



FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE MEDICINA

TESIS

Para la obtención del grado de MAGÍSTER EN CIENCIAS MÉDICAS
MENCIÓN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

por

Andrea Lira Belmar
Julio 2023

**Caracterización Molecular de la Membrana Amniótica Humana tras ser Sometida a
Protocolos de Pulverización y Liofilización.**

COMISIÓN EVALUADORA

Ph.D. Sebastián San Martín H. (UV)	Profesor Guía
Ph.D. Paula Santana S. (UA)	Profesora Co-Guía
Ph.D. Joan Villena G. (UV)	Profesor Corrector
Ph.D. Ivo Carrasco W. (UV)	Profesor Corrector 2
Ph.D. Laura Tamayo V. (UCH)	Profesora Correctora Externa



FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE MEDICINA

TESIS

Para la obtención del grado de MAGÍSTER EN CIENCIAS MÉDICAS
MENCIÓN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

por

Andrea Lira Belmar
Julio 2023

**Caracterización Molecular de la Membrana Amniótica Humana tras ser Sometida a
Protocolos de Pulverización y Liofilización.**

COMISIÓN EVALUADORA

Ph.D. Sebastián San Martín H. (UV)	Profesor Guía
Ph.D. Paula Santana S. (UA)	Profesora Co-Guía
Ph.D. Joan Villena G. (UV)	Profesor Corrector
Ph.D. Ivo Carrasco W. (UV)	Profesor Corrector 2
Ph.D. Laura Tamayo V. (UCH)	Profesora Corrector Externo

**MAGÍSTER EN CIENCIAS MÉDICAS,
MENCIÓN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE MEDICINA**

ANDREA LIRA BELMAR

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA TRAS SER
SOMETIDA A PROTOCOLOS DE PULVERIZACIÓN Y LIOFILIZACIÓN.**

Tesis entregada a la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, para dar cumplimiento como requerimiento parcial para la obtención del grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención Biología Celular y Molecular.

El trabajo fue avalado por la siguiente Comisión Evaluadora:

Profesor Guía:

Ph.D. Sebastián San Martín H.
Centro de Investigaciones Biomédicas.
Universidad de Valparaíso.

Profesor Co-Guía:

Ph.D. Paula Santana S.
Instituto de Ciencias Químicas Aplicadas
Universidad Autónoma de Chile.

Profesor Corrector:

Ph.D. Joan Villena G.
Centro de Investigaciones Biomédicas.
Universidad de Valparaíso.

Profesor Corrector 2:

Ph.D. Ivo Carrasco W.
Centro de Investigaciones Biomédicas.
Universidad de Valparaíso.

Profesor Externo:

Ph.D. Laura Tamayo V.
Departamento de Química.
Universidad de Chile.

**MAGÍSTER EN CIENCIAS MÉDICAS,
MENCIÓN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE MEDICINA**

ANDREA LIRA BELMAR

PROFESOR GUÍA: Ph.D. SEBASTIÁN SAN MARTÍN H.

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA TRAS SER
SOMETIDA A PROTOCOLOS DE PULVERIZACIÓN Y LIOFILIZACIÓN.**

RESUMEN:

La membrana amniótica humana (hAM), es un tejido que delimita a la cavidad que contiene el líquido amniótico y al embrión/feto suspendido dentro de ella. Es altamente versátil, atribuyéndole diversas propiedades biológicas, lo que lo convierte en un excelente biomaterial en las áreas de la ingeniería tisular y medicina regenerativa desde hace más de 100 años. En la actualidad, se utiliza mayoritariamente en una presentación de tipo andamio, obteniendo buenos resultados terapéuticos. Sin embargo, esta presentación exhibe limitaciones en su uso clínico, lo cual puede ser solucionado al llevarla a una presentación en polvo. La liofilización es una técnica ampliamente extendida, ya que el producto obtenido puede ser almacenado a temperatura ambiente, mientras que la pulverización es una técnica sencilla y rápida. El objetivo de este trabajo de investigación es realizar una caracterización molecular de la hAM tras ser sometida a protocolos de liofilización y pulverización. **Metodología:** Se estandarizó un buffer de extracción de proteínas en hAM mediante lisis química y disrupción mecánica, posteriormente la membrana fue sometida a diversos protocolos de liofilización y pulverización. Una vez en polvo se realizó la caracterización de las muestras mediante concentración de proteínas, perfiles de geles de SDS-PAGE, estudio proteómico y mediciones de espectros vibratorios, específicamente, infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y Raman. **Resultados:** El protocolo de liofilización y pulverización que fue saturado previamente en trehalosa demostró una mayor concentración de proteínas totales y éstas se conservaron después de ser almacenadas a temperatura ambiente durante 6 meses. El protocolo criopreservado previo a la liofilización y pulverización demostró mayor número de espectros FTIR y presentó un incremento significativo de intensidad relativa asociado a espectros de ácido hialurónico al ser comparado con el grupo control mediante la espectroscopía Raman, para ello fue necesario hacer uso de un amplificador en base a nanopartículas SHINERS que permitiera una mayor visualización de los espectros. La caracterización proteómica señala la presencia de 295 proteínas de las cuales 72 pertenecen al proyecto Matrisome. **Conclusión:** La membrana amniótica humana de la muestra estudiada, tras ser sometida a protocolos de liofilización y pulverización, preserva los elementos moleculares que la constituyen al ser comparada con un grupo control. Por lo cual, pulverizar el tejido podría ampliar la gama de usos clínicos, pero para ello son necesarios estudios adicionales.

PALABRAS CLAVES: Membrana amniótica; liofilización; pulverización; ingeniería tisular; Proteómica.

Dedicatoria

A mi querido papá.

Agradecimientos

En orden de acontecimientos agradezco a las siguientes personas:

A Mario y Joan por haberme entrevistado en el momento de la postulación, siempre estaré agradecida de la oportunidad que me dieron al haberme permitido ingresar en este programa, sin duda una de las mejores decisiones que he tomado.

A Sebastián San Martín, aunque la verdad es que en una plana se me hace imposible llegar a plasmar algo que se le acerque a la enorme admiración y gratitud que le tengo al "Profe", porque la verdad es que me siento una afortunada de ser su estudiante, es honestamente un lujo.

A mis compañeros del Magíster, a cada uno, porque son lo máximo, los mejores, en especial a Stefano y a Bárbara, por tanto amor genuino, complicidad, preocupación y empuje diario. A Karina Quevedo por ser la "*Matrix*", gracias por su generosidad no solo por la muestras para que este proyecto se pudiera ejecutar, sino también por haberme recibido en el laboratorio los sábados y domingos con tanto cariño para enseñarme desde cero....cero!!.

A Paula Santana, increíble mujer, inalcanzable literalmente, es el alma de este proyecto de investigación, en cada palabra se plasma su risa inolvidable. Gracias por enseñarme tanto y por hacerlo con tanto gusto. Paula Santana, una maravilla!!

A mi adorado Santiago "Santi" Valenzuela, un regalo mágico del destino, un gran profesor. Espero que nuestro cariño logre plasmarse algún día en un cuaderno de laboratorio como el suyo, algo que simplemente pensé no vería en esta vida. Santi, cuida de mi delantal que en nada retomamos.

A Laura Tamayo, por invitarme al dominio de la frecuencia!! Lo que ha sido una experiencia muy enriquecedora. Gracias por su enorme cariño, disposición, generosidad y por compartir conmigo el gran amor que le pone a las cosas. A Sebastián Santander, estudiante estrella de la Profe Laura por su ayuda en las mediciones de FTIR. Sebita queda poco!!

A Arianne Maine, es imposible no estar agradecida por toooooooooooooo lo que me ha ayudado, ha sido una gran compañera, espero podamos concretar todos los proyectos que nos hemos propuesto, entre ellos el congreso en Cancún (paciencia que ahí estaremos).

A mi querida familia, mis padres, mis hermanos, Diego... Y en especial a mi papá quien fue casi un compañero más de curso, con quien disfruté cada uno de los viajes a Viña en plena pandemia. Papá si te hubiese pedido que me acompañaras a clases sé que hubieses sido el primero en llegar, gracias por tu compañía y por tu apoyo, todo este proyecto es para ti.

Y como le dije a muchos, "este Magíster me regaló vida"...

(gracias a mí por haber sido valiente!!)

Índice

Lista de acrónimos	10
Capítulo 1	12
1. Marco Teórico	12
1.1 Morfología de la hAM	12
1.1.1 Anatomía de la hAM.	12
1.1.2. Embriología de la hAM.	13
1.1.3. Histología de la hAM.	14
1.1.4. Las células de la hAM y expresión de marcadores moleculares.	16
1.2. La hAM como biomaterial en ingeniería de tejidos.	17
1.2.1. Antecedentes Históricos.	17
1.2.2. Formatos de presentación de la hAM.	19
1.2.2.1. hAM fresca.	19
1.2.2.2. Andamios de hAM.	20
1.2.2.3. Extractos de hAM.	20
1.2.2.4. hAM en polvo.	20
1.2.3. Preservación y conservación de la hAM.	21
1.2.3.1. Liofilización.	22
1.3 Caracterización de las proteínas de la hAM.	23
1.3.1. Caracterización de la hAM mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier y Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR) y Espectroscopía Raman.	24
1.3.2. Caracterización de proteínas de la hAM según el peso molecular.	24
1.3.3. Caracterización de proteínas de la hAM mediante el estudio proteómico.	25
Capítulo 2	27
2. Hipótesis y Objetivos	27
2.1. Problema de investigación.	27
2.1.1. Pregunta de investigación.	27
2.2. Hipótesis.	27
2.3. Objetivos.	27
2.3.1. Objetivo general.	27
2.3.2. Objetivos específicos.	27
2.4. Principales aportes.	27
Capítulo 3	29
3. Metodología	29
3.1. Alcance del Objetivo 1	29
3.1.1. Adquisición de las muestras.	30
3.1.2. Manipulación de las muestras.	30
3.1.3. Desarrollo de Buffer para extracción de proteínas de la hAM.	30
3.1.4. Cuantificación de proteínas en buffer de extracción de hAM.	31
3.1.5. Extracción de proteínas totales mediante precipitado con metanol/cloroformo.	31

3.1.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida para buffer de hAM.	31
3.2. Alcance del Objetivo 2	32
3.2.1. Desarrollo de protocolos de liofilización en muestras de hAM.	32
3.2.2. Protocolo de pulverización en muestras de hAM.	32
3.3. Alcance del Objetivo 3.	33
3.3.1. Análisis proteómico de la muestra de hAM.	33
3.3.1.1. Digestión de proteínas y procedimiento analítico con LC-MSMS.	33
3.3.1.2. Análisis de datos.	35
3.3.2 Medición de espectros vibratorios.	36
3.3.2.1. Medición de espectros FTIR.	36
3.3.2.2. Medición de espectros Raman.	36
3.3.2.3. Síntesis de SHINS de plata.	36
3.4. Análisis Estadístico.	37
Capítulo 4	38
4. Resultados	38
4.1. Cuantificación de proteínas para buffer de extracción en hAM.	38
4.2. Perfiles de proteínas de hAM en geles SDS-PAGE.	38
4.3. Cuantificación de proteínas en protocolos de liofilización y pulverización.	40
4.4. Perfiles de proteínas de hAM en geles SDS-PAGE.	40
4.5. Cuantificación de proteínas de hAM en geles SDS-PAGE después de 6 meses de seguimiento.	42
4.6. Perfiles de proteínas de hAM en geles SDS-PAGE después de 6 meses de seguimiento.	42
4.7. Caracterización proteómica de la hAM.	44
4.8. Caracterización de la hAM mediante FTIR.	53
4.9. Caracterización de espectros Raman en hAM.	53
Capítulo 5	58
5. Discusión y conclusión	58
5.8. Limitaciones.	67
5.9. Conclusión.	67
Capítulo 6	69
6. Anexos	69
Referencias	73

Lista de acrónimos

- **hAM** Membrana amniótica humana
- **MEC** Matriz extracelular
- **TE** Ingeniería Tisular
- **CTB** Citotrofoblasto
- **SCTB** Sincitiotrofoblasto
- **H/E** Hematoxilina y Eosina
- **hAECs** células epiteliales de la hAM
- **TEM** Microscopía electrónica de transmisión
- **hAMSCs** Células del estroma mesenquimatoso de la hAM
- **SSEA-3** Antígeno embrionario específico tipo 3
- **SSEA-4** Antígeno embrionario específico tipo 4
- **SOX-2** Factor de transcripción SOX-2
- **NANOG** Proteína Homeobox NANOG
- **KI67** Proteína marcadora de proliferación Ki-67
- **Rex-1** Marcador de pluripotencialidad
- **OCT-4** Factor de transcripción 4 de unión a octámero
- **MB** Membrana Basal
- **TEC** Traumatismo encefalocraneano
- **WB** Western Blot
- **PBS** Buffer fosfato salino
- **FGF- β** Factor de crecimiento de fibroblastos
- **VIH** Virus de inmunodeficiencia humana
- **FTIR** Infrarrojo por transformada de Fourier
- **ATR** Reflectancia total atenuada
- **NIR** Infrarrojo cercano
- **UV** Ultravioleta
- **SDS** Dodecilsulfato de sodio
- **PAGE** Electroforesis en gel de poliacrilamida
- **E-ID** Electroforesis de 1 dimensión
- **E-2D** Electroforesis de 2 dimensiones
- **LUM** Lumicano
- **HLA-G** Antígeno de histocompatibilidad HLA clase I, cadena α G
- **PGE2** Prostaglandina tipo E2
- **HGF** Factor de crecimiento de hepatocitos
- **TGF- β** Factor de crecimiento transformante β
- **IL** Interleucina
- **EGF** Factor de crecimiento epidérmico
- **PDGF** Factor de crecimiento derivado de plaquetas
- **VEGF** Factor de crecimiento endotelial vascular
- **IGF** Factor de crecimiento insulínico
- **TIMPs** Inhibidor específico de las metaloproteinasas
- **FDA** Administración de Alimentos y Medicamentos de América
- **DMSO** Dimetilsulfóxido
- **CPAs** Crioprotectores
- **MS** Espectrometría de masa
- **IHQ** Inmunohistoquímica
- **PMF** Masa peptídica
- **BSS** Solución salina balanceada
- **CIP** Cocktail de inhibidores de proteasas
- **LC** Cromatografía líquida
- **MIF** Factor inhibidor de la migración de macrófagos
- **N₂** Nitrógeno líquido
- **TA** Temperatura ambiente
- **BCA** Acido bicinónico
- **ihAM** Membrana amniótica íntegra
- **thAM** Membrana amniótica saturada en trehalosa
- **phAM** Membrana amniótica pulverizada

- **MALDI** Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
- **SHINS** Shell-isolated nanoparticles
- **Nsp** Nanopartículas
- **SHINERS** Shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy
- **chAM** Membrana amniótica crioconservada
- **OGN** Osteoglicina

Capítulo 1

1. Marco Teórico

Durante el desarrollo fetal, la placenta, el cordón umbilical y las membranas fetales, son imprescindibles para que el proceso de gestación logre llegar a término. La placenta, corresponde al órgano fetal más grande y se encarga, entre otras cosas, del intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el feto [Burton and Fowden (2015)]. Posee dos componentes: materno y fetal. El materno se desarrolla a partir de la decidua basal, mientras que el componente fetal se desarrolla del corion frondoso [Aulia et al. (2023)].

La membrana amniótica humana (hAM, de sus siglas en inglés *human amniotic membrane*) también denominada amnios, delimita la cavidad que contiene el líquido amniótico y al embrión suspendido dentro de ella durante todo el proceso de gestación [Arrizabalaga and Nollert (2018)], por lo cual deberá estar constantemente adaptándose [Hamilton and Boyd (1960)]. La hAM adoptará una disposición profunda mientras es rodeada completamente por el corion y junto a él, constituirán a las denominadas membranas extraplacentarias o membrana fetales (ver Figura 1.1).

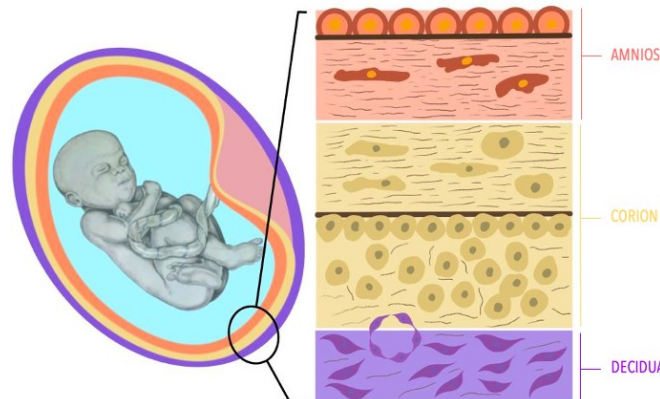


Figura 1.1: Representación de la distribución de las membranas extraplacentarias.
Adaptado de Avilla-Royo et al. (2021)

1.1 Morfología de la hAM.

1.1.1 Anatomía de la hAM.

La hAM es un tejido delgado, translúcido y flexible que carece de nervios, músculos, vasos linfáticos y vasos sanguíneos [Mamede et al. (2012)]. Al término del embarazo, presenta una superficie de 700 a 1.200 cm², un peso de 15 - 35 gr. y un grosor que varía entre 0,02 y 0,05 mm. [Miki and Grubbs (2014), Gramignoli (2016), Mamede et al. (2012)].

Pareciese ser un tejido homogéneo, pero estudios han demostrado que se organiza en subregiones considerablemente variables desde el punto de vista morfológico, celular y

molecular, proporcionándole propiedades diversas [Emge (1921)]. Desde la perspectiva anatomofisiológica se divide en tres regiones [Weidinger et al. (2021)] (Figura 1.2).

- *Amnios placentario*, el cual recubre la decidua basal y tapiza la cara fetal de la placenta,
- *Amnios libre o reflejado*, que corresponde al resto de la hAM que no está adherida a la placenta, formando parte del saco amniótico, y
- *Amnios umbilical*, que corresponde a aquella parte de la hAM que envuelve el cordón umbilical.

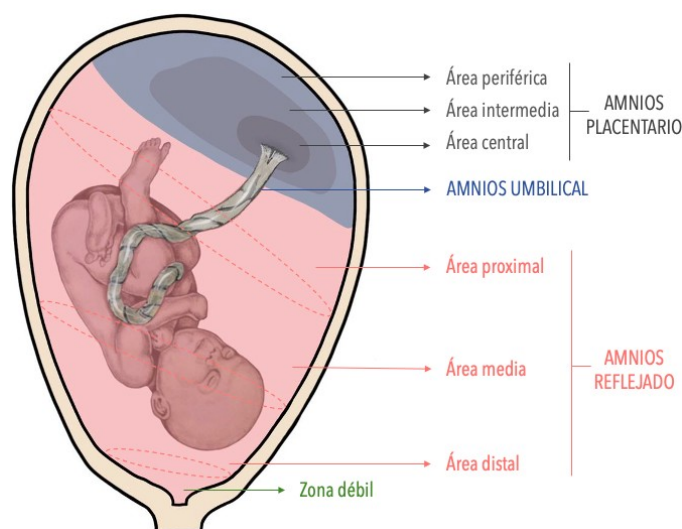


Figura 1.2: Representación de las regiones anatómicas de la hAM.
Adaptado de Weidinger et al. (2021)

1.1.2. Embriología de la hAM.

La hAM, es el componente de las membranas fetales que se desarrolla primero durante la gestación, esto ocurre a partir del epiblasto [Knöfler et al. (2019)]. Posterior a la implantación, en la etapa de blastocisto, ocurre la formación del embrioblasto y el trofoblasto a partir del macizo celular interno. El trofoblasto, se adhiere al epitelio superficial endometrial subyacente, sufriendo un proceso de diferenciación en dos capas: una interna, el citotrofoblasto (CTB) y otra externa, el sincitiotrofoblasto (SCTB).

El CTB corresponde a una capa de células cubicas en yuxtaposición y posee un gran índice mitótico [Wang (2010)]. Mientras que el SCTB es un tejido diferenciado terminalmente y su invasión en el endometrio durante el embarazo, se logra mediante la fusión e incorporación de células del CTB mononucleares, que descansan sobre la membrana basal subyacente [Burton and Fowden (2015)].

Hacia el día 7 posterior a la fecundación, el embrioblasto o macizo celular interno, formará una estructura llamada disco embrionario bilaminar, constituido por el epiblasto y el hipoblasto [Knöfler et al. (2019)]. Desde la migración del epiblasto se formará un pequeño espacio llamado cavidad amniótica primitiva. También comenzarán a surgir las células del amnioblasto, las cuales tapizarán la cavidad formando el epitelio de la cavidad amniótica [Dua et al. (2004)], dando origen a la hAM, así como también serán las encargadas de la producción del líquido amniótico en etapas tempranas. La formación de la cavidad amniótica se puede observar en la Figura 1.3.

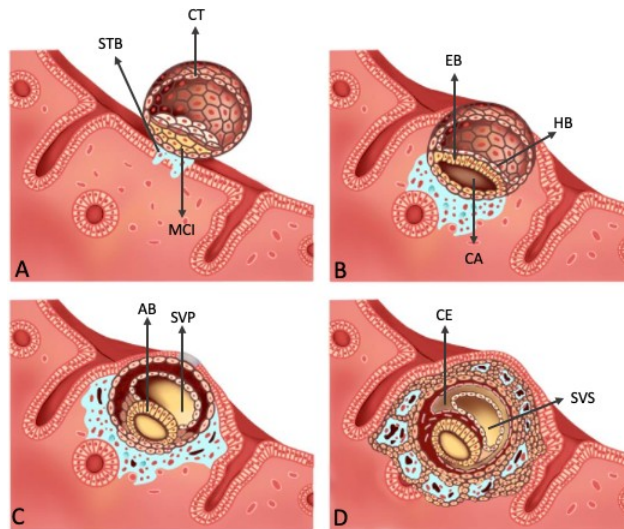


Figura 1.3: Desarrollo embrionario de la cavidad amniótica y el amnioblasto.
MCI: Macizo celular interno, CT: Citotrofoblasto, STB: Sincitotrofoblasto, CA: Cavidad amniótica, EB: Epiblasto, HB: Hipoblasto, AB: Amnioblasto, SVP: Saco vitelino primario, CE: Celoma extraembrionario, SVS: Saco vitelino secundario. Adaptado de Turco and Moffett (2019).

1.1.3. Histología de la hAM.

La hAM está conformada por 5 capas, distribuidas ordenadamente y en paralelo. La capa más interna corresponde a la capa epitelial, la cual está en contacto directo con el líquido amniótico y el feto en desarrollo, luego una membrana basal adherente, para continuar con la capa compacta acelular, capa de fibroblasto o mesenquimática y una capa esponjosa (Figura 1.4); estas 3 últimas conforman el estroma del amnios, el cual contiene células mesenquimales [Arrizabalaga and Nollert (2018), Mamede et al. (2012), Dua et al. (2004), Rodríguez-Ares et al. (2009), Qiu et al. (2020)].

La capa epitelial de la hAM, está conformada por un epitelio simple cilíndrico en la zona placentaria [(Dua et al. (2004)], con presencia de núcleos apicales descentralizados [(Lemke et al. (2018))].

Las conexiones poseen un marcado patrón de microvellosidades y pronunciados pedicelos que permiten el anclaje de las células a la membrana basal [Van Herendael et al. (1978)]. Además el amnios placentario se subdivide en tres áreas: área central, que rodea al cordón umbilical; área intermedia y área periférica [Passaretta et al. (2020)].

El amnios reflejado, también conocido como membrana cervical [(McLaren et al. (1999)) o apical [Gicquel et al. (2009)] debido a su ubicación cercana al cérvix, es considerada como zona crítica debido a que es estructuralmente débil [McLaren et al. (1999)]. Posee un epitelio monoestratificado de células cúbicas con núcleos dispuestos de forma central [Dua et al. (2004), Van Herendael et al. (1978), Lemke et al. (2018)], unidos mediante desmosomas los que favorecen el transporte celular [Bartels and Wang (1983)].

Y finalmente el amnios umbilical, el cual a diferencia de las otras dos regiones, está conformado por tres a cuatro capas de células epiteliales [Van Herendael et al. (1978), Yoon et al. (2014)] y como su nombre lo dice, se localiza revistiendo al cordón umbilical.

La membrana basal (MB) del amnios, es una de las capas más gruesas que se encuentran en nuestro organismo [Hori et al. (2006)]. Está compuesta por sustancia amorfa y fibras reticulares [Dua et al. (2004)], contiene altas concentraciones de colágeno tipo IV, V y VII, fibronectina, laminina, así como también ácido hialurónico secretado por la capa epitelial, [Jirsova and Jones (2017), Lee et al. (2012), Niknejad y cols. (2008)] influyendo estos en los procesos de adhesividad celular, migración, proliferación y diferenciación epitelial [Fukuda y cols. (1999)]. También, posee proteoglicanos de forma abundante, que cumplen el rol de barrera permeable para macromoléculas [Mamede et al. (2012)].

El estroma de la hAM, presenta 3 zonas diferenciadas y se caracteriza por ser avascular [Cooper et al. (2005)]. La lámina compacta, corresponde a la capa gruesa (5 a 20 mm) que se ubica inmediatamente por debajo de la membrana basal, formada por una densa red fibrilar carente de células [Rodríguez-Ares et al. (2009)], la cual contribuye a la resistencia ante las fuerzas de tracción de la hAM [Bourne (1960)]. Está compuesta de fibronectina y colágeno tipo I y III, sintetizados por las células madre mesenquimales [Mamede et al. (2012)].

A continuación se observa una capa de fibroblastos incluidos en una matriz reticular poco densa, la cual contiene células fibroblásticas inmersas en una malla de fibras reticulares [García de Insausti (2012)]. Finalmente, la lámina esponjosa, en contacto con el corion, está compuesta por haces de fibras reticulares en una matriz con mucina y alto contenido en hialuronato, fibronectina, elastina, proteoglicanos y colágenos tipo I, III y V [Rodríguez-Ares et al. (2009)].

Lo que pareciese ser una única pieza estructural, resulta ser un tejido altamente organizado y multifacético [Centurione et al. (2018)]. En base a lo expuesto, las propiedades dependerán directamente de la región desde la cual se ha realizado la extracción del tejido [Gremare et al. (2019)].

La porción placentaria es rica en EGF y TGF- β ; tributando a la cicatrización de heridas crónicas [Brown et al. (1989), Ogawa et al. (2004), Gicquel et al. (2009)], ya que impresiona ser más proinflamatoria y tiende a ser más proangiogénica, con mayor capacidad de proliferación y diferenciación [Dadkhah Tehrani et al. (2021)]. Por otro lado, el área reflejada posee un bajo nivel de TGF- β , lo que la hace más adecuada para aplicaciones en el área de la oftalmología [Brown et al. (1989), Kane et al. (1991)]. Desde el punto de las propiedades mecánicas, la hAM placentaria es considerablemente más fuerte y elástica al compararla con la hAM periférica demostrando una media de 82% y 19%, respectivamente [Dadkhah Tehrani et al. (2021)], mientras que la hAM reflejada es mayormente inmunomoduladora [Lemke et al. (2018)].

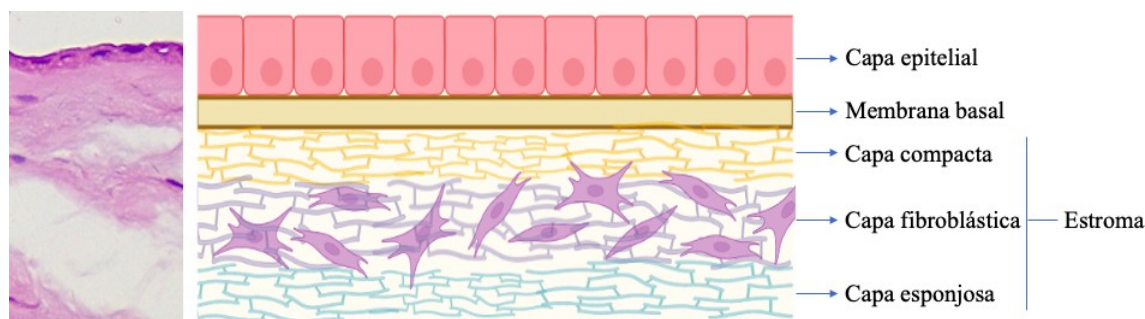


Figura 1.4: Histología de la hAM. A la izquierda, corte histológico del amnios con tinción de H/E. A la derecha, representación de la disposición en capas de la hAM.

