



**RIDUNAJ**  
Repositorio Institucional  
Digital UNAJ



Universidad Nacional  
**ARTURO JAURETCHE**

Tesinas de Grado

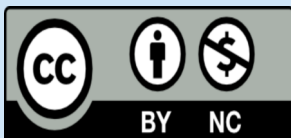
Santa Cruz, Natalia Marisel

# Productos derivados de membrana amniótica humana para tratamiento en la cicatrización de heridas complejas : estudio de mecanismos intervinientes en modelos in vitro e in vivo

2025

*Instituto de Ciencias de la Salud*

*Carrera: Bioquímica*



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.

Atribución – No comercial 4.0

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

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

Cita recomendada:

Santa Cruz, Natalia Marisel (2025). Productos derivados de membrana amniótica humana para tratamiento en la cicatrización de heridas complejas : estudio de mecanismos intervinientes en modelos in vitro e in vivo [Trabajo final de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]. <https://rid.unaj.edu.ar/handle/123456789/3179>



Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica

**“Productos derivados de membrana amniótica humana para tratamiento  
en la cicatrización  
de heridas complejas: estudio de mecanismos intervinientes en modelos *in  
vitro* e *in vivo*”**

Alumna: Santa Cruz, Natalia

Directora: Dra. Moreno, Griselda

Co-directora: Esp. Guerbi, María Ximena

Marzo, 2025

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a toda la gente del Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos, por hacerme un lugar en su espacio. A la Dra. Ivanna Rolny, Prof. del Servicio de Cultivo Celular, por la ayuda, la instrucción y el despeje de cada duda en la mesada de trabajo. Al Grupo de Inmunomodulación en medicina traslacional (“Grupo Rumbo” para los amigos), por la buena onda.

Al Dr. Flavio Francini y la Dra. Bárbara Maiztegui del Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada, por facilitarme los animales de experimentación.

Al Dr. Pablo Stringa y la Dra. Natalia Laussada del Laboratorio de Trasplante de órganos de la Facultad de Medicina de la UNLP, por el espacio, la colaboración y la buena predisposición para el desarrollo del trabajo con los animales.

Al equipo de trabajo de hAM: Flavia, Rocío, Matías, Alejandro, Ximena y Griselda. Es hermoso el trabajo que hacen y, más hermoso es ver cómo le ponen el corazón avivando el fuego que pretenden apagar. Gracias por dejarme participar, por recibirme como a una más y por la paciencia con la que me acompañaron.

A mi directora Griselda y a mi co-directora Ximena. Gracias por el apoyo, los consejos y por animarme en los momentos complicados. Por compartir sus experiencias y conocimientos, con paciencia, siempre con el foco en el proceso de aprendizaje, sin importar el tiempo que demande.

A la Universidad Pública y a mi querida casa de estudios, la Universidad Nacional Arturo Jauretche. A todos los profes de la carrera y a los compañeros.

A mis amigos.

A la familia que Dios me regaló, a través de mis abuelos. A Stella, Victoria y Daniel.

## Resumen

Ante una herida, se activan mecanismos biológicos orientados a su reparación, los cuales involucran múltiples procesos que ocurren en cascada. Las heridas complejas constituyen una elevada carga económica sobre los sistemas de salud y su tratamiento representa un desafío, especialmente las úlceras del pie diabético.

En este contexto, los derivados de membrana amniótica humana (hAM) surgen como una estrategia tecnológica innovadora y no quirúrgica, que se presenta como una alternativa terapéutica segura, práctica y eficaz para promover la cicatrización.

En este trabajo abordamos estrategias experimentales para el estudio de procesos involucrados en la reparación de heridas que permitieran evaluar el efecto de derivados de hAM en distintas condiciones. Para ello, realizamos ensayos de la herida *in vitro* para el estudio de la migración celular en una línea celular de fibroblasto (HT1080) en condiciones de alta glucosa. Además, llevamos a cabo un ensayo *in vivo* preliminar de cierre de la herida dérmica en un modelo animal de ratas con insulino resistencia.

Los ensayos *in vitro* mostraron que hAM favoreció la migración de fibroblastos en condiciones normales, pero no tuvo efecto en condiciones de alta glucosa. En el ensayo *in vivo* preliminar, se observó un retraso en el cierre de la herida en los animales con insulino resistencia.

Estos resultados demuestran que los modelos empleados son adecuados para estudiar la reparación de heridas, aunque en el caso del ensayo *in vitro*, es preciso ajustar las estrategias experimentales para evaluar con mayor precisión el impacto de hAM sobre la migración celular en condiciones de alta glucosa.

Las actividades presentadas en este trabajo final están enmarcadas en una beca de entrenamiento (BIEI UNAJ 2023) y en un proyecto de investigación (UNAJ-INVESTIGA 2020)

# Índice

1. Introducción.....	5
1.1 Reparación de heridas cutáneas.....	5
1.2 Heridas crónicas.....	7
1.3 Diabetes mellitus, resistencia a la insulina y cicatrización.....	8
1.4 Úlcera del pie diabético.....	9
1.5 Tratamiento de heridas crónicas.....	9
1.5.1 Tratamientos convencionales.....	9
1.5.2 Tratamiento alternativo con membrana amniótica humana (hAM).....	10
1.5.3 Tratamiento con derivados de membrana amniótica humana.....	11
2. Objetivos.....	12
3. Materiales y métodos.....	13
3.1 Derivados de membrana amniótica humana: Apósitos.....	13
3.1.1 Obtención de la fase soluble de hAM-pe para ensayos <i>in vitro</i> .....	13
3.1.2. Control de esterilidad.....	14
3.1.3 Cuantificación de proteínas.....	14
3.2 Ensayos <i>in vitro</i> .....	15
3.2.1 Ensayo de viabilidad celular.....	16
3.2.2 Evaluación funcional de la migración celular: ensayo de la herida.....	17
3.3 Ensayo <i>in vivo</i> .....	20
3.3.1 Animales de experimentación.....	21
3.3.2 Inducción de resistencia a la insulina.....	21
3.3.3 Generación y manejo de heridas.....	21
3.3.4 Evaluación de la evolución de las heridas.....	21
3.4 Análisis estadístico.....	22
4. Resultados.....	23
4.1 Control de esterilidad.....	23
4.2 Cuantificación de proteínas.....	23
4.3 Ensayos <i>in vitro</i> .....	23
4.3.1 Estandarización de las condiciones de experimentación.....	23
4.3.2 Evaluación de la viabilidad celular en presencia de hAM-pe.....	24
4.3.3 Evaluación funcional de la migración celular: ensayo de la herida.....	25
4.3.4 Evaluación de la migración celular en presencia de hAM-pe.....	26
4.3.5 Optimización de condiciones de alta glucosa para evaluar la migración celular.....	28
4.3.6 Evaluación de la viabilidad celular en presencia de glucosa.....	29
4.3.7 Evaluación del efecto de hAM-pe sobre de la migración celular en contexto de alta glucosa.....	30
4.4 Ensayo <i>in vivo</i> .....	32
4.4.1 Evaluación del cierre de heridas en ratas insulino resistente.....	32
5. Conclusiones y discusión.....	36

6. Bibliografia.....38

## **1. Introducción**

La piel representa el órgano más externo del cuerpo por lo que desempeña una variedad de funciones protectoras de los tejidos internos frente a agentes nocivos del entorno y cualquier daño en su estructura puede comprometer estas funciones. Ante una herida, se activan mecanismos biológicos orientados a su reparación. La reparación de heridas conlleva múltiples procesos que ocurren en cascada. Sin embargo, existen ciertos factores, como la diabetes, que pueden alterar estos procesos y dar lugar a la formación de heridas crónicas que no cicatrizan. Estas heridas representan una elevada carga económica para los sistemas de salud, además de tener un gran impacto negativo sobre la calidad de vida de los pacientes, aumentando el riesgo de complicaciones graves y muerte (Driver, 2010; Gagliardino, 2000; Gilligan, 2015).

### **1.1 Reparación de heridas cutáneas**

Una herida es una alteración en la integridad de la cobertura de la piel y de las estructuras subyacentes. Su reparación es un proceso complejo que tiene como objetivo restaurar dicha integridad. En heridas agudas, este proceso se desarrolla a través de una serie de eventos celulares organizados en etapas específicas que, aunque secuenciales, tienden a solaparse en el tiempo (Gurther, 2008; Ramírez Hernández, 2010).

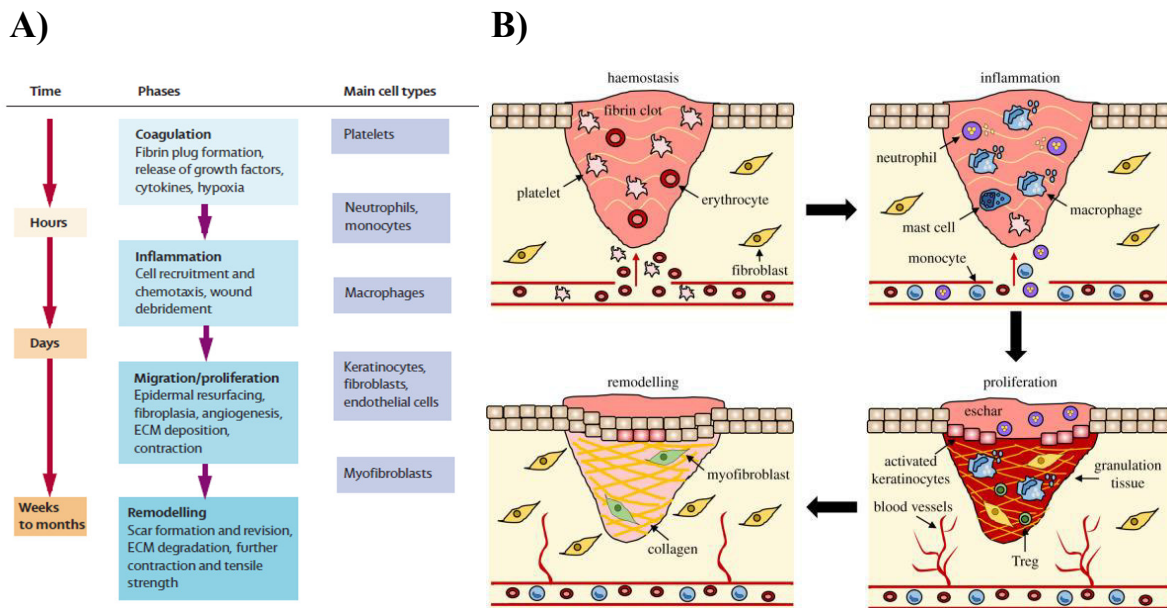
El proceso de reparación comienza con la hemostasia, que se activa inmediatamente después de una lesión. Tras el daño, los vasos sanguíneos se contraen, las plaquetas se activan al entrar en contacto con la matriz subendotelial expuesta y se forma un coágulo compuesto por fibrina, plaquetas y otras proteínas. Este coágulo no solo detiene el sangrado, sino que también actúa como una matriz inicial que favorece la migración de monocitos, fibroblastos y queratinocitos.

Una vez formado el coágulo, se inicia la fase inflamatoria, caracterizada por el reclutamiento de neutrófilos al sitio de la lesión. Éstos eliminan patógenos y tejido necrótico mediante la liberación de enzimas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y péptidos antimicrobianos. Posteriormente, monocitos llegan al área dañada y se diferencian a macrófagos con función fagocítica que orquestan la respuesta inflamatoria para la eliminación de residuos y bacterias, además de liberar citoquinas y factores de crecimiento que favorecen la transición hacia las fases subsiguientes.

