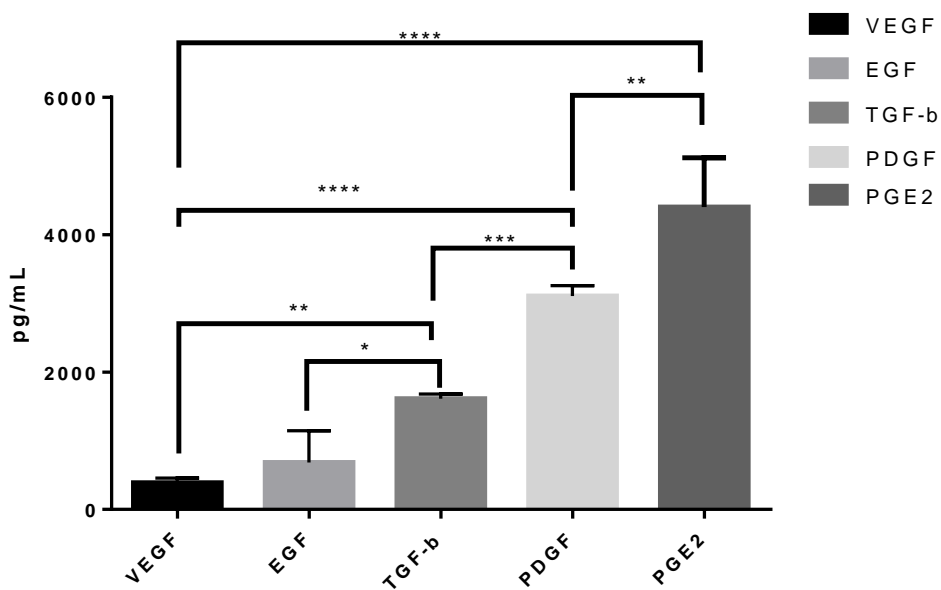
El biocompuesto presenta dos componentes principales, las plaquetas (1500plq/mL) a una concentración, del volumen total, de 75% porque es la matriz y/o andamio biológico, que va sostener el crecimiento de las hAEC, las cuales se trabajaron en proporciones por cm^2 y en dos concentraciones celulares de hAEC, $10^4 - 10^5$ células/ cm^2 . Se usó como agente activador de fibrina al cloruro de Ca^{++}

al 2%, en una proporción establecida de 10%, del volumen total, que permitió una gelificación rápida a los 30 minutos a 37°C. Debido a que los geles se evaluarían por un periodo largo de 4 días, sin solución líquida y/o medio, se agregó 1% de Antifibrinolítico (Ac. Tranexámico), lo cual nos permitió mantener una gelificación, elasticidad y flexibilidad hasta la evaluación final a las 96h. Los componentes establecidos en base a sus proporciones, permitieron una mejor consistencia del gel a través del tiempo.

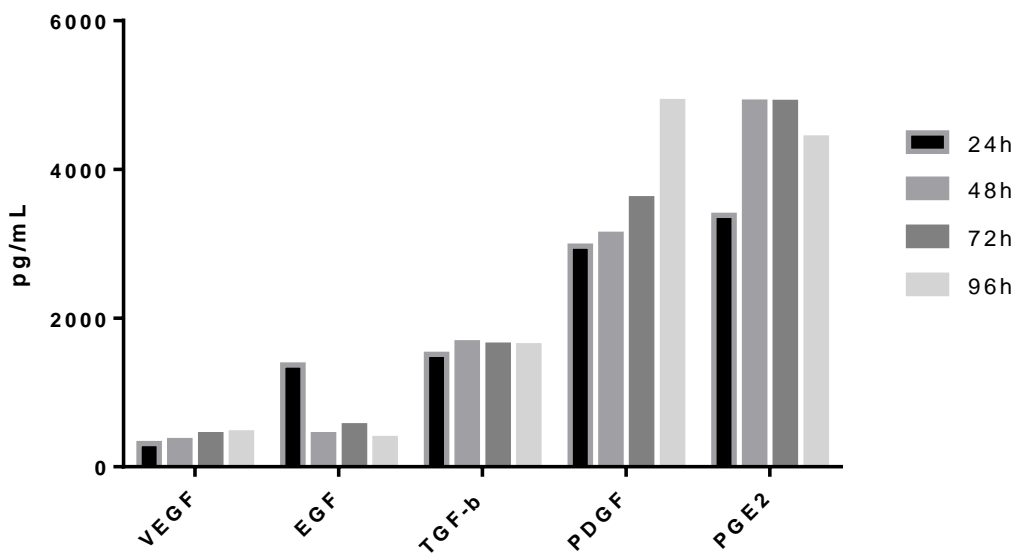
7.9 ENSAYOS DE AFINIDAD DEL BIOCOMPUESTO

7.9.1. CINÉTICA DE FACTORES DE CRECIMIENTO

Los geles plaquetarios se incubaron a 37°C por 24, 48, 72 y 96 h. Los sobrenadantes liberados por cada gel fueron alicuotados en viales de 1mL y se congelaron inmediatamente a -20°C hasta su uso. La concentración (pg/mL) de los principales factores implicados en la regeneración de tejidos se midieron mediante el uso de los kits cuantitativos de ELISA R&D System de EGF, PGE, TGF-B, PDGF y VEGF. El ensayo fue realizado con el biocompuesto formado con 10⁵células/cm² de hAEC con la finalidad de evaluar cuánto es la máxima concentración de factores de crecimiento liberados por los biocompuesto en estudio. Los resultados indican unos picos máximos de concentración de PGE₂ (4393±729.4 pg/mL) y PDGF (3651±881.5 pg/mL) significativamente mayores a los niveles de EGF (683.6±462.2 pg/mL) (p<0.0001), VEGF (389±67.66 pg/mL) (p<0.0001) y TGF-B (1611±68.47 pg/mL) (p=0.002). La presencia de estos factores de crecimiento en el biocompuesto, validan la hipótesis del estudio y su capacidad regenerativa a nivel tisular, mediante la producción de nuevos vasos sanguíneos por la inducción de TGF-B y VEGF, así como la proliferación de queratinocitos mediante el EGF y la proliferación de fibroblastos por medio del PDGF, que inducen a la formación de colágeno (Figura 30A).



A



B

Figura 30. Cinética de factores de crecimiento total. A: Factores de crecimiento liberados por el Biocompuesto con 10^5 células/cm². B: Datos individuales de la cinética de liberación de los factores de crecimiento a través del tiempo 24h, 48h, 72h y 96h. Según GraphPad Prism 7.0. ANOVA two - way. Tukey comparaciones múltiples $p \leq 0.0001$.

El análisis de los factores de crecimiento liberados por el biocompuesto a través del tiempo, presentan una cinética estable y directamente proporcional al tiempo para VEGF, PDGF y PGE2 (Figura 30B), no siendo así para el EGF que presenta una relación inversamente proporcional. Los valores de TGF- β se mantienen constantes (Tabla 1).

	<i>EGF</i>	<i>VEGF</i>	<i>TGF-B</i>	<i>PDGF</i>	<i>PGE2</i>
24H	1368,5 \pm 58,6	312,8 \pm 17,1	1512 \pm 32,5	2966,5 \pm 61,5	3379,7 \pm 45,6
48H	432 \pm 15,5	352,9 \pm 11,3	1669 \pm 26,8	3124 \pm 16,9	4903,2 \pm 23,6
72H	552.5 \pm 16,2	432,4 \pm 55,9	1637 \pm 53,7	3605 \pm 64,3	4905 \pm 7.07
96H	381,5 \pm 13,4	457,9 \pm 53,5	1626 \pm 56,5	4909 \pm 33,9	4419,5 \pm 30,4

Tabla1. Cinética de factores de crecimiento liberados a través del tiempo (24h, 48h, 72h y 96h). Según GraphPad Prism 7.0. ANOVA two-way. Tukey comparaciones múltiples $p \leq 0.0001$.

A. FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)

El VEGF es un factor importante en el proceso de angiogénesis, y en la formación de nuevos vasos, en zonas donde la falta de irrigación sanguínea es el primordial problema para la reparación y cicatrización de las heridas. Los resultados muestran que el biocompuesto con 10^5 células/cm² (389 \pm 67.66 pg/mL) libera mayor cantidad de factores que el biocompuesto con 10^4 células/cm² (132.5 \pm 45.12 pg/mL) $p < 0.0001$, así mismo ambos biocompuestos presentan una mayor concentración que el gel de plaquetas (38.25 \pm 24.25 pg/mL) $p < 0.0001$, lo que indica que las hAEC influyen directamente en la mayor liberación de VEGF. (Figura 31). Los valores de MC hAEC 48h, no expresaron valores representativos para este factor de crecimiento.