1.1.4. Las células de la hAM y expresión de marcadores moleculares.

Existen dos poblaciones celulares diferentes que poseen características atribuibles a células madre presentes en el amnios, las células epiteliales (hAECs) y las células del estroma mesenquimatoso (hAMSCs) [Weidinger et al. (2021)], las cuales han sido caracterizadas previamente debido a sus propiedades biológicas y a que pueden ser aisladas sin dificultad [Koike et al. (2014), Rennie et al. (2012)]. Aun cuando difieren en su morfología y localización, ambas expresan ser marcadores de células pluripotentes [Miki et al. (2007), García-López et al. (2015)] y logran diferenciarse tanto *in vitro* como *in vivo* hacia linajes celulares de las tres capas germinativas [Miki et al. (2007), Sakuragawa et al. (1996) Kakishita et al. (2003) In't Anker et al. (2004) Portmann-Lanz et al. (2006)]. Esta característica es uno de los criterios considerados para catalogarla como célula madre [García-Castro et al. (2015)]. Además, ambas presentan negatividad en la expresión de marcadores hematopoyéticos [Ghamari et al. (2020)].

Las hAECs surgen de una población de células epiteliales escamosas del epiblasto, que derivan de la capa más interna de la hAM [Niknejad et al. (2008)], mientras que las hAMSCs lo hacen desde el hipoblasto. Ambas son capaces de expresar marcadores de superficie (Figura 1.5) asociados a células madre embrionarias, como los antígenos embrionarios específicos SSEA-3 y SSEA-4, los factores de transcripción específicos de pluripotencialidad como SOX-2, NANOG, Rex-1 y OCT-4 y el marcador de proliferación KI67, lo que sugiere que se renuevan a sí mismas [Hammer et al. (1997) Benirschke et al. (2012), Banerjee et al. (2015), García de Insausti (2012), Pirjali et al. (2013), Pozzobon et al. (2014)]. Debido a que ambas poblaciones celulares poseen características propias de célula madre, explicaría que este tejido sea tan atractivo como biomaterial con fines terapéuticos, puesto que posee propiedades antiinflamatorias y antibacterianas, es rico en factores de crecimiento [Kim et al. (2011), Han et al. (2008)], median la liberación de citocinas [Sekiyama et al. (2007), Dadkhah Tehrani et al. (2021)] y posee un bajo riesgo de rechazo post trasplantes [Cai et al. (2015)].

Las propiedades biológicas de la hAM se pueden ver resumidas en el Cuadro 1.1.

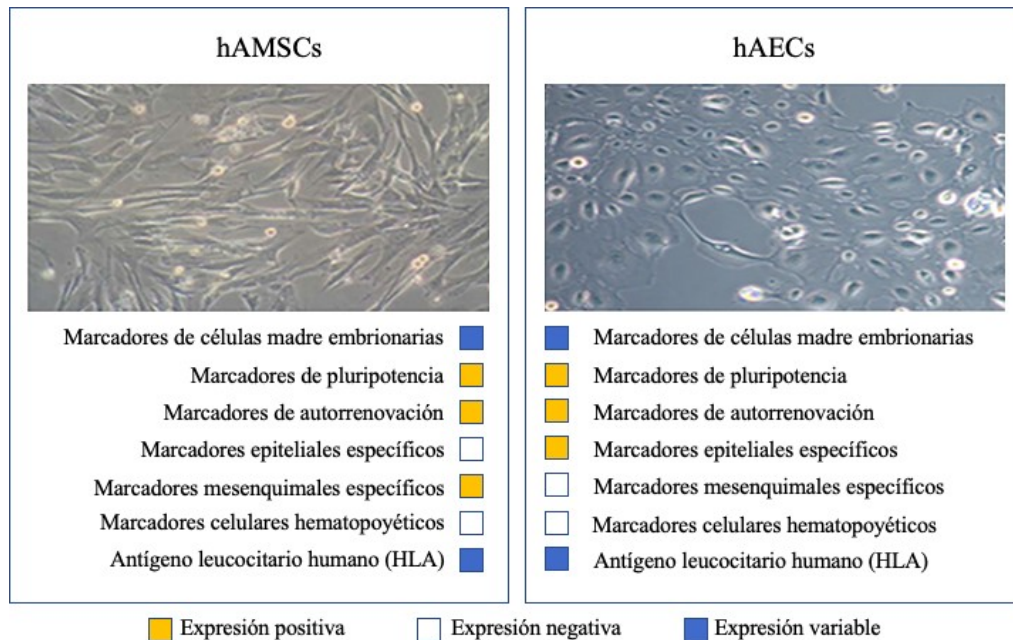


Figura 1.5: Representación de los marcadores expresados por las células mesenquimales y epiteliales.

1.2. La hAM como biomaterial en ingeniería de tejidos.

1.2.1. Antecedentes Históricos.

La hAM ha demostrado ser durante más de un siglo un tejido altamente versátil. El primer registro de su uso en medicina con fines curativos fue realizado el año 1910 por Davis, [Davis (1910)] sin reportar resultados exitosos. Tres años después Stern y Sabella [Stern (1913)] obtuvieron excelentes resultados, en pacientes con quemaduras extensas.

La primera documentación en el área oftalmológica fue realizada el año 1940 por De Röth [De Rötth (1940)] y le siguieron Sorsby y Symons [Sorsby and Symons (1946)]. Ese mismo año, Chao y Humphreys [Chao et al. (1940)] utilizaron la hAM para reconstruir un caso de perforación dural.

Posteriormente, en la década de los noventa a cargo del Dr. Batle y Perdomo [Batlle and Perdomo (1993)], se introduce el trasplante de la hAM en el área oftalmológica, despertando el interés en diversas compañías para hacer uso de este tejido. Desde ahí es que se ha estudiado su preservación con la finalidad de mantener sus funciones biológicas. En 1995 los resultados obtenidos estimularon su uso como biomaterial, diversificándose en distintas áreas de la medicina [Brindeau (1934), Kothary (1974), Kesting et al. (2014), Chopra and Thomas (2013)].

Por otro lado y a medida de que su estudio comenzaba a ampliarse, Kim and Tseng [Kim and Tseng (1995)] proponen la criopreservación del amnios; es así como en el año 1997, Güler y Ercan [Güler et al. (1997)] prueban liofilizando la hAM, manteniendo los beneficios provenientes de los elementos biológicos contenidos en ella. A partir de eso, se desarrolló en forma de colirio, el cual actualmente se comercializa [Yeu (2017)], ya

que cuenta con la aprobación de la FDA desde el año 2001. Actualmente se le ha dado uso no solo en el contexto médico, sino también se utiliza como soporte en el cultivo de variadas líneas celulares [He et al. (1999), Ishino et al. (2004)].

Cuadro 1.1. Propiedades biológicas de la hAM. Traducido de Dadkhah et al (2021).

Características de la hAM	Factores contribuyentes	Referencias
Propiedades biológicas		
Efecto antiinflamatorio	Atrapar células inflamatorias y conducir las a la apoptosis a través de sus agentes proapoptóticos; producción de factores antiinflamatorios por sus células epiteliales; supresión de las citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 α y 1 β ; producción de inhibidores de MMP; expresión del factor inhibidor de la migración expresión de citoquinas antiinflamatorias tales como antagonista del receptor de IL-1; secreción de factores antiinflamatorios como PGE2, TGF-1 β , HGF, TNF-1 γ , MIF de células mesenquimales y epiteliales de la hAM.	Mamede et al., 2012; Islam et al., 2015; Rocha y Bautista, 2015; Ilic et al., 2016
Efecto antibacteriano y antiviral	Expresión de moléculas antibacterianas naturales como defensinas, elafina y cistatina-E; adhesión a la superficie de la herida y actuar como una barrera contra la infiltración bacteriana.	Mamede et al., 2012; Islam et al., 2015; Castellanos et al., 2017; Milán et al., 2020
Baja antigenicidad y no inmunogenicidad	Falta de leucocitarios humanos A, B, C y DR, o 2microglobulina en la superficie de las hAECs; ausencia de vasos, linfa y nervios en su estructura.	Mamede et al., 2012; Chopra y Thomas, 2013; Castellanos et al., 2017
Efecto anticicatrizal y antiadherente en la cicatrización de heridas	Reducción de la actividad de las proteasas debido a la secreción de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP); disminución de la actividad de los fibroblastos a través de la regulación negativa de TGF con el contenido de ácido hialurónico presente en la hAM.	Mamede et al., 2012; Castellanos et al., 2017
Propiedades de angiogénesis y antiangiogénesis (dependientes de la superficie)	Propiedades de angiogénesis: secreción de VEGF, IL-8, angiogenina, interferón-, IL-6, bFGF, EGF y PDGF por hAMSCs. Propiedades de antiangiogénesis: secreción de IL-1, antagonista del receptor de IL-2, IL-10, endostatina, TIMP-1, -2, -3 y -4, trombospondina y proteoglicanos de sulfato de heparina por hAECs .	Islam et al., 2015; Ilic et al., 2016
Un agente anticancerígeno con baja tumorigenicidad	Secreción de agentes proapoptóticos; secreción de IL-1, antagonista del receptor de IL-2, IL-10 y endostatina que inhiben el crecimiento tumoral.	Islam et al., 2015; Jafari et al., 2020
Promoción de la epitelización	Secreción de factores de crecimiento como EGF, KGF y HGF.	Mamede et al., 2012; Islam et al., 2015; Ilic et al., 2016; Castellanos et al., 2017
Apoyar la adhesión y crecimiento celular	Su contenido en ácido hialurónico y proteínas como la fibronectina, laminina, colágenos y proteoglicanos actúan como ligando de los receptores de integrina.	Ilic et al., 2016

1.2.2. Formatos de presentación de la hAM.

Es seguro afirmar que la hAM en sus diversos formatos, continúa siendo un biomaterial con propiedades únicas para los diversos fines establecidos [Liu et al. (2018), Ehredt Jr et al. (2020), Horn et al. (2019), Liang et al. (2020), Puyana et al. (2020), Hossain et al. (2020)].

Es interesante su uso en el área de la ingeniería de tejidos ya que su enriquecida matriz extracelular (MEC) la hacen un tejido con un importante rol biomecánico [Malak et al. (1993), Jabareen et al. (2009)] confiriéndole elasticidad y fuerza de tensión, los cuales son considerados elementos claves para el uso en ésta área [Gremare et al. (2019), Riau et al. (2010)].

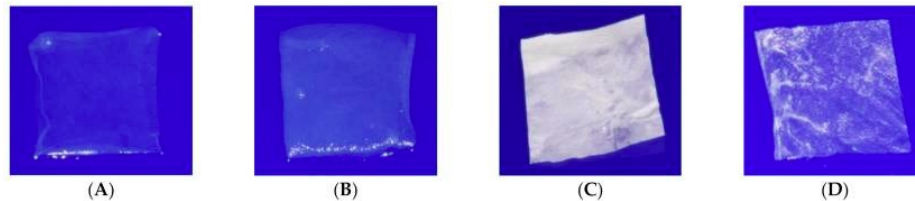


Figura 1.6: Formatos de la hMA más utilizados.

A) Fresca, B) Criopreservada, C) Liofilizada y D) Descelularizada y liofilizada.

Una de las limitaciones de este tejido es la rápida biodegradación, lo que ha desafiado a investigadores a intervenir el tejido con la finalidad de prolongar temporalmente sus propiedades biológicas, aun cuando son requeridos más reportes que evidencien la degradación cuando es aplicada con fines clínicos [Fénelon et al. (2021)]. Otra limitación refiere a la dificultad en su manipulación y a sus ineficientes propiedades de adhesividad, lo que han implicado incurrir en modificaciones de ella [Cai et al. (2015)].

Con la finalidad de superar las limitaciones inherentes de la hAM es que ha sido necesario ir adaptando su presentación (Figura 1.6), buscando mantener sus propiedades lo más similares al tejido intacto. Es importante considerar la variabilidad no solo entre un sujeto y otro [Hopkinson et al. (2006b), López-Valladares et al. (2010), Rahman et al. (2009)], sino también la zona de extracción [Weidinger et al. (2021)] y la metodología de conservación [Russo et al. (2012)].

1.2.2.1. hAM fresca.

El primer uso terapéutico que se le atribuyó a la hAM fue su aplicación en fresco, presentando características biológicas excelentes, pero con algunas desventajas relevantes, como son la no disponibilidad inmediata, la biodegradación y la necesidad de incurrir en pruebas costosas para descartar infecciones y hacer de él un tejido seguro para los receptores [Niknejad et al. (2008)]. Otro punto mencionado en la literatura, es que aun cuando el tejido posee destacables propiedades antiinflamatorias, se han reportado casos aislados de inflamación secundaria al manejo de lesiones cutáneas [Dehghani et al. (2018)].

1.2.2.2. Andamios de hAM.

Un componente importante para la ingeniería de tejidos son los andamios, los cuales corresponden a una matriz de sostén en la cual crecen células [Fénelon et al. (2021)]. En este formato, la hAM ha sido mayormente empleada para el manejo de heridas de la piel, reparación corneal y de tendones, por mencionar algunos. Los andamios a base de hAM pueden utilizarse en forma intacta, sintética o en conjunto reemplazando la MEC [Vacanti and Langer (1999)], ya que posee un bajo riesgo inmunogénico. También se utiliza en este formato para mejorar la biocompatibilidad de otros materiales [Mohan et al. (2017)]. Por lo tanto, corresponde a la presentación más utilizada.

1.2.2.3. Extractos de hAM.

El objetivo de desarrollar extractos de hAM aplica a dos focos, conservación y particulación del tejido, por ejemplo, para hacer compósitos con polímeros sintéticos y de esta forma potenciar sus propiedades biológicas [Dadkhah Tehrani et al. (2021)]. Los extractos de hAM contienen componentes similares al compararlo con la hAM crioconservada [Dudok et al. (2015), Mahbod et al. (2014), Mamede and Botelho (2015), Stachon et al. (2015)].

Para el desarrollo de extractos de hAM no existe una estandarización considerada consistente, pero en la literatura se hace mención como conveniente la pulverización y posterior homogeneización en solución salina o PBS para ser llevada a centrifugación, retiro de sobrenadante y esterilización con un filtro. Otra opción sugerida es micronizar o pulverizar la hAM crioconservada o liofilizada [Murri et al. (2018)].

1.2.2.4. hAM en polvo.

Para la pulverización de la hAM se hace uso de nitrógeno líquido (N₂), troceo manual con mortero hasta obtener un polvo fino. No hay un protocolo estándar a seleccionar, sino más bien se menciona como un procedimiento en el marco de un protocolo o como un paso previo al cual es sometido el tejido con el fin de llevarlo a una presentación en polvo.

Mediante el protocolo utilizado por Mahbod y cols. [Mahbod et al. (2014)] en base a pulverización con N₂ y mortero manual, se observó que es posible extraer más factores sin ningún costo adicional, agregando solución salina balanceada (BSS), cocktail de inhibidores de proteasas (CIP) y pulverizando la hAM en varias etapas; mezclando los sobrenadantes después de centrifugaciones repetidas. Obteniendo como hallazgo que el HGF extraíble, casi se duplicó, pero para ello fue necesario un importante volumen de tejido.

Murphy pulverizó la hAM a partir de su criopreservación a -80°C y posterior liofilización, para luego hacer uso de criomolienda, esterilización y almacenamiento a -80°C hasta su posterior uso, obteniendo buena respuesta a la cicatrización de la piel en estudio animal [Murphy et al. (2020)].

1.2.3. Preservación y conservación de la hAM.

La preservación de la hAM es un paso esencial para garantizar un suministro constante de tejido cuando el objetivo es darle un uso clínico [Laranjo (2015)], esto hace que la calidad sea relevante y para ello, es necesario el desarrollo de protocolos estandarizados que tributen a la seguridad de los pacientes, a la integridad de sus propiedades biológicas y al fin clínico específico buscado. Inicialmente se hizo uso de la hAM fresca, es decir, inmediatamente al parto; luego fue necesario establecer nuevas formas de administración y junto a ello, de conservación y es por eso que la literatura refiere distintas metodologías (Cuadro 1.2), aun cuando el frío es una de las técnicas más antiguas y mayormente utilizadas [Riau et al. (2010), Thomasen et al. (2009)]. Es importante considerar este punto, ya que las opciones metodológicas de preservación existentes, presentan variaciones entre ellas y pueden influir en el resultado terapéutico final.

Cuadro 1.2 Tabla comparativa de preservación utilizadas para preparar la hAM. Traducido de [Von Harbach et al. (2020)]

Preservantes	Ventajas	Desventajas
GLICEROL	- Los componentes de la hAM y la estructura biológica se asemejan al MAH fresco y no conservado - Método más utilizado a nivel mundial.	- Poca acción esterilizante. - Altas concentraciones comprometen la viabilidad de las células de la hAM. - Requiere un congelador costoso, pesado y difícil de instalar. - Es relativamente difícil mantener estable la temperatura durante el transporte de la hAM.
DMSO 1000mL (Synth®)	- Técnica eficaz de conservación de la hAM.	- Hay pocos estudios centrados en investigar su efecto sobre la integridad estructural de la MAH y los componentes biológicos.
LIOFILIZACIÓN	- Las dosis adecuadas de radiación son efectivas contra bacterias, hongos y virus.	- La membrana liofilizada parece ser más fina y, macroscópicamente, más frágil que la criopreservada. - Es probable que el liofilizado provoque la desnaturalización de las proteínas y cambios en la estructura del tejido.
RADIACIÓN GAMMA	- No se observaron cambios en la estructura del tejido y los componentes de la MEC entre la hAM liofilizada esterilizada con irradiación gamma de 25 kGy y la hAM criopreservada.	- La hAM desnuda liofilizada tratada con irradiación muestra un nivel de factor de crecimiento más bajo que la hAM criopreservada.
TERALOSA (Anhui Elite industrial Co. Ltd®)	- La MAH tratada con trehalosa al 10% antes de la liofilización presenta propiedades físicas y biocompatibilidad superiores.	- Método poco utilizado en entornos oftalmológicos.
ACIDO PERASÉTICO (Lvzhiyuan®)	- Buena conservación de la estructura de la hAM en comparación con la hAM no esterilizada - No hay rotura en la membrana basal ni en su contenido biológico.	- Buena conservación de la estructura de la hAM en comparación con la hAM no esterilizada. - No hay rotura de la membrana basal (MB) ni en su contenido biológico.

Una alternativa de preservación es mediante deshidratación, eliminando la humedad residual del tejido, siendo unas de sus grandes ventajas el almacenamiento a temperatura ambiente. Dentro de las opciones se encuentra la liofilización.

1.2.3.1. Liofilización.

La liofilización es un proceso de conservación que permite almacenar materiales biológicos durante largos períodos de tiempo a temperatura ambiente [Rodríguez-Ares et al. (2009)]. Corresponde a un método para deshidratar elementos que contienen agua como componente más abundante. El proceso consiste en cuatro pasos: Congelación previa, secado primario o sublimación, secado secundario o desorción, envasado y eventual rehidratación [Shimazaki et al. (1998) Nowak and Jakubczyk (2020)] (Figura 1.7). Esto da como resultado, la inhibición de reacciones químicas nocivas que conducen a la alteración de los tejidos [Rodríguez-Ares et al. (2009)].

Para reducir el eventual daño, las muestras pueden protegerse con agentes crioprotectores (CPAs) [Niknejad et al. (2011), Ahn et al. (2005)], los cuales estabilizan las proteínas presentes en el tejido, para evitar la desnaturalización durante los ciclos de secado [Nakamura et al. (2004), Mao et al. (2019)]. La baja probabilidad de contaminación, la facilidad de almacenamiento y la conservación adecuada de las propiedades físicas del tejido, hacen que este método presente grandes ventajas [Mao et al. (2019)].

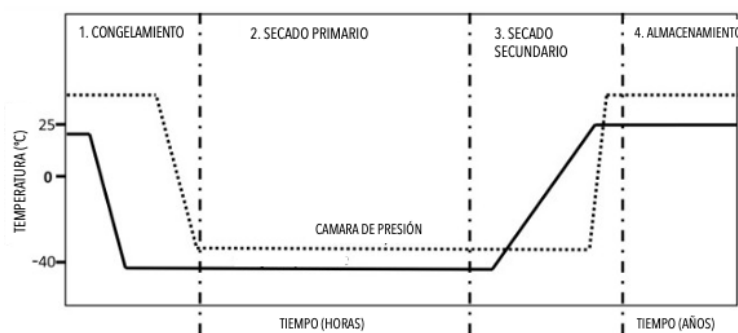


Figura 1.7: Representación del ciclo de liofilización.
Adaptado de Merivaara et al. (2021)

Libera y cols. [Lindenmair et al. (2010)], observaron que la liofilización es una buena opción para preservar hAM para su uso en la reconstrucción de superficie ocular, mencionando que este método facilita el almacenamiento y el transporte, reduciendo costos y sugiere que puede aumentar su uso en procedimientos quirúrgicos.

Rodríguez-Ares y cols. [Rodríguez-Ares et al. (2009)] afirmaron que la liofilización mantiene la estructura histológica de la hAM, pero observaron una mayor pérdida de proteínas al compararla con la técnica de criopreservación. Por otro lado, diversos estudios han confirmado que la hAM liofilizada, no mostró un menor rendimiento de las propiedades biológicas al compararla con aquellas membranas criopreservadas [Lindenmair et al. (2010), Crestani et al. (2012), Wang et al. (2018)].

Mao y cols. [Mao et al. (2019)], sometieron membranas viables a liofilización y observaron que las células de la hAM, persistieron hasta 21 días en un medio de cultivo similar al de la hAM fresca. Por tanto, afirmaron que este método de liofilización diseñado para el almacenamiento a temperatura ambiente de tejido vivo conservado, no compromete la viabilidad celular.

Niknejad y cols. [Niknejad et al. (2011)] demostraron que la adhesión de las células endoteliales y la viabilidad celular podrían mejorar con la liofilización de la hAM. Recientemente Dhall y cols. [Dhall et al. (2018)], desarrollaron una nueva técnica de liopreservación que conserva todos los componentes nativos de los tejidos placentarios, aun cuando no demostraron directamente que las células vivas, permanecieran funcionales.

Como hemos mencionado anteriormente la hAM a lo largo de la historia ha sido foco de interés de estudio, razón por la cual caracterizar sus componentes moleculares toma una relevancia considerable al momento de verificar las intervenciones realizadas para los diversos fines.

1.3 Caracterización de las proteínas de la hAM.

La caracterización de proteínas de la hAM implica el uso de numerosos métodos experimentales. Los más utilizados se pueden observar resumidos en el Cuadro 1.3.

Cuadro 1.3. Métodos de caracterización de proteínas más comúnmente utilizados.

Estimación según peso molecular	
SDS-PAGE	Electroforésis en gel de polyacrilamida
Wester Blot	Inmunotransferencia, mediante la detección de una proteína específica mediante el uso de anticuerpos.
Evaluación según la pureza	
SDS-PAGE	Electroforésis en gel de polyacrilamida
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento. Tiene la capacidad de separar, identificar y cuantificar
Determinación de la concentración de proteínas	
Bradford	Ensayo colorimétrico basado en la interacción entre el azul brillante de Coomassie y la arginina y los residuos aromáticos en su proteína, lo que resulta en un cambio del máximo de absorción del tinte de 465 a 595 nm.
BCA	Ensayo colorimétrico basado en el uso de ácido bicinconínico (BCA) para formar un producto de color púrpura que se absorbe a 562 nm.
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.
Identificación de proteínas por Espectrometría de Masas	
EM	Técnica de identificación y caracterización de proteínas, mediante la ionización de proteínas completas. La identificación ocurre mediante huellas dactilares de masas peptídicas o EM en tándem. Las masas obtenidas se comparan con una base de datos basados en probabilidades para determinar las coincidencias de proteínas más cercanas.
Secuenciación Amino-Terminal	
Secuencia N-Terminal	Se utiliza para identificar el orden de los aminoácidos de proteínas o péptidos, comenzando por su extremo N-terminal. Contribuye al análisis de la estructura principal de la proteína, revelando su función biológica.
Otros análisis	
Evaluación de la estabilidad proteica; detección de endotoxinas; análisis estructural de proteínas (dicroísmo circular (CD)), etc.	

1.3.1. Caracterización de la hAM mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier y Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR) y Espectroscopía Raman.

La espectroscopía vibratoria es un campo que estudia las interacciones de la radiación con la materia, entre ellas ATR-FTIR y Raman han sido ampliamente utilizadas para la caracterización de proteínas. La medición de espectros infrarrojos corresponde a una de las técnicas analíticas fundamentales en la caracterización de las proteínas, tanto en solución como en estado sólido, además de ser la más utilizada; se le cataloga como un excelente método para el análisis biológico [Lee et al. (1985)]. Una de las técnicas hace uso de la transformada de Fourier, ya que la señal del detector se transforma en el espectro medido.

La FTIR se puede utilizar para controlar la estabilidad conformacional global de las proteínas presentes en una muestra [Byler and Susi (1986)], por ejemplo, aquellas que son sólidas posterior a la liofilización, pero no puede monitorear los cambios locales que pueden afectar la estabilidad. El principio físico corresponde a las vibraciones por estiramiento (entre otras) de grupos C=O, N-H y C-N midiéndose en base a la absorción o emisión generada a partir de la luz infrarroja [Riaz et al. (2018)]. Permite identificar grupos funcionales en muestras biológicas, basada en la absorción de luz infrarroja en la región de 4000 a 400 cm⁻¹. La identificación de ciertos grupos funcionales podrían dar cuenta de la presencia y diversidad de macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos, entre otras.

Otra forma de estudio corresponde a la espectroscopía Raman, ésta es una técnica óptica que mide la estructura molecular y permite identificar grupos funcionales en una estructura molecular [Butler et al. (2016)]. Utiliza luz monocromática, generalmente en el rango del infrarrojo cercano (NIR), visible, o ultravioleta (UV), para explotar los fenómenos de dispersión inelástica. Las moléculas que conforman las proteínas experimentan un cambio en la polarizabilidad molecular a medida que vibran. Este cambio proporciona información sobre los esqueletos peptídicos y la estructura de las proteínas [Bolje and Gobec (2021)]. En este estudio se hace caracterización estructural de las proteínas de la hAM con FTIR y Raman, razón por la cual no se hace reseña de las otras técnicas que tienen como objetivo este tipo de mediciones.

1.3.2. Caracterización de proteínas de la hAM según el peso molecular.

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas cargadas, las cuales migran al ser sometidas a un campo eléctrico [Pérez-Chabela et al. (2015)]. Es un método considerado sencillo que se realiza ampliamente en el estudio de proteínas [Chakavarti and Chakavarti (2008)]. Las proteínas se distribuyen en función a su tamaño y forma, generando bandas organizadas en columnas características, a medida que van siendo retenidas mientras migran hacia el polo opuesto en una placa vertical [Roy and Kumar (2014)].

El protocolo más utilizado es el Sistema Laemmli [Laemmli (1970)]. Uno de los métodos para el estudio de proteínas más común corresponde a aquel realizado en condiciones desnaturalizantes mediante el uso de geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia del

detergente dodecilsulfato sódico (SDS) [Macheleidt and Kniemeyer (2021)] y se caracteriza porque la separación de proteínas se hace en función de la masa molecular [García (2000) Chakavarti and Chakavarti (2008)] y corresponde a la electroforesis de una dimensión (E-1D) [Chen et al. (2015)]. En general, esta técnica se utiliza como un método cualitativo, es decir, se realiza una evaluación visual de la intensidad de la tinción de la banda [Dome et al. (2021)]. La E-1D, logra evaluar el perfil de proteínas con pesos moleculares que van desde los 10 kDa a los 300 kDa.

1.3.3. Caracterización de proteínas de la hAM mediante el estudio proteómico.

La Proteómica corresponde al estudio de las interacciones, función, composición y estructura de las proteínas, además de sus actividades celulares [(Wilkins et al. (1996))]. Es el estudio del proteoma, es decir, el conjunto completo de proteínas codificadas por un genoma, sin embargo, es considerablemente más complejo que la genómica, ya que la expresión de la proteína se ve alterada según el tiempo y las condiciones ambientales [Holman et al. (2013)]. Existe una diversa variedad de técnicas: Electroforesis de una dimensión (E-1D) y de dos dimensiones (E-2D) [Vercauteren et al. (2004)], tecnología de identificación multidimensional [Washburn et al. (2001)], marcaje de isótopos estables con aminoácidos en cultivos celulares [Ong et al. (2002)], etiqueta de afinidad codificada por isótopos, marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta de proteínas, entre otras [Ross et al. (2004)], por lo que también posee numerosas aplicaciones, como por ejemplo, en el diagnóstico y pronóstico de patologías mediante la identificación de biomarcadores, en el diseño de fármacos mediante la identificación de nuevos blancos. En la farmacología permite estudiar mecanismos de acción y efectos secundarios de medicamentos, a lo que se le denomina farmacoproteómica, por mencionar algunas de ellas [Al-Amrani et al. (2021)].