A medida que la inflamación disminuye, el proceso entra en la fase proliferativa. En ésta se desarrollan varios procesos en simultáneo. Los fibroblastos proliferan y migran hacia el lecho de la herida, producen tejido de granulación mediante la síntesis de una nueva matriz extracelular (MEC) rica en fibronectina, ácido hialurónico, proteoglicanos y colágeno tipos I, III y VI. Esta matriz sirve como base para la migración celular y soporte tisular. Paralelamente, los fibroblastos se diferencian a miofibroblastos, que contribuyen a la retracción de la herida. Al mismo tiempo, la actividad de células endoteliales inician la angiogénesis, mientras que los queratinocitos proliferan y migran desde los bordes de la herida promoviendo la reepitelización, que es responsable del cierre propiamente dicho de la herida. Este proceso ocurre de manera simultánea y coordinada con la retracción de la herida impulsada por los miofibroblastos.

Finalmente, la fase de remodelación, tiene al fibroblasto como célula principal, encargada de la remodelación de la MEC. El proceso puede extenderse desde meses hasta años. Durante este período, el tejido de granulación experimenta una degradación progresiva y una transición estructural, marcada por el reemplazo del colágeno tipo III por colágeno tipo I, más estable y resistente. Este proceso se lleva a cabo mediante un delicado equilibrio entre la síntesis (de colágeno tipo I) y la lisis (de colágeno tipo III) mediada por metaloproteinasas de matriz (MMPs) y sus inhibidores (TIMPs). Ocurren otros cambios importantes, como la desaparición gradual de componentes como la fibronectina y el ácido hialurónico, la regresión de la neovasculatura, y la apoptosis de fibroblastos. Como resultado, el tejido de granulación se convierte en un tejido con menor densidad celular y vascular, pero rico en colágeno. Al finalizar el proceso de reparación, se restablece la función de barrera de la piel, aunque la resistencia tensil del tejido restaurado no alcanza las características de la piel no lesionada, recuperándose solo entre el 70 y el 80 % de su fuerza inicial. (Ramírez Hernández, 2010; Sorg, 2023).

Todos los procesos implicados en cada una de las etapas descritas se encuentran esquematizados en la Figura 1.



**Figura 1:** Fases de la cicatrización de heridas agudas y principales tipos de células involucradas obtenido de Falanga, 2005 (A) y de Wilkinson y Hardman, 2020 (B).

## 1.2 Heridas crónicas

El proceso de cicatrización puede alterarse debido a diversas condiciones patológicas o factores externos, dando lugar a lo que se conoce como heridas crónicas o complejas. Estas heridas, a diferencia de las agudas, no logran completar el proceso de reparación de manera eficiente dentro de un tiempo esperado, permaneciendo sin sanar por más de 12 semanas. Se caracterizan por su permanencia en una o más etapas del proceso de reparación, lo que impide la restauración funcional y estructural del tejido (Martin y Nunan, 2015). Entre las causas subyacentes más comunes se encuentran anomalías sistémicas como la diabetes mellitus, la insuficiencia venosa, la edad avanzada y factores locales como presión o fricción prolongadas (Wilkinson y Hardman, 2020).

Este proceso alterado se caracteriza por una prolongación de la fase inflamatoria, que genera un entorno hostil dominado por altos niveles de citocinas proinflamatorias, un incremento en la actividad de las MMPs y la destrucción de componentes de la MEC. A su vez, estos cambios se acompañan de una disminución en la actividad de factores de crecimiento y mediadores solubles esenciales para la reparación tisular (Keskin, 2021; Talbott, 2022). En consecuencia, ocurre el deterioro de funciones celulares claves, como la migración,

proliferación y síntesis de MEC retardando la formación de tejido de granulación y afectando negativamente la remodelación final del tejido (Xu, 2013).

### **1.3 Diabetes mellitus, resistencia a la insulina y cicatrización**

La diabetes mellitus es una de las principales causas de heridas crónicas, destacándose las úlceras del pie diabético (UPD) como un ejemplo representativo. Entre los factores macroscópicos que comprometen la cicatrización en personas con diabetes se encuentran la neuropatía periférica, la microangiopatía y la hipoxia tisular. Estas alteraciones dificultan el aporte de oxígeno y nutrientes al sitio de la herida. La hiperglucemia sostenida y sus consecuencias sistémicas afectan profundamente la capacidad de cicatrización, al alterar funciones celulares clave y el microentorno de la herida. Este microentorno, esencial para la reparación tisular, se caracteriza por un estado proinflamatorio sostenido, con la acumulación de productos finales de glicación avanzada (AGEs), incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y niveles elevados de MMPs. A nivel celular, se observan disfunciones que incluyen una capacidad limitada para migrar, proliferar y sintetizar componentes esenciales para la reparación tisular. Este deterioro, combinado con un desequilibrio en la actividad de las MMPs y sus TIMPs conduce a una degradación excesiva de la MEC resultando en una cicatrización anómala. Incluso si se restablece la normoglucemia, las células que estuvieron expuestas a una hiperglucemia prolongada pueden desarrollar una "memoria metabólica" que limita su capacidad para recuperar sus funciones normales. Por lo tanto, mejorar la cicatrización en la diabetes requiere abordar tanto las alteraciones sistémicas como las del microambiente y las funciones celulares en la herida (Rodrigues, 2019).

Además de la hiperglucemia, la resistencia a la insulina (RI) es la principal condición asociada a la diabetes tipo 2, pero también a otros trastornos como el síndrome metabólico o la prediabetes. En estos dos estados, aunque la glucemia basal sea normal, se produce un desequilibrio metabólico caracterizado por inflamación crónica del tejido adiposo y lipotoxicidad, condiciones que preceden y contribuyen al desarrollo de RI. El estado de inflamación crónica es de bajo grado (de poca magnitud pero constante) y resulta del exceso de tejido adiposo que produce citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6), mientras que la lipotoxicidad ocurre por la acumulación de lípidos en órganos no adiposos, como el hígado y los músculos. El exceso de lípidos activaría rutas intracelulares que interfiere con la señalización del receptor de insulina (Melmed, 2020). Juntas, estas alteraciones no solo

causan RI, sino que también generan un microambiente inflamatorio y metabólicamente desfavorable que podría afectar las etapas iniciales y avanzadas de la cicatrización. Por su parte, la RI es un desencadenante de reacciones de fase aguda mediadas por citocinas, asociadas a la diabetes tipo 2, y podría relacionarse con alteraciones en la respuesta inmune innata (Fernández-Real, 2012).

## **1.4 Úlcera del pie diabético**

La úlcera del pie diabético (UPD) es un tipo de herida dérmica crónica y una de las complicaciones a largo plazo más graves de la diabetes que afecta al 19-34% de los pacientes. Estas heridas generan una carga económica significativa para los sistemas de salud debido a los elevados costos asociados al tratamiento prolongado, las hospitalizaciones frecuentes y las intervenciones quirúrgicas. Si no se tratan y cicatrizan eficazmente pueden derivar en la amputación, que es el desenlace más grave debido al impacto devastador en la calidad y la expectativa de vida: aproximadamente el 70% de los pacientes amputados fallecen dentro de los 5 años posteriores. Este impacto económico y clínico, sumado al aumento en la prevalencia de diabetes, refleja la necesidad de nuevos tratamientos para los pacientes con alteración de la cicatrización, de manera de lograr la disminución del número de amputaciones, facilitar la sanación y reducir los costos asociados. (Alexiadou, 2012).

## **1.5 Tratamiento de heridas crónicas**

### **1.5.1 Tratamientos convencionales**

El manejo convencional de las heridas crónicas combina diversas terapias de difícil implementación por requerimientos de infraestructura, recursos humanos calificados y altos costos. Estas terapias incluyen:

Desbridamiento: elimina tejido necrótico y restos superficiales, favoreciendo la formación de tejido de granulación. Puede realizarse quirúrgica, enzimática, biológica o autolíticamente.

Control de la infección: se utilizan antimicrobianos para manejar infecciones que varían desde celulitis local hasta complicaciones severas como fascitis necrotizante u osteomielitis, aunque el tratamiento suele ser prolongado debido a infecciones recurrentes.

Descarga: reduce la presión sobre la lesión, especialmente en úlceras plantares diabéticas, mediante dispositivos externos que redistribuyen la carga.

Terapia de presión negativa: aplica presión subatmosférica intermitente o continua tras el desbridamiento. Mejora la perfusión, reduce el edema, elimina exudados y citocinas proinflamatorias, y promueve la formación de tejido de granulación.

Apósitos especializados: mantienen un ambiente húmedo, absorben exudados y protegen la herida de contaminantes externos.

Revascularización: restaura la circulación sanguínea en la lesión mediante cirugía (bypass arterial, reconstrucción arterial directa) o procedimientos endovasculares como la angioplastia y la colocación de endoprótesis (Alexiadou, 2012; Lavery, 2016).

### **1.5.2 Tratamiento alternativo con membrana amniótica humana (hAM)**

La membrana amniótica es la capa más interna de la placenta, que está en contacto con el feto y el líquido amniótico. Está compuesta por una capa epitelial, con su membrana basal rica en colágeno y laminina y, una capa estromal avascular de fibroblastos (Dadkhah, 2021).

La hAM posee una serie de características que la hacen única y apropiada para la cicatrización de heridas: provee una matriz para la migración celular y su proliferación (Cornwell, 2009), facilita la reepitelización (Kim, 2000), reduce el tejido cicatricial (Tseng, 2004), tiene propiedades antibacterianas (King, 2007), presenta escasa inmunogenicidad (Akle, 1981), reduce la inflamación y el dolor (Hao, 2000; Morkin, 2018).

Está descrito el uso de la hAM para acelerar la curación de heridas crónicas (Litwiniuk, 2014; Tehrani, 2021). Ésta se aplica a través de una presentación criopreservada, lo que requiere almacenamiento y transporte a -80 °C y procedimientos quirúrgicos, dificultando su aplicación óptima y la transferencia continua de los componentes celulares y factores biológicos al lecho de la herida.

A pesar de las distintas opciones, el tratamiento de heridas crónicas, principalmente las UPD, enfrenta importantes desafíos. Estas lesiones no solo afectan a un gran número de pacientes, sino que también presentan una alta resistencia a los tratamientos convencionales, lo que limita su efectividad en muchos casos (Mustoe, 2006; Cavallo, 2024). Aunque estas terapias pueden ser útiles y necesarias para prevenir complicaciones mayores, la necesidad de

infraestructura especializada, personal sanitario calificado y sus costos elevados dificultan su implementación.

Por otro lado, el uso de la hAM como terapia alternativa ha demostrado ser efectiva en el tratamiento de las UPD, en comparación con los tratamientos estándar (Kraus, 2017). Sin embargo, su implementación también está limitada por requisitos logísticos y altos costos asociados.

### **1.5.3 Tratamiento con derivados de membrana amniótica humana**

Los derivados de membrana amniótica humana surgen como una estrategia innovadora para el tratamiento de heridas crónicas, ya que no solo conservan las propiedades terapéuticas de la hAM, sino que también superan las limitaciones logísticas y económicas tanto de las opciones convencionales como de la hAM criopreservada. Esta estrategia se basa en la liofilización, un proceso que permite obtener derivados como apósitos (hAM-pe: membrana amniótica homogeneizada, liofilizada y esterilizada) y parches (hAM-L: membrana amniótica liofilizada y esterilizada), que se pueden producir tanto a partir de la hAM completa como de sus distintas áreas. Aunque este método elimina los componentes celulares, los derivados conservan una variedad de factores biológicos que son esenciales para su actividad terapéutica.

hAM-pe en particular, representa una solución práctica y eficaz para el tratamiento de heridas crónicas, ya que pueden aplicarse cada 48-72 horas, proporcionando una transferencia continua de factores biológicos al lecho de la herida. Además, su manejo es mucho más sencillo, permitiendo su uso en un consultorio médico sin necesidad de procedimientos quirúrgicos, e incluso posibilitando que los mismos pacientes puedan aplicarlos en sus hogares (Carro, 2024).

