



**UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO DE CÉLULAS
MESENQUIMALES DEL ESTROMA DE LA MEMBRANA
AMNIÓTICA HUMANA. POTENCIALIDAD
OSTEOCONDROGÉNICA**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por el bachiller Ricardo López como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutora: Dra. Elizabeth Merentes D.

CARACAS, VENEZUELA
ABRIL - 2014

RESUMEN

En la actualidad, se encuentra en pleno desarrollo la investigación acerca de las diversas fuentes de obtención de las células madre. Si bien, es importante resaltar que estas células presentan una variedad de características destacables y prometedoras para el campo de la biología y la medicina regenerativa; aún existen diversos aspectos en cuestión con respecto a la naturaleza y los problemas éticos que se desencadenan a partir del estudio de estas células. La membrana amniótica humana (MAH), es una nueva fuente de células madre, de baja inmunogenicidad, de fácil acceso sin que suponga ningún riesgo para el donante, no presenta problemas éticos y además provee de suficiente material celular. Estudios recientes acerca del aislamiento de células mesenquimales y epiteliales de la MAH han demostrado que estas células madre presentan propiedades pluripotentes. En este contexto, se planteó como objetivo de este trabajo, la estandarización de los métodos para el aislamiento, caracterización y la evaluación del potencial de diferenciación osteocondrogénico de las células mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana. Para ello, se utilizaron placentas humanas donadas con consentimiento informado y la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias, UCV. La MAH fue aislada del corion de forma manual, posteriormente se realizó la disgregación mecánica y enzimática con la colagenasa tipo I. Los cultivos de células mesenquimales se caracterizaron con un microscopio invertido de contraste de fases, coloraciones de rutina, determinaciones inmunocitoquímicas y mediante sondas fluorescentes. Posteriormente, se realizaron subcultivos para evaluar el potencial de diferenciación de las células utilizando dos estrategias de cultivo:

cultivo en monocapa y sistema de cultivo tridimensional en micromasas. A estos cultivos se les realizaron distintos ensayos histoquímicos e inmunohistoquímicos con el fin de detectar la presencia de diversos componentes de la matriz extracelular que también se encuentran presentes en células del tejido cartilaginoso y el tejido óseo. Se logró estandarizar un método para el establecimiento y caracterización del cultivo primario, manteniéndose la morfología típica a través de los subcultivos sin rasgos aparentes de senescencia. En los cultivos se apreció una subpoblación de células con morfología tipo fusiforme que expresa marcadores de células mesenquimales progenitoras; Stro-1 y vimentina. También se observó otra subpoblación de células de amplio volumen citoplasmático con numerosos lisosomas en la región perinuclear del citoplasma. Por último, la presencia de GAG carboxilados y sulfatados, de proteoglicanos en la matriz extracelular de las micromasas, así como también la expresión de colágeno tipo II, principal marcador de condrogénesis indican que las células mesenquimales de la membrana amniótica humana se diferenciaron hacia el linaje condrogénico bajo todas las condiciones ensayadas, incluso el sistema tridimensional de micromasas permitió que las células en presencia de medio control y ausencia de inductores se diferenciaron espontáneamente hacia este linaje, sin embargo no se logró la diferenciación a nivel osteogénico, mientras que si hay indicios de mineralización de la matriz extracelular en algunas zonas del cultivo bidimensional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	15
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	18
Objetivo general:	18
Objetivos específicos:	18
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Material biológico	20
Establecimiento del cultivo primario de células mesenquimales de la membrana amniótica humana:	20
Aislamiento de la membrana amniótica humana de la placenta	20
Denudación de la membrana amniótica humana	21
Disgregación mecánica y enzimática del estroma de la membrana amniótica humana	23
Establecimiento de subcultivos	25
Ensayos de proliferación celular mediante curva de crecimiento	26
Caracterización morfológica de las células mesenquimales	26
Registros con sondas fluorescentes	27
Determinación inmunocitoquímica	27
Ensayos para la inducción de la diferenciación en cultivos	28
Cultivos en monocapa	28
Cultivos en agregados celulares o micromasas	29
Evaluación citoquímica de la inducción de la diferenciación de las células mesenquimales de la MAH cultivadas en monocapa	30
Coloración azul alcian	30
Coloración de von Kossa	30
Evaluación histoquímica e inmunohistoquímica de la inducción de la diferenciación de las células mesenquimales de la MAH	31
Cultivos en agregados celulares o micromasas	31
Azul de toluidina 1%	31
Coloración de Van Gieson	31
Inmunohistoquímica anti colágeno tipo II	32
RESULTADOS	33