No hay dudas de que las propiedades biológicas de la hAM se deben a la composición proteica del tejido [Costa and Murta (2015)]. Mediante métodos como Microarrays y western blot (WB) se ha logrado realizar la caracterización de la composición proteica [McQuilling et al. (2019), Fenner et al. (2019)], sin embargo, y aun cuando ambos tienen alta especificidad, han demostrado limitaciones con respecto al rendimiento en la identificación de proteínas, más aún cuando hay una abundante cantidad de ellas presentes. McQuilling y cols. [McQuilling et al. (2019)] al analizar la membrana corioamniótica deshidratada mediante proteómica encontraron colágeno I y III, fibronectina, ácido hialurónico, glicosaminoglicanos y laminina, ésta última fue predominante en la MEC de la hAM. El ácido hialurónico fue abundante en la capa esponjosa; VEGF y FGF- β en el epitelio; IL-1 e IGF-1 se concentraron en la capa esponjosa al igual que TGF- β 1 y HGF.

Por medio de la Cromatografía Líquida (LC) y la Espectrometría de Masas (MS), Aviles y cols identificaron 285 proteínas de MEC en la hAM; (Figura 1.8). Los autores reconocen en su estudio haberse sorprendido al obtener que los colágenos eran el grupo de menor abundancia de la MEC, mientras que el TGF- β 1 fue una de las proteínas más abundantes [Avilla-Royo et al. (2021), Hopkinson et al. (2006a)].

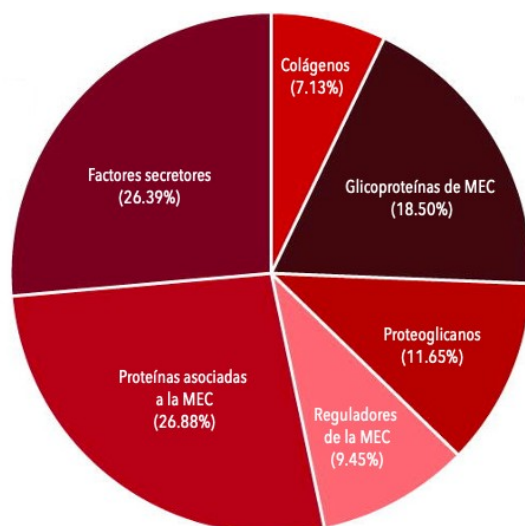


Figura 1.8: Abundancia de las proteínas identificadas de la MEC en hAM.
Adaptado de Avilla-Royo et al (2021)

Hopkinson y cols. mediante estudio proteómico con geles de E-2D, observaron que las proteínas más abundantes eran las citoplasmáticas solubles, siendo las que se presentaron en mayor cantidad la trombospondina, mimecan, TGF- β 1 e integrina α 6 [Hopkinson et al. (2005)]. Park y cols. también obtuvieron como resultado, que las proteínas más abundantes eran las citoplasmáticas [Park et al. (2006)]. Baharvand y cols. [Baharvand et al. (2007)] realizaron el estudio proteómico mediante geles de E-2D y posterior MALDI-TOF/TOF-MS en hAM con denudación epitelial, observando que las proteínas más abundantes identificadas fueron lumican (LUM) y osteoglicina (OGN), ambos miembros de la familia de los proteoglicanos.

Beckett y cols. [Beckett et al. (2021)], realizaron estudio proteómico de la hAM, corion, líquido amniótico y cordón umbilical, observando más de 900 proteínas presentes en cada uno de ellos, siendo colágenos, queratina y albúmina las proteínas más abundantes. Por otro lado, en todas las muestras se confirmó la presencia de LUM. El colágeno tipo VI fue el más abundante para el caso de la hAM. El contenido relativo de factores identificados en MiMedx PURION Processed en hAM deshidratada (a lo que denominan dHACM) mediante estudio proteómico se puede observar en el sitio <https://www.mimedx.com/>, la cual actualmente se comercializa.

Aun cuando existen registros mediante el análisis transcriptómico y proteómico que buscan caracterizar la hAM o las células presentes en ella, se requieren de más estudios para poder aclarar el proteoma y secretoma y de esta forma analizar los niveles de expresión de cada proteína constitutiva [Rocha and Baptista (2015)].

Capítulo 2

2. Hipótesis y Objetivos

2.1. Problema de investigación.

En la actualidad, la hAM se utiliza mayoritariamente en una presentación de tipo andamio, demostrando tener excelentes resultados terapéuticos. Sin embargo, esta presentación exhibe limitaciones en su uso clínico ya que quedan excluidas las aplicaciones del tipo instilación o infiltración, lo cual puede ser solucionado al llevar a la hAM a una presentación en polvo y de esta forma lograr abarcar mayor número de patologías, extendiendo sus propiedades biológicas. Con la finalidad de modificar el estado físico de la hAM a una presentación en polvo y buscar preservar la mayor cantidad de elementos moleculares que la constituyen, es que se utilizan protocolos de liofilización y de pulverización.

2.1.1. Pregunta de investigación.

A partir de la problemática anteriormente expuesta es que nos establecemos la siguiente pregunta de investigación, ¿Existen cambios moleculares en la membrana amniótica humana al modificar su estado físico a una presentación en polvo tras ser sometida a protocolos de liofilización y pulverización?.

2.2. Hipótesis.

La membrana amniótica humana tras ser sometida a protocolos de liofilización y pulverización, preserva los elementos moleculares que la constituyen al ser comparada con un grupo nativo.

2.3. Objetivos.

2.3.1. Objetivo general.

Caracterizar molecularmente la membrana amniótica humana tras ser sometida a protocolos de liofilización y pulverización.

2.3.2. Objetivos específicos.

- 1) Estandarizar un protocolo de extracción de proteínas óptimo en muestras de hAM.
- 2) Desarrollar protocolos de liofilización y pulverización en muestras de hAM.
- 3) Identificar los componentes moleculares de la hAM tras ser sometida a protocolos de liofilización y de pulverización.

2.4. Principales aportes.

La hAM tiene un largo historial de usos en el tratamiento de diversas enfermedades. Se ha considerado como un material de desecho biológico, económico y naturalmente biocompatible, que la convierte en un elemento versátil y de elección para aplicaciones clínicas en el contexto de la Ingeniería de Tejidos.

Sin embargo, aun cuando su uso tiene un amplio desarrollo en medicina, su presentación tipo parche/injerto deja fuera un grupo importante de posibles usos terapéuticos, por lo que modificar su estado físico a una presentación en polvo abre una ventana innovadora para el manejo de patologías crónicas, de difícil manejo, con una baja tasa de éxito terapéutico, como ocurre en el caso de los síndromes dolorosos de vejiga incluida la cistitis intersticial, así como también en mujeres con cáncer de mama que se encuentran en tratamiento con hormonoterapia mediante el uso de bloqueadores de estrógenos y que desarrollan prurito genital, o inclusive en mujeres diagnosticadas con neoplasias cervicales intraepiteliales de diversos grados, por mencionar algunas enfermedades.

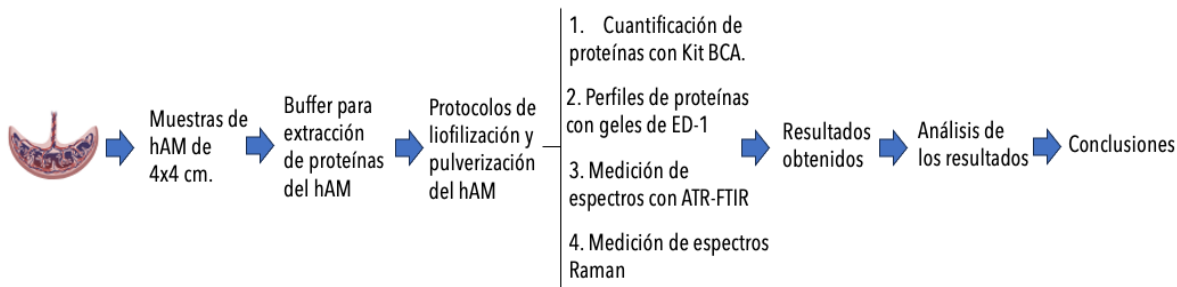
Nuestra propuesta tiene como principal foco el estandarizar protocolos de liofilización y pulverización de la hAM al buscar modificar su presentación, por lo que este estudio representa una primera etapa, ya que obteniéndose un extracto en polvo, nos permitirá a futuro hacer uso clínico de sus beneficios intrínsecos, tal como confección de geles, cremas, soluciones para instilación e infiltración y la atractiva posibilidad de abarcar amplias y novedosas aplicaciones terapéuticas. Este estudio sería un aporte a nivel regional, nacional e internacional que busca intervenir en la salud de las personas y por ende, impactar en la calidad de vida de ellas. Por otro lado, también se vería enriquecida la comunidad científica ya que refuerza las líneas de investigación vinculadas con la temática e invita activamente al desarrollo de ensayos clínicos prometedores.

Capítulo 3

3. Metodología

Este estudio responde a un diseño cuasi experimental de corte transversal y su diseño de muestreo es no probabilístico por conveniencia. Las variables independientes del estudio correspondieron a diversos protocolos de extracción de proteínas, liofilización y pulverización a los cuales fueron sometidas muestras de hAM, mientras que las variables dependientes correspondieron a proteínas presentes en la hAM.

El flujograma de trabajo a partir de la obtención de las muestras se desarrolla en el orden de eventos como se aprecia a continuación:



Para el desarrollo del marco teórico y de los protocolos propuestos, se han utilizado referencias mencionadas en la literatura; como bases de datos, PubMed, Scielo, Dialnet, Science Direct y como buscador se ha utilizado Google Scholar.

3.1. Alcance del Objetivo 1

Los pasos para alcanzar el primero objetivo propuesto fueron los siguientes (Figura 3.1)

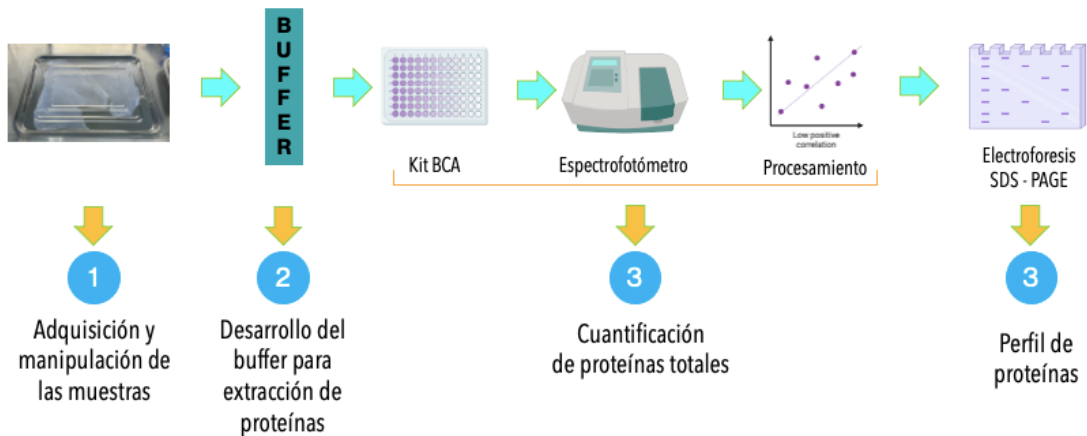


Figura 3.1: Procedimientos para el alcance del objetivo 1.

3.1.1. Adquisición de las muestras.

Se trabajó en conjunto con profesionales del servicio de maternidad del Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso, donde se obtuvo la donación y colecta de una placenta vía cesárea electiva desde madres sanas, previa su autorización y firma del correspondiente consentimiento informado por escrito (Cuadro 3.1). Los profesionales del servicio fueron los encargados de la colecta de la placenta y de posterior almacenamiento en frío hasta su retiro.

3.1.2. Manipulación de las muestras.

La placenta fue trasladada a las dependencias de la Universidad de Valparaíso, con triple embalaje de seguridad para muestras biológicas junto a unidades refrigerantes, para mantener en condiciones óptimas el tejido. Una vez ahí, se procedió a la descoaptación de la capa coriónica de la membrana amniótica mediante disección roma bajo gabinete de bioseguridad, donde luego fue lavada con solución salina estéril para eliminar restos de corion y de coágulos sanguíneos. Posteriormente fue cortada en fragmentos de 5x5 cm. aproximadamente, con bisturí estéril para ser almacenada en forma individual en 10% DMSO en PBS (pH 7.4–7.6) estéril, suplementado con 10 mg·mL⁻¹ de penicilina-estreptomicina (BI Biological Industries) y 0,25 mg·mL⁻¹ de anfotericina B (BI Biological Industries) a -80°C, para evitar la degradación del tejido por los ciclos de congelación y descongelación, hasta su posterior uso.

Cuadro 3.1: Criterios de inclusión para estudios experimentales.

Criterios de inclusión
Gestante mayor de edad
Embarazo de término (37 a 40 semanas)
Ausencia de patología placentaria y materno fetal
Cesárea electiva
Serología negativa para: VIH, hepatitis B y C, sífilis, HTVL

3.1.3. Desarrollo de Buffer para extracción de proteínas de la hAM.

Para este estudio se utilizaron 8 protocolos para la extracción de proteínas en muestras de hAM. Para cada protocolo específico las piezas individuales se distribuyeron al azar.

Buffer B1-B: La muestra fue sometidas a SDS al 2% + Tris-HCl 50 mM a pH 6.8 + 10 µl de cocktail de Inhibidores de Proteasas (CIP) (Merck, P9599-1ml) + 500 µl PMSF 100 mM. Posteriormente fue homogeneizada con 3 beads (BeadBug™ 6, Benchmark, USA) bajo los siguientes parámetros: 1 ciclo de 0,2 a 5.5 ms/s por 3 s y luego se dejó en hielo para evitar el exceso de temperatura. Este paso se repitió 4 veces. Una vez realizado estos pasos la muestra fue centrifugada durante 20 min. a 16.000 g a 4°C y se extrajo el sobrenadante.

Buffer B1-S: La muestra fue sometida a SDS al 2% + Tris-HCl 50 mM a pH 6.8 + 10 µl de CIP (Merck, P9599-1ml) + 500 µl de PMSF 100 mM. Posteriormente fue congelada durante 3 ciclos de 15 min a -80°C para luego ser sonicada. La sonicación (Omni Sonic Ruptor 400, USA) se realizó bajo los siguientes parámetros: 5 inmersiones con amplitud al 30% y 5 inmersiones con amplitud al 100%. Una vez realizado estos pasos la muestra fue centrifugada durante 20 min a 16.000 g a 4°C y se extrajo el sobrenadante.

Buffer B2-B: La muestra fue sometida a 200 µl de PBS 1x + 10 µl de CIP (Merck, P9599-1ml) + 500 µl de PMSF 100 mM. Posteriormente fue homogeneizada con 3 beads (BeadBug™ 6, Benchmark, USA), bajo los siguientes parámetros: 1 ciclo de 0,2 a 5.5 ms/s por 3 s y luego se dejó en hielo para evitar el exceso de temperatura. Este paso se repitió 4 veces. Una vez realizado estos pasos la muestra fue centrifugada durante 20 min a 16.000 g a 4°C y se extrajo el sobrenadante.

Buffer B2-S: La muestra fue sometida a 200 µl de PBS 1x + 10 µl de CIP (Merck, P9599-1ml) + 500 µl de PMSF 100 mM. Posteriormente fue congelada durante 3 ciclos de 15 min a -80°C para luego ser sonicada. La sonicación se realizó bajo los siguientes parámetros: 5 inmersiones con amplitud al 30% y 5 inmersiones con amplitud al 100%. Una vez realizado estos pasos la muestra fue centrifugada durante 20 min a 16.000 g a 4°C y se extrajo el sobrenadante.

Buffer B3-B: La muestra fue sometidas a 50 mM Tris-HCl + 10 nM EDTA + 5 mM PMSF + 0,2% CIP (Merck, P9599-1ml) + 0,5% tritón X-100. Posteriormente fue homogeneizada con 3 beads (BeadBug™ 6, Benchmark, USA), bajo los siguientes parámetros: 1 ciclo de 0,2 a 5.5 ms/s por 3 s y luego se dejó en hielo para evitar el exceso de temperatura. Este paso se repitió 4 veces. Una vez realizado estos pasos la muestra fue centrifugada durante 20 min a 16.000 g a 4°C y se extrajo el sobrenadante.

Buffer B3-S: La muestra fue sometidas a 50 mM Tris-HCl + 10 nM EDTA + 5 mM de PMSF + 0,2% de CIP (Merck, P9599-1ml) + 0,5% de tritón X-100. Posteriormente fue congelada durante 3 ciclos de 15 min a -80°C y luego descongelada para luego ser sonicada. La sonicación se realizó bajo los siguientes parámetros: 5 inmersiones con amplitud del 30% y 5 inmersiones con amplitud del 100%. Una vez realizado estos pasos la muestra fue centrifugada durante 20 min a 16.000 g a 4°C y se extrajo el sobrenadante.

Buffer B4-B: La muestra fue sometidas a nitrógeno líquido (N₂) y mortero de cerámica hasta reducirla en un polvo blanco, mientras se les agregó urea 8 M en solución tampón Tris Hcl 0,1 M pH 8.2 (TBS) + 0,2% de CIP. Posteriormente fue homogeneizada con 3 beads (BeadBug™ 6, Benchmark, USA) bajo los siguientes parámetros: 1 ciclo de 0,2 a 5.5 ms/s por 3 s y luego se dejó en hielo para evitar el exceso de temperatura. Este paso se repitió 4 veces. Una vez realizado estos pasos la muestra fue centrifugada durante 20 min a 16.000 g a 4°C y se extrajo el sobrenadante.

Buffer B4-S: Las muestras fueron sometidas a N₂ y mortero de cerámica hasta reducirlas en un polvo blanco, mientras les fue adicionado una solución en base a urea 8 M en solución tampón Tris 0,1 M pH 8.2 (TBS) + 10 µl de CIP. Posteriormente fue congelada durante 3 ciclos de 15 min a -80°C para luego ser sonicadas. La sonicación se realizó bajo los siguientes parámetros: 5 inmersiones con amplitud al 30% y 5 inmersiones con amplitud al 100%. Una vez realizado estos pasos la muestra fue centrifugada durante 20 min a 16.000 g a 4°C y se extrajo el sobrenadante.

3.1.4. Cuantificación de proteínas en buffer de extracción de hAM.

Del sobrenadante obtenido se realizó la cuantificación de proteínas a través del ensayo BCA Pierce™ según las indicaciones del fabricante. Las muestras de 25 µl fueron cultivadas a 37°C durante 30 min. Posterior a este tiempo, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (BioTek® 800™ TS Absorbance Reader with Gen5™ software) a 562 nm. Las muestras fueron cuantificadas por triplicado y se utilizó una curva de calibración lineal.

3.1.5. Extracción de proteínas totales mediante precipitado con metanol/cloroformo.

1 volumen de la muestra fue sometido a 4 volúmenes de metanol, luego se incorporó 1 volumen de cloroformo, posteriormente se agregaron 3 volúmenes de agua MiliQ. Las muestras fueron centrifugadas durante 2 min a 14.000 g. Se retiró la fase acuosa y se añadieron 4 volúmenes de metanol. Las muestras fueron centrifugadas durante 2 min a 14.000 g. Se retiró tanto metanol como fue posible sin remover el sedimento y se dejaron secar en centrífuga de vacío (Savant DNA120 SpeedVac, Thermo Scientific) durante 10 minutos. Posteriormente se resuspendió en tampón de muestra para SDS-PAGE.

3.1.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida para buffer de hAM.

Las concentraciones de proteínas a utilizar para obtener perfiles en geles de electroforesis SDS-PAGE se determinó a partir de la cuantificación de proteínas obtenidas (ver en el apartado anexos).

Se prepararon geles (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-rad, USA) con el sistema de tampón discontinuo en condiciones denaturantes al 15%, [Laemmli (1970)]. El gel separador se preparó con acrilamida-bisacrilamida 30% (p/v) 0,8% (p/v) a una concentración final de 12% (p/v), tamponado con Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 y SDS 10%. El gel espaciador, en cambio se preparó a una concentración final de 4% (p/v) tamponado con Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 y SDS 10%. Ambos fueron polimerizados con persulfato de amonio 10% (p/v), y TEMED 0,15% (p/v), de concentración final. Las muestras con tampón de muestra y con un 5% (v/v), de β-mercaptoetanol fueron denaturadas calentándolas por 10 min. en agua a 90°C, para luego ser cargadas cuidadosamente en los pocillos del gel. Al sistema ya montado e inmerso en tampón de corrida 1X (25 mM Tris, 192 mM glicina y 0,1% SDS, pH 8,3), se aplicó aproximadamente una corriente de 120 V hasta que el indicador del frente iónico llegó al borde inferior del gel. Finalizada la electroforesis, el gel se fijó durante 1 h., se tiñó en azul de Coomassie por 12 h. Luego el gel se destiñó mediante repetidos lavados con una solución de desteñido (30% metanol y 10% ácido acético), hasta que el gel quedara completamente claro y sólo se apreciaran las bandas teñidas. Todas estas etapas se llevaron a cabo con agitación suave y constante en una plataforma rotatoria. Finalmente, las imágenes fueron obtenidas mediante el fotodocumentador de Biorad.

Las imágenes fueron procesadas mediante el software ImageJ versión 1,8,0 (64 bit) (NIH, Bethesda, MD, U.S.A.) donde se obtuvieron las distribuciones de las áreas de intensidad de bandas, mediante la opción analizador de geles.

3.2. Alcance del Objetivo 2

Los pasos para alcanzar el segundo objetivo propuesto fueron los siguientes (Figura 3.2)



Figura 3.2: Procedimientos para el alcance del objetivo 2.

La adquisición y manipulación de las muestras se replica a los puntos 3.1.1 y 3.1.2.

3.2.1. Desarrollo de protocolos de liofilización en muestras de hAM.

Fueron desarrollados 4 Protocolos de liofilización en muestras de hAM de 4x4 cm equivalente a muestras de 0,9 mg (las masas se observan en el apartado anexos). Cada protocolo fue desarrollado por triplicado.

- *hAM íntegra liofilizada (ihAM)*: para la obtención del grupo control, las muestras íntegras fueron liofilizadas (Ilshin biobase, TFD5503 Benchtop freeze dryer - 55°C, Korea) durante 18 hrs.
- *hAM con trehalosa liofilizada (thAM)*: las muestras fueron saturadas en trehalosa al 0,25 M en solución salina a temperatura ambiente durante 30 min. y posteriormente fueron liofilizadas durante 18 hrs.
- *hAM particulada liofilizada (phAM)*: las muestras fueron pulverizadas mediante el uso de N₂ en mortero de cerámica hasta obtener un polvo fino, posteriormente se incorporaron 2 mL de solución salina balanceada (EBSS) + 5 µl de CIP en 0,5 gr. de hAM pulverizada y posteriormente fueron liofilizadas durante 18 hrs.
- *hAM crioconservada liofilizada (chAM)*: las muestras fueron crioconservadas a -80°C durante 72 hrs. y posteriormente fueron liofilizadas durante 18 hrs.

3.2.2. Protocolo de pulverización en muestras de hAM.

Las muestras obtenidas de los protocolos de liofilización fueron pulverizadas mediante el uso de N₂ en mortero de cerámica hasta obtener un polvo fino. Posteriormente cada protocolo fue suspendido en 1 mL de buffer B4-B. La cuantificación de proteínas y posterior precipitado mediante metanol/cloroformo, así como también la caracterización según pesos moleculares mediante E-1D se replicaron a los puntos 3.1.4, 3.1.5 y 3.1.6 respectivamente.

Las muestras obtenidas de los protocolos ihAM, thAM y chAM fueron almacenadas de forma individual en un tubo Eppendorf de 1,5 ml rotulados y posteriormente todos depositados en un tubo Falcon de 15 ml y fueron conservadas a temperatura ambiente, en una zona libre de humedad y oscuridad, durante 6 meses. La cuantificación de proteínas y posterior precipitado mediante metanol/cloroformo, así como también la caracterización según pesos moleculares mediante E-1D se replicaron a los puntos 3.1.4, 3.1.5 y 3.1.6 respectivamente.

3.3. Alcance del Objetivo 3.

Los pasos para alcanzar el tercer objetivo propuesto fueron los siguientes (Figura 3.3)

3.3.1. Análisis proteómico de la muestra de hAM.

Para el análisis proteómico se utilizó una muestra de hAM de 4x4 cm se utilizó el protocolo B4-B y el protocolo integro (ihAM). Una vez obtenido un polvo fino la muestra fue almacenada en oscuridad y a temperatura ambiente en un tubo Eppendorf de 1,5 ml rotulado y posteriormente trasladado al Parc Científic de Madrid, España, para su posterior análisis.

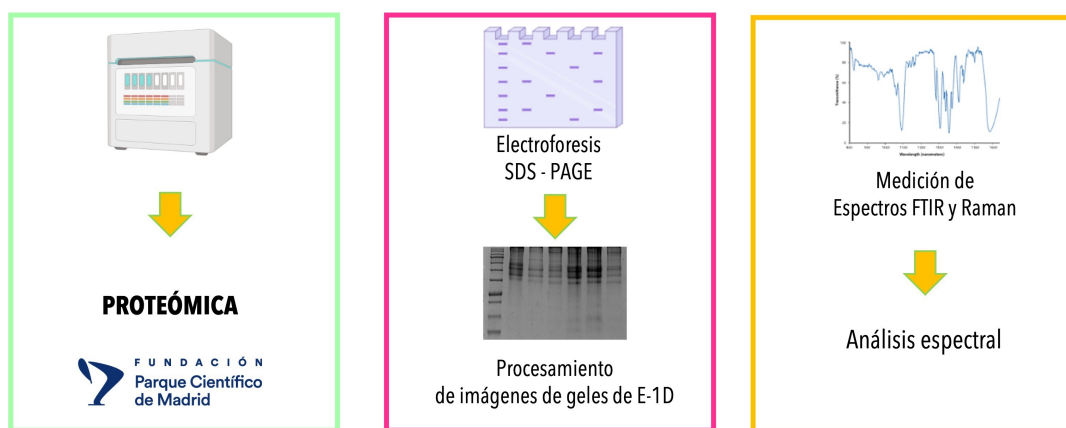


Figura 3.3: Procedimientos para el alcance del objetivo 3.

3.3.1.1. Digestión de proteínas y procedimiento analítico con LC-MSMS.

La muestra se resuspendió en urea 4M y 50 nM de NH_4HCO_3 y luego se sonicó en un baño ultrasónico. La cuantificación de las proteínas totales se realizó mediante el ensayo de proteínas Pierce™ 660 nm y 4,9 μg de proteína de ihAM y fueron digeridas manualmente. Las muestras fueron reducidas (DTT 20 mM en 50 mM NH_4HCO_3 ; 60 min, 32°C) y alquiladas (55 mM de yodoacetamida en 50 mM de NH_4HCO_3 ; 30 min a 25°C, en oscuridad). Posteriormente, las muestras se diluyeron en urea 1M con tampón de 50 mM NH_4HCO_3 y las proteínas fueron digeridos durante 2 h. con tripsina (Sequence grade added porcine Trypsin, Promega; pH 8, 32°C) y luego se digirió durante toda la noche con la misma enzima. Las mezclas peptídicas resultantes se limpiaron con punta C18 (PolyLCInc.) según protocolo del fabricante. Finalmente, la solución de mezcla de péptidos limpia se secó y almacenó a -20°C hasta el análisis LCMS (cromatografía líquida-espectrometría de masas).

La mezcla de péptidos secos se analizó en un cromatógrafo líquido nanoAcquity (Waters) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Lo digerido fue resuspendido en solución de FA al 1% y se inyectó una alícuota para separación cromatográfica. Los péptidos fueron retenidos en una columna Symmetry C18TM (5 µl 180 µm x 20 mm; Waters) y se separaron usando una columna capilar de fase inversa C18 (columna ACQUITY UPLC BEH; 130 Å, 1,7 µm, 75 µm x 250 mm, Aguas). El gradiente utilizado para la elución de los péptidos fue de 1 a 40% B en 60 minutos, seguido de un gradiente de 40% a 60% B en 10 min. (A: 0,1% FA; B:100% ACN, 0,1 % FA; caudal: 250 nL/min). Temperatura de la columna: 40°C.

Los péptidos eluidos se sometieron a ionización por electropulverización en una aguja emisora (Waters) con un voltaje aplicado de 2200V. Las masas peptídicas (m/z 300-1600) se analizaron en modo dependiente de datos en el que se adquirió un Scan MS completo en el Orbitrap con una resolución de 60,000 FWHM a 400m/z. Se seleccionaron hasta el decimoquinto péptido más abundante (intensidad mínima de 500) de cada escaneo de MS y luego se fragmentaron en la trampa de iones lineal usando CID (38% de energía de colisión normalizada) con helio como gas de colisión. Los iones seleccionados para la fragmentación MS/MS se excluyeron dinámicamente durante 10 s. Los ajustes de tiempo de escaneo fueron: Full MS: 250 ms (1 microscan) y MSn: 120 ms. Los archivos de datos. raw generados se recopilaron con ThermoXcalibur (v.2.2).

3.3.1.2. Análisis de datos.

Búsqueda en bases de datos e identificación de proteínas.

