



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Determinación de EGF, TGF- α y FGF en
constructos a base de amnios humano
radioesterilizado.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

VIOLETA SANTIAGO GARDUÑO



**DIRECTOR DE TESIS:
BIÓL. ANA MARÍA BRENA MOLINA
2017**

Ciudad Universitaria, CDMX.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno

Santiago
Garduño
Violeta
67 21 65 98
Universidad Nacional
Autónoma de México,
Facultad de Ciencias
Biología
308281149

2. Datos del tutor

Bióloga
Ana María
Brena
Molina

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Luis Felipe
Jiménez
García

4. Datos del sinodal 2

Dra.
María Cristina
Velasquillo
Martínez

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Roberto
Sánchez
Sánchez

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Yaaziel
Melgarejo
Ramírez

7. Datos del trabajo escrito

Determinación de EGF, TGF- α y FGF en constructos
a base de amnios humano radioesterilizado. 79 p.
2017

A los seres maravillosos que me dieron la vida, por iniciar y continuar modelando su creación. Por su esfuerzo, enseñanzas, apoyo y amor incondicional. Por demostrarlo siempre a cada minuto.

Reconocimientos

Al Instituto Nacional de Rehabilitación que facilitó el uso de sus instalaciones (Laboratorio de Biotecnología del CENIAQ y UITTCyMR de la torre de Investigación) en la parte experimental de este trabajo, mediante el proyecto CONACYT-SALUD-2013-1-201836 “Desarrollo Aplicación de un Sustituto Biológico Dermo-Epidérmico para Pacientes con Quemaduras de Tercer Grado”, avalado y financiado por CONACyT, quien me otorgó la beca con número de registro CONACYT-SALUD-13-01-201836-01-074. Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares por proporcionar los Amnios Humanos Radioesterilizados mediante el contacto de la Dra. María Esther Martínez Pardo.

A mi tutora Ana Brena por su confianza, impulso, apoyo y respaldo. A mis “senseis” cotidianos: Yaaziel Melgarejo –trabajar contigo es de lo mejor que le puede pasar a un aprendiz, gracias por todos tus comentarios y críticas–, Roberto Sánchez –eres un investigador joven crítico y admirable–, Julieta García –conversar, planificar, cambiar las cosas y mejorar siempre es reconfortante en un día malo–, Cristina Velasquillo –muchas gracias por la confianza y apoyo al ingresar a este laboratorio–. Al demás personal del INR como Karina Martínez –al fin dejaré de pedirte material–, que ayudaron, facilitaron y estimularon el trabajo de investigación en alguna de sus fases; por los conocimientos transmitidos, soportarme, hacer cada día de labor una experiencia inolvidable y darme la calidez de sentirme parte de ese gran equipo, una familia. Reitero, nunca terminaré de agradecerles toda la confianza depositada.

A mi amadísima UNAM, mi alma mater, por formar una profesionista completa; por todos los recursos que me facilitaste en mi formación. A la Facultad de Ciencias, por ser mi segundo hogar para desenvolverme y crecer, por el estilo de vida que inculcó. A mis profesores de carrera que despertaron y avivaron el interés por la ciencia, a los que más admiro: Iván Castellanos, Brian Urbano, Arturo Becerra, Salvador Arias, Guadalupe Barajas, Susana Valencia. Gracias por germinar la semilla que no tendrá límites, por la inspiración.

Agradecimientos

A mi amada familia. Mis padres Bertha Garduño y José Luis Santiago, por ser el aliento, soporte, ejemplo y la muestra de amor que todo estudiante y ser humano necesita para impulsarse y crecer; sin ellos, no habría Violeta. Gracias por esfuerzo, sacrificios y desvelos. A Estela Garduño por su motivación y cariño desde que tengo consciencia. A mi perro Bingo, mi bebé, por estar, acompañarme y hacerme sonreír en fatalidades. Porque sin estos seres extraordinarios nada de esto hubiese culminado, agradezco su incondicionalidad, afecto y sustento, no los defraudaré. Los amo.

A las amistades más sobrecogedoras de este caminar. A Ara Delhi Pérez y Yeraldine Nicolás, por seguir desde años remotos, son entrañables, mi ejemplo a seguir. A Selene Cárdenas y Dadelyn Urbina, por escuchar, reír, convivir, estar y superar tempestades...que nunca termine. A mis amistades más queridas e impactantes de la carrera: a Paola Gómez, Rosy Ríos y Nydia Rodríguez, por ser sinceras, objetivas y constantes conmigo. A Rocío Rodríguez, por las risas y el apoyo emocional, la vida que me enseñaste. A Paola Vargas, Jenifer Hernández, Charly Franco y Alexandra Gualito por las horas de reflexión y diversión. A Zhanna Orlova, por vivir, enseñar, compartir, y todo lo dado en su tiempo. Claro, también a los hermanos “Power Panditas”, por seguir conmigo desde la preparatoria, colaborando inesperadamente y sacarme sonrisas. A Guadalupe Nava, por demostrarme que aunque haya espacio y tiempo de por medio, siempre seremos las mismas infantas.

A mis compañeros de laboratorio por las horas, alegrías, angustias, tensión, desilusiones y fracasos que compartimos. Principalmente a Oswaldo González, por soportarme, apoyarme y aceptarme tal y como soy, por ser mi equipo ideal de laboratorio, animarme en mis fracasos experimentales, un amigo que siempre te retroalimentará. A Fabiola Real por las horas de trabajo y amistad. A Beatriz Cabello, Alex Barrera, Eduardo Orozco, Binisa Jiménez y Carlie Fuentes, por la travesía en el tiempo de titulación. A Karla Hernández, Mario Pérez, Dania Gámez, Nancy Ávila y Vladimir Santiago, porque aunque llegaron en la etapa final de este proyecto, me brindaron muchas alegrías y daban motivos para levantarse y querer llegar a trabajar temprano al laboratorio. Sin duda alguna, a todos los

compañeros que en algún punto interceptaron conmigo en este proyecto, porque cada uno dejó una enseñanza en mí.

A la gente que estuvo conmigo durante la realización de la tesis, tan largo proceso. A todo lo hermoso que me ha dejado el Portugués: principalmente a Rui Linhan –gran profesor– y Antonio Ortiz, que día a día escuchaban y compartíamos horas desestresantes practicando una de mis pasiones; a mis demás compañeros de clase, como Felipe Rincón y Gissella Mejía.

A mis amigos de entrenamiento: Dafne Castro, Christopher Herreramoro y demás; porque siempre hacían sacar lo mejor de mí para llegar tranquila y desestresada al laboratorio. Siempre es un placer ambicionar y llegar al límite de nuestras capacidades; que sea así hasta morir. La mejor vibra que uno puede desear.

A Rossy Bernabé y las lechuguitas, el equipo de “Mucho más que sólo lechuga”. Por el sostén, auxilio e interés en que culminara este proceso. Por las sonrisas, compatibilidades, enseñanzas, el aliento a cumplir mis objetivos, y guiarme para cumplir todo tipo de metas. Espero que la comida que degustemos día a día, tenga de base la alegría, carcajadas y momentos que compartimos.

No olvido agradecer mis colegas de la licenciatura, con quienes compartí prácticas, risas, estrés y un sin fin de emociones, que por falta de espacio no mencionaré pero, tenemos un lazo especial. Infinitas gratificaciones a todos por su afecto, consejos, esperanzas, ánimo e interés por su servidora durante este proceso.

Sin duda alguna, por economía de palabras no he podido detallar todos los nombres que hubiese querido. Sin embargo, gracias a todas la personas que estuvieron y están en mi vida, que compartieron un tiempo y espacio mínimo. Gracias, porque de alguna forma su intervención ha formado a la autora de esta obra, ha creado la inspiración de este trabajo.

Santiago G. Violeta. (2017). “Determinación de EGF, TGF- α y FGF en constructos a base de amnios humano radioesterilizado”. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Junio 2017.

Índice General

Resumen	9
Abreviaturas	10
1. Introducción.....	11
1.1. La piel y las quemaduras.	11
1.1.1. Generalidades de la piel.....	11
1.1.1.1. Queratinocitos	11
1.1.1.2. Fibroblastos	12
1.1.1.3. Interacción Queratinocitos-Fibroblastos	13
1.1.1.4. Funcionalidad del tejido	14
1.1.2. Daño en el tejido.....	14
1.1.2.1. Las quemaduras.....	14
1.2. Reparación del tejido dañado	16
1.2.1. Cierre de la herida.	16
1.2.2. Factores que participan en el cierre de la herida	19
1.3. Sustitutos biológicos.....	23
1.3.1. Diversidad de Sustitutos Biológicos de piel.....	24
1.4. Amnios humano.....	27
1.4.1. Ubicación y características del amnios humano.....	27
1.4.1.1. Composición bioquímica	28
1.4.2. Amnios Humano Radioesterilizado (RHA).....	33
1.4.2.1. RHA como cobertura biológica	34
Antecedentes.....	35
Sustitutos biológicos dermo-epidérmicos compuestos	35
Amnios humano como cobertura temporal en quemaduras	36
Amnios humano en sustitutos biológicos.....	37
Interacción celular con la matriz extracelular	38
Lamininas y colágenas como componentes de la ECM y el amnios fresco.....	38
EGF, FGF y TGF como factores promotores de migración.....	39

Caracterización y uso de RHA	40
Justificación.	41
2. Objetivos e hipótesis.....	41
2.1. Hipótesis	41
2.2. Objetivo general	42
2.2.1. Objetivos particulares	42
3. Metodología	42
3.1. Procesamiento de la biopsia.	42
3.1.1. Aislamiento de queratinocitos	43
3.1.2. Aislamiento de fibroblastos	44
3.1.3. Conteo celular.....	45
3.2. Cultivo celular.	46
3.2.1. Cultivo <i>in vitro</i> de queratinocitos	46
3.2.2. Cultivo <i>in vitro</i> de fibroblastos.....	46
3.2.3. Pase celular de fibroblastos	46
3.2.4. Siembra y cultivo en RHA (constructos).....	47
3.2.5. Montaje del sustituto biológico dermo-epidérmico (B-DSS).....	47
3.3. Viabilidad celular en constructos.	48
3.3.1. Kit LIVE/DEAD® Cell Viability Assays de Life Technologies.	48
3.4. Determinación de factores de migración por ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).	48
3.4.1. Diseño experimental para la colecta de sobrenadantes	48
3.4.2. Estandarización del método de ELISA.....	50
3.4.2.1. Análisis de datos.....	51
3.5. Estandarización de la técnica de Western Blot para caracterización de amnios. .	52
3.5.1. Procuración de la muestra y procesamiento	52
3.5.1.1. Amnios humano (HAM)	52
3.5.1.2. Amnios humano radioesterilizado.....	53
3.5.2. Solubilización de la muestra, lisis del tejido	53
3.5.3. SDS-PAGE	53
3.5.4. Inmunoblotting	54
3.5.4.1. Bloqueo e incubación de anticuerpos.....	54
3.5.4.2. Inmunorreactividad	54

4. Resultados	55
4.1. Aislamiento y cultivo celular de queratinocitos y fibroblastos humanos.....	55
4.2. Constructos a base de RHA	56
4.3. Elaboración del prototipo de sustituto biológico dermo-epidérmico a base de constructos de RHA.	58
4.4. Determinación de EGF, TGF- α y FGF por ELISA.	59
4.5. Caracterización de proteínas en RHA.	63
5. Discusión y conclusiones	66
5.1. Discusión.	66
5.1. Conclusiones.....	69
Perspectivas a futuro.	70
Referencias bibliográficas.....	71

Resumen

El amnios humano radioesterilizado (RHA) es una alternativa para el tratamiento de quemaduras. Esta membrana es utilizada como cobertura biológica transitoria, facilitando la epitelización en quemaduras de espesor parcial. Dada la necesidad de innovar en apósitos biológicos de piel así como las ventajas de usar RHA, se elaboró un sustituto biológico dermo epidérmico (B-DSS) compuesto, a base de dos constructos viables de RHA: uno con queratinocitos y otro con fibroblastos. Se tuvo como objetivo principal determinar la secreción de factores de crecimiento (EGF, TGF- α y FGF) que favorecen el cierre de la herida; además de la caracterización de la matriz (RHA). Como resultados, se obtuvieron cultivos *in vitro*, constructos viables y un prototipo de sustituto biológico de piel; de los cuales mediante la estandarización de la técnica de ELISA, se analizaron las concentraciones de los factores de interés, resultando de manera preliminar FGF con la concentración más alta. Por otro lado, la caracterización de RHA mediante la estandarización de la técnica de western blot muestra la tendencia en la que el amnios, al ser irradiado con cobalto 60 a 25

kGy, carece de proteínas de lámina basal (como laminina 1, laminina 5 y colágena 4) que favorecen la adhesión celular. La composición de la matriz está relacionada con la adhesión celular y liberación de factores en el sistema. El prototipo de sustituto biológico elaborado, al corroborar lo anterior, podría tener una aplicación clínica exitosa.

Palabras clave: *Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Factor de Crecimiento Transformante Alfa (TGF- α), Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF), Amnios Humano Radioesterilizado (RHA).*

Abreviaturas

EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
TGF- α	Factor de Crecimiento Transformante Alfa
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
ELISA	Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas.
WB	Western Blot
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
RHA	Amnios Humano Radioesterilizado (<i>Radiosterilized Human Amnion</i>)
HAM	Amnios Humano (<i>Human amniotic membrane</i>)
B-DSS	Sustituto Biológico Dermo Epidérmico (<i>Biologic-dermoepidermal skin substitute</i>)
DMEM-F12	Dubelco's Modified Eagle Medium
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HKGS	Suplemento de Crecimiento para Queratinocitos Humanos
PBS	Phosphate Buffered Saline
FBS	Fetal Bovine Serum
ECM	Matriz Extracelular
INR	Instituto Nacional de Rehabilitación
CENIAQ	Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados
INP	Instituto Nacional de Pediatría
ININ	Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión (<i>Transmission electron microscopy</i>)
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido (<i>Scanning electron microscopy</i>)

1. Introducción

1.1. La piel y las quemaduras.

1.1.1. Generalidades de la piel

La piel es el mayor órgano del cuerpo. Está compuesta por tres capas:

- Epidermis. Los queratinocitos son su componente celular más abundante, encontrándose en un constante proceso de regeneración (1). Esta capa también contiene otros tipos celulares en menor proporción como melanocitos (causantes del pigmento), células de Langerhans (colaboradoras en el sistema inmune) y células de Merkel (responsables de la mecanorrecepción) (2).
- Dermis. Siendo el fibroblasto su principal componente celular, esta capa se encuentra dividida en dos estratos, clasificados por la disposición de las fibras de colágena: el superficial papilar (fina) y el profundo reticular (gruesa) (1); dichos yacimientos celulares están atravesados por un compleja red vascular y nerviosa. La matriz extracelular (ECM, *por sus siglas en inglés*) dérmica se compone principalmente de colágena, elastina y fibras reticulares (2).
- Hipodermis. Se encuentra bajo las dos capas principales, mencionadas anteriormente. Está compuesta principalmente de tejido conjuntivo suelto y grasa. Los adipocitos son su principal tipo celular (2).

1.1.1.1. Queratinocitos

Componentes mayoritarios de la epidermis, distinguida por ser estratificada y queratinizada. Están organizados en cuatro capas (basal, espinosa, granulosa y estrato córneo), denominadas según su posición o alguna propiedad estructural de sus células. Los queratinocitos se diferencian progresivamente a partir de las células basales proliferativas

adheridas a la membrana basal epidérmica, hasta las células terminalmente diferenciadas del estrato córneo queratinizado (3). Los queratinocitos sin alguna alteración en su estructura, son el indicador de una piel no lesionada, lo que los hace muy importantes en el desarrollo de sustitutos de la piel. Además, se destacan por su capacidad de renovarse y proliferar, así como mantener su capacidad para reconstruir la epidermis después de la expansión a largo plazo (2).

De morfología circular, los queratinocitos experimentan una transformación morfológica que pone de manifiesto su queratinización. Esa transformación progresa desde la profundidad hasta la superficie, siendo la capa más profunda el estrato germinal (garantizando la renovación celular), continuando con el estrato espinoso, granuloso y el córneo. Estos últimos estratos tienen modificaciones celulares progresivas que dan paso a la queratinización completa: descamación y pérdida del núcleo celular (4). Cuando las células de la capa basal entran en la capa espinosa, dejan de expresar las citoqueratinas 5 y 14 (CK5 y CK14) para expresar las citoqueratinas CK1 y CK10 (5).

1.1.1.2. Fibroblastos

El principal componente celular de la dermis son los fibroblastos, que en respuesta a una lesión, migran y proliferan para proporcionar una secreción constante en la matriz de colágena, proteoglicano, y otras moléculas estructurales (2). También organizan y remodelan activamente la ECM a través de la producción de proteasas, además de comunicarse de forma paracrina y autocrina (6).

Los fibroblastos son los principales constituyentes celulares de los tejidos conectivos, por lo que aparecen en prácticamente todos los tejidos y órganos del cuerpo, adhiriéndose fácilmente a matrices. Se definen a menudo morfológicamente alargados, sin embargo

pueden exhibir una variedad de formas y tamaños *in vitro*; de hecho, se han utilizado variaciones morfológicas para la selección de subpoblaciones. Algunas poblaciones celulares relacionadas con los fibroblastos son los miofibroblastos, fibroblastos diferenciados asociados con folículos pilosos y células estromales tumorales (población especializada de fibroblastos del tejido conjuntivo que se activan y diferencian a través del contacto con células tumorales)(6).

1.1.1.3. Interacción Queratinocitos-Fibroblastos

Existe una señalización paracrina doble donde los queratinocitos promueven la secreción de factores de crecimiento en los fibroblastos, que por sí mismos estimulan la proliferación de queratinocitos. En esta interacción, los queratinocitos (mediante IL-1 β) estimulan a los fibroblastos a sintetizar factores de crecimiento y citocinas, tales como el factor de crecimiento de fibroblastos 7 (KGF/FGF7), interleucina 6 (IL-6) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); lo que a su vez estimula la proliferación de queratinocitos. Mediante la síntesis de esos factores (KGF/FGF7, GM-CSF, pleiotropina y expresión del factor 1) se regula la proliferación y diferenciación de queratinocitos en cocultivos de queratinocitos y fibroblastos. Los fibroblastos pueden adquirir un fenotipo de miofibroblastos bajo el control de queratinocitos; esto, depende de un equilibrio entre un ambiente proinflamatorio y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). Aparte de esa regulación paracrina de factores de crecimiento, la formación de una nueva zona de membrana basal es otro ejemplo en el que la interacción entre queratinocitos y fibroblastos está implicada de forma trascendental: los fibroblastos facilitan el cierre de la herida, pero afectan la deposición de diversos componentes de la membrana basal. Como consecuencia

de ello, los componentes de la membrana basal y una nueva organización de la misma, pueden influir en el fenotipo y migración del queratinocito (7,8).

1.1.1.4. Funcionalidad del tejido

La piel protege al cuerpo contra la intrusión de agentes biológicos, químicos y físicos, además de controlar la pérdida de agua, como barrera biológica (9). Entre muchas de sus funciones, la piel es principalmente responsable de mantener una barrera estructural y fisiológica entre el interior y exterior del organismo. Por ello, la piel se lesiona con mayor frecuencia que otro tejido, siendo sus daños desde pérdidas parciales hasta totales: algunos autorreparables y otros con necesidad de injertos. Todos, con cicatrices permanentes (10,11).

1.1.2. Daño en el tejido

La piel puede sufrir trastornos y alteraciones causadas por diversos factores: desde daños congénitos o traumatismos. Algunos de esos daños son los causados por alteraciones fisiológicas, radiaciones o distintos agentes externos, encontrándose las quemaduras entre las lesiones térmicas más frecuentes.