Aislamiento y establecimiento del cultivo de células mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana (MAH).	33
Curva de crecimiento de las células mesenquimales de la membrana amniótica humana.....	36
Caracterización morfológica de células mesenquimales del estroma de la MAH.	37
Inducción de la diferenciación de las células mesenquimales del estroma de la MAH.....	40
Diferenciación de células mesenquimales en cultivos en monocapa	41
Diferenciación de células mesenquimales en sistema tridimensional de micromasas.....	44
DISCUSIÓN	63
Aislamiento y establecimiento del cultivo de células mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana.....	63
Curva de crecimiento de las células mesenquimales de la membrana amniótica humana.....	66
Caracterización morfológica de células mesenquimales del estroma de la MAH.	67
Inducción de la diferenciación de las células mesenquimales del estroma de la MAH.....	70
Diferenciación de cultivos de células mesenquimales en monocapa	71
Diferenciación de células mesenquimales en sistema tridimensional de micromasas.....	73
CONCLUSIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	81
ANEXO 1	95
ANEXO 2	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo jerárquico de las células madre de acuerdo a su potencialidad.....	4
Figura 2. Representación esquemática del feto humano dentro de su membrana extraembrionaria a las 20 semanas de gestación.....	7
Figura 3. Corte teñido con hematoxilina-eosina de amnios y corion de un mono Rhesus y representación esquemática del amnios y corion humano.....	7
Figura 4. Esquema de la cadena de señalización de la proteína morfogenética del hueso (BMP).....	11
Figura 5. Componentes orgánicos de la matriz ósea.....	13
Figura 6. Protocolo de aislamiento de la membrana amniótica humana de la placenta.....	22
Figura 7. Protocolo de denudación y disgregación enzimática de la membrana amniótica humana.....	24
Figura 8. Cultivo primario de células aisladas del estroma de la membrana amniótica humana obtenidas de la primera fracción enzimática.....	34
Figura 9. Cultivo primario de células tipo mesenquimales aisladas del estroma de la membrana amniótica humana obtenidas de la segunda fracción enzimática.....	35
Figura 10. Subcultivos de células tipo mesenquimales aisladas del estroma de la membrana amniótica humana.....	36
Figura 11. Curva de crecimiento de las células mesenquimales de la membrana amniótica humana.....	37
Figura 12. Células tipo mesenquimales aisladas del estroma de la membrana amniótica humana. Coloración de rutina May Grünwald-Giemsa.....	38
Figura 13. Células tipo mesenquimales aisladas del estroma de la membrana amniótica humana. Marcaje con sondas fluorescentes: Naranja de Acridina (NA) y Hoescht.....	39
Figura 14. Determinación inmunocitoquímica de cultivos de células tipo mesenquimales aisladas del estroma de la membrana amniótica humana.....	40