Los archivos de datos. raw obtenidos en los análisis de espectrometría de masas se utilizaron para buscar en una versión modificada de la base de datos pública SwissProt-human con una pequeña base de datos que contenía contaminantes de laboratorio. La búsqueda en la base de datos se realizó con el motor de búsqueda Mascot usando Thermo Proteome Discover (v.1.4.1.14). Se aplicaron los siguientes parámetros de búsqueda:

Base de datos/Taxonomía:	SP Human 220127.cont.fasta
Enzima:	Tripsina
Missed cleavage:	2
Modificaciones fijas:	Carbamidometil de cisteína Oxidación de metionina,
Modificaciones variables:	desamidación de asparagina, desamidación de glutamina
Tolerancia a los péptidos:	10 ppm y 0,6 Da (respectivamente para espectros MS y MS/MS)
Percolator:	Objetivo FDR (Estricto): 0.01. FDR objetivo (relajado): 0,05 Validación basada en q-Value.

Para mejorar la sensibilidad de la búsqueda en la base de datos, Percolator (máquina de aprendizaje semisupervisado) se usó con el fin de discriminar las coincidencias de espectro de péptidos correctas de las incorrectas. Percolator asigna un valor q a cada espectro, que se define como el FDR mínimo en el que la identificación se considera correcta. Estos valores-q se estiman utilizando la distribución de puntajes de la búsqueda en la base de datos.

Los resultados obtenidos con la búsqueda Sequest HT se visualizaron en Proteome Discoverer (v.1.4.1.14). Los resultados han sido filtrados por lo que solo las proteínas identificadas con al menos 2 péptidos ($\text{FDR} \leq 1\%$) fueron incluidas.

Las funciones de las proteínas fueron obtenidas desde la base de datos abierta UniProt.org.

3.3.2 Medición de espectros vibratorios.

Muestras de hAM de 4x4 cm fueron sometidas a los protocolos de liofilización y pulverización descritos previamente, sin embargo, el protocolo phAM presentó adaptaciones. El protocolo phAM fue incorporada a 2 mL de solución salina balanceada (EBSS) + 5 μL de CIP y fueron liofilizados durante 18 hrs. Las muestras obtenidas fueron pulverizadas mediante el uso de N_2 en mortero de cuarzo hasta obtener un polvo fino. Fueron almacenados a temperatura ambiente en oscuridad hasta su posterior procesamiento.

3.3.2.1. Medición de espectros FTIR.

Una pequeña fracción de la muestra obtenida de cada uno de los protocolos de hAM liofilizada y pulverizada, fue sometida a la medición de espectros infrarrojos mediante un espectrofotómetro ATR-FTIR (Shimadzu, IRSpirit, Kyoto, Japón). Los espectros se realizaron a 24°C con una humedad relativa del 40% con un barrido desde los 400 a 400 cm^{-1} . Los espectros se recogieron con un promedio de 10 escaneos a una resolución de 2 cm^{-1} . Las mediciones se realizaron por triplicado.

3.3.2.2. Medición de espectros Raman.

Una pequeña fracción de la muestra obtenida de cada uno de los protocolos de hAM liofilizada y pulverizada, fue sometida a la medición de espectros en un microscopio confocal Raman Witec Alpha 300. En todas las mediciones se utilizó un láser Ar con una longitud de onda de excitación de 532 nm, un objetivo de microscopio 20x con una apertura numérica de 0,75 y una cámara CCD enfriada eléctricamente. La potencia del láser sobre las muestras fue de 1,4 mW, la resolución espectral fue de 4 cm^{-1} y se realizaron 32 escaneos por segundo. Los espectros se registraron en la región de 800-1800 cm^{-1} .

Debido a la baja sensibilidad de la técnica para el estudio de tejidos biológicos, específicamente el amnios es que se hizo uso de la técnica Raman SHINERS. Esta técnica nos permite medir espectros mediante el uso de nanopartículas recubiertas de dióxido de silicio (SiO_2).

3.3.2.3. Síntesis de SHINS de plata.

Este procedimiento se ejecutó a partir de la síntesis desarrollada por Lee-Meisel [Lee-Meisel (1982)]. En un balón de 500 mL se disolvieron 90 mg de AgNO_3 en 490 mL de agua. Una vez realizado esto se llevó a ebullición y se adicionaron 10 mL de una solución de citrato de sodio 38,8 mM y mantuvo durante 1 hr. Posteriormente se realizó una selección del tamaño de las nanopartículas mediante centrifugado a 1000 rpm durante

10 minutos, apartando aquellas nanopartículas de 60 nm de diámetro aproximadamente. El sobrenadante se retiró mientras que el precipitado con nanopartículas de mayor tamaño fue eliminado.

Para el desarrollo del recubrimiento de las nanopartículas con SiO₂ se realizó a partir de la propuesta realizada por Liu. Al volumen, cantidad de TEOS y tiempo de centrifugación se le realizaron adaptaciones con respecto a lo reportado. Se tomaron 9 mL de coloide centrifugado y se llevaron a un frasco ámbar de 100 mL. Se agregaron 45 mL de etanol y posteriormente 1,25 mL de amoníaco al 30%. La solución se homogeneizó y se le adicionaron 300 µl de TEOS 40 mM. La agitación de la solución durante todo el procedimiento fue vigorosa. Para finalizar, se dejó reposar por 24 horas. El coloide obtenido se concentró mediante centrifugación a 5000 rpm durante 40 min, el sobrenadante fue eliminado mientras que se colectó el precipitado.

3.4. Análisis Estadístico.

Para cada experimento, las muestras de hAM se derivaron de un donante. Para los protocolos de liofilización y pulverización se utilizaron muestras por triplicado ($n \geq 3$) como repeticiones biológicas y los datos se presentan como media $\pm$ desviación estándar. El análisis estadístico para comparación de medias se realizó mediante el test de ANOVA de una vía para determinar la significancia estadística. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $p < 0,05$. La ejecución de cálculos y desarrollo de las pruebas estadísticas se utilizó el software Python versión 3.9.7 con las librerías Numpy, Pandas y Scipy. Se consideró el valor- $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Capítulo 4

4. Resultados

Objetivo 1: Estandarizar un protocolo de extracción de proteínas óptimo en muestras de hAM.

4.1. Cuantificación de proteínas para buffer de extracción en hAM.

Con respecto al alcance del primero objetivo planteado, es decir, evaluar distintos protocolos para una extracción óptima de proteínas de la hAM, se cuantificaron las proteínas totales utilizando ácido bicinonínico (ensayo BCA Pierce™).

Los resultados obtenidos muestran que utilizando el protocolo B4-B se logró obtener una concentración mayor o igual a 2 µg/µl de proteínas totales, por lo cual se seleccionó éste para continuar con los análisis siguientes. Los resultados obtenidos se muestran a continuación (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1: Cuantificación de proteínas totales de hAM en buffer de extracción. Normalización (Norm) con 0,08 u.a.; con 0,11 u.a.*; factor de dilución (FD) de 1:5.

Prot.	Triplicado			X	Norm.	µg/µl	FD=5	DS
B1-B	0,524	0,466	0,545	0,512	0,402*	0,371	1,9	0,041
B1-S	0,453	0,401	0,463	0,439	0,329*	0,298	1,5	0,033
B2-B	0,168	0,165	0,085	0,139	0,058	-0,091	-0,5	0,04
B2-S	0,126	0,121	0,042	0,096	0,015	-0,129	-0,6	0,04
B3-B	0,171	0,157	0,180	0,170	0,052	-0,14	-0,3	0,001
B3-S	0,149	0,175	0,160	0,162	0,043	-0,15	-0,3	0,001
B4-B	0,613	0,526	0,471	0,537	0,427*	0,396	2,0	0,072
B4-S	0,482	0,481	0,487	0,483	0,373*	0,342	1,7	0,003

4.2. Perfiles de proteínas de hAM en geles SDS-PAGE.

Con el fin de evaluar el perfil de proteínas se realizó una electroforesis en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) para los buffers B1 y B2 ya que los protocolos restantes no lograron extraer proteínas por lo cual se desestimaron. En la Figura 4.1 se puede observar un perfil que indica presencia de proteínas que van desde los 10 a los 250 kDa en los cuatro protocolos. Sin embargo, con los protocolos B4-B y B4-S (Figura 4.1 pocillo A y B, respectivamente) se logran visualizar proteínas de bajo peso molecular. Con el fin de asegurar que sólo se tienen proteínas, se realizó una precipitación de éstas utilizando metanol/cloroformo (Figura 4.1).

En cuanto a la distribución de la densidad según el área (indicado en unidad %) de las bandas registradas como se observa en el Cuadro 4.2, podemos apreciar que ésta es mayor en el protocolo B4-B. Además de que en términos generales las bandas aisladas presentaron mayor % de área en el buffer B4. En consideración a lo anteriormente mencionado es que el buffer B4-B demostró tener mayor eficiencia para la extracción de proteínas en hAM al observar sus perfiles.

Cuadro 4.2: Distribución de las áreas de densidad de bandas en geles SDS-PAGE para el desarrollo de buffer de extracción (valores expresados en valor % del área).

Protocolo	250 kDa	130 kDa	100 kDa	90 kDa	75 kDa	60 kDa	55 kDa	15 kDa	X	DS
B1-B	2,750	2,498	1,268	3,859	4,681	3,047	2,447	<i>ausente</i>	2,569	1,449
B1-S	3,468	1,295	1,149	5,344	6,303	3,033	1,803	<i>ausente</i>	2,799	2,173
B4-B	5,53	2,712	1,691	4,259	6,394	3,872	3,39	0,983	3,603	1,827
B4-S	5,929	3,145	1,642	4,198	5,037	3,795	3,696	0,784	3,528	1,683

Los densitogramas de cada muestra se obtuvieron de forma aislada para poder corroborar la distribución de la densidad por área (%). En los pocillos en los que se utilizó buffer B4 (Figura 4.3) se observan bandas entre los 10-15 kDa los cuales no logran visualizarse en el buffer B1 (Figura 4.2). El estándar se utilizó únicamente como referencia para conocer los pesos moleculares y no como un control para la medición de la densidad.

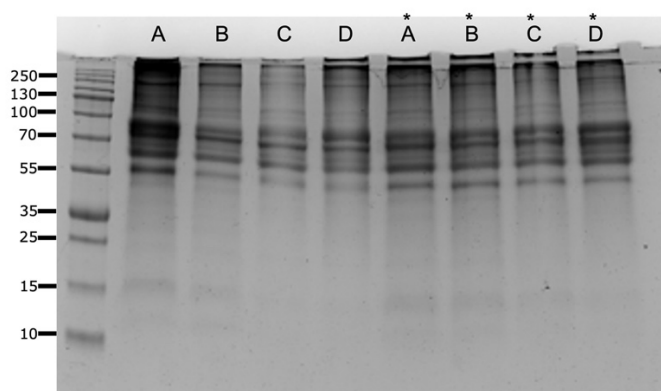


Figura 4.1: Gel SDS-PAGE al 15% de buffer para extracción de proteínas. A) B4-B, B) B4-S, C) B1-B y D) B1-S. Método con Azul de Coomassie. *Extracción de proteínas totales con metanol/cloroformo.

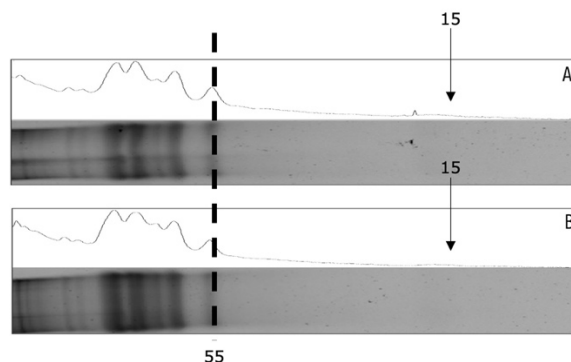


Figura 4.2: Densitograma de protocolos de buffer para extracción de proteínas totales, con metanol/cloroformo. A) B1-B, B) B1-S.

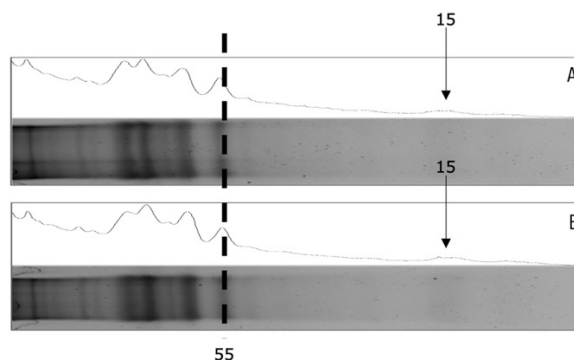


Figura 4.3: Densitograma de protocolos de buffer para extracción de proteínas totales, con metanol/cloroformo. A) B4-B, B) B4-S

Objetivo 2: Desarrollar protocolos de liofilización y pulverización en muestras de hAM.

4.3. Cuantificación de proteínas en protocolos de liofilización y pulverización.

Con respecto al alcance del segundo objetivo, se cuantificaron las proteínas totales (Cuadro 4.3). Los resultados obtenidos muestran que utilizando los protocolos thAM y chAM se logró obtener una concentración mayor o igual a 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas totales. Como se puede observar, existe diferencia entre el grupo control y el grupo saturado en trehalosa (thAM), ya que este último demostró una leve, pero mayor cuantificación de proteínas la cual fue estadísticamente significativa (Cuadro 4.3).

Cuadro 4.3: Cuantificación de proteínas de hAM liofilizada y pulverizada. Normalización (Norm) con 0,010585 u.a., factor de dilución (FD) de 1:5. * $p=0.02$.

Prot.	Triplicado			X	Norm.	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	FD=5	X	DS
ihAM	0,332	0,314	0,276	0,307	0,202	0,160	0,80	1,0	0,028
ihAM	0,436	0,414	0,457	0,436	0,330	0,288	1,44		0,021
ihAM	0,265	0,250	0,303	0,273	0,167	0,125	0,63		0,027
*thAM	0,467	0,561	0,565	0,531	0,425	0,384	1,92	1,5	0,056
*thAM	0,337	0,323	0,324	0,328	0,222	0,180	0,90		0,008
*thAM	0,493	0,470	0,412	0,458	0,352	0,311	1,56		0,042
phAM	0,133	0,143	0,145	0,140	0,035	0	0	0	0,060
phAM	0,138	0,138	0,140	0,139	0,033	0	0		0,010
phAM	0,114	0,113	0,119	0,115	0,010	0	0		0,030
chAM	0,200	0,204	0,207	0,203	0,098	0,055	0,28	1,2	0,003
chAM	0,422	0,450	0,432	0,435	0,329	0,287	1,44		0,140
chAM	0,517	0,492	0,507	0,505	0,400	0,358	1,79		0,012

4.4. Perfiles de proteínas de hAM en geles SDS-PAGE.

Con el fin de obtener el perfil de proteínas de los protocolos desarrollados (ihAM, thAM, chAM), se realizó una electroforesis en condiciones denaturantes (SDS-PAGE). Debido a que la cuantificación de proteínas fue nula se excluyó el protocolo phAM. En la Figura 4.4 se puede observar un perfil de proteínas que van desde los 10 kDa hasta los 250 kDa en los protocolos ihAM, thAM y chAM. Se realizó una precipitación de éstas utilizando metanol/cloroformo y se logró ver perfiles similares de proteínas (Figura 4.4).

Con respecto a la distribución de la densidad por área (%) observado en el procesamiento de imágenes de los geles de electroforesis para los protocolos thAM y chAM (Cuadro 4.4) es que podemos observar que en este último hubo una mayor área al comparar las medias totales con el grupo thAM. Por otro lado, existen bandas con mayor representatividad relativa en proteínas que tributan a la MEC, pudiéndose explicar de forma indirecta (en ningún caso de forma categórica) que posee una mayor área de intensidad en proteínas de ≈ 23 kDa y 55 kDa. Además, el grupo chAM presentó una banda en el orden de los 90 kDa que no se observa presente en el grupo thAM.

La distribución de la densidad del área de las bandas en imágenes de geles de E-1D para el desarrollo de protocolos de liofilización y pulverización, se pueden observar en el Cuadro 4.4.

Cuadro 4.4: Distribución de las áreas de densidad de bandas en geles SDS-PAGE en protocolos de liofilización y pulverización de la hAM.

Protocolo	250 kDa	130 kDa	100 kDa	90 kDa	75 kDa	60 kDa	55 kDa	15 kDa	X	DS
ihAM	3,040	6,507	2,768	1,604	10,180	6,292	3,282	1,628	4,413	2,99
thAM	8,956	11,227	5,644	ausente	13,536	5,832	3,086	0,663	6,992	4,529
chAM	6,636	12,649	4,653	1,397	10,346	5,880	9,495	ausente	7,294	3,808

***Los datos de densidad relativa para el grupo ihAM no son comparativos ya que pertenecen a otro gel y por lo tanto a otra imagen, sin embargo, nos señalan la presencia de la banda al peso molecular respectivo.*

Los densitogramas representativos de cada protocolo de liofilización y pulverización se obtuvieron de forma aislada para poder corroborar la distribución de la densidad por área, para aquellas bandas presentes que no logran visualizarse con facilidad, observándose en los tres protocolos bandas que se concentran sobre los 55 kDa como se aprecia en la Figura 4.5, 4.6 y 4.7, para los protocolos ihAM, thAM y chAM, respectivamente. Sin embargo, el protocolo ihAM (Figura 4.5) nos permite visualizar proteínas de bajo peso molecular.

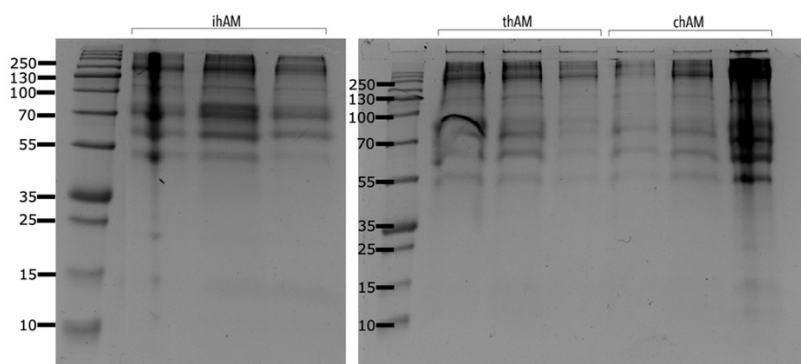


Figura 4.4: Gel SDS-PAGE al 15% en protocolos de liofilización y pulverización de la hAM, mediante extracción de proteínas totales con metanol/cloroformo.

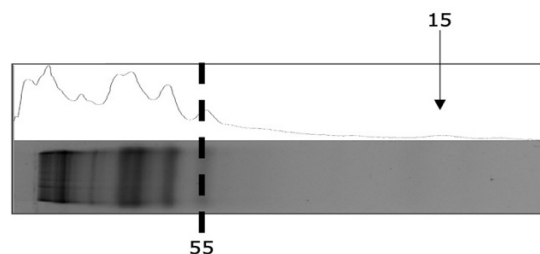


Figura 4.5: Densitograma del grupo ihAM mediante extracción de proteínas totales con metanol/cloroformo.

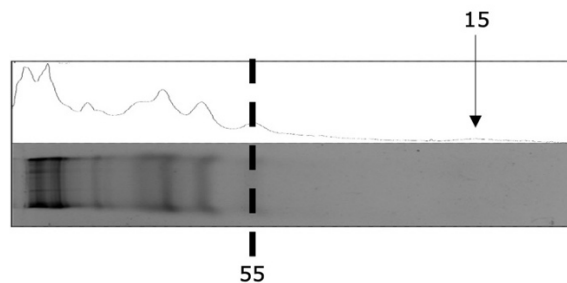


Figura 4.6: Densitograma del grupo thAM mediante extracción de proteínas totales con metanol/cloroformo.

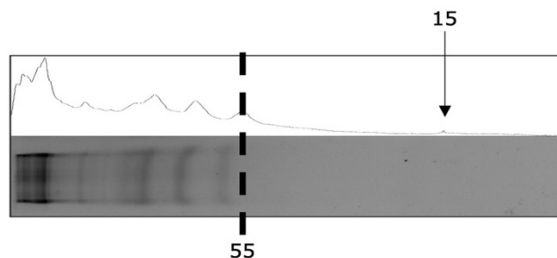


Figura 4.7: Densitograma del grupo chAM mediante extracción de proteínas totales con metanol/cloroformo.

4.5. Cuantificación de proteínas de hAM en geles SDS-PAGE después de 6 meses de seguimiento.

Con respecto al alcance del segundo objetivo, desarrollar distintos protocolos de liofilización y pulverización en hAM, se cuantificaron las proteínas totales utilizando ácido bicinconínico (ensayo BCA Pierce™). Los resultados obtenidos muestran que utilizando los protocolos thAM y chAM se logró obtener una concentración mayor o igual a 0.9 µg/µl de proteínas totales. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 4.5.

Cuadro 4.5: Cuantificación de proteínas en protocolos de liofilización y pulverización a los 6 meses de seguimiento. *p=0.03. Normalización (Norm) con 0,165 u.a. Factor de dilución 1:5

Prot.	Duplicado		Prom	Norm	µg/µl	FD=5	X	DS
ihAM	0,377	0,363	0,37	0,205	0,190	0,95	0,8	0,010
ihAM	0,528	0,083	0,305	0,140	0,125	0,63		0,315
ihAM	0,345	0,333	0,339	0,174	0,159	0,79		0,008
*thAM	0,681	0,622	0,651	0,486	0,472	2,36	1,5	0,042
*thAM	0,312	0,334	0,323	0,158	0,143	0,71		0,016
*thAM	0,465	0,481	0,473	0,308	0,293	1,46		0,011
chAM	0,197	0,188	0,192	0,027	0,012	0,06	0,9	0,006
chAM	0,38	0,391	0,385	0,220	0,205	1,03		0,008
chAM	0,496	0,513	0,504	0,339	0,324	1,62		0,012

4.6. Perfiles de proteínas de hAM en geles SDS-PAGE después de 6 meses de seguimiento.

Con el fin de evaluar el perfil de proteínas con los 3 protocolos desarrollados anteriormente luego de 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente, se realizó una electroforesis en condiciones denaturantes (SDS-PAGE). En la Figura 4.8 se puede observar presencia de proteínas que van desde los 10 hasta los 250 kDa en los protocolos ihAM, thAM y chAM. Se realizó una precipitación de éstas utilizando metanol/cloroformo y

se lograron ver perfiles de proteínas similares (Figura 4.8). La distribución de las áreas de intensidad de bandas en imágenes de geles de E-1D para el desarrollo de protocolos de liofilización y pulverización, se pueden observar en el Cuadro 4.6.

Cuadro 4.6: Distribución de las áreas de densidad de bandas en geles SDS-PAGE en protocolos de liofilización y pulverización posterior a 6 meses de seguimiento (valores expresados en valor % del área).

Protocolo	250 kDa	130 kDa	100 kDa	90 kDa	75 kDa	60 kDa	55 kDa	35 kDa	15 kDa	X
ihAM	2,974	2,259	1,797	1,162	1,305	3,068	4,319	4,617	0,650	2,461
thAM	2,091	1,292	1,829	1,008	0,926	2,315	3,807	4,295	ausente	2,195
chAM	4,388	3,056	3,984	3,801	2,672	4,587	9,399	11,556	ausente	5,430

***Los datos de densidad no son comparativos entre los grupos ya que pertenecen a geles diferentes, sin embargo, nos indican la presencia de las bandas y el peso molecular respectivo.*

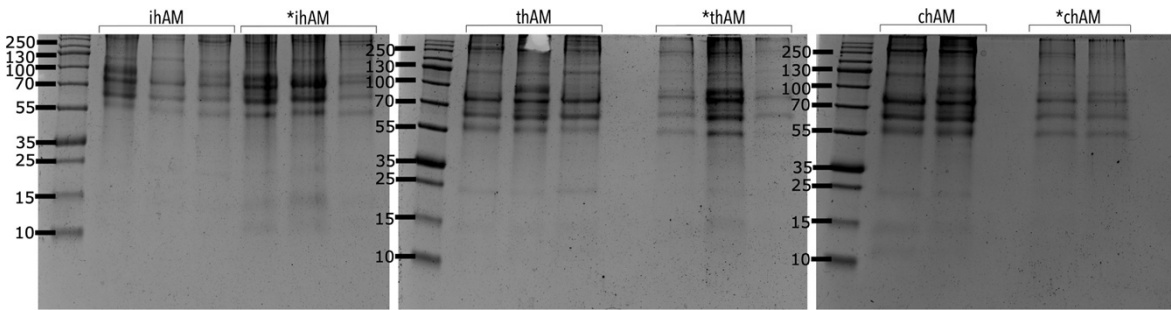


Figura 4.8: Gel SDS-PAGE al 15% en protocolos de liofilización y pulverización.
 * extracción de proteínas totales con metanol/cloroformo.

Los densitogramas representativos de cada protocolo de liofilización y pulverización se obtuvieron de forma aislada para poder corroborar la distribución de la densidad por área sobre todo para aquellas bandas presentes que no logran visualizarse con facilidad, observándose en los tres protocolos bandas claras que se concentran por sobre los 55 kDa como se aprecia en la Figura 4.9, 4.10 y 4.11 para los protocolos ihAM, thAM y chAM, respectivamente.

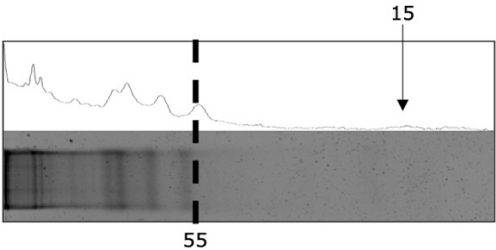


Figura 4.9: Densitograma del grupo ihAM con 6 meses de seguimiento.

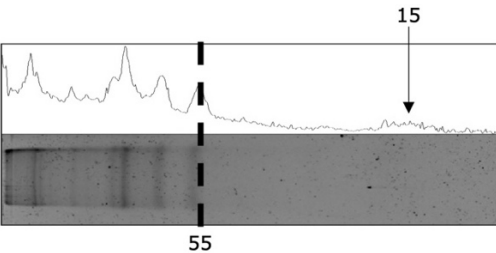


Figura 4.10: Densitograma del grupo thAM con 6 meses de seguimiento.

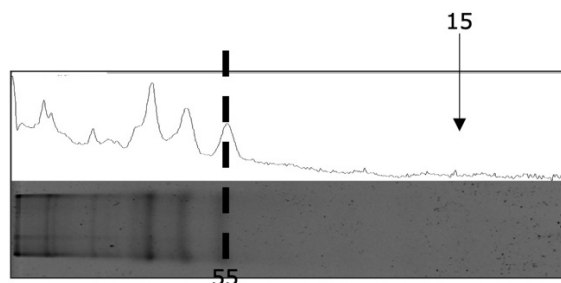


Figura 4.11: Densitograma del grupo chAM con 6 meses de seguimiento.

Objetivo 3: Identificar los componentes moleculares de la hAM tras ser sometida a protocolos de liofilización y de pulverización.

4.7. Caracterización proteómica de la hAM.

En cuanto al alcance del tercer objetivo, se realizó estudio proteómico de la hAM. A partir de los hallazgos observados previamente es que en una muestra de ihAM de 4x4 cm se hizo extracción de proteínas totales con el Buffer B4-B. Las proteínas detectadas fueron 295 y se ubican entre los 10,2 kDa y los 628 kDa. Aquellas con pesos superiores a 70 kDa fueron predominantes a proteínas de la MEC, concentrándose entre los 130 y los 628 kDa (Figura 4.7 y Figura 4.8). Proteínas con pesos moleculares inferiores adquirieron mayor relación con la función inmunitaria agrupándose entre los 14 y 10 kDa (Figura 4.20). La distribución de las proteínas según peso molecular y según función determinada, se pueden ver a continuación:

Cuadro 4.7: Proteínas de 250 kDa o más en el protocolo ihAM.

Peso molecular estándar (kDa)	Proteínas
250 o mas	Fibronectina, colágeno α3 (VI), proteína asociada a la diferenciación de neuroblasto, fibrilina, plectina, tenascina-X, espectrina de cadena α, epiplaquina, colágeno α1 (XII), Filamina-β, heparán sulfato específico de la membrana basal, desmoplaquina, laminina de subunidad α-3, espectrina de cadena β, colágeno α 1 (VII), proteína central de versican, proteína AHNK2, laminina de subunidad α-5, hornerina.