Actualmente, estos derivados están siendo evaluados en un estudio traslacional cuyos resultados preliminares, aunque aún no publicados, sugieren un cierre más rápido de las heridas en comparación con el tratamiento convencional. Los apósitos de hAM han demostrado ser una opción terapéutica segura y eficaz para promover la reparación de tejidos blandos, ofreciendo una alternativa viable y accesible para la resolución de heridas complejas.

## **2. Objetivos**

### **General**

Abordar estrategias experimentales *in vitro* e *in vivo* que permitan conocer el proceso dinámico de cicatrización de heridas bajo el efecto de apósitos de hAM.

Para esto se buscará adquirir conocimiento y experiencia en el diseño y desarrollo de estrategias experimentales en el área de la biomedicina, en el manejo de cultivos de líneas celulares eucariotas. Para, finalmente, discutir a partir de los resultados obtenidos de diferentes estrategias experimentales en pos de la construcción de marcos conceptuales en el tema abordado.

### **Específicos**

1. Evaluar *in vitro* la migración celular de fibroblastos (HT1080) en condiciones de alta glucosa en presencia o ausencia hAM-pe.
2. Evaluar el cierre de la herida dérmica en ratas con insulino resistencia.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Derivados de membrana amniótica humana: Apósitos

Para la realización de este trabajo se utilizó el derivado de membrana amniótica humana (hAM) que denominamos “apósito” de membrana amniótica humana, hAM-pe. La hAM se obtiene de placentas humanas bajo consentimiento informado de la donante, siguiendo los procedimientos y técnicas conforme a lo establecido en la Resolución N°187/01. Los apósitos fueron elaborados y provistos por el Banco de Tejidos de Membrana Amniótica de la Asociación Civil para el Progreso de la Tecnología Médica de Tejidos (AMNIOS BMA) y para este trabajo se utilizaron dos apósitos (lote 3457070324, disco 2 y disco 3). Éstos se encuentran liofilizados y esterilizados por radiación gamma.



**Figura 2.** Foto ilustrativa de los apósitos de membrana amniótica humana, hAM-pe, obtenidos en el AMNIOS BMA.

##### 3.1.1 Obtención de la fase soluble de hAM-pe para ensayos *in vitro*

Los discos fueron pesados y rehidratados utilizando 1 ml de DMEM por cada 50 mg de masa en baño frío para minimizar el calentamiento durante la homogeneización que se realizó utilizando un homogeneizador tisular de émbolo. Luego, se llevaron a cabo tres extracciones consecutivas por centrifugación, agregando sobre el pellet la mitad del volumen inicial de

DMEM para la segunda extracción y, la mitad del volumen utilizado en la segunda, para la tercera extracción. Los sobrenadantes de todas las extracciones se combinaron en un único pool, al cual se le realizó un control de esterilidad, seguido de la cuantificación de proteínas totales mediante el método BCA. Finalmente, el pool se dividió en alícuotas y se almacenaron en tubos Eppendorf a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.

### **3.1.2. Control de esterilidad**

Se inoculó 100  $\mu\text{l}$  del pool de extracto en caldo nutritivo. Paralelamente, se utilizó un tubo con medio de cultivo estéril como control negativo. Ambos tubos se incubaron a  $36^{\circ}\text{C}$  durante 72 hs.

### **3.1.3 Cuantificación de proteínas**

Para la cuantificación de proteínas totales se aplicó el método BCA (ácido bicinonínico) utilizando el kit comercial BCA Pierce™ (Thermo Scientific™). En microplaca de 96 pocillos, se construyó una curva patrón, por duplicado, con albúmina de suero bovino de 2 mg/ml, realizando diluciones seriadas al medio con agua destilada para obtener los puntos de concentración: 2000  $\mu\text{g/ml}$ , 1000  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$ , 125  $\mu\text{g/ml}$ , 62,5  $\mu\text{g/ml}$  y 31,25  $\mu\text{g/ml}$ , más blanco y Reactivo de Trabajo (mezcla 50:1 de Reactivo A: buffer carbonato, BCA, pH:11 + Reactivo B: sulfato de cobre 4%). Para determinar la concentración de proteínas en la fase soluble de hAM-pe se realizó una dilución 1/5, por duplicado. Se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos y se midió la absorbancia (Abs) a 595 nm en lector de placas (BIO-RAD iMark™ Microplate Absorbance Reader). Se midió la Abs a 595 nm de los patrones (corregida por el blanco) en función de su concentración y se obtuvo, por regresión lineal, la ecuación de la recta. Se usó la ecuación para determinar la concentración de proteínas totales en la muestra.

## **3.2 Ensayos *in vitro***

### **Células utilizadas**

Se utilizó para los ensayos un stock criopreservado de fibroblastos humanos HT1080 (ATCC CCL-121<sup>TM</sup>), línea celular proveniente del tejido conectivo de un paciente con fibrosarcoma, disponible en el Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP, CONICET-UNLP).

### **Condiciones de cultivo y mantenimiento**

Las células fueron descongeladas y cultivadas en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; catálogo # 1210046, Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) (Internegocios) inactivado con calor y mantenidas en estufa a 37°C, en una atmósfera húmeda conteniendo 5% de dióxido de carbono (37°C y 5% CO<sub>2</sub>). Inicialmente, se cultivaron en botellas T25, luego se transfirieron a botellas T75 para su expansión. Las células se repicaron de rutina por desprendimiento con TrypLE<sup>TM</sup> (Gibco) seguido del resembrado en botellas T75 en las condiciones mencionadas anteriormente, para su mantenimiento.

Las células se sembraron en placas de 24 y 96 fosas, dependiendo del tipo de ensayo a realizar. Antes de cada ensayo, se realizó la estandarización para determinar el número de células por fosa requerido para lograr una confluencia del 80-90% tras 24 hs de incubación, en DMEM 10% SFB a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Todos los procedimientos implicados con cultivo celular se realizaron bajo condiciones de esterilidad en cabina de seguridad biológica clase II, con materiales y reactivos previamente esterilizados por autoclave o por filtración y utilizando elementos de protección personal<sup>1</sup>.

### **Condiciones experimentales ensayadas sobre el cultivo celular de fibroblastos HT1080 .**

- hAM-pe: se prepararon alícuotas en DMEM 2% SFB, con distintas concentraciones de proteínas totales (PT) a partir del pool de extracto soluble obtenido de los apósitos de hAM. Las mismas fueron agregadas directamente al cultivo celular. Las concentraciones evaluadas fueron desde 50 a 400 µg/ml (concentraciones finales en cultivo). El DMEM 2% SFB se utilizó como control de células sin tratar.

---

<sup>1</sup> El manejo de cultivos celulares y la aplicación de procedimientos de esterilidad fueron realizados conforme a lo aprendido en el curso de “Prácticas de Cultivo Celular e Introducción a la Citometría de Flujo”, dictado por Profesionales de Apoyo del Servicio de Cultivo Celular y Servicio de Citometría de Flujo del IIFP (Diciembre 2023).

- Alta glucosa: a fin de generar condiciones de alta glucosa y evaluar distintos efectos celulares se prepararon alícuotas con diferentes concentraciones de glucosa en DMEM 2% SFB que fueron agregadas directamente al cultivo celular. Se definió como "condición de alta glucosa" aquella en la que la concentración de glucosa en el medio de cultivo excede los 25 mM, que corresponde a la concentración presente en el DMEM. Para ello, se utilizó una solución stock de glucosa 250 mM que se preparó disolviendo D-Glucosa sólida en DMEM. Posteriormente, la solución fue esterilizada utilizando un filtro de 0,22 µm de diámetro de poro (MS® sterile syringe filters). Las concentraciones deseadas, se lograron agregando volúmenes específicos del stock al medio de cultivo suplementado con 2% SFB. Las concentraciones evaluadas en este trabajo fueron desde 32 a 250 mM (concentraciones finales en cultivo). El DMEM 2% SFB, sin agregado, se utilizó como control de células sin tratar.

### 3.2.1 Ensayo de viabilidad celular

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre la viabilidad celular, se realizó el ensayo del MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT]. Éste se basa en la reducción del MTT, un reactivo soluble en agua y de color amarillo, a sales de formazán, que forman cristales insolubles de color violeta dentro de las células. Esta reacción es catalizada, principalmente, por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, cuya actividad depende de la funcionalidad mitocondrial de células viables. La actividad metabólica (proporcional a la formación de formazán), en este ensayo se utiliza como indicador de la viabilidad celular.

Los fibroblastos HT1080 cultivados en placas de 96 fosas (p96) a una densidad aproximada de  $1,7 \times 10^4$  células/fosa fueron estimulados con 100 µl de los siguientes tratamientos, por quintuplicado, durante 20 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> :

Tratamiento	Concentración (µg/ml)
hAM-pe	50, 100, 200 y 400
DMEM 2% SFB (CC)	0

**Tabla 1:** Condiciones de tratamiento para la evaluación del efecto de hAM-pe sobre la viabilidad celular por ensayo del MTT. CC: control, cultivo de células sin hAM-pe. Las

concentraciones corresponden a concentraciones finales de proteínas totales de hAM-pe en cultivo.

Tratamiento	Concentración (mM)
Alta Glucosa	32.0, 39.0, 53.1, 81.2, 137 y 250
DMEM 2% SFB (CC)	25

**Tabla 2:** Tratamientos correspondientes para la evaluación del efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la viabilidad celular por ensayo del MTT. CC: control, cultivo de células sin glucosa adicional (25 mM de glucosa presente en el DMEM). Las concentraciones corresponden a concentraciones finales de glucosa en cultivo.

Pasado el tiempo de incubación, se añadió a cada fosa 12,5 µl de solución de MTT (4 mg/ml), se incubó durante 3 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se descartaron los sobrenadantes y se disolvieron los cristales generados con el agregado de 100 µl de etanol 70%. Por último, se midió la absorbancia en lector de placas a 595 nm. La viabilidad se calculó como un porcentaje de la absorbancia promedio respecto de la condición no tratada (CC), que se consideró como 100% de viabilidad, utilizando la siguiente fórmula:

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

### 3.2.2 Evaluación funcional de la migración celular: ensayo de la herida

Para evaluar la migración celular se realizó el ensayo de la herida (Martinotti y Ranzato, 2020). Éste se basa en observar en el tiempo el cambio que se produce en una monocapa de células confluyente, a la que se le ha generado una discontinuidad para simular una herida. Es decir, se basa en la observación temporal del cierre de esa herida, atribuido a un fenómeno migratorio.

Se efectuaron heridas sobre las monocapas de los fibroblastos HT1080 cultivados en placas de 24 fosas (p24) a una densidad aproximada de 10<sup>5</sup> células/fosa, con la punta de un tip estéril de 10 µl a tiempo inicial del experimento (heridas identificadas como herida final H<sub>f</sub>). Seguido, se retiró el sobrenadante y se lavó con PBS para eliminar los detritos celulares. Se

agregaron 500 µl de los siguientes tratamientos, por triplicado, preparados en DMEM 2% SFB y se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> por 20 hs máximo<sup>2</sup>:

Tratamiento	Concentración (µg/ml)
hAM-pe	100, 200 y 400
DMEM 2% SFB (CC)	0

**Tabla 3:** Tratamientos correspondientes para la evaluación del efecto de hAM-pe sobre la migración celular por ensayo de la herida *in vitro*. CC: control, cultivo de células sin hAM-pe. Las concentraciones corresponden a concentraciones finales de proteínas totales de hAM-pe en cultivo.