Figura 15. Diferenciación de células tipo mesenquimales en el sistema de cultivo en monocapa. Coloración azul alcian pH 2,5.....	42
Figura 16. Diferenciación de células tipo mesenquimales en el sistema de cultivo en monocapa. Coloración de von Kossa.....	43
Figura 17. Sistema de cultivo en micromasas de células tipo mesenquimales. Tamaño de los agregados.....	44
Figura 18. Cartílago humano teñido con azul alcian pH 2,5. Control positivo.....	45
Figura 19. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana cultivadas en micromasas. Medio control. Coloración Azul alcian pH 2,5.....	46
Figura 20. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas. Medio de inducción condrogénica. Coloración Azul alcian pH 2,5.....	47
Figura 21. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas. Medio de inducción osteogénica. Coloración azul alcian pH 2,5.....	48
Figura 22. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana cultivadas en micromasas. Medio control. Coloración azul alcian pH 1.....	49
Figura 23. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas. Medio de inducción condrogénico. Coloración azul alcian pH 1.....	50
Figura 24. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas. Medio de inducción osteogénico. Coloración azul alcian pH 1.....	52
Figura 25. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana cultivadas en micromasas. Medio control. Azul de toluidina.....	52
Figura 26. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas. Medio de inducción condrogénico. Azul de toluidina.....	54

Figura 27. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas. Medio de inducción osteogénico. Azul de toluidina.....	54
Figura 28. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana cultivadas en micromasas. Medio control. Tinción de Van Gieson.....	55
Figura 29. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas. Medio de inducción condrogénica. Tinción de Van Gieson.....	56
Figura 30. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas. Medio de inducción osteogénica. Tinción de Van Gieson.....	57
Figura 31. Cartílago humano. Inmunohistoquímica anti colágeno tipo 2. Control positivo.....	58
Figura 32. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana cultivadas en micromasas. Medio control. Inmunohistoquímica anti colágeno tipo II.....	59
Figura 33. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana cultivadas en micromasas. Medio de inducción condrogénica. Inmunohistoquímica anti colágeno tipo II.....	60
Figura 34. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana cultivadas en micromasas. Medio de inducción osteogénica. Inmunohistoquímica anti colágeno tipo II.....	61
Figura 35. Esquematización del patrón general que exhiben las micromasas en cada ensayo.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunos ejemplos de biomoléculas y efectos involucrados en la condrogénesis <i>in vitro</i>	10
Tabla 2. Factores a ensayar en el medio base para inducir la diferenciación osteogénica y condrogénica.....	28
Tabla 3. Niveles de expresión y de coloración de los ensayos de histoquímica e inmunohistoquímica aplicados en cada región de las micromasas.	62
Tabla 4. Parámetros aplicados en distintas referencias para la disgregación enzimática de la MAH denudada.....	64

OLISTA DE ABREVIATURAS

BMP: proteína morfogenética del hueso.

BMPRI: receptor tipo I de la proteína morfogenética del hueso.

CD105: endoglina, marcador de superficie de células mesenquimales.

CD11b: integrina, marcador de superficie celular de leucocitos.

CD14: marcador de superficie celular de monocitos y macrófagos.

CD19: marcador de superficie celular de linfocitos B.

CD34: marcador de superficie celular hematopoyético.

CD44: molécula de adhesión celular, receptor ácido hialurónico.

CD45: marcador de superficie celular hematopoyético.

CD73: marcador de superficie de células madre mesenquimales.

CD79 α : marcador de superficie celular de linfocitos B.

CD90: antígeno presente en células estromales.

CMAH: células mesenquimales de la membrana amniótica humana.

GAGs: glucosaminoglicanos.

HLA-DR: antígeno de leucocitos humanos.

IGF: factor de crecimiento de insulina.

MAH: membrana amniótica humana.

MEC: matriz extracelular.

MHC-I: complejo mayor de histocompatibilidad clase I.

MHC-II: complejo mayor de histocompatibilidad clase II.

mTOR: serina/treonina proteína kinasa, conocida como la diana de rapamicina en células de mamíferos.

NA: naranja de acridina.

Runx2/Cbfa1: factor de transcripción involucrado en el proceso de osteogénesis.

SOX-9: factor de transcripción expresado en condrocitos y en células de otros tejidos.

Stro-1: antígeno presente en células de unidades formadoras de colonia de fibroblasto, marcador de células madre mesenquimales.

TGF-B: factor de crecimiento transformante beta.

UFC-F: unidades formadoras de colonia de fibroblastos.