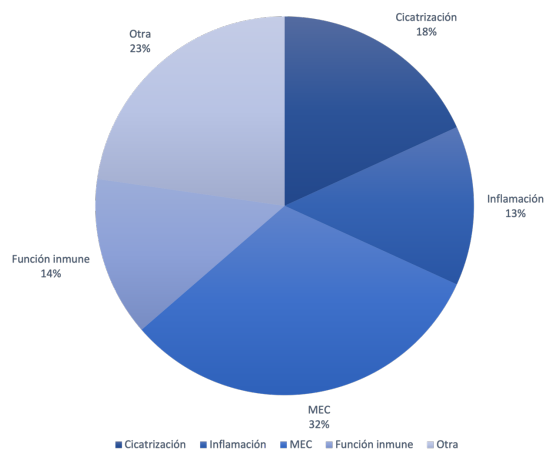


Figura 4.12: Funciones determinadas en proteínas de 250 kDa o más del protocolo ihAM.

Cuadro 4.8: Proteínas de 130 a 249 kDa en el protocolo ihAM.

Peso molecular estándar (kDa)	Proteínas
130 a 249	Nidogeno-1, colágeno α1(I), colágeno α2 (V), nidogeno-2, colágeno α1 (IV), macroglobulina α2 similar a proteína 1, antígeno CD109, proteína de unión del TGF-β4, UDP-glucosa: glicoproteína glucosiltransferasa 1, laminina de subunidad gamma-1, colágeno α1 (V), proteína similar a la activación GTPasa Ras IQGAP 1, clatrina de cadena pesada 1, proteína de unión del TGF-β2, laminina de subunidad β-1, periplaquina, agrina, miosina-14, envoplaquina, tenascina.

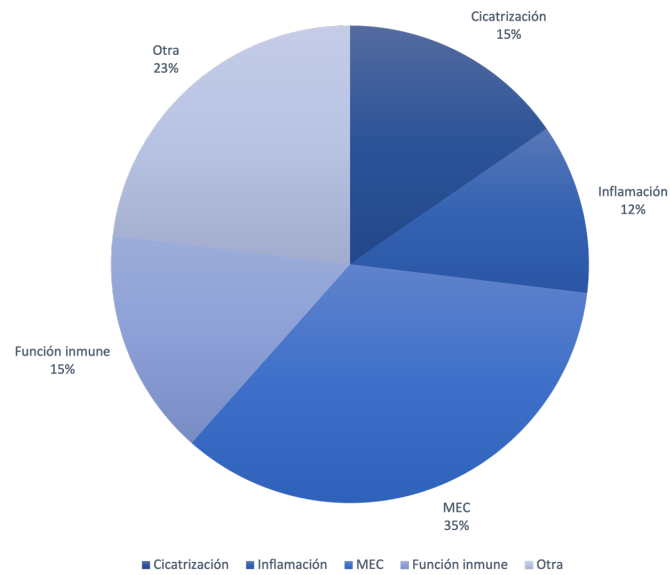


Figura 4.13: Funciones determinadas en proteínas de 130 a 249 kDa del protocolo ihAM.

Cuadro 4.9: Proteínas de 100 a 129 kDa en el protocolo ihAM.

Peso molecular estándar (kDa)	Proteínas
100 - 129	Colágeno α -1 (VI), trombospondina-1, α -actinina-4, colágeno α -2 (VI), colágeno α -2 (I), α -glucosidasa AB neutra, integrina α -6, laminina de subunidad β -3, integrina α -V, proteína similar a ADAMTS, Nesh-SH3, desmogleina-2, aminopeptidasa N, 2-oxoglutarato deshidrogenasa, trombospondina tipo-1, dominio que contiene proteína 4.

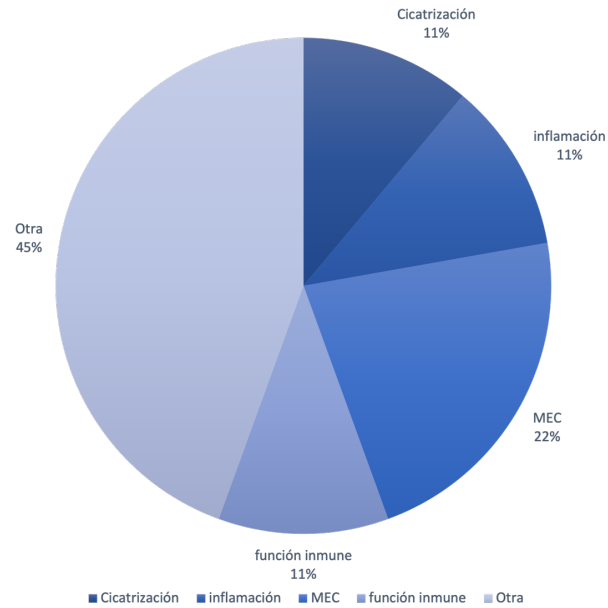


Figura 4.14: Funciones determinadas en proteínas de 100 a 129 kDa del protocolo ihAM.

Cuadro 4.10: Proteínas de 70 a 99 kDa en el protocolo ihAM.

Peso molecular estándar (kDa)	Proteínas
70 – 99	TGF-β4 inducido por la proteína Ig-h3, prelamina-A/C, plasminógeno, chaperona BiP del retículo endoplasmático, gelsolina, proteína de choque térmico 1A, periostina, proteína-glutamina γ-glutamyltransferasa 2, neprilisina, proteína disulfide-isomerasa A4, proteína de choque térmico de 70 KDa, subunidad α de la enzima trifuncional mitocondrial, placofilina-3, procolágeno multifuncional, lisina hidroxilasa y glicosiltransferasa, LH3, proteína de estrés mitocondrial 70, aconitato hidratasa mitocondrial, integrina β-6, fibulina-1, subunidad de la flavoproteínas succinato deshidrogenasa [ubiquinona], proteína de choque térmico de 75 kDa, Integrina β-1, cadena A del factor VIII de coagulación, ATPasa del retículo endoplasmático de transición, endoplasmina, placoglobina de unión.

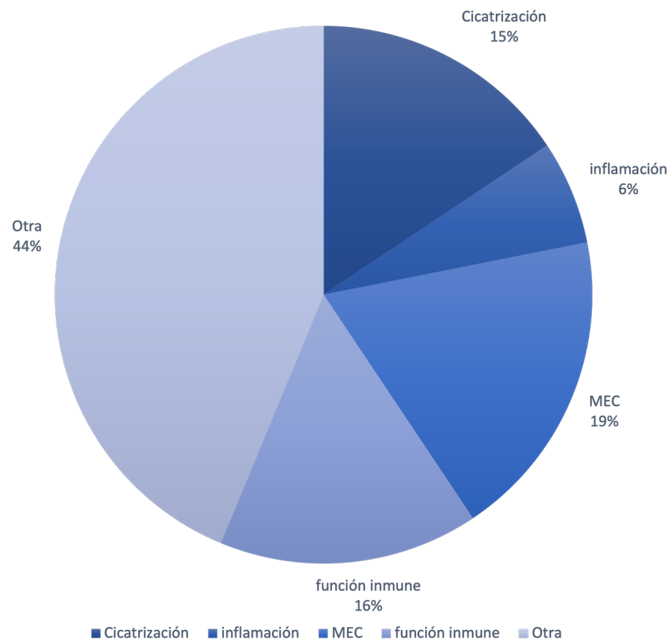


Figura 4.15: Funciones determinadas en proteínas de 70 a 99 kDa del protocolo ihAM.

Cuadro 4.11: Proteínas de 55 a 69 kDa en el protocolo ihAM.

Peso molecular estándar (kDa)	Proteínas
55 – 69	Queratina, tipo I citoesquelético 24, proteína secretora rica en cisteína LCCL que contiene dominio 2, ATP sintasa subunidad β , mitocondrial, prenilecisteína oxidasa 1, proteína disulfuro-isomerasa A3, proteína disulfuro-isomerasa, piruvato quinasa PKM, queratina tipo I citoesquelética 10, glucosidasa 2, subunidad β , y subunidad α de la ATP sintasa mitocondrial, queratina tipo II citoesquelético 6A, subunidad α -2 de prolil 4-hidroxilasa, subunidad α -1 de prolil 4-hidroxilasa, proteína de choque térmico mitocondrial de 60 kDa, tripeptidil-peptidasa 1, glutamato deshidrogenasa 1, mitocondrial, queratina tipo I citoesquelética 9, queratina tipo II citoesquelética 5, antígeno CD166, queratina tipo II citoesquelética 2 epidérmica, proteína 29 que contiene motivo tripartito, proteína 4 asociada al citoesqueleto, queratina tipo II citoesquelética 1, lamina-B1, calnexina, mesotelina, albúmina, ezrina, lamina- β 2.

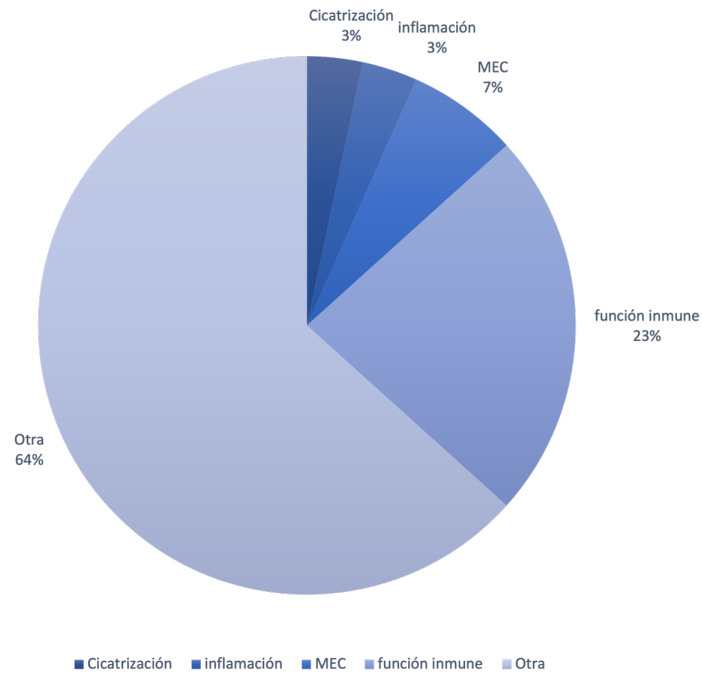


Figura 4.16: Funciones determinadas en proteínas de 55 a 69 kDa del protocolo ihAM.

Cuadro 4.12: Proteínas de 35 a 54 kDa en el protocolo ihAM.

Peso molecular estándar (kDa)	Proteínas
35 - 54	Subunidad α de la flavoproteína mitocondrial de transferencia de electrones, malato deshidrogenasa mitocondrial transductor de señal de calcio asociado a tumor 2, delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoil-CoA isomerasa mitocondrial, anexina A4, anexina A5, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, 2,4-dienoil-CoA reductasa [productora de (3E)-enoil-CoA] mitocondrial, inmunoglobulina pesada constante gamma 1, anexina A3, L-lactato deshidrogenasa cadena A, reticulocalbina 2, calumenina, catepsina B, erlin-2, β -2-glucoproteína 1, lumican, ribonucleoproteína nuclear heterogénea D0, proteína similar a la estomatina 2 mitocondrial, anexina A2, anexina A1, fructosa-bifosfato aldolasa A, tropomodulina-3, histona central macro-H2A.1, decorin, proteína de unión nucleótidos de guanina G(i) subunidad α -2, factor acelerador de la descomposición del complemento, biglican, actina citoplasmática 1, proteína similar a la β -actina 2, actina músculo cardíaco α 1, proteína asociada a caveolas 1, prolargina, nexina derivada de glía, queratina tipo I citoesquelética 19, catepsina D, fosfoglicerato quinasa 1, ceramidasa ácida, proteína relacionada con actina 2, proteína transmembrana 43, inhibidor del activador del plasminógeno 1, proteína de unión a ARN, serpin H1, α 1-antitripsina, proteína residente del retículo endoplásmico 44, α -enolasa, proteína relacionada con actina 3, aspartato aminotransferasa mitocondrial, proteína 5 que contiene el dominio de tioredoxina, queratina, tipo I citoesquelética 18, queratina, tipo I citoesquelética 17, proteína disulfuro-isomerasa A6, calreticulina, residuo de dihidrolipoilisina- succiniltransferasa componente del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa mitocondrial, inmunoglobulina de constante pesada μ , osteomodulina, cadena β de tubulina, cadena de tubulina α -4A, factor de elongación 1- α 1, dolcil-difosfooligosacarido-proteína glicosiltransferasa subunidad de 48 kDa, queratina tipo I citoesquelética 16, queratina tipo I citoesquelética 14, vimentina, queratina tipo II citoesquelética 8, familia de transportadores de solutos 2, miembro transportador facilitador de glucosa 1, vitronectina, proteína α similar a ERO1.

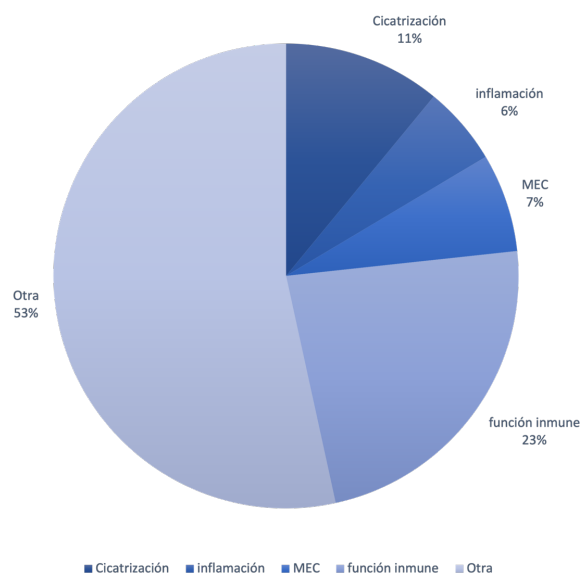


Figura 4.17: Funciones determinadas en proteínas de 35 a 54 kDa del protocolo ihAM.

Cuadro 4.13: Proteínas de 25 a 34 kDa en el protocolo ihAM.

Peso molecular estándar (kDa)	Proteínas
25 – 34	Proteoglicano de medula ósea, interleucina-27 subunidad β , antígeno CD9, glutatión peroxidasa 3, galectina-3, adenilato quinasa 2, mitocondrial, triosafosfato isomerasa, peróxido reductasa dependiente de tioredoxina, mitocondrial, proteína 3 asociada a caveolas, proteína 14-3-3 zeta/delta, 14-3-3 proteína theta, 14-3-3 proteína sigma, transcripción de ARN, proteína de factor de transporte y traducción, 14-3-3 proteína β/α , 14-3-3 proteína gamma, subunidad pequeña de calpaína 1, proteína similar a uroplaquina-3b 2, cadena de tropomiosina α -4, proteína residente del retículo endoplásmico 29, proteína épsilon 14-3-3, proteína ribosomal 60S L7, proteína ribosomal 40S S4, uroplaquina-1b, prohibitina, proteína ribosomal 40S S3a, proteína ribosomal 60S L7a, peroxirredoxina-4, homologo 3 del dosel proteico, proteína 1 del canal selectivo de aniones dependiente del voltaje, apolipoproteína A-I, proteína de unión al subcomponente Q del componente 1 del complemento mitocondrial, enoil-CoA hidratasa, mitocondrial, anión dependiente del voltaje-Proteína de canal selectiva 2, Nucleofosmin, proteína ribosómica L6 60S, subunidad gamma de la ATP sintasa mitocondrial, prohibitina-2, ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas C1/C2, enzima generadora de C- α -formilglicina 2 inactiva, mimecano, NADH-citocromo b5 reductasa 1, NADH-citocromo b5 reductasa 3, proteína ribosómica ácida 60S P0, hidroxilacil-coenzima A deshidrogenasa, mitocondrial, SPARC.

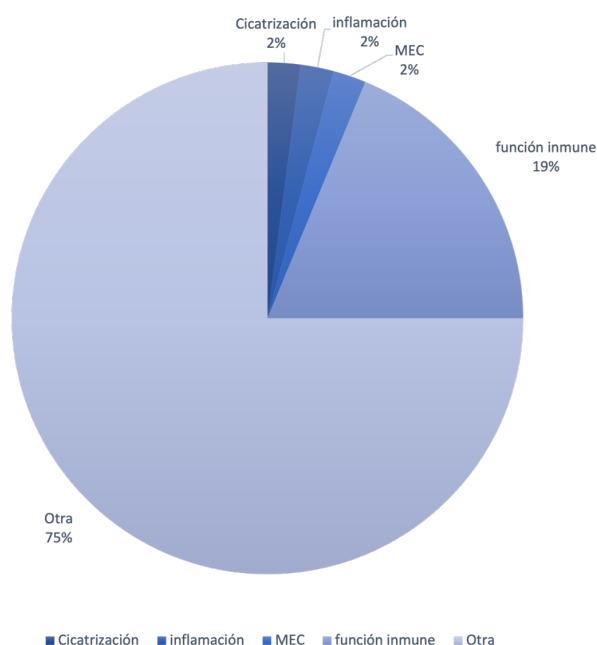


Figura 4.18: Funciones determinadas en proteínas de 25 a 34 kDa del protocolo ihAM.

Cuadro 4.14: Proteínas de 15 a 24 kDa en el protocolo ihAM.

Peso molecular estándar (kDa)	Proteínas
15 - 24	Histona H2AX, subunidad de hemoglobina α , histona H3.1, proteína ribosómica 40S S24, peptidil-prolil cis-trans isomerasa FKBP2, subunidad β de hemoglobina, proteína ribosómica 40S S19, subunidad de hemoglobina gamma-1, lisozima C, polipéptido ligero de miosina 6, proteína ribosómica 40S S15, prostaglandina E, proteína ribosomal 60S L26, proteína ribosómica 60S L12, peptidil-prolil cis-trans isomerasa A, subunidad d de ATP sintasa mitocondrial, proteína ribosómica 40S S10, proteína de gradiente anterior 3, proteína asociada a microfibrilares 5, cadena ligera reguladora de miosina 12A, proteína de gradiente anterior 2 homóloga, cadena α -cristalina B, proteína dosel homólogo 2, histona H1.0, proteína de unión a fosfatidiletanolamina 1, proteína ribosómica 60S L18, histona H1.4, peroxirredoxina-2, eroxirredoxina-5 mitocondrial, peroxirredoxina-1, proteína ribosómica 40S S7, transgelina-2, proteína relacionada con Ras Rab-10, histona H1.5, proteína de choque térmico β -1, proteína ribosómica 40S S5, subunidad O de ATP sintasa, mitocondrial, glutatión S-transferasa P, peptidil-prolil cis-trans isomerasa B, dermatopontina, inhibidor de metaloproteinasas 3, proteína ribosómica 40S S8, superóxido dismutasa [Mn], mitocondrial, proteína corporal multivesicular cargada 4b, proteína transmembrana emp24 que contiene el dominio 10.

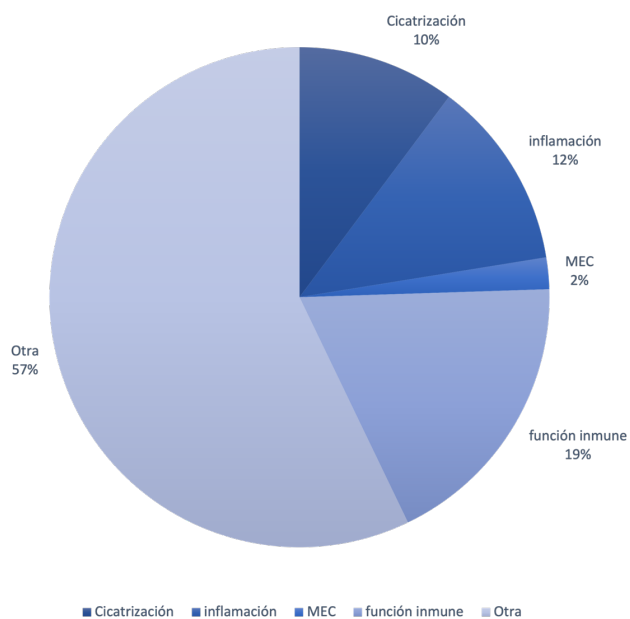


Figura 4.19: Funciones determinadas en proteínas de 15 a 24 kDa del protocolo ihAM.

Cuadro 4.15: Proteínas de 10 a 14 kDa en el protocolo ihAM.

Peso molecular estándar (kDa)	Proteínas
10 - 15	Proteína S100-A4, proteínas de choque térmico mitocondrial de 10 kDa, proteína S100-A10, inmunoglobulina constante lambda 2, histona H4, proteína S100-A13, proteína S100-A4, proteína S100-A11, inmunoglobulina constante kappa, proteína S100-A16, factor inhibidor de la migración de macrófagos, proteína ribosomal 60S L30, NADH subunidad 5 del subcomplejo α deshidrogenasa (ubiquinona) 1, histona H2A.Z, microglobulina β 2, histona H2B tipo 1-K, histona H2B tipo 1-J, histona H2A tipo 2-C, histona H2A tipo 1-B/E, glicoproteína CD59, proteína ribosomal 60S L31, galectina-1, profilina-1.

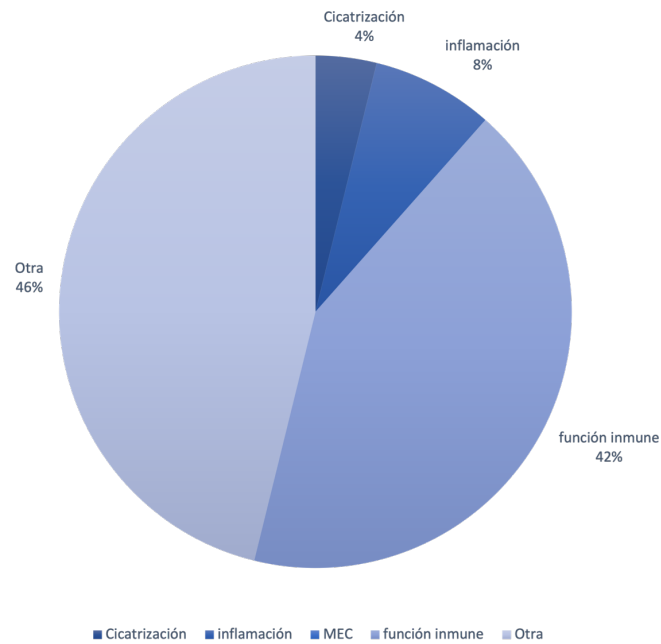


Figura 4.20: Funciones determinadas en proteínas de 10 a 14 kDa del protocolo ihAM.

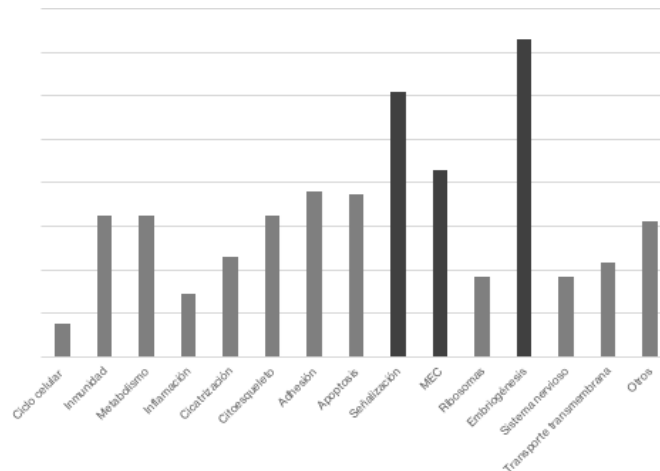


Figura 4.21: Distribución de las principales funciones de las proteínas obtenidas en proteómica del protocolo ihAM.

Al clasificar las proteínas presentes en el protocolo ihAM obtenidas con respecto a los grupos mencionados en el listado del proyecto Matrisome (Cuadro 6.5 y 6.6), encontramos que el grupo de glicoproteínas de la MEC fue el más abundante (37%), seguido de proteínas afiliadas a la MEC (15%) y en tercer lugar el grupo colágeno (14%), lo que señala que ihAM se encuentra muy enriquecida de componentes de la MEC (Figura 4.22).

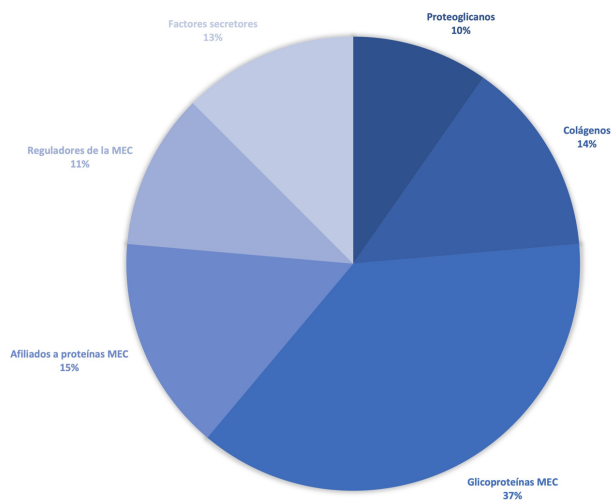


Figura 4.22: Clasificación de las proteínas del protocolo ihAM correspondientes al Proyecto Matrisome.

4.8. Caracterización de la hAM mediante FTIR.

Para el alcance del objetivo 3 se ha considerado medir los espectros vibratorios con ATR-FTIR en los protocolos ihAM, thAM y chAM. Las señales obtenidas indican la presencia de grupos funcionales en similares frecuencias para todos los protocolos desarrollados, observándose una zona con alta presencia de señales entre los 1500 y 1700 cm^{-1} aproximadamente. Sin embargo, el protocolo chAM refiere presentar mayor número de espectros, como por ejemplo a los 2000 cm^{-1} donde se visualiza una banda que no logra observarse en los protocolos restante (Figura 4.23).

Cuadro 4.23: Descripción de espectros FTIR en protocolos de hAM. *p=0.
X=media, DS=desviación estandar

	*ihAM	*thAM	*chAM
N	4.762	4.762	4.762
X	99.74	99.43	91.75
DS	0.15	0.66	17

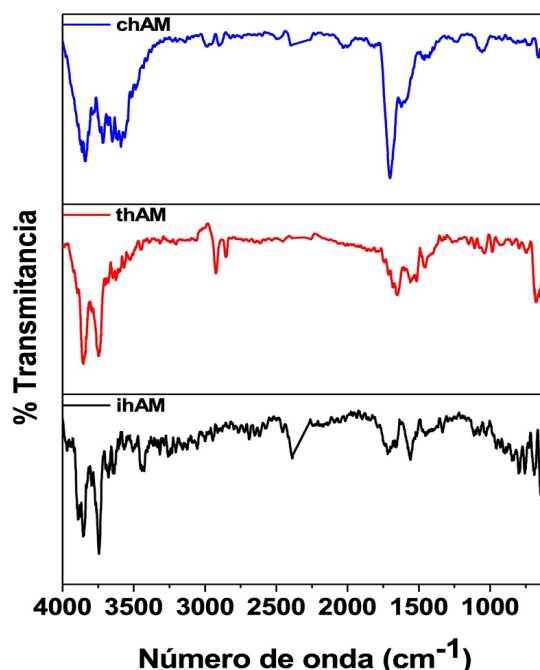


Figura 4.23: Resultados de espectroscopía FTIR en los protocolos de liofilización y pulverización de la hAM.

Cuadro 4.16: Bandas de espectros FTIR en protocolos de liofilización y pulverización en hAM.

ihAM			thAM			chAM		
cm ¹	Grupo	Comentario	cm ⁻¹	Grupo	Comentario	cm ¹	Grupo	Comentario
2387	NH ₂ ⁺	Amina protonada	1651	NH ₂	Amida	1700	-COOH	Ácido Carboxílico
1717	-COOH	Ácido Carboxílico	1555	COO-	Carboxilato	1623	NH ₂	Amida
1559	COO-	Carboxilato	1452	COO-	Carboxilato	1459	COO-	Carboxilato
800	NH ₂ ⁺	Amina protonada				1056	C-O-C	Éter alifático

4.9. Caracterización de espectros Raman en hAM.

En consideración al alcance del objetivo 3 se ha realizado la medición de los espectros moleculares mediante espectroscopía Raman en los protocolos ihAM, thAM y chAM. No fue posible observar los espectros en ninguno de los protocolos, por lo cual se utilizó nanopartículas (Nsp) SHINS (Figuras 4.24, 4.25, 4.26, 4.27), a fin de obtener una señal amplificada de las señales en el espectro (Cuadro 4.17). Todos los protocolos presentan curvas espectrales similares, observándose un grupo de bandas características de MEC entre los 1300 y 1800 cm⁻¹, con una alta intensidad en el grupo chAM (Figura 4.26), arrojando un incremento de la intensidad relativa del 1747% asociado al ácido hialurónico (Figura 4.27). Las imágenes de la muestra ihAM obtenidas mediante microscopía Raman (Figura 4.29. A, B, C, E) logran discriminar a la presencia de las Nsp (Figura 4.29. D y F).

Cuadro 4.24: Descripción de espectros Raman en protocolos de hAM, con y sin uso de Nsp SHINS de plata. *p=0

	*sNps chAM	*cNps chAM	*sNps ihAM	*cNps ihAM	*sNps thAM	*cNps thAM
N	2.262	2.262	2.262	2.262	2.262	2.262
X	815.04	1611.93	783.044	872.074	831.167	1094.60
DS	12.44	571.98	0.722990	32.35	14.24	112.09

Cuadro 4.17: Bandas de Espectros Raman en protocolos de liofilización y pulverización.