Tratamiento	Concentración (mM)
Alta Glucosa	35, 40, 50, 60 y 75
DMEM 2% SFB (CC)	25

**Tabla 4:** Tratamientos correspondientes para la optimización de las condiciones de alta glucosa en el ensayo de la herida *in vitro*. CC: control, cultivo de células sin glucosa adicional (25 mM de glucosa presente en el DMEM). Las concentraciones corresponden a concentraciones finales de glucosa en cultivo.

Tratamiento	[Glucosa]	[hAM-pe]
Alta Glucosa	60 mM	0
hAM-pe	25 mM	200 µg/ml
Alta Glucosa + hAM-pe	60 mM	200 µg/ml
DMEM 2% SFB (CC)	25 mM	0

**Tabla 5:** Tratamientos correspondientes para la evaluación del efecto de hAM-pe en contexto de alta glucosa por ensayo de la herida *in vitro*. CC: control, cultivo de células sin glucosa

<sup>2</sup> Condiciones consideradas para minimizar el efecto proliferativo: utilización de medio de cultivo con baja concentración de SFB y que el tiempo de incubación no supere el tiempo de duplicación de la línea celular utilizada (16-20 hs para fibroblastos HT1080).

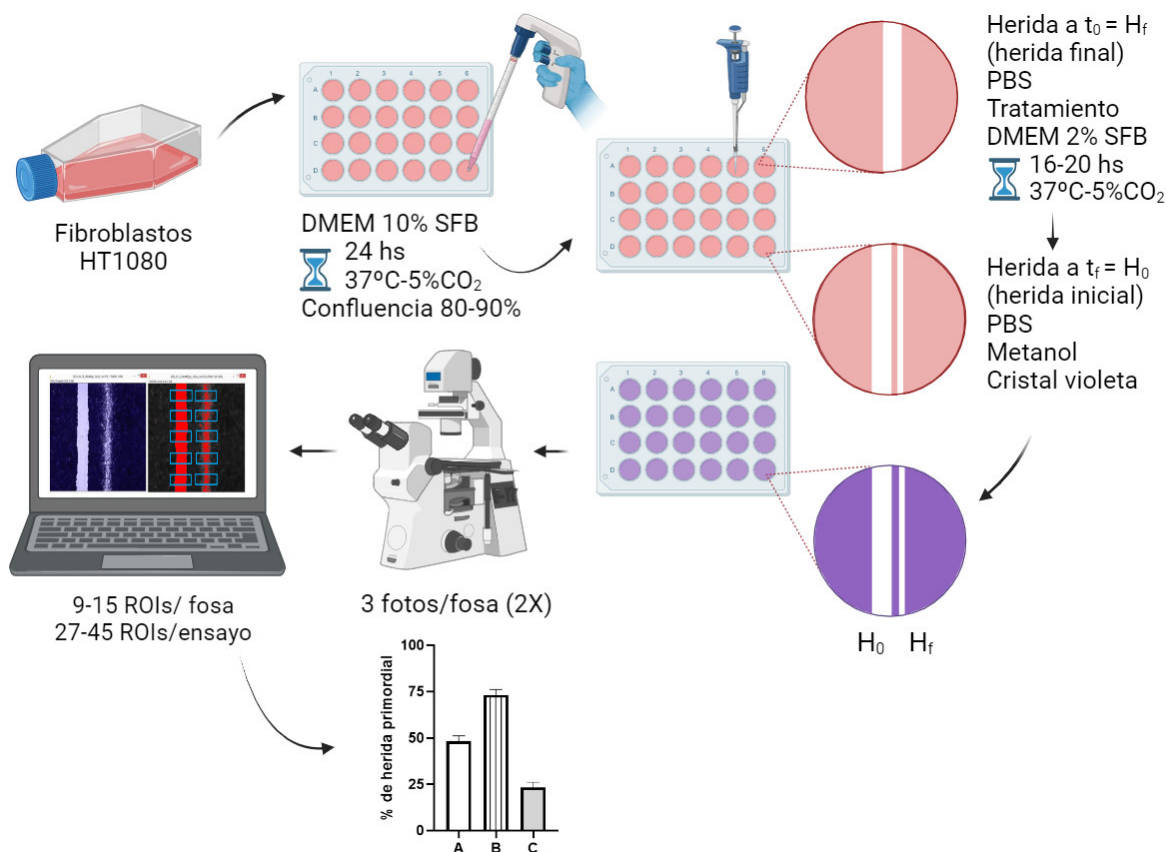
adicional (25 mM de glucosa presente en el DMEM) y sin hAM-pe. Las concentraciones corresponden a concentraciones finales en cultivo.

Transcurrido el período de incubación, a tiempo final del ensayo, se realizó en cada una de las fosas una segunda herida (heridas identificadas como herida inicial  $H_0$ ) paralela a la primera, con la finalidad de imitar a la herida  $H_f$  que se realizó a tiempo inicial. Se retiró el sobrenadante y se lavó con PBS. Las células se fijaron con metanol y se tiñeron con cristal violeta. Se tomaron 3 fotos de cada una de las fosas en microscopio invertido (EVOS®) con aumento 2X. Cada una de las imágenes se analizaron usando software ImageJ (versión 1.54 de Wayne Rasband and contributors National Institutes of Health, USA) seleccionando entre 3 y 5 regiones de interés (ROIs) representativas que delimiten el área de la herida.

Para el análisis del presente ensayo, consideramos el porcentaje de la herida primordial remanente, también referido como porcentaje de 'apertura', como un indicador de la migración celular. Se calculó el promedio de las ROIs de la  $H_0$  en todas las condiciones del ensayo y se consideró como representativo de la herida primordial. El promedio de las ROIs de la  $H_f$  en cada una de las condiciones de tratamiento fue representativo del área final de la herida. Para evaluar la migración celular de cada condición (x), se utilizó la siguiente fórmula, que relaciona los valores de las áreas de las heridas realizadas a tiempo inicial ( $H_f$ ) y a tiempo final ( $H_0$ ):

$$\% \text{ de herida primordial} = (H_{f,x}/H_0) \times 100$$

El valor obtenido representa el porcentaje del área inicial de la herida que permanece abierta después del período de evaluación.



**Figura 3.** Esquema de trabajo del ensayo de la herida.

### 3.3 Ensayo *in vivo*

La evaluación integral de los distintos procesos y etapas de la cicatrización analizando muestras humanas enfrenta diversas limitaciones, como la dificultad para obtener biopsias en número suficiente, la escasez de participantes en los ensayos clínicos, y el abandono frecuente de los tratamientos por parte de los pacientes. Estas restricciones resaltan la necesidad de validar resultados en modelos animales.

Por lo anterior, para establecer un marco de referencia para futuros ensayos utilizando apósitos de hAM se llevó a cabo un ensayo preliminar para explorar las condiciones necesarias a fin de establecer un modelo animal de cierre de la herida en presencia de una condición metabólica alterada.

### **3.3.1 Animales de experimentación**

Se utilizaron 6 ratas Sprague Dawley macho de 12 semanas de edad al inicio del experimento, divididas en dos grupos: 3 controles y 3 insulino resistentes, mantenidas en ciclos de luz/oscuridad de 12 hs, alojadas en grupos de a tres por jaula y alimentadas con una dieta comercial estándar y agua corriente ad libitum durante todo el experimento.

### **3.3.2 Inducción de resistencia a la insulina**

La condición de resistencia a la insulina fue inducida mediante una dieta rica en fructosa. Ratas Sprague Dawley macho adultas (9 semanas) recibieron dieta comercial estándar con adición de 10% de fructosa (p/v) en el agua de bebida ad libitum, durante un período de tres semanas previas al inicio del experimento.

Este modelo ampliamente utilizado (Di Sarli Gutiérrez, 2024) fue facilitado por el Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA UNLP/CONICET).

### **3.3.3 Generación y manejo de heridas**

Se realizaron 2 heridas con punch de biopsia de 6 mm de diámetro en la piel dorsal rasurada de las ratas, bajo anestesia inhalatoria con Isoflurano (5% en cámara para inducción y 2-2.5% para mantenimiento). Finalizada la intervención se aplicó tratamiento analgésico inyectable (Buprenorfina 0.3 mg/ml cada 12 hs) y Lidocaína tópica, seguido de la colocación de un cobertor dérmico adhesivo de film impermeable sobre las heridas reforzado con 4 puntos de sutura. Los grupos se mantuvieron bajo observación hasta su recuperación completa, realizando una cura húmeda de las heridas cada 48/72hs.

### **3.3.4 Evaluación de la evolución de las heridas**

La evaluación del procedimiento se realizó comparando el área de las heridas a lo largo del tiempo experimental. Para ello, se realizó el seguimiento de las mismas mediante un registro fotográfico. Las imágenes se capturaron el día de la cirugía (día 0) y post cirugía los días 3, 7, 9 y 11 con una regla de referencia para calcular el área. Las áreas se midieron con el software ImageJ. Con los datos se calculó el porcentaje de cierre de la herida con la siguiente fórmula:

% de cierre al  $D_n = [(área de la herida D_0 - área de la herida D_n) / área de la herida D_0] \times 100$

Siendo:

$D_0$  : área inicial, área de la herida registrada inmediatamente después de la cirugía

$D_n$  : área de la herida registrada n días después de la cirugía.

La generación y el seguimiento de la evolución de las heridas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Trasplante de Órganos de la Facultad de Medicina UNLP y el protocolo desarrollado en el presente trabajo cuenta con la aprobación de la CICUAL de la Facultad de Ciencias Exactas UNLP (N° de referencia 003-00-23).

### **3.4 Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. La significancia estadística se evaluó mediante la prueba t de Student o ANOVA seguido de un post test de comparación múltiple, considerando significativo un valor  $p < 0,05$ . Todos los análisis y gráficos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism, versión 8.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego USA)

## 4. Resultados

### 4.1 Control de esterilidad

El extracto soluble de los apósitos de hAM obtenido por rehidratación y centrifugación, se evaluó para determinar la presencia de contaminación microbiana mediante un ensayo en caldo nutritivo. Después de 72 horas de incubación a 36°C, no se observó turbidez.

### 4.2 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas totales se realizó por el método BCA. A partir de la curva de calibración construida con albúmina de suero bovino, se obtuvo la ecuación de la recta por regresión lineal ( $y = 0.0004x + 0.0237$ ,  $R^2 = 0.9828$ ). Aplicando esta ecuación a la absorbancia promedio medida en la muestra de hAM-pe, se determinó que la concentración de proteínas totales en el extracto soluble fue de 6.754 mg/ml (Tabla 6).

