



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
FACULTAD DE FARMACIA**

**CARACTERIZACIÓN DE MEDIO ENRIQUECIDO DERIVADO DE
CÉLULAS MADRES PARA FAVORECER LA REPARACIÓN
TISULAR EN UN MODELO DE ANIMAL CON HIPERGLICEMIA**

Por

VALESKA ALEJANDRA ORMAZÁBAL VALLADARES

**Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de
Concepción para optar al grado académico de
Magister en Bioquímica Clínica e Inmunología**

Profesor Guía

Dr. Claudio Rodrigo Aguayo Tapia
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

**Enero 2017
Concepción, Chile**

TABLA DE CONTENIDO

Índice de Tablas	IV
Índice de Figuras	V
Resumen	VII
Abstract	IX
Introducción	1
Cicatrización de heridas	1
Hemostasia	2
Inflamación	3
Proliferación y migración Celular	5
Maduración-remodelación	7
Heridas Crónicas	8
Diabetes	9
Úlcera de pie diabético.	10
Impacto social de la úlcera de pie diabético	14
Clasificación de las úlceras de pie diabético	16
Tratamiento del pie diabético	17
Células madre	27
Células madre mesenquimales	28
Células mesenquimales de gelatina de wharton (hWMSC)	30
Potencial terapéutico de células mesenquimales aisladas de gelatina de wharton humana.	31
Modelos animales de enfermedades metabólicas.	32

Modelos animal de heridas	40
Propuesta de investigación	45
Pregunta de investigación	50
Hipótesis de trabajo	50
Objetivos	50
Objetivo General	50
Objetivos Específicos	51
Materiales y Métodos	52
Metodología	52
Materiales	56
Resultados	65
Discusión	100
Glosario	106
Referencias	108



INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1:	Factores que afectan la cicatrización	1
Tabla 1.2:	Clasificación de las úlceras de pie diabético de acuerdo a la escala Wagner.	17
Tabla 1.3:	Modelos de ratones diabéticos inducidos por dieta alta en Grasas	40
Tabla 3.1:	Análisis de los cortes histológicos de las heridas de los animales control.	88
Tabla 3.2:	Análisis de los cortes histológicos de las heridas de los animales control.	96



INDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Modelo esquemático de la metodología de trabajo utilizada en este trabajo de tesis	55
Figura 2:	Peso de los ratones y porcentaje de grasa.	67
Figura 3:	Evaluación parámetros bioquímicos para evaluar el metabolismo glucídico en animales control y alimentados con una dieta alta en grasa (HFD).	71
Figura 4:	Test de tolerancia a la glucosa en los animales control y sometidos a un adieta alta en grasa	72
Figura 5:	Determinación del perfil lipídico en animales control y alimentados con una dieta alta en grasa (HFD).	74
Figura 6:	Determinación de la concentración de antioxidantes totales en plasma	76
Figura 7:	Cultivo de células madres mesenquimales (MSC) diferenciadas a Células endoteliales.	77
Figura 8:	Efecto de los medios de cultivo de células HUVEC. Mesenquimales (MSC) y Mesenquimal-endotelial (Endo) en la viabilidad de células ECV-304.	80
Figura 9:	Ensayo de herida y de proliferación celular posterior a una aplicación de los medios MSC. HUVEC y Endo.	83
Figura 10:	Ensayo de herida y de proliferación celular posterior a aplicaciones cada 24 horas de los medios MSC. HUVEC y Endo.	84
Figura 11:	Fotografías representativas de la evolución de las heridas en el tiempo del animal control tras la intervención con los medios condicionados.	86
Figura 12:	Efecto de los medios condicionados en el cierre de	

la herida en modelo animal sometido a una dieta convencional
87

- Figura 13: Fotografías representativas de cortes histológicos de animal control tratado con los medios Endo, MSC, HUVEC 90
- Figura 14: Fotografías representativas de la evolución de las heridas en el tiempo en modelo animal de hiperglicemia inducida por Dieta tras la intervención con los medios condicionados 92
- Figura 15: Efecto de los medios condicionados en el cierre de la herida en modelo animal con Hiperglicemia inducida por una dieta alta en grasa 93
- Figura 16: Fotografías representativas de cortes histológicos de animal con hiperglicemia inducida por dieta, tratado con los medios Endo, MSC, HUVEC. 95
- Figura 17: Comparación de la Velocidad de cierre de la Herida entre al animal alimentado con una dieta convencional y el modelo animal con hiperglicemia inducida por Dieta 97
- Figura 18: Comparación del efecto del medio Endotelial (Endo) en el cierre de la herida en el modelo animal control y en modelo de hiperglicemia inducido por dieta. 99

RESUMEN

En los últimos años, se ha habido un aumento de diabetes mellitus, la Federación Internacional de Diabetes (FDI), señala que en el 2013, 382 millones de personas tiene diabetes y se espera que llegue a 592 millones en el 2035. Chile es el país con mayor prevalencia de Diabetes en América del Sur con un 12,32% de la población con Diabetes. La Diabetes tiene una alta morbimortalidad, se estima que entre un 15-25% de los pacientes con Diabetes desarrollan Úlcera de Pie Diabético en alguna de sus extremidades inferiores, de estos entre un 10-30% sufrirá además una amputación. En este contexto, se hace necesario la búsqueda de herramientas terapéuticas innovadoras que permitan tratar en forma eficiente la úlcera de pie diabético y garantizar su curación total. Por otro lado, las células madres Mesenquimales han sido objeto de debido a su alto potencial de diferenciación, proliferación, plasticidad, baja inmunogenicidad y fácil cultivo. Trabajos previos de nuestro laboratorio permitieron demostrar la capacidad de las células mesenquimales de diferenciarse a células endoteliales. Además demostramos que estas células endoteliales tenían la capacidad de inducir angiogénesis y de acelerar el cierre de heridas en un modelo *in vivo*. Asociado a estos hallazgos, se logró demostrar que el potencial de regeneración de las células endoteliales estaba en factores solubles secretados al medio de cultivo. Nos preguntamos: Los factores secretados por células endoteliales podrán inducir un mayor cierre de la herida en un modelo animal con hiperglicemia.

Hipótesis: Factores angiogénicos secretados al medio de cultivo, por células endoteliales favorecen el proceso de regeneración tisular en un modelo animal con hiperglicemia, inducido por dieta.

Objetivo General: Evaluar la capacidad de regeneración tisular del medio condicionado endotelial en un modelo de herida de animal con hiperglicemia, inducida por dieta, e identificar los factores solubles involucrados en este efecto. Para ello realizaremos ensayos de herida *in vitro* e *in vivo* utilizando un modelo animal de hiperglicemia inducido por dieta, además analizamos del medio de cultivo por *array* de factores secretados e isoelectroenfoque líquido acoplado a masa.

Resultados: Nuestros resultados indican que el medio condicionado endotelial, incrementa la velocidad de cierre de la herida *in vivo* en un modelo animal con hiperglicemia inducida por dieta. Sin embargo en los ensayos *in vitro* el medio condicionado endotelial no logra inducir cierre de la herida. Los ensayos de proliferación celular *in vitro* muestran que el medio condicionado endotelial incrementa en un 30% la proliferación celular. Por otro lado utilizando ensayos de *array* e isoelectroenfoque líquido acoplado a masa, pudimos identificar factores solubles con potencial de ser los involucrados en el aumento del cierre de herida. Finalmente podemos concluir que no solo las células madres son responsables de su potencial en regeneración de tejidos, si no también los factores secretados por éstas.

ABSTRACT

In recent years, there has been an increase in diabetes mellitus, the International Diabetes Federation (IDF), which indicates that in 2013, 382 million people have diabetes and is expected to reach 592 million by 2035. Chile is The country with the highest prevalence of Diabetes in South America with 12.32% of the population with Diabetes. Diabetes has a high morbimortality, it is estimated that between 15-25% of patients with Diabetes develop Diabetic Foot Ulcer in one of their lower extremities, of these between 10-30% also an amputation. In this context, it is necessary to search for innovative therapeutic tools that allow the efficient treatment of diabetic foot ulcer and guarantee its total cure. On the other hand, Mesenchymal stem cells have been subject to due to their high potential for differentiation, proliferation, plasticity, low immunogenicity and easy culture. Previous work in our laboratory has demonstrated the ability of mesenchymal cells to differentiate into endothelial cells. We further demonstrate that these endothelial cells had the ability to induce angiogenesis and to accelerate wound closure in an in vivo model. Associated with these findings, it was demonstrated that the regeneration potential of endothelial cells was in soluble factors secreted into the culture medium. We ask: Factors secreted by endothelial cells may induce a greater closure of the wound in an animal model with hyperglycemia.

Hypothesis: Angiogenic factors secreted into the culture medium by endothelial cells favor the process of tissue regeneration in an animal model with hyperglycemia, induced by diet. Aims: To evaluate the tissue regeneration capacity of the endothelial conditioned medium in a diet-induced hyperglycemia animal wound model and to identify the soluble factors involved in this effect. For this purpose we will perform in vitro and in vivo wound tests using an animal model of hyperglycemia induced by diet, in addition we analyzed the culture medium by array of secreted factors and liquid isoelectric focusing coupled to mass.

Results: Our results indicate that the endothelial conditioned medium increases the rate of wound closure in vivo in an animal model with diet-induced hyperglycemia. However in the in vitro assays the conditioned endothelial medium fails to induce wound closure. In vitro cell proliferation assays show that endothelial conditioned medium increases cell proliferation by 30%. On the other hand, using array and liquid isoelectric focusing experiments coupled to mass, we were able to identify soluble factors with potential to be involved in the increase of wound closure. Finally we can conclude that not only the stem cells are responsible for their potential in tissue regeneration, but also the factors secreted by them.

INTRODUCCIÓN

CICATRIZACIÓN DE HERIDAS

La piel esta formada por varias capas de keratinocitos, los cuales proveen una eficiente barrera entre el ambiente y el organismo (Pastar et al., 2014). La piel tiene diversas funciones tales como protección frente a agentes externos como patógenos, radiación UV o estrés oxidativo. Además, cumple funciones como barrera de inmunidad, control de la temperatura corporal, metabolismo y comunicación (Kurahashi & Fujii, 2015). Una lesión en la piel puede permitir el ingreso de agentes injuriantes al organismo o facilitar la salida de fluidos, ocasionando daño o incluso la muerte, por lo que es muy importante sanar rápidamente una herida (Kurahashi & Fujii, 2015). En individuos sanos, la curación de una herida conlleva múltiples procesos que ocurren secuencialmente en forma coordinada. Sin embargo, hay condiciones locales o sistémicas que puede alterar el proceso de cicatrización retrasando su avance o deteniendo el proceso en una de las etapas (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Factores que afectan la cicatrización (adaptado de GUO et., al 2010) (Guo & Dipietro, 2010)

Factores locales	Factores sistémicos
Oxigenación Infección Presencia de Cuerpos extraños Pobre drenaje Venoso	Edad y Género Hormonas sexuales Isquemia Enfermedades: Diabetes, queloides, desordenes hereditarios de cicatrización. Obesidad Medicación (glucocorticoides, alcoholismo) Pacientes inmunocomprometidos (cáncer, radiación, SIDA, deficiencia Nutricional)

La cicatrización fisiológica de una herida es un proceso complejo que se desarrolla en 4 etapas que se superponen entre sí (Figura 1) (Gurtner, Werner, Barrandon, & Longaker, 2008). Estas etapas son: 1) hemostasia, 2) inflamación. 3) proliferación y migración celular, y 4) maduración-remodelación. Cada etapa se caracteriza por eventos celulares y moleculares claves que están coordinados por una serie de factores secretados que son reconocidas y liberadas por las células que responden frente a la herida (Sun, Sitrashvili, & Khavari, 2014).

A continuación se describirá cada una de las etapas del proceso de cicatrización celular.

Hemostasia

Una vez que se produce la lesión, de forma inmediata se activa la cascada de la coagulación, la cual, a través del ensamblaje de fibrina, forma el coágulo y asegura la hemostasia proporcionando la arquitectura de una matriz básica, que permite iniciar la invasión y el reclutamiento de células inflamatorias. Las plaquetas atrapadas en el coágulo liberan factores de crecimiento en el medio ambiente local de la herida (Anitua, Andía, Ardanza, Nurden, & Nurden, 2004) tales como el factor de crecimiento transformante β (TGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento epidérmico vascular (VEGF) factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Guo & Dipietro, 2010) y Angiopoyetina 1 y 2, que regula la actividad de VEGF. Además, hay secreción de quimioquinas como el

factor de necrosis tumoral ($TNF\alpha$) e interleuquina 1β ($IL-1\beta$)(Witte & Barbul, 1997). Las plaquetas y sus productos secretados son de gran importancia para una adecuada cicatrización, esto ha sido demostrado clínicamente con el uso de plasma enriquecido en plaquetas (Martinez-Zapata et al., 2016) y la corrección de alteraciones en la cicatrización observada en modelos animales con trastornos plaquetarios (Deppermann et al., 2013).

Inflamación

En paralelo a la hemostasia, se inicia la respuesta inflamatoria temprana, la cual moviliza sistemas de defensa locales y sistémicos al sitio de la lesión (Eming, Martin, & Tomic-Canic, 2014). La respuesta inflamatoria se inicia con la acumulación de leucocitos en la zona de la herida. Los neutrófilos son los primeros leucocitos en llegar proveniente de la vasculatura circundante a la herida, posteriormente llegan los monocitos quienes se diferencian a macrófagos. En la etapa final de hemostasia, se producen citoquinas que estimulan la expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1, ELAM-1, ICAM-1) en el endotelio que favorecen el desarrollo de la etapa de inflamación. Los Neutrófilos que llegan a la zona de lesión expresan moléculas de contra-adhesión (integrinas, selectinas), favoreciendo la sujeción e infiltración en el tejido dañado (Petty, Lenox, Weiss, Poynter, & Suratt, 2009) (M. H. Kim et al., 2008).

En esta etapa los neutrófilos producen grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno (ROS), que son esenciales para proteger contra el

desarrollo de una infección, pero cuando están presente en exceso, pueden simultáneamente dañar los tejidos circundantes (Kurahashi & Fujii, 2015; Novo & Parola, 2008). Por otro lado, los neutrófilos son una fuente importante de producción de varias citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α , que estimulan la diferenciación de los monocitos a macrófagos tipo M1 (Werner & Grose, 2003). Los macrófagos M1 tienen como función remover por fagocitosis restos celulares como también a los neutrófilos moribundos, producir citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento, tales como PDGF, TNF α , IL-1 e IL-6, de manera de facilitar el proceso de cicatrización de la herida (Mahdavian Delavary, van der Veer, van Egmond, Niessen, & Beelen, 2011). Además, la citoquina IL-1 induce la liberación del factor estimulante de granulocitos (G-CSF) y del factor de estimulante de granulocitos macrófago (GM-CSF) por células endoteliales y fibroblastos, estos factores llevan a que los monocitos secreten aún más PDGF (Herlyn & Malkowicz, 1991). Los macrófagos secretan además metaloproteinasas (MMP), que degradan la matriz extracelular de la zona de la herida para permitir la migración de queratinocitos y fibroblastos quienes participan en la etapa de proliferación celular (reepitelización) (Goldman, 2004).

Así mismo, la inflamación es acompañada por angiogénesis, cuya función es generar vasos que rodean la herida permitiendo la llegada de nutrientes, oxígeno y células que favorecerán el proceso de cicatrización (Sonnemann &

Bement, 2011). Este proceso es comandado por la secreción del factor de crecimiento VEGF.

Finalmente, al terminar esta etapa se da inicio a la etapa de proliferación. Se ha propuesto que el paso de la etapa inflamatoria a la etapa de proliferación esta asociado al cambio del fenotipo de los macrófagos tipo M1 a tipo M2, los cuales tienen un fenotipo antiinflamatorio (Mahdavian Delavary et al., 2011).

Proliferación y migración celular

En esta etapa continúa la neo vascularización donde los queratinocitos producen VEGF (estimulada por NO, KGF y $TNF\alpha$), este proceso es regulado por la presencia de factores inhibidores de la neovascularización (Goldman, 2004). Sin embargo, el sello de esta etapa es el incremento local de la división de células epidermales, para reemplazar las células destruidas por la herida. Esto implica la migración de células epidermales al sitio de la herida (*reepitelización*), acompañada del reclutamiento de otros tipos celulares tales como fibroblastos, guiados por el factor de crecimiento de plaquetas (PDGF). Además se produce depósito de matriz extracelular y colágeno, dando origen al llamado *tejido de granulación*. Esta etapa es iniciada con la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-1, $TNF\alpha$) quienes estimulan la síntesis y liberación por parte de los fibroblastos del factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), óxido nítrico (NO), e IL-6, quienes permiten la proliferación, migración y diferenciación de los queratinocitos a células epidermales (Kurahashi & Fujii, 2015). La migración de queratinocitos ocurre

desde los dos extremos de la herida y termina cuando los queratinocitos de ambos extremos se encuentran en la parte media de la herida; este mecanismo de inhibición de contacto es el que detiene la migración (Pastar et al., 2014). Los fibroblastos son reclutados desde el borde de la herida, estimulados por la secreción del factor de crecimiento de Fibroblastos (FGF), contribuyendo al cierre de la herida por un mecanismo diferente y complementario a la migración de los queratinocitos. Los fibroblastos atraídos a la herida, proliferan y pueden diferenciarse a miofibroblastos, estimulando la migración de queratinocitos desde el borde de la herida y de los apéndices dérmicos como los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas y sebáceas. Los fibroblastos y miofibroblastos además contribuyen al cierre de la herida por secreción en una gran cantidad de colágeno y otros componentes de matriz extracelular (MEC) (Sonnemann & Bement, 2011). Posteriormente, los miofibroblastos contraen la herida, estableciendo una unión con la matriz extracelular situada a los bordes de la herida, reduciendo el tamaño de la herida. Finalmente, los fibroblastos detienen la contracción y hay cambio en la composición de la matriz extracelular dando inicio a la fase de maduración (Hinz, 2006).

Una etapa importante en el proceso de reparación tisular es la migración de fibroblastos en respuesta a PDGF. PDGF es el factor que tiene un rol crucial en el proceso de reparación tisular y representa el único factor, hasta ahora, aprobado por la FDA para mejorar la cicatrización de heridas (Barrientos, Stojadinovic, Golinko, Brem, & Tomic-Canic, 2008; Margolis et al., 2004).

Maduración-remodelación

En esta etapa se produce el cese de la proliferación de células epidermales, remodelación de la matriz extracelular y muerte por apoptosis de los leucocitos que fueron reclutados a la herida, culminando con la formación de la cicatriz. La remodelación de la matriz extracelular (síntesis y degradación) es dirigida por TGF β (Sporn, Roberts, Wakefield, & de Crombrughe, 1987) y es favorecida por una disminución de la producción de metaloproteinasas (MMPs), el aumento de expresión de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP), y el aumento de la expresión de las proteínas de adhesión celular (Goldman, 2004). En este proceso, el colágeno tipo III formado en las etapas anteriores es reemplazado por colágeno tipo I, un componente predominante en la dermis humana normal y que tiene mayor fuerza tensora (Xue & Jackson, 2015). Así la fuerza tensora del tejido dañado puede alcanzar entre un 50 a 80% con respecto a la piel no dañada. Aunque los epitelios reparados son casi igual que antes de la herida, el tejido de la cicatriz no es completamente igual que la dermis no herida. En la fase tardía de la maduración, la actividad celular se reduce, entonces la cicatriz, pierde su apariencia eritematosa debido principalmente a que los vasos sanguíneos son removidos por apoptosis. La etapa de maduración puede durar días incluso años.

Heridas Crónicas

Cuando la respuesta a la cicatrización de una herida se vuelve anormal pueden ocurrir dos grandes efectos: 1) Generar una cicatriz excesiva (queloide) o generar una lesión ulcerosa que no cicatriza (herida crónica).

Las heridas crónicas se definen como lesiones que no han podido remediarse través de la reparación ordenada y oportuna para recuperar la integridad anatómica y funcional del tejido dañado (Werdin, Tennenhaus, Schaller, & Rennekampff, 2009). Tradicionalmente las heridas crónicas se han clasificado de acuerdo a su etiología en heridas producto de insuficiencia de perfusión venosa o arterial, úlceras por presión y úlceras de pie diabético (Werdin et al., 2009). Algunas de las características en común que tienen estas lesiones son: **i)** Un aumento del tiempo de cierre de la herida, **ii)** Una fase inflamatoria excesiva y prolongada (Eming, Hammerschmidt, Krieg, & Roers, 2009), con una alta infiltración de neutrófilos y macrófagos (Loots et al., 1998; Sindrilaru et al., 2011), quienes generan un desbalance entre factores pro y anti inflamatorios (Beidler et al., 2009; Eming et al., 2010). **iii)** Infecciones persistentes y formación de biopelículas de microorganismos resistentes a la terapia farmacológica (Demidova-Rice, Hamblin, & Herman, 2012; Tarnuzzer & Schultz, 1996) y finalmente **iv)** disminución del depósito de colágeno y de la formación de tejido de granulación **v)** incapacidad de las células dérmicas y/o epidérmicas de responder a los estímulos que inducen la reparación tisular (Demidova-Rice et al., 2012). En general, esta deficiente respuesta celular, se ha asociado con

niveles reducidos de factores de crecimiento endógeno o actividad en el sitio de la herida (Frank et al., 1995).

En este trabajo nos centraremos en las heridas crónicas producidas por úlcera de pie diabético

DIABETES

La diabetes Mellitus (DM) es un desorden metabólico que se caracteriza por hiperglicemia crónica con alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas, como resultado de un defecto en la secreción de insulina o por una respuesta inadecuada a esta, generando un desbalance metabólico (OMS 1999). La DM fue reconocida como una entidad clínica en 1812. La prevalencia y el mecanismo de la enfermedad no se conocían en ese entonces, por lo que no habían tratamientos efectivos, llevando a la muerte de los pacientes en semanas o meses posteriores al diagnóstico. En los últimos 200 años se han generado avances significativos en el conocimiento del mecanismo fisiopatológico de la diabetes, como también en las estrategias de prevención y tratamiento. Estos avances han permitido ampliar la expectativas de vida de los pacientes posterior al diagnóstico, sin embargo siguen siendo menores comparadas con personas no diabéticas. Irónicamente, a pesar de los avances científicos que han llevado a estrategias efectivas para la prevención de la diabetes, aún no se ha logrado obtener la “cura” de esta. De hecho, si se analiza desde un punto de vista de la salud pública y de la sociedad en general,

poco progreso se ha logrado hacia la conquista de la enfermedad durante los últimos 200 años, y estamos podría decirse peor ahora que en 1812 (Polonsky, 2012).

En la actualidad, el espectro común encontrado en la diabetes es muy diferente. Aunque la deficiencia severa de insulina se sigue produciendo, ahora representa sólo alrededor del 10% de los casos y pueden tratarse fácilmente con insulina. La gran mayoría de los pacientes con diabetes tienen sobrepeso y tienen una combinación de resistencia a la insulina con una deteriorada secreción de insulina. La prevalencia de esta forma de diabetes ha ido aumentando de manera espectacular, sobre todo en las últimas tres o cuatro décadas, resultando en una epidemia mundial que ha posicionado a diabetes, como una de las condiciones médicas más común y grave que la humanidad ha tenido que enfrentar.

El último informe de la Federación Internacional de Diabetes (FDI), señala que en el 2013, 382 millones de personas (8,5% de la población mundial) tiene diabetes y se espera que llegue a 592 millones en el 2035 (Diabetes, 2011-2012). Chile es el país con mayor prevalencia de DM en América del Sur con un 12,32% de la población con DM, y se estima que solo 78% de la población chilena ha sido diagnosticada (Diabetes, 2011-2012). Solo en el 2014, 104.848 personas desarrollaron diabetes en Chile, es decir, una persona cada cinco minutos al día (*Desafío de la diabetes en Chile*, 2015). Este comportamiento epidémico probablemente se debe a varios factores entre los cuales se

destacan la raza, el cambio en los hábitos de vida y el envejecimiento de la población. Estudios en comunidades nativas americanas han demostrado una latente pero alta propensión al desarrollo de diabetes y otros problemas relacionados con resistencia a la insulina, que se hace evidente con el cambio en los hábitos de vida, lo cual está ocurriendo en forma progresiva (Danaei et al., 2011).

DM genera un impacto sobre el paciente, la familia, la sociedad y la economía (Federation, 2014). Padecer diabetes se asocia a un mayor riesgo de depresión (Ali, Stone, Peters, Davies, & Khunti, 2006) baja adherencia al tratamiento, lo que se traduce en malos resultados médicos y mayores costos en salud (Mutowo et al., 2016; Pouter, Nefs, & Nouwen, 2013). La carga del tratamiento y control de la diabetes puede llevar a las familias a la pobreza, mientras que la pérdida de productividad, el ausentismo y el bajo rendimiento laboral por causa de la enfermedad provoca que los empleadores y las economías se vean afectados (Tunceli et al., 2005).

La DM tiene una alta morbimortalidad, siendo las complicaciones macrovasculares (infarto agudo al miocardio y accidentes cerebrovasculares) causantes de la alta mortalidad y las complicaciones microvasculares (retinopatía, nefropatía, neuropatía y úlcera de pie diabético), causantes de la alta morbilidad (Beckman & Creager, 2016; Hardigan, Ward, & Ergul, 2016; Miller et al., 2016; van Dieren, Beulens, van der Schouw, Grobbee, & Neal, 2010; Vieira-Potter, Karamichos, & Lee, 2016).

ÚLCERA DE PIE DIABÉTICO.

Una de las múltiples complicaciones del paciente diabético, con un mal control glicémico, es la alteración de todas las etapas del proceso de cicatrización de heridas, esta alteración da origen a la úlcera de pie diabético (UPD). La UPD es una complicación común de la diabetes mellitus. Su principal característica es la ulceración, que se define como la lesión que afecta el espesor completo de la dermis del pie. La UPD representa una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. La etiología de las úlceras del pie es multifactorial, siendo sus principales pilares la neuropatía, isquemia e infección (Boulton, 2008). La neuropatía periférica conduce a la disminución de la sensación de protección y al desarrollo de deformidades en el pie (Vairamon, Babu, & Viswanathan, 2009). Las deformidades dan lugar a una redistribución de la presión durante la marcha y pueden resultar en una ulceración en las áreas de alta presión, esto sumado a los cambios en la piel que la vuelven más vulnerable, conduciendo a un aumento en el agrietamiento y ruptura, lo que aumenta el riesgo de infección (Vuorisalo, Venermo, & Lepantalo, 2009)

La neuropatía diabética es la complicación más frecuente y precoz de la diabetes. A pesar de ello suele ser la más tardíamente diagnosticada. Su prevalencia es difícil de establecer debido a la ausencia de criterios diagnósticos unificados, a la multiplicidad de métodos diagnósticos y a la heterogeneidad de las formas clínicas. Su evolución y gravedad se correlacionan con la duración de la enfermedad y el mal control metabólico. La

detección depende de la sensibilidad de los métodos diagnósticos empleados. Así por ejemplo, a través de métodos electrofisiológicos es posible detectar neuropatía en la casi totalidad de los pacientes diabéticos en el momento del diagnóstico o poco tiempo después. La Neuropatía diabética, puede presentarse como un proceso doloroso agudo o crónico y/o como un proceso indoloro, que en su etapa final lleva a complicaciones como úlcera del pie, deformidades (por ejemplo, el pie de Charcot) y amputaciones no traumáticas. La forma más común es la dolorosa crónica (sensitiva), con disestesias que empeoran de noche (sensación de hormigueo, agujas, quemaduras, punzadas, etcétera) y pueden remitir espontáneamente por largos períodos. La *neuropatía sensitiva* es el factor que se asocia de manera más consistente a la aparición de úlceras en el pie (Carlos Beltrán B., 2001)

Diversos estudios han demostrado que en el paciente diabético se ven alteradas las etapas de cicatrización, es así como en la etapa de hemostasis, hay una disminución de la expresión del receptor del factor PDGF en las células endoteliales y epiteliales, lo que resulta en la transición tardía a la etapa de inflamación. Posteriormente ocurre una gran infiltración de macrófagos en la herida, resultando en un aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias, prolongando de este modo la fase inflamatoria. La fase proliferativa también se ve afectada, resultando en la formación de un tejido de proliferación deficiente, caracterizado por una paraqueratosis (presencia de núcleos en las células del estrato corneo) y una hiperqueratosis (engrosamiento

de la capa externa de la piel) (Werner, Krieg, & Smola, 2007). Por otro lado se ha demostrado que en la UDP, hay una elevada concentración de especies reactivas del oxígeno, generando una gran inestabilidad en la matriz de colágeno (Loots et al., 1998), una disminución en la angiogénesis y una pobre vascularización debido a una alteración en la sensibilidad a VEGF (Tchaikovski, Olieslagers, Bohmer, & Waltenberger, 2009). Esto se traduce en una pérdida de la llegada de oxígeno y nutrientes a la zona de lesión dificultando la cicatrización (Anderson & Hamm, 2012).