Protocolo	Espectros sin Nsp (cm^{-1})	Espectros con Nsp (cm^{-1})
Control (ihAM)	No se observaron espectros	806 – 1052 – 1203 – 1381 – 1578
Trehalosa (thAM)	No se observaron espectros	1002 – 1160 – 1238 – 1375 – 1576
Crioconservación (chAM)	1079 – 1376 – 1585	985 – 1204 – 1362 – 1565

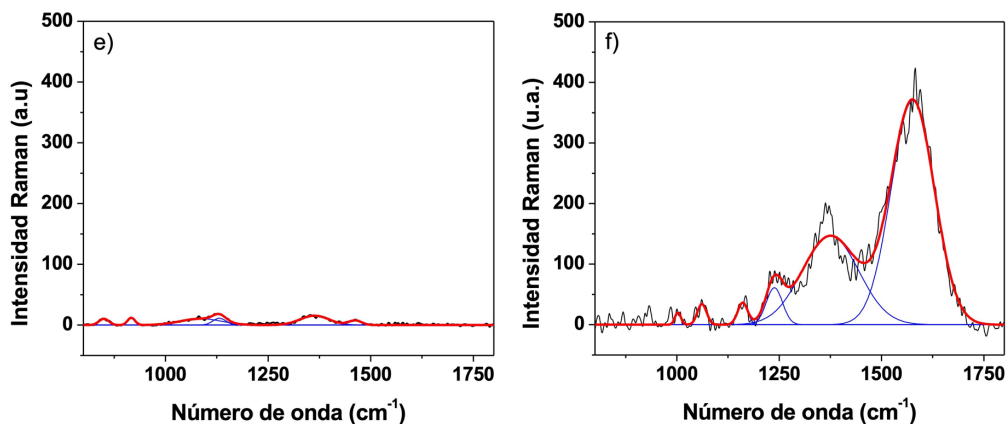


Figura 4.24: Resultados de espectroscopía Raman en grupo control ihAM.

a) sin uso de Nsp. b) con uso de Nsp.

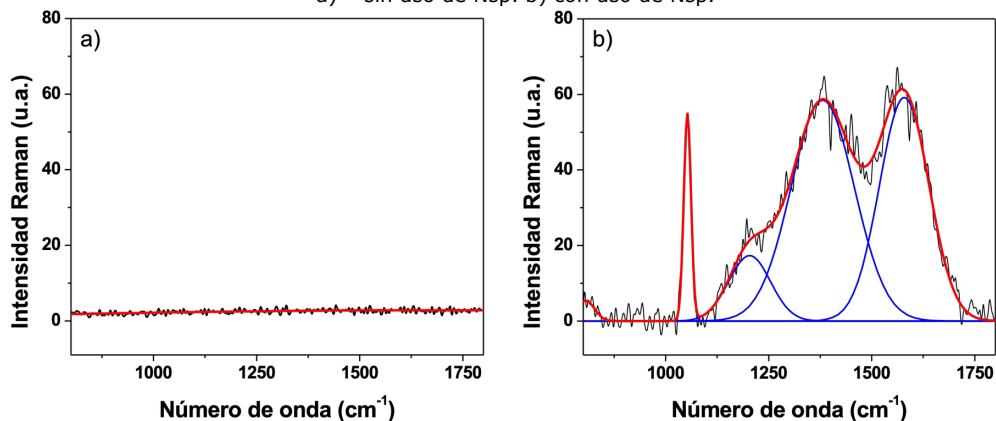


Figura 4.25: Resultados de espectroscopía Raman en grupo thAM.

a) sin uso de Nsp. b) con uso de Nsp.

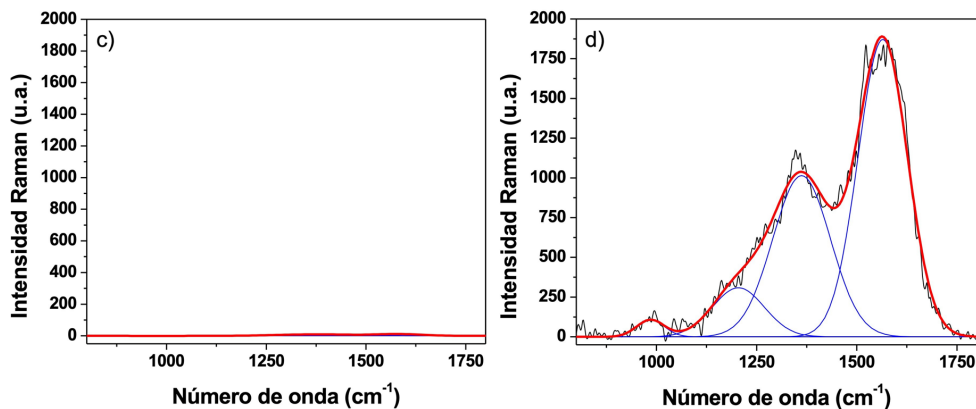


Figura 4.26: Resultados de espectroscopía Raman en grupo chAM.
a) sin uso de Nsp. b) con uso de Nsp.

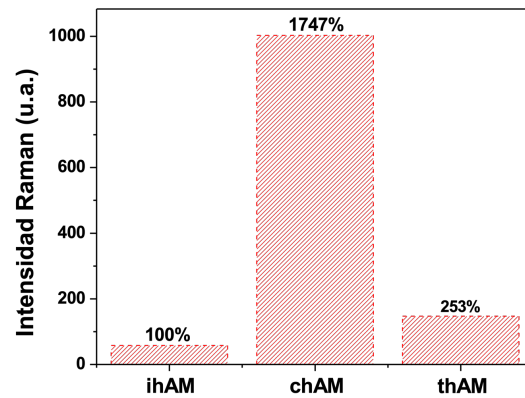


Figura 4.27: Intensidad relativa de ácido hialurónico en grupos ihAM, chAM y thAM.

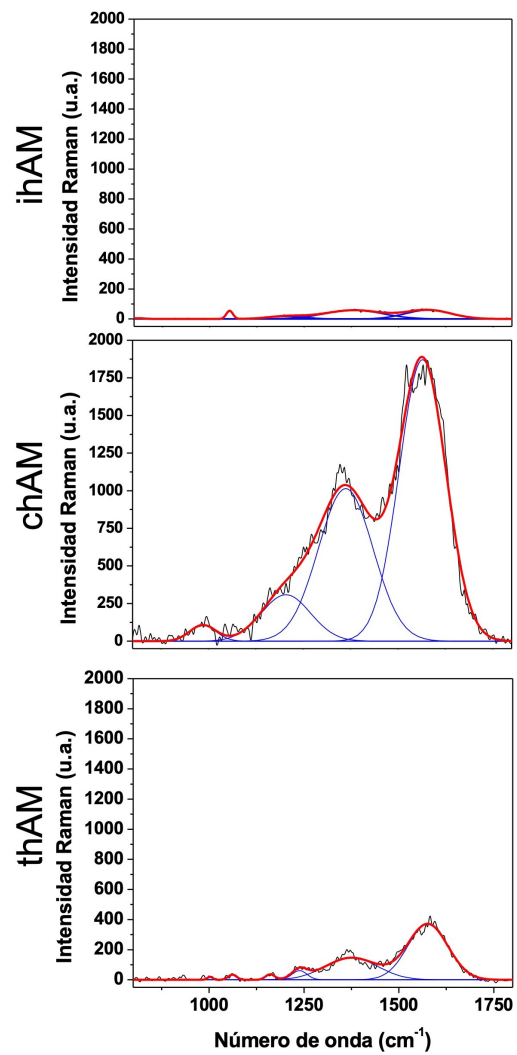


Figura 4.28: Comparación de los espectros Raman en grupos ihAM, thAM, chAM según parámetros de intensidad con Nsp.

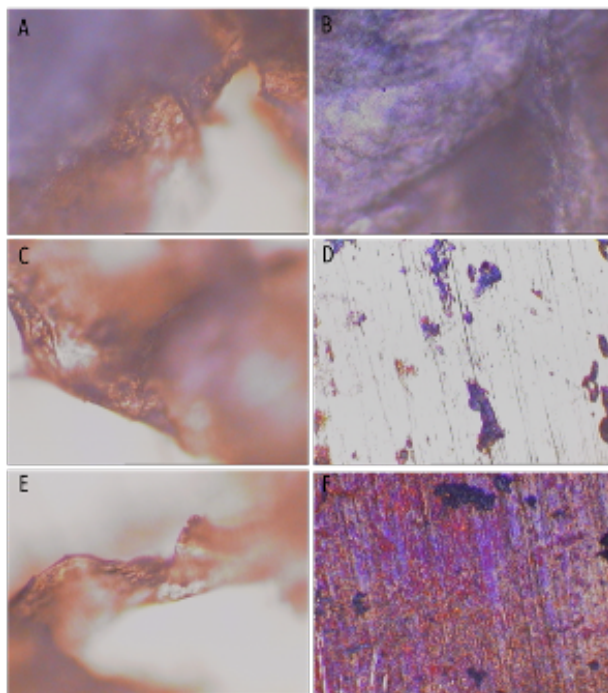


Figura 4.29: Microscopía Raman en los protocolos de liofilización y pulverización del protocolo chAM.

Capítulo 5

5. Discusión y conclusión

5.1. Selección y manipulación de las muestras.

Como se mencionó anteriormente, existe abundante literatura que respalda las exquisitas propiedades que posee la hAM y es por ello, el interés en hacer uso de estos beneficios para el manejo de patologías, tales como, heridas crónicas o úlceras por presión, por lo cual sus bondades no son cuestionables.

El desarrollo de andamios de hAM parece ser la presentación más estudiada, así como también su medio de conservación, sobre todo cuando su uso apunta a fines médicos. La presentación en polvo o particulada aun cuando se ha mencionado de forma escueta en la literatura, ha sido el objetivo de interés en este proyecto de investigación.

Los criterios de inclusión y de exclusión (Cuadro 3.1) para estudios que hacen uso de este tejido, se basan en un protocolo estandarizado a partir de las normativas vigentes, por parte de entidades internacionales, así como también nacionales con respecto a la legislación. En nuestro caso, se realiza en el marco de la Norma General Técnica para el Procuramiento, Preservación e Implante de Tejidos, establecidos por el Ministerio de Salud de Chile el año 2018. Protocolos estandarizados permiten entre otras cosas la fácil reproducibilidad de un experimento, por lo que se ha considerado una fortaleza para los estudios de este tipo.

En nuestro país, durante el cuarto trimestre del año 2021 se realizaron 292 cesáreas y 677 partos en el Servicio de Salud de Valparaíso San Antonio, según lo informado por el Informe Glosa 04 de la Subsecretaría de Redes Asistenciales de Chile. Sin embargo, aun cuando el número de cesáreas se mantiene alto, la donación de placentas para este proyecto fue bajo, pudiendo eventualmente haber limitado su desarrollo. Es importante considerar que uno de los criterios de inclusión, corresponde a fetos de término interrumpidos por cesárea electiva, de los cuales, en nuestro caso, las donaciones provienen desde una entidad pública del Servicio de Salud de Valparaíso, por lo cual extenderse en la Red Hospitalaria de la región puede ser un punto que considerar. Desde otra perspectiva, es importante mencionar que al provenir la hAM de una donante, se logra controlar la variabilidad interdonante tal como lo describen algunos autores [Hopkinson et al. (2006b), Dua et al. (2006)] de esta forma nuestra principal fuente de variabilidad fue el protocolo aplicado en cada grupo de estudio, por lo cual, lo que pareciera ser una limitación, también podría considerarse una fortaleza.

Otro punto que involucra la variabilidad entre donantes es la edad de las mujeres. Se ha mencionado en la literatura que existen diferencias en la hAM según la edad de la donante y según la edad gestacional. Las mujeres embarazadas jóvenes, es decir, menores de 19 años, así como las mujeres mayores de 35, tienen más riesgo de

presentar patologías asociadas al embarazo, considerándose un intervalo ideal entre los 25-29 años [Cavazos-Rehg et al. (2015)] de edad, por lo que se podría asumir que en base a eso pudiese existir una relación proporcional entre las edades mencionadas y los elementos presentes en la hAM. Por otro lado, en un estudio se realizó la caracterización del proteoma del líquido amniótico, registrando que el 25% aproximadamente de las proteínas presentes en éste, cambiaron de forma significativa en abundancia al comparar el segundo trimestre y las semanas de término de la gestación. Con respecto a ello, el 48.1% de las proteínas aumentaron y 51,9% disminuyeron en abundancia al comparar a ambos grupos [Bhatti et al. (2022). Gargiulo y cols. (1997)], encontraron una concentración mayor del receptor de EGF al analizar la hAM en mujeres que se encontraban en trabajo de parto, versus las que aún no lo estaban [Gargiulo et al. (1997)]. Kauma y cols. observaron que el factor de crecimiento hepático (HFG) en la placenta de mujeres que cursaban embarazo de término es menor al compararla con mujeres que se encontraban en el segundo trimestre de gestación; esta misma relación se observó en el líquido amniótico [Kauma et al. (1997)], por lo que se puede inferir que existen diferencias también con los otros componentes presentes en la hAM. Los estudios que realizan este tipo de análisis son complejos ya que es imposible contar con una cesárea electiva en mujeres que se encuentran en el segundo trimestre o menos de gestación y por otro lado, la realización de amniocentesis es un procedimiento no exento de riesgos, por lo cual realizar seguimientos en esta población mediante esta técnica podría considerarse un atentado a la ética.

Es necesario tener en cuenta para estudios futuros, que en vista de que se han observado variaciones constitutivas entre las diversas regiones de la hAM, se vuelve relevante considerar que la selección de la porción de la hAM debe ser rigurosamente escogida.

5.2. Caracterización molecular de la hAM: Estandarización de protocolos para extracción de proteínas.

El ensayo BCA es una prueba muy utilizada para el análisis cuantitativo de proteínas totales mediante colorimetría, es importante considerar que el tiempo de cultivación, así como también el volumen de la muestra se deben respetar de forma estricta, ya que se ha visto que la modificación de estos parámetros reduce significativamente la precisión del ensayo Rogatsky (2021). Además, dentro de las ventajas que justificaron su selección, fue que encontramos amplio rango de ensayo (20-2000 µg/ml), simplicidad, baja variación proteína-proteína, tolerancia a los detergentes y la disponibilidad en formato de microplaca [Smith et al. (1985), Glyk et al. (2015)] además cabe mencionar que detecta proteínas en muy bajas concentraciones, hasta 2 mg/ml (Protein assay technical handbook. Available online at <http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/protein-assay-technical-handbook.pdf>).

En la actualidad no existe un protocolo estandarizado para la extracción de proteínas en la hAM. La literatura menciona diversas propuestas, pero no se ha comprobado cuál de ellas puede ser considerada como la ideal. Las proteínas de la MEC son difíciles de solubilizar y es debido a esto, que se debe elegir una estrategia de preparación de muestras adecuada para optar a una amplia caracterización de la hAM. En este estudio,

para la extracción de proteínas se incluyeron dos componentes; disrupción y lisis del tejido, con el objetivo de liberar su contenido celular. Es necesario recalcar que se emplearon métodos químicos y mecánicos combinados, ya que esto aumenta la eficiencia de la lisis [Harrison (1991), Balasundaram et al. (2009)].

Se evaluaron 8 buffers para la extracción de proteínas en hAM. Para el Buffer **B1-B** y **B1-S**, se utilizaron los mismos reactivos, pero la disrupción involucró la homogeneización mecánica y la ultrasónica, respectivamente. Para la lisis, el sodio dodecil sulfato (SDS), actúa como un tensoactivo aniónico que rompe enlaces no covalentes en las proteínas, mientras que el Tris-HCl actúa como un tampón manteniendo el pH estable en 8.6 y finalmente, un inhibidor de proteasas (PMSF). Como se observa en la figura 4.1 ambos buffers logran extraer similar cantidad de proteínas al ser cuantificadas por medio del ensayo BCA, lo que indicaría que ambos protocolos son similarmente efectivos.

Para los Buffer **B2-B** y **B2-S**, se utilizaron los mismos reactivos, pero la disrupción involucró la homogeneización mecánica y la ultrasónica, respectivamente. En este caso, como se observa en el Cuadro 4.1, la extracción de proteínas fue nula, razón por la cual estos protocolos fueron desestimados en este experimento. La falta de un reactivo que genere lisis química en el tejido podría ser la razón por la cual las proteínas no lograron ser extraídas de la hAM.

Para los Buffer **B3-B** y **B3-S**, se utilizaron los mismos reactivos, pero la disrupción involucró la homogeneización mecánica y la ultrasónica, respectivamente. En este caso, como se observa en el Cuadro 4.1, la extracción de proteínas fue nuevamente nula, razón por la cual estos protocolos fueron desestimados en este experimento. Este buffer es ampliamente utilizado de forma transversal para la extracción de proteínas; dentro de sus componentes tenemos el ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA), este es una sustancia utilizada como agente quelante y por otro lado, el tritón es un tensoactivo que se utiliza en baja dosis para la disolución de proteínas. Al parecer la baja solubilización del tejido, no permitió que la extracción fuera eficiente mediante el uso de estos reactivos, otra justificación que planteamos es que el EDTA en vista de que se utiliza en protocolos para la descelularización en hAM, pudo haber afectado el recuento de proteínas [Saghizadeh et al (2013)], provocando la ausencia de éstas cuando fue aplicado el kit BCA.

Para los Buffer **B4-B** y **B4-S**, las muestras fueron pulverizadas con N₂ en mortero de cerámica y posteriormente se utilizaron los mismos reactivos, la disrupción involucró la homogeneización mecánica y ultrasónica, respectivamente. En este caso, como se observa en el Cuadro 4.1, la extracción de proteínas fue mayor mediante el uso de perlas de cerámica al compararla con sonicación. Es importante considerar que la urea es uno de los componentes más utilizado en la etapa de lisis en estudios proteómicos de la hAM, según referencia la literatura [Avilla-Royo et al. (2021)]. Por otro lado, el paso de pulverización previo con N₂ actuó como un disruptor mecánico adicional, lo cual podría haber mejorado la extracción de las proteínas, puesto que causa un mayor daño en la

membrana celular de la hAM y por lo tanto, emergen más proteínas y factores de crecimiento, tales como HGF [Mahbod et al. (2014)].

Con respecto a los métodos mecánicos o físicos de disrupción celular que fueron seleccionados, uno de ellos fue mediante “perlas” de cerámica (en inglés *beads mill*) las cuales disgregan mediante la agitación de diminutas perlas y se mezclan con la suspensión celular a alta velocidad, rompiendo la membrana celular y liberando los componentes intracelulares, lo que le confiere una alta eficiencia [Mohammed et al. (2017)]. Por otro lado, la sonicación actúa como una técnica de disrupción celular física, basada en la aptitud de las fuerzas de cavitación para infligir daño a la pared celular, además de ser una técnica considerada como fácilmente reproducible y sencilla [Nemer et al. (2021)]. Aun cuando ambos fueron efectivos (Cuadro 4.1), es necesario mencionar que el uso de sonicador nos produjo pérdida de muestra, por lo que es necesario tener en cuenta la cantidad de tejido que será requerido para ejecutar este método. Es por esta razón, que en este estudio nos hemos inclinado en la homogenización mediante el uso de perlas de cerámica.

En base a los resultados de cuantificación de proteínas (Cuadro 4.1) obtenidos y a la posterior corroboración mediante el uso de geles de poliacrilamida (Figura 4.1), es que en este estudio hemos seleccionado el **buffer B4-B** para la extracción de proteínas en protocolos de liofilización y pulverización en hAM.

5.3. Caracterización molecular de la hAM: Perfil de proteínas totales mediante geles SDS-PAGE.

El buffer B4-S aun cuando logra extraer importante cantidad de proteínas, presenta una disminución de un 0,6 % en el área de intensidad al compararlo con el protocolo B4-B, esto podría deberse a la pérdida de muestra producto de la sonicación, alterando los resultados obtenidos para ese grupo de estudio. En cuanto a los protocolos B1 ambos reflejan una disminución promedio del 8% con respecto al grupo B4-B siendo concordante con la cuantificación de proteínas realizado previamente.

Con respecto a la precipitación de proteínas con metanol/cloroformo (Cuadro 4.1) las cuatro columnas de los buffers señalaron una distribución más homogénea entre sí, es decir, un patrón de señal muy similar, con bandas bien definidas en términos generales (Figuras 4.2 4.3). La razón por la cual la intensidad de la señal se ve disminuida en las muestras precipitadas, proponemos que se debe a que el buffer no es selectivo únicamente para proteínas, por lo cual lípidos y ácidos nucleicos también pudiesen haber sido extraídos de los protocolos desarrollados, siendo estos componentes removidos al realizar la precipitación.

5.4. Caracterización molecular de la hAM: Evaluación de protocolos de liofilización y pulverización.

Para esta etapa las muestras fueron tratadas previamente al ser suspendidas en el buffer de lisis B4-B. Todos los protocolos para llevar a la hAM a polvo son reproducibles de forma sencilla (apartado 3.2.1) y en general los reactivos son fáciles de encontrar en los laboratorios, lo que se consideró una fortaleza en este estudio. Todos los protocolos contemplaron 18 horas de liofilización y una etapa posterior de pulverización con N₂ en

mortero de cerámica. La liofilización fue seleccionada por ser un método simple, ampliamente extendido, que logra deshidratar las muestras de hAM en condiciones de vacío, sin reducir el rendimiento de las propiedades biológicas de la hAM [Lindenmair et al. (2010), Crestani et al. (2012), Wang et al. (2018)] y permite además almacenar las muestras a temperatura ambiente. En vista de que no hay un protocolo estándar de liofilización en este tipo de tejido, es que se calculó el tiempo en base a un promedio según la literatura, mientras que la simplicidad en ejecutar la pulverización con N₂ y mortero, nos permitió llevar el tejido a un formato en polvo sin complicaciones.

Con respecto al protocolo en el cual la muestra fue previamente saturada en trehalosa es importante considerar que ésta corresponde a un disacárido no reductor (C₁₂H₂₂O₁₁) altamente utilizado en la manipulación de la hAM en ensayos oftalmológicos y dermatológicos [Nakamura et al. (2008)]; se postula, que podría proteger la hAM durante la liofilización, mejorando su calidad biológica [Nakamura et al. (2008)]. Su eficacia se basa en que logra reemplazar parte del agua de la célula, permitiendo su estabilización y protegiendo de esta manera, la membrana celular y las proteínas durante el proceso de congelación [Crowe et al. (2001)], razón por la cual se justifica el resultado obtenido. Teniendo presente los excelentes resultados documentados en la literatura, con respecto a los parches saturados previamente con trehalosa, es que se respetaron en este estudio los parámetros: tiempo, temperatura y concentración. Estudios adicionales son necesarios para establecer una concentración óptima de trehalosa y de esta forma protocolizar su uso en hAM.

De forma totalmente opuesta, el grupo en base a pulverización (phAM) arrojó una nula cuantificación de proteínas (Cuadro 4.3). Para este protocolo nos enfocamos en aquel propuesto por Mahbod y cols. en el cual la hAM fue secada mediante el uso de papel absorbente y gasa para luego ser pulverizada con N₂ y mortero de cerámica, para finalmente incorporarse en un pulverizador. El polvo obtenido fue suspendido en cocktail de inhibidores de proteasas, solución salina balanceada y luego fue centrifugada. Estos pasos fueron replicados numerosas veces, lo que implicó el uso de una importante cantidad de tejido. Es debido a esto que el protocolo fue adaptado, razón por la cual es posible que la cantidad de tejido y de los reactivos hayan provocado dilución de la muestra, lo cual se vio reflejado en una nula cuantificación de proteínas con test BCA. Por otro lado, posterior a la liofilización la muestra persistía con un aspecto húmedo por lo que su pulverización fue dificultosa y no se logró obtener un polvo fino. Una de las razones que postulamos es que hubo un plegamiento de la muestra no permitiendo su deshidratación posterior a las 18 hrs. de liofilización lo que se reflejó al momento de la extracción de proteínas.

Y finalmente el protocolo en base a crioconservación a -80 °C (chAM), el cual demostró una cuantificación levemente menor al grupo control (Cuadro 4.3). Este fenómeno podría implicar la desnaturalización de proteínas, ya que puede ocurrir en los tejidos biológicos al estar expuestos a temperaturas ultrabajas, según menciona literatura [Jang et al. (2022)]. Pero con respecto a eso, en la caracterización con E-1D (Figura 4.7) hay una ausencia de bandas de bajo peso molecular entre los 10-15 kDa lo que si pudiese haberse asociado a una menor presencia de proteínas (Figura 4.4).

Una vez transcurridos los 6 meses, se cuantificaron nuevamente las proteínas. (Cuadro 4.5). Como resultado se registró una menor presencia de proteínas en el grupo control (ihAM), así como también en el grupo criopreservado (chAM). Sin embargo, los valores de cuantificación de proteínas para el grupo saturado en trehalosa (thAM) se mantuvieron estables, esto nuevamente se podría justificar gracias a el efecto protector que ejerce en la célula. Dhall y cols. demostraron que parches de hAM saturados en trehalosa y liofilizados produce tejido viable posterior a su almacenamiento durante 6 meses a temperatura ambiente [(Dhall et al. (2018))].

Este estudio es el primero en registrar que la saturación de la hAM en trehalosa en polvo, logra mantener la concentración de proteínas estables después de 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente (Cuadro 4.5).

5.5. Caracterización proteómica de la hAM.

Hicimos el entrecruzamiento de los datos obtenidos en el estudio proteómico ihAM con el proyecto human Matrisome [Naba et al. (2016)]. Este proyecto busca clasificar las proteínas observadas en la MEC y las organiza en proteínas centrales o del núcleo Matrisome, las cuales consisten en colágenos, proteoglicanos, glucoproteínas y en aquellas que se le asocian, las cuales participan en el mantenimiento y la remodelación de la MEC [Avilla-Royo et al. (2021)]. En este estudio, en la muestra ihAM se logró detectar 72 proteínas totales respecto a la lista maestra del Matrisome, de las cuales 44 fueron centrales (Cuadro 6.5), cifra similar a la obtenida por Fenner y cols. (Fenner et al. (2019)), lo que nos orienta a considerar la efectividad del buffer para la extracción de proteínas, sin embargo, la cantidad de proteínas asociadas al Matrisome fueron inferiores (Cuadro 6.6).

La distribución según función de las proteínas presentes en la ihAM obtenidas en el estudio proteómico se puede observar en la Figura 4.21. Las proteínas más abundantes fueron aquellas que cumplen función estructural y participan activamente durante el proceso de desarrollo embrionario. Aun cuando habíamos considerado que las proteínas de la MEC inicialmente serían uno de los grupos de mayor abundancia (Figura 4.22).

Hopkinson y cols. [Hopkinson et al. (2006a)] informaron en su estudio que el TGF- β I fue una de las proteínas de mayor abundancia en la hAM y dentro de sus funciones encontramos, crecimiento y diferenciación celular, así como también la cicatrización de heridas (Cuadro 5.2).

Los proteoglicanos decorina, lumicano, mimecano, prolargina y heparán sulfato se encuentran de forma abundante en la hAM según Meinert et al. (2001). La decorina se relaciona con la preservación de la integridad de la hAM [Wu et al. (2014)], ya que está involucrada en la fibrillogénesis del colágeno [Kalamajski and Oldberg (2010)]; por otro lado, lumican está relacionado con la reparación tisular.

Dentro del grupo de las proteínas afiliadas a la MEC encontramos a las anexinas, de las cuales, la anexina 1 poseen función antiinflamatoria [Kalamajski and Oldberg (2010)], así como también la proteína S100-A4, la cual está involucrada en la cicatrización de

heridas [Ryan et al. (2003)]. Los factores de crecimiento participan en la reparación de tejidos, por ejemplo, durante la cicatrización de heridas y poseen relación directa con las proteínas de la MEC.

5.6. Caracterización Molecular de la hAM mediante espectros FTIR.

Como se mencionó anteriormente, la matriz extracelular o también denominada MEC por sus iniciales, corresponde a una red tridimensional compleja [Vecino and Kwok (2016)] y es un componente fundamental de todos los tejidos biológicos (figura 5.3) [Bergholt et al. (2019)], confiriéndoles una gran cantidad de funciones específicas, tales como son, estabilidad mecánica, barreras de transporte molecular, uniones para adhesión celular, transducción de señales mecánicas, además de ser un importante reservorio de factores de crecimiento.