Absorbancia 1	0,5405
Absorbancia 2	0,5875
Promedio de absorbancias	0,5640
Concentración [mg/ml]	6,754

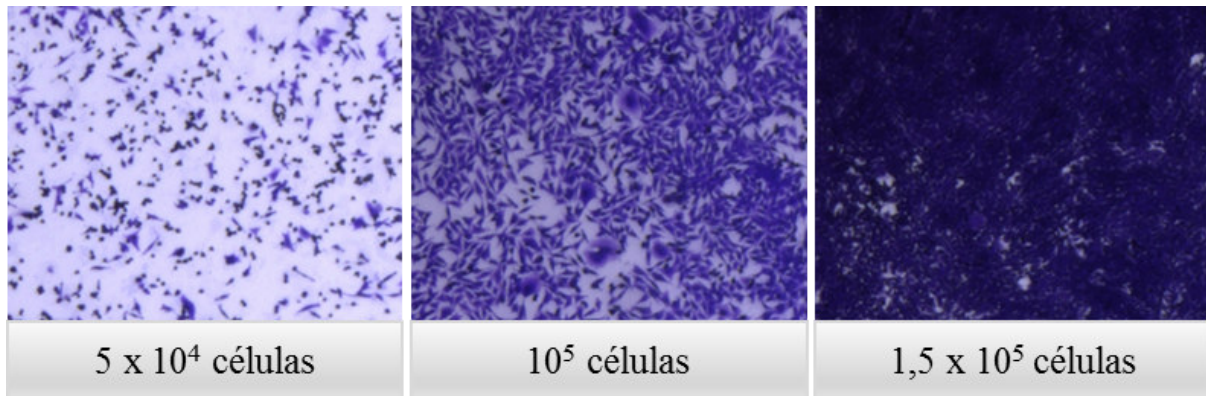
**Tabla 6:** Concentración de proteínas totales en el pool extracto soluble de hAM-pe.

### 4.3 Ensayos *in vitro*

#### 4.3.1 Estandarización de las condiciones de experimentación

En primer lugar, se determinó la densidad celular, es decir, el número de células por pocillo requerido para lograr tras 24 hs incubación una confluencia óptima. Una confluencia así definida para los ensayos en este trabajo, es aquella en la que el porcentaje de cobertura de la superficie del pocillo oscile entre un 80 y 90% de manera que quede espacio disponible para que puedan ser ocupados porque aquellas células que se encuentren en replicación y evitar el

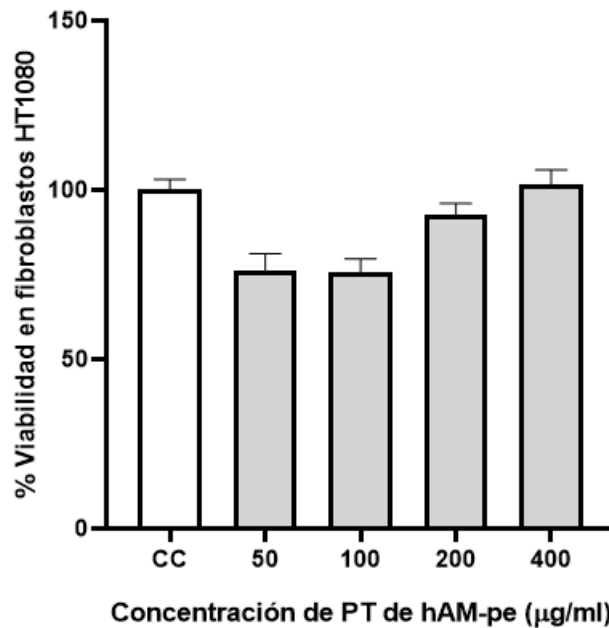
riesgo de desprendimiento de la monocapa durante el período de evaluación de los distintos tratamientos. Para los ensayos de viabilidad se usaron placas p96 y para los de migración, p24. Se sembraron diferentes números de células y se incubaron durante 24 hs, en DMEM 10% SFB a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Como se puede observar en la figura 5, la confluencia deseada en placas p24 se logra con un inóculo de 10<sup>5</sup> células/fosa.



**Figura 5.** Determinación de la densidad celular. Fibroblastos HT1080 fueron sembrados en placas p24 en DMEM 10% SFB por 24 hs. Luego fueron fijadas con metanol y teñidas con cristal violeta.

#### **4.3.2 Evaluación de la viabilidad celular en presencia de hAM-pe**

Previo a la evaluación de los efectos de hAM-pe sobre la migración de fibroblastos era importante determinar si por sí misma presentaba algún efecto citotóxico sobre este tipo celular. Para ello, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT. Los cultivos de fibroblastos HT1080 fueron tratados con hAM-pe a las concentraciones de proteínas totales indicadas en la Tabla 1 (Materiales y métodos 3.2.1). Los resultados muestran que hAM-pe no alteró la viabilidad de los fibroblastos, por lo tanto no presenta citotoxicidad.



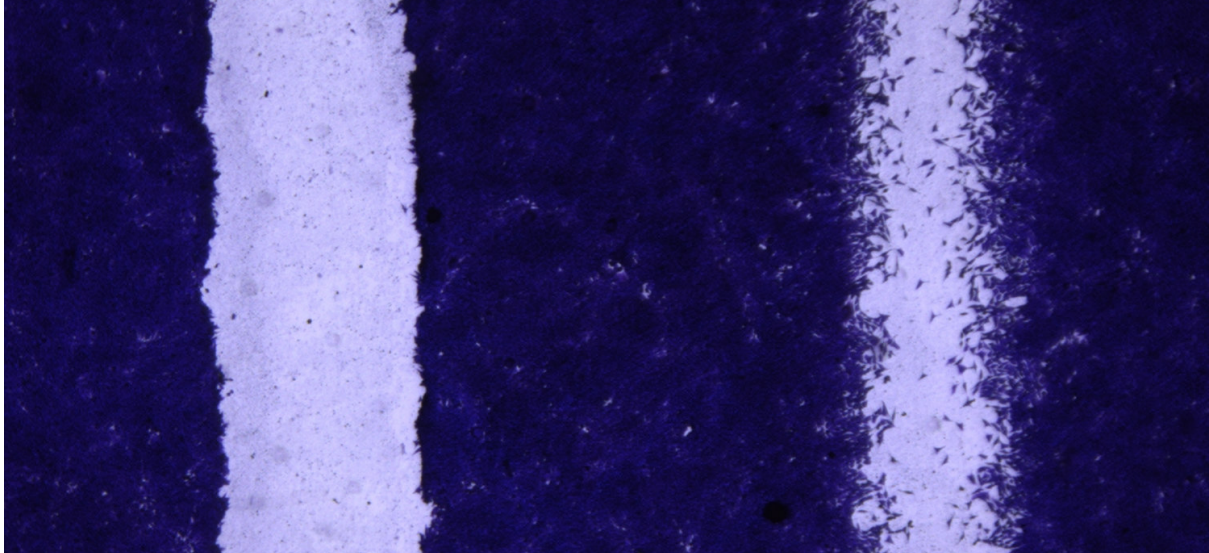
**Figura 6.** Viabilidad celular evaluada por ensayo del MTT en fibroblastos HT1080 tratados con diferentes concentraciones de proteínas totales (PT) de hAM-pe, durante 20 hs. Los valores se expresan como porcentaje respecto del control no tratado considerado como 100% de viabilidad. CC: control, cultivo de células sin tratar. No se observan diferencias significativas de los tratamientos frente al control. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de Dunnett.

#### 4.3.3 Evaluación funcional de la migración celular: ensayo de la herida

La reparación de heridas es un mecanismo por el cual diferentes tipos celulares se activan para reparar el sitio dañado mediante la síntesis de nuevo tejido. En la piel, una de las células encargadas de esta reparación son los fibroblastos. Por su capacidad de migración invaden la zona dañada para poder repararla.

Evaluamos el proceso de migración celular en la línea celular de fibroblastos HT1080 mediante ensayo de la herida. Se provocó un estímulo mecánico sobre las monocapas confluentes mediante la realización de una primera herida a tiempo inicial ( $H_t$ ) con la punta de un tip estéril de 10 µl, generando la ruptura tanto de las uniones intercelulares como de la unión a la superficie de la fosa. Las células fueron incubadas con baja concentración de suero (2%) como condición control, durante 20 hs. Luego, se realizó una segunda herida ( $H_0$ ) para imitar la herida generada a tiempo inicial. Las células se fijaron con metanol, se tiñeron con cristal violeta y se fotografiaron en microscopio invertido. Al comparar las áreas de las

heridas, notamos que, después de 20 hs de incubación ( $H_f$ ) el área libre de células se redujo. Esto indica que en condiciones controles las HT1080 activaron mecanismos de motilidad celular frente al estímulo mecánico para reparar la herida.



**Figura 7.** Fotomicrografía de monocapa fibroblastos HT1080 lesionada mecánicamente. Área de la herida inmediatamente después de la lesión o  $H_0$  (izquierda) y área de la herida después de 20 hs o  $H_f$  (derecha). Se observa la reducción del área de la herida por migración tras 20 hs de incubación post-herida.

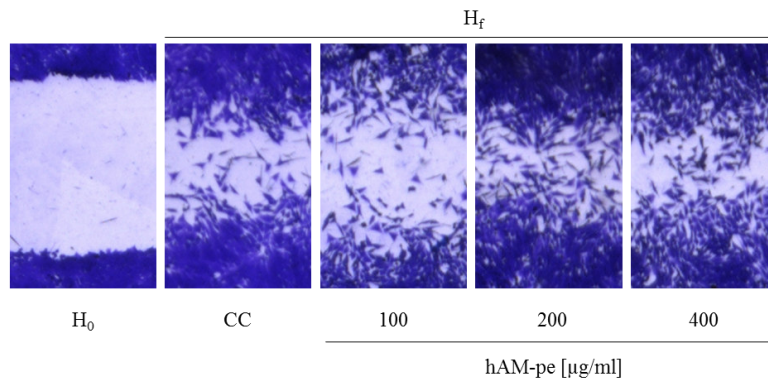
A continuación, se evaluó la migración celular en presencia de hAM-pe y se inició la evaluación de las condiciones experimentales en función de establecer microentornos de alta glucosa para, finalmente, evaluar el efecto de hAM-pe sobre la migración en esos microentornos.

#### **4.3.4 Evaluación de la migración celular en presencia de hAM-pe**

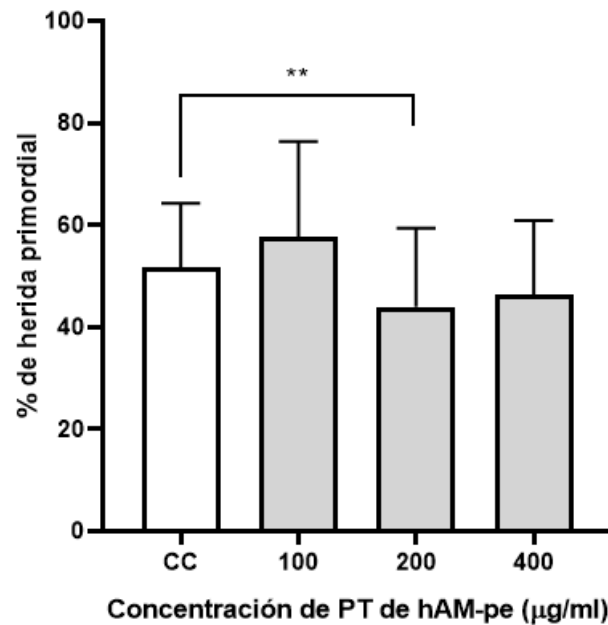
Efectuadas las heridas  $H_f$  sobre las monocapas celulares, los cultivos fueron tratados con hAM-pe a las concentraciones de proteínas totales indicadas en la Tabla 3 (Materiales y métodos 3.2.2). Al comparar las condiciones experimentales observamos que el ancho de la herida (área libre de células) se redujo en los cultivos tratados con las mayores concentraciones de hAM-pe. Sin embargo, sólo con el agregado de 200  $\mu\text{g/ml}$  las diferencias fueron significativas (Figura 8 B). Específicamente, en los cultivos control, el porcentaje de herida remanente fue del 51%, mientras que en los cultivos tratados con 200  $\mu\text{g/ml}$  de

hAM-pe se redujo al 44%. Esta reducción refleja un mayor desplazamiento de los fibroblastos hacia el área libre, acelerando el cierre de la herida. En base a estos resultados, se decidió utilizar una concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$  de hAM-pe para los siguientes experimentos.