A pesar de que existe claridad acerca de cuáles son los factores determinantes en la aparición de las complicaciones diabéticas de los miembros inferiores, un muy bajo porcentaje de la población diabética que se somete a un control estricto de los pies y por ende existe un **alto riesgo de padecer pie diabético y sus complicaciones las cuales concluyen en la amputación de la extremidad**. Es por ello que se requieren estrategias de prevención oportunas o de tratamientos efectivos que permitan el tratamiento de esta patología, sin tener que llegar a la amputación.

IMPACTO SOCIAL DE LA ÚLCERA DE PIE DIABÉTICO

No cabe duda que las úlceras de pie diabético generan un alto costo para el paciente y su familia, en términos económicos, funcionales y de calidad de vida, así como lo es para los sistemas de salud y para la sociedad. Estas lesiones tienen una importante morbilidad asociada a numerosas complicaciones que

impactan aún más la cicatrización de la herida, tales como sobreinfección (local o sistémica) contracturas, atrofas, sumado a trastornos psicológicos que en su conjunto convergen en un deterioro en la calidad de vida (Boulton, 2005; Vileikyte et al., 2005).

Se estima que entre un 15 a 25% de los pacientes diabéticos desarrollará en su vida una úlcera de pie diabético (Boulton, 2008)(UPD) y de estos aproximadamente un 10 % será amputado de al menos una extremidad inferior (Adriana Lozano-Platonoff & Contreras-Ruiz*, 2014) .

En Chile la tasa de amputaciones por complicaciones periféricas en población diabética aumentó entre los años 2002 y 2006, de tasas de 3,5 a 4,5 por mil portadores de diabetes respectivamente, lo que corresponde a un incremento del 28% (Sapunar, 2016). A pesar del tratamiento de la lesión del pie, la cronicidad y recidivas explican la gran carga socioeconómica que suponen las úlceras de la extremidad inferior, entre un 40% y un 50% permanecen activas durante más de 6 meses y las que cicatrizan antes de 12 meses, con una tasa de recidiva entre un 25% y un 30%. De este grupo, un 50 a 70% de los pacientes tiene recurrencia y termina en una amputación y reamputación, generando un alto costo (directo, como indirecto) para el paciente y su familia, en términos económicos, funcionales y de calidad de vida, así como lo es para los sistemas de salud y para la sociedad (Adriana Lozano-Platonoff & Contreras-Ruiz*, 2014; Apelqvist, 2005). El costo directo de un paciente diabético con UPD es aproximadamente 26.940 US\$/año (Harrington, Zagari,

Corea, & Klitenic, 2000) el que varía de acuerdo al nivel de complejidad de la UDP (Stockl, Vanderplas, Tafesse, & Chang, 2004). Más aún, el costo de tratamiento posterior a la amputación, alcanza hasta un 15% de los presupuestos nacionales de salud.

Los altos costos sociales y económicos de la UPD, requiere la implementación de políticas públicas y sociales tendientes a implementar medidas de pesquisa y prevención, como también de la búsqueda de nuevos y mejorados tratamientos que mejoren la efectividad de terapia, reduzcan la recidiva y disminuyan la tasa de amputaciones.

CLASIFICACIÓN DE LAS ÚLCERAS DE PIE DIABÉTICO

Diversas son las causas que permiten el desarrollo del pie diabético así como también su forma de presentación y evolución clínica, por tanto, es importante contar con un sistema de clasificación de las lesiones del pie diabético que estandarice las diversas definiciones, permita evaluar el curso clínico y los resultados de distintos tratamientos. Las úlceras de pie diabético se clasifican según su severidad, gravedad, profundidad, grado de infección y gangrena. La escala más utilizada para su clasificación corresponde a la escala Wagner (Mendoza-Romo, 2005), que clasifica a las úlceras diabéticas en 6 estadios (Tabla 1.2):

Tabla 1.2: Clasificación de las úlceras de pie diabético de acuerdo a la escala Wagner. (datos obtenidos de ALAD, asociación latinoamericana de diabetes)

Grado	Lesión	Característica
0	Ninguna lesión. Pie de riesgo	Callos gruesos, cabeza metatarsianas prominentes, dedos en garra, deformidades óseas.
1	Úlceras superficiales	Destrucción total del espesor de la piel
2	Úlceras profundas	Penetra en la piel, grasa, ligamentos pero sin afectar hueso, infectada.
3	Úlceras profundas más absceso	Extensa, profunda, secreción y mal olor.
4	Gangrena limitada	Necrosis de parte del pie
5	Gangrena extensa	Todo el pie afectado, efectos sistémicos

TRATAMIENTO DE LA ÚLCERA DE PIE DIABÉTICO

El tratamiento de la úlcera de pie diabético depende de múltiples factores, en general es el médico, en primera instancia, quien debe definir si el manejo debe ser ambulatorio u hospitalario, con base en el grado de la úlcera, la presencia de osteomielitis y/o de gangrena y el estado de control metabólico del paciente. Clásicamente se han establecido dos sistemas de curación en las úlceras crónicas: la cura tradicional o cura seca, basada en uso de antisépticos y la cura en ambiente húmedo que propone el empleo de productos que genera en el lecho de la herida un ambiente húmedo, controlan el exudado y estimulan una cicatrización más fisiológica (Ramsey et al., 1999; Winter, 1962). El tratamiento de las úlceras crónicas se basa actualmente en la llamada cura húmeda y contempla un doble aspecto: el de la enfermedad de base y el tratamiento local. El tratamiento etiológico es necesario, pero no siempre va a

solucionar la presencia de la úlcera crónica. El tratamiento local sigue una serie de intervenciones, como lo son:

1) Aliviar la presión del pie, con reposo, uso de calzado cómodo y si es necesario el uso de bastón.

2) Desbridamiento o remoción quirúrgica del tejido necrótico del pie. El desbridamiento también puede ser no quirúrgico dependiendo del grado de lesión. En úlceras diabético-isquémica se utiliza desbridamiento enzimático con colagenasa (Iroxol mono). También se utiliza el desbridamiento autolítico que básicamente es, generar un ambiente húmedo con apósitos, o hidrogeles para favorecer el desbridamiento natural del organismo.

3) Drenaje y lavado de la herida con solución salina.

4) Manejo de la infección. Los antibióticos deben utilizarse teniendo en cuenta que la mayoría de las infecciones superficiales son producidas por gérmenes gram positivos y las profundas por una asociación de gram positivos, gram negativos y anaerobios. Si las infecciones son limitadas se utilizan antibióticos orales, pero si son sistémicas se utilizan antibióticos parenterales.

5) Mejorar el flujo vascular. La pentoxifilina se ha utilizado con la intención de mejorar la llegada de sangre a nivel distal y mejorar las condiciones hemorreológicas.

Cuando todas estas intervenciones fracasan terminan con la amputación (Carlos Beltrán B., 2001).

Aunque los principios estándar de tratamiento de una herida (desbridamiento, tratamiento de la infección, descarga, uso de vendajes adecuados) son aplicables a las heridas crónicas, se hace necesario la identificación de los factores involucrados en la alteración del proceso de regeneración tisular, para buscar la mejor alternativa terapéutica para el paciente (Anderson & Hamm, 2012), evitar las recidivas y las amputaciones. Considerando que una herida se repara como resultado de un proceso altamente coordinado de respuestas celulares y bioquímicas altamente integradas, para favorecer el proceso de regeneración es necesario analizar estas etapas y cual de ellas se ve alterada en las heridas crónicas. La integración de la ingeniería biológica con los avances en la comprensión de los complejos mecanismos del proceso de curación de la herida ha generado el desarrollo de varias terapias “alternativas” como lo son: oxígeno hiperbárico, terapia de heridas mediante presión negativa, injerto de piel artificial, uso de células madres y factores de crecimiento.

A continuación se describen algunas de estas alternativas terapéuticas:

Terapia mediante presión negativa: la terapia de heridas mediante presión negativa es la aplicación controlada de presión subatmosférica a una herida mediante el uso de una bomba eléctrica y vendas especiales. Los estudios han sugerido que los efectos de la aplicación de presión negativa son: optimización del flujo sanguíneo, reducción de la inflamación, eliminación de fluidos potencialmente dañinos para la herida, estimulación de angiogénesis y del tejido de granulación y estimulación de la proliferación celular (Meloni et al.,

2015). La eficacia del método no esta tan clara, en algunos pacientes, se ha visto una reducción del tamaño de la herida y del tiempo de cierre de ésta (Eneroth & van Houtum, 2008). Esta estrategia no se puede utilizar en pacientes con infección ó daño isquémico y su uso esta restringido en aquellos que están bajo terapia anticoagulante (Meloni et al., 2015)

Terapia de oxígeno hiperbárico: La terapia con oxígeno hiperbárico (HBO) ha sido propuesta como una terapia efectiva para el tratamiento de las úlceras diabéticas desde hace más de 20 años (Baroni et al., 1987). El estudio Cochrane del año 2004, concluyó basado en los resultados de cuatro ensayos clínicos, que "la terapia con HBO redujo significativamente el riesgo de amputación mayor y puede mejorar las perspectivas de sanar a 1 año", pero, el pequeño número de estudios, el modesto número de pacientes, y algunos fallos metodológicos y de presentación de informes, exigen una interpretación cautelosa de los resultados (Kranke, Bennett, Roeckl-Wiedmann, & Debus, 2004). Una revisión sistemática agrupada en tres ensayos que incluyen 118 pacientes mostraron una reducción en el riesgo de amputación mayor, cuando se utilizó la terapia HBO complementaria a la terapia convencional, en comparación con cada terapia en forma separada (Abidia et al., 2003; C. E. Chen, Ko, Fong, & Juhn, 2010).

Apósitos biológicos mediante ingeniería tisular: Los productos de ingeniería tisular fueron inicialmente destinados a actuar como un sustituto de la piel. Entre estos se encuentran el Dermagraft (Avanzada BioHealing Inc) y Apligraf

(Novartis) los cuales están aprobados en los Estados Unidos. El Dermagraft, está compuesto de fibroblastos neonatales humanos en un soporte de poliglactina. Está indicado para las úlceras del pie diabético con una evolución de 6 semanas, con lesiones que se extienden a través de la dermis, sin afectar al tendón, músculo y/o hueso (Marston, 2004; Naughton, Mansbridge, & Gentzkow, 1997). Apligraf, es un equivalente dérmico alogénico derivado de fibroblastos cultivados en una matriz de colágeno y queratinocitos. Está indicada en el tratamiento de las úlceras del pie diabético de más de 3 semanas de duración, que no han respondido a la terapia convencional y que se extienden a través de la dermis (Edmonds & Apligraf, 2009; "Expert Recommendations for Optimizing Outcomes Utilizing Apligraf (R) for Diabetic Foot Ulcers," 2012; Pham et al., 1999).

El uso de piel o apósitos obtenidos por ingeniería de tejidos ha demostrado mejorar la tasa de curación de las úlceras y se traduce en menores tasas de osteomielitis, tanto Dermagraft y Apligraf han demostrado su eficacia en ensayos clínicos (Armstrong, 2006; Dinh & Veves, 2006; Park & Hay, 2003). Aunque no estimulan la antigenicidad, su uso está limitado porque este material se construye a partir de células humanas vivas que no pueden ser esterilizadas, por lo tanto existe preocupación por la bioseguridad y el riesgo de transmisión de infecciones, rechazo al injerto y formación de tumores. Considerando que esta tecnología contiene células vivas, son de un costo considerable y se deben conservar bajo las condiciones adecuadas, además su vida media es corta, sólo

se recomienda en pacientes con extensas lesiones y que no han respondido a otro tipo de tratamiento.

Uso de células madre: Se ha demostrado que las células madre se movilizan hacia el tejido isquémico y secretan citoquinas y factores de crecimiento que promueven la angiogénesis y la remodelación de la matriz extracelular, favoreciendo un entorno propicio para la cicatrización de las lesiones. Existen una serie de trabajos que demuestran el uso de distintas poblaciones celulares en pacientes con pie diabético (M. D. Li, Atkins, & Bubela, 2014); éstos se pueden clasificar en base a su origen en células madre alogénicas y autólogas (Zhou, Zhang, & Qian, 2016).

Las células madre alogénicas incluyen la placenta o las células madre mesenquimales derivadas del amnios y del embrión. Las células madre autólogas incluyen, células derivadas de médula ósea, sean estas células progenitoras endoteliales (EPC), células madre mesenquimales de la médula ósea (BM-MSK), células hematopoyéticas (HSC), o las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (Bakhshayesh, Soleimani, Mehdizadeh, & Katebi, 2012; H. Li et al., 2006). El uso de células madres adultas (células mesenquimales, mononucleares) ha demostrado ser útil para el tratamiento de las úlceras del pie diabético ya que aumentan el flujo de sangre y favorecen la curación de las lesiones (H. Li et al., 2006).

Resultados similares hemos obtenido en nuestro laboratorio utilizando implantes de células mesenquimales diferenciadas a endotelio provenientes de

cordón umbilical humano. Los resultados indican que las células madres mesenquimales diferenciadas a endotelio favorecen la regeneración tisular en un modelo de ratón no diabético (Aguilera et al., 2014). Los ratones que recibieron células endoteliales diferenciadas desde células mesenquimales de cordón umbilical humano, muestran un aumento en la velocidad de cierre cercano al 50%. La observación microscópica de los tejidos muestran un aumento en el número y densidad de los vasos sanguíneos, asociado con un cambio en el grosor de la dermis y epidermis. Sin embargo, el tejido muestra un escaso número de células humanas en tejido de ratón, sugiriendo que el efecto observado depende de los factores secretados por las células localizadas en el tejido. Otros resultados de nuestro laboratorio confirman que son los factores secretados por las células endoteliales derivadas de células mesenquimales las que inducen regeneración tisular. Al respecto, existen diversos antecedentes bibliográficos en relación al uso de factores de crecimiento o citoquinas utilizados como terapia en el manejo del pie diabético (Bakhshayesh et al., 2012).

A continuación se describen algunos resultados en relación al uso de estos factores en el tratamiento de heridas crónicas.

Citoquinas y factores de crecimiento: Estos factores desempeñan un papel importante en la reparación de heridas ya que estimulan la quimiotaxis, favorecen la proliferación celular, la formación de matriz extracelular y la angiogénesis y permiten la cicatrización de las heridas. La eficacia de este tipo

de terapia ha sido demostrada tanto *in vivo* e *in vitro*. Los factores de crecimiento que pueden ser útiles para el tratamiento de las úlceras del pie diabético son: PDGF, EGF, FGF y TGF- β 1 (Bakhshayesh et al., 2012; Barrientos, Brem, Stojadinovic, & Tomic-Canic, 2014; Barrientos et al., 2008).

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas. PDGF recombinante humana (rh PDGF-BB) (becaplermina) es un factor de crecimiento generado por ingeniería genética, promueve la cicatrización de heridas cutáneas mediante el aumento en la proliferación y migración de los fibroblastos dérmicos y favorecer el depósito de matriz extracelular. Por lo tanto, conduce a la mejora de los procesos de curación de heridas, crecimiento y la reparación celular. Un primer estudio evaluó la eficacia y la seguridad de rhPDGF-BB, muestran que de un total de 382 pacientes, becaplermina en gel disminuyó en un 50% de úlceras diabéticas crónicas (Margolis, Bartus, Hoffstad, Malay, & Berlin, 2005).

Factor de crecimiento epidérmico: El efecto curativo de EGF humano recombinante (EGFhr) fue evaluado en un total de 61 diabéticos, los cuales fueron asignados al azar en tres grupos. El uso de EGFhr mejoró la tasa de curación en comparación con los otros tratamientos (Fernandez-Montequin et al., 2009; Kusumanto et al., 2006). Heberprot-P, EGF recombinante inyectable ha logrado cicatrizar la UPD en 3 meses con una efectividad de un 70% en el cierre de heridas, una tasa de disminución de las amputaciones de un 30% y con una baja tasa de reincidencia. Hasta ahora Heberprot-P es una de las terapias convencionales que ha demostrado tener el mayor éxito (Berlanga et al., 2013;

Pai-Dhungat & Parikh, 2015). Las desventajas de su uso están asociadas a sus efectos adversos, siendo el dolor el principal de ellos y la necesidad de múltiples aplicaciones, 2 veces por semana, en un promedio de 14 semanas de tratamiento (Fernandez-Montequin et al., 2009).

Factor de crecimiento de fibroblastos: El uso trafermina (bFGF recombinante humano) favorece la regeneración tisular en pacientes úlcera en el pie, que no responden a tratamiento. La recuperación de la extremidad se logró en seis de los siete pacientes dentro de un tiempo medio de 8,3 meses (Ichioka, Ohura, & Nakatsuka, 2005). Estudios de Fase III, en el que se evaluó la capacidad e regeneración periodontal de trafermina en 323 pacientes, demostraron su eficacia comparado con el tratamiento convencional (Kitamura et al., 2016)

Factor de crecimiento endotelial vascular: Los estudios experimentales han sugerido que el VEGF tiene un efecto beneficioso en la curación de heridas mediado por un aumento local de los factores de crecimiento y por movilización de células derivadas de la médula ósea, que contribuyen a la formación de vasos sanguíneos, y su reclutamiento hacia el ambiente local de la herida, donde son capaces de acelerar la reparación. Así, telbermina es un VEGF recombinante que favorece la recuperación completa dentro de las 6 semanas en un 41,4% de los sujetos (Kusumanto et al., 2006).

Concentrado de plaquetas: El concentrado plaquetario es un producto autólogo ofrecido por un grupo de centros de cuidado de heridas (Mehrannia, Vaezi, Yousefshahi, & Rouhipour, 2014; Saad Setta, Elshahat, Elsherbiny,

Massoud, & Safe, 2011). Un estudio retrospectivo ha demostrado la utilidad de un concentrado plaquetario para el tratamiento de úlceras diabéticas (Kakagia et al., 2007). El uso del sobrenadante de plaquetas, muestra una tasa de curación a las 20 semanas en el 71% de las lesiones en el grupo con tratamiento (T. M. Chen, Tsai, & Burnouf, 2010). Sin embargo, de acuerdo al estudio Cochrane, la calidad de la evidencia científica que apoya estos resultados es cuestionable y requieren de ensayos clínicos mejor diseñados (Martinez-Zapata et al., 2016).

Un dato importante de destacar es que todos estos factores siempre han sido utilizados en forma aislada, nunca se han analizado si existe un efecto sinérgico en la utilización de 2 o más factores en conjunto.

En la actualidad están en desarrollo diversos productos biofarmacéuticos que tienen como blanco el tratamiento de heridas crónicas. Si bien, se ha avanzado mucho en la comprensión de los mecanismos responsable de la cicatrización de las heridas crónicas, con un importante énfasis en el pie diabético aún faltan productos que permitan restaurar el ciclo completo del proceso de cicatrización de heridas. Por otro lado, los nuevos tratamientos son caros y esto limita su uso en el cuidado del pie diabético. A pesar del costo económico de éstos productos, diversos estudios han demostrado que, finalmente son rentables ya que bajan la carga económica total del pie diabético.

El desarrollo de futuros tratamientos puede implicar diferentes métodos, como la entrega de factores de crecimiento, la liberación controlada por los

mediadores químicos asociados con factores angiogénicos, sin embargo, todos estos métodos necesitan de una evaluación cuidadosa antes de ser aplicados a la curación de úlceras

CELULAS MADRE:

Las células madres son aquellas células que pueden promover su auto-renovación, también pueden mantener la integridad de los tejidos mediante la generación de células hijas destinadas a diferenciarse en distintos linajes y convertirse en células especializadas, morfológica y funcionalmente.

De acuerdo con su estado evolutivo, las células madre se clasifican en: a) embrionarias, b) perinatales y c) somáticas o adultas. En relación a su potencial de diferenciación las células madre se pueden clasificar en: a) células madre totipotenciales, capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario y con esto un organismo completo; b) células madre pluripotenciales, con habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias, Ectodermo, Mesodermo y Endodermo y c) células madre multipotenciales, capaces de diferenciarse a tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria (Trounson & DeWitt, 2016).

Tradicionalmente se ha considerado a las células madre embrionarias como células pluripotenciales, a diferencia de las células madres adultas que se han caracterizadas sólo como multipotenciales. Sin embargo, trabajos publicados recientemente sugieren que la potencialidad de algunos tipos de células madre adultas podría ser mayor de lo esperado, ya que existen células madre

pluripotenciales en órganos adultos con la capacidad de diferenciarse a tejidos derivados de cualquiera de las capas embrionarias (Krause et al., 2001).

Una célula madre adulta es una célula inmadura que se ubica entre células diferenciadas en un tejido u órgano específico. Estas pueden auto-renovarse y diferenciarse hacia linajes celulares más especializados. El principal rol de las células madres adultas en el organismo es la mantención y reparación de los tejidos en los cuales se sitúan. Se han encontrado células madres adultas en muchos tejidos, al parecer cada tejido posee un pool de células madres destinado a cuidar la integridad del tejido u órgano en el cual se ubican. Es por esto, que las células madres adultas han sido estudiadas y utilizadas con fines terapéuticos, ya que, son capaces de regenerar células y tejidos dañados, pero a diferencia de la célula madre embrionaria, su capacidad de proliferación no es indefinida (The National Institutes of Health).

En 1960, se descubrió que la médula ósea contenía al menos dos tipos de células madres. Una población llamada célula madre hematopoyética (HSC), las cuales son las encargadas de formar todos los linajes de las células sanguíneas y células progenitoras endoteliales. Pocos años más tarde se descubrió una segunda población llamada células madre estromales, que también son designadas como células madre mesenquimales, MSCs (Pittenger et al., 1999).

CELULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células madres mesenquimales (MSCs) son un grupo heterogéneo de

células madres adultas que fueron caracterizadas hace más de 40 años por Friedenstein quien las aisló de médula ósea y las describió como células adherentes de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos (Grosicki et al., 2015). El considerable potencial terapéutico de estas células ha generado un marcado incremento en el interés de usarlas en una variedad de disciplinas biomédicas y junto a esto, ha surgido la necesidad entre los investigadores de buscar nuevas herramientas para su aislamiento, expansión y caracterización.

En el 2006 la Sociedad Internacional de Terapia celular propuso tres criterios que debían cumplir las MSCs para ser definidas como tal, estos son (Dominici et al., 2006):

1. Ser capaces de adherirse al plástico en condiciones de cultivo estándar.
2. Expresar antígenos de superficie específicos. Donde más del 95% de las células deben ser positivas para CD105, CD73 y CD90 y menos del 2% positivas para CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA clase II.
3. Deben ser capaces de diferenciarse hacia Osteocitos, Condrocitos y Adipocitos en medios de cultivo de diferenciación estándar y estos cambios ser detectados por tinciones especiales.

La médula ósea es considerada como la fuente principal para el aislamiento de este tipo de células, debido a la posibilidad de aislarlas con alta eficiencia y su capacidad de diferenciación a diversos tipos celulares. No obstante, la médula

ósea como fuente de aislamiento de MSCs, presenta dos limitaciones importantes; la toma de muestra, es un procedimiento invasivo y además, existe una disminución de la capacidad de proliferación y diferenciación de estas células en donantes de mayor edad. Por esto, se han buscado fuentes alternativas para la obtención de MSCs como son placenta (Parolini et al., 2008) y cordón umbilical (Rocha et al., 2004) ya sea, desde la sangre como desde su matriz o gelatina de Wharton (La Rocca et al., 2009). Estas alternativas corresponden a fuentes prometedoras de aislamiento de estas células, debido a que su obtención no involucra ningún riesgo para el donante y su utilización provoca menos debate ético, ya que, pueden ser aisladas de partos normales, a partir de tejido que es considerado como material de desecho.

CELULAS MESENQUIMALES DE GELATINA DE WHARTON (hWMSC)

Las células madre de la gelatina de Wharton (hWMSC) se localizan en la matriz existente entre los vasos del cordón umbilical (Mitchell et al., 2003). Las hWMSC se caracterizan porque: i) Expresan en su superficie diversos marcadores característicos de las células Mesenquimales (SH2, SH3, CD10, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, CD166), siendo negativas para marcadores del linaje hematopoyético (CD31, CD34, CD38, CD40 y CD45) (Maleki, Ghanbarvand, Reza Behvarz, Ejtemaei, & Ghadirkhomi, 2014) ii) Presentan capacidad de diferenciarse hacia la línea osteogénica, adipogénica y condrogénica (Wang, Wu, Wang, Lin, & Sun, 2009; Weissman, Anderson, & Gage, 2001).

POTENCIAL TERAPÉUTICO DE CÉLULAS MESENQUIMALES AISLADAS DE GELATINA DE WHARTON HUMANA.

En aproximadamente el 99% de los partos, los cordones umbilicales y con esto las células madre son desechados como residuos médicos. La facilidad en la obtención de las células madre aisladas de gelatina de Wharton de cordón umbilical humano sobre las células madre adultas (médula ósea, tejido adiposo), unido a la gran capacidad de expansión representan una fuente casi inagotable de células madre para terapias celulares tanto autólogo como alogénico, conformándose así en un producto prometedor en la ingeniería de tejidos.

Las hWMSCs han sido utilizadas para reparar tejido isquémico, ya que promueven la neovascularización (Ghazaryan et al., 2016; Hamou et al., 2009; Izmirli et al., 2016), aceleran la reendotelización e inhibe la hiperplasia de la neointima (A. K. Kim et al., 2016). Sugiriendo que el uso de hWMSCs puede ser una estrategia terapéutica viable y eficiente para la prevención de reestenosis después de procedimientos de revascularización, como son la angioplastia transluminal percutánea, colocación de *stent* y aterectomía (A. K. Kim et al., 2016). Por otro lado, estudios *in vitro* e *in vivo*, revelan la capacidad de hWMSCs de diferenciarse a células productoras de insulina y con esto su potencial uso en terapia en diabetes (Yang et al., 2015). Al mismo tiempo, se ha estudiado el potencial de estas células de diferenciarse hacia condrocitos (Karlsson et al., 2007; Leyh et al., 2014).

Estos antecedentes sugieren el uso potencial de las células hWMSCs en regeneración y reparación tisular, debido a su alto potencial angiogénico. ***Sin embargo, su uso nos plantea la siguiente interrogante, son las células madres las que inducen y promueven la neovascularización, o bien son las factores secretados por estas?***

MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDADES METABÓLICAS.