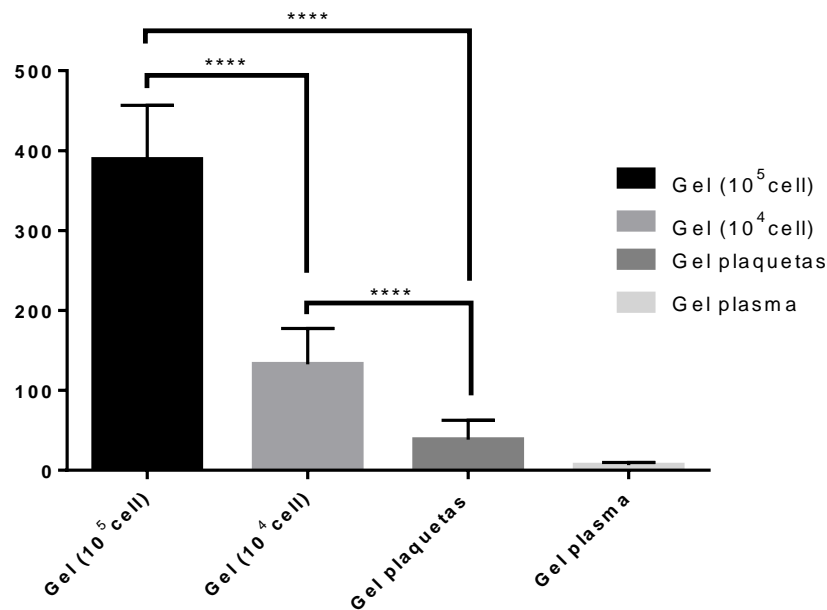


Figura 31. Cinética de factores de crecimiento vascular endotelial (VEGF) liberados por el Biocompuesto con 10⁵ células/cm², 10⁴ células/cm² y gel de solo plaquetas. Como control negativo, gel de plasma. Según GraphPad Prism 7.0. ANOVA two - way . Tukey comparaciones múltiples $p \leq 0.0001$.

B. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGFβ1)

El TGF-β1 es un factor de crecimiento primordial en la formación de neovasos, y participa en las tres primeras etapas de la cicatrización tisular (homeostasis, inflamación y proliferación/reparación), así como la reepitelización de queratinocitos e inmunomodulador de la respuesta inmune frente a rechazo. El biocompuesto formado por 10⁵ células/cm² (1612±84.85 pg/mL), libera la mayor cantidad del factor TGF-β1, comparado con los otros biocompuestos en análisis $p < 0.0001$. El biocompuesto formado por 10⁴ células/cm² de hAEC (1190±33.23 pg/mL) no presentan ninguna diferencia significativa con respecto al gel de plaquetas (1142±27.58 pg/mL) $p < 0.0001$. Las células hAEC liberan durante las primeras 48h, TGF-β como parte de sus procesos metabólicos (972.5±140 pg/mL) (figura 32), en menor proporción que los biocompuestos, lo que indica que la sinergia de los componentes (células hAEC y plaquetas), expresan valores significativos para el tratamiento de daños tisulares.

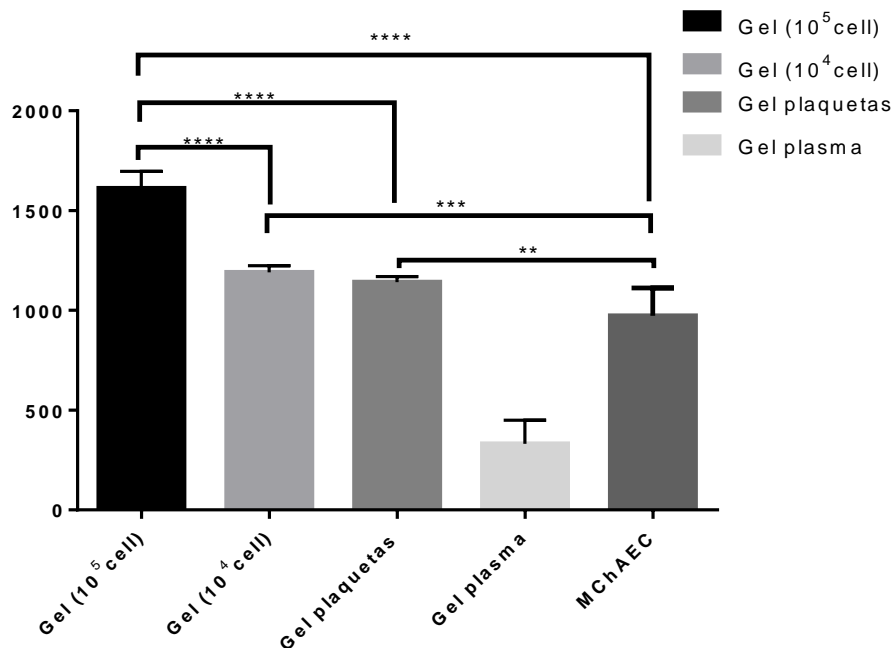


Figura 32. Cinética de factores de crecimiento transformante β (TGF- β) liberados por el Biocompuesto con 10^5 células/cm², 10^4 células/cm² y solo plaquetas. Como control negativo gel de plasma. Según GraphPad Prism 7.0. ANOVA two - way . Tukey comparaciones múltiples $p \leq 0.0001$.

C. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGF)

El EGF es un factor que interviene en la proliferación de uno de los principales componentes dérmicos, las células epiteliales como queratinocitos influenciado en su reepitelización. Los resultados indican que el gel de plaquetas (2714 ± 1861 pg/mL) libera una mayor concentración de EGF con respecto a los biocompuestos formados $p < 0.0001$. Así mismo el análisis entre los biocompuestos, muestran una mayor concentración en el biocompuesto formado por 10^4 células/cm² (1964 ± 114.2 pg/mL). Los resultados de EGF, expresan una relación inversamente proporcional al número de células y al tiempo (horas) de análisis de los biocompuestos, debido a que las células hAEC necesitan indispensablemente de este factor como inductor de crecimiento y proliferación, lo cual explica los bajos niveles de EGF en el biocompuesto con 10^5 células/cm² (683 ± 462.2 pg/mL) (Figura 33).

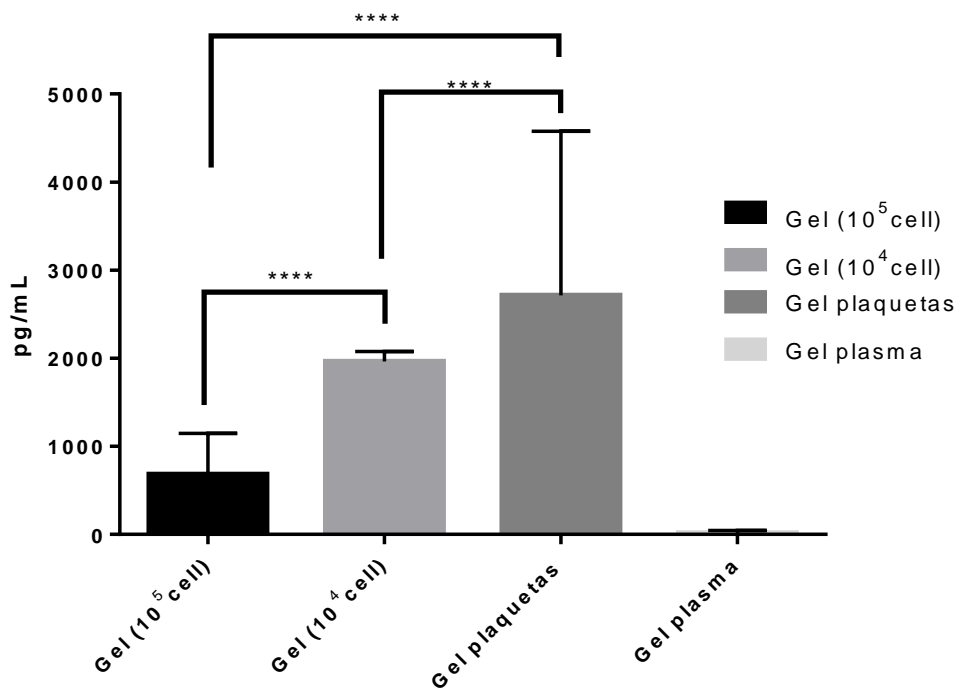


Figura 33. Cinética del factor de crecimiento Epidermal (EGF) liberados por el Biocompuesto con 10⁵ células/cm², 10⁴ células/cm² y gel solo plaquetas. Como control negativo gel de plasma. Según GraphPad Prism 7.0. ANOVA two - way. Tukey comparaciones múltiples $p \leq 0.0001$.

D. FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)

El PDGF es un factor que interviene en la proliferación de fibroblastos, así como en el proceso inflamatorio, neovascularización de la cicatrización de heridas. Los resultados no presentan ninguna diferencia significativa entre el biocompuesto con 10⁵ células/cm² (3018±94.75 pg/mL) y 10⁴ células/cm² (3284.25±66.47 pg/mL) en comparación con el gel de plaquetas (3179±79.9 pg/mL). Sin embargo, los exudados liberados por los geles (biocompuesto y plaquetas), presentan una concentración significativamente mayor que el MC48 de hAEC (2348±217.4 pg/mL) $p < 0.0001$ (figura 34). No se observa ninguna influencia de las hAEC sobre la liberación de PDGF del biocompuesto.