**A**



**B**



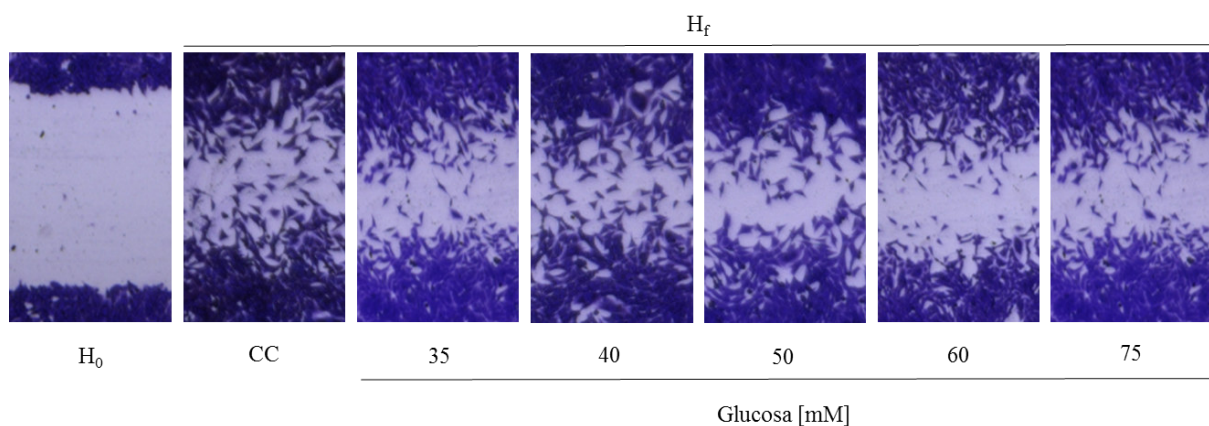
**Figura 8.** Fotomicrografías representativas (A) y cuantificación de la migración celular por ensayo de la herida en fibroblastos HT1080 tratados con diferentes concentraciones de proteínas totales (PT) de hAM-pe, durante 20 hs de incubación post-herida. Cuantificación de la migración representada como % de herida primordial =  $(H_f/H_0) \cdot 100$  (B).  $H_0$ : herida inicial.  $H_f$ : herida final. CC: control, cultivo de células sin tratar. La migración celular aumenta con el

agregado de 200  $\mu\text{g/ml}$  extracto de hAM-pe respecto de CC. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de Dunnett;  $**p < 0.01$ .

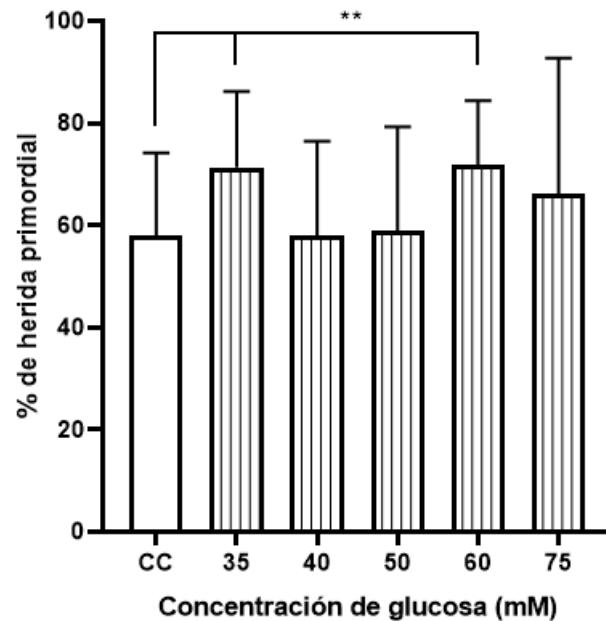
### 4.3.5 Optimización de condiciones de alta glucosa para evaluar la migración celular

La reparación de heridas es un proceso complejo que puede verse alterado por diversos factores, entre ellos, la hiperglucemia característica de la diabetes. Altos niveles de glucosa afectan diversas funciones y procesos celulares esenciales para el cierre de heridas, como la migración. En pos de recrear un microentorno adverso en condiciones de cultivo que simulara el impacto de la hiperglucemia, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de glucosa sobre el cierre de la herida. Los cultivos de fibroblastos HT1080 fueron tratados con diferentes concentraciones de glucosa en el rango de 35 a 75 mM, según se detalla en la Tabla 3 (Materiales y métodos 3.2.2). Este rango de concentraciones fue elegido debido a que afecta negativamente la migración de diferentes tipos celulares (Chen, 2022; Zhang, 2022). En este contexto, se observó que las concentraciones de 35 mM y 60 mM de glucosa redujeron significativamente la migración celular activada por daño mecánico. En los cultivos tratados con estas concentraciones, el porcentaje de herida primordial remanente fue del 71%, mientras que en el control (CC) se redujo al 56% (Figura 9 B).

A



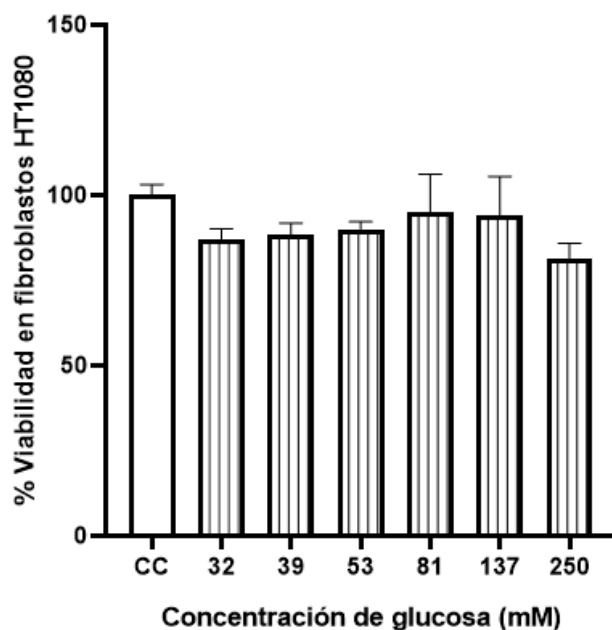
**B**



**Figura 9.** Fotomicrografías representativas (A) y cuantificación de la migración celular por ensayo de la herida en fibroblastos HT1080 tratados con diferentes concentraciones de glucosa, durante 20 hs de incubación post-herida. Cuantificación de la migración representada como % de herida primordial =  $(H_f/H_0) \cdot 100$  (B).  $H_0$ : herida inicial.  $H_f$ : herida final. CC: control, cultivo de células sin tratar. La migración celular se reduce a concentraciones 35 y 60 mM de glucosa respecto de CC. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de Dunnett;  $**p < 0.01$ .

#### **4.3.6 Evaluación de la viabilidad celular en presencia de glucosa**

Para descartar que el retraso en la migración observada en condiciones de alta glucosa (Figura 9 B) reflejara una pérdida de la viabilidad celular se evaluó dicho parámetro por ensayo del MTT. Los cultivos de fibroblastos HT1080 fueron estimulados, durante 20 hs, con glucosa a distintas concentraciones, según se describe en la Tabla 2 (Materiales y métodos 3.2.1). Los resultados muestran que el tratamiento de los cultivos de fibroblastos con glucosa no alteró la viabilidad celular (Figura 10).



**Figura 10.** Viabilidad celular evaluada por ensayo del MTT en fibroblastos HT1080 tratados con diferentes concentraciones de glucosa, durante 20 hs. Los valores se expresan como porcentaje respecto del control no tratado considerado como 100% de viabilidad. CC: control, cultivo de células sin tratar. No se observan diferencias significativas de los tratamientos frente al control. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de Dunnett.

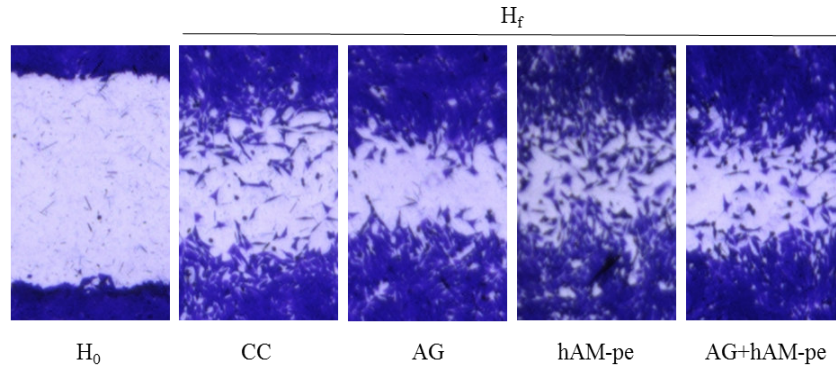
#### **4.3.7 Evaluación del efecto de hAM-pe sobre de la migración celular en contexto de alta glucosa**

Los cultivos de fibroblastos HT1080 fueron tratados con alta glucosa (AG), con alta glucosa en combinación con hAM-pe (AG+hAM-pe) o con DMEM 2% SFB (CC), según se describe en la Tabla 5 (Materiales y métodos 3.2.2). Los resultados muestran que el porcentaje de herida primordial remanente fue de 50% para CC, 44% para AG y 43% para AG+hAM-pe (Figura 11 B).

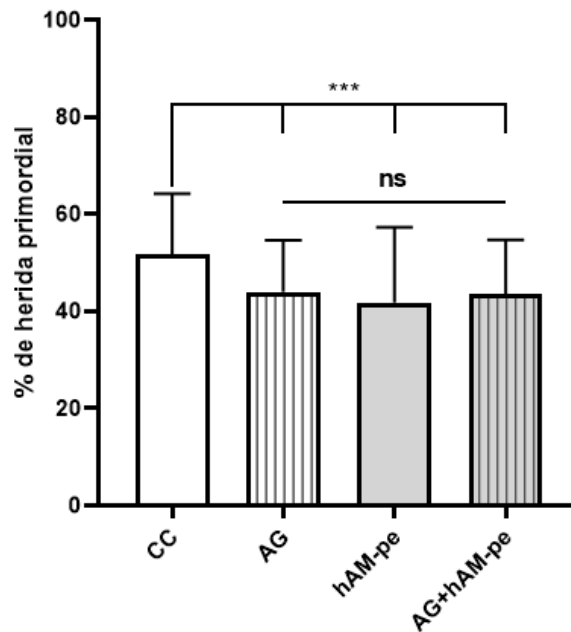
Estos resultados presentan ciertas discrepancias con los ensayos previos realizados en condiciones similares. Las células tratadas con AG presentaron un porcentaje de herida remanente menor que las células control (CC), lo que indica una mayor migración en dicha condición (44% en AG frente a 50% en CC). Al comparar directamente las condiciones AG y AG+hAM-pe, se observó que el agregado de hAM-pe no tuvo ningún efecto en la migración celular, ya que el porcentaje de herida remanente fue similar en ambas condiciones (44% y

43%, respectivamente). Esto indica que, bajo las condiciones evaluadas, hAM-pe no parece influir en la migración de fibroblastos en un entorno de alta glucosa.