Las enfermedades metabólicas, incluyendo la diabetes (y sus complicaciones), obesidad, dislipidemia y la hipertensión, son enfermedades comunes y que con frecuencia ocurren en combinación. Para estudiar estas enfermedades, se han reportado muchos modelos animales, tales como los ratón ob/ob, db/db, KK-Ay ratón, el modelo de rata Goto-Kakizaki (GK), rata obesas-diabética Zucker (ZDF), rata Otsuka-Largo-Evans-Tokushima (OLETF), el modelo de rata espontáneamente diabética Torii (SDT), ratas espontáneamente hipertensas (SHR), los modelos de conejo hiperlipidémico Watanabe (WHHL), y de hipertrigliceridemia postprandial (PHT). Por otro lado se han obtenido modelos generados por métodos químico (Por ejemplo, estreptozotocina (STZ), aloxano) y los modelos inducidos por dieta (Por ejemplo, alta sacarosa, rica en grasas, colesterol alto). Aunque las técnicas de biología molecular se han vuelto más importante para aclarar los mecanismos de las enfermedades, la importancia de los modelos animales no ha cambiado. Se necesitan modelos animales para revelar la subyacente fisiopatología de las enfermedades metabólicas; Este

enfoque proporciona información que es clave para el desarrollo de nuevas terapias y medicamentos para tratar estas enfermedades (Sasase, Yokoi, Pezzolesi, & Shinohara, 2015).

Modelos animales de diabetes tipo 2.

Como la diabetes tipo 2 está estrechamente vinculada a la obesidad, la mayor parte del modelos animales actuales de diabetes de tipo 2 son obesos. La obesidad puede ser el resultado de mutaciones que ocurren de forma natural o por manipulación genética. Alternativamente, la obesidad puede ser inducida por alimentación con alto contenido de grasa.

Modelos monogénicos de obesidad: Aunque la obesidad en los seres humanos es raramente causada por una mutación monogénica, modelos monogénicas de obesidad se utilizan comúnmente como modelo animal de diabetes tipo 2. Los mayoría de los modelos de obesidad monogénicos ampliamente utilizados son defectuosos en la señalización de leptina. La leptina induce la saciedad, y por lo tanto, la falta de leptina funcional en estos animales inducen hiperfagia y posteriormente obesidad. Estos modelos incluyen el ratón $Lep^{ob/ob}$, que es deficiente en leptina y el $LepR^{db/db}$ y la rata obesas-diabéticas Zucker (ZDF), que son deficientes en el receptor de leptina. Estos modelos se utilizan a menudo para probar nuevas terapias para la diabetes tipo 2 (Gault, Kerr, Harriott, & Flatt, 2011; Lindstrom, 2007; Oana et al., 2005; Yoshida et al., 2010).

El ratón $Lep^{ob/ob}$, es un modelo de obesidad severa que deriva de una mutación

espontánea de la cepa de ratones C57BL/6, descubierta en el año 1949. Recién en el año 1994 se identificó que la proteína mutada era leptina. El aumento de peso de estos ratones comienza a las dos semanas de edad, y desarrollan hiperinsulinemia. A las 4 semanas desarrollan hiperglicemia, aunque hay algunas alteraciones en la secreción de insulina, no hay grandes alteraciones en la función de la células beta pancreática por lo que la diabetes no es severa, por lo que este modelo no representa completamente la diabetes tipo 2 humana (Lindstrom, 2007).

El ratón $Lepr^{db/db}$ se debe a una mutación autosómica recesiva en el receptor de leptina. Estos animales son hiperfágicos, obesos, con hiperinsulinemia e hiperglicemia. La obesidad es evidente a partir de 3-4 semanas de edad con hiperinsulinemia cada vez más evidente en alrededor de 2 semanas de edad y el desarrollo de hiperglucemia a 4-8 semanas y desarrollar cetosis después de unos meses de edad y tienen una vida útil relativamente corta. La cepa comúnmente utilizada es C57BLKS/J (King, 2012).

Ratas obesas Zucker y ratas obesas-diabéticas Zucker (Oana et al., 2005).

Las Ratas obesas Zucker fueron descubiertos en 1961, tienen una mutación en el receptor de leptina, esta alteración induce hiperfagia, y la ratas se vuelven obesas alrededor de 4 semanas de edad. Estas ratas también son hiperinsulinémicas, hiperlipidémicas e hipertensos y tienen dañada la tolerancia a la glucosa. Una mutación a esta cepa, deriva en una subcepa con un fenotipo diabetogénico llamado ratas obesas-diabéticas Zucker (ZDF). Estas ratas son

menos obesas, que las ratas obesas Zucker, pero tienen una severa insulino resistencia la cual no son capaces de compensar debido a un incremento de la apoptosis de las células beta pancreáticas. Este modelo se caracteriza por una hiperinsulinemia inicial, seguida por una disminución en los niveles de insulina⁴⁶. La diabetes se desarrolla a las 8-10 semanas en los machos, pero las hembras no desarrollan una manifiesta diabetes. Esta cepa también desarrolla signos y síntomas de las complicaciones de la diabetes (Shibata et al., 2000).

Modelos poligénicos de obesidad: los modelos poligénicos de obesidad proporcionan mayor precisión y similitud a la condición humana. La variedad de diferentes modelos de ratón de obesidad poligénica, intolerancia a la glucosa y diabetes, permiten tener una variedad de genotipos y susceptibilidades. Sin embargo, a diferencia de los modelos monogénicas, no hay controles de tipo salvaje. Además, el sesgo de sexo masculino es más extremo en estos modelos (Leiter, 2009). Dentro de los modelos poligénicos encontramos:

Ratón KK: esta cepa de ratón es ligeramente obesa e hiperleptinémica. Desarrollan hiperinsulinemia y resistencia a la insulina en tejido adiposo y muscular.

Rata OLETF: Derivada de una cepa de rata que desarrolló diabetes en forma espontánea no insulino dependiente (Schroeder, Moran, & Weller, 2010). La cepa OLETF tiene obesidad leve. Las ratas OLETF son hiperfágicas desde el

nacimiento y desarrollan una mayor adiposidad e hipertrofia adipocitaria a partir de la semana 1 postnatal, debido a que tiene un defecto congénito en la expresión del gen del receptor de colecistocinina-1 (CCK1) (Schroeder et al., 2010). A las 18 semanas de edad desarrollan hiperglicemia con un curso crónico de la enfermedad. A las 40 semanas, se observan cambios histológicos en los islotes pancreáticos que terminan convirtiéndose en tejido fibrótico con una evidente atrofia del tejido (Kawano, Hirashima, Mori, & Natori, 1994)

Ratón obeso New Zealand: Este modelo es de un ratón obeso con hiperfagia e hiperleptinemia, debido a una resistencia a leptina periférica. Estos ratones son hiperinsulinémicos y con resistencia hepática a la insulina debido en una falla en los mecanismo de regulación de la enzima fructosa 1,6 bifosfatasa, generando alteraciones a la tolerancia a la glucosa (King, 2012).

Además de estos modelos, se han descrito los modelos de ratón *TallyHo/Jng* y *NoncNZO10/LtJ* (King, 2012).

Modelos por alimentación rica en grasa.

El modelo de alimentación rico en grasa fue descrito por primera vez en ratones C57BL/6 el año 1988 (Surwit, Kuhn, Cochrane, McCubbin, & Feinglos, 1988). La alimentación alta en grasas puede conducir a obesidad, hiperinsulinemia y a una alterada homeostasis de la glucosa debido a la insuficiente compensación por los islotes pancreáticos (Winzell & Ahren, 2004). La alimentación “normal” compuesta por alrededor de 25% de proteínas, 63% de carbohidratos y 5% de grasa, es reemplazada por una dieta que aumenta el porcentaje de grasa

(38,5%). Los ratones alimentados con una dieta alta en grasa suben de peso y el aumento de peso se asocia con resistencia a la insulina, y a la falta de compensación de las células beta, lo que conduce a intolerancia a la glucosa. La cepa de fondo utilizada, puede determinar la susceptibilidad a los cambios metabólicos inducidos por la dieta, por lo tanto los cambios pueden no detectarse en algunas cepas que son más resistentes (Surwit et al., 1995). También se ha demostrado que existe heterogeneidad de la respuesta a una alimentación alta en grasa en una misma cepa consanguínea, lo que indica que las respuestas diferenciales a una dieta alta en grasas no son puramente genética (Burcelin, Crivelli, Dacosta, Roy-Tirelli, & Thorens, 2002).

Modelos no obesos de diabetes tipo 2.

No todos los pacientes con diabetes tipo 2 son obesos, por lo tanto es importante incluir modelos de estudio que no desarrollen obesidad. Estos modelos en general tienen una respuesta inadecuada de las células beta pancreáticas, que es lo que en última instancia conduce a la diabetes tipo 2 en los seres humanos (King, 2012).

Existen diferentes modelos de diabetes tipo 2, la elección del modelo depende del propósito para el cual quiere ser utilizado; efecto de algún fármaco, estudios genéticos o la comprensión de algunos mecanismos involucrados en la patología. Es importante tener en cuenta los mecanismos subyacente a la hiperglucemia y si esto es relevante para el estudio. Estos mecanismos pueden incluir insulina resistencia y/o insuficiencia de las células beta pancreáticas. Por

otro lado, la gran mayoría de los modelos de diabetes tipo 2 son obesos, sin embargo, esto por lo general viene con una variedad de patologías asociadas, tales como la dislipidemia y aterosclerosis. Aunque estas co-morbilidad son comunes en algunos seres humanos con diabetes tipo 2, sólo se representa en una porción de la población diabética. Además, cabe señalar que no todos los modelos animales de diabetes desarrollan complicaciones diabéticas (por ejemplo, la cepa C57BL/6 es relativamente resistente a nefropatía) (Alpers & Hudkins, 2011; Brosius et al., 2009), así que, se debe tener cuidado en la elección de un modelo apropiado si el punto final de el estudio es investigar las complicaciones diabéticas tales como nefropatía o neuropatía (Chow & Allen, 2015; O'Brien, Sakowski, & Feldman, 2014; Sullivan et al., 2007; Sullivan, Lentz, Roberts, & Feldman, 2008)

Modelo animal de diabetes tipo 2 para el estudio de la neuropatía diabética periférica (DPN):

Para caracterizar completamente DPN en modelos de ratón, es necesario caracterizar el fenotipo metabólico. Los pesos corporales, la glucosa en sangre en ayuno, y la tolerancia alterada a la glucosa (IGT) son medidas longitudinalmente. En los ratones, el inicio de la diabetes es típicamente definido cuando, los niveles glucemia en ayunas superan 150 mg /dL (Sullivan et al., 2007). Este mismo estudio indica que los niveles de glicemia o más bien la mantención de una hiperglicemia, son cruciales para el desarrollo de DPN (O'Brien et al., 2014).

Modelos de DPN: El modelo de diabetes tipo 2 monogénico desarrolla neuropatía diabética periférica, y se considera un buen modelo porque desarrollan hiperalgesia e hiperglicemia crónica (O'Brien et al., 2014), pero pierde la combinatoria de efectos dado por la genética y el ambiente en el desarrollo de diabetes .

Los ratones alimentados con una dieta alta en grasa (HFD) que posteriormente desarrollan obesidad inducida por la dieta (DIO) son excelentes como modelo de la fisiopatología neurológica en prediabetes (O'Brien et al., 2014). A diferencia de los ratones db/db y ob/ob que son diabéticos a las 4 semanas de edad y esencialmente eluden la etapa de prediabetes, los ratones alimentados con HFD-tienen un inicio gradual, con desequilibrios metabólicos que son más característicos de la condición humana. Los ratones alimentados con una dieta HFD muestran aumento de peso, incremento de la adiposidad, hiperinsulinemia moderada, e intolerancia a la glucosa (Coppey, Davidson, Lu, Gerard, & Yorek, 2011). Diversos estudios muestran que el uso de dieta alta en grasa predispone al desarrollo de DPN, incluso antes de establecerse el estado de diabetes (Tabla 1.3) y que el tiempo de dieta alta en grasa y el tipo, es fundamental en el desarrollo de DPN, el cual se ve favorecido por el estrés oxidativo inducido por esta alimentación. Por otro lado las características de este modelo le permite ser utilizado, para el análisis de fármacos o biofármacos que pueden ser utilizados en el tratamiento de heridas crónicas (Nunan, Harding, & Martin, 2014).

Tabla 1.3: Modelos de ratones diabéticos inducidos por dieta alta en grasas (O'Brien et al., 2014).

Chow			Mice		Paradigm			Neuropathy phenotype ^a			Reference
Fat	Chow supplier	Primary fat source	Strain	Sex	HFD initiation, wks	HFD duration, wks	Final age, wks	Behavior	NCV	Anatomy	
45%	Research Diets D12451	Lard	C57BL/6	Male	3	34	38	Thermal hypoalgesia (12 wks)	↓ MNCV (12 wks) ↓ SNCV	↓ IENFD	Vincent, Hayes 2009
			C57BL/6	Male	12	12	24	Thermal hypoalgesia (6 wks)	↓ SNCV Ns Δ MNCV (6 wks)	↓ IENFD	Coppey et al. 2011
			C57BL/6	Male	12	12	24	Thermal hypoalgesia	↓ SNCV Ns Δ MNCV	↓ IENFD	Coppey et al. 2012
54%	Harlan Teklad TD.07011	Vegetable oil	C57BL/6	Male	7	8	15	Tactile allodynia Absent thermal hypoalgesia	↓ MNCV Ns Δ SNCV	Ns Δ IENFD	Guilford et al. 2011
58%	Research Diets D12330	Coconut oil	C57BL/6	Male	—	16	—	Mechanical hypoalgesia Thermal hypoalgesia	↓ MNCV ↓ SNCV	—	Lupachyk, Watcho, Obrosova et al. 2013
			C57BL/6	Male	—	23	—	Mechanical hypoalgesia (16 wks) Thermal hypoalgesia (16 wks) Tactile allodynia (16 wks)	↓ MNCV ↓ SNCV	—	Watcho et al. 2010
			C57BL/6	Female	—	16	—	Tactile allodynia Thermal hypoalgesia	↓ MNCV ↓ SNCV	Ns Δ IENFD	Stavniichuk et al. 2010
			C57BL/6	Female	—	16	—	Tactile allodynia Thermal hypoalgesia	↓ MNCV ↓ SNCV	—	Obrosova et al. 2007

HFD, high-fat diet; IENFD, intraepidermal nerve fiber density; MNCV, motor nerve conduction velocity; NCV, nerve conduction velocity; Ns Δ, no significant change; SNCV, sensory nerve conduction velocity.
^a Phenotyping was performed at final age unless indicated otherwise.

MODELOS ANIMAL DE HERIDAS

El objetivo de los modelos de cicatrización de heridas animales es replicar la fisiología humana y predecir los resultados terapéuticos. La mayoría (78%) de los modelos de heridas en animales utilizan roedores con heridas incisionales (Pierce et al., 1988), excisionales (Shaw & Martin, 2009a), o quemaduras para evaluar el proceso de regeneración tisular. Los modelos de roedores han sido criticados porque el principal mecanismo de cierre de heridas es la contracción, mientras que en humanos la reepitelización y la formación de tejido de granulación son los principales mecanismos implicados (Galiano, Michaels, Dobryansky, Levine, & Gurtner, 2004). Actualmente no existe un modelo de

cicatrización de heridas en roedores que sea muy similar a la curación de heridas humanas. Sin embargo, los roedores siguen siendo los candidatos más atractivos para los estudios de curación de heridas debido a su disponibilidad, bajo costo y facilidad de manejo.

A continuación se describen los modelos *in vivo* más utilizados en investigación de la reparación de heridas.

Heridas excisionales.

Las heridas excisionales, son heridas de mayor grosor que dañan diversas estructuras celulares, lo cual permite evaluar diferentes procesos como, epitelización, contracción. Reconstitución dérmica, inflamación, quimiotáxis angiogénesis, producción y organización de la matriz, como también resultados cosméticos y funcionales. La eficacia curativa de diferentes tipos de vendajes, sustitutos dérmicos y agente terapéutico local y externo puede ser investigada por este modelo (Avcı et al., 2013). Muchas de las especies utilizadas para investigación del cierre de heridas (ratón, rata, conejillo de indias, conejo, y hámster), tienen un músculo subcutáneo que contribuye a la reparación mediante la contracción y la formación de colágeno (Shaw & Martin, 2009b). Esta estructura está ausente en los seres humanos, generando un desafío el uso de este tipo de animal para el estudio de cicatrización de herida, sin embargo aún se sigue utilizando ya que es adecuado para la evaluación histológica del tejido, debido a los cambios morfológicos más amplios que ocurren durante el proceso de cicatrización de heridas (Liu et al., 2013). Así, las

apariencias visibles y las mediciones de la contracción de la herida se convierten en parámetros confiables en la evaluación macroscópica para la cicatrización de heridas (Liu et al., 2013).

Para solucionar este inconveniente se han desarrollado distintas estrategias, una de ellas es el uso de una férula de silicona en la herida, la cual ha permitido generar un modelo más preciso y reproducible de cicatrización de heridas que facilita la cicatrización de heridas "humanizadas" a través de los procesos de granulación y reepitelización (Isakson, de Blacam, Whelan, McArdle, & Clover, 2015). Otra alternativa es utilizar como modelo animal el cerdo. Anatómica y fisiológicamente, la piel de cerdo es similar a la piel humana y se ha encontrado que el modelo porcino es una excelente herramienta para la evaluación de agentes terapéuticos destinados a ser utilizados en heridas humanas (Avci et al., 2013).

El uso de un solo factor de crecimiento para promover el cierre de una herida ha sido controversial. Esto no es sorprendente considerando que el proceso de cicatrización resulta de una compleja red de interacciones entre factores solubles (citoquinas, factores de crecimiento), células y formación de matriz extracelular (Singer & Clark, 1999). Esto permite sugerir que tal vez la combinación de varios factores de crecimiento entregados en distintos tiempos podría promover el proceso de cicatrización. Así mismo, se ha demostrado el efecto sinérgico de la combinación de factores de crecimiento en el cierre de la herida (Pierce & Mustoe, 1995).

Heridas Incisionales.

Las heridas incisionales son aquellas en las cuales se realiza un corte en la piel del animal, provocando la apertura de la piel, sin retirar ningún fragmento de ésta, a diferencia de las heridas excisionales (Liu et al., 2013). El objetivo primario de este tipo de heridas es evaluar la fuerza tensora de la piel tras una herida. En general las incisionales oscilan entre 10 y 15 mm de longitud, generalmente son de espesor total y se induce bisturí. Sin embargo, alrededor de un tercio de los estudios emplean sutura para cerrar los márgenes de la herida. Curiosamente, se ha demostrado que el tamaño, la periodicidad y el tipo de sutura empleados alteran significativamente las fuerzas de tracción de la piel herida

Frente a estos dos tipos de modelos de heridas se han generado algunas controversias en relación al cual de ellos es mejor, cual de ellos tiene menor variabilidad en un mismo individuo o entre individuos, o bien si es mejor realizar estudios planimétricos (fotografías seriadas de la herida en el tiempo) o bien análisis histológicos. Un estudio realizado el que se comparan los dos modelos de heridas, señala que el modelo de herida excisional muestra una menor variabilidad en los datos de determinación de cierre de la herida utilizando la determinación planimétrica, pero que sin embargo al realizar una comparación de la herida (excisional o incisional) desde el punto de vista histológico no se observan diferencias entre estos dos modelos. Finalmente se concluye que las heridas excisionales son adecuadas para el análisis

planimétrico, pero las heridas incisionales muestran una mayor correlación entre los parámetros planimétricos e histológicos. Aún así los análisis histológicos independiente el tipo de herida, se considera un buen factor predictor del cierre de herida (Ansell, Campbell, Thomason, Brass, & Hardman, 2014). Los autores de este trabajo también concluyen que existe mucha variabilidad en el cierre de la herida entre individuos por lo sugieren que tal vez los modelos *in vitro* podrían reemplazar a los modelos animales por su mayor reproducibilidad (Ansell et al., 2014).



PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN.

Existe mucho interés en el estudio de las complicaciones diabéticas y en especial en las causas que originan el pie diabético; esto ha permitido un importante avance en la búsqueda de alternativas de tratamiento que incluyen técnicas quirúrgicas, uso de nuevos fármacos, empleo de factores de crecimiento y uso de células madres.

Aunque todos estos tratamiento parecen prometedores desde los estudios *in vitro* y en modelos animales, esto no se ha traducido en tratamientos clínicos prácticos. Los pocos estudios que se han llevado a cabo en humanos con pacientes con pie diabético están restringidos a un pequeño número de pacientes. No existen en el mercado un gran número de productos que hallan demostrado una eficacia terapéutica en los ensayos controlados utilizando un número significativo de pacientes. Si bien existe un producto en el mercado (*Heberprot®*) que ha demostrado una gran eficacia en el tratamiento de la úlcera de pie diabético con una respuesta de eficacia cercana al 70% y una disminución de las amputaciones de un 30% (GARELLI & BULLO F. , 2012). El uso masivo del producto no ha ocurrido aún, por el costo y efectos adversos del tratamiento enfocados principalmente en el dolor causado por su uso y vía de administración (Gurri, 2014).

Por otro lado, el uso de células madres mesenquimales han resultado ser atractivas para el tratamiento de diversas patologías incluido su uso en el tratamiento de úlcera de pie diabético (Isakson et al., 2015). Diversos trabajos

publicados demuestran el uso de células madre derivadas de la médula ósea para el tratamiento de la isquemia de las extremidades (Tateishi-Yuyama et al., 2002; Q. Wu, Chen, & Liang, 2016). La inyección intramuscular mejora una serie de parámetros clínicos, como el aumento perfusión, disminución del dolor y disminución de tamaño de la úlcera (H. Li et al., 2006; Prochazka et al., 2009; Y. J. Wu, Chen, Scott, & Tredget, 2007). Un estudio aleatorizado más reciente evaluó la diferencia entre el efecto de células mesenquimales (BM-MSK) y mononucleares (MNC-BM) aisladas desde la médula ósea, en el tratamiento de heridas crónicas en pacientes con pie diabético. Los resultados demostraron tasas más rápidas de curación, así como mejora del flujo sanguíneo en extremidades inferiores (análisis de MRA vasos colaterales) en heridas tratadas con BM-MSK en comparación con las heridas tratadas con BM-MNC. Sin embargo, en todos los trabajos publicados se demuestra que el número de células recuperadas en el sitio de la lesión es muy bajo, lo cual sugiere que la participación de factores de crecimiento producidos por las células inyectadas como los responsables de contribuir al proceso de regeneración tisular.

Por otra parte, el proceso de regeneración fisiológico de las heridas agudas requiere del desarrollo de etapas finamente coordinadas las que involucran la secreción de componentes que permiten la proliferación células, la activación de la respuesta inmune, remodelación y síntesis de matriz extracelular, todas estas etapas coordinadas por la secreción de factores solubles. Las heridas crónicas como la úlcera de pie diabético, no siguen la

secuencia de procesos descrita previamente y no se suceden en forma armónica. Esta alteración lleva a que el proceso de regeneración se perpetúe en el tiempo quedando detenida en su fase inflamatoria. El trauma repetido y la infección persistente, entre otros, llevan a una actividad proteolítica mantenida, a lo que se agregan glicosilación de las proteínas de matriz y defectos funcionales de fibroblastos y neutrófilos propios de la diabetes. Con manejo adecuado, 80 a 85% de las úlceras crónicas termina cicatrizando; sin embargo, entre 15 y 20% no responde. En estos casos se ha demostrado la existencia de fibroblastos disfuncionantes y persistencia prolongada de enzimas proinflamatorias (Carlos Beltrán B., 2001).

Actualmente existen investigaciones en curso a nivel preclínico, sobre la utilidad de los factores de crecimiento angiogénicos, pero también a nivel clínico temprano. Los principales factores de crecimiento angiogénicos hasta ahora investigados incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblasto b (bFGF), factores de crecimiento epidermal y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Estos estudios muestran que las citoquinas favorecen la proliferación endotelial, aumentan la migración y la formación de tubos, e inducen neovascularización en modelos *in vivo*. Sin embargo, aún es cuestionable si la secreción elevada de estas moléculas tienen efecto en la neovascularización. Resultados de nuestro laboratorio, utilizando un modelo animal de herida, muestran que el uso de medios condicionados producidos por células endoteliales derivadas de células madres

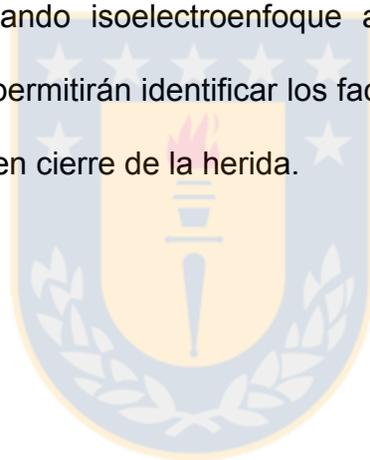
mesenquimales, obtenidas desde gelatina de Wharton (cordón umbical), favorecen la regeneración tisular, observándose una disminución en el tiempo de cierre de la herida. Análisis histológicos de los tejidos muestran un aumento en la migración celular concordante con el proceso de regeneración tisular (Aguilera et al., 2014). Estudios *in vitro*, realizados en nuestro laboratorio muestran que el medio condicionado endotelial podría estar favoreciendo la regeneración tisular por un mecanismo que involucra la estimulación de angiogénesis.

Los antecedentes anteriores, nos permiten sugerir que factores solubles secretados por células endoteliales derivadas de células mesenquimales, obtenidas desde gelatina de Wharton, permiten coordinar las etapas del proceso de regeneración tisular y promover angiogénesis.

Nos preguntamos: 1) ¿Que efecto tendrá el medio condicionado endotelial en la regeneración tisular en un modelo de herida de ratón con hiperglicemia? 2) ¿Qué factores proteicos secretados son producidos por las células endoteliales? 3) ¿Cuál o cuales de los factores proteicos son responsables de la reparación y regeneración de la Herida?.

Para responder estas interrogantes, proponemos determinar si el medio condicionado endotelial es capaz de inducir reparación tisular en un modelo de animal con hiperglicemia. Para estudiar el efecto del medio condicionado endotelial en la reparación tisular, desarrollaremos un modelo de animal con resistencia a la insulina a través del uso de dieta hipercalórica por un periodo

de tiempo de 2 meses. El modelo de animal será evaluado por medio de diferentes parámetros bioquímicos: glicemia, insulina, perfil lipídico. Una vez establecido el modelo, realizaremos un ensayo de herida in vivo, y evaluaremos el efecto del medio condicionado endotelial en el proceso de cicatrización tisular, analizaremos el tiempo de cierre de la herida y realizaremos estudios histológicos. Para identificar los factores secretados por las células endoteliales realizaremos un análisis proteómico a través del uso de array de factores angiogénicos y realizando isoelectroenfoque asociado a espectrometría de masa, estos ensayos permitirán identificar los factores proteicos candidatos que estarían involucrados en cierre de la herida.



PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es capaz el medio condicionado concentrado endotelial de favorecer el proceso de regeneración tisular en un modelo de herida de ratón con hiperglicemia inducida por dieta?

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Factores angiogénicos secretados al medio de cultivo, por células endoteliales favorecen el proceso de regeneración tisular en un modelo animal con hiperglicemia, inducido por dieta.



OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar la capacidad de regeneración tisular del medio condicionado endotelial (MCE) en un modelo de herida de animal con hiperglicemia, inducida por dieta, e identificar los factores solubles involucrados en este efecto.

Evaluaremos la capacidad del medio concentrado endotelial de inducir regeneración tisular *in vivo* en un modelo animal con hiperglicemia. Proponemos identificar los factores proteicos que forman parte del medio condicionado endotelial que inducen reparación y regeneración de la herida.

Nos proponemos responder:

¿El medio condicionado endotelial es capaz de inducir regeneración y reparación tisular en un modelo de herida de ratón con hiperglicemia?

¿Qué factores proteicos secretados son producidos por las células endoteliales?