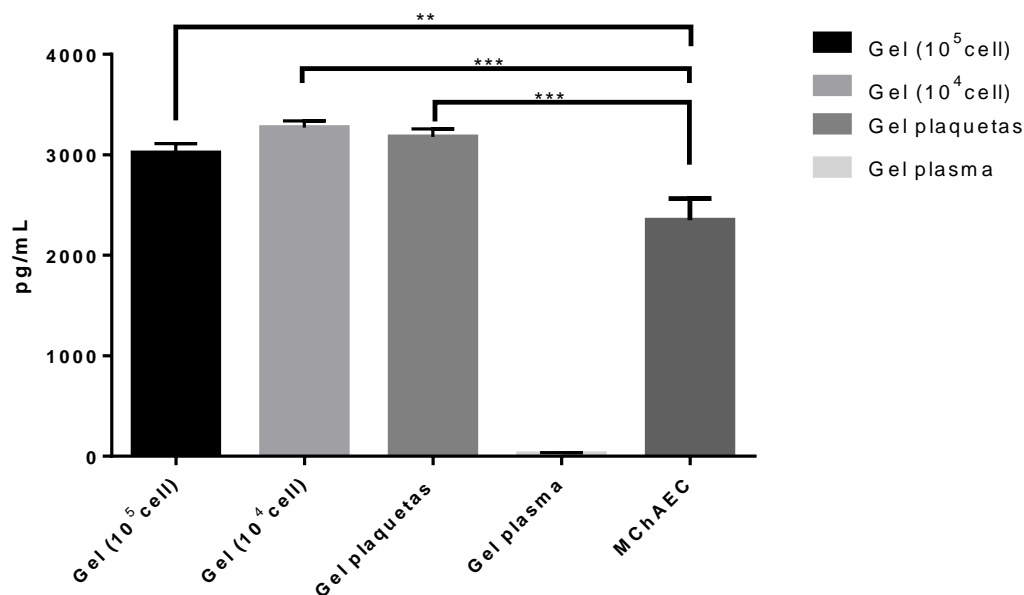


Figura 34. Cinética del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) liberados por el Biocompuesto con 10^5 células/cm², 10^4 células/cm² y gel solo plaquetas. Como control negativo gel de plasma. Según GraphPad Prism 7.0. ANOVA two - way. Tukey comparaciones múltiples $p \leq 0.0001$.

E. PROSTAGLANDINA E2 (PGE2)

El PGE2 es una citoquina inflamatoria, que en el biocompuesto con 10^5 células/cm² se expresa en concentraciones directamente proporcionales (DP) con respecto al tiempo, alcanzando su máxima concentración dentro de las 48 y 72h (4900 ± 254.5 pg/mL) (Figura 35).

Los niveles de PGE2 en el biocompuesto formado con 10^5 células/cm² (4393 ± 729.4 pg/mL) presentan diferencia significativas mayores con respecto al gel de plaquetas (1550 ± 70.71 pg/mL) y gel de plasma (1050 ± 212.1 pg/mL) $p < 0.0001$ (Figura 36), lo que implica directamente a las células hAEC en la producción y liberación de PGE2, para regular el sistema inmune, lo cual representa un gran valor clínico en el uso de componentes alogénicos y ectópicos en la reparación de tejidos dañados.

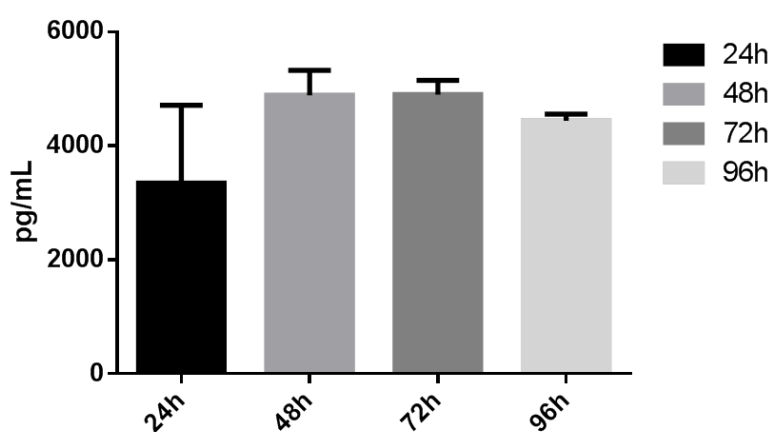


Figura 35. Cinética Prostaglandina E2 (PGE2) liberados por el Biocompuesto con 10^5 células/cm² durante 24, 48, 72 y 96h. Según GraphPad Prism 7.0. ANOVA one-way. Tukey comparaciones múltiples $p \leq 0.0001$.

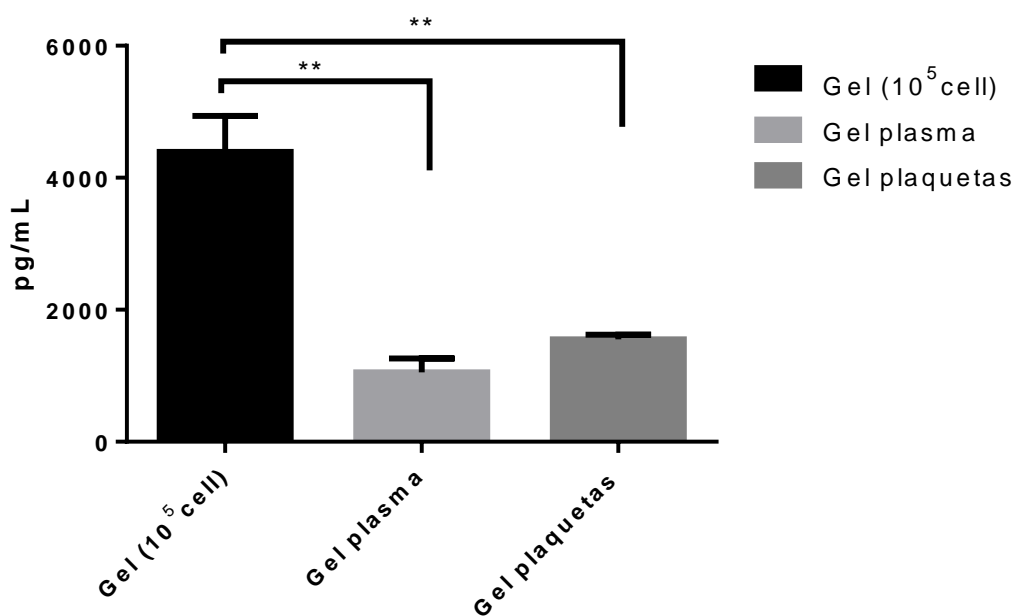


Figura 36. Cinética del factor de crecimiento de Prostaglandina E2 (PGE2) liberados por el Biocompuesto con 10^5 células/cm², gel de plaquetas y como control negativo gel de plasma. Según GraphPad Prism 7.0. ANOVA one-way. Tukey comparaciones múltiples $p \leq 0.0001$.

7.9.2. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD POR CONTACTO

Para evaluar y simular *in vitro* el efecto citotóxico y/o viabilidad de las células al contacto con el biocompuesto a través del tiempo (48h), se analizó la acción citotóxica y antiproliferativa del biocompuesto sobre los fibroblastos dérmicos. Se trabajó con una concentración inicial de 5×10^4 células/mL fibroblastos y luego de 48 h de incubación con los inductores, se procedió a tripsinizar y contar el número celular mediante la cámara de Neubauer. Todos los ensayos fueron por triplicado. El biocompuesto formado con 10^5 células/mL hAEC ($63.5 \pm 1.290 \times 10^4$ células/mL) presenta una mayor proliferación, con respecto al CP (alcohol yodado) ($8.01 \pm 1.636 \times 10^4$ células/mL) y a los fibroblastos inducidos con SBF10% ($20.08 \pm 6.125 \times 10^4$ células/mL) $p < 0.0001$. Estos resultados indican que el biocompuesto mejora la proliferación de los fibroblastos en contacto, duplicando los valores obtenidos con el control negativo en las primeras 48h de cultivo (SBF10%) $p < 0.0001$ (figura 37). Por lo tanto, el compuesto no presenta acción citotóxica por contacto sobre los fibroblastos, sino proliferativa.