1.1.2.1. Las quemaduras

Una quemadura, es una lesión producida en los tejidos vivos por agentes físicos, químicos y eventualmente biológicos (1), los cuales provocan alteraciones que varían de forma local: zonas de hiperemia, estasis, necroptosis (necrosis, apoptosis, autofagia asociada con muerte celular), así como una respuesta inflamatoria sistémica que busca detener y reparar dicho daño (12). Según su profundidad, las quemaduras se pueden clasificar en: primer grado, segundo grado y tercer grado; denominándose también: epidérmicas, dérmicas (superficial o

profunda) y de espesor total, dependiendo el estrato afectado. En las últimas dos clasificaciones, se ve comprometida la regeneración de este órgano (1,13).

En una quemadura, el calor transferido al tejido produce desnaturalización de las proteínas y pérdida de la integridad de la membrana plasmática, a nivel celular. La temperatura y la duración de exposición al calor, tienen un efecto en conjunto. Tras una quemadura, la necrosis se produce en el centro de la lesión y pierde severidad conforme se aleja. En el sitio de la lesión se pueden distinguir tres áreas:

1. *Área central de coagulación.* Donde no hay células viables.
2. *Área de estasis* o zonas de riesgo. Caracterizada por una mezcla de células viables y no viables, alteraciones en la microcirculación con fenómenos de agregación plaquetaria, depósitos de fibrina, microtrombos, etc.) que pueden llevar a la isquemia.
3. *Área de hiperemia.* Donde hay células viables, daño celular mínimo y fenómenos de vasodilatación debidos a la acción de los mediadores locales de la inflamación) (1).

1.1.2.1.1. Prevalencia de las quemaduras

Las quemaduras son un importante problema de salud pública del cual se puede derivar severa discapacidad física, psicológica, social y laboral. Este fenómeno tiene un alto índice de mortalidad y graves secuelas, derivadas de la cicatrización que produce desfiguramiento facial y corporal, con contracturas y deformidades de las extremidades. Lo anterior ocasiona al individuo afectado una limitación funcional con grave repercusión psicológica, social y económica, ya que los gastos tanto de atención y como de rehabilitación son demasiado elevados (14). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), casi 265,000 muertes ocurren cada año debido a las quemaduras con fuego, y más de la mitad de estas

quemaduras se producen en países de ingresos bajos y medianos. Las lesiones de quemaduras graves son una fuente importante de morbilidad (15).

En México, cada año se reportan alrededor de 130 mil accidentes por quemadura, 13 mil egresos hospitalarios y una tasa de mortalidad de 23.4%. De acuerdo con el INEGI, en el 2011, el 5.7% de la población en general en algún momento de su vida, había sufrido una quemadura que ameritó atención médica (14). Mientras que Moctezuma en el 2015, describe la epidemiología al citar que durante el año 2013 hubo 126,786 nuevos casos por quemadura, mientras que de enero a junio de 2014 hubo 65,182 casos (16).

1.2. Reparación del tejido dañado

Al existir un daño en el tejido, la reparación de la herida de forma natural abarca diferentes procesos.

1.2.1. Cierre de la herida.

Se caracteriza por una secuencia ordenada de eventos, que pueden clasificarse ampliamente en fases distintas. Estas fases se desarrollan de manera sistemática con un alto grado de integración, organización y control, con eventos como la inflamación, migración y mitosis celular, neovascularización y regeneración de la matriz extracelular. Sin embargo, las diversas etapas: inflamación, formación del tejido y remodelación del tejido, no están delimitadas, pero se superponen considerablemente, y los factores que afectan a una fase tienen un efecto estimulador o inhibitorio sobre el proceso global (9).

Después de una lesión en la piel, las células epiteliales al margen de la herida comienzan a proliferar por influencia de factores de crecimiento generados por queratinocitos,

fibroblastos y macrófagos, principalmente. A partir de ahí, como describen Seifert y Maden (Figura 1) (17), se inicia un proceso complejo en el que se distinguen las siguientes etapas:

- A. Hemostasis e inflamación [0-48 h después de la lesión]. Inmediatamente después del daño del vaso sanguíneo que implica una herida, se forma un tapón plaquetario o trombo, formado por fibrina. Ésta contiene bacterias, plaquetas degranuladas, células inflamatorias y muchos factores de crecimiento. La acumulación de fibrina produce un coágulo de fibrina que actuará como matriz provisional para el reclutamiento de células inflamatorias, proporcionando un sustrato para la migración epitelial, proliferación de fibroblastos, miofibroblastos y células endoteliales. Así, los leucocitos inflamatorios, neutrófilos (centinelas inflamatorias tempranas que destruyen las bacterias por fagocitosis) y monocitos (que se convierten en macrófagos), migran y entran en el sitio de la herida. La acumulación de monocitos es estimulada por muchos quimioatrayentes (incluyendo fragmentos de colágeno, elastina, fibronectina, trombina y varios factores de crecimiento). Al madurar, los macrófagos liberan potentes enzimas que degradan la ECM (como la colagenasa y otras proteasas) que ayudan a facilitar su movimiento a lo largo del coágulo de fibrina y la matriz provisional. Algunos de los factores de crecimiento involucrados en este proceso, son necesarios para la formación de nuevos tejidos y la reparación, y por lo tanto, este período marca la transición de la inflamación a la formación de nuevos tejidos.
- B. Reepitelización [2-6 días después de la lesión], y nueva formación de tejido [2-21 días después de la lesión]. Se forma una costra (escara) en la superficie bajo la cual los queratinocitos basales de los márgenes de la herida emigran para reepitelizar la

herida. Aquí, las células epiteliales en el borde de la herida comienzan a proliferar bajo la influencia de factores de crecimiento generados localmente, incluyendo EGF, TGF- α y FGFs (generados por queratinocitos, macrófagos y fibroblastos dérmicos); y sintetizan una nueva membrana basal desde el borde de la herida hacia el interior. Las células epidérmicas renuevan su unión a la nueva membrana basal vía hemidesmosomas. Al formarse tejido nuevo (de granulación) en el lecho de la herida, que consiste en capilares, macrófagos, fibroblastos y tejido conectivo, los nuevos vasos sanguíneos se infiltran en él.

C. Remodelación del tejido [hasta 1 año]. Una región de colágena desorganizada, en su mayoría colágena tipo I, es establecida por fibroblastos. Esta red densa de colágena formará la cicatriz. La arquitectura original de la piel es completamente reemplazada por la cicatriz; no hay pelos, glándulas sudoríparas o glándulas sebáceas presentes en la región reparada.

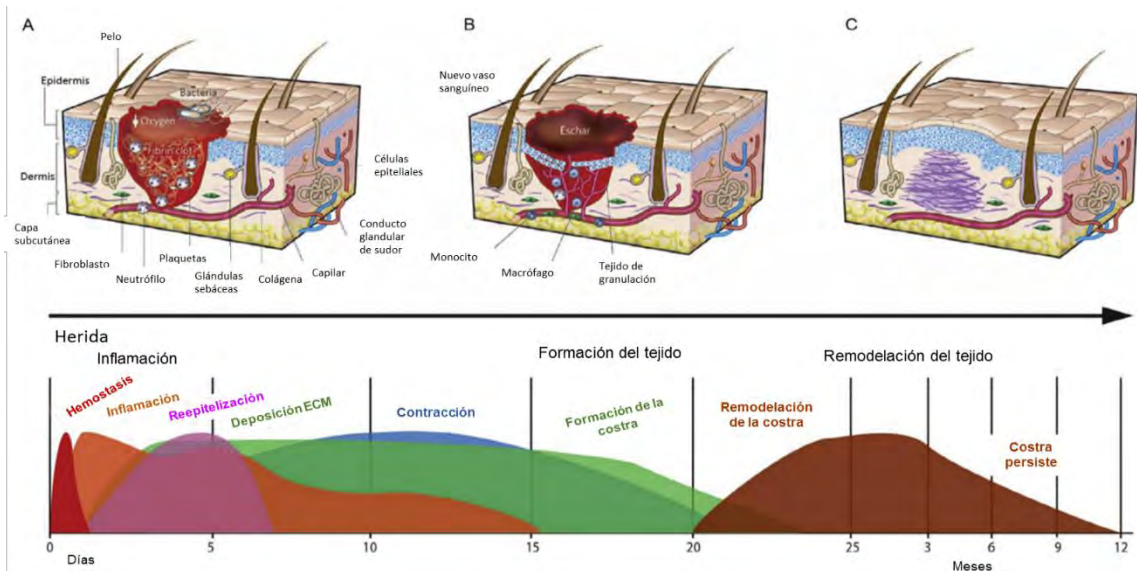


Figura 1 | Proceso del cierre de la herida. Cierre de la herida en piel de mamíferos. (A) Inflamación del tejido, (B) Reepitelización y (C) Remodelación del tejido. Se exhibe un solapamiento de las etapas. Modificada de Seifert y Maden, 2014.

1.2.2. Factores que participan en el cierre de la herida

En el cierre de la herida hay una gran variedad de interacciones entre células, proteínas fibrosas, proteínas endógenas, quimioatrayentes, proteinasas, factores angiogénicos y factores de crecimiento, secretados de forma local y mediante mecanismos autócrinos y parácrinos. (9,18,19). Algunos de esos factores importantes son EGF, TGF- α (19) y FGF (18,20). Dichos factores, a diferencia de PDGF, WAF y TGF- β (por mencionar algunos), son secretados principalmente por los dos tipos celulares de la piel (queratinocitos y fibroblastos), participando en su relación paracrina y conllevando a un cierre de la herida sin modificar el fenotipo celular.

La regulación de los distintos factores secretados es distinta en tiempo, forma e individuo. Por ejemplo, en el caso de reparaciones de heridas fetales, se exhibe una ausencia de cicatrices y fibrosis; este proceso regenerativo se caracteriza por una inflamación mínima y restauración de la deposición normal de colágena y de los anexos cutáneos (2,21), donde la secreción del factor de crecimiento en la reparación de piel fetal es diferente al del adulto, caracterizándose por niveles mayores de secreción del factor de crecimiento transformante (TGF- β 3) y niveles más bajos del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TGF- β 1, y TGF- β 2 (2,22).

Imae (9), refiere en su trabajo, el siguiente orden de participación de factores de crecimiento en el proceso de reparación de la herida (Figura 2):

1. *Inflamación, migración y mitosis celular.* Distintos factores de crecimiento implicados en el proceso inflamatorio son secretados durante las primeras fases en la reparación de heridas, incluyendo **PDGF** (factor de crecimiento derivado de plaquetas), **EGF** (factor de crecimiento epidérmico), **TGF- β** (factor de crecimiento

transformante β), **HBEGF** (factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina) y **IGF-1** (factor de crecimiento insulínico), que estimulan la migración ordenada de células (neutrófilos, luego macrófagos y después fibroblastos) en el sitio de la herida. También se estimula la proliferación de fibroblastos, miofibroblastos y células endoteliales mediante la secreción de **TGF- α** (factor de crecimiento transformante α), **FGF** (factor de crecimiento de fibroblastos), IGF-1, PDGF y TGF- β 1 (23).

2. *Neovascularización.* Por otra parte, se cree que la secreción de factores de crecimiento quimiotácticos y proteasas degradativas, por células inflamatorias agudas, también contribuye a la iniciación de la migración de células endoteliales. Por ello, los factores de crecimiento juegan un papel importante en la regulación del proceso general de angiogénesis; principalmente **bFGF** (factor de crecimiento fibroblástico básico), **TNF- β** (factor de necrosis tumoral β), **EGF** y **WAF** (factor de angiogénesis en la herida). El TGF- β puede actuar de forma indirecta estimulando la migración de los macrófagos, que a su vez liberan factores angiogénicos. Durante la transición de la inflamación a la proliferación en el proceso de cierre de la herida, el número de células inflamatorias disminuye, mientras que la población de fibroblastos dentro del sitio de la herida aumenta. TGF- α (al igual que TGF- β) tiene un papel importante en la proliferación fibroblástica, además favorece la proliferación epitelial, mientras que TGF- β promueve la quimiotaxis y angiogénesis. TGF- α es secretado por plaquetas, neutrófilos, linfocitos, macrófagos, queratinocitos y células epiteliales del folículo piloso (18,20); mientras que TGF- β es secretado por queratinocitos, plaquetas y macrófagos reparadores (24). Quimioatrayentes específicos además de TGF- β y PDGF principalmente, también estimulan la afluencia de macrófagos.

3. *Regeneración de ECM.* El proceso de migración y proliferación de fibroblastos está regulado por un complejo equilibrio de factores estimuladores e inhibidores del crecimiento. En esta etapa, los fibroblastos continúan estimulando la expresión de PDGF, TGF- β y otros factores de crecimiento, regulando así la regeneración de la matriz extracelular mediante la síntesis y deposición de sus componentes, incluyendo fibronectina, laminina, glicosaminoglicanos (GAGs) y colágena.
4. *Epitelización.* Implica la migración, proliferación y diferenciación de queratinocitos presentes en la epidermis. Aquí, las células epiteliales en el margen de la herida comienzan a proliferar bajo la influencia de factores de crecimiento generados localmente, incluyendo EGF, TGF- α y FGF que son originados de queratinocitos, macrófagos y fibroblastos dérmicos (25). EGF y TGF- β aumentan la tasa de epitelización; **KGF** (factor de crecimiento de queratinocitos), también denominado **FGF-7** (factor de crecimiento de fibroblastos-7), es secretado por macrófagos y estimula la proliferación de queratinocitos; y bFGF y PDGF también estimulan la formación de un nuevo tejido conectivo, aumentando directamente la epitelización. Existen estudios que sugieren que TGF- α , ligando de la familia de receptores EGF, es dispensable para la cicatrización de heridas; un análisis más detallado reveló un papel notorio de este factor en la fase temprana de la reepitelización. La falta de TGF- α se puede compensar si la cicatrización se acompaña de la formación de tejido de granulación en modelos de heridas de espesor total en cabeza, a diferencia de las de grosor parcial en oído, en ratones (20,26).
5. *Remodelación.* Los principales factores de crecimiento reguladores en esta etapa son TGF- β , PDGF y FGF, que son liberados durante la lesión y reparación de tejidos. Al proliferar los queratinocitos desde los bordes hacia el centro, son estimulados por

factores de crecimiento liberados por las propias células epiteliales del borde de la herida, como TGF- α (20). Algunas otras moléculas como IL-1 (interleucina-1), TNF- β e interferón- γ , son también importantes para la reparación de heridas, ya que pueden modular la función de los fibroblastos y la deposición de la matriz. Asimismo, la degradación de colágena está también regulada por factores de crecimiento. El PDGF, IL-1 y EGF estimulan la síntesis de procologenasa por fibroblastos cutáneos, mientras que TGF- β inhibe la producción de procologenasa, aumentando así la deposición de colágena. Durante la fase de maduración, se produce la rotación de colágena y la diferenciación de queratinocitos, para que eventualmente la cicatriz se remodele a una línea plana y delgada en la superficie de la piel. Existen receptores TGF- α /EGF expresados por muchos tipos de células incluyendo queratinocitos de piel, fibroblastos y células endoteliales vasculares, acelerándose la reparación de la herida

(19).

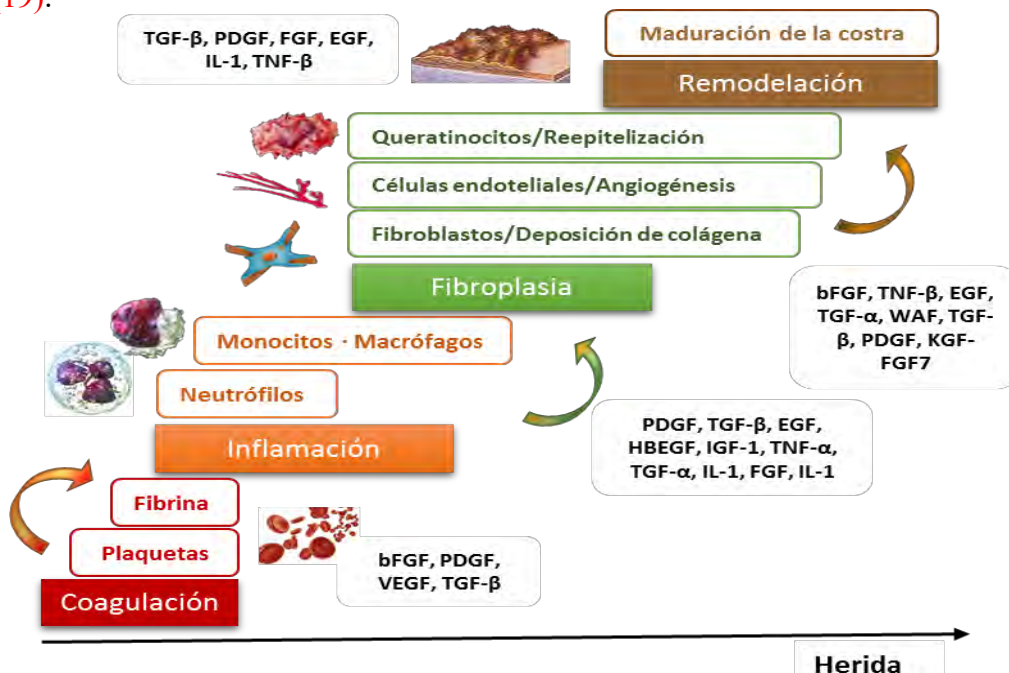


Figura 2 | Factores que participan en el cierre de la herida. Se exhiben los principales procesos de la reparación de la herida: coagulación, inflamación, fibroplasia y remodelación; junto con sus principales participantes (células, proteínas y factores de crecimiento). PDGF, TGF- α , TGF- β , EGF y FGF tienen un papel primordial en dicho evento. Basada en Imae, 2014.

En ocasiones al ser una herida amplia y profunda, la sanación de la herida puede demorar y no ser óptima. Por lo que si se toma en cuenta que la herida sana desde el interior hacia el exterior, el uso de un apósito biológico sobre la herida, como alternativa, ayudará a una reparación rápida y eficiente del daño.

En las quemaduras de gran extensión se requiere una barrera de protección para prevenir las infecciones y desecaciones. Esto, ha llevado a la evolución de diferentes apósitos naturales y sintéticos así como de sustitutos de piel que restauren las funciones de la barrera epidérmica y se integren para realizar el proceso de curación de la herida (27).

1.3. Sustitutos biológicos.

La restauración de la anatomía de la piel mediante el implemento de un apósito, en la sanación de la herida, va más allá de la rehabilitación de la arquitectura estructural y su fisiología, puesto que se necesita restaurar con cualidades mecánicas cercanas a las nativas, y la ausencia de toxicidad del huésped o rechazo inmune (28), Por ello, se necesita considerar el genotipo de las células de la piel trasplantadas, la biocompatibilidad de los materiales utilizados, su complejidad de fabricación y problemas de almacenamiento (29).

En bioingeniería, cuando se elaboran sustitutos de la piel, las matrices deben tratar de imitar la ECM incorporando factores de crecimiento apropiados, enzimas, agentes farmacológicos y otros péptidos de señalización. Estas matrices pueden ser naturales (por ejemplo, colágeno, hidroxiapatita, alginato, polipéptidos, glucosaminoglicanos, hialuronano, fibronectina) o sintéticas (por ejemplo, cloruro de polivinilo, polilactida), difiriendo de sus propiedades. Por ello, debido al implemento de distintos materiales, como materiales poliméricos biodegradables, surgió la necesidad de una nueva generación de materiales que

implican el uso de la nanotecnología, y en consecuencia, una gran diversidad de sustitutos biológicos de piel (2).