¿Cuál o cuales de los factores proteicos son responsables de la reparación y regeneración de la Herida?.

Objetivos Específicos:

1. Desarrollar un modelo animal con hiperglicemia.
2. Evaluar el potencial de proliferación celular del medio condicionado endotelial *in vitro*.
3. Evaluar la capacidad de regeneración tisular del medio condicionado endotelial en la regeneración tisular en un modelo de animal con hiperglicemia inducida por dieta.
4. Identificar factores secretados al medio de cultivo por las células endoteliales.

MATERIALES Y MÉTODOS

METODOLOGIA

Modelo animal de hiperglicemia: Para responder al objetivo general planteado en la tesis, desarrollaremos un modelo animal con hiperglicemia, utilizando la cepa de ratones C57BL/6. La hiperglicemia será inducida por una alimentación alta en grasas. Los animales serán alimentados con una dieta alta en grasa por un periodo de 2 meses iniciando a las 4 semanas de vida. Antes del inicio de la dieta, al primer mes de dieta y al segundo mes de dieta se tomarán muestras de sangre en ayuna (8 horas de ayuna) para cuantificar los niveles de glicemia, perfil lipídico, insulina y perfil antioxidante (Figura 1).

Obtención del medio condicionado endotelial: Para evaluar el efecto del medio condicionado endotelial, obtendremos células mesenquimales desde la región llamada gelatina de Wharton presente en el cordón umbilical (las muestras de cordón umbilical provienen desde el hospital regional, y son obtenidas previa firma de un consentimiento informado). Una vez obtenidas las células mesenquimales, éstas serán diferenciadas a células endoteliales, para obtener el sobrenadante de cultivo de estas células. Para obtener el sobrenadante, las células se cultivarán por 24 horas en medio sin suero para evitar la interferencia del suero bovino fetal en los resultados posteriores. Para evaluar la especificidad del efecto del medio condicionado endotelial, además obtendremos, medio de cultivo de células mesenquimales y de células HUVEC

(células endoteliales de cordón umbilical). Estos dos últimos medios de cultivo condicionados serán parte de los controles (Figura 1).

Evaluar efecto de medio de cultivo endotelial en modelo de herida *in vitro*.

Para evaluar el efecto del medio de cultivo condicionado endotelial en modelos de herida *in vitro* utilizaremos células ECV-304. Los ensayos de herida se realizarán utilizando como soporte células ECV-304, y se realizará la herida con una punta estéril. Una vez realizada la herida, las células ECV-304 serán cultivadas en medio sin suero, medio con suero (control positivo y negativo) y medio sin suero conteniendo los respectivos medios condicionados obtenidos de células mesenquimales (MSC), endoteliales (Endo) y células HUVEC. Bajo estas condiciones evaluaremos capacidad de cierre de la herida tras 72 horas de cultivo y utilizando distintas concentraciones de los medios de cultivo condicionados. Además realizaremos ensayos para evaluar citotoxicidad de los medios condicionados (Figura 1).

Evaluar efecto de medio de cultivo endotelial en modelo de herida *in vivo*.

Para evaluar el efecto del medio de cultivo condicionado endotelial en modelos de herida *in vivo* realizaremos una herida excisional en la cepa de ratón C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa (ratón con hiperglicemia) y en animales alimentados con una dieta convencional (control). Ambos grupos serán divididos en forma aleatoria en 4 subgrupos de acuerdo a la intervención que se les aplicará. 1) grupo tratados con medio de cultivo, 2) Grupo tratado con

medio de cultivo endo, 3) grupo tratado con medio de cultivo MSC y 4) grupo tratado con medio de cultivo HUVEC. Posteriormente las heridas de los ratones serán fotografiadas temporalmente hasta el día del cierre total de la herida. Se analizará el cierre de la herida y además se realizará un análisis histológico del tejido (Figura 1). En total se utilizaron 4 animales para cada condición experimental, con un total de 32 animales.

Identificación de los factores secretados. Para identificar los factores secretados utilizaremos dos estrategias. La primera es realizar un *array* de factores angiogénicos en el medio condicionado Endo, MSC y HUVEC. Compararemos los resultados de estos tres *array* para buscar las diferencias entre estos e identificar aquellos presentes solo en el medio condicionado Endo. La segunda estrategia es analizar los medios condicionados Endo, MSC y HUVEC por isoelectroenfoque líquido y luego analizar la fracción “diferente” por espectrometría de masa para identificar el o los factor proteicos (Figura 1).

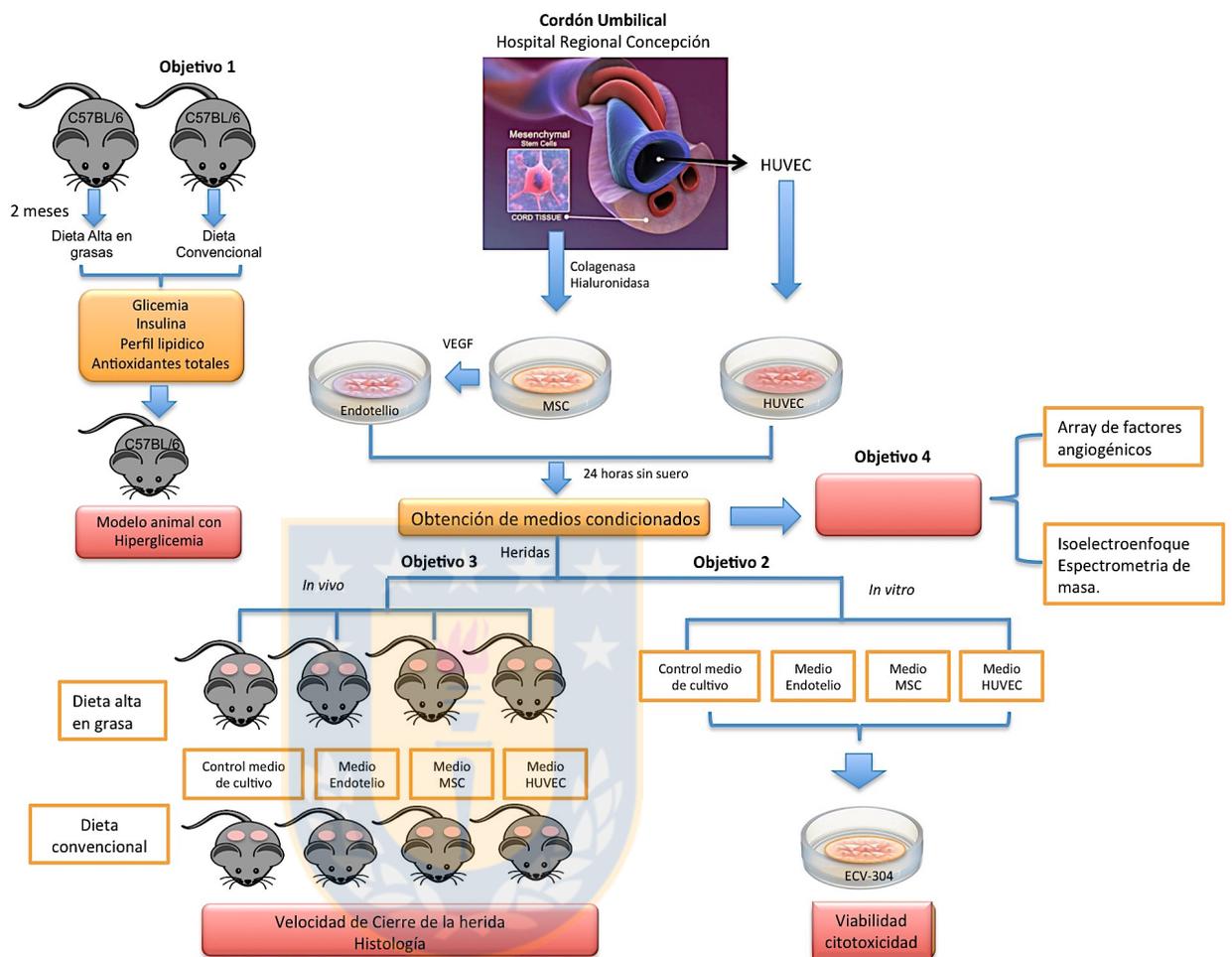


Figura 1: Modelo esquemático de la metodología de trabajo utilizada en este trabajo de tesis.

MATERIALES

Objetivo específico 1: Desarrollo modelo de animal diabético.

1. Animales. Ratones machos C57BL/6 de 4 semanas serán obtenidos desde el Instituto de Salud Pública (ISP) Chile. Los animales serán mantenidos en un ambiente controlado bajo condiciones estériles. Comida, y agua serán esterilizados previo a su uso y administrados *at libitum* o de acuerdo al tratamiento dietario (dieta alta el grasas y carbohidratos).

2. Generación de modelo de ratón con hiperglicemia: Ratones machos C57BL/6 de 4 semanas (~20 gr), serán divididos aleatoriamente en dos grupos: control (C) y diabéticos (D). Al grupo control se les alimentará con pellet estándar para ratones que contenía un 5 gr% de grasa, un 66,7gr% de carbohidratos y 22 gr% de proteínas (AIN-76A); mientras que los animales que desarrollarán hiperglicemia recibirán una dieta rica en grasa conteniendo un 36 gr% de grasa, 66,4 gr% de carbohidratos y 20 gr% de proteínas, equivalente a un 58% kcal en grasa (Gwon, Ahn, Kim, & Ha, 2012).

Cada grupo será alimentado con esas dietas por 12 semanas. La dieta rica en grasa será elaborada en nuestro laboratorio a partir de un Pellet Animal de uso estándar. Los ratones serán puestos en jaulas de 4 animales. Las jaulas se mantendrán en una habitación con sistema automático de control de la temperatura (21+/- 1°C), control automático de los ciclos de luz y oscuridad

(12h luz/12h oscuridad), y sistema de extracción de aire.

El desarrollo de diabetes será evaluado evaluación de los niveles de glicemia en ayunas, test de tolerancia a la glucosa oral (TTGO), niveles de insulina y perfil lipídico.

3. Test de Tolerancia oral a la Glucosa: Después del ayuno de 12-15 h, los ratones se someterán al test de tolerancia a la glucosa (TTG). Muestras de sangre se obtendrán de la cola para medidas basales y después de la administración de la glucosa (2 g/kg, i.p.) (Miyagawa et al., 2013). Se recolectarán muestras de sangre en los tiempos 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. Los niveles de glucosa serán determinados usando el analizador ACCUCHECK GO KIT (Gwon et al., 2012). Estos ensayos serán realizados en el departamento de Fisiopatología, con la asistencia del un veterinario que esta a cargo del cuidado de los animales.

4. Perfil lipídico: Se tomarán muestras de sangre a través de la vena submandibular empleando una lanceta de 5 mm en tubos en ausencia de anticoagulante. Posterior a la extracción de la muestra los tubos serán centrifugados a 3000 g por 15 min a 4°C y serán almacenados a -20°C hasta su análisis. El perfil lipídico será realizado métodos colorimétrico utilizando KIT comerciales (LABTEST)

5. Protocolo de Eutanasia. Los animales se sacrificarán por dislocación

cervical posterior a una inyección intravenosa de pentobarbital sódico (200mg/kg), previo a la comprobación que el animal no responde a estímulos.

Este procedimiento esta de acuerdo al manual de “PROTOCOLO DE SUPERVISION DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION” de la Universidad de Concepción, Chile.

• *Número de animales que serán utilizados en el proyecto:* Se realizarán en este proyecto 32 ratones diabéticos. El número de ratones a utilizar (controles negativos y Diabéticos) ha sido determinado de acuerdo a los datos publicados en los cuales se han utilizado desde 8 a 15 ratones por cada condición experimental, utilizando igual número de ratones para los experimentos como para los controles negativos. El número de animales en el diseño experimental se ha reducido al mínimo posible para poder aplicar un estudio estadístico consistente a partir de los resultados experimentales.

Todo este procedimiento se realizará con la supervisión del Médico Veterinario, Dr. Rafael Maura Pérez, del departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad de Concepción

• *Los desechos generados por la mantención, tratamiento, eutanasia y necropsias de los animales serán retirados por MATPEL de la Universidad de Concepción de acuerdo al reglamento sanitario sobre manejo de residuos peligrosos.*

Objetivo específico 2: Evaluar el potencial de proliferación celular del medio condicionado endotelial *in vitro*.

1.- Cultivo de células mesenquimales desde gelatina de Wharton humana

En los cultivos primarios de células madre de gelatina de Wharton de cordón umbilical, se utilizarán cordones umbilicales obtenidos de partos por cesárea de mujeres gestantes sin patologías del embarazo. La gelatina de Wharton será fragmentada y tratada con Colágenas tipo I y hialorunidasa y luego las células serán recolectadas mediante centrifugación. Las células Mesenquimales serán cultivadas en medio de cultivo adecuado (M199 suplementado con FGF). Las células serán caracterizadas por su capacidad para diferenciarse en Adipocitos, Osteocitos y Condrocitos.

2.- Obtención de células endoteliales de origen mesenquimal.

La diferenciación de células mesenquimales hacia el fenotipo endotelial, se realizará a través del cultivo de las células mesenquimales por 15 días en medio de cultivo suplementado con VEGF, según lo descrito anteriormente por nuestro grupo (Guzmán-Gutiérrez et al., 2010, Fernández et al., 2012).

3. Preparación y obtención del medio condicionado: El medio condicionado será generado a partir de células endoteliales en un 80% de confluencia y cultivadas en frascos de cultivo de 75 cm², en medio sin suero e incubados durante 24 h bajo condiciones de normoxia (5% CO₂). Para los experimentos in

vivo, el medio condicionado serán procesados como a continuación se detalla.

4. Secado de los medios de cultivo

El secado de los medios condicionados se realizará mediante liofilización y/o spraydier, con la finalidad de obtener un concentrado de producto que pueda permanecer estable en el tiempo. Para su uso en el tratamiento de las heridas será resuspendido en tampón fosfato pH 7,4 y será almacenado a -20°C.

5. Ensayos in vitro de cicatrización o cierre de herida (“wound healing”).

Las células endoteliales ECV-304, se sembrarán a confluencia, a una densidad de 34000 células/cm², en DMEM suplementado con 10%FBS y 24 horas más tarde se realizará una “herida” perpendicular en la zona central del plato de cultivo mediante una punta de pipeta estéril. Una vez realizada la herida, las células se lavarán varias veces con PBS 1X para asegurar la eliminación de todas las células levantadas y/o muertas, reemplazándose el medio por DMEM 0% FBS. Las células se estimularon con el medio de cultivo endotelial. Como control se utilizarán células tratadas con medio de cultivo convencional, y con medio de cultivo obtenido desde cultivo de células HUVEC y células mesenquimales. La migración de las células se realizará a través de un microscopio de contraste de fases (Eclipse TE300, Nikon) y con una cámara digital acoplada al microscopio (Nikon digital sight DS-U2). Para calcular la eficiencia del cierre de la herida en las distintas condiciones de cultivo se medirá el área de la herida a los tiempos inicial (0h) y final (48h), utilizando el

programa imageJ. Los resultados se expresarán como porcentaje de cierre a las 48h respecto al tiempo 0.

Objetivo específico 3: Evaluar la capacidad de regeneración tisular del medio condicionado endotelial en la regeneración tisular en un modelo de animal diabético.

1. Efecto de los factores de crecimiento sobre la regeneración de la piel.

El modelo animal de injuria se realizará según lo propuesto por Galiano et al. 2004 y Aguilera et al. 2014. Este ensayo se basa en un modelo de herida excisional.

Todos los procedimientos en los animales se desarrollarán en bioterio de Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción a cargo del Veterinario Dr. Rafael Maura. Los procedimientos fueron aprobados bajo las directrices de las Ciencias de la Salud Animal y el Comité de ética de la Universidad de Concepción

Los ratones serán anestesiados mediante una inyección intraperitoneal, la superficie dorsal será rasurada para remover el cabello remanente y las heridas serán realizadas con un “punch biopsia” estéril de 6 mm. La herida recibirá una sola inyección de factores de crecimiento proveniente de cultivo de células endoteliales. Como control se utilizarán células tratadas con medio de cultivo convencional, y con medio de cultivo obtenido desde cultivo de células HUVEC

y células mesenquimales.

2. Análisis de la herida: Se evaluará el cierre de la herida por fotografía digital a los 0, 3, 7, 10 y 12 días. El cierre de la herida será definido como el momento en el que el tejido este completamente re-epitelizado con nuevo tejido. El porcentaje de cierre de la herida se medirá a través de la fórmula $(\text{Área de herida original} - \text{Área de herida actual}) / \text{Área de herida original} \times 100$. Los ratones serán sacrificados a los 14 días, a los cuales se extraerá una muestra de tejido en el sitio de la lesión usando un punch biopsia de 10 mm de diámetro. Para el montaje de toda la piel, toda la herida y la piel de los alrededores se pondrá en una placa de cultivo con la dermis hacia abajo y se procederá a fotografiar inmediatamente (Aguilera et al., 2014).

3. Velocidad de cicatrización:

Se realizará un análisis fotográfico de las heridas en los días 0, 2, 7, y 12 días. Tiempo de cierre de la herida se definió como el tiempo en el que el lecho de la herida fue completamente re-epitelizada y llena de Nuevo tejido. Zona de la herida se medirá mediante el trazado de la margen de la herida y se calcula usando un programa de análisis de imágenes (Image J). Los ratones serán sacrificados a los 14 días cuando se hayan recogido las muestras de piel incluyendo la herida y 10 mm de la piel que rodea la herida utilizando un punch biopsy. Posteriormente, el tejido será utilizado para el análisis histológico.

4. Análisis Histológico: Los análisis histológico se realizarán utilizando cortes de tejido correspondientes al área donde se realizará la herida en embebidos en parafina y teñidos con Hematoxilina-Eosina. El Cálculo de Score Histológico, será realizado de acuerdo a los parámetros de re-epitelización, formación de tejido de granulación y angiogénesis. La densidad capilar se evaluará mediante un examen en 4 campos del tejido teñido con hematoxilina-eosina donde se cuantificará el área y número de vasos sanguíneos a través del programa ImagePro Plus.



Objetivo Específico 4: Identificar factores secretados por el cultivo de células endoteliales.

1. Arreglos de anticuerpo de las proteínas (factores de crecimiento y angiogénicos) secretadas por las células endoteliales.

El ensayo se realizará siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D diagnostic), las muestras que contienen igual cantidades de proteínas totales se depositarán e incubarán sobre membranas de nitrocelulosa, luego las membranas serán lavadas para retirar las proteínas no unidas. Después del lavado, las membranas se incubarán con un bioconjugado con anticuerpos anti-citoquinas y posteriormente serán lavadas e incubadas con estreptoavidina conjugada con HRP. La detección será realizada por quimioluminiscencia. La

intensidad de señal será determinada mediante el uso de software para el análisis de imágenes y su clasificación según intensidad.

2. Isoelectroenfoque líquido:

Como técnica de fraccionamiento de los factores proteicos secretados por las células endoteliales, se utilizará isoelectroenfoque en medio líquido (OFFGEL). Esto permitirá el enriquecimiento y caracterización de las proteínas constituyentes del medio condicionado endotelial. Se realizará un isoelectroenfoque en medio líquido a partir de medio condicionado endotelial en el intervalo de pH 4-7 empleando un fraccionador OFFGEL 3100 de Agilent. La separación se realizará a lo largo de 12 fracciones independientes donde las proteínas quedarán en solución, lo que permite una cómoda recuperación de las mismas. Las fracciones colectadas serán evaluadas por espectrometría de masa.

3. Espectrometría de masa: las fracciones de proteínas obtenidas desde el isoelectroenfoque líquido serán tripsinizadas para su posterior análisis por espectrometría de masas (sistema LC-ESI-MS/MS). Los resultados obtenidos serán analizados utilizando sistemas computacionales disponibles en internet de análisis de perfil proteico para la identificación de las proteínas de cada fracción con actividad biológica.

RESULTADOS

Objetivo 1: Desarrollar un modelo animal con hiperglicemia.

Dieta Alta en grasa

Para desarrollar el modelo animal con hiperglicemia, utilizamos la cepa de ratón C57BL/6. Esta cepa ha sido utilizada ampliamente para inducir cambios metabólicos asociados a cambios en la dieta. Habitualmente se utiliza una dieta alta en grasa hasta llegar a un aporte de 58kcal de aporte en grasa. En materiales y métodos, se indican los componentes de la dieta y los gramos de cada uno utilizados para la formulación de 100 grs de alimento. Para evaluar los resultados de la implementación de la dieta, se realizó una toma de muestra de sangre antes del inicio de la dieta y luego al mes y dos meses de la dieta, como también se evaluó el peso corporal y el perfil antioxidante.

Durante el periodo dieta hubo incremento de peso tanto en los ratones sometidos a una dieta convencional (grupo control), como también en el grupo sometido a una dieta alta en grasa. Sin embargo, en los ratones sometidos a una dieta alta en grasa el incremento de peso fue discretamente superior que en los ratones control (Figura 2 A). Además de evaluar el peso corporal en el transcurso de la dieta, posterior a la eutanasia de los animales se cuantificó la masa grasa de los animales (Figura 2B y C). Para ello se aisló la grasa visceral epididimal de los ratones control y con dieta alta en grasa. Los resultados muestran que los ratones sometidos a una dieta alta grasa acumularon una

mayor cantidad de grasa visceral (en gramos) comparados con los ratones sometidos a una dieta convencional.



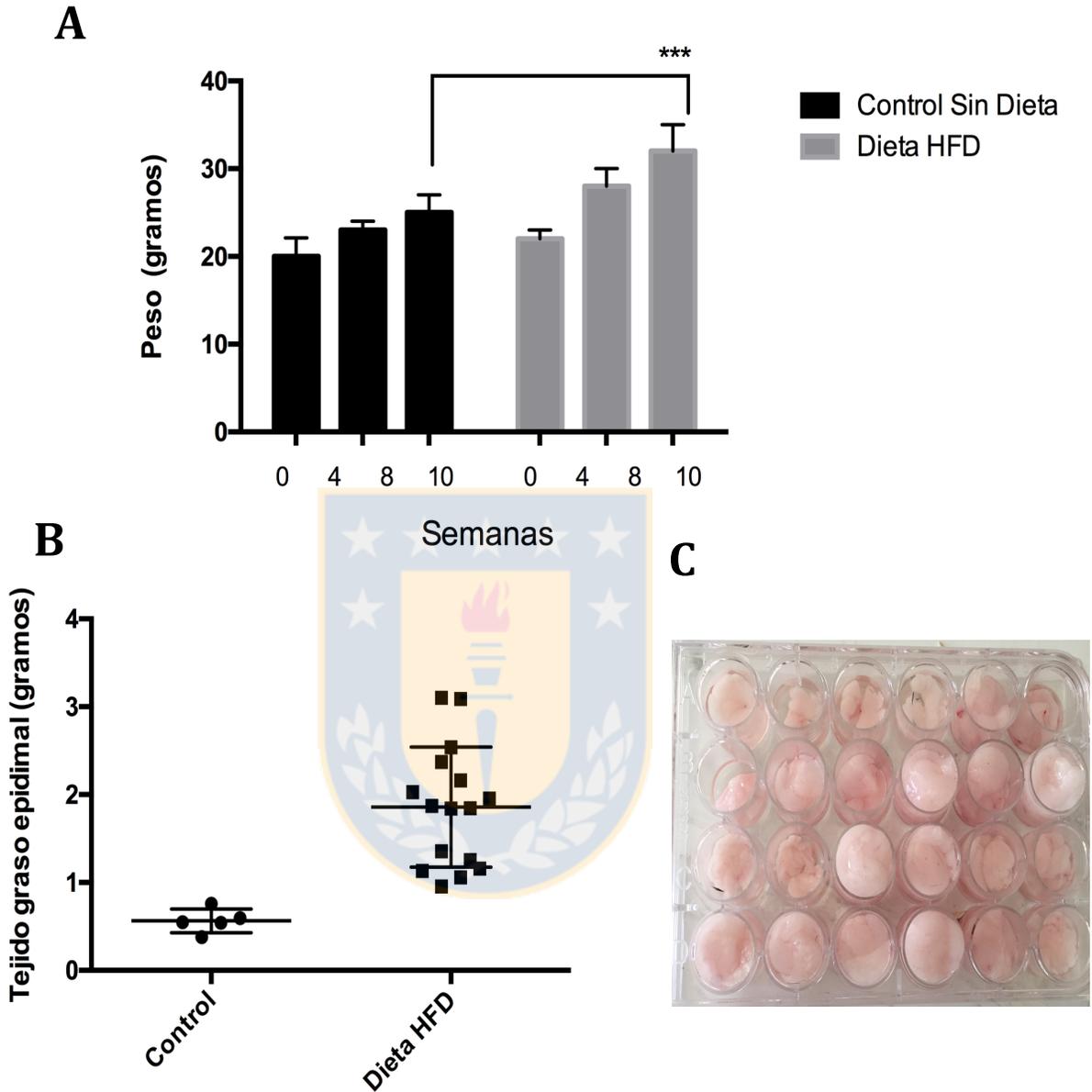


Figura 2: Peso de los ratones y porcentaje de grasa. A. Peso de los ratones determinado en el tiempo de Dieta. **B.** Peso en gramos de grasa epididimal de los ratones control y sometidos a una dieta alta en grasa. **C** Imagen representativa de la grasa extraída desde tejido epididimal .

Perfil Metabólicos de los animales alimentados con una dieta alta en grasa.

Metabolismo glucídico: Para evaluar el efecto de la dieta alta en grasa en los animales se midieron los niveles de glucosa en ayuna, perfil lipídico, insulina. Se cuantificaron los niveles de estos analitos al tiempo cero, 4 y 8 y 10 semanas de iniciado la intervención con dieta alta en grasa. Los resultados muestran que los ratones controles mantienen niveles constantes, durante el tiempo de experimentación, los niveles plasmáticos de glucosa, con un valor que va desde 100 a 115 mg/dl. En cambio en los ratones sometidos a una dieta alta en grasa los valores de glicemia evolucionaron desde 103 mg/dl al inicio de la intervención hasta un valor máximo de 210 mg/dl a las 8 semanas de dieta para a la semana 10 tener un nivel de glicemia de 160 mg/dl (Figura 3 A). Los niveles de insulina evolucionan en el tiempo de forma similar manteniéndose niveles constantes del orden de los 2,0 ng/ml en los ratones control. Para los ratones sometidos a una dieta alta en grasa se observa un aumento paulatino de los niveles de insulina las primeras 4 semanas de dieta, y un aumento considerable comparado con el control a las 8 y 10 semanas de dieta. Estos valores son concordantes con los cambios en los niveles de glicemia (Figura 3 B).

Además, con estos datos determinamos el valor del índice HOMA-IR (sigla en ingles de del modelo homeostático de evaluación de la resistencia en insulina) que permite realizar estimaciones de resistencia insulínica y función de las

células beta mediante las concentraciones de la glucosa y la insulina plasmáticas en ayunas. Con este método se determinó un valor de HOMA para los ratones control de 0,07 en promedio en el tiempo de experimentación el cual fluctuó entre valores de 0,06 y 0,09. Para los ratones sometidos a una dieta alta en grasa los valores del índice HOMA comenzaron a aumentar desde un valor de 0,08 al inicio de la dieta para finalizar en la semana 10 con un valor de 0,47, observándose un aumento significativo de este índice comparado con el control (Figura 3 C).