**A**



**B**



**Figura 11.** Fotomicrografías representativas (A) y evaluación de la migración celular por ensayo de la herida en fibroblastos HT1080 tratados con alta glucosa (AG: 60 mM de glucosa) y alta glucosa en combinación con 200 µg/ml de hAM-pe (AG+hAM-pe), durante 20 hs de incubación post-herida. Cuantificación de la migración representada como % de herida primordial =  $(H_f/H_0) \cdot 100$  (B).  $H_0$ : herida inicial.  $H_f$ : herida final. CC: control, cultivo de células sin tratar. La migración celular aumenta tanto en presencia de alta glucosa como en

presencia de alta glucosa en combinación con 200 µg/ml de hAM-pe. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de Tukey. \*\*\* $p < 0.001$ . ns: no significativo.

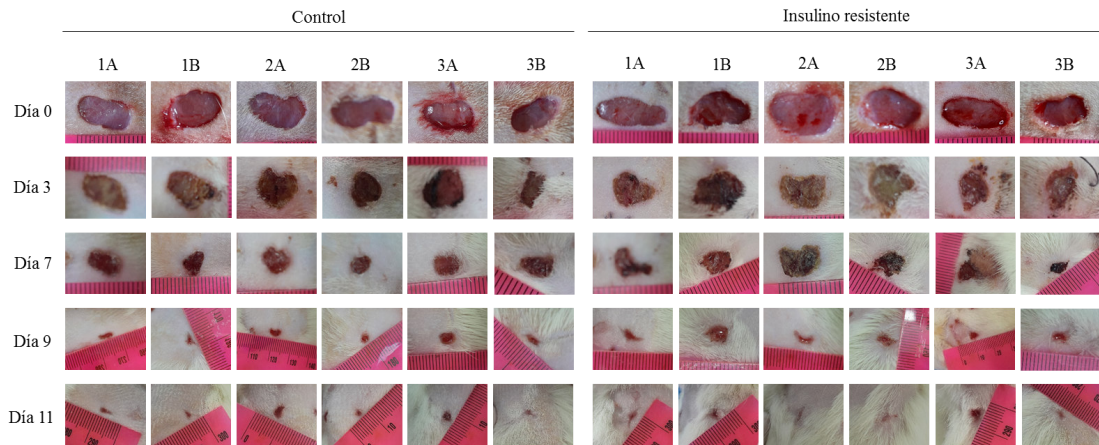
#### **4.4 Ensayo *in vivo***

Con el propósito de establecer modelos que permitan estudiar las etapas de la cicatrización, se realizó un ensayo en ratas insulino resistentes. En caso de observar diferencias en el cierre de la herida en estas condiciones, el uso de apósito de hAM en este modelo sería relevante para la caracterización y el estudio de sus efectos en la cicatrización.

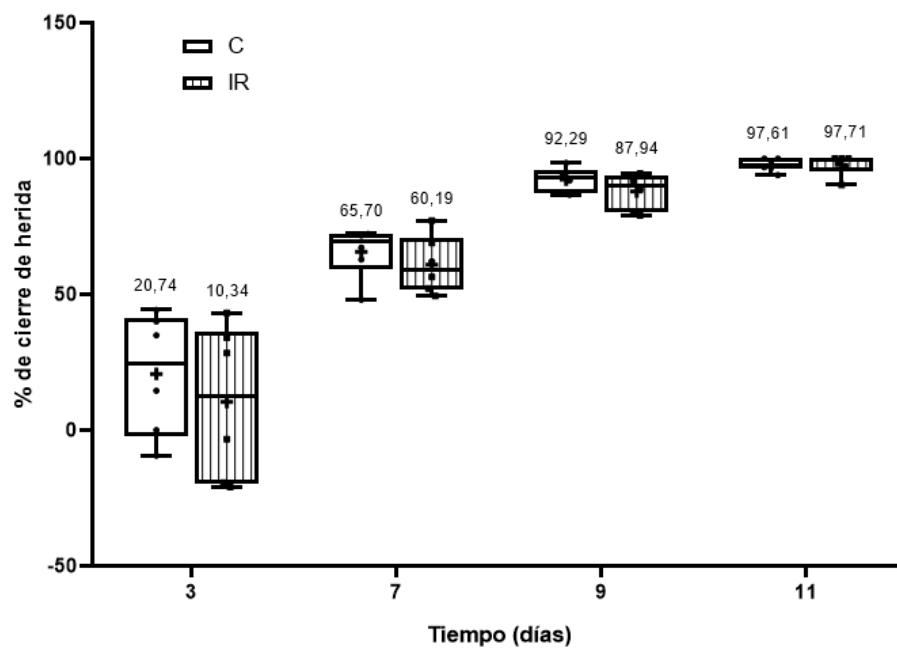
##### **4.4.1 Evaluación del cierre de heridas en ratas insulino resistente**

El cierre de heridas fue evaluado en un modelo animal de resistencia a la insulina (IR) comparado con un grupo control (C), utilizando ratas Sprague Dawley. El procedimiento experimental, detallado en la sección de Materiales y Métodos 3.3, incluyó la realización de dos heridas por animal, un seguimiento fotográfico y análisis del cierre de las heridas a través de parámetros como el porcentaje, el tiempo y la velocidad de cierre.

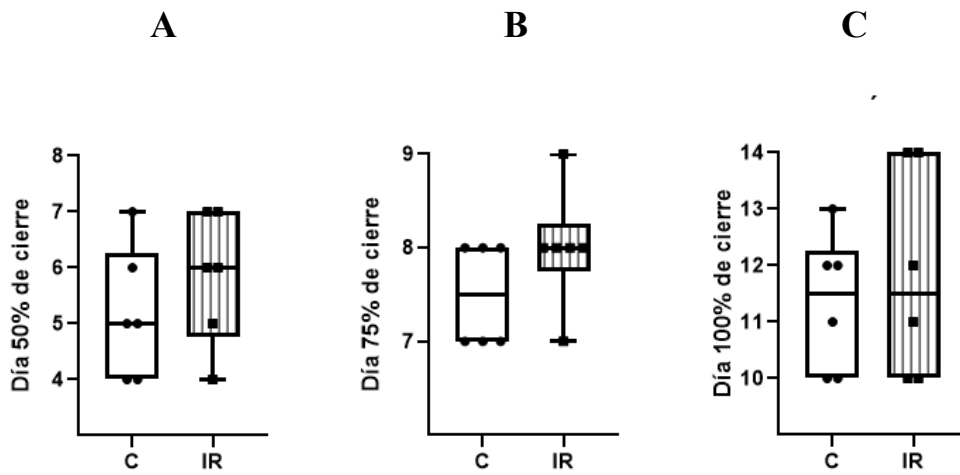
De la comparación del aspecto macroscópico de las heridas se observó una diferencia entre los grupos, puntualmente en el día 7: el grupo C presentó heridas semejantes entre sí en cuanto a forma y coloración mientras que las del grupo IR se mostraron más heterogéneas y con más presencia de costra (Figura 12). Al analizar la tasa de cierre, el grupo IR mostró un menor porcentaje de cierre del área de la herida en promedio respecto del grupo C en los días 3 (10,34% vs 20,74%), 7 (60,19% vs 65,19%) y 9 (87,84% vs 92,29%), igualándose ambos grupos en el día 11 (Figura 13). De la evaluación del tiempo de cierre se destaca la distribución de los datos en el día de cierre del 50% de la herida: se observó que 4 de 6 heridas del grupo control se redujeron al 50% antes del sexto día mientras que 4 de 6 heridas del grupo IR lo hicieron partir del día 6 (Figura 14 A). Por último, al evaluar la velocidad media de cierre se observó que el grupo IR presentó una menor velocidad durante el cierre del 50% de la herida, 8,33% por día, mientras que el grupo control presentó una velocidad del 10% por día en este mismo período (Figura 15). Pudo observarse para ambos grupos que la etapa de mayor velocidad fue durante el cierre del 50% de la herida, disminuyó durante el cierre del 50% al 75% y del 75% al cierre completo, resultando esta última la etapa más lenta.



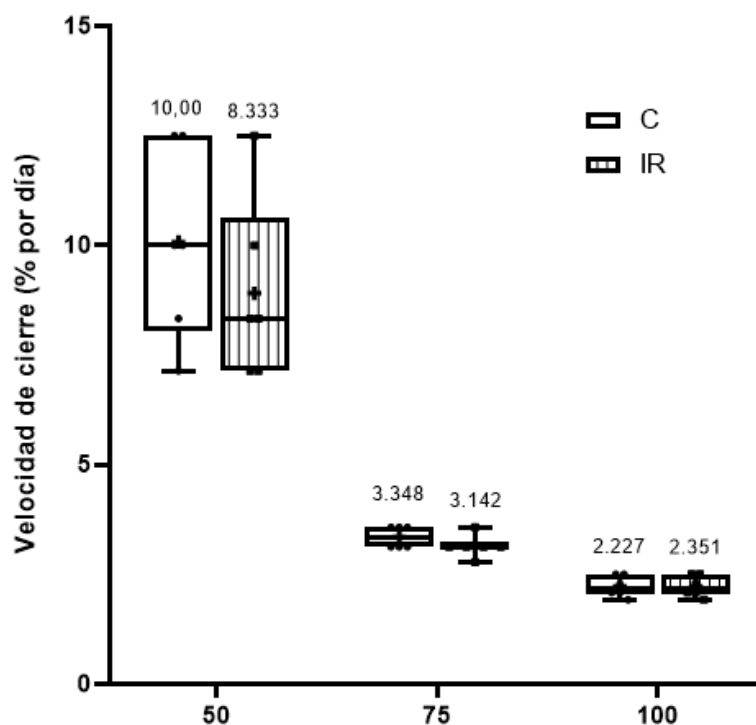
**Figura 12:** Registro fotográfico de las heridas en los días 0, 3, 7, 9 y 11 de dos zonas (A y B) en tres animales diferentes para cada condición: control e insulino resistente.



**Figura 13.** Porcentaje de cierre de herida en el tiempo evaluado en ratas insulino resistentes (IR) vs ratas control (C). Los datos se representan como diagramas de caja y bigotes, mostrando la distribución de los valores individuales (n=6), con la media indicada numéricamente sobre cada grupo. Se realizó un ANOVA de dos vías seguido de Holm-Sidak.



**Figura 14.** Tiempo (en días) de cierre de la herida evaluado en ratas insulino resistentes (IR) vs ratas control (C). Día de cierre del 50% (A), 75% (B) y 100% (C). Los diagramas de caja y bigotes muestran la distribución de los datos en cada grupo (n=6). Se realizó un t-Student para muestras independientes con varianzas homogéneas.



**Figura 15.** Velocidad de cierre evaluada en ratas insulino resistentes (IR) vs ratas control (C). Velocidad para lograr el 50% de cierre de herida (50), para pasar del 50 al 75% (75) y para avanzar del 75% hasta el cierre completo (100), expresada como porcentaje de cierre por día.

Los datos se representan como diagramas de caja y bigotes, mostrando la distribución de los valores individuales ( $n=6$ ), con la media indicada numéricamente sobre cada grupo. Se realizó un ANOVA de dos vías seguido de Holm-Sidak.

## 5. Conclusiones y discusión

En este trabajo abordamos el estudio de mecanismos claves involucrados en la reparación tisular mediante el desarrollo y ajuste de modelos *in vitro* e *in vivo*.