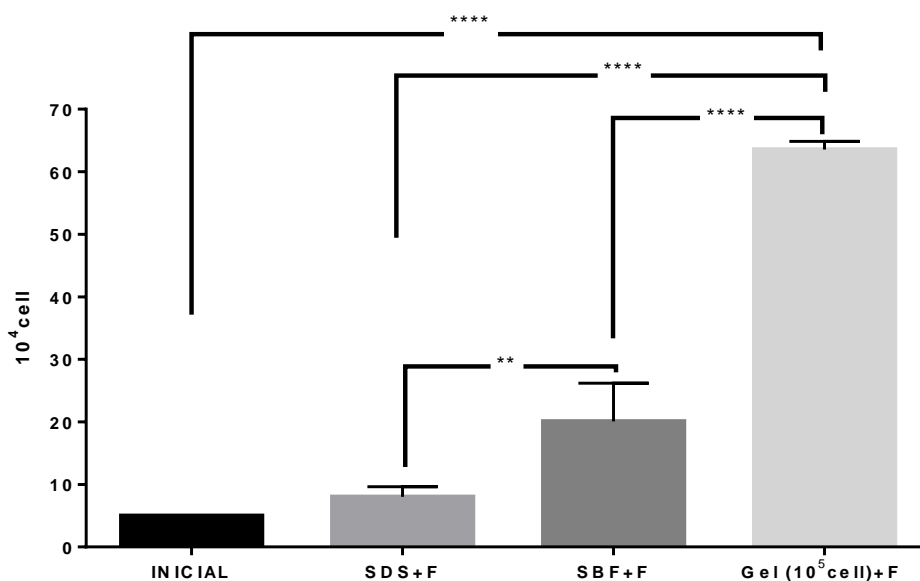


Figura 37. Citotoxicidad por contacto. CP (SDS): gasa con alcohol yodado. CN (SBF): Medio DMEM10%SBF1%PSA. Inicial: número de células iniciales de cultivo 5×10^4 células/mL. Evaluación por incubación de 48h a 37°C , 5% CO_2 . Según GraphPad Prism 7.0. ANOVA two - way. Tukey comparaciones múltiples $p \leq 0.0001$.

7.9.3. ENSAYO DE MTT

Los factores de crecimiento y productos metabólicos liberados por los biocompuestos a través del tiempo (24, 48, 72 y 96 h), fueron analizados sobre el crecimiento de los fibroblastos, con la finalidad de analizar su efecto citotóxico. Los índices de proliferación del biocompuesto formado con 10^5 células/mL a las 24 h ($9,955 \pm 0,94$), 48h ($8,848 \pm 1,14$), 72h ($8,942 \pm 0,53$) y 96h ($8,881 \pm 1,03$), presentan diferencias significativa $p < 0.0001$ con respecto al control (alcohol yodado) ($3,2 \pm 0,42$). Al analizar los índices de proliferación obtenidos entre los tiempos del biocompuesto con 10^5 células/mL, no se encontró diferencias significativas, manteniendo una proliferación de los fibroblastos constante. Los índices a través del tiempo del biocompuestos mantiene mayor proliferación con respecto a los fibroblastos inducidos con medio DMEM10%SBF ($6,041 \pm 0,16$) $p < 0.0001$ (Figura 38). En resumen el biocompuesto mejora la proliferación de los fibroblastos, y no presenta efecto citotóxico sino proliferativo sobre los fibroblastos.

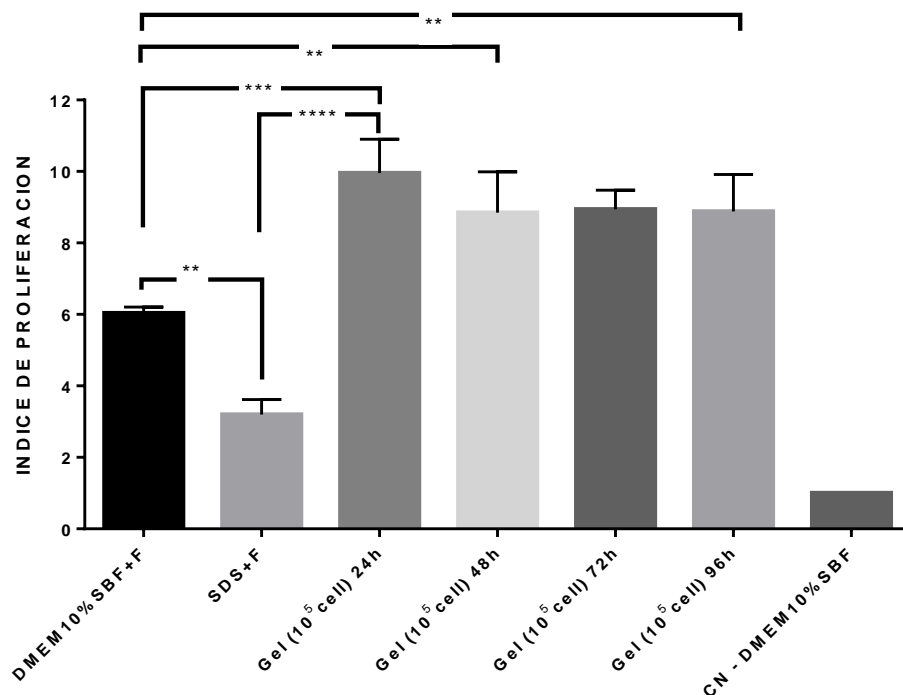


Figura 38. Citotoxicidad de fibroblastos por liberación de factores. CP (SDS): alcohol yodado. CN: Medio DMEM10%SBF1%PSA. Inductores: Exudado liberado por el Biocompuesto en el tiempo (24h, 48h, 72h y 96). Incubación a 37°C y 5%CO₂ por 48h.

CAPÍTULO VIII: DISCUSIÓN

En nuestro país los daños tisulares generados por desórdenes metabólicos como la diabetes y otros factores como quemaduras y fracturas, entre otras dolencias, presentan una elevada prevalencia sin discriminación de edad o sexo⁽⁵²⁻⁵⁵⁾. A nivel mundial los tratamientos son generalmente costosos y están basados en el uso de apósitos xenogénicos, alogénicos, autólogos y tratamientos con compuestos sintéticos⁽⁷⁾, los cuales en su mayoría presentan un éxito moderado en el proceso de regeneración y/o cicatrización de la zona dañada. La ingeniería de tejidos y el cultivo celular han generado una gran expectativa terapéutica en la medicina regenerativa. Desde el descubrimiento del uso de células madre mesenquimales, y otros linajes celulares como fibroblastos, queratinocitos, melanocitos, etc, en combinación con una matriz biológica y factores de crecimiento, forman scaffolds, constructos o andamios biológicos que reemplazan al tejido dañado. Los mayores inconvenientes implica buscar las fuentes biológicas con la mayor obtención de células viables, que tengan propiedades pluripotentes, inmunoregulatoras y de fácil acceso. En el uso convencional de células madre troncales adultas, las fuentes más usadas son tejido graso y médula espinal. Una de las fuentes muy utilizada es el tejido extraembrionario, conformado por la placenta, el cordón umbilical y las membranas fetales.

La membrana amniótica ubicada en la cara de origen fetal, orientada hacia la cavidad amniótica de la placenta, es una membrana de 0.02 a 0.5 mm de grosor, que no presenta nervios, músculos ni vasos sanguíneos e inmunológicamente importante⁽³⁾. Para el presente trabajo, la obtención de la membrana amniótica bajo el proceso de donación, no tuvo complicaciones éticas, ya que al ser un componente biológico que recubre la placenta, es un tejido de desecho en sala de partos y no se tiene contacto directo con el neonato.

La membrana amniótica posee una capa epitelial (epitelio amniótico) que está conformada por las células epiteliales amnióticas humanas (hAEC), que presentan funciones secretoras y de transporte a nivel intracelular⁽²⁷⁾. La extracción y aislamiento de las hAEC es complicado, debido a la estructura histológica interna de la membrana amniótica, siendo el principal componente contaminante las células madre mesenquimales amnióticas (hAMSC) que se ubican en el

mesodermo amniótico^(27,53). El proceso de extracción de hAEC con una alta pureza celular, se estandarizó mediante dos procesos continuos de incubación con la enzima Tripsina – EDTA, a la concentración de 0.25% por 20 minutos en cada tiempo, con ligera agitación constante. La concentración celular extraída está entre los 50 a 80x10⁶células/mL, siendo dependiente del tamaño del tejido amniótico a usar. Las hAEC presentan un crecimiento lento y muy definido en su morfología, son células homogéneas redondeadas, de tamaño mediano con abundante citoplasma, y con tendencia a formar colonias clonales en cultivos con baja densidad celular. Las células hAEC fueron caracterizadas según los parámetros establecidos por la ISCT para la caracterización de células madre, adherencia, expresión de marcadores CD, y diferenciación celular⁽⁵⁴⁾. Las hAEC presentan una fuerte adherencia al plástico dentro de las 4 primeras horas de cultivo. Con respecto a la caracterización fenotípica los análisis citométricos fueron realizados en 2 tipos de pasajes P0 y P2, expresando consistentemente CD73 en ambos pasajes P0 (97.1%) y P2 (98.9%), con respecto al CD90, en el P0 expresan 33.8% incrementando en el P2 (75.5%), aún no está claro la funcionalidad de este marcador celular, pero algunas literaturas difieren en su expresión para las células hAEC. La expresión de CD105 en P0 (58.2%) y P2 (56.1) no tuvo variaciones significativas entre los pasajes y expresión negativa para CD34, CD11b, CD19, CD45 PE y HLA-DR (90.6%). Un parámetro indispensable en toda célula madre es su capacidad de diferenciación a otros linajes, por tal motivo las hAEC se indujeron a diferenciación osteogénica y adipogénica logrando diferenciarse a adipocitos y osteocitos, dentro de los 14 y 10 días de incubación con los inductores, respectivamente.