Para complementar el análisis del metabolismo de los carbohidratos realizamos un test de tolerancia a la glucosa tanto a los animales control como con dieta alta en grasa a las 8 semanas de dieta (tiempo en que posteriormente realizamos los ensayos de herida). Los resultados muestran que los ratones control tienen una glicemia promedio en ayuna de 80 mg/dl y que posterior al desafío con glucosa administrada por vía intraperitoneal los niveles de glucosa aumentan llegando a un máximo de 179 mg/dl a los 15 minutos, post inyección de glucosa para luego descender hasta los 92 mg/dl a los 120 minutos post inyección. Para los ratones con dieta alta en grasa la cinética temporal de concentraciones de glucosa fue similar, sin embargo la concentración plasmática máxima alcanzada fue de 252 mg/dl y a los 120 minutos la glicemia plasmática fue de 160 mg/dl (Figura 4). Al analizar el área bajo la curva (AUC) de estos datos, los resultados indican una mayor biodisponibilidad plasmática

de glucosa en el ratón sometido a dieta alta en grasa comparado con el control

(Figura 4)



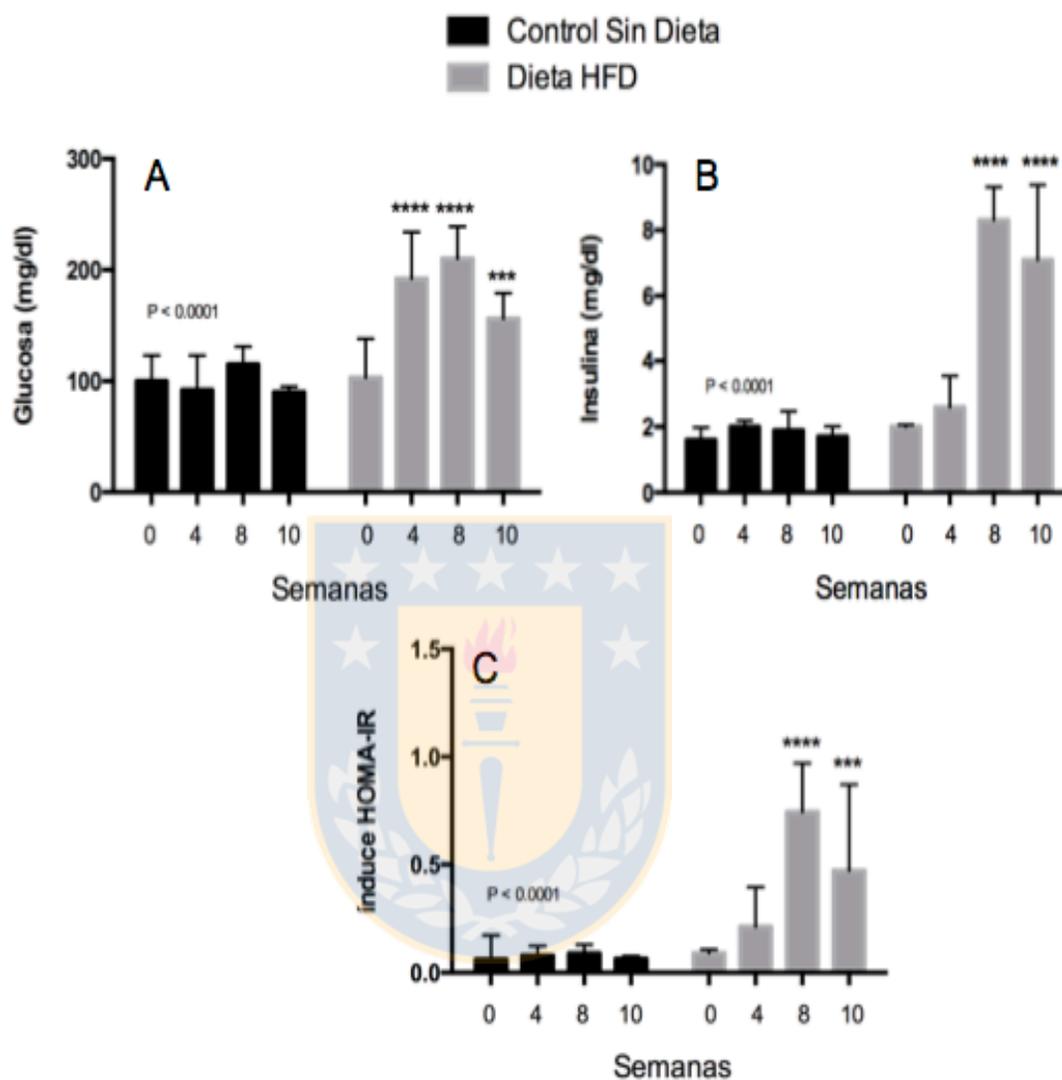


Figura 3: Evaluación parámetros bioquímicos para evaluar el metabolismo glucídico en animales control y alimentados con una dieta alta en grasa (HFD). A Determinación de los niveles de glucosa plasmática. **B** Determinación de los niveles de insulina plasmática. **C** Determinación del índice HOMA. Los resultados representan el promedio de cada determinación por triplicado en 20 animales en cada grupo. El análisis estadístico se realizó por ANOVA.

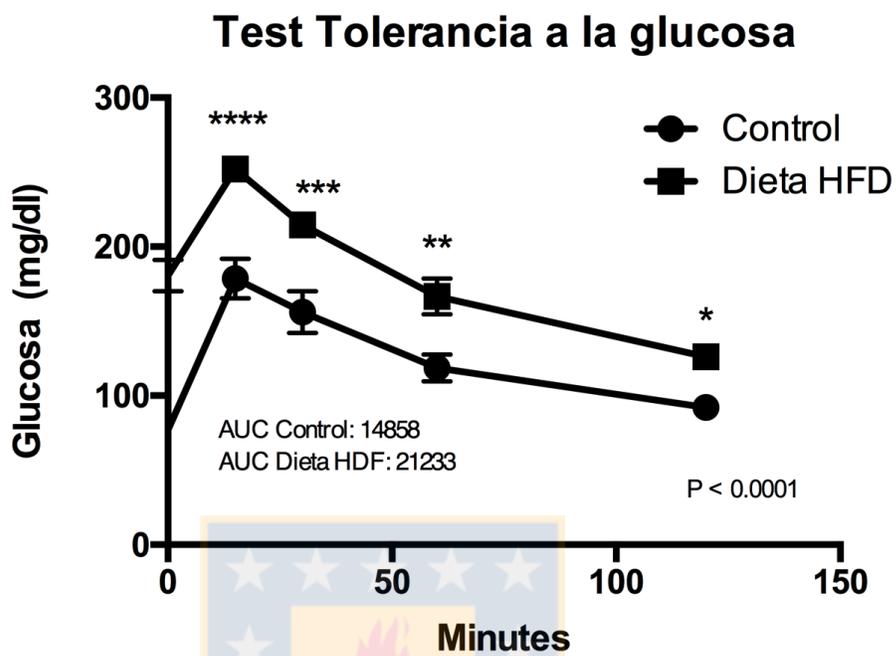


Figura 4: Test de tolerancia a la glucosa en los animales control y sometidos a un adieta alta en grasa. Posterior a 8 horas de ayuno los animales fueron sometidos a una prueba de tolerancia la glucosa. Se determinaron los niveles de glucosa en el tiempo a los 0, 15, 30, 90 y 120 minutos. Los resultados representan el promedio de cada determinación por triplicado en 5 animales en cada grupo. El análisis estadístico se realizó por ANOVA

Perfil lipídico: Para evaluar el efecto de la dieta alta en grasa en los animales se midieron los niveles de colesterol total, colesterol HDL, y triglicéridos en ayuna. Los niveles de colesterol LDL se determinaron por el método Friedewald (si bien este método se utiliza en humanos, hay publicaciones en las cuales se ha usado con alta confiabilidad en animales (Coppo NB, 2003; Koornneef et al., 2011; Osorio, 2013). Se cuantificaron los niveles de estos analitos al tiempo cero, 4 y 8 y 10 semanas de iniciado la intervención con dieta alta en grasa. Los niveles de colesterol total se mantuvieron constantes durante toda la intervención tanto para los ratones control como para los ratones con dieta alta en grasa. Los valores de colesterol total fluctuaron entre 162 mg/dl y 116 mg/dl para los ratones control y para los ratones con dieta alta grasa entre 158 y 182 mg/dl (Figura 5 A). En relación a los niveles de colesterol LDL y colesterol HDL, en ambos grupos de animales los niveles se mantienen constantes durante el tiempo de experimentación. Los valores de HDL promedio obtenidos fueron de 50 mg/dl y para el grupo control y de 52 mg/dl para el grupo dieta alta en grasa (Figura 5 B). La estimación de los valores de LDL promedio obtenidos fueron de 77 mg/dl y para el grupo control y de 82 mg/dl para el grupo dieta alta en grasa (Figura 5 C). En relación a los niveles de triglicéridos, éstos fueron un poco más fluctuantes, pero sin diferencias significativas durante todo el periodo de intervención tanto en los animales control como en aquellos sometidos a una dieta alta en grasa (Figura 5D).

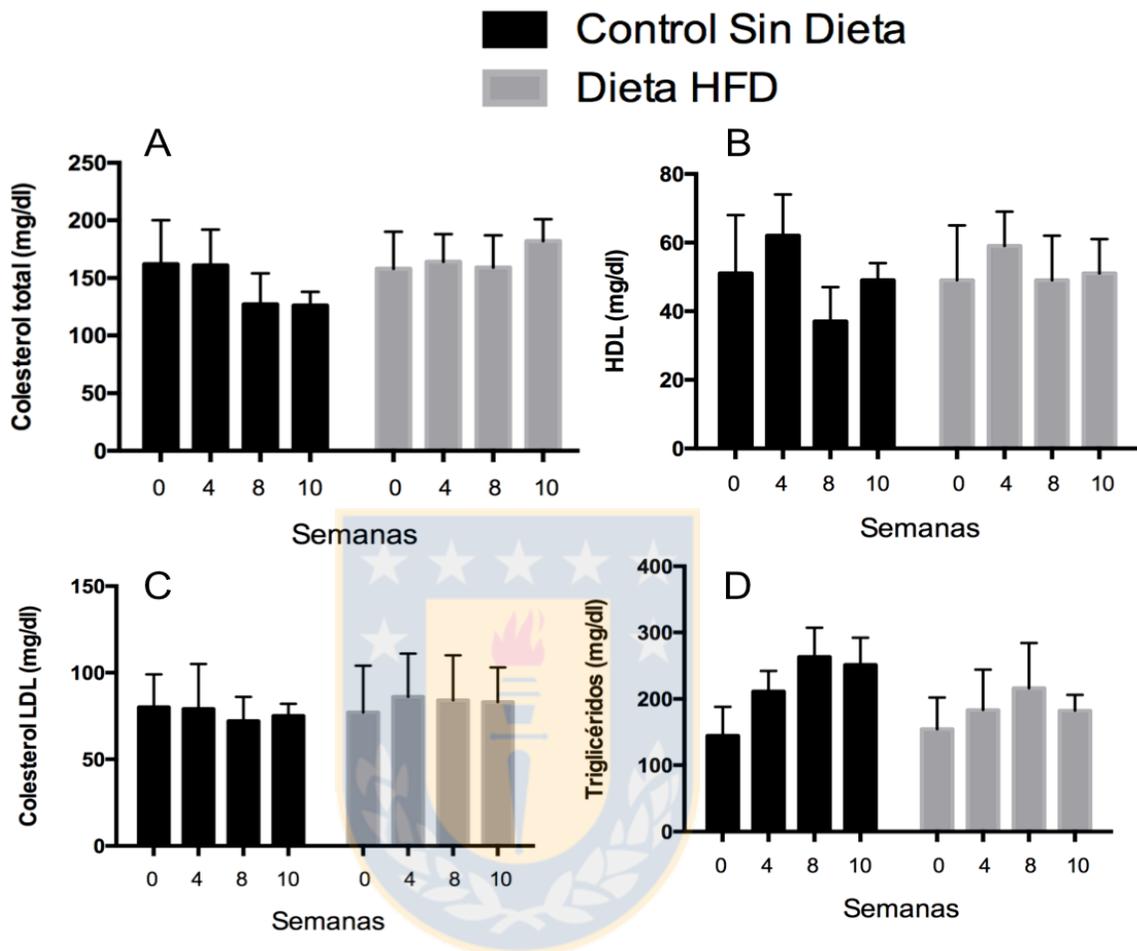


Figura 5: Determinación del perfil lipídico en animales control y alimentados con una dieta alta en grasa (HFD). **A** Determinación de los niveles de colesterol total. **B** Determinación de los niveles de colesterol HDL. **C** Determinación de los niveles de colesterol LDL. **D** Determinación de los niveles de colesterol triglicéridos. Los resultados representan el promedio de cada determinación por triplicado en 20 animales en cada grupo. El análisis estadístico se realizó por ANOVA

Antioxidantes Totales. Además del perfil metabólico, se evaluó el contenido de antioxidantes totales en plasma de los ratones control y ratones sometidos a una dieta alta en grasa. Los resultados indican que ha medida que transcurre la intervención los ratones control van aumentando su contenido de antioxidantes totales desde 14 uM hasta 28 uM en la semana 10. Sin embargo los ratones sometidos a un a dieta alta en grasa comienzan a disminuir su contenido de antioxidantes totales a partir de la semana 4 comparado con el grupo control. En la semana 10 la cantidad de antioxidantes totales del grupo con dieta alta es grasa fue de 20 uM (Figura 6).

Objetivo 2: Evaluar el potencial de proliferación celular del medio condicionado endotelial *in vitro*.

Para poder realizar este objetivo se obtuvieron células mesenquimales (MSC) desde muestras de cordón umbilical, específicamente desde la región denominada gelatina de Wharton. Las células fueron crecidas hasta 95 % confluencia (Figura 7 A) y luego fueron diferenciadas a células endoteliales (Endo) (figura 7 B). Como control se aislaron desde cordón umbilical células HUVEC (células de vena de cordón umbilical Humano). De cada uno de estos cultivos celulares (MSC, Endo, HUVEC), se obtuvo el sobrenadante (ver materiales y método) el cual se separó en tres grupos: 1) Sobrenadante, 2) sobrenadante concentrado (liofilizado) 3) sobrenadante sonificado para realizar los ensayos posteriores. El sobrenadante corresponde a una fracción del medio

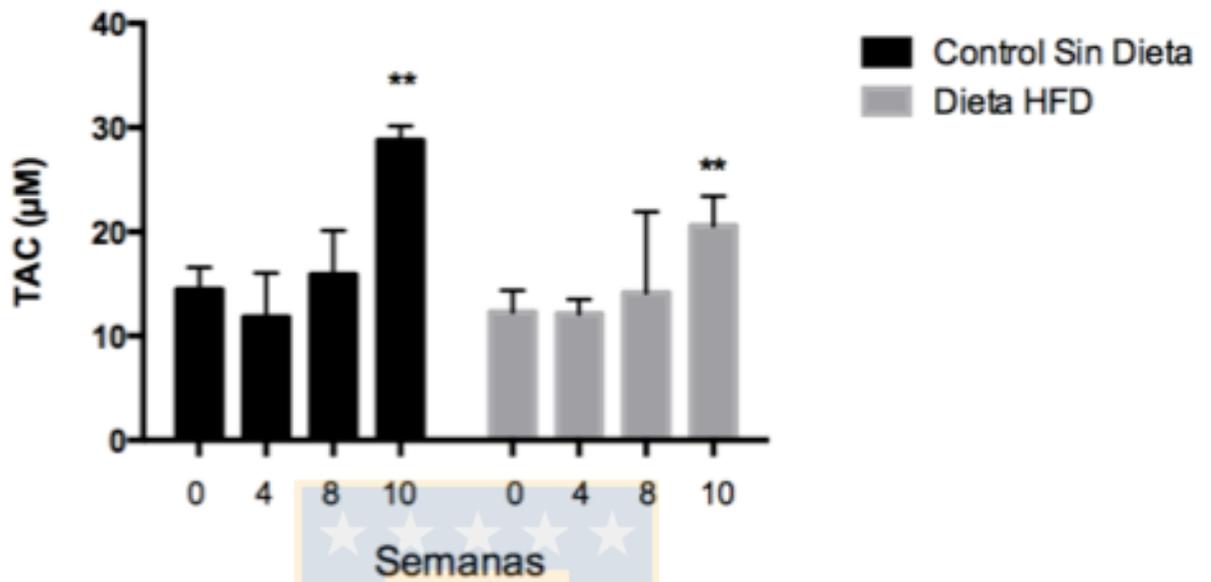


Figura 6: Determinación de la concentración de antioxidantes totales en plasma. Se determinó la concentración de antioxidantes totales en plasma de animales alimentados con una dieta convencional y en animales alimentados con una dieta alta en grasa en tiempo. Los resultados representan el promedio de cada determinación por triplicado en 5 animales en cada grupo. El análisis estadístico se realizó por ANOVA

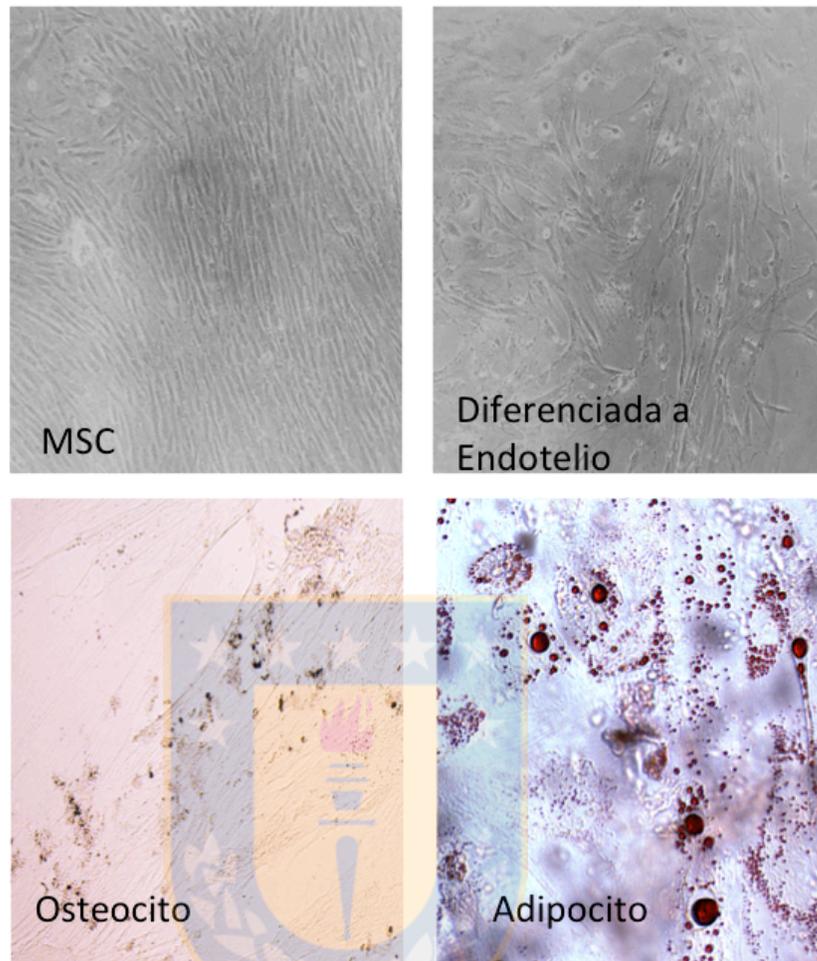


Figura 7: Cultivo de células madres mesenquimales (MSC) diferenciadas a Células endoteliales. La fotografía muestra el cultivo a confluencia de células madres mesenquimales (MSC) diferenciadas a endotelio. En la figura se muestra la imagen de las células madres diferenciadas a osteocito (tinción de plata) y adipocito (oil red) como controles.

recolectado. Se llamó liofilizado a 50 ml de medio de cultivo que fue liofilizado y luego resuspendido a una concentración de 10 mg/ml. Sonicado es una fracción de medio de cultivo que fue sometido a tres ciclos de 30 segundos de sonicación, con el objetivo de destruir posibles vesículas presentes en el medio de cultivo y que podrían ser responsables de los efectos del medio de cultivo obtenido de MSC, Endo o HUVEC.

Evaluación de Viabilidad Celular por XTT

El ensayo de viabilidad celular XTT, es una prueba colorimétrica que detecta la actividad metabólica de las células. Durante el ensayo, la sal de tetrazolio amarilla XTT se reduce a un colorante de formazano altamente coloreado, debido a la presencia de enzimas deshidrogenasas en células metabólicamente activas. Esta conversión sólo ocurre en células viables y, por lo tanto, la cantidad de formazán producida es proporcional a células viables en la muestra.

Realizamos un ensayo utilizando dosis creciente (0-10 ug/ml) de sobrenadante de cultivo de células MSC, Endo, y HUVEC en las tres formulaciones de medio de cultivo: sobrenadante, liofilizado, sonicado, para evaluar viabilidad celular. En estos ensayos se retiró el medio de cultivo de las células ECV-304 y fue reemplazado por medio de cultivo sin suero conteniendo las dosis de ensayo de cada condición por un periodo de 24 horas. Para ello

realizamos un ensayo para determinar el efecto de los medios de cultivo sobre la viabilidad celular de Células ECV-304 (modelo celular de endotelio).

Los resultados muestran que dosis crecientes del medio de cultivo liofilizado de MSC, Endo y HUVEC reducen el porcentaje de células ECV-304 vivas con un IC50 aproximado de 5 ug/ul para el liofilizado de MSC y de 6ug/ul para el liofilizado de Endo y HUVEC. A 1ug/ml para el liofilizado de MSC y Endo se aprecia un leve aumento del número de células vivas (figura 8 A).

Dosis creciente de sobrenadante de MSC, Endo y HUVEC no afectan la viabilidad celular (figura 8 B). Resultados similares se observan con el medio sonificado de MSC y Endo (Figura 8 C). No así con el medio sonificado de HUVEC que produce una disminución del porcentaje de células vivas de forma dosis dependiente.

Considerando éstos resultados, se realizaron ensayos para evaluar el efecto del tiempo de exposición de los medios de cultivo en la viabilidad de células ECV-304 por 24, 48 y 72 horas, utilizando una concentración de 1 ug/ml de cada condición. Los resultados indican que no hay cambio en la viabilidad celular con la incubación por 24, 48 y 72 horas en ninguna de las condiciones analizadas (Figura 8 D).

En los ensayos que describen a continuación solo se trabajo con el medio liofilizado.

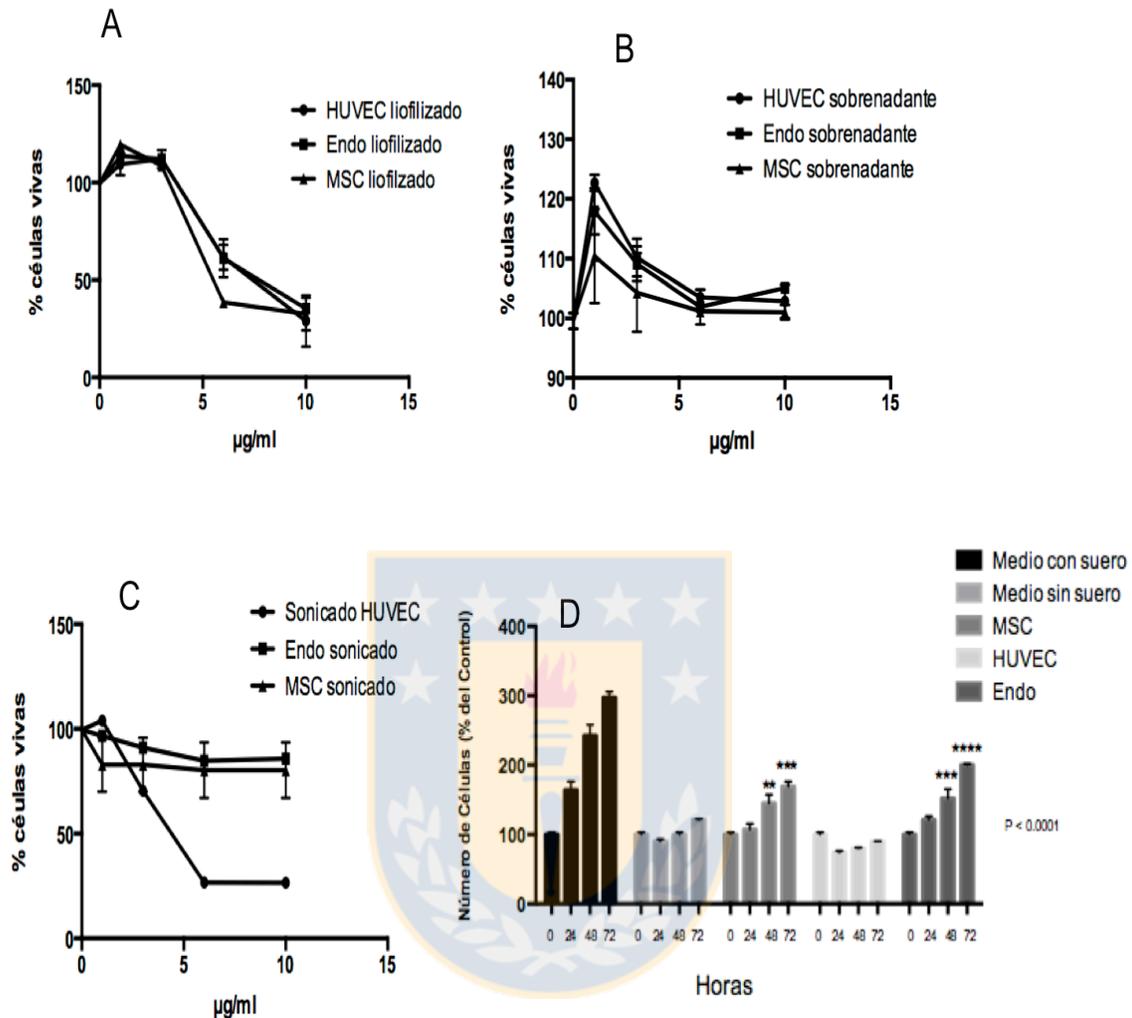


Figura 8: Efecto de los medios de cultivo de células HUVEC. Mesenquimales (MSC) y Mesenquimal-endotelial (Endo) en la viabilidad de células ECV-304. En estos ensayos se determinó viabilidad celular por el método XTT. A efecto de la dosis liofilizado HUVEC, MSC y Endo. **B** efecto de la dosis sobrenadante HUVEC, MSC y Endo. **C** efecto de la dosis sonicados HUVEC, MSC y Endo. **D** Viabilidad de células ECV-304 incubadas por 24, 48 y 72 horas con medios liofilizados. Los datos representan el promedio de las determinaciones por triplicado. Los análisis estadísticos se realizaron por Anova.

Ensayos de cierre de la herida *In vitro* y recuento celular

El Ensayo de cierre de herida, tiene como objetivo el estudio de la migración celular. Se basa en la observación del comportamiento de una monocapa confluyente de células a la que previamente se le ha realizado una brecha o “herida”. Las células en el borde de la brecha se moverán hacia la abertura hasta establecer nuevos contactos célula-célula cerrando así la “herida”. Los Pasos básicos implican la creación de la “herida” o área libre de células en la monocapa celular, la captura de imágenes de manera periódica durante el experimento y la comparación de todas las imágenes para determinar la velocidad de migración de las células. Este Experimento permite analizar tanto la migración de la monocapa como el movimiento de células individuales

Para evaluar la capacidad de los medios de cultivo de MSC, Endo y HUVEC de cerrar heridas realizamos ensayos de cierre de herida in vitro. Para ello se trabajo con células ECV-304, las cuales fueron cultivadas hasta una confluencia del 95% y posteriormente se realizó la herida con una punta p200 todo el pocillo de cultivo. Para evaluar el efecto de los medios liofilizados, se reemplazo el medio de cultivo de las células EVC-304, con medio sin suero conteniendo liofilizado de MSC, Endo o HUVEC, todos ellos a una concentración de 1 ug/ml. Los resultados muestran que en ninguna de las tres condiciones se observó cierre de la herida, después de 48 horas de exposición al medio liofilizado de de MSC, Endo o HUVEC. Para determinar si hubo

proliferación celular, se cuantificaron células por el método de exclusión por azul de Tripan. Los resultados muestran que no hubieron diferencias significativas en el número de células en todo el tiempo de intervención (Figura 9 A y B).