El desarrollo de equivalentes biológicos de la epidermis y dermis corresponde a uno de los objetivos clínicos prioritarios de la ingeniería de tejidos, la cual busca el desarrollo de métodos de reparación de órganos y tejidos o su reemplazo *in vitro* (30). Tres elementos diferentes interactúan en la ingeniería de tejidos: las células en cuestión, las matrices o andamios como materiales de soporte y los diferentes factores de crecimiento que rigen el desarrollo del tejido. Se puede recurrir a una manipulación *in vitro* de células, matrices o su combinación (constructos compuestos a base de un andamio y el tipo celular), en la producción de sustitutos cutáneos (2).

Existen diversas técnicas para el reemplazo *in vitro* de la piel. Entre ellas, se encuentra el aislamiento de queratinocitos (células epidérmicas) y los fibroblastos (células dérmicas) del propio paciente (autólogo) o de donadores (heterólogo), así como su expansión mediante técnicas de cultivo específicas, pasando por la construcción de una matriz o soporte dérmico para el cultivo final de las células en cuestión (31).

1.3.1. Diversidad de Sustitutos Biológicos de piel

En la actualidad se busca eficiencia en forma y función a largo plazo, en el tratamiento de heridas causadas por quemaduras, a fin de una mejora en la calidad de vida de la curación. Esto demanda el implemento de distintos sustitutos de piel en el manejo de lesiones por quemaduras agudas, así como reconstrucciones posteriores a las mismas (32).

Estructura anatómica	Duración del cubrimiento	Tipo de biomaterial	Composición del sustituto
Epidérmicos	Permanente	Biológico: autólogo	Celular
Dérmicos	Semipermanente	Alogénico, xenogénico	Acelular
Dermoepidérmicos	Temporal	Sintético: biodegradable, no biodegradable	

Tabla 1 | Clasificación de los sustitutos de piel. Concentraciones de las variables experimentales. Tomada de Gómez *et. al.*, 2012 (115) .

Los sustitutos de piel se pueden dividir en dos clases principales: biológicos y sintéticos, de acuerdo al tipo de material (Tabla1). Los sustitutos biológicos conservan mejor la matriz extracelular (casi intacta), permitiendo la construcción de dermis nueva más natural y fomentando la re-epitelización debido a la presencia de la membrana basal; en tanto que los sustitutos sintéticos se elaboran por demanda y pueden ser diseñados para propósitos específicos, por ello que se demuestran algunas ventajas al aumentar el control sobre la composición del andamio (32). Los sustitutos de piel también se pueden clasificar en: (I) de cobertura temporal o permanente, (II) epidérmicos, dérmicos y compuestos. Actualmente, no existe un sustituto ideal en el mercado, puesto que son muchas las variables a considerar, y cada uno tiene sus ventajas y desventajas (Tabla 2). El objetivo final es lograr una cicatrización eficaz de la herida mediante un sustituto de piel permanente, o en su defecto, una cobertura temporal; en este caso, el amnios humano ha demostrado ser una cobertura temporal de calidad, de fuente inagotable y fácil obtención, que favorece el cierre de la herida.

Tipo de sustituto de piel	Modo de acción sugerido	Ejemplos (nombres comerciales)	Clasificación	Composición	Ventajas	Desventajas
Epidérmicos, alogénicos	Los queratinocitos injertados del donante de piel estimulan los factores de crecimiento y promueven la sanación de la herida	CelaDerm®	E T b	Láminas de queratinocitos de prepucio	Fácilmente disponible, no necesita biopsia	Cobertura superficial y temporal, con mal resultado estético
Epidérmicos, autólogos	Los queratinocitos cultivados de la propia piel del paciente, son trasplantados sobre el lecho de la herida multiplicándose y reepitelizando	EpiCel® Laserskin®	E P b E P bs	Queratinocitos cultivados en una gasa de petrolato Queratinocitos cultivados en una matriz de éster de ácido hialurónico	Tasa alta de toma de injerto, poco o ningún rechazo, cobertura amplia y permanente	Cobertura poco natural y estética, frágil, implica mucho tiempo y un alto costo de producción
Dérmicos, xenogénicos	La matriz proporciona un soporte estructural para el crecimiento de nuevos tejidos y vasculatura. Las proteínas promueven la cicatrización de la herida	Biobrane® Integra® OASIS® Permacol®	C P bs C P bs D T b D T b	Colágena porcina en una malla de silicona/nylon Colágena de tendón de bovino y condroitina de tiburón en membrana de silicona Colágeno intestinal porcino y matriz extracelular Dermis porcina	Disponibilidad inmediata, formación mínima de exudado, menos dolor de herida	Posible alergia bovina, puede necesitar múltiples aplicaciones, mayores tasas de infección
Dérmicos, alogénicos	Actúa como andamio para el crecimiento celular y vascular en el lecho de la herida, y permite la regeneración de tejidos secundarios. Las proteínas de la matriz extracelular estimulan el cierre de la herida	AlloDerm® TransCyte® Dermagraft® FlexHD®	D P b D T bs D P b D P b	Dermis humana descellularizada de cadáver Fibroblastos neonatales crecidos en malla de nylon Fibroblastos neonatales crecidos en una malla de poligalactina bioabsorbible Dermis humana de cadáver	Inmunológicamente inerte, inmediatamente disponible, fácil de remover, poco dolor	Riesgo de transmisión de patógenos humanos, con necesidad de múltiples aplicaciones
Compuesto	La combinación de elementos bovinos y humanos proporciona una arquitectura casi normal de la piel y mejora la cicatrización de la herida	Apligraf® GammaGraft® OrCel®	C P bs C T b C P b	Colágena bovina, queratinocitos y fibroblastos humanos alogénicos Aloinjerto de piel humana Fibroblastos y queratinocitos humanos alogénicos en matriz de colágena bovina	Prontamente disponible, resultados cosméticos favorables	Riesgo de rechazo, bajo riesgo de infección

b = biológico; bs = biosintético; C = compuesto; D = dermis; E = epidermis; P = permanente; T = temporal.

Tabla 2 | Categorías de sustitutos de piel. Ejemplos seleccionados de productos comercialmente disponibles y sus características. Principales sustitutos de la piel disponibles en el mercado mundial y su clasificación por ubicación, tiempo de permanencia y criterios de origen. Elaborada de Anish, 2015 & Ferreira *et. al.*, 2011 (116,117) .

1.4. Amnios humano.

1.4.1. Ubicación y características del amnios humano

Todos los vertebrados tienen tejidos extraembrionarios conocidos como membranas placentarias. Especialmente en humanos, su origen junto con su complejidad estructural y funcional, recientemente han recibido una atención considerable debido al interés en la composición de sus diversos componentes y propiedades de las células troncales de sus células epiteliales y estromales (33). Una de ellas es la membrana amniótica (mejor conocida como amnios), la cual es la membrana placentaria más interna que se encuentra contigua al líquido amniótico (34). El amnios, replegado, está fusionado al corion liso (formando el saco amniótico) y cubre la superficie fetal de la placenta. Desde la superficie placentaria, el amnios se continúa recubriendo la superficie del cordón umbilical. Al separarse el amnios del corion, el primero es translúcido con un brillo azulado y el segundo es relativamente más opaco (33,35,36). Es una membrana resistente, firme y flexible (34),

El amnios tiene características que lo hacen único para aplicaciones clínicas, entre estas características se encuentran:

- Efectos anti-inflamatorios gracias a la producción de factores anti-inflamatorios, como el ácido hialurónico (HA) (37).
- Supresión de las citocinas proinflamatorias como interleucina IL-1 α (1 alfa) y IL-1 β (1 beta) (38,39).
- Producción de inhibidores de metaloproteinasas (MMP's) (38,40).
- Propiedades anti-bacterianas porque expresan moléculas antimicrobianas naturales tales como β -defensinas (41).

- Baja antigenicidad y no inmunogénica, debido a que las células epiteliales amnióticas no expresan en sus superficies antígenos de leucocitos humanos A, B, C, y antígenos DR, o microglobulina $\beta 2$ (42).
- Proporciona una matriz extracelular (ECM) para la migración celular y la proliferación (43).
- Promueve la curación y mejora en el proceso de cicatrización de herida, permitiendo la infiltración de leucocitos polimorfonucleares e inhibiendo la actividad proteolítica (40).
- Actividad anti-cicatrizante y anti-adhesiva, reduciendo la actividad de las proteasas a través de la secreción de inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP's) (40) y, regulando negativamente el Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), responsable de la activación de fibroblastos y prevenir la adhesión, reduciendo el riesgo de fibrosis en la reparación de la herida (44,45).
- Es una barrera biológica natural (46-48).

1.4.1.1. Composición bioquímica

El amnios es una membrana avascular, delgada de 35-60 μm de grosor (33), que se encuentra formada por cinco capas:

1. Epitelio. La capa más interna, se encuentra en contacto con el líquido amniótico, está compuesto de células cúbicas no ciliadas, derivadas del ectodermo embrionario.
2. Lámina basal. Sobre ella descansa el epitelio, está compuesta de colágena tipo III, IV, V, laminina y fibronectina.
3. Capa compacta. Capa adyacente a la lámina basal, forma la principal estructura fibrosa gracias a su contenido de colágena intersticial con ligaduras cruzadas de tipos I

(proporcionando gran resistencia a la tracción (49)), III (aumentando la extensibilidad y también resistencia a la tracción) y en menor cantidad V y VI, lo que confiere su integridad mecánica.

4. Capa fibroblástica Capa celular, formada por fibroblastos y macrófagos, presenta una matriz de tejido conectivo laxo.
5. Capa esponjosa (intermedia). Se ubica entre el amnios y corion, está formada por proteoglicanos y glicoproteínas, además de colágena tipo III (34,50). Las colágenas intersticiales I y III son producidas principalmente por las células mesenquimales, en tanto que las células epiteliales producen principalmente proteínas de la lámina basal, como procolágena IV, fibronectina y laminina (34,35,51).

Los principales componentes del amnios son ECM y células, siendo éstas las responsables de la síntesis, degradación y rotación de la matriz (33). Esta población celular está dividida en dos subpoblaciones: las células epiteliales amnióticas y células mesenquimales amnióticas, que presentan características de células troncales. Estas células expresan marcadores pluripotentes, presentando una alta expansión *in vitro* y pudiéndose diferenciar en las tres capas germinales (33). Las moléculas de colágena y proteoglicano son junto con la elastina, fibronectina y laminina, los componentes principales de la ECM de la membrana amniótica que le dan al tejido propiedades mecánicas y de integridad específicas (49).

1.4.1.1.1. Componentes de la ECM

Las proteína estructurales de la ECM también forman los componentes estructurales de la arquitectura de la membrana amniótica, conteniendo una variedad de proteínas especializadas (52).

1.4.1.1.1.1. Colágenas

La colágena es una proteína de triple hélice que generalmente consta de dos cadenas idénticas ($\alpha 1$), y una cadena adicional que difiere ligeramente en su composición química ($\alpha 2$). La composición de aminoácidos de la colágena es atípica a las demás proteínas por su alto contenido de hidroxiprolina (53). La biosíntesis y el ensamblaje de la colágena sigue la vía normal para una proteína secretada. (54). Varios tipos de colágena genéticamente distintos se han identificado hasta ahora. Todos los tipos de colágenas no difieren sólo en sus secuencias de aminoácidos sino también en sus conformaciones espaciales, confiriéndoles propiedades funcionales específicas (55). Las colágenas de los tipos I y III, junto con cantidades más pequeñas de los tipos IV, V y VI, son los principales componentes del amnios. Las colágenas I, III y V pertenecen a la misma familia y son los principales componentes de la red de colágena para dar las propiedades mecánicas al tejido. Finalmente, se cree que la colágena VI proporciona filamentos de anclaje en la interfase de la membrana (56).

Colágena IV

La colágena IV es una proteína de 400 nm de largo y consta de dos cadenas $\alpha 1$ (IV) y una $\alpha 2$ (IV). En la red de colágena IV, que proporciona una matriz para las membranas basales, las moléculas se unen y reticulan a través de sus regiones finales similares e interactúan lateralmente con sus dominios de triple hélice. La colágena IV participa en las interacciones celulares y posee dos sitios de reconocimiento específicos para las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ (57). Las moléculas de colágena IV forman láminas estructurales dentro de la lámina basal del epitelio amniótico y membranas basales del amnios (56).

1.4.1.1.1.2. Lamininas

Las lamininas son un componente principal de las membranas basales y están formadas por varias subunidades unidas entre sí por enlaces disulfuro, formando una estructura en forma de cruz. Las células interactúan con lamininas a través de secuencias de reconocimiento específico y receptores integrina (58), asegurando el "anclaje" de las células epiteliales al estroma subyacente a través de la membrana basal, se cree que las lamininas desempeñan una importante función de refuerzo en la membrana amniótica (59).

Laminina 1

La expresión de la laminina 1 parece estar limitada en gran medida a las membranas basales epiteliales. Aparece temprano durante la morfogénesis epitelial en la mayoría de los tejidos de embrión, y permanece presente como una laminina epitelial mayor en algunos tejidos adultos. La laminina 1 contiene varios módulos activos, pero varios se encuentran en cadenas $\beta 1$ o $\gamma 1$ compartidas por al menos 11 lamininas. Sin embargo, los terminales carboxilo de las cadenas α contienen cinco módulos de laminina globular, distintos para cada cadena α . Las vías que controlan la síntesis de laminina 1 son prácticamente desconocidas, pero los avances recientes plantean la posibilidad de que la síntesis de laminina 1 y colágena IV pueda ser regulada por quinasas de la familia B/Akt (60).

Laminina 5

La laminina 5 (anteriormente conocida como kalinina, epiligrina y niceína) es una proteína de adhesión localizada en los filamentos de anclaje dentro del espacio de la lámina lucida de la zona de la membrana basal, situada entre la epidermis y la dermis de la piel humana. Los filamentos de anclaje son estructuras dentro de la lámina lúcida y se encuentran debajo de los hemidesmosomas de los queratinocitos basales adosados a la zona de la membrana basal.

Esta molécula heterotrimérica tiene tres subunidades: la cadena $\alpha 3$ de 200 kDa, la $\beta 3$ de 140 kDa, y la $\gamma 2$ de 155 kDa, las cuales son productos de genes diferentes. Las cadenas $\alpha 3$ y $\gamma 2$ se procesan a polipéptidos de 165 y 105 kDa, respectivamente (61). Los queratinocitos humanos sintetizan y depositan laminina 5, regulando la señalización y adhesión de la integrina (61,62).

1.4.1.1.1.3. Proteoglicanos, elastinas y fibronectinas

Los proteoglicanos son glicoproteínas compuestas de una proteína del núcleo a la que se unen covalentemente polisacáridos sulfatados o glicosaminoglicanos, e interactúan con moléculas de colágena para promover la reticulación de la red y regular la formación de fibras de colágena (63). Además, son importantes para la proliferación y diferenciación celular y realizar, a través de la unión de los factores de crecimiento, las funciones esenciales en los procesos de remodelación (64).

Las elastinas confieren la propiedad del retroceso elástico a fibras elásticas que se ensamblan a partir de una familia de precursores de tropoelastina (65). Se cree que las moléculas de elastina, son abundantes en las capas reticulares y compactas de la membrana amniótica (66).

Las fibronectinas son glicoproteínas sintetizadas por una amplia variedad de tipos de células que también dirigen su posterior organización en fibrillas de la ECM. Esta compleja familia de proteínas es un producto de un solo gen, que puede, por splicing alternativo, dar lugar a 20 formas diferentes de fibronectina subunidades humanas (58). La fibronectina fetal es una proteína que actúa como un pegamento, debido a sus múltiples dominios de unión (especializados, de al menos seis sitios peptídicos, capaces de mediar la adhesión celular) para las células, así como otros componentes de la matriz, que estabilizan todo el sistema

celular y matriz (67). Los receptores de integrinas pueden mediar la adhesión celular y la migración en la fibronectina y otras moléculas extracelulares (68).

El amnios ha sido usado en medicina desde hace muchos años, sin embargo, su interés ha renacido en los últimos años y se está popularizando su uso como cobertura biológica temporal de heridas en ciertos campos de la cirugía. Se ha utilizado fresco o preservado con distintas metodologías.

El uso de amnios fresco es muy frecuente en aplicaciones clínicas, aunque se han desarrollado otras técnicas como su uso seco (69), congelado (70), irradiado (69), liofilizado (secado por congelación reduciendo el contenido de agua al 5%) (71), preservado en glicerol (72), etc.

1.4.2. Amnios Humano Radioesterilizado (RHA).

Aunque varios métodos de preparación y preservación están disponibles, el amnios seco es el más sencillo de preparar y almacenar. La radiación gamma puede ser utilizada para eliminar aún más el riesgo de contaminación microbiana (69). La irradiación gamma a 25 kGy asegura una completa esterilización bacteriana fúngica y viral (el VIH se inactiva a 20 kGy) (73). Actualmente no están muy descritas las proteínas que tiene el amnios después de su esterilización con cobalto 60.

El amnios humano radioesterilizado (RHA, *por sus siglas en inglés*) ha sido utilizado como apósito biológico en el tratamiento de quemaduras, degeneración y tumor corneal, etc. (74,75). En México, el Banco de Tejidos Radioesterilizados (BTR) del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) es donde se realiza el procedimiento de irradiación hacia este apósito. El protocolo del BTR inicia con la recepción del tejido y verificación de documentos. Previamente, en el hospital, se hizo la selección de las donadoras (pacientes

sanas, con gestación a término, sin sufrimiento fetal, ni cursado enfermedades infecciones, degenerativas, etc., con resultados serológicos negativos para virus de inmunodeficiencia humana (VIH 1 y 2), hepatitis b, hepatitis c y sífilis), obtención del consentimiento informado, procuración del tejido, limpieza preliminar, realización de serologías y almacenamiento temporal a temperatura de refrigeración en envases estériles debidamente identificados. Una vez aprobado el tejido, se lleva a cabo el lavado del mismo, secado al aire y control microbiológico (para determinar la carga microbiana inicial y calcular dosis de esterilización). Posteriormente, el amnios es empacado al vacío, etiquetado y esterilizado con radiación gamma de Cobalto-60 en la Planta de Irradiación Gamma del Instituto. Finalmente, los tejidos irradiados se someten a pruebas de esterilidad y se almacenan a temperatura ambiente, en espera de resultados serológicos negativos practicados a las donadoras 6 meses después, para confirmar que no existe ningún agente infeccioso que pudiera transmitirse de donador a receptor. Cumplido lo anterior, los tejidos son liberados para su distribución y aplicación clínica. Todas las etapas se llevan a cabo bajo un control de calidad riguroso (76).

1.4.2.1. RHA como cobertura biológica

El RHA tiene varias propiedades que lo convierten en una herramienta atractiva en distintas aplicaciones clínicas, entre ellas puede destacarse sus concentraciones de citocinas y factores de crecimiento, además de su capacidad para reducir el estado de inflamación y secretar factores pro-apoptóticos. Las propiedades, disponibilidad, bajo costo y recuperación no invasiva usando amnios, lo convierten en candidato ideal para diversas aplicaciones clínicas. (33).

En la clínica, el amnios es utilizado como cobertura temporal en quemaduras de espesor parcial colocándose con el lado epitelial hacia abajo, en contacto con la superficie de la herida, a fin de liberar eficientemente los factores de crecimiento al sitio de la herida. El uso de la membrana amniótica para cubrir las áreas inflamadas o expuestas influye favorablemente en el proceso de cicatrización de la herida, así como la reducción de los niveles de dolor y malestar del paciente (33,77); por ello, se ha empleado al amnios en diversos tratamientos, como los asociados al tracto urinario, la cavidad oral, estómago, cartílago y el cerebro (78–82); siendo hasta el momento, la reconstrucción de la superficie ocular, aplicación de la piel y la ingeniería de tejidos, las aplicaciones más conocidas y más prometedoras (48,83,84).

Antecedentes.