INTRODUCCIÓN

En años recientes de investigación, el estudio de la célula mediante técnicas de cultivo celular ha obtenido un avance significativo, sustentado por las diversas ventajas que presenta esta tecnología. Entre las ventajas principales se destacan, según Freshney en el 2010, el control de las características fisicoquímicas del microambiente (pH, temperatura, presión osmótica, concentración tanto de O₂ como de CO₂) así como también las condiciones fisiológicas presentes. A su vez, estas características se encuentran englobadas dentro de las necesidades básicas que determinan la preparación de un cultivo, como lo son: un soporte o sustrato, una fase gaseosa y un medio de cultivo. Es preciso señalar, que este conjunto de factores buscan simular el ambiente de la célula cuando ésta se encuentra en su condición *in vivo*, es por esto que este microambiente debe estar constituido por una óptima adhesión del sustrato, una concentración adecuada de nutrientes, hormonas, factores de crecimiento y contar con un número significativo de interacciones celulares; todo esto resulta fundamental para la expresión de funciones celulares especializadas (Alberts y col., 2008).

Así como se expresan funciones especializadas por parte de la célula también se expresa un fenotipo característico, el cual no siempre coincide exactamente con el fenotipo que se presenta en condiciones *in vivo*; pues esto se encuentra determinado por el cambio del microambiente. De igual forma se ve reducido el número de interacciones célula-célula y célula-matriz debido a la ausencia de la arquitectura heterogénea y tridimensional del tejido original, así como también la carencia de numerosos estímulos por parte de nutrientes y hormonas (Freshney, 2010).

La célula alcanza la expresión de propiedades fenotípicas y funcionales similares a las presentadas *in vivo* a través de un proceso llamado diferenciación, es en esta etapa que se le denomina célula madura, la cual puede estar sujeta a una condición irreversible o reversible (Freshney, 2010). Por otra parte, cuando una célula no exhibe estas características se le conoce como célula indiferenciada, entre las que se destacan las células madre.

En la actualidad, el tema de las células madre ha ocupado un papel importante en la biología moderna y en la medicina, puesto que la disciplina de estudio de esta vertiente ha obligado a los científicos a intentar establecer conexiones entre regulaciones epigenéticas y el destino de la célula. Igualmente, la biología de las células madre circunscribe aplicaciones para el tratamiento de diversas enfermedades como la malformación y degeneración de tejidos, traumas y deficiencias genéticas. Es por esta razón que se sitúa a las células madre como una promesa para alcanzar terapias efectivas que permitan incluso restaurar completamente las funciones perdidas de tejidos dañados como consecuencia de distintas patologías (Daley, 2010).

Las células madre son células indiferenciadas que se encuentran presentes en los distintos estadios del desarrollo de un organismo (embrión, feto y adulto). Igualmente, éstas originan las células diferenciadas que conforman un tejido, los cuales, a su vez constituyen a los órganos. Tanto en la etapa postnatal como en la etapa adulta se pueden localizar células madre en distintos órganos del cuerpo humano. Éstas resultan cruciales al momento de reparar alguna lesión presentada por un órgano en específico. Entre las principales características de las células madre están: la capacidad de auto renovarse (pueden proliferar extensivamente),

la habilidad de clonarse a partir de una sola célula y su potencialidad (capacidad de diferenciación en distintos tipos celulares). Sin embargo, estas propiedades pueden variar en diversos tipos de células madre (Kolios y Moodley, 2012).

La clasificación de las células madre se puede realizar según dos criterios distintos: su potencial de diferenciación y su origen. En términos de potencial de diferenciación, se pueden clasificar en 5 grupos: totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes y unipotentes (Smith, 2006). En cuanto a las totipotentes, éstas son las únicas células capaces de conformar un organismo completo, el origen de las mismas proviene del cigoto. (Smith, 2006; Rossant, 2001). Las células madre pluripotentes poseen la capacidad de diferenciarse en células de cualquiera de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo; mas no en células del tejido extraembrionario (De Miguel y col., 2010). Por otra parte, las células madre multipotentes son capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria (Prósper y Herreros, 2004). En cuanto a las células madre oligopotentes, éstas poseen una menor capacidad de diferenciación que las multipotentes, puesto que se pueden diferenciar a un grupo más restringido de linajes celulares (Wagers y Weissman., 2004; Ilic y Polak, 2011). Por último, las células madre unipotentes únicamente pueden diferenciarse en células de un solo tipo celular determinado (Amabile y Meissner, 2009).