En particular, se evaluó el efecto del extracto soluble de apósitos membrana amniótica humana (hAM-pe) sobre la migración de fibroblastos HT1080 en condiciones de alta glucosa, un contexto relevante para estudiar la reparación de heridas en diabetes. Los resultados mostraron que hAM-pe no presentó efectos citotóxicos sobre los fibroblastos, ya que no alteró su viabilidad en un rango de concentraciones de 50 a 400  $\mu\text{g/ml}$ . En condiciones normales, hAM-pe favoreció la migración de los fibroblastos, reduciendo significativamente el área de la herida en concentraciones de 200  $\mu\text{g/ml}$ . Contrariamente a lo esperado, en condiciones de alta glucosa (60 mM) no se observó una inhibición de la migración celular; en cambio, se registró un aumento de la misma, lo que difiere de los resultados obtenidos previamente en el ensayo de optimización. Con este resultado, la evaluación de hAM-pe en condiciones de alta glucosa se vió limitada. Las diferencias entre los resultados obtenidos sobre la migración celular con 60 mM de glucosa entre ambos experimentos podría estar relacionada con el tiempo de expansión celular previo al ensayo de migración. En el ensayo final, donde se evaluó el efecto de hAM-pe en contexto de alta glucosa, se utilizó un criotubo nuevo de células, y éstas requirieron casi dos semanas de expansión para alcanzar la densidad necesaria, mientras que en los ensayos previos este tiempo fue menor (una semana). Por otra parte, aunque la literatura consultada para el desarrollo de este trabajo describe que altas concentraciones de glucosa inhibe la migración en ciertos tipos celulares, otros estudios han reportado que, en condiciones específicas, la glucosa puede favorecerla. Por ejemplo, se ha observado que diferentes tipos de células epiteliales responden de manera distinta a concentraciones elevadas de glucosa, con variaciones en la migración entre líneas celulares primarias e inmortalizadas (Urusky, 2021). Nuestros resultados sugieren que la generación de un contexto de altas concentraciones de glucosa como condición adversa para la migración celular puede involucrar estrategias con mayor desafío. Las limitaciones encontradas impidieron una evaluación óptima de hAM-pe en este escenario. Por ello, es necesario continuar con los ajustes en las estrategias experimentales para alcanzar un escenario *in vitro*

adecuado que permita evaluar con mayor precisión el impacto de hAM-pe sobre la migración celular bajo condiciones de alta glucosa.

Finalmente, en el ensayo exploratorio de cierre de la herida en un modelo de ratas, se observó una notable diferencia en la evolución del cierre entre los grupos C e IR. Puntualmente, al día 7 post-operatorio, las heridas del grupo IR mostraron una mayor heterogeneidad en su aspecto, con mayor presencia de costras, en comparación con las del grupo C, que presentaron una curación más homogénea. El análisis de la tasa de cierre reveló que, en los primeros días, el grupo IR presentó un menor porcentaje de cierre en comparación con el grupo C, aunque ambos grupos igualaron sus tasas de cierre al día 11. La evaluación del tiempo de cierre mostró que la mayoría de las heridas del grupo C (4 de 6) alcanzaron el 50% de cierre antes del sexto día, mientras que en el grupo IR esto ocurrió a partir del día 6 (4 de 6). Además, la velocidad media de cierre del grupo IR fue más baja (8,33% por día) en comparación con el grupo C (10% por día). La variabilidad en la velocidad de cierre también refleja las fases fisiológicas de la cicatrización, que disminuyen a medida que la herida progresa hacia su cierre completo (Sorg, 2023). Estos resultados sugieren que la condición IR afectó negativamente la cicatrización, lo que es consistente con las dificultades de curación observadas en modelos diabéticos (Seitz, 2010) y de insulinoresistencia (Otranto, 2013), lo que posiciona al modelo desarrollado como una herramienta factible para futuras caracterizaciones de los apósitos de hAM que el grupo de trabajo está llevando a cabo. Sin embargo, al tratarse de un ensayo exploratorio con un tamaño muestral limitado, es necesario ampliarlo en futuros estudios para reducir la variabilidad observada y confirmar estas tendencias de manera de establecer una base más sólida antes de evaluar los efectos de los apósitos de hAM.

En conjunto, estos resultados resaltan la importancia de continuar con el desarrollo y optimización de los modelos experimentales para profundizar en el estudio del potencial terapéutico de los productos derivados de membrana amniótica humana para la cicatrización de heridas complejas.

## 6. Bibliografía

Akle, C. A., Adinolfi, M., Welsh, K. I., Leibowitz, S., & McColl, I. (1981). Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet (London, England)*, 2(8254), 1003–1005.

Alexiadou, K., & Doupis, J. (2012). Management of diabetic foot ulcers. *Diabetes therapy : research, treatment and education of diabetes and related disorders*, 3(1), 4.

Carro, G. V., Guerbi, X., Berra, M., Rodriguez, M. G., Noli, M. L., Fuentes, M., Ticona, M. A., Michelini, F., & Berra, A. (2024). Homogenized and Lyophilized Amniotic Membrane Dressings for the Treatment of Diabetic Foot Ulcers in Ambulatory Patients. *Foot & ankle international*, 45(8), 905–915.

Cavallo, I., Sivori, F., Mastrofrancesco, A., Abril, E., Pontone, M., Di Domenico, E. G., & Pimpinelli, F. (2024). Bacterial Biofilm in Chronic Wounds and Possible Therapeutic Approaches. *Biology*, 13(2), 109.

Cornwell, K. G., Landsman, A., & James, K. S. (2009). Extracellular matrix biomaterials for soft tissue repair. *Clinics in podiatric medicine and surgery*, 26(4), 507–523.

Chen, S., Zhu, Y., Xu, Q., Jiang, Q., Chen, D., Chen, T., Xu, X., Jin, Z., & He, Q. (2022). Photocatalytic glucose depletion and hydrogen generation for diabetic wound healing. *Nature communications*, 13(1), 5684.

Dadkhah Tehrani, F., Firouzeh, A., Shabani, I., & Shabani, A. (2021). A Review on Modifications of Amniotic Membrane for Biomedical Applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 606982.

Di Sarli Gutiérrez, L., Castro, MC, Farromeque Vásquez, S., Villagarcía, HG, González Arbeláez, L., Rojano, B., Schinella, G., Maiztegui, B., & Francini, F. (2024) . Efecto

protector del monoterpene isoespintanol en un modelo de rata de prediabetes inducida por fructosa. *Productos farmacéuticos*, 17 (1), 47.

Driver, V. R., Fabbi, M., Lavery, L. A., & Gibbons, G. (2010). The costs of diabetic foot: the economic case for the limb salvage team. *Journal of vascular surgery*, 52(3 Suppl), 17S–22S.

Fernández-Real, J. M., & Pickup, J. C. (2012). Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 55(2), 273–278.

Falanga V. (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet (London, England)*, 366(9498), 1736–1743.

Gagliardino, J. J., Olivera, E. M., Etchegoyen, G. S., González, C., & Guidi, M. L. (2000). Evaluación y costos del proceso de atención de pacientes diabéticos. *Medicina (Buenos Aires)*, 60(880), 8.

Gilligan, A. M., Waycaster, C. R., & Landsman, A. L. (2015). Wound closure in patients with DFU: a cost-effectiveness analysis of two cellular/tissue-derived products. *Journal of wound care*, 24(3), 149–156.

Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314–321.

Hao, Y., Ma, D. H., Hwang, D. G., Kim, W. S., & Zhang, F. (2000). Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*, 19(3), 348–352.

Keskin, E. S., Keskin, E. R., Öztürk, M. B., & Çakan, D. (2021). The Effect of MMP-1 on Wound Healing and Scar Formation. *Aesthetic plastic surgery*, 45(6), 2973–2979.

Kim, J. S., Kim, J. C., Na, B. K., Jeong, J. M., & Song, C. Y. (2000). Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Experimental eye research*, 70(3), 329–337.

King, A. E., Paltoo, A., Kelly, R. W., Sallenave, J. M., Bocking, A. D., & Challis, J. R. (2007). Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta*, 28(2-3), 161–169.

Kraus, I., Sabolinski, M. L., Skornicki, M., & Parsons, N. B. (2017). The Comparative Effectiveness of a Human Fibroblast Dermal Substitute versus a Dehydrated Human Amnion/Chorion Membrane Allograft for the Treatment of Diabetic Foot Ulcers in a Real-world Setting. *Wounds : a compendium of clinical research and practice*, 29(5), 125–132.

Lavery, L. A., Davis, K. E., Berriman, S. J., Braun, L., Nichols, A., Kim, P. J., Margolis, D., Peters, E. J., & Attinger, C. (2016). WHS guidelines update: Diabetic foot ulcer treatment guidelines. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 24(1), 112–126.

Litwiniuk, M., & Grzela, T. (2014). Amniotic membrane: new concepts for an old dressing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 22(4), 451–456.

Martin, P., & Nunan, R. (2015). Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *The British journal of dermatology*, 173(2), 370–378.

Martinotti, S., & Ranzato, E. (2020). Scratch Wound Healing Assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2109, 225–229.

Melmed, S., Auchus, R. J., Goldfine, A. B., Koenig, R. J. y Rosen, C. J. (2020). *Williams Textbook of Endocrinology* (14.<sup>a</sup> ed.). Elsevier Health Sciences.

Morkin, M. I., & Hamrah, P. (2018). Efficacy of self-retained cryopreserved amniotic membrane for treatment of neuropathic corneal pain. *The ocular surface*, 16(1), 132–138.

Mustoe, T. A., O'Shaughnessy, K., & Kloeters, O. (2006). Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plastic and reconstructive surgery*, 117(7 Suppl), 35S–41S.

Otranto, M., Nascimento, A. P., & Monte-Alto-Costa, A. (2013). Insulin resistance impairs cutaneous wound healing in mice. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 21(3), 464–472.

Ramírez Hernández, G.A. (2010). Fisiología de la cicatrización cutánea. *RFS Revista Facultad De Salud*, 2 (2), 69–78.

Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., & Gurtner, G. C. (2019). Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological reviews*, 99(1), 665–706.

Seitz, O., Schürmann, C., Hermes, N., Müller, E., Pfeilschifter, J., Frank, S., & Goren, I. (2010). Wound healing in mice with high-fat diet- or ob gene-induced diabetes-obesity syndromes: a comparative study. *Experimental diabetes research*, 2010, 476969.

Sorg, H., & Sorg, C. G. G. (2023). Skin Wound Healing: Of Players, Patterns, and Processes. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes*, 64(2), 141–157.

Talbott, H. E., Mascharak, S., Griffin, M., Wan, D. C., & Longaker, M. T. (2022). Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis. *Cell stem cell*, 29(8), 1161–1180.

Tseng, S. C., España, E. M., Kawakita, T., Di Pascuale, M. A., Li, W., He, H., Liu, T. S., Cho, T. H., Gao, Y. Y., Yeh, L. K., & Liu, C. Y. (2004). How does amniotic membrane work?. *The ocular surface*, 2(3), 177–187.

Tehrani, F. D., Firouzeh, A., Shabani, I., & Shabani, A. (2021). A Review on Modifications of Amniotic Membrane for Biomedical Applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 606982.

Uruski, P., Mikula-Pietrasik, J., Drzewiecki, M., Budkiewicz, S., Gładki, M., Kurmanalina, G., Tykarski, A., & Książek, K. (2021). Diverse functional responses to high glucose by primary and permanent hybrid endothelial cells in vitro. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 156, 1–6.

Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open biology*, 10(9), 200223.

Xu, F., Zhang, C., & Graves, D. T. (2013). Abnormal cell responses and role of TNF- $\alpha$  in impaired diabetic wound healing. *BioMed research international*, 2013, 754802.

Zhang, F., Liu, Y., Wang, S., Yan, X., Lin, Y., Chen, D., Tan, Q., & Wu, Z. (2022). Interleukin-25-Mediated-IL-17RB Upregulation Promotes Cutaneous Wound Healing in Diabetic Mice by Improving Endothelial Cell Functions. *Frontiers in immunology*, 13, 809755.