Sustitutos biológicos dermo-epidérmicos compuestos

Existe una gran variedad de sustitutos cutáneos. El generar una piel de espesor grueso, mediante la bioingeniería, implica la incorporación de por lo menos dos o más tipos celulares, que proporcionen factores de crecimiento y citocinas, además de una ECM. Estos sustitutos cutáneos compuestos pretenden imitar la estructura histológica de la piel normal donde están presentes las capas epidérmica y dérmica, para al mismo tiempo, proporcionar un parecido funcional. La producción de sustitutos cutáneos dermoepidérmicos permanentes utiliza fibroblastos y queratinocitos autólogos o alogénicos, siendo estos últimos los capaces de satisfacer las necesidades de grandes cantidades de lotes de sustitutos comerciales (85).

Entre los sustitutivos cutáneos dermo-epidérmicos (compuestos) comercialmente disponibles está el Apligraf® y el Orcel®. El Apligraf® es una bioconstrucción en bicapa donde los fibroblastos dérmicos se siembran en una suspensión con colágena bovina tipo I y se forma un equivalente de retículo dérmico en 4-6 días, con la interacción de fibroblastos y colágena; en tanto que los queratinocitos se cultivan sobre la superficie de la capa dérmica y se exponen a una interfaz aire-líquido, con el fin de promover la maduración y la cornificación de la capa epidérmica estratificada. El Orcel® es un producto en bicapa a base de una esponja porosa de colágena. En él, los fibroblastos se cultivan en un lado de la matriz, mientras que el otro lado es cubierto con un gel de colágena donde son sembrados los queratinocitos (85).

Amnios humano como cobertura temporal en quemaduras

RHA es una alternativa para el tratamiento de quemaduras utilizado como cobertura biológica transitoria, ya que facilita la epitelización en quemaduras de espesor parcial, además de disminuir el dolor al aislar lesiones del medio externo, dada la presencia de factores antiinflamatorios (74,75). El amnios ha demostrado acelerar el proceso de reepitelización, lo cual resulta en un cierre de la herida más rápido en quemaduras superficiales y de espesor parcial. Por ejemplo, Miller *et.al.* demostró que las heridas de quemaduras de espesor parcial cerraron más rápido que los controles cuando éstas eran protegidas inmediatamente con un aloinjerto. Aunado a esto, Sharma *et.al.* (86) demostró que la aplicación de la membrana amniótica a quemaduras de espesor parcial está asociada con exudación mínima, y la curación se produce sin la necesidad de autoinjerto. La membrana favorece la cicatrización, acelerando la migración de fibroblastos y el desarrollo de colágena durante los primeros 6-8 días de la reparación (86-88). El amnios también puede

proporcionar un buen equilibrio de la humedad que permite la rápida epitelización. Otro mecanismo adjudicado a esta membrana y que promueve un rápido cierre, es la inhibición de la actividad de proteinasa, que a su vez, reduce las respuestas inflamatorias debido a la disminución de infiltración de leucocitos polimorfonucleares (40).

Amnios humano en sustitutos biológicos

Debido a la combinación de las propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y antivirales, antifibróticas y antiangiogénicas de la membrana amniótica humana (HAM), ésta proporciona un ambiente favorable para la unión celular y su expansión *in vivo* e *in vitro*. Los productos de HAM comercialmente disponibles, tales como AmnioGraft® y ProKera®, actualmente se tratan con criopreservación a -80°C después del sembrado, para no hacer viables las células epiteliales amnióticas y el tejido no inmunogénico. Existen otros sustitutos a base de HAM, elaborados con una membrana amniótica humana descelularizada y deshidratada, como Acelagraft®. Aquí el tejido es esterilizado por irradiación gamma, descelularizado y liofilizado (89).

El amnios humano al ser utilizado en sustitutos biológicos, ha sido evaluado como matriz extracelular. Guo *et. al.* (90) realizó experimentos comparando el amnios con una matriz de placenta, en los que concluye que la membrana amniótica humana descelularizada y deshidratada es una matriz extracelular que sirve principalmente como un andamio, y promueve señalización suficiente para permitir la adhesión celular y la proliferación; además que las moléculas liberadas a consecuencia de la fijación celular, favorecen la supervivencia y migración celular. En tanto que el grupo de trabajo de Bhatia *et. al.* (91), realizó experimentos en una membrana amniótica irradiada, descelularizada y liofilizada (Acelagraft®), comparando sus propiedades biológicas y ultraestructurales con amnios humano

convencional criopreservado. Se informa que la membrana amniótica irradiada, descelularizada y liofilizada es un material de matriz extracelular apto para el soporte de fibroblastos dérmicos y la secreción de citocinas en la cicatrización de heridas.

Interacción celular con la matriz extracelular

Schultz y Wysocki (92), en una revisión, reportan interacciones dinámicas y bidireccionales entre la matriz extracelular y los factores de crecimiento, señalando que los factores de crecimiento regulan la ECM aumentando la producción de sus componentes, y a su vez, la de los factores de crecimiento. Ellos clasifican estas interacciones como directas (unión directa de los factores a la ECM para liberar, simultáneamente, ciertos factores de crecimiento que pueden servir para secuestrar y proteger otros factores de crecimiento contra la degradación y/o potenciar su actividad) e indirectas (incluyen la unión de células a la ECM a través de las integrinas, lo que permite que las células respondan a factores de crecimiento y puede inducir la expresión del factor de crecimiento). Por otro lado, mencionan que las matricinas o subcomponentes moleculares de la ECM, pueden unirse a receptores de citocinas, quimiocinas o de familias de factores de crecimiento y estimular las actividades celulares.

Lamininas y colágenas como componentes de la ECM y el amnios fresco

Se ha demostrado que las proteínas que componen la lámina basal afectan la diferenciación y la supervivencia celular (93). Los componentes principales que componen la membrana basal del amnios incluyen lamininas, colágena tipo IV y VII, y fibronectina (94). La fibronectina y la colágena son glicoproteínas que constituyen la ECM. La

fibronectina es capaz de mediar la adhesión celular, mientras que la colágena realiza funciones estructurales que permiten el mantenimiento de la integridad de la membrana (49).

La laminina es el principal componente que interactúa con las células subyacentes, a través de los receptores de superficie celular, tales como las integrinas. Las lamininas regulan la expresión génica e influencia celular; además de contribuir de manera crítica a la diferenciación celular, forma y movimiento celular, el mantenimiento del fenotipo del tejido, y la promoción de la supervivencia del mismo (95,96). Cabe mencionar que el grupo de trabajo de Takashima *et.al.* (97), caracterizó las isoformas de laminina en el amnios humano mediante la técnica de PCR tiempo real (RT-PCR) e inmunohistoquímicas; tomando en cuenta que sus isoformas heterotrímeras (compuestas de los dominios α 1-5, β 1-3, y γ 1-3) son expresadas y secretadas por células epiteliales adyacentes. Se halló un amplio espectro de isoformas de laminina: laminina 2, 4, 5, 6, 7, 10 y 11. Además de que previamente, Engvall *et.al* (98), Champlaud *et.al* (59) y Rousselle *et. al* (99), ya habían caracterizado mediante la técnica de Western Blot, algunas isoformas de laminina.

EGF, FGF y TGF como factores promotores de migración

Son extensos los estudios en los que se menciona a TGF, EGF y FGF como factores importantes en las diferentes etapas del cierre de la herida, siendo secretados por la interacción entre fibroblastos y queratinocitos, principalmente (7,9,18–20). Por mencionar algunos: Schultz *et.al.* reporta la aceleración de la regeneración epidérmica en quemaduras de grosor parcial con la aplicación tópica de EGF o TGF- α (19); mientras que Chrissouli *et. al.* (100) describe el papel de bFGF en la proliferación de fibroblastos humanos de piel fetal y adulta, y Akita *et. al.* (101) señala los beneficios del factor para la uniformidad del color postoperatorio en la sanación de una herida, respectivamente.

Caracterización y uso de RHA

Son pocos los trabajos de caracterización en RHA. Entre ellos se encuentra el de Paolin *et.al.*, que experimentó con la presencia de determinadas moléculas (factores de crecimiento, citocinas, etc.) en la membrana amniótica con distintas radiaciones, y comparando los resultados con la liofilización. Usando microscopía electrónica de transmisión (TEM, *por sus siglas en inglés*) se observó que la liofilización no parece afectar la estructura biológica de la membrana amniótica a diferencia de la irradiación γ ; mientras que mediante un ensayo inmunoabsorción ligado a enzimas, se obtuvo una disminución significativa de la concentración de los inhibidores tisulares de la metaloproteinasa-4, FGF y EFG. La irradiación también indujo daño estructural al epitelio, la membrana basal y la lámina densa. Cuanto mayor es la dosis de irradiación (25-30 kGy), más grave es el daño a la estructura de la membrana amniótica (102). Por otro lado, anteriormente Lim y su grupo de trabajo mediante histología, inmunohistoquímica y microscopía electrónica de transmisión (TEM, *por sus siglas en inglés*) confirman la pérdida de colágena IV y VII, laminina y fibronectina en el amnios radioesterilizado. También observan niveles más bajos de varios factores de crecimiento; teniendo una aplicación clínica exitosa con reepitelización rápida (89).

Hamid *et.al.* estudió la morfología del amnios radioesterilizado bajo microscopía electrónica de barrido (SEM, *por sus siglas en inglés*), mostrando que la conservación en glicerol, previa a la radioesterilización es mucho más efectiva (103). En tanto que Singh y Chacharkar demostraron, usando la exploración espectral de infrarrojos, que no hay degradación o cambios en la calidad y las características cuando se utiliza el proceso de irradiación; incluso después de largos períodos de almacenamiento de hasta 5 años, ya que

preservan moléculas bioactivas como fibronectina, laminina, glucosaminoglicanos y elastina. Ellos también demuestran que la eficacia clínica del material se conserva, en una serie de pacientes con quemaduras superficiales y de espesor parcial (104). Así mismo se han realizado modelos experimentales con ratones, donde se concluye una inflamación y epitelización no significativas en comparación a un incremento notable en la angiogénesis (105).

Justificación.

Dada la necesidad de un apósito biológico para el tratamiento de quemaduras, la facilidad de obtención del amnios humano radioesterilizado (RHA) y sus cualidades de promover la reparación de la herida, así como secretar factores de crecimiento; se elaborará un sustituto biológico dermo-epidérmico (B-DSS) con constructos a base de RHA. Este sustituto tiene la ventaja de disponer de los dos tipos celulares y buscará secretar factores que participen en las diversas etapas del cierre de la herida. Se determinará in vitro si los queratinocitos y fibroblastos humanos sobre RHA forman un B-DSS viable que secreta factores de crecimiento como EGF, TGF- α y FGF. También se llevará a cabo la caracterización del amnios humano radioesterilizado, ya que es un biomaterial procesado mediante irradiación y no se sabe con exactitud si aún conserva en su estructura proteínas características de lámina basal que ayuden a la adhesión de las células sobre ésta.

2. Objetivos e hipótesis

2.1. Hipótesis

Al elaborar un sustituto biológico dermo-epidérmico a base de amnios humano radioesterilizado, éste secretará factores de crecimiento como EGF, TGF- α y FGF.

2.2. Objetivo general

Determinar la secreción de EGF, TGF- α y FGF en los constructos a base de amnios humano radioesterilizado.

2.2.1. Objetivos particulares

- I. Aislar en cultivo celular los principales tipos celulares de la piel (fibroblastos y queratinocitos).
- II. Elaborar constructos de células de la piel a base de RHA.
- III. Elaborar un prototipo de sustituto biológico dermo-epidérmico a base de constructos de RHA.
- IV. Determinar EGF, TGF- α y FGF en sobrenadantes de medio de cultivo en co-cultivo, constructos y sustituto biológico dermo-epidérmico.
- V. Caracterizar proteínas de lámina basal (laminina 1, laminina5 y colágena 4) en RHA.

3. Metodología

Para la elaboración del trabajo se utilizaron un total de 6 biopsias: 3 obtenidas de cirugía de reducción de abdomen y 3 obtenidas de cirugía de circuncisión (donantes con previo consentimiento informado firmado), de donde se aislaron fibroblastos y queratinocitos humanos.

3.1. Procesamiento de la biopsia.

Una vez que la biopsia fue procurada por el médico cirujano, se depositó en medio de transporte (DMEM-F12/ 10% de antibiótico-antimicótico) elaborado en condiciones de esterilidad. La muestra se transportó al Laboratorio de Biotecnología a una temperatura de a 4°C. El procesamiento de la muestra una vez obtenida, no fue mayor a 2 días.

Las biopsias fueron procesadas en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar (*Thermo Scientific 1300 Series A2*). Se mantuvo la biopsia húmeda en una caja petri estéril y se retiró el tejido adiposo. Una vez obtenidos los fragmentos a procesar, fueron pesados y medidos, para después realizar en el tejido un corte estilo “falda hawaiana”. Posteriormente los fragmentos fueron colocados en un tubo cónico de 50 mL y fueron sometidos a 3 lavados con PBS (*Gibco Phosphate-Buffered Saline 1X*) (PBS 1X al 10% antibiótico-antimicótico (*Gibco Antibiotic-Antimycotic 100X*)) durante 10 minutos cada uno. Para la separación de la epidermis y dermis, se utilizó dispasa (*Gibco Dispase*) a una concentración de 0.03 g /10 mL de PBS para después ser filtrada en un filtro celular de 0.22 μ antes de usarse. Una vez que la muestra fue colocada en la solución de dispasa, ésta se mantuvo en un agitador orbital a una temperatura de 37°C de 1 a 1.30 horas. La muestra fue monitoreada para observar la separación de las capas de la piel: un tejido blanco grueso (parte dérmica) y un tejido muy fino de color café (parte epidérmica); una vez separadas ambas capas se trataron de manera individual. Si había pasado el tiempo total para que la muestra permaneciera en la solución de dispasa, y la epidermis no se había desprendido por completo, la muestra se retiraba de la solución y era colocada en una caja petri estéril para separar la epidermis de la dermis de forma mecánica con ayuda de unas pinzas de relojero.

3.1.1. Aislamiento de queratinocitos

III.1.1. Aislamiento de queratinocitos

Las láminas epidérmicas – tejido café – obtenidas fueron colocadas en un tubo eppendorf de 2 mL donde se adicionó 1 mL de tripsina (*Gibco Trypsin-EDTA Solution 1X - 0.25% trypsin, 0.02% EDTA*) al 0.25%. El tubo fue colocado en un Termo-mixer (*Eppendorf ThermoMixer C*) manteniéndolo en constante agitación a 900 R.P.M., 37°C durante 90

minutos. Una vez transcurrido el tiempo en tripsina, esta fue inactivada con 1 mL de medio DMEM-F12 (*Gibco, Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*) suplementado al 2.5% FBS (*Gibco, Fetal Bovine Serum*) (relación 1:1 respecto al volumen de tripsina empleada).

Las láminas de tejido no disgregadas, fueron utilizadas para realizar el “cultivo en explante” sobre una capa alimentadora ó feeder layer (fibroblastos mitomizados). El explante se extrajo de la solución de tripsina inactivada con pinzas y fue depositado con cuidado sobre la feeder layer para evitar dañarla. La solución inactivada, con el resto de tejido epidérmico disgregado, fue centrifugada a 1500 R.P.M. durante 10 minutos (*Eppendorf Centrifuge MiniSpin plus*), obteniendo un pellet. Se retiró el sobrenadante y se procedió con el conteo celular.

3.1.2. Aislamiento de fibroblastos

El tejido dérmico –tejido blanco– fue disgregado mecánicamente en fragmentos pequeños sobre una caja petri de vidrio estéril, con ayuda de bisturí, pinzas de disección y tijeras rectas. Los fragmentos obtenidos fueron colocados en un tubo cónico de 50 mL para su disgregación en una solución de colagenasa a una concentración de 100 μ l / 10 mL de HBSS. El tubo se colocó en el agitador orbital (*Thermo Scientific MaxQ 4000*) durante 24 horas a 37°C.

Una vez cumplido el periodo de incubación, se neutralizó la actividad de la colagenasa utilizando DMEM-F12 suplementado con 10% FBS y 1% antibiótico-antimicótico (proporción 1:1). Si al pasar el tiempo total de incubación en colagenasa, el tejido no se disgregaba por completo, se retiraba este tejido. La solución filtrada se centrifugó a 1200

R.P.M. durante 6 minutos (*Eppendorf Centrifuge 5702*), obteniendo un pellet. Se retiró el sobrenadante y se procedió con el conteo celular.

3.1.3. Conteo celular

El conteo celular se realizó después de obtener el pellet. Se retiró el sobrenadante y se adicionó 1mL de medio suplementado (según el tipo celular) al botón celular –o pellet–. Se homogenizó el pellet con el medio suplementado para poder realizar el conteo celular por el método de exclusión con azul de tripano en una cámara de Neubauer, contando 10 μ l. En un microscopio invertido (*Zeiss AXIO Observer .A1*) se realizó la observación por cuadrantes de células vivas y muertas, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} \times 10,000 \times 2 \times \text{factor de dilución}$$

en la que la concentración es igual al número de células totales entre el número de cuadrantes contados, por 10,000 (volumen de la cámara), por 2 (factor de dilución 1:2 con azul tripano), por el segundo factor de dilución (factor de dilución 1:1 dado el volumen de resuspensión del botón celular).

En el caso de los queratinocitos, éstos fueron resuspendidos en 1 mL de medio DMEM-F12 suplementado al 2.5% FBS sin antibiótico-antimicótico; y sembrados a una densidad de 50,000 células/cm², en cultivo primario. Mientras que los fibroblastos fueron resuspendidos en 1mL de medio DMEM-F12 suplementado con 10% FBS y 1% antibiótico-antimicótico, y sembrados a una densidad de 10,000 células/cm².

3.2. Cultivo celular.

3.2.1. Cultivo *in vitro* de queratinocitos

El cultivo primario procedente del aislamiento celular se realizó de forma directa, sobre feeder layer (fibroblastos mitomizados a 15,000 células/cm²), según el diseño experimental (ver apartado 3.4.1). Después de cultivar los queratinocitos durante 72 horas con medio DMEM-F12 suplementado al 2.5% FBS sin antibiótico-antimicótico, se inició el proceso para la colecta de sobrenadantes.

3.2.2. Cultivo *in vitro* de fibroblastos

El cultivo primario (10,000 células/cm²) procedente del aislamiento celular se realizó en una caja de cultivo T25 (*Corning Product #430639*), para su expansión celular. Una vez que las células alcanzaron 80-90% de confluencia se realizó el primer pase, donde se ocuparon cajas de cultivo T75. Ya en confluencia, se obtuvieron las células necesarias para la colecta de sobrenadantes. Se hizo cambio de medio cada tres días, con el medio DMEM-F12 suplementado con 10% FBS y 1% antibiótico-antimicótico.

Al sembrar (según el diseño experimental, ver apartado 3.4.1), se hizo el pase 2 en la microplaca de 24 pozos, dejando pasar 3 horas en cultivo con medio DMEM-F12 suplementado con 10% FBS y 1% antibiótico-antimicótico y se comenzó el proceso de colecta de sobrenadantes.

3.2.3. Pase celular de fibroblastos

Para realizar los pases celulares se retiró el medio de cultivo y se lavó la placa o caja de cultivo 2 veces, durante 5 minutos cada uno, utilizando PBS 1X. Después, se retiró el PBS para agregar tripsina-EDTA al 0.05% (proporción 1:4) e incubar a 37°C durante 10 min.

Finalizado el tiempo de incubación, se inactivó la tripsina en proporción 1:1 con medio de cultivo suplementado al 10% de FBS. Se resuspendió la solución y se disgregó el contenido de la caja mediante presión contra las paredes de la misma. La solución restante se centrifugó a 1200 R.P.M durante 6 minutos, se realizó conteo celular y cultivó como ya se ha descrito anteriormente.