De acuerdo a su origen o fuente de obtención, las células madre se pueden clasificar en: células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre adultas y células madre de origen neonatal. (Ilic y Polak, 2011; Kolios y Moodley, 2012). Las células madre embrionarias son pluripotentes y se

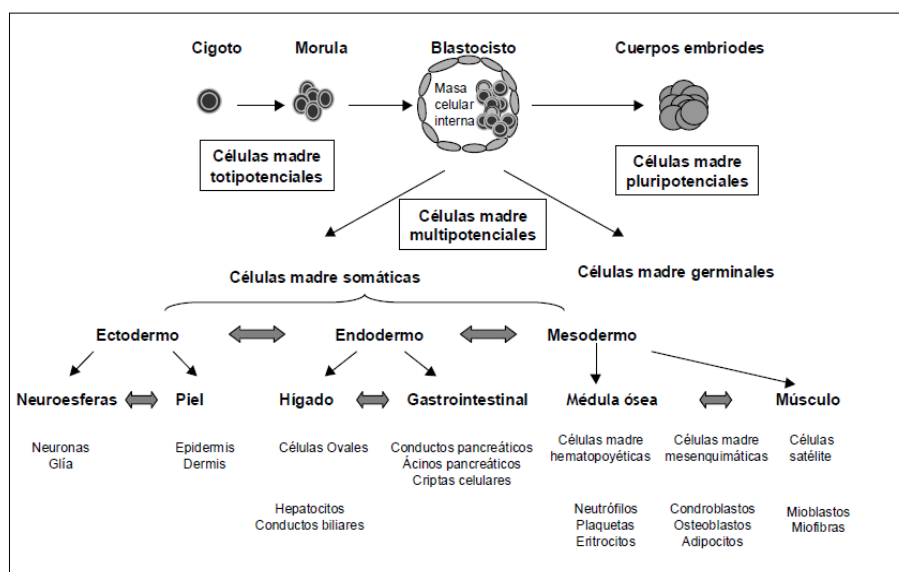


Figura 1. Modelo jerárquico de las células madre de acuerdo a su potencialidad (Tomado de Prósper y Herreros, 2004)

derivan de la masa celular interna del blastocisto (estadio ubicado entre los días 5 y 6 posteriores a la fertilización, señalado en la Figura 1), éstas se pueden mantener en cultivo y en estado indiferenciado por un tiempo prolongado (Yao y col., 2006; Rossant, 2008). En referencia a las células madre pluripotentes inducidas, éstas se originan a partir de la reprogramación de células somáticas adultas a través de la sobreexpresión de factores de transcripción específicos (Amabile y Meissner, 2009). De la misma forma, se ha demostrado que estas células resultan muy similares a las células madre embrionarias en términos de morfología, proliferación, antígenos de superficie, genes de expresión, estado epigenético de genes específicos de pluripotencialidad y actividad enzimática de la telomerasa (Takahashi y col., 2007). Las células madre adultas generalmente son multipotentes, del mismo modo se han reportado hallazgos de estas células en diversas zonas del organismo, tales como: médula ósea, músculo esquelético, piel, tejido adiposo, corazón, pulmón, hígado, próstata, intestinos, sangre

periférica y el sistema nervioso central. (Alison e Islam, 2008; Hass y col., 2011).