Los resultados corroboran la idea de que estamos frente a un nuevo grupo de células madre de origen embrionario, capaces de diferenciarse a varios linajes, con una alta población celular en el proceso de extracción y con capacidad proliferativa, sin complicaciones éticas para su obtención, por el uso de fetos o embriones, ya que se obtiene de un producto de desecho del proceso de parto.

Otra importancia de las hAEC evaluadas en este estudio, es el medio condicionado (MC), el cual es el producto metabólico de un conjunto de células, que durante su ciclo celular, crecimiento, liberan productos derivados, proteínas y

factores de crecimiento, que pueden influenciar sobre la acción de otras células. El medio condicionado derivado de las hAEC (MC48h), fue obtenido mediante el cultivo de las células hAEC en medio DMEM1%PSA sin la presencia de SBF u otro inductor de crecimiento, con la finalidad de evaluar el efecto proliferativo y migratorio de los compuestos metabólicos liberados por las hAEC sobre los fibroblastos sin la acción de otros componentes externos. Con la misma finalidad se evaluó el lisado plaquetario humano (HPL), que a nivel internacional, se está estandarizando su uso como reemplazo del suero bovino fetal (SBF) de origen xenogénico, en el cultivo de células humanas grado clínico con fines de terapia celular, debido a la diversidad de factores que intervienen en la proliferación, crecimiento y adherencia celular⁽⁵⁵⁾. Por tal motivo se obtuvo plaquetas concentradas a 15000 plq/mL mediante una plaquetaféresis bajo un proceso de donación, las cuales fueron lisadas por procesos continuos de shock térmico, que permitieron romper las plaquetas y sus gránulos α , para la liberación de factores de crecimiento. La concentración de uso como inductores de crecimiento, enriqueciendo los medios de cultivo, se trabajó en base a porcentajes del volumen total (5%, 10% y 20%), presentando como control de ensayo al SBF10% como Gold estándar.

Las concentraciones de HPL (5%, 10% y 20%) y MC48h como inductores de crecimiento de fibroblastos fueron analizados en una curva de crecimiento, indicando que los inductores de proliferación que más se asemejan al grupo control SBF10% son los del MC48h y 5%HPL. En la curva exponencial se observó un crecimiento lento hasta el día 6 y luego un declive hacia el día 9, manteniendo la morfología característica de los fibroblastos. Estos inductores son posibles candidatos para su uso en cultivos celular. Los inductores de HPL (5%, 10% y 20%) presentan una alta y rápida inducción de crecimiento celular, directamente proporcional a las concentraciones de HPL. Las concentraciones de 10% y 20% presentan una marcada diferencia en la morfología de los fibroblastos con respecto al SBF. Con la finalidad de observar el efecto de lisado plaquetario sobre la proliferación de hAEC, se realizó una curva de crecimiento con los inductores plaquetarios HPL5% y HPL10%, observando un crecimiento lento y ninguna diferencia significativa con el grupo control SBF10%.

Dentro de la diversidad de técnicas que nos permiten estandarizar el cultivo de una línea celular con respecto a su confluencia y/o crecimiento, tenemos al DPT, que nos permite determinar en qué tiempo las células duplican su población bajo una fórmula matemática (logarítmica). Los resultados de DPT de los fibroblastos según los inductores en estudio (HPL, SBF, MChAEC), muestran al MC48h de las hAEC como el inductor con mayor tiempo de DPT=5.86 h, comparado con el control SBF10% (5.08 h) no mostrando diferencia significativa. Los inductores de HPL, presentan un menor tiempo en relación inversamente proporcional a sus concentraciones 5% (3.68 h), 10%(3.59 h) y 20%(2.33 h) con respecto al control SBF10%, demostrando la presencia de una mayor concentración de factores de crecimiento implicados directamente en la proliferación de fibroblastos. La concentración de 5% de HPL y MC48h mantienen durante toda la evaluación la morfología característica de los fibroblastos, no siendo así en las concentraciones de 10 y 20% que alargan más las células, pero presentan una proliferación mayor. La proliferación de los fibroblastos, por medio de la técnica de MTT, bajo la acción de los inductores en estudio, muestran que el HPL a concentraciones mínimas, 2.5% (datos no documentados), como al 5% inducen proliferación, que se hace significativa a partir del 10%HPL con respecto al control 10%SBF. El MC48h induce proliferación de los fibroblastos no significativamente mayor al 10%SBF, lo cual nos brinda una posibilidad de uso del MC48h de hAEC y 5%HPL como un potente inductor del crecimiento celular *in vitro* sin una proliferación exacerbada y semejante al control SBF10%.

Una de las técnicas que modela *in vitro* el daño tisular que podría ocurrir *in vivo*, es el ensayo de migración celular, el cual consiste en raspar con la punta de un tip un cultivo confluyente de fibroblastos, para luego medir la rapidez con que migran los fibroblastos y cierran la zona dañada. Con respecto al efecto del medio condicionado de las hAEC sobre los queratinocitos, permite su proliferación mediante la activación de las vías de señalización ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) y JNK (*c-Jun N-terminal kinase*)⁽⁵⁶⁾. La migración de los fibroblastos, depende de la presencia de factores de crecimiento como PDGF, TGF- β y factor de crecimiento fibroblástico (FGF)⁽⁵⁷⁾. Los resultados fueron positivos para HPL (5, 10 y 20%), presentando un tiempo de cierre dentro de las

48h de cultivo. El MC48h no presentó inducción migratoria celular, debido a los bajos niveles de PDGF y TGF- β , pero si mantuvo durante todo el proceso la viabilidad y morfología celular de los fibroblastos, al comparar con el control de ensayo que solo presentaba medio DMEM1%PSA (sin inductor de proliferación). Sabemos que el contacto célula-célula es indispensable para la determinación de la proliferación celular en muchos linajes celulares. Las células hAEC, sirven de *feeder layer* para muchas líneas celulares como las células epiteliales de la vena umbilical (HUVECS)⁽⁵⁸⁾, células progenitoras epiteliales límbicas⁽⁵⁹⁾, entre otras. Al observar los resultados positivos para proliferación y negativos en migración de los factores de crecimiento del medio condicionado MC48h de hAEC sobre los fibroblastos dérmicos, es necesario corroborar si los fibroblastos necesitan el contacto celular para una mejor migración y/o proliferación, por tal motivo se co-cultivaron hAEC con fibroblastos en base a los datos obtenidos en las curvas de crecimiento de ambos tipos celulares, 10^5 fibroblastos frente 10^4 hAEC, y se determinó que no existe influencia en el contacto célula-célula para el índice de proliferación a través del tiempo de los fibroblastos y solo depende de los factores de crecimiento como TGF- β y PDGF liberados por el medio condicionado de hAEC.

La inflamación es una etapa decisiva para el inicio de una buena cicatrización, sin embargo, la inflamación prolongada impide el progreso a través de las etapas normales de curación de la herida (inflamación y reparación). La inflamación severa también se ha asociado con cicatrices excesivas como queloides⁽⁶⁰⁾. La inflamación es mediada por las PBMC (neutrófilos y macrófagos). Por tal motivo una característica de las hAEC *in vivo* es la inmunoregulación del sistema inmune, por tal motivo se co-cultivaron hAEC-PBMC. Las PBMC son el grupo celular que representa mejor al sistema inmune *in vitro*, debido a sus componentes celulares, como linfocitos, células dendríticas, macrófagos, entre otras. Los datos estadísticos de los índices de proliferación de los co-cultivos hAEC-PBMC, muestran una ligera disminución de la proliferación de PBMC, pero no existe diferencia significativa con respecto al control de viabilidad RPMI10%SBF. Las células hAEC no inducen proliferación a PBMC, por contacto, por lo tanto, en posibles terapias celulares permitirán una rápida cicatrización al disminuir el

tiempo de inflamación de la zona dañada, debido a la presencia de HLA-G el cual actúa como inmunoregulador del sistema inmune⁽³⁴⁾.

Según los resultados obtenidos de forma individual por el MC48h y HPL, de las hAEC y plaquetas, respectivamente, por procesos metabólicos de degradación y ciclo celular, coinciden en la inducción de la proliferación, viabilidad y no en la migración de los fibroblastos, datos que dan una gran perspectiva en el uso de estos compuestos biológicos en la regeneración tisular. Por tal motivo se homogenizó ambos componentes en forma de un biocompuesto gelificado, plaquetas y hAEC, para ser evaluado como posible terapia ectópica en el cierre de heridas y mejoras en el tiempo, con una mejor calidad de cicatrización por los factores sinérgicos que se liberan. La cinética de los factores liberados por el biocompuesto fue analizado mediante ELISA cuantitativo, de los sobrenadantes que fueron liberados cada 24 h por un transcurso de 4 días. Se evaluó también el número de células a usar por cm^2 , siendo la más adecuada y con mayor concentración de factores de crecimiento y estabilidad a través del tiempo, el gel de plaquetas conformado por 10^5 células/ cm^2 hAEC, expresando una mayor concentración en PGE2 (4393 ± 729.4 pg/mL) y PDGF (3651 ± 881.5 pg/mL) significativamente mayor a los niveles de EGF (683.6 ± 462.2 pg/mL) ($p < 0.0001$), VEGF (389 ± 67.66 pg/mL) ($p < 0.0001$) y TGF- β (1611 ± 68.47 pg/mL) ($p = 0.002$). Los niveles de EGF son inversamente proporcionales al número de células que forman el biocompuesto, debido a que las hAEC consumen y necesitan como suplemento EGF como inductor de crecimiento.^(21,61) El análisis de los niveles de los factores de crecimiento cada 24 h, muestra una producción constante en sus concentraciones, lo cual es muy importante en caso de una terapia celular que implique un recambio del biocompuesto cada 4 días, donde los niveles de los factores de crecimiento se mantendrán constantes durante todo el tratamiento con una buena inducción de regeneración.