3.2.4. Siembra y cultivo en RHA (constructos)

Para la formación del constructo (células aunadas a una matriz), se siguió el protocolo de conteo, siembra y cultivo celular antes descrito en cultivos *in vitro*; con las siguientes modificaciones: los queratinocitos fueron sembrados a una densidad de 100,000 células/cm² y los fibroblastos a 240,000 células/cm². Ambos tipos celulares se sembraron en una superficie de áreas de 1.9 cm² de amnios humano radioesterilizado (RHA, *por sus siglas en inglés*), previamente humedecidas con 10 µl de PBS. Mientras los fibroblastos se sembraron en pase 2, los queratinocitos se sembraron después del aislamiento (cultivo primario).

3.2.5. Montaje del sustituto biológico dermo-epidérmico (B-DSS)

En condiciones estériles y con ayuda de unas pinzas de relojero, se unieron los constructos de RHA-queratinocitos con el de RHA-fibroblastos, para obtener un prototipo de sustituto biológico dermo-epidérmico (B-DSS, *por sus siglas en inglés*). El constructo de queratinocitos quedó sobre el de fibroblastos (figura 3).



Figura 3 | Montaje del B-DSS. Esquematación de cómo fue montado el sustituto biológico. Se obtuvo el constructo al sembrar queratinocitos y fibroblastos en la matriz (RHA), respectivamente. El sustituto biológico dermo-epidérmico se formó colocando el constructo de fibroblastos sobre el de queratinocitos.

3.3. Viabilidad celular en constructos.

Se realizó un prueba de viabilidad celular a las 48 horas de cultivo. Lo anterior, a fin de asegurar que las células de las que provenían los sobrenadantes estaban realmente adheridas al material. La prueba se llevó a cabo mediante el kit de viabilidad/toxicidad (*LIVE/DEAD® Cell Viability Assays* de *Life Technologies*).

3.3.1. Kit LIVE/DEAD® Cell Viability Assays de Life Technologies.

Se agregó 0.5 µl de homodímero-1 de etídio y 1 µl de calceína AM en 1 mL de solución salina de Hank's (HBSS, *por sus siglas en inglés*). Esta solución se adicionó a los constructos, fueron incubados durante 45 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Pasado el tiempo de incubación, se realizó un lavado con PBS 1X para por último observar la fluorescencia bajo el microscopio vertical (*Zeiss AXIO Imager.Z2*). Este método fluorimétrico para diferenciar células vivas de muertas tuvo resultados descriptivos.

3.4. Determinación de factores de migración por ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

3.4.1. Diseño experimental para la colecta de sobrenadantes

Se realizó un diseño experimental que incluyó los dos tipos celulares (queratinocitos y fibroblastos), con 3 repeticiones cada uno. Los sobrenadantes, provenientes de un cultivo celular en condiciones idóneas (implicando la adición de un suplemento al medio de cultivo), se colectaron en un tiempo de 24 horas, partiendo de 5 variables principales: (1) cultivo *in vitro* de queratinocitos, (2) cultivo *in vitro* de fibroblastos, (3) constructo de RHA con queratinocitos, (4) constructo de RHA con fibroblastos y (5) B-DSS. Estas variables tuvieron sus controles positivos, que fue el mismo tratamiento sin la adición de un factor de

crecimiento en el medio de cultivo (Figura 4A), para asegurar que los factores secretados fueron propiamente de la variable y no del suplemento que se le adicionó al medio de cultivo (Figura 4B). El diseño se detalla a continuación:

Todos los cambios de medio de cultivo se realizaron aplicando 500 μ l. Se sembraron las células en áreas de 1.9 cm^2 a una densidad de 100,000 células/ cm^2 (queratinocitos) y 240,000 células/ cm^2 (fibroblastos) en microplacas de cultivo y sobre RHA. Después de la siembra, los cultivos se tuvieron de 3 horas (fibroblastos) a 3 días (queratinocitos) en medio de cultivo suplementado para favorecer la proliferación y adhesión celular a la matriz o soporte.

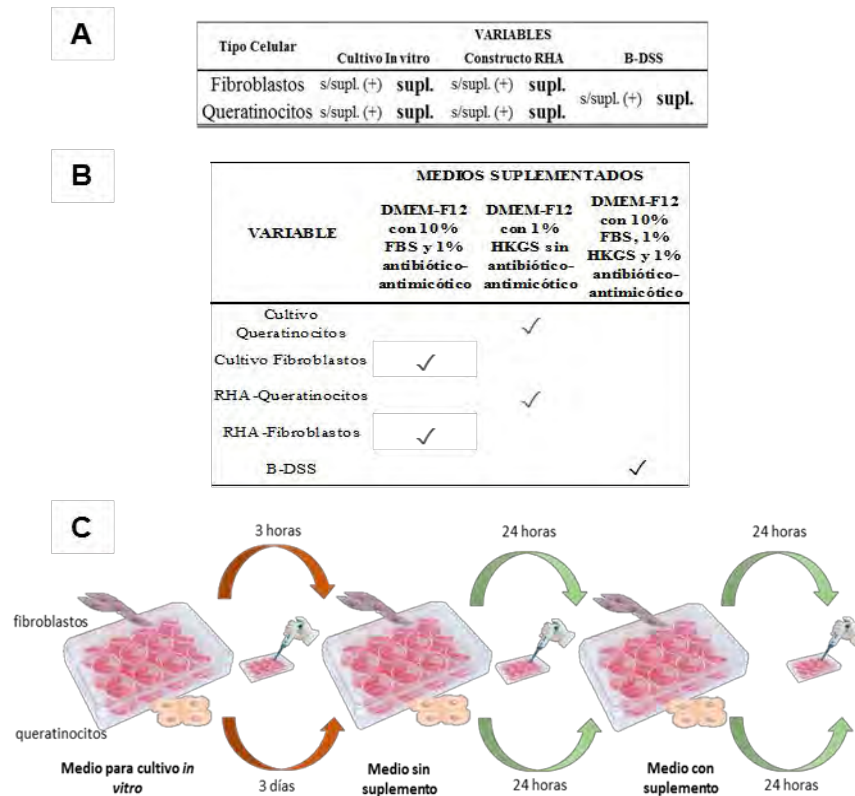


Figura 4 | Diseño experimental. (A) Variables experimentales –cultivo *in vitro* de queratinocitos, cultivo *in vitro* de fibroblastos, constructo de RHA con queratinocitos, constructo de RHA con fibroblastos y sustituto biológico dermo-epidérmico (B-DSS)– con sus controles positivos –variables sin suplemento–, (B) Medios suplementados utilizados por variable, (C) Modo de colecta de los sobrenadantes. Después de la siembra los cultivos se tuvieron de 3 horas (fibroblastos) a 3 días (queratinocitos) en medio de cultivo suplementado. Posteriormente se hizo cambio de medio no suplementado para la colecta de sobrenadantes control, 24 horas después. Finalmente se cambió a medio suplementado para ser recolectado 24 horas más tarde. Las flechas verdes indican la colecta del medio.

Pasado el tiempo anteriormente referido, se hizo cambio de medio para iniciar 24 horas después, la colecta de sobrenadantes control (medio DMEM-F12 sin suplemento). Posteriormente, se añadió medio DMEM-F12 con suplemento: 1% HKGS (para queratinocitos), y 10% FBS, 1% antibiótico-antimicótico (para fibroblastos); para ser recolectado 24 horas más tarde. Respecto al B-DSS, se utilizó el diseño anterior (sin suplemento y con suplemento), variando el medio con suplemento: 10% FBS, 1% HKGS y 1% antibiótico-antimicótico (Figura 4C).

3.4.2. Estandarización del método de ELISA

La estandarización para el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) se realizó para determinar la presencia de los factores de crecimiento como EGF, TGF- α y FGF, que promueven la rápida reepitelización en el lecho de la herida.

Se utilizaron 3 kits para las pruebas: Human EGF Standard ABTS ELISA Development Kit (*PrepoTech, N. Cat. 900-K05*), Human FGF-basic Standard ABTS ELISA Development Kit (*PrepoTech, N. Cat. 900-K08*) y Human TGF-alpha Quantikine ELISA Kit (*R&D Systems, N. Cat. DTGA00*). Para la elaboración de la prueba se utilizaron microplacas de 96 pozos y cinco soluciones: PBS (*10xPBS a 1xPBS, pH 7.20 en agua estéril*), búfer de lavado (*0.05% de Tween-20 en PBS*), búfer de bloqueo (*1% de BSA en PBS*), solución diluyente (*0.05% de Tween-20, 0.1% de BSA en PBS*) y sustrato líquido ABTS (*2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)*; *Sigma-Aldrich, N. Cat. A1888 SIGMA*). El procedimiento en general, consistió en seis fases; en el intermedio de cada fase se realizaron 4 lavados con 300 μ l búfer de lavado:

1. Se preparó la placa con 100 μl de anticuerpo primario de captura (por pozo) diluido en PBS, a una concentración de 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; para dejar incubando una noche a temperatura ambiente.
2. Se bloqueó la placa con 300 μl de bufer de bloqueo (por pozo). Se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente.
3. Posteriormente se agregó 100 μl del estándar o muestra (por pozo). Para la realización de la curva estándar, éste se diluyó en PBS a una concentración principal de 2 ng/mL ; las concentraciones utilizadas fueron 2, 1.75, 1.5, 1.25, 1.00, 0.75, 0.50, 0.25, 0.00 ng/mL . Se incubó la placa durante 2 horas a temperatura ambiente.
4. Se preparó la placa con 100 μl de anticuerpo secundario de detección (por pozo) diluido en PBS, a una concentración de 0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.; para dejar incubando 2 horas a temperatura ambiente.
5. Después se agregaron 100 μl de la avidina peroxidasa (agente amplificador más la enzima) (por pozo), dilución en solución diluyente 1:2,000. La placa se incubó 45 minutos a temperatura ambiente.
6. Finalmente se adicionaron 100 μl de solución de sustrato líquido ABTS a cada pocillo, para leer en el lector multi-modal Synergy HTX (*BioTek*), durante 40 minutos a temperatura ambiente y a una absorbancia de 405 nm con corrección de 650 nm.

3.4.2.1. Análisis de datos

Se elaboró una curva estándar partiendo de los datos obtenidos de las diluciones en serie. Se graficó la concentración de las proteínas (x) en función de la absorbancia de los estándares (y), en unidades pg/ml ; y se realizó una regresión lineal. Para la cuantificación de las muestras, se despejó (x) en la ecuación de la recta y se sustituyeron las absorbancias de las

muestras en (y). Los valores obtenidos se corrigieron: se promediaron las lecturas duplicadas para cada estándar, control y muestra, y se restó la densidad óptica estándar media de los valores cero de la curva (O.D.). Por último, se hizo un promedio de todos los ensayos. Todos los cálculos se hicieron con ayuda del programa Microsoft® Excel 2013.

3.5. Estandarización de la técnica de Western Blot para caracterización de amnios.

Se estandarizó la técnica de Western Blot en el laboratorio, para proteínas mayores a 300 kDa. Se caracterizaron proteínas de lámina basal (laminina 1 [200,400 kDa], laminina 5 [165, 140,105 kDa] y colágena 4 [300 kDa]) en RHA, que favorecen la adhesión celular, teniendo como control amnios humano sin radioesterilizar.

3.5.1. Procuración de la muestra y procesamiento

3.5.1.1. *Amnios humano (HAM)*

La membrana amniótica humana fue colectada con el consentimiento informado de una paciente sometida a cesárea electiva. El tejido (placenta) fue transportado en medio de transporte (PBS 1X suplementado con 10% antibiótico-antimicótico) a 4°C. En el laboratorio, la membrana fue separada del corion y criopreservada en segmentos de ~10 cm² a -80°C en 1mL de 10% v/v DMSO en PBS 1X (106,107). Al descongelar, los segmentos de la membrana fueron lavados tres veces con 5 mL de PBS 1X conteniendo inhibidores de proteasas (2 µg/mL aprotinina, 7.5 µg/mL leupeptina y 1 mM PMSF), durante 5 minutos cada uno. Se conservó el medio de los lavados. La proteína se extrajo a partir de las membranas criopreservadas y los medios de lavado.

3.5.1.2. Amnios humano radioesterilizado

El amnios humano radioesterilizado (RHA, *por sus siglas en inglés*) fue proporcionado por el Banco de Tejidos Radioesterilizados (BTR) del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), donde se realiza el procedimiento de irradiación hacia ese apósito, con todas las normativas, criterios de inclusión y exclusión de sus protocolos correspondientes; comenzando con una serie de lavados del tejido, secado al aire, control microbiológico, empacado al vacío, etiquetado y la esterilización mediante radiación gamma de Cobalto-60.

3.5.2. Solubilización de la muestra, lisis del tejido

Se homogeneizaron piezas de tejido amniótico (~ 100 mg en HAM y ~ 5 mg en RHA) con 0.5 mL de búfer de lisis (constituido por agua destilada, Tris-HCl 0.5 mol/L (pH 6,8), 10% dodecil sulfato sódico (SDS), 15 % glicerol y 6% β -mercaptoetanol (108)) en el TissueLyser LT (*QIAGEN*) con 40 oscilaciones por segundo, durante 30 minutos a 4°C. Los homogeneizados se centrifugaron a 1200 xg durante 20 minutos a 4°C (*Eppendorf Centrifuge 5415 R*), extrayendo la fracción final soluble. La concentración de la proteína fue determinada por el método de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*). Las alícuotas de 300 μ l fueron almacenadas a - 20°C.

3.5.3. SDS-PAGE

Se realizó electroforesis desnaturizante para tener en cuenta el peso de las proteínas y no su estructura. Las muestras fueron hervidas a 100 ° C durante 7 minutos en búfer de carga 1X (diluido con β -mercaptoetanol, proveniente del stock 2X constituido a base de 62.5 Mm Tris-HCl, pH 6.8, 25% glicerol, 2% SDS y 0.01% azul de bromofenol).

50 μ g de proteína amniótica se sometieron a electroforesis (Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems de *Bio-Rad*) en geles de SDS-poliacrilamida al 5% (separating gel) (109)

y 4% (stacking gel), durante 90 minutos a 120 V (*Bio-Rad PowerPac Basic Electrophoresis Power Supply*) con un marcador de referencia (*BlueRAY Prestained Protein Ladder in Tris-glycine 4~20%*); y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0.45 µm) usando el Bio-Rad Mini Trans-Blot Cell de *Bio-Rad*, durante 2 horas. Se utilizó búfer de corrida 1X de un stock 10X elaborado con 25 Mm Tris, 1.92 M glicina, 1% SDS, pH 8.3; y búfer de transferencia 1X de un stock 10X elaborado con 25 Mm Tris, 190 mM glicina. Se verificó la presencia de proteínas con solución rojo Ponceau, y se lavó la membrana con agua destilada para retirarla.

3.5.4. Inmunoblotting

3.5.4.1. Bloqueo e incubación de anticuerpos

La membrana se incubó con solución de bloqueo (PBS 1X, 5% BSA o leche, 0.1% Tween 20) durante 1.5 hrs a temperatura ambiente; para después incubar en anticuerpo primario [anti-laminina 1+2 (*Abcam, ab7463*), anti-laminina 5 (*Abcam, ab14509*) y anti-colágena IV (*Abcam, ab6586*)] diluido (1/1,000) en solución de anticuerpo (PBS 1X, 5% BSA, 0.1% Tween 20). Después de la incubación de la membrana durante toda la noche a 4°C, se hicieron 3 lavados y se utilizó el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP (*del inglés Horseradish Peroxidase*) (1/2,000) [Goat Anti-Rabbit HRP (IgG H&L) (*Abcam, ab97051*)]. El anticuerpo secundario fue incubado durante 2 horas a temperatura ambiente; antes y después de su incubación se sometió a la membrana a 3 lavados con solución de lavado (PBS 1X, 0.1% Tween 20), durante 5 minutos cada uno.

3.5.4.2. Inmunorreactividad

La membrana se visualizó con el Kit de detección para transferencias Western Pierce ECL (*Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific*). La técnica de revelado

se llevó a cabo mediante placas fotográficas. Las placas utilizadas fueron CL-XPosure Film (*Thermo Fisher Scientific, 34088*), reveladas en solución de revelado Kodak Professional Dektol (*Kodak Cat. 516-0270*) y expuestas durante 5 minutos en un casete de exposición (*GE Healthcare Exposure Cassette*). La placa fue fijada con Kodak Professional Fijador rápido con endurecedor (*Kodak Cat. 516-0353*).

4. Resultados

4.1. Aislamiento y cultivo celular de queratinocitos y fibroblastos humanos

Se obtuvieron los principales tipos celulares de la piel (fibroblastos y queratinocitos) de biopsias de reducción de abdomen, mediante la técnica de procesamiento de piel (figura 5). Los fibroblastos fueron sembrados directamente en la caja, mientras que los queratinocitos se sembraron sobre fibroblastos mitomizados. Ambos cultivos primarios tuvieron la finalidad de ser expandidos y alcanzar un alto número de células para sembrar en los andamios.

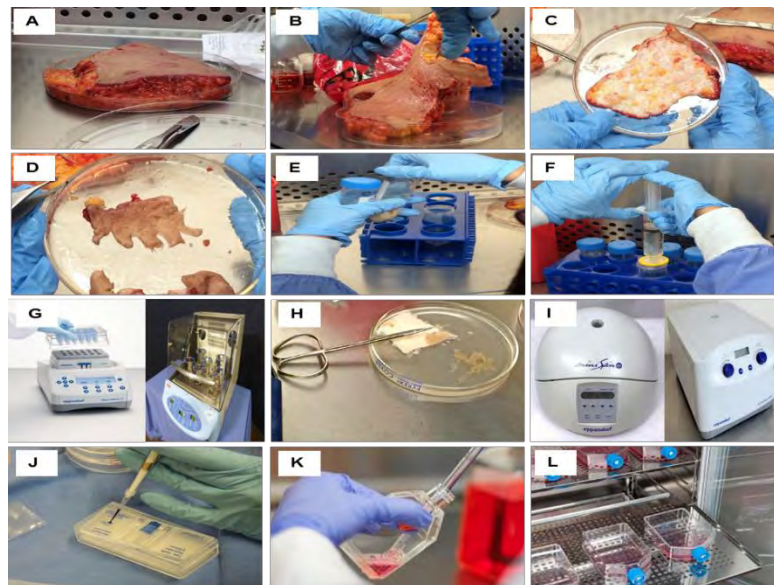


Figura 5 | Procesamiento de la biopsia. (A) Biopsia de reducción de abdomen; (B) limpieza de la muestra retirando la hipodermis; (C) dermis y epidermis listas para pesarse y medirse; (D) corte estilo “falda hawaiana” para facilitar la acción de la enzima, (E) lavados con PBS y antibiótico-antimicótico; (F) filtrado de la dispasa; (G) agitación de la muestra en dispasa; (H) separación manual de la dermis y epidermis para someterse a collagenasa y tripsina, respectivamente; (I) centrifugación después de la inactivación de la segunda enzima; (J) conteo celular; (K) siembra en caja e (L) incubación a 37 °C.

4.2. Constructos a base de RHA

Para formar los constructos, los queratinocitos se sembraron a una densidad de 100,000 células/cm² obtenidas directamente del aislamiento del tejido, y los fibroblastos a 240,000 células/cm² después del segundo pase de expansión celular.

Las células sembradas sobre le amnios humano radioesterilizado se utilizaron a una densidad celular alta previamente estandarizada en el laboratorio. Para ello, las células fueron obtenidas de cultivos primarios (figura 6) y sembradas a distintas densidades (dato no mostrado en este trabajo). Los cultivos de fibroblastos se expandieron y posteriormente fueron cultivos sobre el RHA. Los cultivos de queratinocitos, al ser expandidos sobre fibroblastos mitomizados (feeder layer) mostraron una reducción de células en el conteo final, por lo cual se sembraron directamente sobre el material después de ser aisladas del tejido.