En cuanto a las células madre de origen neonatal, se consideran como principales fuentes de obtención tejidos como la placenta, el amnios, y el cordón umbilical. Una ventaja destacable de estos tejidos como fuente de células madre es su fácil disponibilidad y obtención, lo cual permite que se descarten intervenciones invasivas al organismo además de evitar problemas de índole ético. De hecho, este tipo de tejidos neonatales están conformados por una serie de poblaciones celulares que incluyen: células epiteliales, mesenquimales, endoteliales y hematopoyéticas; todas con características de células madre. Inclusive, se ha sugerido que las células madre mesenquimales provenientes de estos tejidos podrían tener ventajas adicionales a las células madre adultas del tipo mesenquimal; entre las que se destacan: mejor capacidad de proliferación, mayor tiempo de vida y mayor potencial de diferenciación. Un ejemplo factible de células madre obtenidas a partir de tejidos neonatales con las características anteriormente descritas, son las células mesenquimales de la placenta. (Hass y col., 2011).

La placenta en humanos, junto con el blastocisto, empieza su desarrollo durante los días 6 y 7 posteriores a la fertilización (Parolini y col., 2008). El órgano de la placenta surge de un proceso en el cual se realiza una conexión estrecha entre una parte de las membranas fetales y el endometrio, lo cual precede a la implantación. Asimismo, estas membranas (desarrolladas a partir del embrión) desempeñan funciones importantes y vitales para el feto (Avancini y col., 2012).

Las membranas fetales reciben el nombre de corion y el amnios; ambas extendidas a partir del borde de la placenta. A diferencia del corion, el amnios o

membrana amniótica se encuentra contiguo al cordón umbilical y la piel del feto (Ver Figura 2). El amnios desempeña una resistencia al estiramiento progresivo del embrión en crecimiento, traumas internos y externos, y cambios drásticos o lentos de presión. Esta resistencia se debe a la composición de su estructura, la cual está conformada por una capa epitelial y el tejido conectivo derivado del mesodermo amniótico, del que se pueden observar en detalle 4 capas distintas en el esquema representado en la Figura 3 (Dobrevy y col., 2010). La monocapa epitelial está compuesta por células planas, cuboidales y columnares; y se encuentran en contacto con el fluido amniótico. Éstas células secretan glucoproteínas, colágeno y lamininas que constituyen la membrana basal; esta última está en contacto con el mesodermo amniótico (Van Hereldaen, 1978; Takashima y col., 2008). Próxima a la membrana basal, se puede distinguir una capa acelular compacta, constituida por tejido conectivo formando paralelamente grupos de colágeno que mantienen la integridad mecánica de la membrana amniótica. Seguidamente, se encuentra una capa denominada estroma ; contigua a una capa esponjosa compuesta por proteoglicanos, glucoproteínas y una red de colágeno no fibrosa adyacente a una capa reticular que contiene células mesenquimales dentro de una matriz extracelular de fibronectina, colágeno y fibrilina. El estroma se caracteriza por ser la capa de mayor espesor conformada por células mesenquimales de tipo fibroblastos, usualmente llamadas células mesenquimales de la membrana amniótica, éstas a su vez se encuentran embebidas en una matriz extracelular de colágeno (Van Hereldaen y col. 1978; Kobayashi y col., 2008; Magatti y col., 2008).

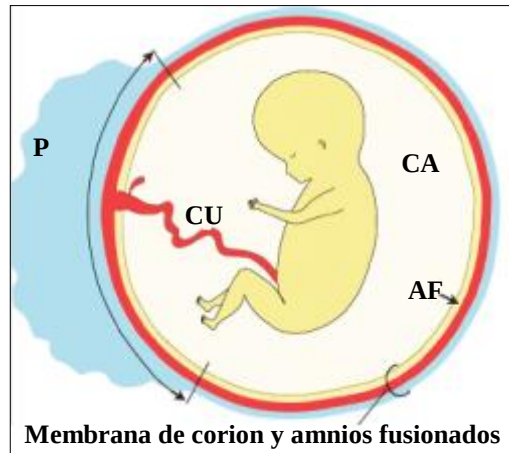


Figura 2. Representación esquemática del feto humano dentro de su membrana extraembrionaria a las 20 semanas de gestación. **P:** Placenta. **CU:** Cordón umbilical. **CA:** Cavidad amniótica. **AF:** Amnios fetal. (Tomado de Dobrev y col., 2010)