Posteriormente nos preguntamos si la incapacidad de inducir cierre de la herida, se debía a que solo estábamos realizando una única aplicación del medio de cultivo liofilizado. Por lo que realizamos un experimento en el que cada 24 horas, por 3 días, se aplicó una dosis adicional de 1 ug/ml. Realizamos ensayos de la herida y nuevamente observamos que no se producía cierre de la herida con ninguno de los medios liofilizados (Figura 10 A). Adicionalmente, realizamos cuantificación del número de células con la aplicación cada 24 horas de 1 ug/ml de los medios liofilizados. Los resultados muestran que con el medio liofilizado de HUVEC no se observa proliferación celular en los 3 días que duró el ensayo, sin embargo con los medios liofilizados de MSC y Endo se observa un leve aumento del número de células, siendo un poco mayor para el cultivo celular tratado con medio Endo (Figura 10 B).

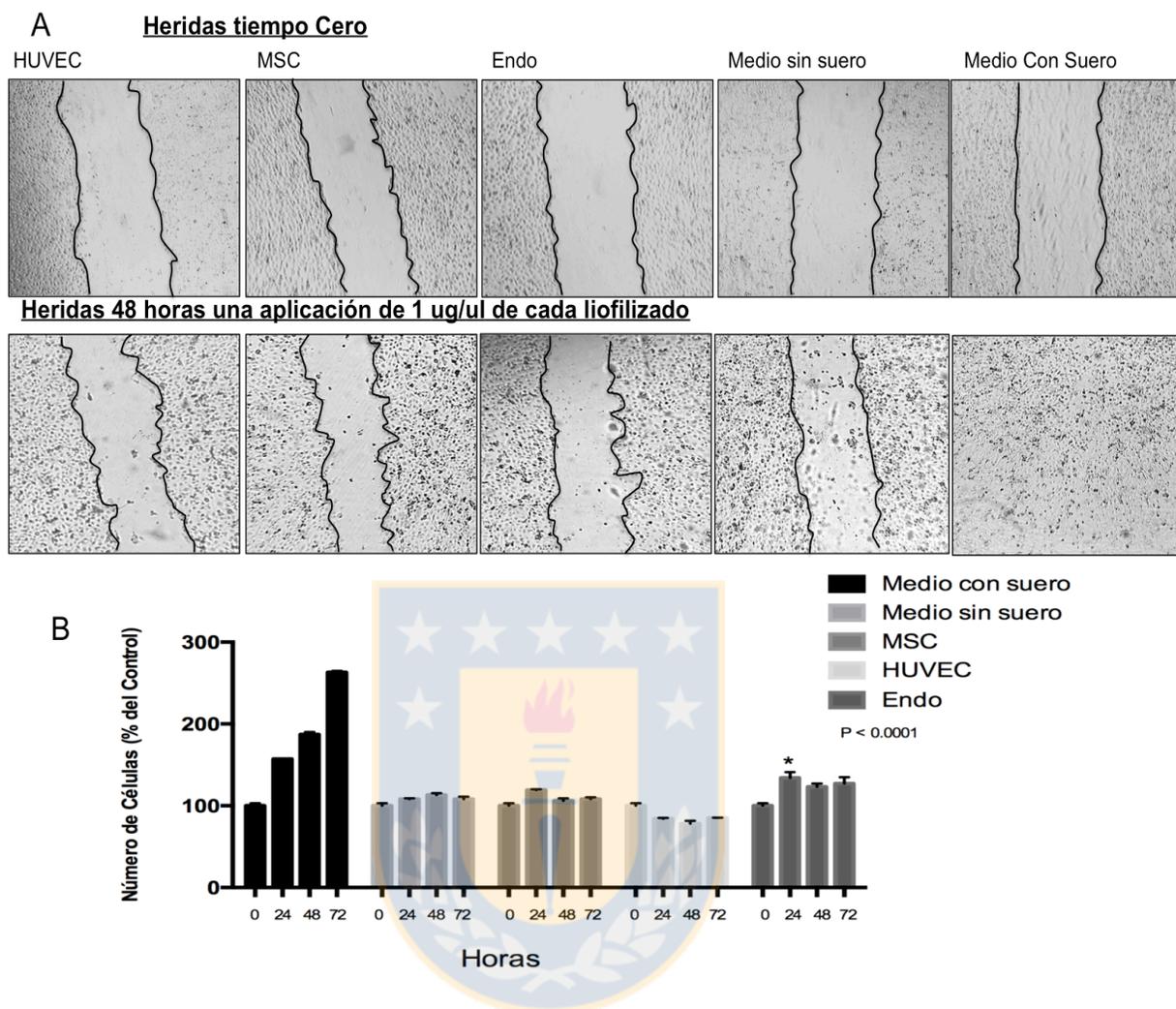
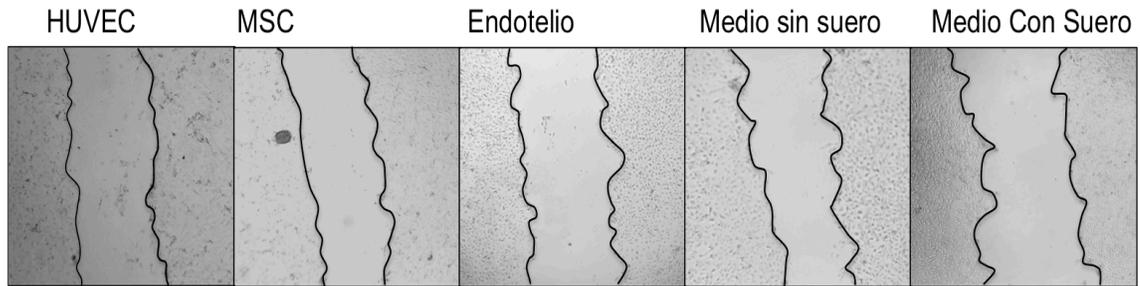
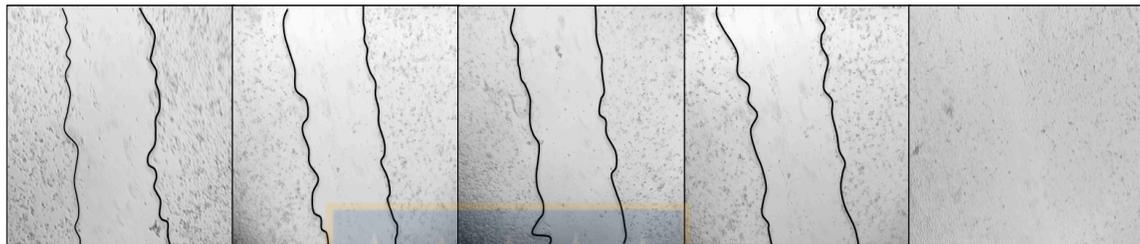


Figura 9: Ensayo de herida y de proliferación celular posterior a una aplicación de los medios MSC, HUVEC y Endo. A Fotografías representativas de ensayo de herida utilizando células EVC-304 en el tiempo cero y 48 horas posterior a la aplicación de los medios de cultivo. B Ensayo de cuantificación del número de células por exclusión de azul de tripán el por 24, 48 y 72 horas post aplicación de los medios de cultivo. Los resultados corresponden al promedio de los datos obtenidos en triplicado. Los análisis estadísticos se realizaron por Anova.

A Heridas tiempo Cero



Aplicación de 1 ug/ul de cada liofilizado (cada 24 horas)



48 horas

B

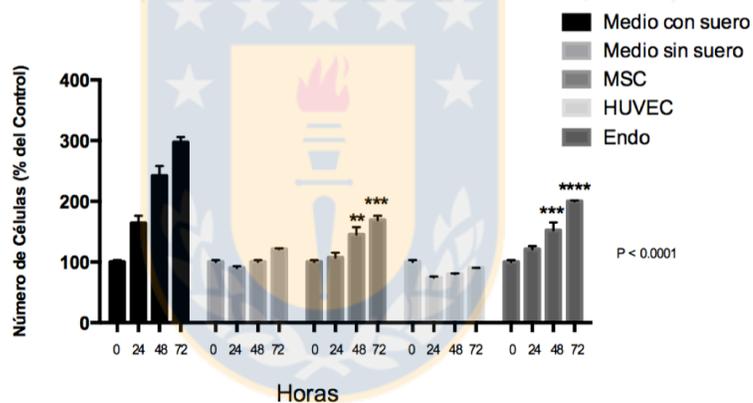


Figura 10: Ensayo de herida y de proliferación celular posterior a aplicaciones cada 24 horas de los medios MSC, HUVEC y Endo. A Fotografías representativas de ensayo de herida utilizando células EVC-304 en el tiempo cero y 48 horas posterior a la 2 aplicaciones de los medios de cultivo. B Ensayo de cuantificación del número de células por exclusión de azul de tripán el por 24, 48 y 72 horas post aplicación de los medios de cultivo. Los resultados corresponden al promedio de los datos obtenidos en triplicado. Los análisis estadísticos se realizaron por Anova.

Objetivo específico 3: Evaluar la capacidad de regeneración tisular del medio condicionado endotelial en la regeneración tisular en un modelo de animal diabético.

Efecto de los factores secretados en cierre de la herida en ratón C57BL/6

Para evaluar el efecto de los medios liofilizados en su capacidad de estimular el cierre de la herida, realizamos ensayos de herida en modelo animal. Para ello utilizamos la cepa de ratón C57BL/6 y realizamos una herida en el dorso del ratón utilizando un *punch* de biopsia de 6 mm. Una vez realizada la incisión aplicamos en cuatro puntos de la herida un total de 10 ug/ml de medio liofilizado de HUVEC, MSC, y Endo. Como control se utilizó PBS (tampón fosfato). Los resultados muestran que para aquellos animales tratados con liofilizado HUVEC se produce un retraso en el cierre de la herida comparado con el control en todo el periodo del experimento. Para aquellos animales tratados con liofilizado MSC y Endo se observa un leve aumento de la velocidad de cierre de la herida comparado con el control, siendo aun mayor para las heridas tratadas con liofilizado Endo (figura 11 y 12). El cierre completo de la herida fue observado al día 12 después de la intervención.

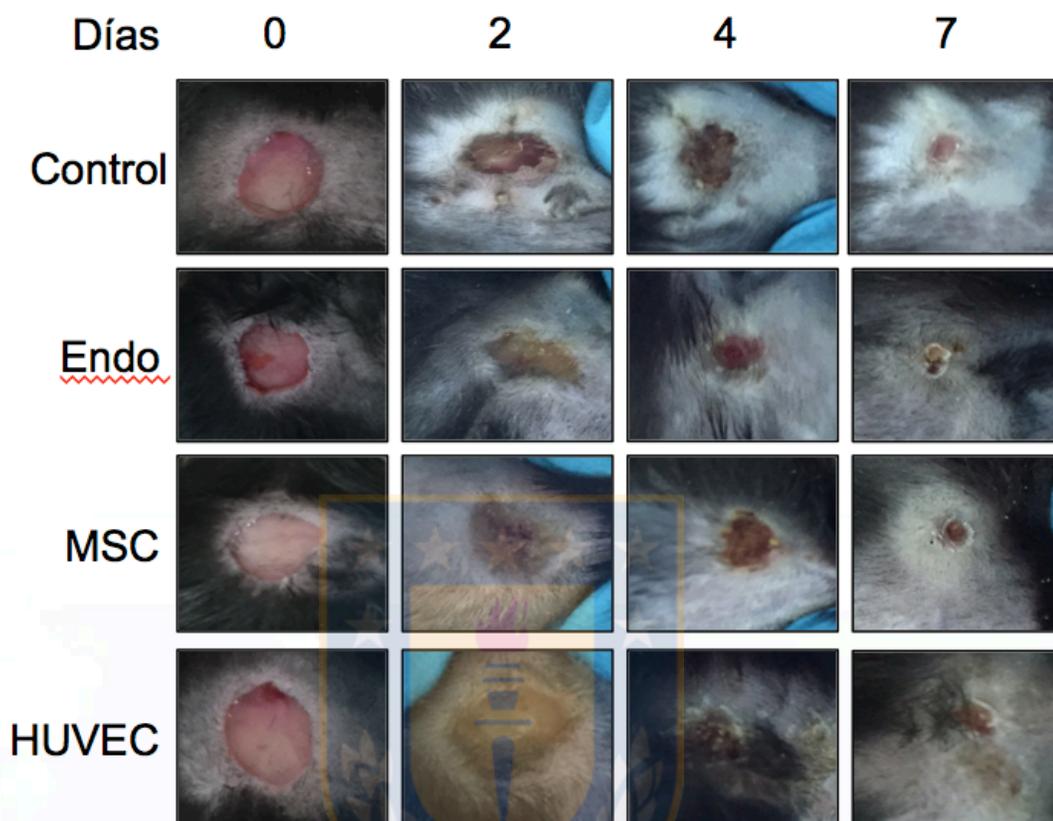


Figura 11: Fotografías representativas de la evolución de las heridas en el tiempo del animal control tras la intervención con los medios condicionados. Los paneles representan una imagen representativa correspondiente a las heridas tratadas con PBS (control) y tratadas con medio de cultivo de células mesenquimales (MSC), medio de Cultivo de células mesenquimales derivadas a endotelio (Endo) y medio de cultivo proveniente de células HUVEC (HUVEC). Estas fotografías representan el efecto de los medios de 5 animales por grupo.

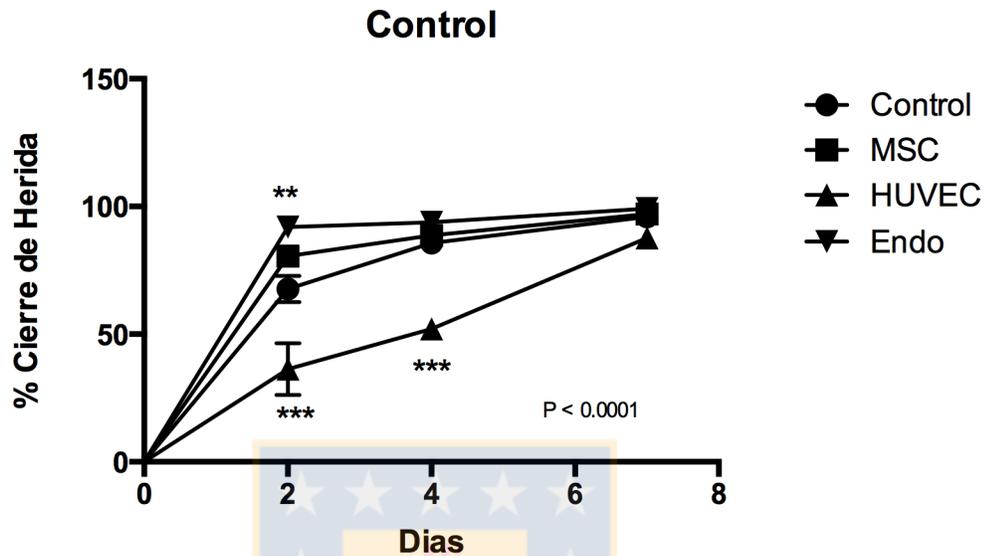


Figura 12: Efecto de los medios condicionados en el cierre de la herida en modelo animal sometido a una dieta convencional. Los medios condicionados fueron obtenidos desde sobrenadante de células huvec (HUVEC), células mesenquimales (MSC) y células mesenquimales derivadas a endotelio (Endo) en el cierre de herida en animal control. Cada punto corresponde al porcentaje de cierre de la herida de 5 animales por grupo. El análisis de la significancia se realizó por ANOVA. Cada punto del ensayo fue comparado con el control.

Análisis histológico de la herida en ratón C57BL/6

Una vez que la herida se cerró (día 12) los animales fueron sacrificados, y se recuperaron trozos de piel del lugar donde se realizó la herida. El resultado del análisis histológico se resumen en la Tabla 3.1 y Figura 13. Los resultados muestran una mayor cicatrización en los cortes histológicos provenientes de la piel tratada con medio Endo comparado con el control, además se observa migración de células desde el folículo piloso hacia la zona de la herida. Para la piel tratada con medio MSC, no se observan cambios histológicos comparados con el control. La piel tratada con medio HUVEC, muestra una marcada hiperproliferación de la epidermis concordante con una abundante migración de células de los folículos pilosos.

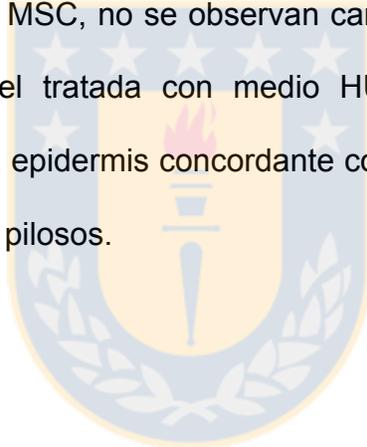


Tabla 3.1 : Análisis de los cortes histológicos de las heridas de los animales control. (Estos resultados corresponden al análisis de cortes histológicos de 5 animales de cada grupo).

	Piel control medio	Piel tratada con Endo	Piel tratada con HUVEC	Piel tratada con MSC
Tejido graso	Escaso	Leve	Leve	Escaso
Inflamación	No	No	no	no
Epidermis proliferativa	No	No	Marcada	no
Depósito de tejido conectivo	moderada	Moderada	Leve	leve
Número de folículos pilosos	Leve	Abundante	moderada	Leve
Migración células desde folículos pilosos a la epidermis	moderado	Moderado	Marcada	Leve

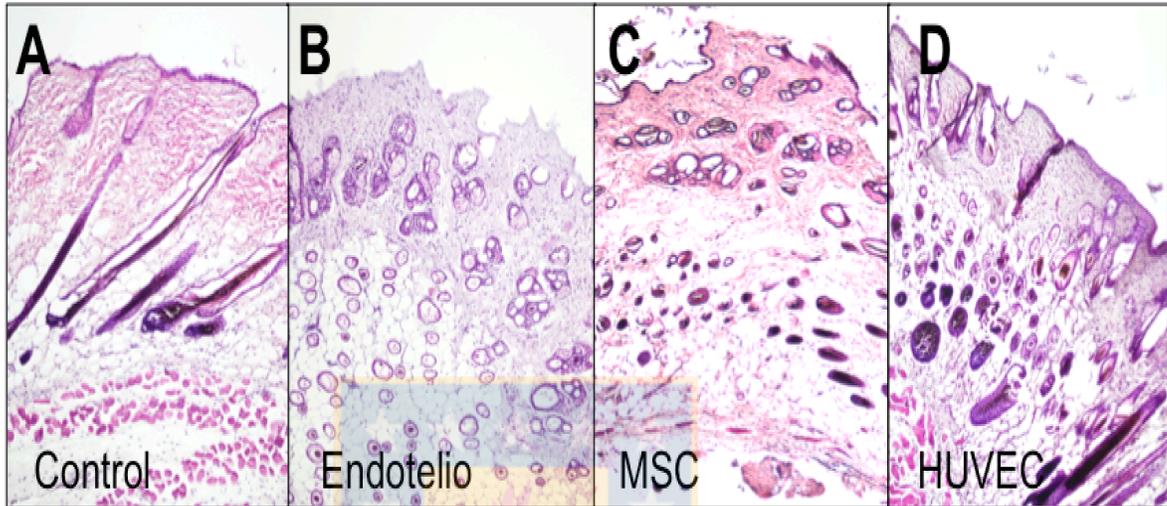


Figura 13: Fotografías representativas de cortes histológicos de animal control tratado con los medios Endo, MSC, HUVEC. Las fotografías corresponden a cortes histológico de piel del lugar donde se realizó la incisión. **A.** Corresponde al corte de piel tratado con PBS. **B** corresponde al corte de piel tratado con medio Endotelial. **C** corresponde al corte de piel tratado con medio MSC. **D** corresponde al corte de piel tratado con medio HUVEC.

Efecto de los factores secretados en cierre de la herida en ratón C57BL/6 con Hiperglicemia.

a. Efecto de los factores secretados en cierre de la herida en ratón C57BL/6

Para evaluar el efecto de los medios liofilizados en su capacidad de estimular el cierre de la herida en un modelo animal con hiperglicemia inducida por dieta, realizamos ensayos de herida. La herida se realizó en el dorso del ratón utilizando un *punch* de biopsia de 6 mm. Una vez realizada la incisión aplicamos en cuatro puntos de la herida un total de 10 ug/ml de medio liofilizado de HUVEC, MSC, y Endo. Como control se utilizó PBS (tampón fosfato). Los resultados muestran que para aquellos animales tratados con liofilizado HUVEC se produce un retraso en el cierre de la herida comparado con el control en todo el periodo del experimento. Para aquellos animales tratados con liofilizado MSC y Endo se observa un leve aumento de la velocidad de cierre de la herida comparado con el control, siendo aun mayor para las heridas tratadas con liofilizado Endo (figura 14 y 15). El cierre completo de la herida fue observado al día 12 después de la intervención.



Figura 14: Fotografías representativas de la evolución de las heridas en el tiempo en modelo animal de hiperglicemia inducida por Dieta tras la intervención con los medios condicionados. Los paneles representan una imagen representativa correspondiente a las heridas tratadas con PBS (control) y tratadas con medio de cultivo de células mesenquimales (MSC), medio de Cultivo de células mesenquimales derivadas a endotelio (Endo) y medio de cultivo proveniente de células HUVEC (HUVEC). Estas fotografías representan el efecto de los medios de 5 animales por grupo.

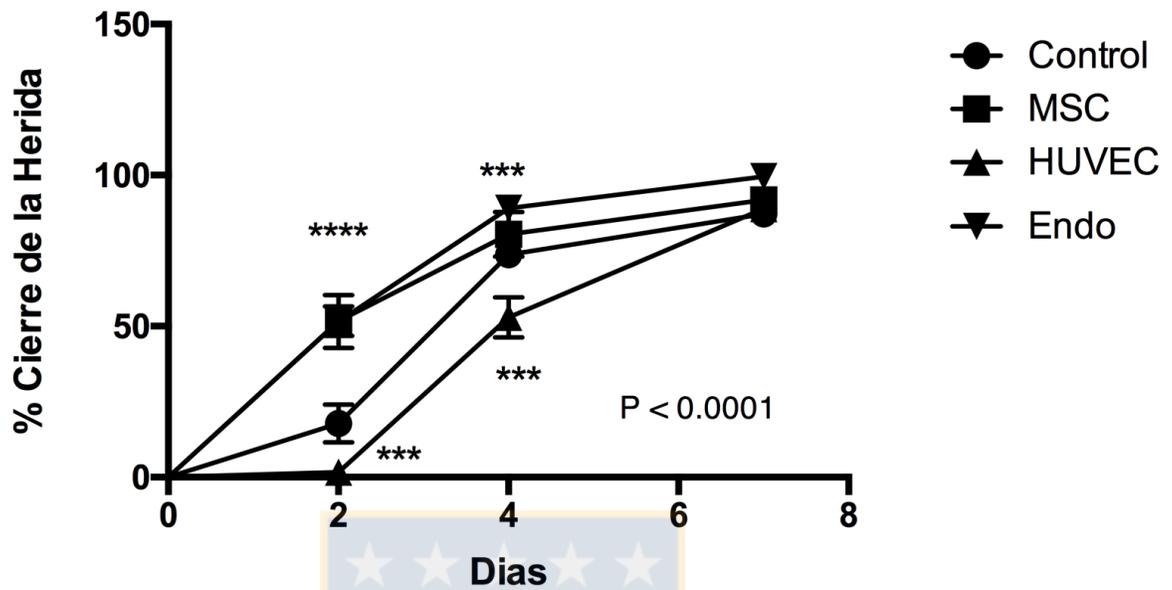
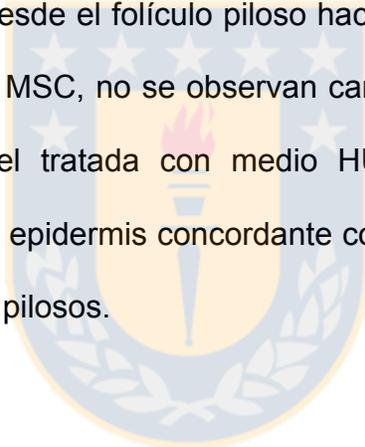


Figura 15: Efecto de los medios condicionados en el cierre de la herida en modelo animal con Hiperglicemia inducida por una dieta alta en grasa. Los medios condicionados fueron obtenidos desde sobrenadante de células huvec (HUVEC), células mesenquimales (MSC) y células mesenquimales derivadas a endotelio (Endo) en el cierre de herida en animal control. Cada punto corresponde al porcentaje de cierre de la herida de 5 animales por grupo. El análisis de la significancia se realizó por ANOVA. Cada punto del ensayo fue comparado con el control.

b. Análisis histológico de la herida en ratón C57BL/6 con hiperglicemia inducida por Dieta.

Una vez que la herida se cerró (día 12) los animales fueron sacrificados, y se recuperaron trozos de piel del lugar donde se realizó la herida. El resultado del análisis histológico se resumen en la Tabla 3.2 y Figura 16. Los resultados muestran una mayor cicatrización en los cortes histológicos provenientes de la piel tratada con medio Endo comparado con el control, además se observa migración de células desde el folículo piloso hacia la zona de la herida. Para la piel tratada con medio MSC, no se observan cambios histológicos comparados con el control. La piel tratada con medio HUVEC, muestra una marcada hiperproliferación de la epidermis concordante con una abundante migración de células de los folículos pilosos.



Cortes de Piel Dieta

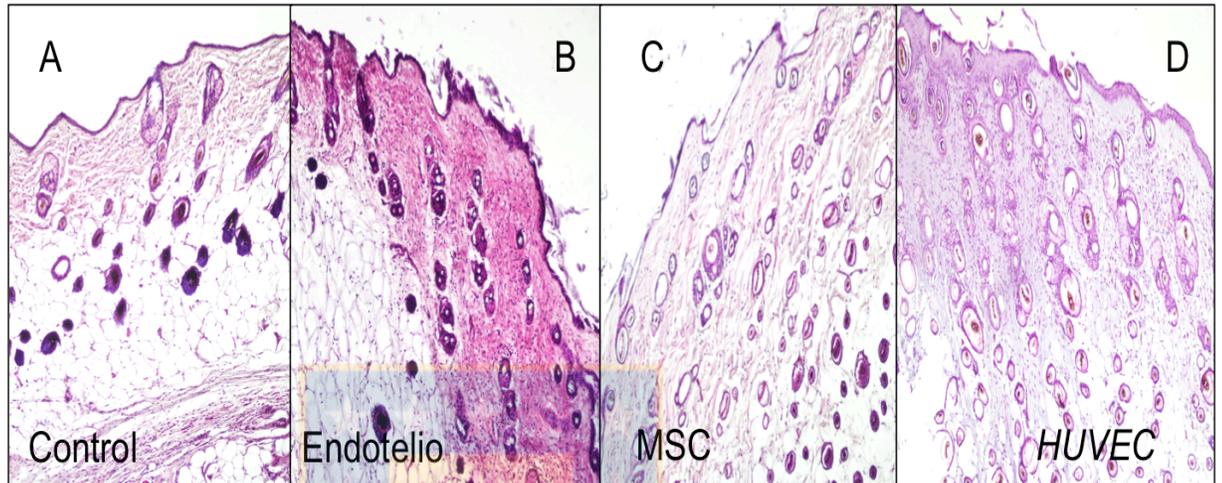


Figura 16: Fotografías representativas de cortes histológicos de animal con hiperglicemia inducida por dieta, tratado con los medios Endo, MSC, HUVEC. Las fotografías corresponden a cortes histológico de piel del lugar donde se realizó la incisión. **A.** Corresponde al corte de piel tratado con PBS. **B** corresponde al corte de piel tratado con medio Endotelial. **C** corresponde al corte de piel tratado con medio MSC. **D** corresponde al corte de piel tratado con medio HUVEC.