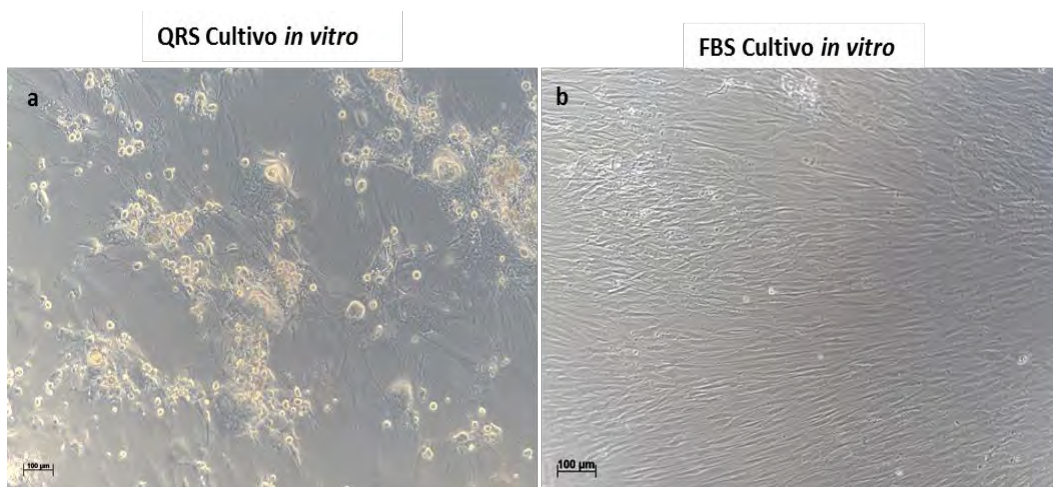


Figura 6 | Cultivo celular primario *in vitro*. a, Cultivo celular *in vitro* de queratinocitos a una densidad de 50,000 células/cm², se observan las colonias de queratinocitos sobre los fibroblastos mitomizados; b, Cultivo celular *in vitro* de fibroblastos a una densidad de 10,000 células/cm², se observa un cultivo confluyente. En ambos cultivos, se muestra la morfología típica (ovoide y alargada, respectivamente) del tipo celular.

Al realizar la prueba de viabilidad en los constructos (Figura 7), los fibroblastos presentaron una morfología alargada tipo espiga y los queratinocitos una morfología ovoide. En dichos constructos existe una disminución en el número de células sembradas. Las células del constructo de fibroblastos (FBS/RHA) mostraron un descenso de alrededor del 75%, mientras que el constructo de queratinocitos (QRS/RHA) tuvo una reducción de alrededor del 80% (análisis previamente realizado en el laboratorio). En ambos constructos, las células viables adheridas se presentaron en una baja cantidad sobre el andamio, teniendo ausencia de células no viables (figura 7); esto quiere decir que no hubo adhesión por parte de la mayoría de las células sembradas, por lo que tal vez se necesite sembrar en áreas más grandes para facilitar la ejecución de la técnica, o en su defecto, optimizar el protocolo de sembrado. Es relevante acotar que se esperaba que la adhesión de fibroblastos fuese mayor, dado que este tipo celular se adhiere a diferentes superficies (6).

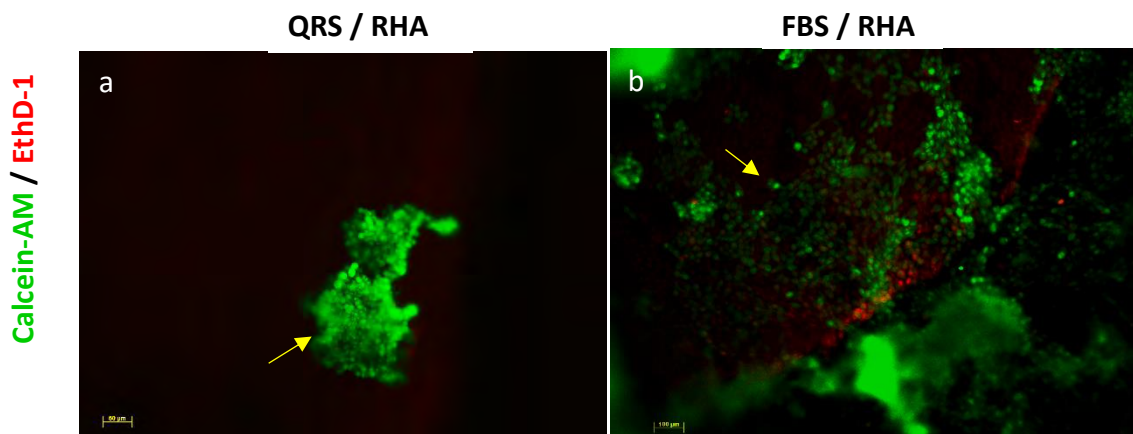


Figura 7 | Viabilidad celular en RHA. a, Viabilidad celular de queratinocitos. **b,** Viabilidad celular de fibroblastos. Hay una reducción de alrededor del 20% (fibroblastos), y de más del 75% (queratinocitos) de acuerdo a las cantidad celular sembrada. Se aprecian percances en la técnica de sembrado al notarse la baja de células en comparación a los cultivos *in vitro*, pese a la ausencia de células no viables (ausencia de células teñidas de rojo, salvo el epitelio celular del amnios humano radioesterilizado).

El test de viabilidad no es un indicador correlacionado de forma directa a otras interacciones celulares. La prueba de viabilidad utilizada en los constructos sólo asegura el que las células sembradas no sufran efectos citotóxicos referentes a propiedades físicas (integridad de la membrana) y bioquímicas de las células (actividad ubicua de la esterasa intracelular); más directamente no es un indicador de que el amnios como constructo, favorezca o no la proliferación celular, y por ende la producción de factores de crecimiento (110–112). El uso de esta herramienta proporciona un resultado indirecto de la adhesión celular.

4.3. Elaboración del prototipo de sustituto biológico dermo-epidérmico a base de constructos de RHA.

Se utilizaron los constructos de queratinocitos y fibroblastos para la elaboración del sustituto biológico dermo-epidérmico (B-DSS) (figura 8). Se colocó el sustituto de fibroblastos sobre el de queratinocitos (figura 8A) para que al invertir el sustituto, el reemplazo dérmico quedase más cerca del exterior. Siendo la membrana amniótica radioesterilizada un material bastante frágil, se tuvo especial cuidado para hacer coincidir los bordes de los constructos en el ensamble (figura 8B).

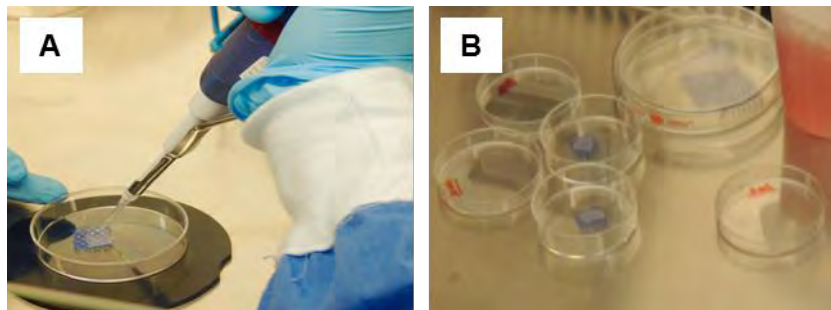


Figura 8 | Elaboración del prototipo de sustituto biológico dermo-epidérmico. (A) Manipulación de los constructos y **(B)** constructos antes del ensamble del sustituto biológico dermo-epidérmico.

4.4. Determinación de EGF, TGF- α y FGF por ELISA.

En los cultivos, constructos y B-DSS elaborados, hubo secreción de EGF, TGF- α y FGF, factores de crecimiento secretados por queratinocitos y fibroblastos, que promueven la migración celular en el lecho de la herida. Se exhiben los resultados obtenidos durante la estandarización del método de ELISA, evidenciando la secreción de EGF, TGF- α y FGF (figura 9).

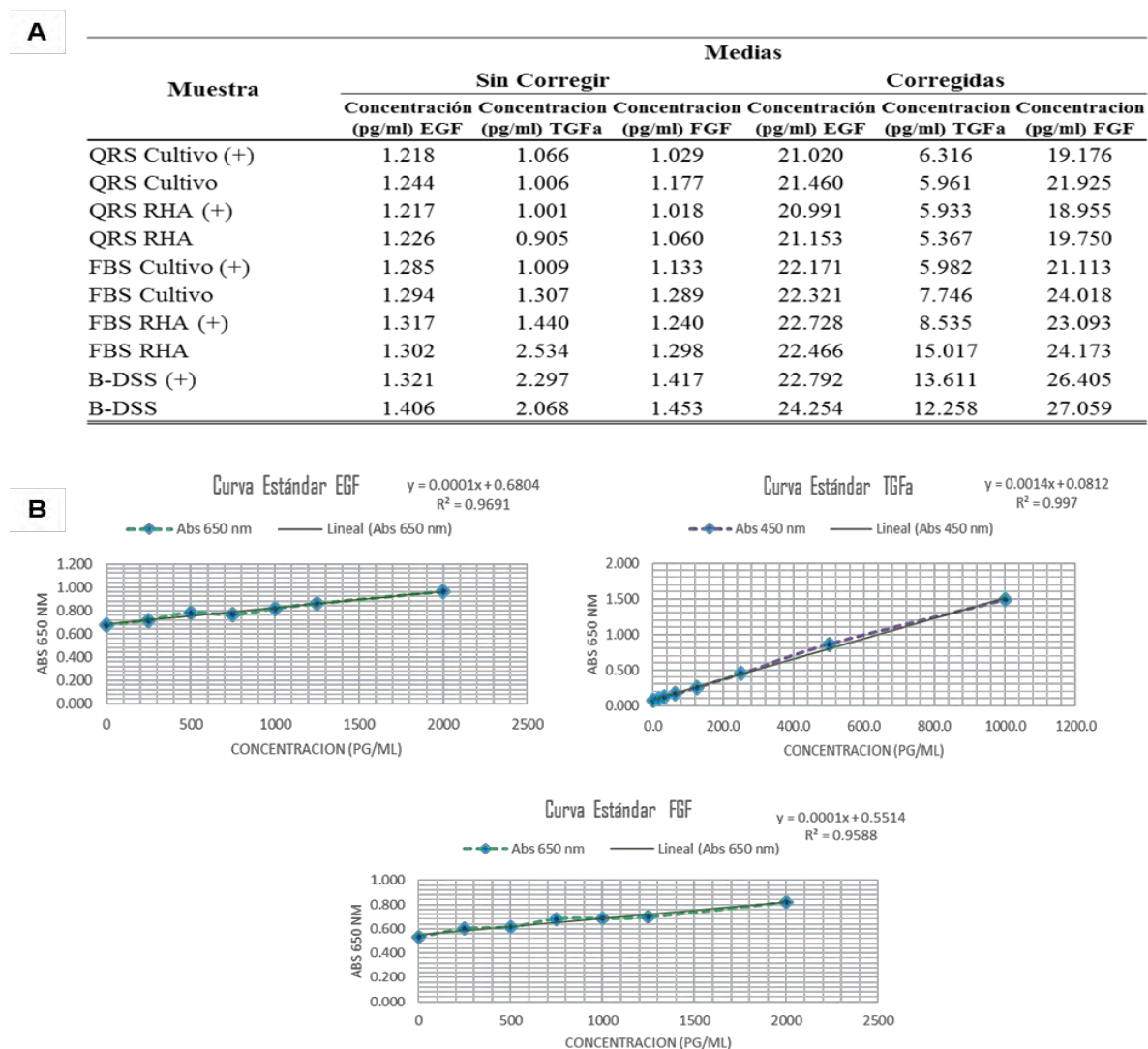


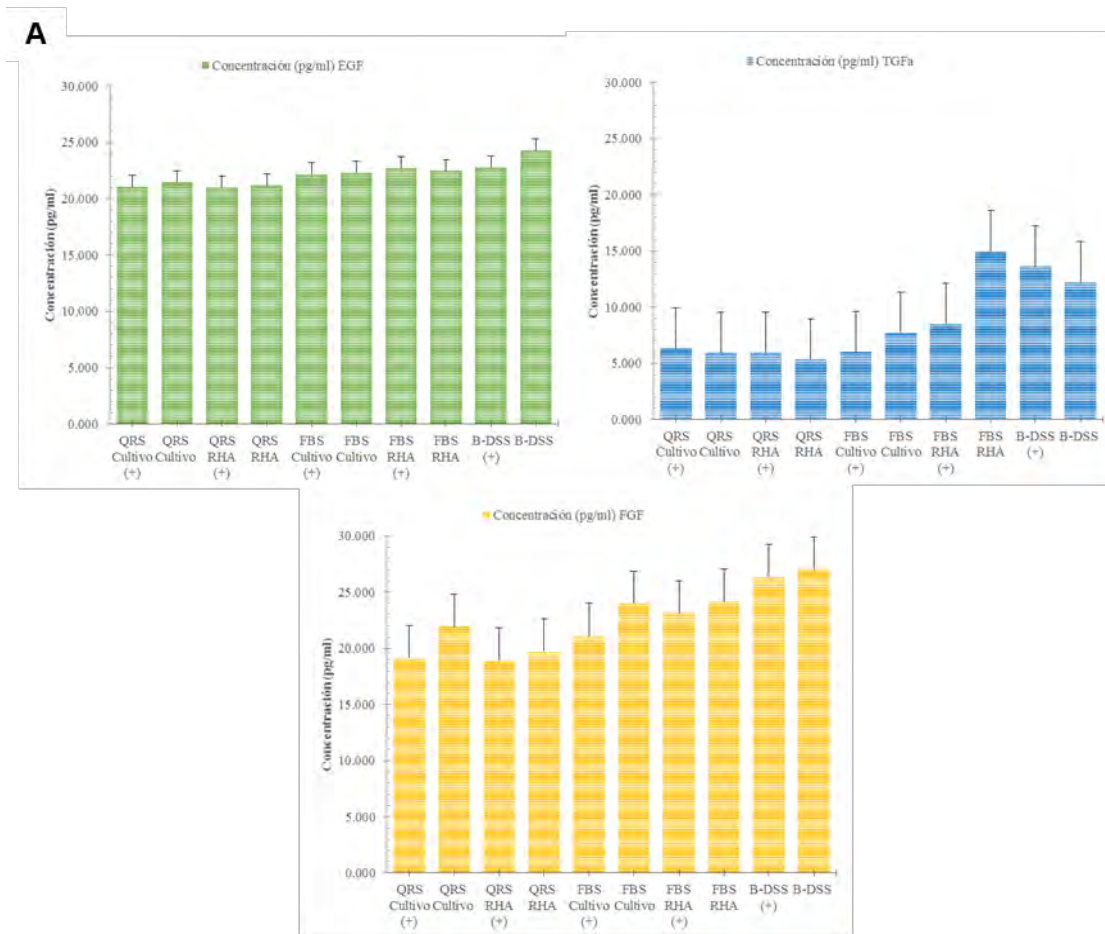
Figura 9 | Resultados de las ELISAS de EGF, TGF- α y FGF. (A) Medias de las concentraciones de las variables experimentales, incluyendo los controles (+). Valores sin corregir: datos directos de la lectura; valores corregidos: valores con la resta de la densidad óptica estándar media de los valores cero de la curva (O.D.); se muestra una diferencia notoria al corregir los valores; (B) Curvas estándar de los ensayos realizados. Al realizar la regresión lineal, los tres ensayos presentaron una r^2 mayor a de 0.95.

En la figura 9 se aprecia una diferencia al normalizar los datos y restar la densidad óptica estándar media de los valores cero (O.D.), por lo que al corregir los datos, éstos exhiben valores de entre 5 y 30 pg/ml (figura 9A). Por otra parte, como se obtuvo una r^2 mayor a 0.95 (muy cercana a 1) al realizar la regresión lineal de las curvas estándar de la absorbancia de los tres factores de interés, se descarta un error de técnica en el ensayo (figura 9B).

Los datos obtenidos fueron graficados, por factor, observándose diferencias en cuanto a la concentración de los factores (figura 10). En la figura 10A se percibe que los resultados obtenidos en los grupos control no distan mucho de los datos de las cinco variables principales, al tener de diferencia valores no mayores a 1 pg/ml. Esto podría denotar la elección de un erróneo control positivo, ya que el medio de cultivo por sí mismo podría estar arrojando valores de un falso positivo. Esto prácticamente no debería suceder, porque el medio utilizado es un producto elaborado con procedimientos industriales estandarizados, y la etiqueta de sus componentes no describe la presencia de alguno de los factores de interés. Para descartar esta hipótesis se debería redefinir el control, tomando de referencia el medio DMEM-F12 como control negativo.

De acuerdo a las gráficas (figura 10A) y cifras resultantes (figura 10B) se pueden establecer relaciones entre las concentraciones de EGF, TGF- α y FGF en el cultivo *in vitro* de queratinocitos, cultivo *in vitro* de fibroblastos, constructo de RHA con queratinocitos, constructo de RHA con fibroblastos y el sustituto biológico dermo-epidérmico (B-DSS):

1. La secreción de FGF en sobrenadantes de medio de cultivo del B-DSS, es el valor obtenido más alto (27.059 pg/ml). Al formar el B-DSS hubo una mayor concentración de EGF (24.254 pg/ml) y FGF (27.059 pg/ml). La concentración de TGF- α fue menor (12.258 pg/ml).



B

Muestra	Concentración (pg/ml) EGF	Concentración (pg/ml) TGF α	Concentración (pg/ml) FGF
QRS Cultivo	21.460	5.961	21.925
QRS RHA	21.153	5.367	19.750
FBS Cultivo	22.321	7.746	24.018
FBS RHA	22.466	15.017	24.173
B-DSS	24.254	12.258	27.059
Varianza	1.465	17.616	7.466
Desviacion estandar	1.210	4.197	2.732

Figura 10 | Análisis de datos de las ELISAS de EGF, TGF- α y FGF. (A) Graficas de las concentraciones de las variables (incluyendo grupos control) por factor de interés: EGF, TGF- α y FGF, respectivamente. EGF y FGF presentan concentraciones más altas que TGF- α ; (B) Tabulación de las concentraciones de las cinco variables principales: cultivo *in vitro* de queratinocitos, constructo de queratinocitos sobre RHA, cultivo *in vitro* de fibroblastos, constructo de fibroblastos sobre RHA y B-DSS-sustituto biológico dermo-epidérmico. Se exhiben valores de varianza más altos en FGF y TGF- α al relacionar sus variables entre sí.

2. TGF- α fue el factor con menor concentración en las variables, al presentar valores en un rango de 5 a 13 pg/ml; mientras que los demás factores obtuvieron valores de 16 a 27 pg/ml.
3. La secreción de EGF fue menos variable entre los constructos de queratinocitos, fibroblastos y B-DSS al mostrar una varianza de 1.465. EGF exhibe un mínimo aumento de concentración al comparar los cultivos y andamios de fibroblastos (de 22.321 pg/ml a 22.466 pg/ml) con los cultivos y andamios de queratinocitos (de 21.460 pg/ml a 21.153 pg/ml).
4. El implemento de RHA como andamio modificó las concentraciones del constructo respecto al cultivo *in vitro*: en queratinocitos disminuyó la concentración de FGF (de 21.925 pg/ml a 19.750 pg/ml) y en fibroblastos se favoreció a TGF- α (de 7.746 pg/ml a 15.017 pg/ml). Sin embargo, FGF se potencializa si se forma el B-DSS (de 24 pg/ml a 27.059 pg/ml).
5. Las variables con fibroblastos (cultivo *in vitro* y constructo) fueron las que mayores concentraciones presentaron (hasta 22.466 pg/ml de EGF, 15.017 pg/ml de TGF- α y 24.173 pg/ml de FGF). Esto podría ser el resultado de tener menor cantidad celular de queratinocitos viables en los andamios.