Los biocompuestos que existen en la actualidad presentan matrices constituidas de plasma, fibrinógeno, colágeno y otros compuestos sintéticos^(11,44,62,63), que son ideales para el transporte de células, pero no brindan factores de crecimiento que mejoren la regeneración. El proceso de cicatrización tisular presenta etapas como: homeostasis, inflamación, proliferación y reepitelización, dentro de las cuales

intervienen muchos factores de crecimiento como EGF, FGF, TGF- β , PDGF, KGF, etc, células (queratinocitos, fibroblastos, células madre) y el sistema inmune, con la inflamación (respuesta celular)^(64,65). El biocompuesto desarrollado libera el factor de crecimientos EGF, que induce de forma paracrina la proliferación y migración de los queratinocitos y células epiteliales, mejorando la reepitelización y aumentando resistencia a la tracción en las heridas⁽⁶⁶⁾. Algunos ensayos clínicos terapéuticos para heridas crónicas muestran que la adición de EGF tópico, aumenta la epitelización y acortó el tiempo de cicatrización en los sitios de curación de los donantes de injerto de piel⁽⁶⁷⁾. Dentro de la familia de TGF- β , el TGF- β 1 predomina en el proceso de la salud cutánea, interviniendo en las etapas de inflamación, angiogénesis, reepitelización de la cicatrización así como en la regeneración de tejido conectivo. El TGF- β 1 facilita el reclutamiento de células inflamatorias y aumenta el desbridamiento tisular mediado por macrófagos, e induce a los fibroblastos a la síntesis de colágeno y fibronectina⁽⁶⁵⁾, permitiendo la contracción de la herida al facilitar la contracción de los fibroblastos de la matriz de colágeno⁽⁶⁸⁾. Por último el TGF- β 1 está involucrado en la producción de colágeno (particularmente del tipo I y III) y actúa como un potente inhibidor de la metaloproteinasa MMP-1, MMP-3 y MMP-9 y un promotor del inhibidor tisular de la síntesis de metaloproteinasa TIMP-1, lo que inhibe la degradación del colágeno ⁽⁶⁹⁾.

El factor VEGF promueve la angiogénesis, induce la formación de nuevos vasos sanguíneos, e intervienen conjuntamente en la proliferación y migración celular de células endoteliales en estudios *in vitro*. Factores de crecimiento como EGF y TGF- β 1 promueven la expresión de VEGF, mejorando su acción en heridas crónicas y agudas ⁽⁷⁰⁾. El VEGF participa también en la linfoangiogénesis y la formación de la matriz extracelular (ECM)⁽⁷¹⁾, el cual es el primer paso para vascularización de la herida que va ayudar a una mejor irrigación de la zona afectada.

El PDGF juega un rol en cada etapa de cicatrización tisular, que permite la proliferación de los fibroblastos para la formación de colágeno, así como su quimiotaxis a la zona dañada. Así mismo permite la formación de tejido granuloso y promueve el desbridamiento tisular mediado por macrófagos⁽⁷²⁾. Uno de las

principales funciones del PDGF es potenciar la proliferación de fibroblastos y, por lo tanto, la producción de ECM⁽⁷³⁾ pero durante la remodelación tisular, el PDGF ayuda a descomponer el colágeno viejo mediante la regulación positiva de las metaloproteinasas de la matriz⁽⁷⁴⁾.

Los factores como EGF, VEGF, PDGF y TGFβ1 tienden a disminuir su presencia o no aparecen en heridas crónicas, debido a procesos proteolíticos en el medio ambiente crónico de una herida, por la acción de metaloproteasas, lo que sugiere la utilidad de matrices ricas en estos factores de crecimiento, que permitan mantener constantes sus niveles a través del tiempo. Es por ello que el biocompuesto analizado en este estudio, se perfila *in vitro* como terapia regenerativa de tejido epitelial.

Otro aporte importante para una rápida regeneración tisular, es el efecto inmunomodulador que las células madre mesenquimales amnióticas presentan, y que están asociados a factores solubles como TGF-β1, PGE2, IDO y HGF⁽⁷⁵⁾. Al analizar los niveles de PGE2 liberados por los diferentes grupos de geles en estudio, se observa indican que las concentraciones totales en el biocompuesto, dependen directamente de las hAEC. La PGE2 es un inmunosupresor inducido por ambientes inflamatorios⁽⁷⁶⁾, que entre sus propiedades principales regula la maduración de las células dendríticas e inhibe la proliferación de las células T y regulando la producción de citoquinas pro inflamatorias⁽⁷⁵⁾.

Estos resultados hacen prometedor el uso de este gel para futuras aplicaciones clínicas, ya que es un gel que inducirá la proliferación celular a nivel de queratinocitos y fibroblastos, la angiogénesis y disminuirá la etapa inflamatoria actuando como un inmunorregulador, ya que en heridas crónicas la etapa inflamatoria se ve alterada, alargando el tiempo de inicio de la etapa de proliferación y reparación, debido a que los neutrófilos liberan elastasa y colagenasa impidiendo que se forme la matriz extracelular⁽⁶⁰⁾ manteniendo el ambiente inflamatorio por más tiempo, lo cual a futuro generará la formación de queloides y secuelas regenerativas.

El efecto citotóxico que puede presentar el biocompuesto sobre los fibroblastos *in vitro*, fue analizado bajo dos técnicas. La citotoxicidad por contacto, que asemeja *in vitro* el microambiente que los fibroblastos y el biocompuesto generarán al

contactarse en una herida *in vivo*. La citotoxicidad por MTT, donde se analizó los componentes liberados por el sobrenadante del biocompuesto según el tiempo (24, 48, 72 y 96 h). Se analizó el biocompuesto con mayor concentración celular hAEC (10^5 células/cm²), que representaría *in vitro*, el efecto de la aplicación ectópica por más de 24h sobre los fibroblastos en una herida. Los resultados de ambas pruebas muestran que el biocompuesto no es citotóxico para los fibroblastos, presentando una alta actividad proliferativa a través del tiempo, sin efectos en su morfología y crecimiento exponencial, lo que permitiría una mejora en la migración, proliferación, de las células implicadas, con beneficios promisorios en el cierre de la zona dañada, lo cual en caso de heridas crónicas es crucial para evitar futuras infecciones, amputaciones y muerte.

Todos los resultados obtenidos nos conllevan a resumir que los factores liberados por el biocompuesto, podrían beneficiar el tratamiento de heridas crónicas como la diabetes, actuando en la proliferación celular de los fibroblastos y reepitelización de los queratinocitos (EGF, PDGF), como inmunoregulador disminuyendo la etapa inflamatoria (PGE2), en la angiogénesis y linfangiogénesis (VEGF), y en la reepitelización y remodelamiento (TGF- β 1) del tejido epidérmico y dérmico, con una rápida cicatrización y cierre de la zona dañada.

Con el presente estudio se demostró *in vitro* el efecto sinérgico beneficioso del uso del biocompuesto, formado por células hAEC y plaquetas, el cual presenta concentraciones ideales de factores de crecimiento (VEGF, EGF, PDGF, TGF- β 1, PGE2), que servirán de fuente para reparar en un menor tiempo la zona dañada, reduciendo la intervención quirúrgica y futuras amputaciones de extremidades inferiores en úlceras diabéticas, y expandir su accionar a otros tipos de daños tisulares leves y crónicos. El presente estudio generará una serie de conocimientos acerca del entorno celular y molecular de la acción de las hAEC y las plaquetas sobre las úlceras diabéticas, quemaduras u otras heridas, permitiéndonos abordar desde un perfil clínico, biológico, e inmunológico y contrarrestar estas dolencias, planteando estudios *in vivo* a futuro, con grandes expectativas de uso, con una alta efectividad y seguridad en terapia celular, lo cual permitirá mejorar la calidad de vida en los pacientes con diabetes tipo II, facilitando su reincorporación a la sociedad.