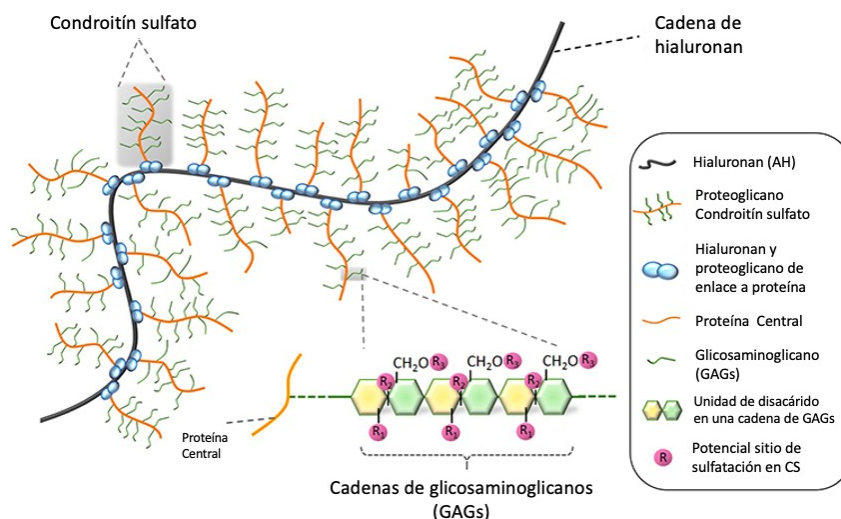


Figura 5.1: Elementos de la MEC. Adaptado de [Bergholt et al. (2019)].

En cuanto a su composición molecular proteica podemos observar elementos fibrilares, como son distintos tipos de colágenos, glicoproteínas, como por ejemplo lamininas, glicosaminoglicanos (GAGs) como el sulfato de condroitina o el ácido hialurónico, así como también proteoglicanos como es el agregano, versicano y decorina los cuales en su mayoría están presentes en iHAM según señaló el estudio proteómico.

Los glicosaminoglicanos son una clase de polisacáridos lineales que se organizan en cuatro grupos principales en función de sus unidades de disacárido centrales: heparán sulfato (heparina), dermatán sulfato, queratán sulfato, ácido hialurónico y condroitín sulfato, siendo este último el más abundante [Casale and Crane (2019)]. Se caracterizan por tener notables propiedades físicas las cuales son atribuibles a la abundancia de grupos carboxilo, hidroxilo y sulfato [Rauch (2007)]. Al poseer carga negativa neta atraen Na^+ generando que atraigan grandes cantidades de agua [Vecino and Kwok (2016)] causando que los espacios intersticiales donde residen aumenten su volumen. La estructura polar del ácido hialurónico logra que ésta sea capaz de retener 100.000 veces su propio peso en agua [Casale and Crane (2019)].

En base a los espectros obtenidos y a partir de la estructura molecular de los proteoglicanos: ácido hialurónico, condroitín sulfato y heparán sulfato (Figura 5.4) se pudo observar una banda de vibración en el grupo thAM a 1651 cm^{-1} la cual se ha relacionado con la presencia de colágeno [Glassford et al. (2013), Carneiro et al. (2016)], específicamente a la banda de absorción de la proteína amida I, siendo asignada al modo de estiramiento C=O [Cavalu et al. (2021)]. Las bandas a los 1559 y 1555 cm^{-1} presentes en el grupo ihAM y thAM, respectivamente son característicos de carboxilatos COO^- , presentes en la cadena de condroitín sulfato [Galus et al. (2016)].

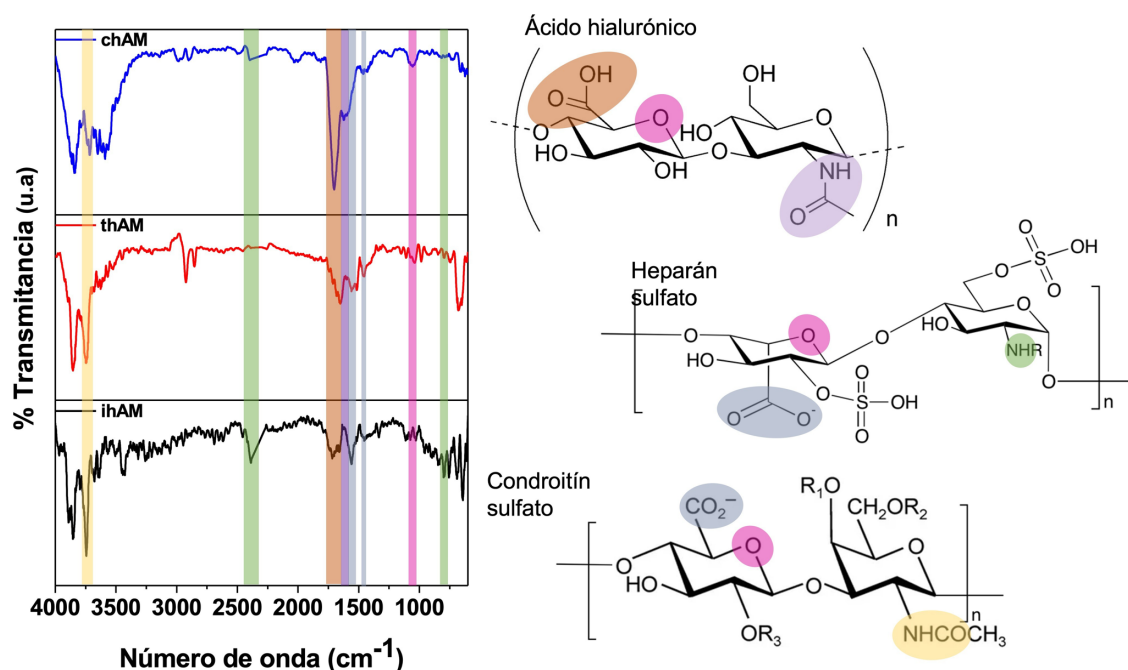


Figura 5.2: Espectros FTIR en protocolos de liofilización y pulverización de hAM asociados al ácido hialurónico y heparán sulfato. verde=amina protonada, naranja= ácido carboxílico, rosa=éter, azul=carboxilatos, amarillo=amida.

Bandas de estiramiento del carbonilo del ácido carboxílico se observan en a los 1700 y 1717 cm^{-1} presentes en el grupo chAM e ihAM, respectivamente, las cuales se asocian a la presencia de ácido hialurónico [Carneiro et al. (2016)]. Es probable que la banda de 3775 cm^{-1} observada en el grupo chAM corresponda a la presencia de heparán sulfato [Singh et al. (2013)] y se corrobora por la presencia de grupos amida. La banda observada a 1056 cm^{-1} la cual está relacionado con el C–O–C de las unidades de sacáridos de este mismo grupo de GAGs [Mainreck et al. (2011), Vasi et al. (2014)].

La vibración de un grupo sulfato de los residuos de galactosamina ubicado en 800 cm^{-1} se observa en el grupo ihAM [Mainreck et al. (2011)] y es característico del grupo condroitín sulfato. Las vibraciones a 1452 y 1459 cm^{-1} observados en los protocolos thAM y chAM respectivamente, se encuentra en una región espectral en la que normalmente se encuentran los modos de flexión O–H en los grupos carboxilo [Lettow et al. (2020)].

5.7. Caracterización de la hAM mediante espectros Raman.

Los espectros Raman miden la dispersión inelástica, por la polarizabilidad de las moléculas presentes en los tejidos, generando una huella molecular propia y específica de cada grupo funcional. Los espectros observados son correspondientes a los publicados por Bansil [Bansil et al. (1978)].

En el protocolo chAM se observaron señales de frecuencia a 1079 cm^{-1} y 1376 cm^{-1} (deformación simétrica de CH_3) (Figura 4.24), ambas características de condroitín sulfato, un proteoglicano distribuido de forma abundante en la MEC de los tejidos corporales. La baja intensidad de la señal Raman en el espectro chAM, corrobora la sensibilidad de la técnica utilizada para obtener los espectros de interés. A partir de esta observación, se propuso el uso del método SHINERS con el objetivo de amplificar las señales Raman visualizadas.

El método SHINERS (shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy) tiene un potencial extraordinario en la caracterización de estructuras biológicas y es por lo que las hemos seleccionado en este estudio [Li et al. (2010)]. Permite analizar varias muestras biológicas *in situ* mediante el uso de un método novedoso, relativamente sensible de análisis químico de varias superficies. Siendo éstas un tipo de espectroscopia Raman mejorada en superficie (SERS), en la que se induce mediante el uso de nanopartículas plasmónicas un aumento en la eficiencia de la dispersión Raman, actuando como resonadores electromagnéticos que generan mejoría local en el campo eléctrico de la radiación electromagnética incidente.

Al hacer uso de las Nsp para la medición de los espectros Raman se lograron visualizar señales que anteriormente no se lograron ver, lo que corrobora su efectividad en la visualización de bandas. Las bandas 1052 cm^{-1} (C-OH parcialmente) y 1381 cm^{-1} observadas en el grupo control (Figura 4.22), corresponden a N-acetilgalactosamina, la cual es una glucoproteína, mientras que la banda 1203 cm^{-1} arrojó la presencia de ácido glucurónico, el cual es componente principal del ácido hialurónico. Por otro lado, el grupo thAM arrojó espectros pertenecientes a condroitín sulfato ($1160 - 1238\text{ cm}^{-1}$) correspondientes a deformación simétrica (SO_3^-) y a hialuronato de sodio ($1002 - 1375\text{ cm}^{-1}$) correspondiente a deformación simétrica (CH_3) (Cuadro 4.23). Finalmente, el tratamiento bajo crioconservación nos permitió observar espectros de ácido hialurónico ($1204 - 1362 - 1565\text{ cm}^{-1}$) de forma predominante con respecto a los otros protocolos (Figura 4.24).

Con respecto a la distribución de la presencia de ácido hialurónico en los tres protocolos, se observó un incremento del 253% y del 1747% en intensidad relativa, para los grupos thAM y chAM respectivamente al ser comparados con el grupo control (ihAM) (Figura 4.25).

El recubrimiento de la Nsp (4.10.1 E y F) nos permitió la amplificación de los espectros Raman de la hAM, obteniéndose señales características de MEC, proteínas, entre otras, las que se pueden observar en la Figura 4.26. Esta mejora, conduce a un aumento significativo en la eficiencia de una serie de procesos ópticos para moléculas en la

proximidad de las nanoestructuras plasmónicas, tales como: fluorescencia [Touahir et al. (2010)] y dispersión Raman [Brolo et al. (2002)]. Por lo cual el uso del método SHINERS es una excelente selección para amplificar espectros que provienen de la hAM, pero son necesarios estudios adicionales con respecto a su estandarización.

5.1. Limitaciones.

Es importante considerar que aun cuando las metodologías utilizadas en este estudio son apropiadas para lograr realizar una caracterización molecular del tejido, no está exenta de limitaciones. Una de las técnicas seleccionadas para la caracterización estructural de la hAM fue mediante el estudio de espectros Raman ya que posee una importante especificidad molecular, sin embargo, el análisis fue altamente complejo.

Los tejidos biológicos están conformados por diversos elementos bioquímicos, más allá del componente proteico, lo que provoca que múltiples y simultáneos espectros vibratorios se logren visualizar, por lo cual el análisis de estas señales requiere ser realizado por un experto, ya que se considera un verdadero desafío. Por otro lado, algunos tejidos pueden exhibir una autofluorescencia prohibitivamente alta, por lo cual es necesario al momento de la medición hacer uso de diversas longitudes de onda de excitación y eso implica que se deba utilizar más de un láser para poder observar los espectros. La autofluorescencia puede ser tal que la señal biológica prácticamente no se pueda distinguir con respecto al ruido de fondo. El uso del método SHINERS es una excelente opción para amplificar las señales, pero no asegura la eliminación del ruido acoplado y es por lo que además se requiere de conocimiento avanzado en lo que respecta al pre-procesamiento y procesamiento de las señales biológicas Raman.

5.9. Conclusión.

A partir de lo anteriormente expuesto podemos concluir que, se logró estandarizar un protocolo óptimo para la extracción de proteínas totales en base a pulverización de la hAM con N₂, posterior suspensión en el buffer **B4-B** en base a urea 8 M en solución tampón Tris-HCl 0,1 M a pH 8.2 y 0,2% de cocktail de inhibidores de proteasas más homogeneización con beads, liofilización de 18 h y nueva pulverización en base a N₂ en mortero de cerámica.

De la misma forma se logró desarrollar un protocolo de liofilización y pulverización de la hAM en base a liofilización de 18 h más pulverización con N₂ y mortero de cerámica previo a 72 h. de crioconservación a -80°C (chAM), quien demostró áreas de densidad de bandas mayores en lo que respecta al procesamiento de imágenes de geles SDS-PAGE, así como también mayor intensidad y número de espectros asociados a la MEC mediante FTIR y Raman. Sin embargo, el protocolo liofilizado y pulverizado previo a saturación con trehalosa (thAM) fue quien presentó una mejor cuantificación de proteínas, estadísticamente significativa al ser comparada con el grupo control. Además, este estudio es el primero en documentar que el uso de la trehalosa logró preservar las proteínas de forma estadísticamente significativa, luego de 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente al ser comparada con un grupo control.

La identificación de componentes moleculares para protocolos de liofilización y pulverización se logró mediante el estudio proteómico de la muestra y de espectros FTIR y Raman. Fueron predominantes en la composición de la hAM elementos proteicos relacionados con embriogénesis, además de presentar 72 proteínas de la MEC según el proyecto Matrisome de las cuales el 35% correspondía a glucoproteínas. El grupo chAM presentó un incremento del 1747% de intensidad relativa asociado a espectro de ácido hialurónico al ser comparado con el grupo control mediante espectroscopía Raman, además de haber presentado mayor número de espectros vinculados a la presencia de ácido hialurónico, condroitín sulfato y heparán sulfato mediante FTIR. Este estudio es el primero en documentar que el uso de Nsp SHINS en los protocolos de liofilización y pulverización de la hAM logró ejercer un efecto amplificador estadísticamente significativo para la visualización de espectros Raman.

Finalmente, y a partir de la pregunta de investigación realizada es que podemos concluir que, la membrana amniótica humana de la muestra estudiada, tras ser sometida a protocolos de liofilización y pulverización, preserva los elementos moleculares que le constituyen al ser comparada con un grupo control. Por lo cual, pulverizar el tejido podría ampliar la gama de usos clínicos, pero para ello son necesarios estudios adicionales.

Capítulo 6

6. Anexos

Cuadro 6.1. Pesos moleculares de las muestras pertenecientes a cada protocolo de liofilización y pulverización de la hAM.

Protocolo	Masa (g)
ihAM_1	0,128
ihAM_2	0,175
ihAM_3	0,146
thAM_1	0,182
thAM_2	0,107
thAM_3	0,167
phAM_1	0,118
phAM_2	0,113
phAM_3	0,187
chAM_1	0,110
chAM_2	0,148
chAM_3	0,164

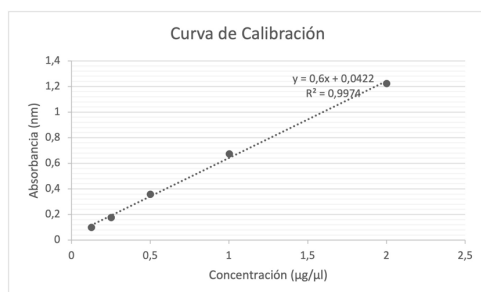


Figura 6.1: Curva de Calibración de protocolos de buffer de extracción de proteínas de hAM.

Cuadro 6.2: Cálculos para dosificación de E-1D de protocolos de buffer de extracción de proteínas de hAM

Prot.	Triplicado			promedio	Normalizado	µg/µl	FD=5	10 µg	buff carga x6	25 µg	H ₂ O
B1-B	0,524	0,466	0,545	0,512	0,402	0,371	1,9	5,395	0,899	13	87
B1-S	0,453	0,401	0,463	0,439	0,329	0,298	1,5	6,712	1,119	17	83
B4-B	0,613	0,526	0,471	0,537	0,427	0,396	2,0	5,054	0,842	13	87
B4-S	0,482	0,481	0,487	0,483	0,373	0,342	1,7	5,842	0,974	15	85

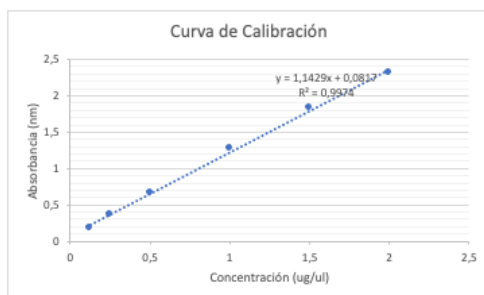


Figura 6.2: Curva de calibración para buffer B2-B y B2-S

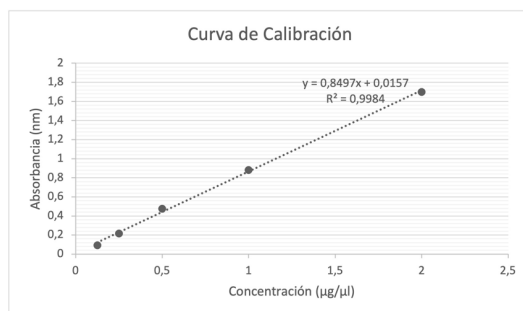


Figura 6.3: Curva de Calibración de protocolos de liofilización y pulverización de hAM.

Cuadro 6.3: Cálculos para dosificación de E-1D de protocolos de liofilización y pulverización de hAM.

Prot.	Triplicado			Prom	Norm	µg/µl	FD=5	10 µg	buff carga x6	25 µg	H ₂ O
ihAM	0,332	0,314	0,276	0,307	0,202	0,160	0,80	12,51	2,09	31	69
ihAM	0,436	0,414	0,457	0,436	0,330	0,288	1,44	6,94	1,16	17	83
ihAM	0,265	0,250	0,303	0,273	0,167	0,125	0,63	15,98	2,66	40	60
thAM	0,467	0,561	0,565	0,531	0,425	0,384	1,92	5,21	0,87	13	87
thAM	0,337	0,323	0,324	0,328	0,222	0,180	0,90	11,09	1,85	28	72
thAM	0,493	0,470	0,412	0,458	0,352	0,311	1,56	6,43	1,07	16	84
phAM	0,133	0,143	0,145	0,140	0,035	-0,008	-0,04	0,00	0,00	0	0
phAM	0,138	0,138	0,140	0,139	0,033	-0,009	-0,05	0,00	0,00	0	0
phAM	0,114	0,113	0,119	0,115	0,010	-0,033	-0,16	0,00	0,00	0	0
chAM	0,200	0,204	0,207	0,203	0,098	0,055	0,28	36,06	6,01	90	10
chAM	0,422	0,450	0,432	0,435	0,329	0,287	1,44	6,96	1,16	17	83
chAM	0,517	0,492	0,507	0,505	0,400	0,358	1,79	5,58	0,93	14	86

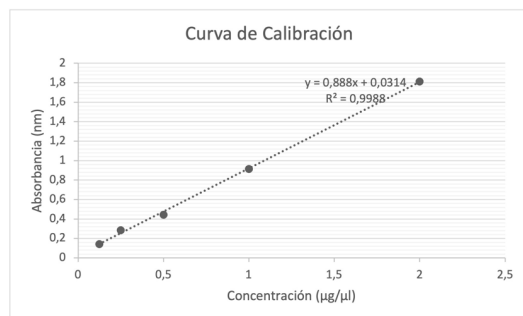


Figura 6.4: Curva de Calibración de protocolos de liofilización y pulverización de hAM después de 6 meses.

Cuadro 6.4: Cálculos para dosificación de E-1D de protocolos de liofilización y pulverización de la hAM después de 6 meses de seguimiento

Prot.	Duplicado		Prom	Norm	µg/µl	FD=5	10 µg	buff carga x6	25 µg	H ₂ O
ihAM	0,377	0,363	0,37	0,205	0,190	0,95	10,5	1,76	26	74
ihAM	0,528	0,083	0,3055	0,1405	0,125	0,63	16,0	2,67	40	60
ihAM	0,345	0,333	0,339	0,174	0,159	0,79	12,6	2,10	32	68
thAM	0,681	0,622	0,6515	0,4865	0,472	2,36	4,2	0,71	11	89
thAM	0,312	0,334	0,323	0,158	0,143	0,71	14,0	2,34	35	65
thAM	0,465	0,481	0,473	0,308	0,293	1,46	6,8	1,14	17	83
chAM	0,197	0,188	0,1925	0,0275	0,012	0,06	169,2	28,20	0	0
chAM	0,38	0,391	0,3855	0,2205	0,205	1,03	9,8	1,63	24	76
chAM	0,496	0,513	0,5045	0,3395	0,324	1,62	6,2	1,03	15	85

Cuadro 6.5: Proteínas de la ihAM presentes en el Matrisome Project.

Proteínas del Matrisoma Cental
Lumicano
Decorina
Colágeno de cadena α -3(VI)
Fibronectina
TGF- β -inducido por Ig-h3
Mimecano
Colágeno de cadena α -1(VI)
Biglicano
Tenascina-X
Colágeno de cadena α -2(VI)
Colágeno de cadena α -1(XII)
Colágeno de cadena α -2(I)
Dermatopontina
proteoglicano heparán sulfato específico de la MB
Integrina α -6
Laminina subunidad α -3
Colágeno de cadena α 1(I)
Laminina subunidad β -3
Periostina
Tenascina
Cisteína rica en proteínas secretora LCCL de dominio 2
Integrina α -V
Proteoglicano de médula ósea
Nidogeno-2
Colágeno de cadena α 1(VII)
Nidogeno-1
Versicano
Laminina subunidad γ -1
Vitronectina
Colágeno de cadena α -1(V)
Procolágeno multifuncional lisina hidroxilasa y glicosiltransferase LH3
Laminina de subunidad β -1
Laminina de subunidad α -5
Osteomodulina
Laminina
Colágeno de cadena α 1(IV)
LTBP-4
Integrina β 6
LTBP-2
Integrina β 1
Colágeno de cadena α 2(V)
MFAP5
Thsd5
SPARC

Cuadro 6.6: Proteínas de la ihAM presentes en el Matrisome Project.

Proteína asociada al Matrisoma
2-oxoglutarato dehidrogenasa mitocondrial
ADAMTS-like proteína 4

α -2-macroglobulina-like proteína 1
Anexina A1
Anexina A3
Anexina A4
Anexina A5
Anexina A2
Catepsina B
Catepsina D
Antígeno CD109
Cadena de factor de coagulación XIII α
Componente del complemento 1 de proteína de unión al subcomponente Q, mitocondrial
Hornerina
Subunidad β de la Interleuquina-27
Factor inhibidor de la migración de macrófagos
Inhibidor de la metaloproteinasa
Plasminógeno
proteína de unión a ARNm 1, Inhibidor del activador del plasminógeno 1
Prolil 4-hidroxilasa subunidad α -1
Prolil 4-hidroxilasa subunidad α -2
Proteína S100-A10
Proteína S100-A11
Proteína S100-A13
Proteína S100-A16
Proteína S100-A4
Proteína S100-A6
Serpina H1

Cuadro 6.7: Densidad del grupo ihAM en gel de SDS-PAGE.

Protocolo	250 kDa	130 kDa	100 kDa	90 kDa	75 kDa	60 kDa	55 kDa	15 kDa	X	DS
ihAM	3,040	6,507	2,768	1,604	10,180	6,292	3,282	1,628	4,413	2,99

Referencias

- Ahn, J.-I., Jang, I.-K., Lee, D.-H., Seo, Y.-K., Yoon, H.-H., Shin, Y.-H., Kim, J.-C., Song, K.-Y., Lee, H.-G., Yang, E.-K., et al. (2005). A comparison of lyophilized amniotic membrane with cryo- preserved amniotic membrane for the reconstruction of rabbit corneal epithelium. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10:262–269.
- Al-Amrani, S., Al-Jabri, Z., Al-Zaabi, A., Alshekaili, J., and Al-Khabori, M. (2021). Proteomics: Concepts and applications in human medicine. *World Journal of Biological Chemistry*, 12(5):57.
- Arrizabalaga, J. H. and Nollert, M. U. (2018). Human amniotic membrane: a versatile scaffold for tissue engineering. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(7):2226–2236.
- Aulia, F., Argaheni, N. B., Longgupa, L. W., Marasing, I., Apriani, L. A., Wiharyanti, R., Sari, P., Aninora, N. R., Handayani, I., Putra, B. P., et al. (2023). Embriologi. *Global Eksekutif Teknologi*.
- Avilla-Royo, E., Gegenschatz-Schmid, K., Grossmann, J., Kockmann, T., Zimmermann, R., Snedeker, J. G., Ochsenbein-Kölble, N., and Ehrbar, M. (2021). Comprehensive quantitative characterization of the human term amnion proteome. *Matrix Biology Plus*, 12:100084.
- Baharvand, H., Heidari, M., Ebrahimi, M., Valadbeigi, T., and Salekdeh, G. H. (2007). Proteomic analysis of epithelium-denuded human amniotic membrane as a limbal stem cell niche. *Mol Vis*, 13:1711–1721.
- Balasundaram, B., Harrison, S., and Bracewell, D. G. (2009). Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. *Trends in biotechnology*, 27(8):477–485.
- Banerjee, A., Weidinger, A., Hofer, M., Steinborn, R., Lindenmair, A., Hennerbichler-Lugscheider, S., Eibl, J., Redl, H., Kozlov, A. V., and Wolbank, S. (2015). Different metabolic activity in placental and reflected regions of the human amniotic membrane. *Placenta*, 36(11):1329–1332.
- Bartels, H. and Wang, T. (1983). Intercellular junctions in the human fetal membranes. *Anatomy and Embryology*, 166(1):103–120.
- Battle, J. and Perdomo, F. (1993). Placental membranes as a conjunctival substitute. *Ophthalmology*, 100(107):15.
- Bansil, R., Yannas, I., and Stanley, H. (1978). Raman spectroscopy: a structural probe of glycosaminoglycans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 541(4):535–542.
- Beckett, L., Matuska, A. M., Hon, S., Delco, M. L., Cole, B. J., Begum, L., Zhang, S., and Fortier, L. A. (2021). Proteomic analysis and cell viability of nine amnion, chorion, umbilical cord, and amniotic fluid-derived products. *Cartilage*, 13(2 suppl):495S–507S.
- Benirschke, K., Burton, G. J., and Baergen, R. N. (2012). Anatomy and pathology of the placental membranes. In *Pathology of the human placenta*, pages 249–307. Springer.
- Bergholt, M. S., Serio, A., and Albrow, M. B. (2019). Raman spectroscopy: guiding light for the extracellular matrix. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7:303.
- Bhatti, G., Romero, R., Gomez-Lopez, N., Chaiworapongsa, T., Jung, E., Gotsch, F., Pique-Regi, R., Pacora, P., Hsu, C.-D., Kavdia, M., et al. (2022). The amniotic fluid proteome changes with gestational age in normal pregnancy: a cross-sectional study. *Scientific Reports*, 12(1):1–16.
- Bolje, A. and Gobec, S. (2021). Analytical techniques for structural characterization of proteins in solid pharmaceutical forms: an overview. *Pharmaceutics*, 13(4):534.

- Bourne, G. L. (1960). The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *American journal of obstetrics and gynecology*, 79(6):1070–1073.
- Brindeau, A. (1934). Création d'un vagin artificiel à l'aide des membranes ovulaires d'un oeuf à terme. *Gynecol Obstet*, 29:385.
- Brolo, A. G., Germain, P., and Hager, G. (2002). Investigation of the adsorption of L-cysteine on a polycrystalline silver electrode by surface-enhanced Raman scattering (SERS) and surface-enhanced second harmonic generation (SESHG). *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(23):5982–5987.
- Brown, G. L., Nanney, L. B., Griffen, J., Cramer, A. B., Yancey, J. M., Curtsinger III, L. J., Holtzin, L., Schultz, G. S., Jurkiewicz, M. J., and Lynch, J. B. (1989). Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *New England Journal of Medicine*, 321(2):76–79.
- Burton, G. J. and Fowden, A. L. (2015). The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1663):20140066.
- Butler, H. J., Ashton, L., Bird, B., Cinque, G., Curtis, K., Dorney, J., Esmonde-White, K., Fullwood, N. J., Gardner, B., Martin-Hirsch, P. L., et al. (2016). Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nature protocols*, 11(4):664–687.
- Byler, D. M. and Susi, H. (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 25(3):469–487.
- Cai, M., Zhang, J., Guan, L., and Zhao, M. (2015). Novel implantable composite biomaterial by fibrin glue and amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(3):1–8.
- Carneiro, J., Döll-Boscardin, P. M., Fiorin, B. C., Nadal, J. M., Farago, P. V., and Paula, J. P. d. (2016). Development and characterization of hyaluronic acid-lysine nanoparticles with potential as innovative dermal filling. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52:645–651.
- Casale, J. and Crane, J. S. (2019). *Biochemistry, glycosaminoglycans*.
- Cavalu, S., Roiu, G., Pop, O., Herede, D. A. P., Costea, T. O., and Costea, C. F. (2021). Nano-scale modifications of amniotic membrane induced by UV and antibiotic treatment: histological, AFM and FTIR spectroscopy evidence. *Materials*, 14(4):863.
- Cavazos-Rehg, P. A., Krauss, M. J., Spitznagel, E. L., Bommarito, K., Madden, T., Olsen, M. A., Subramaniam, H., Peipert, J. F., and Bierut, L. J. (2015). Maternal age and risk of labor and delivery complications. *Maternal and child health journal*, 19:1202–1211.
- Centurione, L., Passaretta, F., Centurione, M. A., De Munari, S., Vertua, E., Silini, A., Liberati, M., Parolini, O., and Di Pietro, R. (2018). Mapping of the human placenta: experimental evidence of amniotic epithelial cell heterogeneity. *Cell transplantation*, 27(1):12–22.
- Chakavarti, B. and Chakavarti, D. (2008). Electrophoretic separation of proteins. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (16): e758.
- Chao, Y.-C., Humphreys, S., and Penfield, W. (1940). A new method of preventing adhesions. The use of amnioplastin after craniotomy. *British medical journal*, 1(4134):517.
- Chen, Z.-T., Liang, Z.-G., and Zhu, X.-D. (2015). A review: proteomics in nasopharyngeal carcinoma. *International journal of molecular sciences*, 16(7):15497–15530.