Tabla 3.2: Análisis de los cortes histológicos de las heridas de los animales control. (Estos resultados corresponden al análisis de cortes histológicos de 5 animales de cada grupo).

	Piel control medio	Piel tratada con Endo	Piel tratada con HUVEC	Piel tratada con MSC
Tejido graso	Abundante	Moderado	Abundante	abundante
Inflamación	No	No	no	no
Epidermis proliferativa	No	No	Marcada	no
Depósito de tejido conectivo	Abundante	Moderada	moderada	no
Número de folículos pilosos	moderada	moderado	abundante	moderado
Migración células desde folículos pilosos a la epidermis	Leve	Moderado	Marcada	Leve

Comparación del efecto del medio de cultivo endotelial en modelo animal sometido a dieta convencional comparado con el modelo animal con hiperglicemia inducida por dieta.

En ambos modelos animal, los resultados indican que el medio de cultivo de células mesenquimales derivadas a endotelio (Endo), logra aumentar la velocidad de cierre de la herida tras una aplicación. Para evaluar el impacto de la dieta en el cierre de la herida comparamos el cierre de la herida en animal control (dieta convencional) y el animal con hiperglicemia inducida por una alimentación alta en grasa (Figura 17). Los resultados muestran que el animal con hiperglicemia inducida por dieta tiene un retraso en el cierre de la herida comparado con el control. Ahora si comparamos el efecto del medio de cultivo endotelial (Endo) en ambos modelos (Figura 18) podemos observar que la aplicación de este medio incrementa la velocidad de cierre de la herida en ambos modelos, y que en animal con hiperglicemia, el aumento de la velocidad de cierre de la herida logra llegar a la velocidad de cierre de la herida del animal sin hiperglicemia.

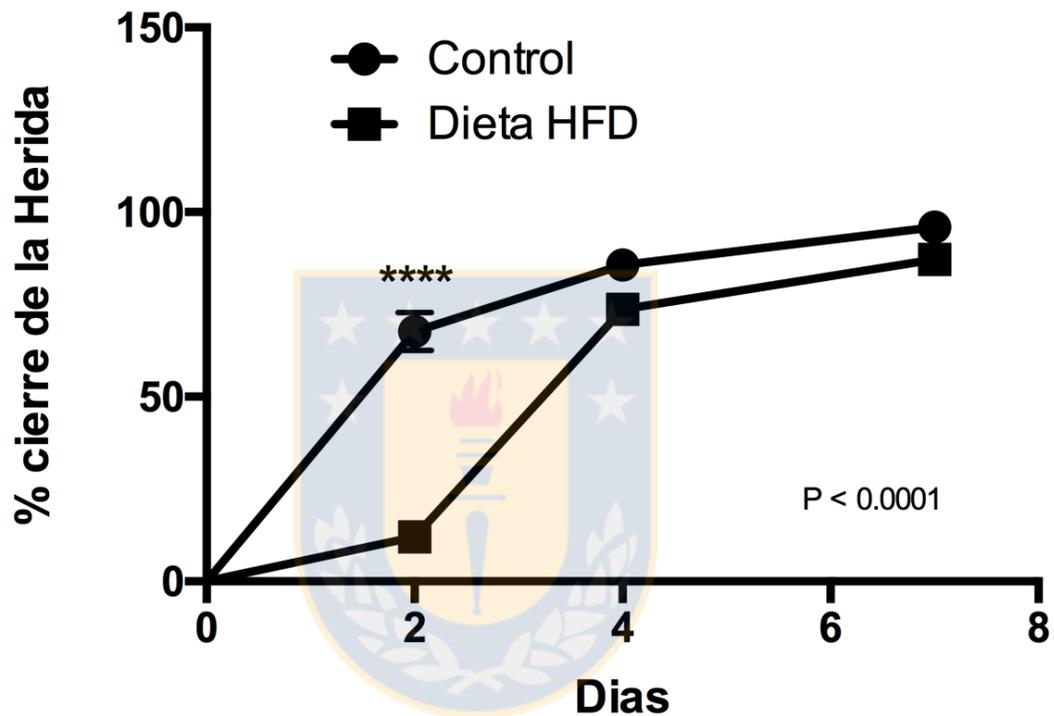


Figura 17: Comparación de la Velocidad de cierre de la Herida entre al animal alimentado con una dieta convencional y el modelo animal con hiperglicemia inducida por Dieta. Cada punto corresponde al porcentaje de cierre de la herida de 5 animales por grupo. El análisis de la significancia se realizó por ANOVA. Cada punto del ensayo fue comparado con el control.

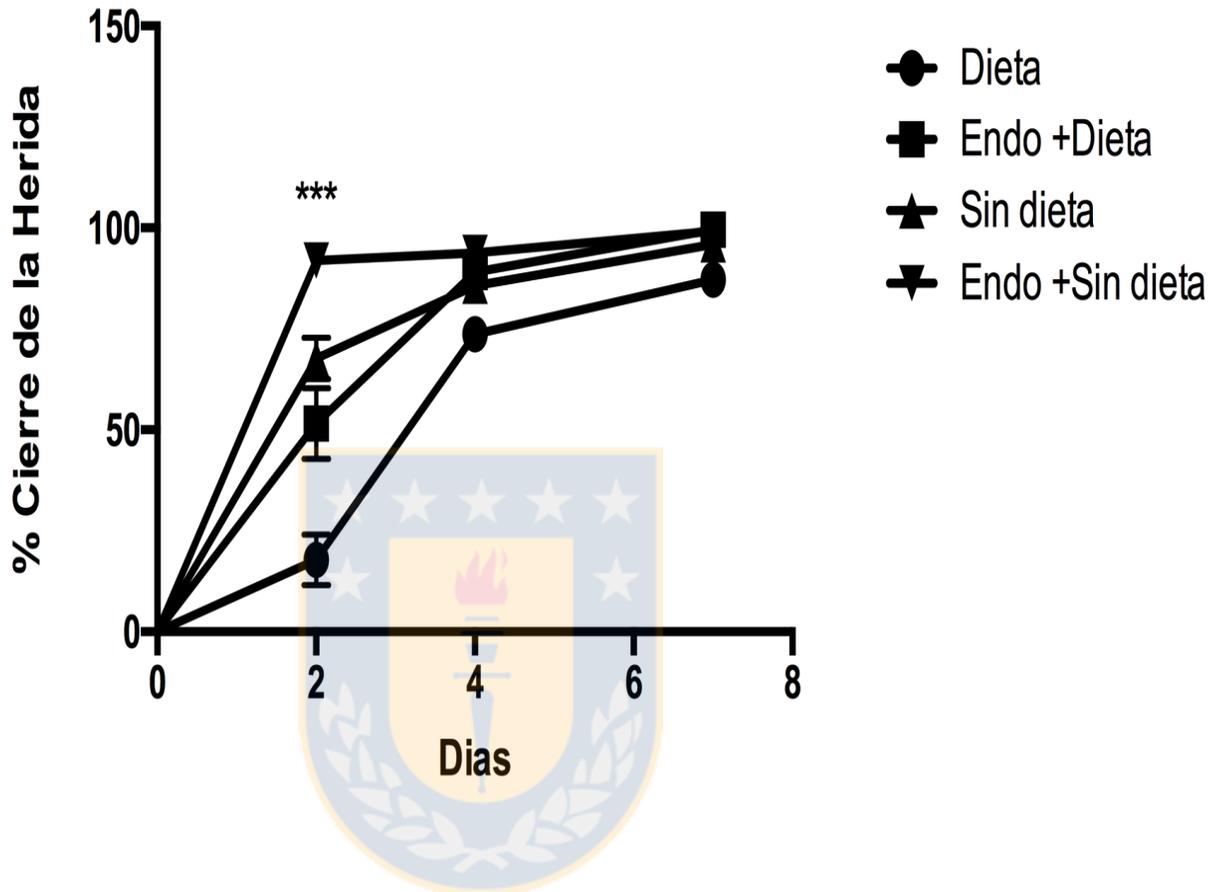


Figura 18: Comparación del efecto del medio Endotelial (Endo) en el cierre de la herida en el modelo animal control y en modelo de hiperglicemia inducido por dieta. Cada punto corresponde al porcentaje de cierre de la herida de 5 animales por grupo. El análisis de la significancia se realizó por ANOVA. Cada punto del ensayo fue comparado con el control.

DISCUSIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles han aumentado en los últimos años, siendo responsables de las primeras causas de muerte a nivel nacional e internacional. Junto con el aumento sostenido de estas patologías se han incrementado las tasas de comorbilidades asociadas a estas enfermedades. Una de las patologías crónicas que más ha aumentado es diabetes mellitus. Se ha considerado a la Diabetes como una de las condiciones médicas más común y grave que la humanidad ha tenido que enfrentar. El último informe de la Federación Internacional de Diabetes (FDI), señala que en el 2013, 382 millones de personas (8,5% de la población mundial) tiene diabetes y se espera que llegue a 592 millones en el 2035 (Diabetes, 2011-2012). Chile es el país con mayor prevalencia de Diabetes en América del Sur con un 12,32% de la población con Diabetes, y se estima que solo 78% de la población chilena ha sido diagnosticada (Diabetes, 2011-2012). Este comportamiento epidémico probablemente se debe a varios factores entre los cuales se destacan la raza, el cambio en los hábitos de vida (hábitos alimentarios con mayor contenidos de grasas y carbohidratos, sedentarismo, obesidad) y el envejecimiento de la población. La Diabetes tiene una **alta morbimortalidad**, siendo las complicaciones microvasculares (retinopatía, nefropatía, neuropatía y úlcera de pie diabético), causantes de la alta morbilidad y las complicaciones macrovasculares (infarto agudo al miocardio y accidentes cerebrovasculares) causantes de la alta mortalidad. La naturaleza crónica así como la gravedad de

sus complicaciones y los recursos necesarios para su control, convierten a la **Diabetes en una enfermedad muy costosa**, no solo para los individuos afectados y sus familias, si no también para el sistema de salud. Entre un 15 y un 25% de los pacientes con Diabetes desarrollan Úlcera de Pie Diabético (UPD) en alguna de sus extremidades inferiores en algún momento de su vida, de estos entre un 10-30% sufrirá además una amputación. Otro dato alarmante es que 7 de cada 10 amputaciones de extremidades inferiores están relacionadas con la diabetes, esto es una amputación cada 30 segundos. En este contexto, se hace necesario la búsqueda de herramientas terapéuticas innovadoras que permitan tratar en forma eficiente la úlcera de pie diabético y garantizar su curación total.

Por otro lado, las células madres Mesenquimales (MSCs) han sido objeto de estudio a partir de la década de los años 70's debido a su alto potencial de diferenciación, proliferación, plasticidad, baja inmunogenicidad y fácil cultivo. Por lo tanto, son una excelente fuente para la reparación de tejidos. Trabajos previos de nuestro laboratorio permitieron demostrar la capacidad de las células mesenquimales de diferenciarse a células endoteliales. Además demostramos que estas células endoteliales tenían la capacidad de inducir angiogénesis y de acelerar el cierre de heridas en un modelo *in vivo*. Asociado a estos hallazgos, se logró demostrar que el potencial de regeneración de las células endoteliales derivadas de células mesenquimales estaba en factores solubles secretados al medio de cultivo por estas células.

Frente a la creciente población de personas con diabetes y el aumento de sus comorbilidades (úlceras de pie diabético por ejemplo), así como las propiedades de regeneración de los factores secretados por las células endoteliales derivadas de células mesenquimales, nos planteamos evaluar el efecto de estos factores en el cierre de heridas en un modelo de animal con hiperglicemia.

Considerando los factores ambientales que predisponen a Diabetes asociado a datos de literatura nos planteamos generar un modelo animal con hiperglicemia inducida por dieta para realizar nuestros ensayos de herida, con la finalidad de acercarnos a una condición diabética, más bien tratando de simular una herida en un paciente diabético. Si bien es cierto, que para generar una herida con característica de úlcera de pie diabético se requiere más que hiperglicemia (neuropatía, reducción del flujo sanguíneo, infección bacteriana) este modelo es el más utilizado y es el que más se podría acercar a la condición diabética. Los resultados obtenidos señalan que la alimentación alta en grasa es un factor importante en el desarrollo de hiperglicemia. Algunas publicaciones señalan que una alta ingesta de lípidos condiciona a un estado de resistencia a la insulina, el que evoluciona a un estado de tolerancia alterada a la glucosa y posteriormente a un estado de hiperglicemia (Dong et al., 2012; Unger & Orci, 2000). Nuestros resultados apoyan esta propuesta. Además no sólo, una dieta alta en grasa, genera alteraciones en el perfil del metabolismo glucídico (glicemia, insulina, test de tolerancia a la glucosa, índice HOMA), si no además en el perfil

antioxidante total, el cual se ve disminuido conforme aumenta el tiempo de dieta. Finalmente logramos generar un modelo animal con hiperglicemia inducido por dieta.

Ensayos de Herida: Considerando nuestros resultados preliminares en modelos in vivo, decidimos evaluar el efecto de los factores secretados por las células endoteliales derivadas de células mesenquimales en el cierre de herida en modelos in vitro e in vivo (modelo de hiperglicemia). Para iniciar esta etapa analizamos el efecto de dosis y tiempo de exposición de los medios de cultivo de células mesenquimales-endoteliales (Endo), mesenquimales (MSC), y HUVEC sobre un cultivo de células ECV-304. Si bien, nuestro objetivo primario era demostrar el efecto inductor de regeneración del medio de cultivo Endo, se consideró utilizar medio de cultivo MSC como control, ya que fueron el origen de las células Endo, pero además utilizar HUVEC, ya que son células endoteliales, y nos permitía evaluar si las propiedades regeneradoras son propias de las células endoteliales. Los resultados in vitro, demostraron que a pesar de variar dosis o tiempos de exposición en los ensayos de herida no se logró el cierre de la herida *in vitro* a diferencia a los resultados obtenidos in vivo. Una posible explicación es que la base celular para realizar los ensayos de herida in vitro (ECV-304), no era adecuada, probablemente la opción adecuada sería haber utilizado fibroblastos o keratinocitos.

Con el modelo in vivo los resultados fueron diferentes dependiendo el origen del medio de cultivo. Se observó un leve aumento en la velocidad de cierre de la herida cuando se utilizó medio de cultivo MSC y Endo, (observándose un mayor efecto con el medio Endo). Sin embargo se observaron resultados adversos cuando se utilizó medio de cultivo de HUVEC. Este patrón de respuesta se observó tanto en los animales control (dieta convencional) como en los animales con hiperglicemia (dieta alta en grasa). Otro punto interesante de estos resultados, es que el efecto de mayor incremento en la velocidad del cierre de la herida se logra en las primeras horas posterior a la aplicación, para luego observar una velocidad de cierre similar en todas las condiciones analizadas, con excepción del medio HUVEC. Por otro lado, la condición de hiperglicemia, si deterioró el patrón de cierre de la herida el cual se logró restablecer al utilizar el medio Endo.

Finalmente, la evidencia señala que el medio Endo contiene factores solubles capaces de inducir regeneración tisular. Hasta ahora, los datos no nos permiten dilucidar el mecanismo por el cual induce regeneración tisular in vivo. In vitro no pudimos demostrar que los factores secretados por Endo inducen migración celular, al parecer si logra inducir una leve proliferación celular.

Nuestras estrategias para identificar los factores secretados, basados en los datos de laboratorio anteriores a esta tesis, nos llevaron a realizar una búsqueda de factores secretados. Para ello realizamos un ensayo (*array* de factores secretados), que nos permitía identificar 55 factores secretados

secretados. Estos resultados nos permitieron identificar al menos 7 factores que sólo están presentes en el medio de Endo y que no están en MSC o HUVEC. Por lo cual estos factores son nuestros candidatos como responsables del cierre de la herida (datos no mostrados). Además realizamos separación de proteínas por isoelectroenfoque líquido al cual acoplamos a espectrómetro de masa. Este análisis nos permitió identificar otras proteínas presentes en el medio Endo, que podrían tener un potencial regenerador (datos no mostrados).

La realización de este trabajo, nos lleva a sugerir que una parte importante de los efectos terapéuticos atribuidos a las células madres se debe a los factores solubles secretados por éstas y como estos factores modulan funciones biológicas. Podemos concluir que los factores secretados por Endo tienen una importante aplicación en Biomedicina. Aún queda por dilucidar el mecanismo por el cual inducen regeneración, así como identificar por otras técnicas otras proteínas que podrían estar presente en el medio Endo y que no logramos identificar por las limitaciones de las técnicas utilizadas.

GLOSARIO

ALAD: Asociación latinoamericana de diabetes

BM-MSC: células madre mesenquimales de la médula ósea.

DIO: Obesidad inducida por Dieta

DM: Diabetes Mellitus

DPN: Neuropatía Diabética

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EPC: Células progenitoras endoteliales

ECV-304: Células endoteliales humanas.

EGFhr: Factor de crecimiento epidérmico recombinante humano.

Endo: Células endoteliales derivadas desde células mesenquimales

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos .

FDA: Food and Drug Administration

FDI: Federación Internacional de Diabetes

G-CSF: factor estimulante de granulocitos.

GM-CSF: factor de estimulante de granulocitos macrófago

GK : rata Goto-Kakizaki

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

HFD: Dieta Alta en grasa

HUVEC: Células endoteliales de vena de cordón umbilical Humano

HSC células madre hematopoyéticas.

hWMSC: células madre de la gelatina de Wharton humana.

IL-1 β : interleuquina 1 β

IL6: Interleuquina 6

KGF: Factor de crecimiento de queratinocitos

MEC: Matriz Extracelular

MMP: Metaloproteinasas

MSC: Células madres mesenquimales.

NO: Oxído Nítrico

OMS: Organización Mundial de la Salud

OLETF: rata Otsuka-Largo-Evans-Tokushima

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

ROS: Especies reactivas del Oxígeno

rhPDGF-BB: Factor de crecimiento derivado de plaquetas recombinante humano.

SDT: rata espontáneamente diabética Torii

SHR: ratas espontáneamente hipertensas

STZ : estreptozotocina

TGF β : Factor de crecimiento transformante beta

TIMP: inhibidores tisulares de metaloproteinasas

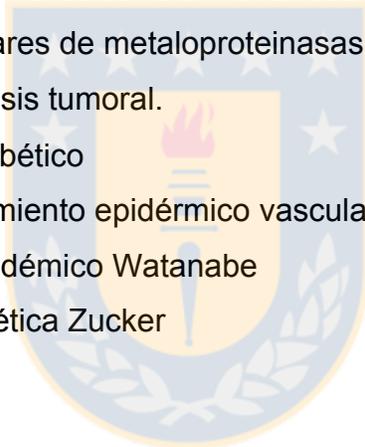
TNF α : Factor de necrosis tumoral.

UPD: Úlcera de pie diabético

VEGF: Factor de crecimiento epidérmico vascular.

WHHL: conejo hiperlipidémico Watanabe

ZDF: rata obesas-diabética Zucker



REFERENCIAS

- Abidia, A., Laden, G., Kuhan, G., Johnson, B. F., Wilkinson, A. R., Renwick, P. M., . . . McCollum, P. T. (2003). The role of hyperbaric oxygen therapy in ischaemic diabetic lower extremity ulcers: a double-blind randomised-controlled trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 25(6), 513-518. doi:10.1053/ejvs.2002.1911
- Adriana Lozano-Platonoff, M. D. F. M.-M., Mónica Ibáñez-Doria, & Contreras-Ruiz*, y. J. (2014). Estándar de oro en el manejo del pie diabético: yeso de contacto total. *Gaceta Médica de México*, 150, 58-64.
- Aguilera, V., Briceno, L., Contreras, H., Lamperti, L., Sepulveda, E., Diaz-Perez, F., . . . Aguayo, C. (2014). Endothelium trans differentiated from Wharton's jelly mesenchymal cells promote tissue regeneration: potential role of soluble pro-angiogenic factors. *PLoS One*, 9(11), e111025. doi:10.1371/journal.pone.0111025
- Ali, S., Stone, M. A., Peters, J. L., Davies, M. J., & Khunti, K. (2006). The prevalence of co-morbid depression in adults with Type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabet Med*, 23(11), 1165-1173. doi:10.1111/j.1464-5491.2006.01943.x
- Alpers, C. E., & Hudkins, K. L. (2011). Mouse models of diabetic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 20(3), 278-284. doi:10.1097/MNH.0b013e3283451901
- Anderson, K., & Hamm, R. L. (2012). Factors That Impair Wound Healing. *J Am Coll Clin Wound Spec*, 4(4), 84-91. doi:10.1016/j.jccw.2014.03.001
- Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P., & Nurden, A. T. (2004). Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*, 91(1), 4-15. doi:10.1160/TH03-07-0440
- Ansell, D. M., Campbell, L., Thomason, H. A., Brass, A., & Hardman, M. J. (2014). A statistical analysis of murine incisional and excisional acute wound models. *Wound Repair Regen*, 22(2), 281-287. doi:10.1111/wrr.12148
- Apelqvist, J., Ragnarson Tennvall, G. (2005). Calcular los costes del pie diabético. *Diabetes Voice*, 50.
- Armstrong, D. G. (2006). The efficacy of Apligraf in the treatment of diabetic foot ulcers - Discussion. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(7), 158S-159S. doi:10.1097/01.prs.0000222532.83350.f6
- Avci, P., Sadasivam, M., Gupta, A., De Melo, W. C., Huang, Y. Y., Yin, R., . . . Hamblin, M. R. (2013). Animal models of skin disease for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, 8(3), 331-355. doi:10.1517/17460441.2013.761202
- Bakhshayesh, M., Soleimani, M., Mehdizadeh, M., & Katebi, M. (2012). Effects of TGF-beta and b-FGF on the potential of peripheral blood-borne stem cells and bone marrow-derived stem cells in wound healing in a murine model. *Inflammation*, 35(1), 138-142. doi:10.1007/s10753-011-9298-4

- Baroni, G., Porro, T., Faglia, E., Pizzi, G., Mastropasqua, A., Oriani, G., . . . Favales, F. (1987). Hyperbaric oxygen in diabetic gangrene treatment. *Diabetes Care*, *10*(1), 81-86.
- Barrientos, S., Brem, H., Stojadinovic, O., & Tomic-Canic, M. (2014). Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*, *22*(5), 569-578. doi:10.1111/wrr.12205
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*, *16*(5), 585-601. doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x
- Beckman, J. A., & Creager, M. A. (2016). Vascular Complications of Diabetes. *Circ Res*, *118*(11), 1771-1785. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306884
- Beidler, S. K., Douillet, C. D., Berndt, D. F., Keagy, B. A., Rich, P. B., & Marston, W. A. (2009). Inflammatory cytokine levels in chronic venous insufficiency ulcer tissue before and after compression therapy. *J Vasc Surg*, *49*(4), 1013-1020. doi:10.1016/j.jvs.2008.11.049
- Berlanga, J., Fernandez, J. I., Lopez, E., Lopez, P. A., del Rio, A., Valenzuela, C., . . . Herrera, L. (2013). Heberprot-P: a novel product for treating advanced diabetic foot ulcer. *MEDICC Rev*, *15*(1), 11-15.
- Boulton, A. J. (2005). El pie diabético: epidemiología, factores de riesgo y atención. *Diabetes Voice*, *50*.
- Boulton, A. J. (2008). The diabetic foot: grand overview, epidemiology and pathogenesis. *Diabetes Metab Res Rev*, *24 Suppl 1*, S3-6. doi:10.1002/dmrr.833
- Brosius, F. C., 3rd, Alpers, C. E., Bottinger, E. P., Breyer, M. D., Coffman, T. M., Gurley, S. B., . . . Animal Models of Diabetic Complications, C. (2009). Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, *20*(12), 2503-2512. doi:10.1681/ASN.2009070721
- Burcelin, R., Crivelli, V., Dacosta, A., Roy-Tirelli, A., & Thorens, B. (2002). Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *282*(4), E834-842. doi:10.1152/ajpendo.00332.2001
- Carlos Beltrán B., A. F. V., TM M. Soledad Giglio M., Leandro Biagini A., Ricardo Morales I., Jorge Pérez G. y E.U. Isabel Aburto T. (2001). Tratamiento de la infección en el pie diabético. *Revista Chilena de Infectología*, *18*(3).
- Chen, C. E., Ko, J. Y., Fong, C. Y., & Juhn, R. J. (2010). Treatment of diabetic foot infection with hyperbaric oxygen therapy. *Foot Ankle Surg*, *16*(2), 91-95. doi:10.1016/j.fas.2009.06.002
- Chen, T. M., Tsai, J. C., & Burnouf, T. (2010). A novel technique combining platelet gel, skin graft, and fibrin glue for healing recalcitrant lower extremity ulcers. *Dermatol Surg*, *36*(4), 453-460. doi:10.1111/j.1524-4725.2010.01480.x
- Chow, B. S., & Allen, T. J. (2015). Mouse Models for Studying Diabetic Nephropathy. *Curr Protoc Mouse Biol*, *5*(2), 85-94. doi:10.1002/9780470942390.mo140192

- Coppey, L., Davidson, E., Lu, B., Gerard, C., & Yorek, M. (2011). Vasopeptidase inhibitor ilepatril (AVE7688) prevents obesity- and diabetes-induced neuropathy in C57Bl/6J mice. *Neuropharmacology*, *60*(2-3), 259-266. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.09.008
- Coppo NB, C. J., Lazarte MA. (2003). Intervalos de confianza para colesterol ligado a lipoproteínas de alta y baja densidad en suero de bovinos, equinos, porcinos y caninos. *Revista veterinaria*, *14*, 1-10.
- Danaei, G., Finucane, M. M., Lu, Y., Singh, G. M., Cowan, M. J., Paciorek, C. J., . . . C, G. B. M. R. F. (2011). National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*, *378*(9785), 31-40. doi:10.1016/S0140-6736(11)60679-X
- Demidova-Rice, T. N., Hamblin, M. R., & Herman, I. M. (2012). Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care*, *25*(7), 304-314. doi:10.1097/01.ASW.0000416006.55218.d0
- Deppermann, C., Cherpokova, D., Nurden, P., Schulz, J. N., Thielmann, I., Kraft, P., . . . Nieswandt, B. (2013). Gray platelet syndrome and defective thromboinflammation in Nbeal2-deficient mice. *J Clin Invest*. doi:10.1172/JCI69210
- Desafío de la diabetes en Chile*. (2015).
- Diabetes, F. I. (2011-2012). *Federación Internacional de la Diabetes. Plan mundial contra la Diabetes*.
- Dinh, T. L., & Veves, A. (2006). The efficacy of Apligraf in the treatment of diabetic foot ulcers. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *117*(7 Suppl), 152S-157S; discussion 158S-159S. doi:10.1097/01.prs.0000222534.79915.d3
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., . . . Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315-317. doi:10.1080/14653240600855905
- Dong, B., Qi, D., Yang, L., Huang, Y., Xiao, X., Tai, N., . . . Wong, F. S. (2012). TLR4 regulates cardiac lipid accumulation and diabetic heart disease in the nonobese diabetic mouse model of type 1 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *303*(6), H732-742. doi:10.1152/ajpheart.00948.2011
- Edmonds, M., & Apligraf, E. A. (2009). Apligraf in the Treatment of Neuropathic Diabetic Foot Ulcers. *International Journal of Lower Extremity Wounds*, *8*(1), 11-18. doi:10.1177/1534734609331597
- Eming, S. A., Hammerschmidt, M., Krieg, T., & Roers, A. (2009). Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. *Semin Cell Dev Biol*, *20*(5), 517-527. doi:10.1016/j.semcdb.2009.04.009
- Eming, S. A., Koch, M., Krieger, A., Brachvogel, B., Kreft, S., Bruckner-Tuderman, L., . . . Fox, J. W. (2010). Differential proteomic analysis distinguishes tissue repair

- biomarker signatures in wound exudates obtained from normal healing and chronic wounds. *J Proteome Res*, 9(9), 4758-4766. doi:10.1021/pr100456d
- Eming, S. A., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med*, 6(265), 265sr266. doi:10.1126/scitranslmed.3009337
- Eneroth, M., & van Houtum, W. H. (2008). The value of debridement and Vacuum-Assisted Closure (V.A.C.) Therapy in diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab Res Rev*, 24 Suppl 1, S76-80. doi:10.1002/dmrr.852
- Expert Recommendations for Optimizing Outcomes Utilizing Apligraf (R) for Diabetic Foot Ulcers. (2012). *Wounds-a Compendium of Clinical Research and Practice*, 4-23.
- Federation, I. D. (2014). *Diabetes Atlas*. Brussels, Belgium.
- Fernandez-Montequin, J. I., Valenzuela-Silva, C. M., Diaz, O. G., Savigne, W., Sancho-Soutelo, N., Rivero-Fernandez, F., . . . Cuban Diabetic Foot Study, G. (2009). Intra-lesional injections of recombinant human epidermal growth factor promote granulation and healing in advanced diabetic foot ulcers: multicenter, randomised, placebo-controlled, double-blind study. *Int Wound J*, 6(6), 432-443. doi:10.1111/j.1742-481X.2009.00641.x
- Frank, S., Hubner, G., Breier, G., Longaker, M. T., Greenhalgh, D. G., & Werner, S. (1995). Regulation of Vascular Endothelial Growth-Factor Expression in Cultured Keratinocytes - Implications for Normal and Impaired Wound-Healing. *Journal of Biological Chemistry*, 270(21), 12607-12613.
- Galiano, R. D., Michaels, J. t., Dobryansky, M., Levine, J. P., & Gurtner, G. C. (2004). Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen*, 12(4), 485-492. doi:10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x
- GARELLI , G., CALVAGNO M., TOLSTANO A. CARRIO M., & BULLO F. , G. R. (2012). TRATAMIENTO DE ÚLCERAS SEVERAS DE PIÉ DIABÉTICO CON FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO RECOMBINANTE (HEBERPROT-P®) ANÁLISIS RETROSPECTIVO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ARGENTINA. *REVISTA ARGENTINA DE CIRUGÍA CARDIOVASCULAR*, X(3), 153-162.
- Gault, V. A., Kerr, B. D., Harriott, P., & Flatt, P. R. (2011). Administration of an acylated GLP-1 and GIP preparation provides added beneficial glucose-lowering and insulinotropic actions over single incretins in mice with Type 2 diabetes and obesity. *Clin Sci (Lond)*, 121(3), 107-117. doi:10.1042/CS20110006
- Ghazaryan, E., Zhang, Y., He, Y., Liu, X., Li, Y., Xie, J., & Su, G. (2016). Mesenchymal stem cells in corneal neovascularization: Comparison of different application routes. *Mol Med Rep*, 14(4), 3104-3112. doi:10.3892/mmr.2016.5621
- Goldman, R. (2004). Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. *Adv Skin Wound Care*, 17(1), 24-35.