CAPÍTULO IX: CONCLUSIONES

1. Las plaquetas liberan altos niveles de factores de crecimiento como EGF, PDGF, que actúan como inductores de crecimiento en reemplazo del SBF en la proliferación de los fibroblastos.
2. Los inductores de crecimiento analizados en el presente estudio HPL (5%, 10% y 20%), MC48h, presentan un alto índice de proliferación como una alternativa de uso para el 10% SBF, el cual es un inductor caro y de origen xenogénico.
3. El MC48h de las hAEC es un buen inductor de proliferación para los fibroblastos dérmicos, sin embargo no induce la migración celular en este tipo de células.
4. La migración celular del HPL al 5% es la que se asemeja más en el tiempo de crecimiento, proliferación y morfología de los fibroblastos, al compararlos con el control (estándar internacional) 10% de SBF.
5. Las hAEC no presentan actividad proliferativa por contacto con los fibroblastos.
6. Las hAEC no expresan capacidad inmunoestimuladora en co - cultivo con las células PBMC, lo cual permitirá, en heridas crónicas, acortar los tiempos de la etapa inflamatoria y migrar a la etapa reconstructiva.
7. El biocompuesto presenta una alta estabilidad y flexibilidad de manipulación a través del tiempo, durante 96h.
8. El biocompuesto con hAEC 10^5 células/cm², presentan un mejor comportamiento en la liberación de los factores de crecimiento analizados (VEGF, EGF, TGF – β , PDGF, PGE2) con respecto al biocompuesto con hAEC 10^4 células/cm². Los niveles de EGF expresan una menor concentración en el biocompuesto con hAEC 10^5 células/cm², debido a que las células hAEC usan como inductor de crecimiento y proliferación EGF.
9. Según los resultados obtenidos *in vitro*, el biocompuesto presenta alta capacidad regenerativa y proliferativa de los fibroblastos, siendo no tóxico para las células en cultivo.
10. El uso de las hAEC y plaquetas, como fuente de moléculas co-estimuladoras para la reparación tisular, genera un microambiente inmunológicamente

importante para la cicatrización de heridas, nos brinda promisorios resultados como nueva alternativa para el cultivo de fibroblastos con posibles aplicaciones clínicas en el tratamiento de úlceras cutáneas de pie diabético.

CAPÍTULO X: RECOMENDACIONES

1. Para trabajar con HPL10% y HPL20% como inductores de crecimiento se recomienda realizar un análisis cromosómico y molecular de los fibroblastos inducidos, ya que la estructura morfológica y velocidad de proliferación analizadas en la tesis indica que son muy distantes con respecto al control (SBF10%), lo que infiere a pensar en posibles desórdenes metabólicos o cromosómicos (epigenéticos).
2. Se recomienda trabajar con las hAEC máximo hasta el pasaje 3.
3. Se recomienda trabajar con reactivos del mismo lote durante todo el ensayo.
4. Se recomienda realizar la medición de otros factores de crecimiento liberados por el biocompuesto como factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), que permitan completar la información del efecto proliferativo, migratorio y regenerativo, sobre las poblaciones celulares que influyen en la reparación tisular (queratinocitos y fibroblastos).

CAPÍTULO XI: REFERENCIAS

1. The Emerging Risk Factors Collaboration. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. 26 de junio de 2010;375(9733):2215-22.
2. Mundial D. da Diabetes. 2014;
3. Mathers CD, Loncar D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. Samet J, editor. *PLoS Med*. 28 de noviembre de 2006;3(11):e442.
4. Medina A, Scott PG, Ghahary A, Tredget EE. Pathophysiology of chronic nonhealing wounds. *J Burn Care Rehabil*. agosto de 2005;26(4):306-19.
5. Boulton AJM, Kirsner RS, Vileikyte L. Neuropathic Diabetic Foot Ulcers. *N Engl J Med*. 1 de julio de 2004;351(1):48-55.
6. Wieman TJ. Principles of management: the diabetic foot. *Am J Surg*. agosto de 2005;190(2):295-9.
7. OMS | Diabetes [Internet]. WHO. [citado 19 de marzo de 2018].
8. Alcántara W, Flores R, Garmendia F. Prevalencia y riesgo de amputación en pacientes con pie diabético. *Fac Med Perú*. septiembre de 1999;60(3):159-64.
9. Torres-Aparcana HL, Gutiérrez C, Pajuelo-Ramírez J, Pando-Álvarez R, Arbañil-Huamán H. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes hospitalizados por pie diabético en el Hospital Nacional Dos de Mayo entre 2006 y 2008, Lima-Perú. 2012;16(3):7.
10. Stoltz J-F, de Isla N, Li YP, Bensoussan D, Zhang L, Huselstein C, et al. Stem Cells and Regenerative Medicine: Myth or Reality of the 21th Century. *Stem Cells Int*. 2015;2015:1-19.
11. Mao AS, Mooney DJ. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proc Natl Acad Sci*. 24 de noviembre de 2015;112(47):14452-9.
12. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring H-J, Evangelista M, et al. Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*. febrero de 2008;26(2):300-11.
13. Ojeh N, Pastar I, Tomic-Canic M, Stojadinovic O. Stem Cells in Skin Regeneration, Wound Healing, and Their Clinical Applications. *Int J Mol Sci*. 23 de octubre de 2015;16(10):25476-501.
14. Lindenmair A, Hatlapatka T, Kollwig G, Hennerbichler S, Gabriel C, Wolbank S, et al. Mesenchymal Stem or Stromal Cells from Amnion and

- Umbilical Cord Tissue and Their Potential for Clinical Applications. *Cells*. 12 de noviembre de 2012;1(4):1061-88.
15. Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M, Drewa T. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016;64(6):443-54.
 16. Iniesta P, Majado MJ, Castellanos G, Moraleda JM, Carmen L, Insausti, Miguel Blanquer, Patricia Bleda. *Histol Histopathol*. 2010;25:91–98.
 17. Bourne G. The foetal membranes: a review of the anatomy of normal amnion and chorion and some aspects of their function. *Postgrad Med J*. 1962;38(438):193.
 18. Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. Anatomy and pathology of the placental membranes. En: *Pathology of the human placenta* [Internet]. Springer; 2012 [citado 19 de septiembre de 2017]. p. 249–307. 19. Tamagawa T, Ishiwata I, Saito S. Establishment and characterization of a pluripotent stem cell line derived from human amniotic membranes and initiation of germ layers in vitro. *Hum Cell*. 2004;17(3):125–130.
 20. Manuelpillai U, Tchongue J, Lourensz D, Vaghjiani V, Samuel CS, Liu A, et al. Transplantation of human amnion epithelial cells reduces hepatic fibrosis in immunocompetent CCl₄-treated mice. *Cell Transplant*. 2010;19(9):1157-68.
 21. Murphy S, Rosli S, Acharya R, Mathias L, Lim R, Wallace E, et al. Amnion Epithelial Cell Isolation and Characterization for Clinical Use. En: Bhatia M, Elefanty AG, Fisher SJ, Patient R, Schlaeger T, Snyder EY, editores. *Current Protocols in Stem Cell Biology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2010 [citado 3 de julio de 2017].
 22. Toda A, Okabe M, Yoshida T, Nikaido T. The Potential of Amniotic Membrane/Amnion-Derived Cells for Regeneration of Various Tissues. *J Pharmacol Sci*. 2007;105(3):215-28.
 23. Miki T, Mitamura K, Ross MA, Stolz DB, Strom SC. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J Reprod Immunol*. octubre de 2007;75(2):91-6.
 24. Díaz-Prado S, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Rendal-Vázquez ME, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, et al. Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J Cell Biochem*. 1 de noviembre de 2010;111(4):846-57.
 25. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. *Stem Cells*. noviembre de 2005;23(10):1549-59.
 26. Miki T, Strom SC. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2006;2(2):133–141.

27. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem Cells Derived from Human Fetal Membranes Display Multilineage Differentiation Potential. *Biol Reprod.* 1 de septiembre de 2007;77(3):577-88.
28. Ito A, Takizawa Y, Masashige S, Honda H, Hata K-I, Ueda M, et al. Proliferation and stratification of keratinocyte on cultured amniotic epithelial cells for tissue engineering. *J Biosci Bioeng.* 2003;95(6):589-93.
29. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res.* marzo de 2000;20(3):173-7.
30. Moodley Y, Ilancheran S, Samuel C, Vaghjiani V, Atienza D, Williams ED, et al. Human Amnion Epithelial Cell Transplantation Abrogates Lung Fibrosis and Augments Repair. *Am J Respir Crit Care Med.* septiembre de 2010;182(5):643-51.
31. Hori J, Wang M, Kamiya K, Takahashi H, Sakuragawa N. Immunological characteristics of amniotic epithelium. *Cornea.* 2006;25:S53–S58.
32. Hsi BL, Samson M, Grivaux C, Fénichel P, Hunt JS, Yeh CJ. Topographical expression of class I major histocompatibility complex antigens on human amniotic epithelium. *J Reprod Immunol.* julio de 1988;13(2):183-91.
33. Hunt JS, Andrews GK, Fishback JL, Feess M, Wood GW. Amnion membrane epithelial cells express class I HLA and contain class I HLA mRNA. *J Immunol.* 15 de abril de 1988;140(8):2790-5.
34. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(7):1539–1546.
35. Banas RA, Trumpower C, Bentlejewski C, Marshall V, Sing G, Zeevi A. Immunogenicity and immunomodulatory effects of amnion-derived multipotent progenitor cells. *Hum Immunol.* junio de 2008;69(6):321-8.
36. Houlihan JM, Biro PA, Harper HM, Jenkinson HJ, Holmes CH. The human amnion is a site of MHC class Ib expression: evidence for the expression of HLA-E and HLA-G. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 de junio de 1995;154(11):5665-74.
37. Rebmann V, Switala M, Eue I, Grosse-Wilde H. Soluble HLA-G is an independent factor for the prediction of pregnancy outcome after ART: a German multi-centre study. *Hum Reprod.* 1 de julio de 2010;25(7):1691-8.
38. Lefebvre S, Adrian F, Moreau P, Gourand L, Dausset J, Berrih-Aknin S, et al. Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic epithelial cells. *Hum Immunol.* 2000;61(11):1095–1101.

39. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science*. 13 de abril de 1990;248(4952):220-3.
40. Li H, Niederkorn JY, Neelam S, Mayhew E, Word RA, McCulley JP, et al. Immunosuppressive Factors Secreted by Human Amniotic Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1 de marzo de 2005;46(3):900-7.
41. Moon JH, Lee JR, Jee BC, Suh CS, Kim SH, Lim HJ, et al. Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. *Hum Reprod Oxf Engl*. agosto de 2008;23(8):1760-70.
42. Irony-Tur-Sinai M, Grigoriadis N, Tsiantoulas D, Touloumi O, Abramsky O, Brenner T. Immunomodulation of EAE by alpha-fetoprotein involves elevation of immune cell apoptosis markers and the transcription factor FoxP3. *J Neurol Sci*. 15 de abril de 2009;279(1-2):80-7.
43. Irony-Tur-Sinai M, Grigoriadis N, Lourbopoulos A, Pinto-Maaravi F, Abramsky O, Brenner T. Amelioration of autoimmune neuroinflammation by recombinant human alpha-fetoprotein. *Exp Neurol*. marzo de 2006;198(1):136-44.
44. Wolbank S, Peterbauer A, Fahrner M, Hennerbichler S, van Griensven M, Stadler G, et al. Dose-Dependent Immunomodulatory Effect of Human Stem Cells from Amniotic Membrane: A Comparison with Human Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. *Tissue Eng*. 11 de abril de 2007;13(6):1173-83.
45. Ueta M, Kweon M-N, Sano Y, Sotozono C, Yamada J, Koizumi N, et al. Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. *Clin Exp Immunol*. septiembre de 2002;129(3):464-70.
46. Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, Ota M, Akaike T, et al. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant*. 2003;12(5):545-552.
47. Bailo M, Soncini M, Vertua E, Signoroni PB, Sanzone S, Lombardi G, et al. Engraftment Potential of Human Amnion and Chorion Cells Derived from Term Placenta: Transplantation. *Transplantation*. noviembre de 2004;78(10):1439-48.
48. Sakuragawa N, Enosawa S, Ishii T, Thangavel R, Tashiro T, Okuyama T, et al. Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver. *J Hum Genet*. 2000;45(3):171-6.
49. Takashima S, Ise H, Zhao P, Akaike T, Nikaido T. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell Struct Funct*. junio de 2004;29(3):73-84.

50. Miki T, Marongiu F, Dorko K, Ellis ECS, Strom SC. Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* enero de 2010;Chapter 1:Unit 1E.3.
51. Murphy S, Rosli S, Acharya R, Mathias L, Lim R, Wallace E, et al. Amnion epithelial cell isolation and characterization for clinical use. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* abril de 2010;Chapter 1:Unit 1E.6.
52. Zevallos JAC, Pimentel MIR. Prevalencia de hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2, enfermedad renal crónica y obesidad en una población urbana de los distritos de Carabayllo, Comas e Independencia en los años 2014 y 2015. :8.
53. Revilla L, López T, Sánchez S, Yasuda M, Sanjinés G. Prevalencia de hipertensión arterial y diabetes en habitantes de Lima y Callao, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública [Internet].* 25 de septiembre de 2014 [citado 10 de enero de 2019];31(3).
54. Adams KJ, Chirinos JL. Prevalencia de factores de riesgo para síndrome metabólico y sus componentes en usuarios de comedores populares en un distrito de Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 5 de abril de 2018;35(1):39.
55. Gutiérrez DE, García LL, Sánchez JG, Gutiérrez GE. AMPUTACIÓN DEL MIEMBRO INFERIOR POR PIE DIABÉTICO EN HOSPITALES DE LA COSTA NORTE PERUANA 1990 – 2000: CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* :7.
56. Lim R, Tan J, Hodges RJ, Wallace EM. Amniotic Membrane Stem Cell Populations. En: Fauza DO, Bani M, editores. *Fetal Stem Cells in Regenerative Medicine [Internet].* New York, NY: Springer New York; 2016 [citado 19 de septiembre de 2017]. p. 149-66.
57. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
58. Strunk D, Lozano M, Marks DC, Loh YS, Gstraunthaler G, Schennach H, et al. International Forum on GMP-grade human platelet lysate for cell propagation. *Vox Sang.* enero de 2018;113(1):e1-25.
59. Zhao B, Liu J-Q, Zheng Z, Zhang J, Wang S-Y, Han S-C, et al. Human amniotic epithelial stem cells promote wound healing by facilitating migration and proliferation of keratinocytes via ERK, JNK and AKT signaling pathways. *Cell Tissue Res.* julio de 2016;365(1):85-99.
60. Schreier T, Degen E, Baschong W. Fibroblast migration and proliferation during in vitro wound healing. *Res Exp Med (Berl).* 1993;193(1):195–205.

61. Grzywocz Z, Pius-Sadowska E, Klos P, Gryzik M, Wasilewska D, Aleksandrowicz B, et al. Growth factors and their receptors derived from human amniotic cells in vitro. *Folia Histochem Cytobiol.* 10 de octubre de 2014;52(3):163-70.
62. Chen Y-T, Li W, Hayashida Y, He H, Chen S-Y, Tseng DY, et al. Human amniotic epithelial cells as novel feeder layers for promoting ex vivo expansion of limbal epithelial progenitor cells. *Stem Cells.* 2007;25(8):1995–2005.
63. Landén NX, Li D, Ståhle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(20):3861-85.
64. Pratama G, Vaghjiani V, Tee JY, Liu YH, Chan J, Tan C, et al. Changes in Culture Expanded Human Amniotic Epithelial Cells: Implications for Potential Therapeutic Applications. *PLoS ONE [Internet].* 2 de noviembre de 2011 [citado 4 de abril de 2017];6(11).
65. Meana A, Iglesias J, Rio MD, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, et al. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns.* 1 de noviembre de 1998;24(7):621-30.
66. Hussin IH, Pingguan-Murphy B, Osman SZ. The fabrication of human amniotic membrane based hydrogel for cartilage tissue engineering applications: a preliminary study. En: *5th Kuala Lumpur International Conference on Biomedical Engineering 2011 [Internet].* Springer; 2011 [citado 19 de septiembre de 2017]. p. 841–844.
67. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.* 3 de diciembre de 2014;6(265):265sr6.
68. Reinke JM, Sorg H. Wound Repair and Regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35-43.
69. Brown GL, Curtsinger LJ, White M, Mitchell RO, Pietsch J, Nordquist R, et al. Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-beta. *Ann Surg.* diciembre de 1988;208(6):788-94.
70. Falanga V, Eaglstein WH, Bucalo B, Katz MH, Harris B, Carson P. Topical use of human recombinant epidermal growth factor (h-EGF) in venous ulcers. *J Dermatol Surg Oncol.* julio de 1992;18(7):604-6.
71. Meckmongkol TT, Harmon R, McKeown-Longo P, Van De Water L. The fibronectin synergy site modulates TGF-beta-dependent fibroblast contraction. *Biochem Biophys Res Commun.* 7 de septiembre de 2007;360(4):709-14.

72. White LA, Mitchell TI, Brinckerhoff CE. Transforming growth factor beta inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription. *Biochim Biophys Acta*. 29 de febrero de 2000;1490(3):259-68.
73. Frank S, Hübner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*. 26 de mayo de 1995;270(21):12607-13.
74. DiPietro LA, Polverini PJ. Role of the macrophage in the positive and negative regulation of wound neovascularization. *Behring Inst Mitt*. agosto de 1993;(92):238-47.
75. Uutela M, Wirzenius M, Paavonen K, Rajantie I, He Y, Karpanen T, et al. PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis. *Blood*. 15 de noviembre de 2004;104(10):3198-204.
76. Lin H, Chen B, Sun W, Zhao W, Zhao Y, Dai J. The effect of collagen-targeting platelet-derived growth factor on cellularization and vascularization of collagen scaffolds. *Biomaterials*. noviembre de 2006;27(33):5708-14.
77. Jinnin M, Ihn H, Mimura Y, Asano Y, Yamane K, Tamaki K. Regulation of fibrogenic/fibrolytic genes by platelet-derived growth factor C, a novel growth factor, in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol*. febrero de 2005;202(2):510-7.
78. Kang JW, Koo HC, Hwang SY, Kang SK, Ra JC, Lee MH, et al. Immunomodulatory effects of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci*. marzo de 2012;13(1):23-31.
79. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol*. marzo de 2012;33(3):136-43.