Hay dos hechos fundamentales a destacar en los resultados, que marcan un sesgo importante en los resultados obtenidos por la prueba de ELISA: (1) el que el número celular del que se mide la secreción de los factores, no es el mismo en los dos constructos que forman el sustituto biológico (las variables con fibroblastos tienen más células que las variables con queratinocitos) y, (2) la posible existencia de un control falso positivo en la comparación de la secreción de EGF, TGF- α y FGF.

Ahora, refiriendo al análisis estadístico, para dar validez a los supuestos de las interacciones de factores señalados en los apartados anteriores (cuyo objetivo no es el de este trabajo), se necesita una n mayor para realizar dicho análisis (al menos 30 datos por población). Puesto que los datos presentados tienen varianzas muy distintas (ver figura 10B) y están basados en lecturas colorimétricas (que la mayoría de ocasiones no tienden a una distribución normal); se sugiere la prueba no paramétrica de ANOVA Kruskal-Wallis (juzga si el comportamiento de alguno de los factores estudiados (mediana) difiere drásticamente de los demás). Aunque una comparación por grupos pareados independientes, utilizando la prueba U de Mann-Whitney, sería una buena opción para el conocimiento más detallado de las interacciones.

4.5. Caracterización de proteínas en RHA.

Se realizó la estandarización de la técnica de Western Blot para proteínas mayores a 300 kDa al caracterizar la matriz del prototipo de sustituto biológico en cuestión: el amnios humano radioesterilizado. Éste fue procesado por el BTR-ININ y empaquetado de forma estéril sobre una ligera red de nailon (figura 11).



Figura 11 | Manipulación de RHA. Habiendo proporcionado el BTR el tejido, éste fue tratado con sumo cuidado debido a su fragilidad. En todos los experimentos se usó el amnios solo, sin la malla de nailon que trae el producto para su manipulación al irradiarse.

Para la caracterización del material, se tuvo como control una membrana amniótica fresca donada (figura 12). El amnios fresco fue procurado y procesado en el laboratorio, extrayendo la membrana de la placenta (figura 12A) y separándola del corion (figura 12B).

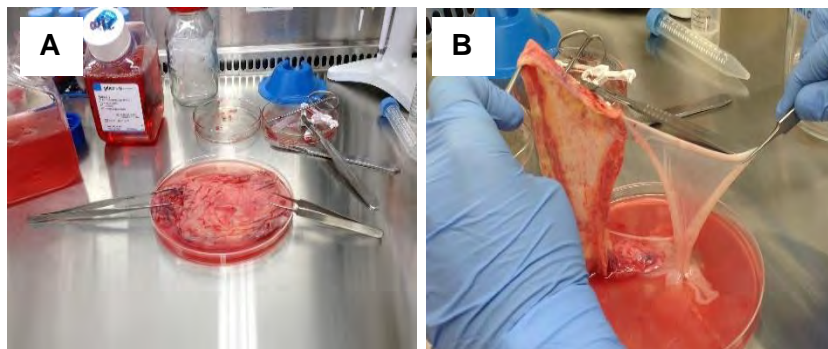


Figura 12 | Amnios Humano fresco. Separando la membrana de la placenta. (A) Placenta y (B) separación del corion. La membrana amniótica humana (de estructura frágil y apariencia translúcida) se encuentra plegada al corion, con el que en conjunto, forma parte de la placenta. Se cortó la placenta de forma transversal para extraer el corion y por separado, desplegar la membrana de interés.

Después de la obtención de las muestras se procedió al lisado, extracción de proteínas y desnaturalización del tejido; para en secuencia, realizar la electrotransferencia (figura 13). En la electroforesis (figura 13A) para separar las proteínas por su peso molecular, se obtuvo que el porcentaje adecuado para que el gel de corrida permitiera el descenso de las proteínas a través del poro, es de 4%. En cuanto a la transferencia, ésta fue realizada en húmedo a baja temperatura. A través de las repeticiones se logró optimizar el tiempo de transferencia a una hora y media. La transferencia de proteínas se verificó mediante la adición de la solución rojo Ponceau, viéndose la presencia de proteínas en ambas variables: membrana amniótica fresca y membrana amniótica radioesterilizada (figura 13B). Si bien estas proteínas pueden no ser las de interés (laminina 1, laminina 5 y colágena 4), exponen la existencia de cualquier tipo proteico en las muestras.

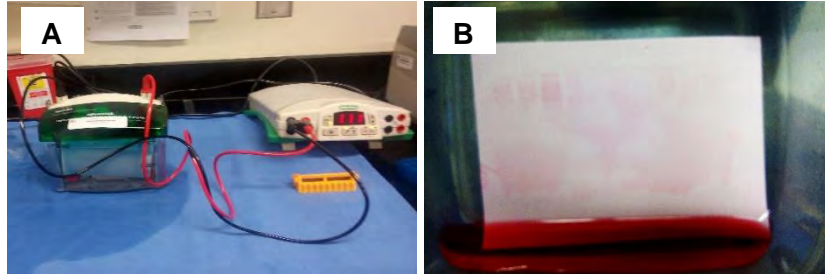


Figura 13 | Electroforesis y transferencia de Western Blot. (A) SDS-PAGE durante 90 minutos a 120 V y (B) transferencia a membrana de nitrocelulosa durante 2 horas. En la transferencia se visualizan proteínas en los carriles de la membrana control, como en el amnios irradiado.

Posterior a la transferencia se llevó a cabo el inmunoblot. Por último se procedió con el revelado de la placa fotográfica para la visualización del bandeo (figura 14).

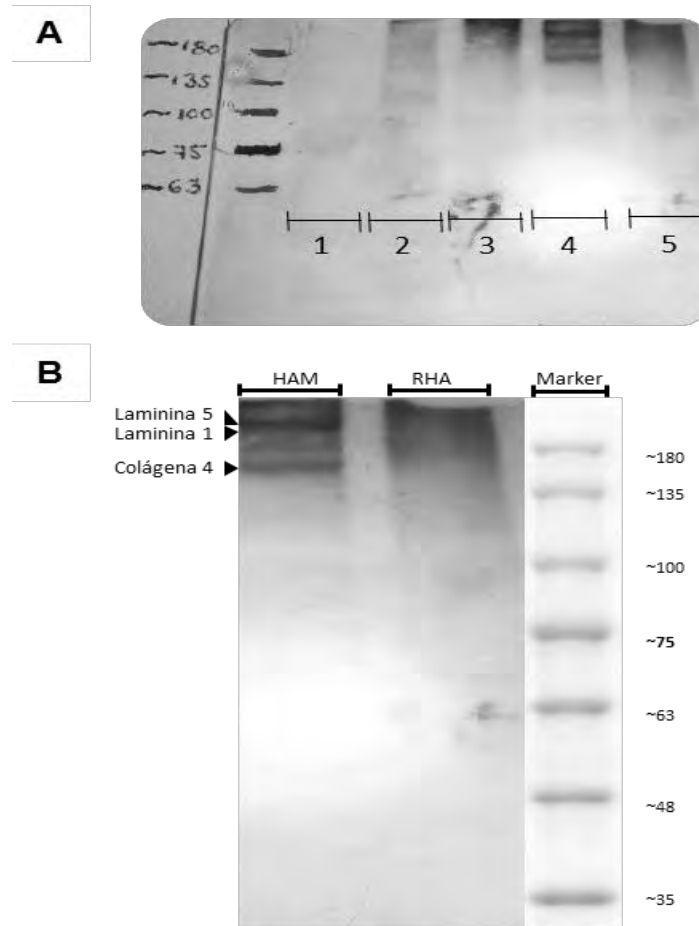


Figura 14 | Caracterización de lamininas y colágenas en RHA. (A) Placa fotográfica [1-marcador, 2-3-5 RHA y 4-HAM] y (B) presentación del bandeo. De izquierda a derecha se muestra el bandeo control de HAM (laminina 1 [>200 kDa], laminina 5 [>250 kDa] y colágena 4 [>150 kDa]) y la ausencia de bandeo en RHA; comparándolos con el patrón de bandeo exhibido en la hoja técnica del marcador molecular utilizado. Mediante la técnica de Western Blot se denota la ausencia de proteína de lámina basal después de la radiación con rayos gamma de HAM.

En la figura 14 se aprecian los resultados de la prueba de western blot. La placa fotográfica revelada y fijada (figura 14A) muestra cinco carriles: el del marcador de peso molecular (1) (muy borroso y difícil de ver), el de la membrana amniótica fresca como control (4) y tres carriles más con el amnios humano radioesterilizado (2,3 y 5); dejando ver la ausencia de proteínas como laminina 1, laminina 5 y colágena 4 en RHA. La figura 14B es la presentación de la prueba, donde a diferencia del control (membrana amniótica sin irradiar), no se observa ningún patrón de bandeo en el amnios humano radioesterilizado. Aquí es importante detallar que el carril control exhibe tres bandeos, puesto que al incubarse en anticuerpo primario de captura, toda la membrana se incubó en una solución con anti-laminina 1, anti-laminina 5 y anti-colágena 4. Por tal motivo, se podría generar interrogación en cuanto a tener un control más fidedigno (como lo es el tener una proteína control por carril), ya que referir la caracterización por el peso molecular del control, no es lo ideal. Pese a ello, es irrefutable que la membrana amniótica irradiada, no contiene proteínas de la lámina basal. Esto denota que la radiación gamma de forma intensa (25 kGy) afecta la integridad de la HAM, degradando las proteínas como laminina 1, laminina 5 y colágena 4 que favorecen la adhesión celular.

5. Discusión y conclusiones

5.1. Discusión.

El que EGF, TGF- α y FGF hubiesen estado presentes en los sobrenadantes del prototipo de B-DSS, puede sugerir que este sustituto biológico ayude a mejorar el cierre de la herida, ya que estaría secretando factores que favorecen la cicatrización de la misma. La presencia *in vivo* de los factores antes señalados, descrita por grupos de trabajo como el de Schultz *et al.* (19), respaldan que el sustituto biológico compuesto pueda ser un buen sustituto de piel,

útil en el tratamiento de pacientes quemados. Esto, incrementa sus ventajas en comparación con el uso de andamios con un solo tipo celular (2), ya que este prototipo tiene los dos principales tipos celulares de la piel. El uso de células donadas (heterólogas) también confiere la ventaja de poder tener células en expansión para sembrar el RHA. La esterilización por irradiación gamma de cobalto 60 confiere al material seguridad para su uso clínico ya que asegura estar libre de patógenos tales como: bacterias y virus, como refiere el grupo de trabajo de Martínez *et. al* (113).

La interacción células, matriz y factores de crecimiento en el sustituto biológico dermo-epidèrmico podría estar regulada por distintos eventos. Por ejemplo, los fibroblastos son principales excretores de FGF, y los queratinocitos lo son de TGF- α y EGF. También existe una homología entre TGF- α y EGF, puesto que utilizan el mismo receptor expresado por ambos tipos celulares (9,20) y están relacionados en polimorfismos del gen de EGFR (114). Adicionalmente, EGF y FGF participan en la señalización paracrina donde los queratinocitos promueven la secreción de factores de crecimiento en los fibroblastos, que por sí mismos estimulan la proliferación de queratinocitos, regulándose su proliferación en cocultivos de ambos tipos celulares (7). De ahí que la secreción de estos tres factores sea dependiente.

La regulación entre células y factores de crecimiento, tiene una repercusión directa en la producción de componentes de la matriz extracelular, según refieren Schultz y Wysocki (92) señalando la existencia de interacciones dinámicas y bidireccionales en las que los factores de crecimiento regulan la ECM aumentando la producción de sus componentes, y a su vez, la de los factores de crecimiento. Esto conlleva a plantear que los componentes proteicos del amnios repercuten en la adhesión y proliferación de los tipos celulares cutáneos, lo cual explica el que la adhesión de los queratinocitos no haya sido eficaz al andamio (al requerir

componentes de matriz extracelular para la adhesión de éstos a una superficie), a diferencia de los fibroblastos (que sólo necesitan un soporte). Por otra parte, recordando los trabajos en los que el amnios humano ha sido evaluado como matriz extracelular, se tiene en el que al ser comparado una matriz de placenta (90), la membrana amniótica humana descelularizada y deshidratada resultó mejor promotora de adhesión y proliferación celular, además de liberar moléculas que favorecen la supervivencia y migración celular. En tanto que al comparar las propiedades biológicas y ultraestructurales de amnios humano convencional criopreservado con una membrana amniótica irradiada, descelularizada y liofilizada (91), éste resultó un material de matriz extracelular apto para el soporte de fibroblastos dérmicos y la secreción de citocinas en la cicatrización de heridas. De tal forma que la ausencia de lamininas y colágenas por un intenso proceso de irradiación, es una razón por la que el amnios irradiado (pese a sus ventajas en clínicas) no es la mejor matriz a utilizar.

La radioesterilización tiene un efecto en la presencia de Laminina 1, Lamina 5 y Colágena 4. El control presentado, aunque no pueda concluir de manera precisa la presencia de las proteínas en cuestión, es muy parecido en cuanto a cantidad, a los resultados obtenidos por el grupo de Lim *et. al.* (89); el cual reporta una mínima presencia de fibronectina, colágena 4 y 6, además de laminina 5 en un amnios común. La ausencia de las proteínas de interés analizadas (que favorecen la adhesión celular) en la caracterización por western blot de amnios irradiado, se suma a estudios previos. Dichos estudios informaron mediante otras técnicas (microscopía electrónica y western blot, respectivamente) que la irradiación induce daño estructural (102), pérdida de colágena IV y VII, laminina, fibronectina, y la baja de factores de crecimiento (89); además de indicar que cuanto mayor es la dosis de irradiación (25-30 kGy), más grave es el daño (102). En contraste, en otros trabajos anteriormente

publicados se demostró (usando la exploración espectral de infrarrojos), que no hay degradación o cambios en la calidad y las características en sus biomoléculas cuando se utiliza el proceso de irradiación como conservación (104). Lo anterior indica que depende mucho la técnica utilizada para caracterizar, así como la finalidad de la caracterización, para decidir si el material presenta cambios en su estructura. Mediante la técnica de western blot es claro un cambio de composición a causa de la radiación, aunque convendría analizar otras proteínas características del amnios y componentes de la ECM. A pesar de todo, diversos trabajos reflejan que RHA tiene una aplicación clínica exitosa con reepitelización rápida (89).

En general, el trabajar con amnios es bastante variable, tiene un sesgo difícil de eliminar. Lo anterior se atribuye, a que como dicen E. Costa y J.N. Murta (de acuerdo a sus aplicaciones clínicas compiladas (33)), cada membrana amniótica es única y su composición puede variar durante el tiempo de almacenamiento y procesamiento. La heterogeneidad biológica de cada amnios introduce un sesgo importante en su caracterización y uso como constructo. Por ello, se debe tener una preservación óptima y cuidadosa, además de una manipulación minuciosa por su frágil estructura como RHA. En tanto, el desarrollo de un producto estandarizado, podría optimizar los resultados haciéndolos más predecibles.

5.1. Conclusiones.

Se logró el aislamiento de queratinocitos y fibroblastos de remanentes de cirugías de reducción de abdomen, con los cuales se pudieron desarrollar constructos viables a base de RHA y se logró el prototipo de B-DSS. Éste tuvo una mayor secreción de FGF, probablemente porque el sustituto se formó a base de constructos con células mayoritariamente fibroblásticas. Existe una secreción de EGF, TGF- α y FGF en los constructos a base de amnios humano radioesterilizado.

Se lograron obtener resultados preliminares (con la estandarización de la técnica de western blot) de que hay una tendencia a que el RHA al ser irradiado de forma intensa con cobalto 60 a 25 kGy, carece de proteínas de lámina basal que favorecen la adhesión celular (como laminina 1, laminina 5 y colágena 4). El RHA tiene un efecto directo en los factores liberados y por ende, en las células del sustituto biológico.

Perspectivas a futuro.

Como perspectivas en el análisis de la secreción de factores, para dar un respaldo a los resultados obtenidos por ELISA, sería benéfico el planteamiento de un nuevo control negativo. Una cuantificación mediante la técnica de PCR en tiempo real, aplicada a las células viables de los andamios, ayudaría a establecer una relación entre el número de células que secretan los factores de interés, y sus concentraciones en los sobrenadantes. Con ello, se podría establecer una mejor interacción de secreción de los factores de crecimiento mediante un estudio prospectivo *in vitro* que analice el comportamiento de los factores de interés en RHA.

En cuanto a la caracterización del RHA se deben evaluar con otros controles positivos. También se complementarían los resultados con inmunohistoquímicas o caracterización con otras proteínas de la ECM.

Al obtener resultados favorables en los aspectos anteriores, se podría pensar en una aplicación del prototipo de sustituto biológico dermo-epidérmico (B-DSS) en heridas *in vitro* para verificar la eficiencia del producto. Partiendo de ahí, se puede implementar en el ámbito clínico. Se debe mejorar la técnica de siembra en los andamios para obtener una densidad celular favorable en los constructos.