- Grosicki, S., Holowiecki, J., Kuliczowski, K., Skotnicki, A., Hellmann, A., Kyrzcz-Krzemien, S., . . . Giebel, S. (2015). Assessing the efficacy of allogeneic hematopoietic stem cells transplantation (allo-HSCT) by analyzing survival end points in defined groups of acute myeloid leukemia patients: a retrospective, multicenter Polish Adult Leukemia Group study. *Am J Hematol*, *90*(10), 904-909. doi:10.1002/ajh.24113
- Guo, S., & Dipietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *J Dent Res*, *89*(3), 219-229. doi:10.1177/0022034509359125
- Gurri, D. R. (2014). Caracterización de los pacientes con pie diabético tratados con heberprot-P® en el Hospital Militar de Holguín. *Revista Cubana Angiol Cir Vasc.*, *15*(1).
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, *453*(7193), 314-321. doi:10.1038/nature07039
- Gwon, S. Y., Ahn, J. Y., Kim, T. W., & Ha, T. Y. (2012). Zanthoxylum piperitum DC ethanol extract suppresses fat accumulation in adipocytes and high fat diet-induced obese mice by regulating adipogenesis. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, *58*(6), 393-401.
- Hamou, C., Callaghan, M. J., Thangarajah, H., Chang, E., Chang, E. I., Grogan, R. H., . . . Gurtner, G. C. (2009). Mesenchymal stem cells can participate in ischemic neovascularization. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *123*(2 Suppl), 45S-55S. doi:10.1097/PRS.0b013e318191be4a
- Hardigan, T., Ward, R., & Ergul, A. (2016). Cerebrovascular complications of diabetes: focus on cognitive dysfunction. *Clin Sci (Lond)*, *130*(20), 1807-1822. doi:10.1042/CS20160397
- Harrington, C., Zagari, M. J., Corea, J., & Klitenic, J. (2000). A cost analysis of diabetic lower-extremity ulcers. *Diabetes Care*, *23*(9), 1333-1338.
- Herlyn, M., & Malkowicz, S. B. (1991). Regulatory pathways in tumor growth and invasion. *Lab Invest*, *65*(3), 262-271.
- Hinz, B. (2006). Masters and servants of the force: the role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. *Eur J Cell Biol*, *85*(3-4), 175-181. doi:10.1016/j.ejcb.2005.09.004
- Ichioka, S., Ohura, N., & Nakatsuka, T. (2005). The positive experience of using a growth factor product on deep wounds with exposed bone. *J Wound Care*, *14*(3), 105-109. doi:10.12968/jowc.2005.14.3.26753
- Isakson, M., de Blacam, C., Whelan, D., McArdle, A., & Clover, A. J. (2015). Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential. *Stem Cells Int*, *2015*, 831095. doi:10.1155/2015/831095
- Izmirli, H. H., Alagoz, M. S., Gercek, H., Eren, G. G., Yucel, E., Subasi, C., . . . Karaoz, E. (2016). Use of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells to Accelerate Neovascularization in Interpolation Flaps. *J Craniofac Surg*, *27*(1), 264-271. doi:10.1097/SCS.0000000000002270

- Kakagia, D. D., Kazakos, K. J., Xarchas, K. C., Karanikas, M., Georgiadis, G. S., Tripsiannis, G., & Manolas, C. (2007). Synergistic action of protease-modulating matrix and autologous growth factors in healing of diabetic foot ulcers. A prospective randomized trial. *J Diabetes Complications*, 21(6), 387-391. doi:10.1016/j.jdiacomp.2007.03.006
- Karlsson, C., Brantsing, C., Svensson, T., Brisby, H., Asp, J., Tallheden, T., & Lindahl, A. (2007). Differentiation of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes: analysis of chondrogenic potential and expression pattern of differentiation-related transcription factors. *J Orthop Res*, 25(2), 152-163. doi:10.1002/jor.20287
- Kawano, K., Hirashima, T., Mori, S., & Natori, T. (1994). OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) rat: a new NIDDM rat strain. *Diabetes Res Clin Pract*, 24 Suppl, S317-320.
- Kim, A. K., Kim, M. H., Kim, D. H., Go, H. N., Cho, S. W., Um, S. H., & Kim, D. I. (2016). Inhibitory effects of mesenchymal stem cells in intimal hyperplasia after balloon angioplasty. *J Vasc Surg*, 63(2), 510-517. doi:10.1016/j.jvs.2014.08.058
- Kim, M. H., Liu, W., Borjesson, D. L., Curry, F. R., Miller, L. S., Cheung, A. L., . . . Simon, S. I. (2008). Dynamics of neutrophil infiltration during cutaneous wound healing and infection using fluorescence imaging. *J Invest Dermatol*, 128(7), 1812-1820. doi:10.1038/sj.jid.5701223
- King, A. J. F. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*, 166(3), 877-894. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x
- Kitamura, M., Akamatsu, M., Kawanami, M., Furuichi, Y., Fujii, T., Mori, M., . . . Murakami, S. (2016). Randomized Placebo-Controlled and Controlled Non-Inferiority Phase III Trials Comparing Trafermin, a Recombinant Human Fibroblast Growth Factor 2, and Enamel Matrix Derivative in Periodontal Regeneration in Intrabony Defects. *Journal of Bone and Mineral Research*, 31(4), 806-814. doi:10.1002/jbmr.2738
- Koornneef, A., Maczuga, P., van Logtenstein, R., Borel, F., Blits, B., Ritsema, T., . . . Konstantinova, P. (2011). Apolipoprotein B knockdown by AAV-delivered shRNA lowers plasma cholesterol in mice. *Mol Ther*, 19(4), 731-740. doi:10.1038/mt.2011.6
- Kranke, P., Bennett, M., Roeckl-Wiedmann, I., & Debus, S. (2004). Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev*(2), CD004123. doi:10.1002/14651858.CD004123.pub2
- Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., . . . Sharkis, S. J. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105(3), 369-377.
- Kurahashi, T., & Fujii, J. (2015). Roles of Antioxidative Enzymes in Wound Healing. *Journal of Developmental Biology*, 3(2), 57-70. doi:10.3390/jdb3020057
- Kusumanto, Y. H., van Weel, V., Mulder, N. H., Smit, A. J., van den Dungen, J. J., Hooymans, J. M., . . . Hospers, G. A. (2006). Treatment with intramuscular

- vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial. *Hum Gene Ther*, 17(6), 683-691. doi:10.1089/hum.2006.17.683
- La Rocca, G., Anzalone, R., Corrao, S., Magno, F., Loria, T., Lo Iacono, M., . . . Farina, F. (2009). Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol*, 131(2), 267-282. doi:10.1007/s00418-008-0519-3
- Leiter, E. H. (2009). Selecting the "right" mouse model for metabolic syndrome and type 2 diabetes research. *Methods Mol Biol*, 560, 1-17. doi:10.1007/978-1-59745-448-3_1
- Leyh, M., Seitz, A., Durselen, L., Schaumburger, J., Ignatius, A., Grifka, J., & Grassel, S. (2014). Subchondral bone influences chondrogenic differentiation and collagen production of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, 16(5), 453. doi:10.1186/s13075-014-0453-9
- Li, H., Fu, X., Ouyang, Y., Cai, C., Wang, J., & Sun, T. (2006). Adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells contribute to wound healing of skin appendages. *Cell Tissue Res*, 326(3), 725-736. doi:10.1007/s00441-006-0270-9
- Li, M. D., Atkins, H., & Bubela, T. (2014). The global landscape of stem cell clinical trials. *Regen Med*, 9(1), 27-39. doi:10.2217/rme.13.80
- Lindstrom, P. (2007). The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *ScientificWorldJournal*, 7, 666-685. doi:10.1100/tsw.2007.117
- Liu, H., Lin, S., Xiao, D., Zheng, X., Gu, Y., & Guo, S. (2013). Evaluation of the Wound Healing Potential of Resina Draconis (*Dracaena cochinchinensis*) in Animal Models. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 709865. doi:10.1155/2013/709865
- Loots, M. A., Lamme, E. N., Zeegelaar, J., Mekkes, J. R., Bos, J. D., & Middelkoop, E. (1998). Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J Invest Dermatol*, 111(5), 850-857. doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00381.x
- Mahdavian Delavary, B., van der Veer, W. M., van Egmond, M., Niessen, F. B., & Beelen, R. H. (2011). Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*, 216(7), 753-762. doi:10.1016/j.imbio.2011.01.001
- Maleki, M., Ghanbarvand, F., Reza Behvarz, M., Ejtemaei, M., & Ghadirkhomi, E. (2014). Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *Int J Stem Cells*, 7(2), 118-126. doi:10.15283/ijsc.2014.7.2.118
- Margolis, D. J., Bartus, C., Hoffstad, O., Malay, S., & Berlin, J. A. (2005). Effectiveness of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of

- diabetic neuropathic foot ulcers. *Wound Repair Regen*, 13(6), 531-536. doi:10.1111/j.1524-475X.2005.00074.x
- Margolis, D. J., Cromblehome, T., Herlyn, M., Cross, P., Weinberg, L., Filip, J., & Propert, K. (2004). Clinical protocol. Phase I trial to evaluate the safety of H5.020CMV.PDGF-b and limb compression bandage for the treatment of venous leg ulcer: trial A. *Hum Gene Ther*, 15(10), 1003-1019. doi:10.1089/hum.2004.15.1003
- Marston, W. A. (2004). Dermagraft, a bioengineered human dermal equivalent for the treatment of chronic nonhealing diabetic foot ulcer. *Expert Rev Med Devices*, 1(1), 21-31. doi:10.1586/17434440.1.1.21
- Martinez-Zapata, M. J., Marti-Carvajal, A. J., Sola, I., Exposito, J. A., Bolibar, I., Rodriguez, L., . . . Zaror, C. (2016). Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev*(5), CD006899. doi:10.1002/14651858.CD006899.pub3
- Mehrannia, M., Vaezi, M., Yousefshahi, F., & Rouhipour, N. (2014). Platelet rich plasma for treatment of nonhealing diabetic foot ulcers: a case report. *Can J Diabetes*, 38(1), 5-8. doi:10.1016/j.jcjd.2013.08.271
- Meloni, M., Izzo, V., Vainieri, E., Giurato, L., Ruotolo, V., & Uccioli, L. (2015). Management of negative pressure wound therapy in the treatment of diabetic foot ulcers. *World J Orthop*, 6(4), 387-393. doi:10.5312/wjo.v6.i4.387
- Mendoza-Romo, M., Ramírez Arriola, MC. (2005). Abordaje multidisciplinario del pie diabético. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 13(4), 165-179.
- Miller, R. G., Mahajan, H. D., Costacou, T., Sekikawa, A., Anderson, S. J., & Orchard, T. J. (2016). A Contemporary Estimate of Total Mortality and Cardiovascular Disease Risk in Young Adults With Type 1 Diabetes: The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes Care*. doi:10.2337/dc16-1162
- Mitchell, K. E., Weiss, M. L., Mitchell, B. M., Martin, P., Davis, D., Morales, L., . . . Troyer, D. (2003). Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*, 21(1), 50-60.
- Miyagawa, K., Kondo, T., Goto, R., Matsuyama, R., Ono, K., Kitano, S., . . . Araki, E. (2013). Effects of combination therapy with vildagliptin and valsartan in a mouse model of type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*, 12, 160. doi:10.1186/1475-2840-12-160
- Mutowo, M. P., Lorgelly, P. K., Laxy, M., Renzaho, A. M., Mangwiro, J. C., & Owen, A. J. (2016). The Hospitalization Costs of Diabetes and Hypertension Complications in Zimbabwe: Estimations and Correlations. *J Diabetes Res*, 2016, 9754230. doi:10.1155/2016/9754230
- Naughton, G., Mansbridge, J., & Gentzkow, G. (1997). A metabolically active human dermal replacement for the treatment of diabetic foot ulcers. *Artif Organs*, 21(11), 1203-1210.

- Novo, E., & Parola, M. (2008). Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 1(1), 5. doi:10.1186/1755-1536-1-5
- Nunan, R., Harding, K. G., & Martin, P. (2014). Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Dis Model Mech*, 7(11), 1205-1213. doi:10.1242/dmm.016782
- O'Brien, P. D., Sakowski, S. A., & Feldman, E. L. (2014). Mouse models of diabetic neuropathy. *ILARJ*, 54(3), 259-272. doi:10.1093/ilar/ilt052
- Oana, F., Takeda, H., Hayakawa, K., Matsuzawa, A., Akahane, S., Isaji, M., & Akahane, M. (2005). Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin. *Metabolism*, 54(8), 995-1001. doi:10.1016/j.metabol.2005.02.016
- Osorio, H. (2013). Determinación de los niveles de colesterol LDL en una especie con patrón HDL. *revista Inv Vet Perú*, 24(3), 277-282.
- Pai-Dhungat, J. V., & Parikh, F. (2015). Diabetic Foot and Heberprot-P. *J Assoc Physicians India*, 63(3), 142-143.
- Park, J., & Hay, J. W. (2003). Cost-effectiveness analysis of graftskin (ApliGraf) and becaplermin (Regranex) in diabetic neuropathic foot ulcers. *Value in Health*, 6(3), 332-332. doi:Doi 10.1016/S1098-3015(10)64180-0
- Parolini, O., Alviano, F., Bagnara, G. P., Bilic, G., Buhring, H. J., Evangelista, M., . . . Strom, S. C. (2008). Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*, 26(2), 300-311. doi:10.1634/stemcells.2007-0594
- Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N. C., Ramirez, H., Nusbaum, A. G., Sawaya, A., . . . Tomic-Canic, M. (2014). Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 3(7), 445-464. doi:10.1089/wound.2013.0473
- Petty, J. M., Lenox, C. C., Weiss, D. J., Poynter, M. E., & Suratt, B. T. (2009). Crosstalk between CXCR4/Stromal Derived Factor-1 and VLA-4/VCAM-1 Pathways Regulates Neutrophil Retention in the Bone Marrow. *Journal of Immunology*, 182(1), 604-612.
- Pham, H. T., Rosenblum, B. I., Lyons, T. E., Giurini, J. M., Chrzan, J. S., Habershaw, G. M., & Veves, A. (1999). Evaluation of GP graftskin (Apligraf (R)), a human skin equivalent, for the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes*, 48, A18-A18.
- Pierce, G. F., & Mustoe, T. A. (1995). Pharmacologic enhancement of wound healing. *Annu Rev Med*, 46, 467-481. doi:10.1146/annurev.med.46.1.467
- Pierce, G. F., Mustoe, T. A., Senior, R. M., Reed, J., Griffin, G. L., Thomason, A., & Deuel, T. F. (1988). In vivo incisional wound healing augmented by platelet-derived growth factor and recombinant c-sis gene homodimeric proteins. *J Exp Med*, 167(3), 974-987.

- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., . . . Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, *284*(5411), 143-147.
- Polonsky, K. S. (2012). The past 200 years in diabetes. *N Engl J Med*, *367*(14), 1332-1340. doi:10.1056/NEJMra1110560
- Pouwer, F., Nefs, G., & Nouwen, A. (2013). Adverse effects of depression on glycemic control and health outcomes in people with diabetes: a review. *Endocrinol Metab Clin North Am*, *42*(3), 529-544. doi:10.1016/j.ecl.2013.05.002
- Prochazka, V., Gumulec, J., Chmelova, J., Klement, P., Klement, G. L., Jonszta, T., . . . Krajca, J. (2009). Autologous bone marrow stem cell transplantation in patients with end-stage chronic critical limb ischemia and diabetic foot. *Vnitř Lek*, *55*(3), 173-178.
- Ramsey, S. D., Newton, K., Blough, D., McCulloch, D. K., Sandhu, N., Reiber, G. E., & Wagner, E. H. (1999). Incidence, outcomes, and cost of foot ulcers in patients with diabetes. *Diabetes Care*, *22*(3), 382-387.
- Rocha, V., Labopin, M., Sanz, G., Arcese, W., Schwerdtfeger, R., Bosi, A., . . . Eurocord-Netcord, R. (2004). Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med*, *351*(22), 2276-2285. doi:10.1056/NEJMoa041469
- Saad Setta, H., Elshahat, A., Elsherbiny, K., Massoud, K., & Safe, I. (2011). Platelet-rich plasma versus platelet-poor plasma in the management of chronic diabetic foot ulcers: a comparative study. *Int Wound J*, *8*(3), 307-312. doi:10.1111/j.1742-481X.2011.00797.x
- Sapunar, J. (2016). Epidemiología de la Diabetes Mellitus en Chile. *Revista Médica Clínica las Condes*, *27*(2). doi:10.1016/j.rmcl.2016.04.003
- Sasase, T., Yokoi, N., Pezzolesi, M. G., & Shinohara, M. (2015). Animal models of diabetes and metabolic disease 2014. *J Diabetes Res*, *2015*, 571809. doi:10.1155/2015/571809
- Schroeder, M., Moran, T. H., & Weller, A. (2010). Attenuation of obesity by early-life food restriction in genetically hyperphagic male OLETF rats: peripheral mechanisms. *Horm Behav*, *57*(4-5), 455-462. doi:10.1016/j.yhbeh.2010.02.002
- Shaw, T. J., & Martin, P. (2009a). Wound repair at a glance. *J Cell Sci*, *122*(Pt 18), 3209-3213. doi:10.1242/jcs.031187
- Shaw, T. J., & Martin, P. (2009b). Wound repair at a glance. *J Cell Sci*, *122*(18), 3209-3213. doi:10.1242/jcs.031187
- Shibata, T., Takeuchi, S., Yokota, S., Kakimoto, K., Yonemori, F., & Wakitani, K. (2000). Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma agonist, JTT-501, on diabetic complications in Zucker diabetic fatty rats. *Br J Pharmacol*, *130*(3), 495-504. doi:10.1038/sj.bjp.0703328
- Sindrilaru, A., Peters, T., Wieschalka, S., Baican, C., Baican, A., Peter, H., . . . Scharffetter-Kochanek, K. (2011). An unrestrained proinflammatory M1

- macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J Clin Invest*, 121(3), 985-997. doi:10.1172/JCI44490
- Singer, A. J., & Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*, 341(10), 738-746. doi:10.1056/NEJM199909023411006
- Sonnemann, K. J., & Bement, W. M. (2011). Wound Repair: Toward Understanding and Integration of Single-Cell and Multicellular Wound Responses. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol 27, 27, 237-263. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154251
- Sporn, M. B., Roberts, A. B., Wakefield, L. M., & de Crombrughe, B. (1987). Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol*, 105(3), 1039-1045.
- Stockl, K., Vanderplas, A., Tafesse, E., & Chang, E. (2004). Costs of lower-extremity ulcers among patients with diabetes. *Diabetes Care*, 27(9), 2129-2134. doi:Doi 10.2337/Diacare.27.9.2129
- Sullivan, K. A., Hayes, J. M., Wiggin, T. D., Backus, C., Su Oh, S., Lentz, S. I., . . . Feldman, E. L. (2007). Mouse models of diabetic neuropathy. *Neurobiol Dis*, 28(3), 276-285. doi:10.1016/j.nbd.2007.07.022
- Sullivan, K. A., Lentz, S. I., Roberts, J. L., Jr., & Feldman, E. L. (2008). Criteria for creating and assessing mouse models of diabetic neuropathy. *Curr Drug Targets*, 9(1), 3-13.
- Sun, B. K., Sibrashvili, Z., & Khavari, P. A. (2014). Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science*, 346(6212), 941-945. doi:10.1126/science.1253836
- Surwit, R. S., Feinglos, M. N., Rodin, J., Sutherland, A., Petro, A. E., Opara, E. C., . . . Rebuffe-Scrive, M. (1995). Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism*, 44(5), 645-651.
- Surwit, R. S., Kuhn, C. M., Cochrane, C., McCubbin, J. A., & Feinglos, M. N. (1988). Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 37(9), 1163-1167.
- Tarnuzzer, R. W., & Schultz, G. S. (1996). Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen*, 4(3), 321-325. doi:10.1046/j.1524-475X.1996.40307.x
- Tateishi-Yuyama, E., Matsubara, H., Murohara, T., Ikeda, U., Shintani, S., Masaki, H., . . . Investigators, T. S. (2002). Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 360(9331), 427-435. doi:Doi 10.1016/S0140-6736(02)09670-8
- Tchaikovski, V., Olieslagers, S., Bohmer, F. D., & Waltenberger, J. (2009). Diabetes mellitus activates signal transduction pathways resulting in vascular endothelial growth factor resistance of human monocytes. *Circulation*, 120(2), 150-159. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.817528
- Trounson, A., & DeWitt, N. D. (2016). Pluripotent stem cells progressing to the clinic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(3), 194-200. doi:10.1038/nrm.2016.10

- Tunceli, K., Bradley, C. J., Nerenz, D., Williams, L. K., Pladevall, M., & Elston Lafata, J. (2005). The impact of diabetes on employment and work productivity. *Diabetes Care*, *28*(11), 2662-2667.
- Unger, R. H., & Orci, L. (2000). Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*, *24 Suppl 4*, S28-32.
- Vairamon, S. J., Babu, M., & Viswanathan, V. (2009). Oxidative stress markers regulating the healing of foot ulcers in patients with type 2 diabetes. *Wounds*, *21*(10), 273-279.
- van Dieren, S., Beulens, J. W., van der Schouw, Y. T., Grobbee, D. E., & Neal, B. (2010). The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, *17 Suppl 1*, S3-8. doi:10.1097/01.hjr.0000368191.86614.5a
- Vieira-Potter, V. J., Karamichos, D., & Lee, D. J. (2016). Ocular Complications of Diabetes and Therapeutic Approaches. *Biomed Res Int*, *2016*, 3801570. doi:10.1155/2016/3801570
- Vileikyte, L., Leventhal, H., Gonzalez, J. S., Peyrot, M., Rubin, R. R., Ulbrecht, J. S., . . . Boulton, A. J. (2005). Diabetic peripheral neuropathy and depressive symptoms: the association revisited. *Diabetes Care*, *28*(10), 2378-2383.
- Vuorisalo, S., Venermo, M., & Lepantalo, M. (2009). Treatment of diabetic foot ulcers. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, *50*(3), 275-291.
- Wang, T. W., Wu, H. C., Wang, H. Y., Lin, F. H., & Sun, J. S. (2009). Regulation of adult human mesenchymal stem cells into osteogenic and chondrogenic lineages by different bioreactor systems. *J Biomed Mater Res A*, *88*(4), 935-946. doi:10.1002/jbm.a.31914
- Weissman, I. L., Anderson, D. J., & Gage, F. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *17*, 387-403. doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.387
- Werdin, F., Tennenhaus, M., Schaller, H. E., & Rennekampff, H. O. (2009). Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds. *Eplasty*, *9*, e19.
- Werner, S., & Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, *83*(3), 835-870. doi:10.1152/physrev.00031.2002
- Werner, S., Krieg, T., & Smola, H. (2007). Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol*, *127*(5), 998-1008. doi:10.1038/sj.jid.5700786
- Winter, G. D. (1962). Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature*, *193*, 293-294.
- Winzell, M. S., & Ahren, B. (2004). The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*, *53 Suppl 3*, S215-219.
- Witte, M. B., & Barbul, A. (1997). General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*, *77*(3), 509-528.

- Wu, Q., Chen, B., & Liang, Z. W. (2016). Mesenchymal Stem Cells as a Prospective Therapy for the Diabetic Foot. *Stem Cells Int.* doi:Artn 4612167
10.1155/2016/4612167
- Wu, Y. J., Chen, L., Scott, P. G., & Tredget, E. E. (2007). Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*, 25(10), 2648-2659. doi:10.1634/stemcells.2007-0226
- Xue, M., & Jackson, C. J. (2015). Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 4(3), 119-136. doi:10.1089/wound.2013.0485
- Yang, S. F., Xue, W. J., Duan, Y. F., Xie, L. Y., Lu, W. H., Zheng, J., & Yin, A. P. (2015). Nicotinamide Facilitates Mesenchymal Stem Cell Differentiation Into Insulin-Producing Cells and Homing to Pancreas in Diabetic Mice. *Transplant Proc*, 47(6), 2041-2049. doi:10.1016/j.transproceed.2015.05.019
- Yoshida, S., Tanaka, H., Oshima, H., Yamazaki, T., Yonetoku, Y., Ohishi, T., . . . Shibasaki, M. (2010). AS1907417, a novel GPR119 agonist, as an insulinotropic and beta-cell preservative agent for the treatment of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*, 400(4), 745-751. doi:10.1016/j.bbrc.2010.08.141
- Zhou, J. Y., Zhang, Z., & Qian, G. S. (2016). Mesenchymal stem cells to treat diabetic neuropathy: a long and strenuous way from bench to the clinic. *Cell Death Discov*, 2, 16055. doi:10.1038/cddiscovery.2016.55