- Cooper, L. J., Kinoshita, S., German, M., Koizumi, N., Nakamura, T., and Fullwood, N. J. (2005). An investigation into the composition of amniotic membrane used for ocular surface reconstruction. *Cornea*, 24(6):722–729.
- Costa, E. and Murta, J. N. (2015). Amniotic membrane in ophthalmology. *Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications*, pages 105–122.
- Crestani, B., Marchand-Adam, S., Quesnel, C., Plantier, L., Borensztajn, K., Marchal, J., Mailleux, A., Soler, P., and Dehoux, M. (2012). Hepatocyte growth factor and lung fibrosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9(3):158–163.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., Oliver, A. E., Tsvetkova, N., Wolters, W., and Tablin, F. (2001). The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*, 43(2):89–105.
- Dadkhah Tehrani, F., Firouzeh, A., Shabani, I., and Shabani, A. (2021). A review on modifications of amniotic membrane for biomedical applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8:606982.
- Davis, J. (1910). Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J*, 15:307–396.
- De Rötth, A. (1940). Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. *Archives of ophthalmology*, 23(3):522–525.
- Dehghani, S., Rasouljanboroujeni, M., Ghasemi, H., Keshel, S. H., Nozarian, Z., Hashemian, M. N., Zarei-Ghanavati, M., Latifi, G., Ghaffari, R., Cui, Z., et al. (2018). 3d-printed membrane as an alternative to amniotic membrane for ocular surface/conjunctival defect reconstruction: An in vitro & in vivo study. *Biomaterials*, 174:95–112.
- Dhall, S., Sathyamoorthy, M., Kuang, J.-Q., Hoffman, T., Moorman, M., Lerch, A., Jacob, V., Sinclair, S. M., and Daniilkevitch, A. (2018). Properties of viable lyopreserved amnion are equivalent to viable cryopreserved amnion with the convenience of ambient storage. *PLoS One*, 13(10): e0204060.
- Dome, K., Akimenko, Z., Bychkov, A., Kalambet, Y., and Lomovsky, O. (2021). On the applicability of electrophoresis for protein quantification. *Polymers*, 13(22):3971.
- Dua, H. S., Gomes, J. A., King, A. J., and Maharajan, V. S. (2004). The amniotic membrane in ophthalmology. *Survey of ophthalmology*, 49(1):51–77.
- Dua, H. S., Maharajan, V. S., and Hopkinson, A. (2006). Controversies and limitations of amniotic membrane in ophthalmic surgery. *Cornea and external eye disease*, pages 21–33.
- Dudok, D. V., Nagdee, I., Cheung, K., Liu, H., Vedovelli, L., Ghinelli, E., Kenyon, K., Parapuram, S., and Hutnik, C. M. (2015). Effects of amniotic membrane extract on primary human corneal epithelial and limbal cells. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 43(5):443–448.
- Ehredt Jr, D. J., Zulauf, E. E., min Kim, H., and Connors, J. (2020). Cryopreserved amniotic membrane and autogenous adipose tissue as an interpositional spacer after resection of a cubonavicular coalition: a case report and review of the literature. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, 59(1):173–177.
- Emge, L. A. (1921). Notes on the study of mitochondria in the human amnion. *The Anatomical Record*, 22(5):342–351.
- Fénelon, M., Catros, S., Meyer, C., Fricain, J.C., Obert, L., Auber, F., Louvrier, A. and Gindraux, F. (2021). Applications of human amniotic membrane for tissue engineering. *Membranes*, 11(6):387.
- Fenner, B. J., Yusoff, N. Z., Fuest, M., Zhou, L., Bandeira, F., Cajucom-Uy, H. Y., Tan, H., Mehta, J. S., and Yam, G. H. (2019). A cellular and proteomic approach to assess proteins extracted from cryopreserved human amnion in the cultivation of corneal stromal keratocytes for stromal cell therapy. *Eye and Vision*, 6(1):1–14.

- Fukuda, K., Chikama, T.-i., Nakamura, M., and Nishida, T. (1999). Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea*, 18(1):73–79.
- Galus, A., Mallet, J.-M., Lembo, D., Cagno, V., Djabourov, M., Lortat-Jacob, H., and Bouchemal, K. (2016). Hexagonal-shaped chondroitin sulfate self-assemblies have exalted anti-HSV-2 activity. *Carbohydrate polymers*, 136:113–120.
- García, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ Diag*, 1(2):31–41.
- García-Castro, I.L., García-López, G., Ávila-González, D., Flores-Herrera, H., Molina-Hernández, A., Portillo, W., Ramón-Gallegos, E., and Díaz, N. F. (2015). Markers of pluripotency in human amniotic epithelial cells and their differentiation to progenitor of cortical neurons. *PloS one*, 10(12): e0146082.
- García de Insausti, C. L. (2012). Aislamiento y caracterización de las células madre de la membrana amniótica: una nueva fuente para terapia celular e inmunomodulación. Proyecto de investigación.
- García-López, G., García-Castro, I. L., Ávila-González, D., Molina-Hernández, A., Flores-Herrera, H., Merchant-Larios, H., and Díaz-Martínez, F. (2015). Human amniotic epithelium (HAE) as a possible source of stem cells (SC). *Gac Med Mex*, 151(1):66–74.
- Gargiulo, A. R., Khan-Dawood, F. S., and Dawood, M. Y. (1997). Epidermal growth factor receptors in uteroplacental tissues in term pregnancy before and after the onset of labor. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(1):113–117.
- Ghamari, S.-H., Abbasi-Kangevari, M., Tayebi, T., Bahrami, S., and Niknejad, H. (2020). The bottlenecks in translating placenta-derived amniotic epithelial and mesenchymal stromal cells into the clinic: current discrepancies in marker reports. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8:180.
- Gicquel, J.-J., Dua, H. S., Brodie, A., Mohammed, I., Suleman, H., Lazutina, E., James, D. K., and Hopkinson, A. (2009). Epidermal growth factor variations in amniotic membrane used for ex vivo tissue constructs. *Tissue Engineering Part A*, 15(8):1919–1927.
- Glassford, S. E., Byrne, B., and Kazarian, S. G. (2013). Recent applications of ATR-FTIR spectroscopy and imaging to proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1834(12):2849–2858.
- Glyk, A., Heinisch, S. L., Scheper, T., and Beutel, S. (2015). Comparison of colorimetric methods for the quantification of model proteins in aqueous two-phase systems. *Analytical biochemistry*, 477:35–37.
- Gramignoli, R. (2016). Therapeutic use of human amnion-derived products: cell-based therapy for liver disease. *Current Pathobiology Reports*, 4(3):157–167.
- Gremare, A., Jean-Gilles, S., Musqui, P., Magnan, L., Torres, Y., Fenelon, M., Brun, S., Fricain, J.-C., and L'heureux, N. (2019). Cartography of the mechanical properties of the human amniotic membrane. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 99:18–26.
- Güler, R., Ercan, M., Ulutuncel, N., Devrim, H. and Uran, N. (1997). Measurement of blood flow by the 133xe clearance technique to grafts of amnion used in vestibuloplasty. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 35(4):280–283.
- Hammer, A., Hutter, H., Blaschitz, A., Mahnert, W., Hartmann, M., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., and Dohr, G. (1997). Amnion epithelial cells, in contrast to trophoblast cells, express all classical HLA class I molecules together with HLA-G. *American Journal of Reproductive Immunology*, 37(2):161–171.

Han, Y. M., Romero, R., Kim, J.-S., Tarca, A. L., Kim, S. K., Draghici, S., Kusanovic, J. P., Gotsch, F., Mittal, P., Hassan, S. S., et al. (2008). Region-specific gene expression profiling: novel evidence for biological heterogeneity of the human amnion. *Biology of reproduction*, 79(5):954–961.

Hanash, S. (2003). Disease proteomics. *Nature*, 422(6928):226–232.

Harrison, S. T. (1991). Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. *Biotechnology advances*, 9(2):217–240.

Holman, J. D., Dasari, S., and Tabb, D. L. (2013). Informatics of protein and posttranslational modification detection via shotgun proteomics. *Proteomics for Biomarker Discovery*, pages 167– 179.

Hopkinson, A., McIntosh, R. S., Shanmuganathan, V., Tighe, P. J., and Dua, H. S. (2006a). Proteomic analysis of amniotic membrane prepared for human transplantation: characterization of proteins and clinical implications. *Journal of proteome research*, 5(9):2226–2235.

Hopkinson, A., McIntosh, R. S., Tighe, P. J., James, D. K., and Dua, H. S. (2006b). Amniotic membrane for ocular surface reconstruction: donor variations and the effect of handling on TGF- β content. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(10):4316–4322.

Hori, J., Wang, M., Kamiya, K., Takahashi, H., and Sakuragawa, N. (2006). Immunological characteristics of amniotic epithelium. *Cornea*, 25: S53–S58.

Horn, A., Saller, J., Cuttica, D., and Neufeld, S. (2019). Review of use of amniotic membrane allograft in total ankle replacements. *Foot & Ankle Orthopaedics*, 4(4):2473011419S00222.

Hossain, M. L., Rahman, M. A., Siddika, A., Adnan, M., Rahman, H., Diba, F., Hasan, M. Z., and Asaduzzaman, S. (2020). Burn and wound healing using radiation sterilized human amniotic membrane and centella asiatica derived gel: A review. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 6:347–357.

In'tAnker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G. M., Claas, F. H., Fibbe, W. E., and Kanhai, H. H. (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem cells*, 22(7):1338–1345.

Ishino, Y., Sano, Y., Nakamura, T., Connon, C. J., Rigby, H., Fullwood, N. J., and Kinoshita, S. (2004). Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(3):800–806.

Jabareen, M., Mallik, A. S., Bilic, G., Zisch, A. H., and Mazza, E. (2009). Relation between mechanical properties and microstructure of human fetal membranes: an attempt towards a quantitative analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 144: S134–S141.

Jang, K., Kim, H. G., Hlaing, S. H. S., Kang, M., Choe, H. W., & Kim, Y. J. (2022). A short review on cryoprotectants for 3D protein structure analysis. *Crystals*, 12(2), 138.

Jennings, T. A. (1999). *Lyophilization: introduction and basic principles*. CRC press.

Jirsova, K. and Jones, G. L. (2017). Amniotic membrane in ophthalmology: properties, preparation, storage and indications for grafting—a review. *Cell and tissue banking*, 18(2):193–204.

Kalamajski, S. and Oldberg, A°. (2010). The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix biology*, 29(4):248–253.

Kauma, S., Hayes, N., and Weatherford, S. (1997). The differential expression of hepatocyte growth factor and met in human placenta. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(3):949–954.

Kesting, M. R., Wolff, K.-D., Nobis, C. P., and Rohleder, N. H. (2014). Amniotic membrane in oral and maxillofacial surgery. *Oral and maxillofacial surgery*, 18(2):153–164.

- Kim, J. C. and Tseng, S. (1995). Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea*, 14(5):473–484.
- Kim, S. Y., Romero, R., Tarca, A. L., Bhatti, G., Lee, J., Chaiworapongsa, T., Hassan, S. S., and Kim, C. J. (2011). mir-143 regulation of prostaglandin-endoperoxidase synthase 2 in the amnion: implications for human parturition at term. *PloS one*, 6(9): e24131.
- Knöfler, M., Haider, S., Saleh, L., Pollheimer, J., Gamage, T.K. and James, J. (2019). Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76:3479–3496.
- Koike, C., Zhou, K., Takeda, Y., Fathy, M., Okabe, M., Yoshida, T., Nakamura, Y., Kato, Y., and Nikaido, T. (2014). Characterization of amniotic stem cells. *Cellular Reprogramming (Formerly Cell Lineage and Stem Cells)*, 16(4):298–305.
- Kothary, P. (1974). Total glossectomy and repair with amniotic membrane. *Journal of the Indian Medical Association*, 62(3):87–88.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259):680–685.
- Laranjo, M. (2015). Preservation of amniotic membrane. *Amniotic membrane: Origin, characterization and medical applications*, pages 209–230.
- Lee, D. C., Hayward, J. A., Restall, C. J., and Chapman, D. (1985). Second-derivative infrared spectroscopic studies of the secondary structures of bacteriorhodopsin and calcium-ATPase. *Biochemistry*, 24(16):4364–4373.
- Lee, P.-H., Tsai, S.-H., Kuo, L., Hwang, C.-Y., Kuo, C.-Y., Yang, V. C., and Chen, J.-K. (2012). A prototype tissue engineered blood vessel using amniotic membrane as scaffold. *Acta Biomaterialia*, 8(9):3342–3348.
- Lee, P. C., & Meisel, D. (1982). Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *The Journal of Physical Chemistry*, 86(17), 3391–3395.
- Lemke, A., Ferguson, J., Gross, K., Penzenstadler, C., Bradl, M., Mayer, R. L., Gerner, C., Redl, H., and Wolbank, S. (2018). Transplantation of human amnion prevents recurring adhesions and ameliorates fibrosis in a rat model of sciatic nerve scarring. *Acta biomaterialia*, 66:335–349.
- Lettow, M., Grabarics, M., Mucha, E., Thomas, D. A., Polewski, L., Freyse, J., Rademann, J., Meijer, G., von Helden, G., and Pagel, K. (2020). IR action spectroscopy of glycosaminoglycan oligosaccharides. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 412:533–537.
- Li, J. F., Huang, Y. F., Ding, Y., Yang, Z. L., Li, S. B., Zhou, X. S., Fan, F. R., Zhang, W., Zhou, Z. Y., Wu, D. Y., et al. (2010). Shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy. *nature*, 464(7287):392–395.
- Liang, X., Zhou, L., and Yan, J. (2020). Amniotic membrane for treating skin graft donor sites: A systematic review and meta-analysis. *Burns*, 46(3):621–629.
- Lindenmair, A., Wolbank, S., Stadler, G., Meinel, A., Peterbauer-Scherb, A., Eibl, J., Polin, H., Gabriel, C., van Griensven, M. and Redl, H. (2010). Osteogenic differentiation of intact human amniotic membrane. *Biomaterials*, 31(33):8659–8665.
- Liu, H., Zhou, Z., Lin, H., Wu, J., Ginn, B., Choi, J. S., Jiang, X., Chung, L., Elisseeff, J. H., Yiu, S., et al. (2018). Synthetic nanofiber-reinforced amniotic membrane via interfacial bonding. *ACS applied materials & interfaces*, 10(17):14559–14569.

- López-Valladares, M.J., Teresa Rodríguez-Ares, M., Tourino, R., Gude, F., Teresa Silva, M. and Couceiro, J. (2010). Donor age and gestational age influence on growth factor levels in human amniotic membrane. *Acta oftalmológica*, 88(6): e211–e216.
- Macheleidt, J. and Kniemeyer, O. (2021). Serological proteome analysis for the characterization of secreted fungal protein antigens. *Host-Fungal Interactions: Methods and Protocols*, pages 15–26.
- Mahbod, M., Shahhoseini, S., Khabazkhoob, M., Beheshtnejad, A.-H., Bakhshandeh, H., Atyabi, F., and Hashemi, H. (2014). Amniotic membrane extract preparation: what is the best method? *Journal of Ophthalmic & Vision Research*, 9(3):314.
- Mainreck, N., Brézillon, S., Sockalingum, G. D., Maquart, F.-X., Manfait, M., and Wegrowski, Y. (2011). Rapid characterization of glycosaminoglycans using a combined approach by infrared and Raman microspectroscopies. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(2):441–450.
- Malak, T., Ockleford, C., Bell, S., Dalglish, R., Bright, N., and Macvicar, J. (1993). Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta*, 14(4):385–406.
- Mamede, A. C. and Botelho, M. F. (2015). Amniotic membrane: origin, characterization and medical applications. Springer.
- Mamede, A. C., Carvalho, M., Abrantes, A. M., Laranjo, M., Maia, C., and Botelho, M. (2012). Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell and tissue research*, 349(2):447–458.
- Mao, Y., Hoffman, T., Dhall, S., Singal, A., Sathyamoorthy, M., Danilkovitch, A., and Kohn, J. (2019). Endogenous viable cells in lyopreserved amnion retain differentiation potential and anti- fibrotic activity in vitro. *Acta Biomaterialia*, 94:330–339.
- McLaren, J., Malak, T., and Bell, S. (1999). Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: identification of an area of altered morphology overlying the cervix. *Human reproduction*, 14(1):237–241.
- McQuilling, J. P., Kammer, M., Kimmerling, K. A., and Mowry, K. C. (2019). Characterization of dehydrated amnion chorion membranes and evaluation of fibroblast and keratinocyte responses in vitro. *International Wound Journal*, 16(3):827–840.
- Meinert, M., Eriksen, G. V., Petersen, A. C., Helmig, R. B., Laurent, C., Ulbjerg, N., and Malmström, A. (2001). Proteoglycans and hyaluronan in human fetal membranes. *American journal of obstetrics and gynecology*, 184(4):679–685.
- Miki, T. and Grubbs, B. (2014). Therapeutic potential of placenta-derived stem cells for liver diseases: Current status and perspectives. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 40(2):360– 368.
- Miki, T., Mitamura, K., Ross, M. A., Stolz, D. B., and Strom, S. C. (2007). Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *Journal of Reproductive Immunology*, 75(2):91–96.
- Mohammed, S., Aryasomayajula, A., and Selvaganapathy, P. (2017). A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines*, 8(3):83.
- Mohan, R., Bajaj, A., and Gundappa, M. (2017). Human amnion membrane: potential applications in oral and periodontal field. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 7(1):15.
- Murphy, S. V., Skardal, A., Nelson Jr, R. A., Sunnon, K., Reid, T., Clouse, C., Kock, N. D., Jackson, J., Soker, S., and Atala, A. (2020). Amnion membrane hydrogel and amnion membrane powder accelerate wound healing in a full thickness porcine skin wound model. *Stem cells translational medicine*, 9(1):80–92.

- Murri, M. S., Moshirfar, M., Birdsong, O. C., Ronquillo, Y. C., Ding, Y., and Hoopes, P. C. (2018). Amniotic membrane extract and eye drops: a review of literature and clinical application. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)*, 12:1105.
- Naba, A., Clauser, K. R., Ding, H., Whittaker, C. A., Carr, S. A., and Hynes, R. O. (2016). The extracellular matrix: Tools and insights for the "omics" era. *Matrix Biology*, 49:10–24.
- Nakamura, T., Sekiyama, E., Takaoka, M., Bentley, A. J., Yokoi, N., Fullwood, N. J., and Kinoshita, S. (2008). The use of trehalose-treated freeze-dried amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Biomaterials*, 29(27):3729–3737.
- Nakamura, T., Yoshitani, M., Rigby, H., Fullwood, N. J., Ito, W., Inatomi, T., Sotozono, C., Nakamura, T., Shimizu, Y., and Kinoshita, S. (2004). Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(1):93–99.
- Nemer, G., Louka, N., Vorobiev, E., Salameh, D., Nicaud, J.-M., Maroun, R. G., and Koubaa, M. (2021). Mechanical cell disruption technologies for the extraction of dyes and pigments from microorganisms: A review. *Fermentation*, 7(1):36.
- Niknejad, H., Deihim, T., Solati-Hashjin, M., and Peirovi, H. (2011). The effects of preservation procedures on amniotic membrane's ability to serve as a substrate for cultivation of endothelial cells. *Cryobiology*, 63(3):145–151.
- Niknejad, H., Peirovi, H., Jorjani, M., Ahmadiani, A., Ghanavi, J., and Seifalian, A. M. (2008). Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cells Mater*, 15:88–99.
- Nowak, D. and Jakubczyk, E. (2020). The freeze-drying of foods the characteristic of the process course and the effect of its parameters on the physical properties of food materials. *Foods*, 9(10):1488.
- Ogawa, K., Chen, F., Kuang, C., and Chen, Y. (2004). Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor- β is mediated by a nuclear factor-kb site. *Biochemical Journal*, 381(2):413–422.
- Ong, S.-E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & cellular proteomics*, 1(5):376–386.
- Park, S.-J., Yoon, W.-G., Song, J.-S., Jung, H. S., Kim, C. J., Oh, S. Y., Yoon, B. H., Jung, G., Kim, H.-J., and Nirasawa, T. (2006). Proteome analysis of human amnion and amniotic fluid by two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proteomics*, 6(1):349–363.
- Passaretta, F., Bosco, D., Centurione, L., Centurione, M. A., Marongiu, F., and Di Pietro, R. (2020). Differential response to hepatic differentiation stimuli of amniotic epithelial cells isolated from four regions of the amniotic membrane. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(7):4350–4355.
- Pérez-Chabela, M.d.L., Soriano-Santos, J., Ponce-Alquicira, E., Díaz-Tenorio, L., et al. (2015). Polyacrylamide gel electrophoresis-SDS as a tool to study myofibrillar proteins. a review. *Nacameh*, 9(2):77–96.
- Pirjali, T., Azarpira, N., Ayatollahi, M., Aghdaie, M., Geramizadeh, B., and Talai, T. (2013). Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord wharton's jelly and amniotic membrane. *International journal of organ transplantation medicine*, 4(3):111.
- Pozzobon, M., Piccoli, M., and De Coppi, P. (2014). Stem cells from fetal membranes and amniotic fluid: markers for cell isolation and therapy. *Cell and tissue banking*, 15(2):199–211.

- Puyana, S., Ruiz, S., Elkbuli, A., Bernal, E., McKenney, M., Askari, M., Lim, R., and Mir, H. (2020). The use of dehydrated human amniotic membrane versus amniotic/chorionic membrane allografts to treat partial thickness facial burns. *Journal of Craniofacial Surgery*, 31(1):201–203.
- Qiu, C., Ge, Z., Cui, W., Yu, L., and Li, J. (2020). Human amniotic epithelial stem cells: a promising seed cell for clinical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20):7730.
- Rabilloud, T. and Lelong, C. (2011). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *Journal of proteomics*, 74(10):1829–1841.
- Rennie, K., Gruslin, A., Hengstschläger, M., Pei, D., Cai, J., Nikaido, T. and Bani-Yaghoub, M. (2012). Applications of amniotic membrane and fluid in stem cell biology and regenerative medicine. *Stem cells international*, 2012.
- Riau, A. K., Beuerman, R. W., Lim, L. S., and Mehta, J. S. (2010). Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*, 31(2):216–225.
- Riaz, T., Zeeshan, R., Zarif, F., Ilyas, K., Muhammad, N., Safi, S.Z., Rahim, A., Rizvi, S.A. and Rehman, I. U. (2018). FTIR analysis of natural and synthetic collagen. *Applied Spectroscopy Reviews*, 53(9):703–746.
- Rocha, S. C. M. and Baptista, C. J. M. (2015). Biochemical properties of amniotic membrane. *Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications*, pages 19–40.
- Rodríguez-Ares, M. T., López-Valladares, M. J., Touriño, R., Vieites, B., Gude, F., Silva, M. T., and Couceiro, J. (2009). Effects of lyophilization on human amniotic membrane. *Acta Oftalmológica*, 87(4):396–403.
- Rogatsky, E. (2021). Pandora box of BCA assay. investigation of the accuracy and linearity of the microplate bicinchoninic protein assay: Analytical challenges and method modifications to minimize systematic errors. *Analytical Biochemistry*, 631:114321.
- Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., et al. (2004). Multiplexed protein quantitation in *saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & cellular proteomics*, 3(12):1154–1169.
- Roy, S. and Kumar, V. (2014). A practical approach on SDS page for separation of protein. *International Journal of Science and Research*, 3(8):955–960.
- Russo, A., Bonci, P. and Bonci, P. (2012). The effects of different preservation processes on the total protein and growth factor content in a new biological product developed from human amniotic membrane. *Cell and tissue banking*, 13(2):353–361.
- Sekiyama, E., Nakamura, T., Kurihara, E., Cooper, L. J., Fullwood, N. J., Takaoka, M., Hamuro, J., and Kinoshita, S. (2007). Novel sutureless transplantation of bioadhesive-coated, freeze-dried amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(4):1528–1534.
- Shimazaki, J., Shinozaki, N., and Tsubota, K. (1998). Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. *British Journal of Ophthalmology*, 82(3):235–240.
- Smith, P. e., Krohn, R. I., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., and Klenk, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1):76–85.
- Sorsby, A. and Symons, H. (1946). Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye:(burns of the second degree). *The British journal of ophthalmology*, 30(6):337.

- Stern, M. (1913). The grafting of preserved amniotic membrane to burned and ulcerated surfaces, substituting skin grafts: a preliminary report. *Journal of the American Medical Association*, 60(13):973–974.
- Thomasen, H., Pauklin, M., Steuhl, K.-P. and Meller, D. (2009). Comparison of cryopreserved and air-dried human amniotic membrane for ophthalmologic applications. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 247:1691–1700.
- Touahir, L., Jenkins, A. T. A., Boukherroub, R., Gouget-Laemmel, A. C., Chazalviel, J.-N., Peretti, J., Ozanam, F., and Szunerits, S. (2010). Surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy on silver based SPR substrates. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(51):22582–22589.
- Turco, M. Y. and Moffett, A. (2019). Development of the human placenta. *Development*, 146(22): dev163428.
- Vacanti, J. P. and Langer, R. (1999). Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *The lancet*, 354: S32–S34.
- Van Herendael, B., Oberti, C., and Brosens, I. (1978). Microanatomy of the human amniotic membranes: a light microscopic, transmission and scanning electron microscopic study. *American journal of obstetrics and gynecology*, 131(8):872–880.
- Vasi, A.-M., Popa, M. I., Butnaru, M., Dodi, G., and Verestiuc, L. (2014). Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications. *Materials Science and Engineering: C*, 38:177– 185.
- Vecino, E. and Kwok, J. C. (2016). The extracellular matrix in the nervous system: The good and the bad aspects. *Composition and Function of the Extracellular Matrix in the Human Body*, pages 1–35.
- Vercauteren, F. G., Bergeron, J. J., Vandesande, F., Arckens, L., and Quirion, R. (2004). Proteomic approaches in brain research and neuropharmacology. *European journal of pharmacology*, 500(1– 3):385–398.
- Wang, Y. (2010). Vascular biology of the placenta. In *Colloquium Series on integrated systems physiology: from molecule to function*, volume 2, pages 1–98. Morgan & Claypool Life Sciences.
- Wang, Z., Fei, S., Suo, C., Han, Z., Tao, J., Xu, Z., Zhao, C., Tan, R., and Gu, M. (2018). Antifibrotic effects of hepatocyte growth factor on endothelial-to-mesenchymal transition via transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)/SMAD and AKT/mTOR/p70s6k signaling pathways. *Annals of Trans- plantation*, 23:1.
- Washburn, M. P., Wolters, D., and Yates, J. R. (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature biotechnology*, 19(3):242–247.
- Weidinger, A., Pozenel, L., Wolbank, S. and Banerjee, A. (2021). Subregional differences of the human amniotic membrane and their potential impact on tissue regeneration application. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8:1489.
- Wilkins, M. R., Sanchez, J.-C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., and Williams, K. L. (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 13(1):19–50.
- Wu, Z., Horgan, C. E., Carr, O., Owens, R. T., Iozzo, R. V., and Lechner, B. E. (2014). Biglycan and decorin differentially regulate signaling in the fetal membranes. *Matrix Biology*, 35:266–275.
- Yeu, E. (2017). Retrospective analysis of safety and efficacy of amniotic cytokine extract (pge-2) in the treatment of dry-eye syndrome. In 2017 ASCRS· ASOA Symposium and Congress. ASCRS.
- Yoon, H.-H., Lee, S.-K., Song, K.-Y., Park, J.-K., et al. (2014). Amniotic epithelial cells have different in vitro proliferation capacity depending on their anatomical origin. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 19(6):1091–1096.