Referencias bibliográficas

1. Palao Doménech R. Quemados. Valoración y criterios de actuación. Marge books; 2010. 48 p.
2. Kamel RA, Ong JF, Eriksson E, Junker JPE, Caterson EJ. Tissue Engineering of Skin. *J Am Coll Surg*. Alan R. Liss, Inc., New York; 2013 Sep;217(3):533–55.
3. Fitzpatrick TB. Dermatología en medicina general, Vol.1. Editorial Médica Panamericana; 2009. 1200 p.
4. Poirier J. Histología. Elsevier, editor. España: Masson; 2002. 216 p.
5. Fuchs E, Green H, Inoue N, Cram DL, Epstein WL, Paterson B, et al. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*. Academic Press, New York; 1980 Apr;19(4):1033–42.
6. Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblasts—A Diverse Population at the Center of It All. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2009. p. 161–214.
7. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing. *J Invest Dermatol*. 2007 May;127(5):998–1008.
8. El Ghalbzouri A, Hensbergen P, Gibbs S, Kempenaar J, Schors R van der, Ponc M. Fibroblasts facilitate re-epithelialization in wounded human skin equivalents. *Lab Invest*. Nature Publishing Group; 2004 Jan 20;84(1):102–12.
9. Imae T. *Skin Bioscience: A Molecular Approach*. 1st Editio. Imae T, editor. Pan Stanford Publishing; 2014. 240 p.
10. Seifert AW, Monaghan JR, Voss SR, Maden M, Antonellis K. Skin Regeneration in Adult Axolotls: A Blueprint for Scar-Free Healing in Vertebrates. Zhou Z, editor. *PLoS One*. Identification of differentially expressed thyroid hormone responsive genes from the brain of the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*; 2012 Apr 2;7(4):e32875.
11. Clark RAF. Wound Repair. In: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Boston, MA: Springer US; 1988. p. 3–50.
12. Miguel-Jaimes KD, Foncerrada-Ortega G, Sánchez-Flores AY. Epidemiología de las quemaduras en México. *Rev Espec Médico-Quirúrgicas*. 2015;20:78–82.
13. Lorenzo F. *Cuidados Enfermeros en la Unidad de Quemados*. Vértice SL. 2009;
14. ARGM S. CENIAQ una institución altamente especializada. *Boletín Informativo CCINSHAE CALAMÉO* [Internet]. México, CDMX.; 2011;41. Available from: <http://es.calameo.com/read/000289769c9dd2ad16bf8>
15. WHO. WHO | Burns [Internet]. WHO. World Health Organization; 2016 [cited 2017 Apr 7]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/en/>

16. Moctezuma-Paz LE, Páez-Franco I, Jiménez-González S, Dida Miguel-Jaimes, Katia Foncerrada-Ortega G. Epidemiología de las quemaduras en México. *Rev Espec Médico Quirúrgicas*. 2015;20:78–82.
17. Seifert AW, Maden M. New Insights into Vertebrate Skin Regeneration. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2014. p. 129–69.
18. Martin P. Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science (80-)*. 1997;276(5309).
19. Schultz G, Clark W, Rotatori DS. EGF and TGF- α in wound healing and repair. *J Cell Biochem*. 1991 Apr;45(4):346–52.
20. Werner S, Grose R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol Rev*. 2003;83(3).
21. Ferguson MWJ, O’Kane S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. The Royal Society*; 2004 May 29;359(1445):839–50.
22. Leung A, Crombleholme TM, Keswani SG. Fetal wound healing. *Curr Opin Pediatr*. 2012 Jun;24(3):371–8.
23. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen. Blackwell Publishing Inc*; 2008 Sep;16(5):585–601.
24. Fernández V, Mañez V. La cicatrización de las heridas. *Enfermería Dermatológica* [Internet]. 2008;8. Available from: <https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwio05Hk2bHTAhVS9WMKHAcNBJSQFggIMAA&url=https%3A%2F%2Fdiagonalnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F4606613.pdf&usg=AFQjCNGieXnyIUOdZtziA2tmUH2lWLTZLw&sig2=t8cvXV3Vet7Q-7ZyzPjh1w&ca>
25. Woodley DT. Reepithelialization. In: Clark RAF, Henson PM, editors. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. 2 ed. Boston, MA: Springer US; 1988. p. 339–354.
26. Kim I, Mogford JE, Chao JD, Mustoe TA. Wound epithelialization deficits in the transforming growth factor-alpha knockout mouse. *Wound Repair Regen*. 2001;9(5):386–90.
27. Horch R, Kopp J, Kneser U, Beier J. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J Cell Mol Med*. 2005;9(3):592–608.
28. Boyce ST, Gibbons D., Fukushi S, Ohshima H, Tanabe M, Ishida H, et al. Design principles for composition and performance of cultured skin substitutes. *Burns. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL*; 2001 Aug;27(5):523–33.
29. Boyce ST. Cultured Skin Substitutes: A Review. *Tissue Eng. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA*; 1996 Dec;2(4):255–66.
30. Puerta DV, Molina CP. Soluciones terapéuticas para la reconstrucción de la dermis y

- la epidermis. Oportunidades en el medio antioqueño. Rev Ing. 2008;
31. Liu J, Karasek M. Isolation and growth of adult human epidermal keratinocytes in cell culture. *J Invest Dermatol.* 1978;
 32. Halim AS, Khoo TL, Mohd Yusof SJ. Biologic and synthetic skin substitutes: An overview. *Indian J Plast Surg. Medknow Publications and Media Pvt. Ltd.;* 2010 Sep;43(Suppl):S23-8.
 33. Mamede A, Botelho M. Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications. 1st Editio. Mamede A, Botelho M, editors. Springer; 2015. 254 p.
 34. Cabero Roura L, Saldivar Rodríguez D, Cabrillo Rodríguez E. Obstetricia y medicina materno-filial. Editorial Médica Panamericana; 2007. 1400 p.
 35. Cunningham F, Leveno K, Bloom S, Spong C. Obstetricia de Williams. McGraw-Hill / Interamericana de México, S.A.; 2016. 1404 p.
 36. Fleischer M, Jeanty R. Ecografía en Obstetricia y Ginecología. Editorial Marbán; 2002. 1046 p.
 37. Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Hyaluronic acid-CD44 interaction mediates the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma. *Cornea.* 2005 Mar;24(2):206–12.
 38. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea.* 2000 May;19(3):348–52.
 39. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, G Tseng SC. Suppression of interleukin 1 and interleukin 1 in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(4):444–9.
 40. Kim JS, Kim JC, Na BK, Jeong JM, Song CY. Amniotic Membrane Patching Promotes Healing and Inhibits Proteinase Activity on Wound Healing Following Acute Corneal Alkali Burn. *Exp Eye Res.* 2000;70(3):329–37.
 41. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave J-M, Bocking AD, Challis JRG. Expression of Natural Antimicrobials by Human Placenta and Fetal Membranes. *Placenta.* 2007 Feb;28(2–3):161–9.
 42. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet.* 1981 Nov 7;2(8254):1003–5.
 43. Cornwell KG, Landsman A, James KS. Extracellular Matrix Biomaterials for Soft Tissue Repair. *Clin Podiatr Med Surg.* 2009 Oct;26(4):507–23.
 44. Tseng SCG, Li D-Q, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol.* 1999 Jun;179(3):325–35.

45. Li D, Lee S, Tseng S. Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res.* 2000;20(4):325–34.
46. Ganatra MA. Amniotic Membrane in Surgery. *J Pak Med Assoc.* 2003;53(1):29–32.
47. Mermet I, Pottier N, Sainthillier JM, Malugani C, Cairey-Remonnay S, Maddens S, et al. Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 2007 Jul;15(4):459–64.
48. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater.* 2008 Apr 29;15:88–99.
49. Bryant-Greenwood GD. The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta.* 1998 Jan;19(1):1–11.
50. Sadler T, Langman J. *Embriología médica: con orientación clínica.* Editorial Médica Panamericana; 2007. 386 p.
51. Heras J Las, Dabancens A, Serón Ferré M. Placenta y anexos embrionarios. In: Pérez-Sánchez A, Donoso Siña E, editors. *Obstetricia.* 3er Ed. Madrid, España: Marbán Libros; 1999. p. 118–36.
52. Fetterolf DE, Snyder RJ. Scientific and clinical support for the use of dehydrated amniotic membrane in wound management. *Wounds a Compend Clin Res Pract.* 2012 Oct;24(10):299–307.
53. Szpak P. Fish bone chemistry and ultrastructure: implications for taphonomy and stable isotope analysis. *J Archaeol Sci.* 2011;38(12):3358–72.
54. Lodish H, Berk FA, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular cell biology.* 4th editio. New York: W.H. Freeman; 2000. 36 p.
55. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K. *Molecular Biology of the Cell.* 4th Editio. London: Garland Science; 2002. 1616 p.
56. Prévost TP. Biomechanics of the human chorioamnion [Internet]. Massachusetts Institute of Technology; 2006. Available from: <https://dspace.mit.edu/handle/1721.1/36217>
57. Kühn K. Basement membrane (type IV) collagen. *Matrix Biol.* 1995 Feb;14(6):439–45.
58. Yamada KM. Fibronectin and Other Cell Interactive Glycoproteins. In: *Cell Biology of Extracellular Matrix.* Boston, MA: Springer US; 1991. p. 111–46.
59. Champlaud MF, Lunstrum GP, Rousselle P, Nishiyama T, Keene DR, Burgeson RE. Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *J Cell Biol.* 1996 Mar;132(6):1189–98.
60. Ekblom P, Lonai P, Talts JF. Expression and biological role of laminin-1. *Matrix*

- Biol. 2003 Mar;22(1):35–47.
61. O’Toole EA, Marinkovich MP, Hoeffler WK, Furthmayr H, Woodley DT. Laminin-5 Inhibits Human Keratinocyte Migration. *Exp Cell Res.* 1997 Jun 15;233(2):330–9.
 62. Nguyen BP, Ryan MC, Gil SG, Carter WG. Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 Oct;12(5):554–62.
 63. Meinert M, Eriksen G, Petersen A, Helmig R. Proteoglycans and hyaluronan in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;
 64. Iozzo R V, Murdoch AD. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J. Federation of American Societies for Experimental Biology;* 1996 Apr;10(5):598–614.
 65. Hieber AD, Corcino D, Motosue J, Sandberg LB, Roos PJ, Yu SY, et al. Detection of elastin in the human fetal membranes: proposed molecular basis for elasticity. *Placenta.* 1997 May;18(4):301–12.
 66. Malak TM, Bell SC. Distribution of fibrillin-containing microfibrils and elastin in human fetal membranes: a novel molecular basis for membrane elasticity. *Am J Obstet Gynecol.* 1994 Jul;171(1):195–205.
 67. Feinberg RF, Kliman HJ, Lockwood CJ. Is oncofetal fibronectin a trophoblast glue for human implantation? *Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology;* 1991 Mar;138(3):537–43.
 68. Aota S, Nagai T, Olden K, Akiyama SK, Yamada KM. Fibronectin and integrins in cell adhesion and migration. *Biochem Soc Trans.* 1991;19(4).
 69. Rao T V, Chandrasekharam V. Use of dry human and bovine amnion as a biological dressing. *Arch Surg.* 1981 Jul;116(7):891–6.
 70. Colocho G, Graham WP, Greene AE, Matheson DW, Lynch D. Human amniotic membrane as a physiologic wound dressing. *Arch Surg.* 1974 Sep;109(3):370–3.
 71. Burgos H, Sergeant RJ. Lyophilized human amniotic membranes used in reconstruction of the ear. *J R Soc Med. Royal Society of Medicine Press;* 1983 May;76(5):433.
 72. Ravishanker R, Bath AS, Roy R. “Amnion Bank”—the use of long term glycerol preserved amniotic membranes in the management of superficial and superficial partial thickness burns. *Burns.* 2003 Jun;29(4):369–74.
 73. Adly OA, Moghazy AM, Abbas AH, Ellabban AM, Ali OS, Mohamed BA. Assessment of amniotic and polyurethane membrane dressings in the treatment of burns. *Burns.* 2010 Aug;36(5):703–10.
 74. Maria OI, Dania Y. Apósitos de membrana amniótica radio esterilizadas: una alternativa factible para el Sistema de Salud Cubano. In: *Convención Salud 2015 [Internet].* 2015. p. 7. Available from:

<http://www.convencionsalud2015.sld.cu/index.php/convencionsalud/2015/paper/viewPaper/1534>

75. Correa C, Calcáneo C. Cobertura temporal con membrana amniótica radioesterilizada. *Cirugía Plástica*. 2006;
76. BTR. Amnios. Banco de Tejidos Radioesterilizados [Internet]. BTR. 2017 [cited 2017 May 11]. Available from: http://inin.gob.mx/mini_sitios/tercer_plano.cfm?cve_area=BTR&codigo_opc=300002003
77. Dua HS, Gomes JAP, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. 2004;49(1):51–77.
78. Amer MI, Abd-El-Maeboud KH. Amnion graft following hysteroscopic lysis of intrauterine adhesions. *J Obstet Gynaecol Res*. 2006 Dec;32(6):559–66.
79. Jin CZ, Park SR, Choi BH, Lee K-Y, Kang CK, Min B-H. Human Amniotic Membrane as a Delivery Matrix for Articular Cartilage Repair. *Tissue Eng*. 2007 Apr;13(4):693–702.
80. Toda A, Okabe M, Yoshida T, Nikaido T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci*. 2007 Nov;105(3):215–28.
81. Chen Z, Tortella FC, Dave JR, Marshall VS, Clarke DL, Sing G, et al. Human Amnion-Derived Multipotent Progenitor Cell Treatment Alleviates Traumatic Brain Injury-Induced Axonal Degeneration. *J Neurotrauma*. 2009 Nov;26(11):1987–97.
82. Mohan R, Bajaj A, Gundappa M. Human Amnion Membrane: Potential Applications in Oral and Periodontal Field. *J Int Soc Prev Community Dent*. Medknow Publications; 2017;7(1):15–21.
83. Fernandes M, Sridhar MS, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Cornea*. 2005 Aug;24(6):643–53.
84. Yang L, Shirakata Y, Shudou M, Dai X, Tokumaru S, Hirakawa S, et al. New skin-equivalent model from de-epithelialized amnion membrane. *Cell Tissue Res*. 2006 Oct 7;326(1):69–77.
85. Zhang B, Liu X, Wang C, Li L, Ma L, Gao C. Chapter 52 – Bioengineering Skin Constructs. In: *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. 2015. p. 703–19.
86. Sharma SC, Bagree MM, Bhat AL, Banga BB, Singh MP. Amniotic membrane is an effective burn dressing material. *Jpn J Surg*. Springer-Verlag; 1985 Mar;15(2):140–3.
87. Bapat C V, Kothary PM. Preliminary report on acceleration of wound healing by amnion membrane graft. *Indian J Med Res*. 1974 Sep;62(9):1342–6.
88. Bose B. Burn wound dressing with human amniotic membrane. *Ann R Coll Surg Engl*. Royal College of Surgeons of England; 1979 Nov;61(6):444–7.

89. Lim LS, Poh RWY, Riau AK, Beuerman RW, Tan D, Mehta JS. Biological and Ultrastructural Properties of Acelagraft, a Freeze-Dried γ -Irradiated Human Amniotic Membrane. *Arch Ophthalmol*. 2010 Oct 11;128(10):1303.
90. Guo X, Kaplunovsky A, Zaka R, Wang C, Rana H, Turner J, et al. Modulation of Cell Attachment, Proliferation, and Angiogenesis by Decellularized, Dehydrated Human Amniotic Membrane in In Vitro Models. *Wounds a Compend Clin Res Pract*. 2017 Jan;29(1):28–38.
91. Bhatia M, Pereira M, Rana H, Stout B, Lewis C, Abramson S, et al. The Mechanism of Cell Interaction and Response on Decellularized Human Amniotic Membrane: Implications in Wound Healing. *Wounds a Compend Clin Res Pract*. 2007 Aug;19(8):207–17.
92. Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen*. Blackwell Publishing Inc; 2009 Mar;17(2):153–62.
93. Streuli C, Ekblom P (ed., Timpl R (ed). Basement membrane as a differentiation and survival factor. In: Ekblom P, Timpl R, editors. *The Laminins*. Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic Publishers; 1996. p. 217–233.
94. Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea*. 1999 Jan;18(1):73–9.
95. Fukushima Y, Ohnishi T, Arita N, Hayakawa T, Sekiguchi K. Integrin $\alpha 3\beta 1$ -mediated interaction with laminin-5 stimulates adhesion, migration and invasion of malignant glioma cells. *Int J Cancer*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 1998 Mar 30;76(1):63–72.
96. Akashi T, Miyagi T, Ando N, Suzuki Y, Nemoto T, Eishi Y, et al. Synthesis of basement membrane by gastrointestinal cancer cell lines. *J Pathol*. John Wiley & Sons, Ltd.; 1999 Jan;187(2):223–8.
97. Takashima S, Yasuo M, Sanzen N, Sekiguchi K, Okabe M, Yoshida T, et al. Characterization of laminin isoforms in human amnion. *Tissue Cell*. 2008 Apr;40(2):75–81.
98. Engvall E, Davis GE, Dickerson K, Ruoslahti E, Varon S, Manthorpe M. Mapping of domains in human laminin using monoclonal antibodies: localization of the neurite-promoting site. *J Cell Biol*. 1986 Dec;103(6 Pt 1):2457–65.
99. Rousselle P, Keene DR, Ruggiero F, Champlaud MF, Rest M, Burgeson RE. Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. *J Cell Biol*. The Rockefeller University Press; 1997 Aug 11;138(3):719–28.
100. Chrissouli S, Pratsinis H, Velissariou V, Anastasiou A, Kletsas D. Human amniotic fluid stimulates the proliferation of human fetal and adult skin fibroblasts: The roles of bFGF and PDGF and of the ERK and Akt signaling pathways. *Wound Repair*

- Regen. Blackwell Publishing Inc; 2010 Nov;18(6):643–54.
101. Akita S, Akino K, Yakabe A, Tanaka K, Anraku K, Yano H, et al. Basic fibroblast growth factor is beneficial for postoperative color uniformity in split-thickness skin grafting. *Wound Repair Regen. Blackwell Publishing Inc*; 2010 Nov;18(6):560–6.
 102. Paolin A, Trojan D, Leonardi A, Mellone S, Volpe A, Orlandi A, et al. Cytokine expression and ultrastructural alterations in fresh-frozen, freeze-dried and γ -irradiated human amniotic membranes. *Cell Tissue Bank*. 2016 Sep 12;17(3):399–406.
 103. Ab Hamid SS, Zahari NK, Yusof N, Hassan A. Scanning electron microscopic assessment on surface morphology of preserved human amniotic membrane after gamma sterilisation. *Cell Tissue Bank*. 2014 Mar 28;15(1):15–24.
 104. Singh R, Chacharkar MP. Dried gamma-irradiated amniotic membrane as dressing in burn wound care. *J Tissue Viability*. 2011 May;20(2):49–54.
 105. Duarte IGL, Duval-Araujo I, Duarte IGL, Duval-Araujo I. Amniotic membrane as a biological dressing in infected wound healing in rabbits. *Acta Cir Bras. Acta Cirúrgica Brasileira/SOBRADPEC*; 2014 May;29(5):334–9.
 106. Hopkinson A, McIntosh RS, Layfield R, Keyte J, Dua HS, Tighe PJ. Optimised two-dimensional electrophoresis procedures for the protein characterisation of structural tissues. *Proteomics. WILEY-VCH Verlag*; 2005 May;5(7):1967–79.
 107. Hopkinson A, McIntosh RS, Tighe PJ, James DK, Dua HS. Amniotic Membrane for Ocular Surface Reconstruction: Donor Variations and the Effect of Handling on TGF- β Content. *Investig Ophthalmology Vis Sci. The Association for Research in Vision and Ophthalmology*; 2006 Oct 1;47(10):4316.
 108. Tskitishvili E, Komoto Y, Temma-Asano K, Hayashi S, Kinugasa Y, Tsubouchi H, et al. S100B protein expression in the amnion and amniotic fluid in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod. Oxford University Press*; 2006 Oct 5;12(12):755–61.
 109. Díaz-Araya Dra Lorena García Nannig G, Díaz-Araya Santiago G. Angiotensina II modifica el comportamiento celular de miofibroblastos cardiacos de ratas neonatas que sobre expresan el receptor subtipo AT 1. Para optar al título de QF. [Internet]. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas; 2007. Available from: http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2007/mateluna_m/sources/mateluna_m.pdf
 110. Invitrogen Detection Technologies. LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells* [Internet]. Thermo Fisher Scientific. 2017 [cited 2017 Apr 6]. p. 7. Available from: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp03224.pdf>
 111. Simón García de Mora GP. Inducción de apoptosis por los agentes antitumorales mitocondriotóxicos trióxido de arsénico y lonidamina y su modulación por agentes fenólicos naturales [Internet]. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas.; 2013. Available from: <http://eprints.ucm.es/24590/>

112. Eynard AR, Valentich MA, Rovasio RA. Histología y embriología del ser humano : bases celulares y moleculares. Panamericana; 2008. 660 p.
113. Martínez-Pardo ME, Morales Pedraza J, Sánchez Ramírez O. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Mexico. Cell Tissue Bank. Springer Netherlands; 2009 May 9;10(2):157–65.
114. Zhang J, Zhan Z, Wu J, Zhang C, Yang Y, Tong S, et al. Relationship between EGF, TGFA, and EGFR Gene Polymorphisms and Traditional Chinese Medicine ZHENG in Gastric Cancer. Evidence-Based Complement Altern Med. Hindawi Publishing Corporation; 2013;13.
115. Gómez CMA, Soto GJM, Múnera LMR. Sustitutos cutáneos desarrollados por ingeniería de tejidos. Iatreia. Universidad de Antioquia; 2012;25(1):42–53.
116. Anish S. Skin substitutes in dermatology. Indian J Dermatol Venereol Leprol. Medknow Publications and Media Pvt. Ltd.; 2015;81(2):175–8.
117. Ferreira MC, Paggiaro AO, Isaac C, Teixeira Neto N, Santos GB dos. Sustitutos cutáneos: conceitos atuais e proposta de classificação. Rev Bras Cir Plástica. Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica; 2011 Dec;26(4):696–702.