La gran resistencia que poseen las membranas fetales se debe, en su mayoría, a la presencia de colágeno. Se ha evidenciado la existencia de colágeno del tipo I, III, IV, V y VI en las distintas capas que constituyen estas membranas. Sin embargo, esta resistencia se encuentra mayormente sustentada por el colágeno tipo I, el cual está presente de manera extensa tanto en la capa compacta como en las adyacencias del mesodermo. Igualmente el colágeno tipo IV es un

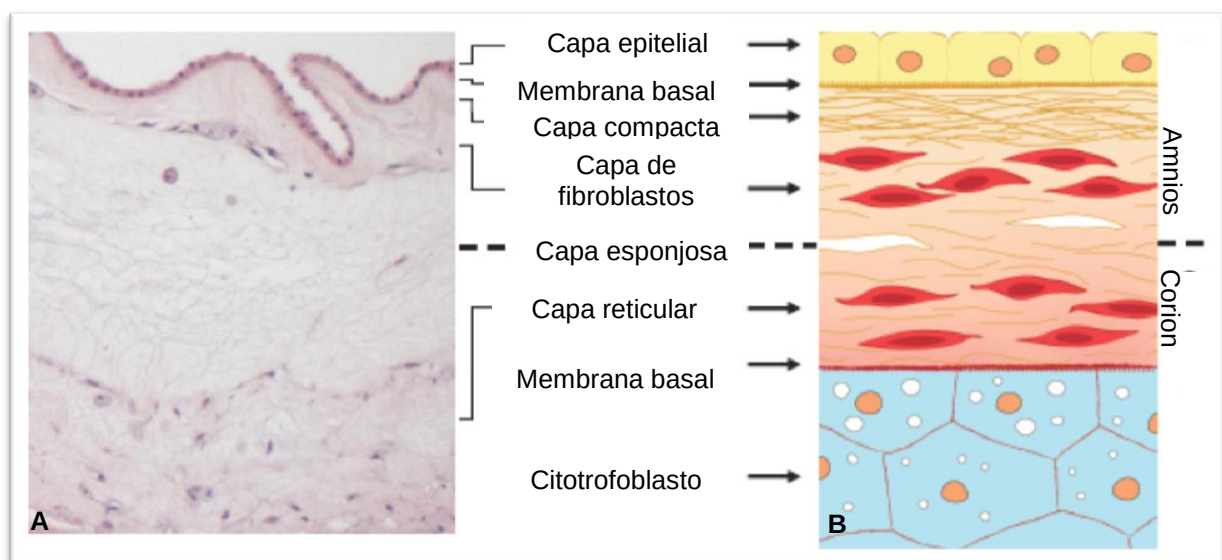


Figura 3. A. Corte teñido con hematoxilina-eosina de amnios y corion de un mono rhesus. **B.** Representación esquemática del amnios y corion humano (Tomado de Dobrev y col., 2010)

componente principal tanto de la membrana basal como de las bandas que interconectan el estroma y el epitelio (Bachmaier y Graf, 1999; Moore y col., 2006). De acuerdo al primer taller internacional sobre células madre derivadas de la placenta, se pueden distinguir cuatro regiones distintas de este órgano: tejido epitelial amniótico, tejido mesenquimal amniótico, tejido mesenquimal coriónico y tejido trofoblástico coriónico. Es decir, de cada una de estos tejidos se pueden señalar cuatro poblaciones diferentes de células madre: células epiteliales de la membrana amniótica humana, células mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana, células mesenquimales del estroma del corion y células mesenquimales del trofoblasto del corion (Parolini y col., 2008). Asimismo, en 2006 Dominici y colaboradores (sustentado por la Sociedad Internacional para la Terapia Celular) reportaron que deben existir unos requisitos mínimos para constatar la presencia de una célula madre mesenquimal. Entre estos criterios se encuentran los descritos a continuación: 1) La expresión positiva de las siguientes moléculas de superficie: CD105 (SH2), CD73 (SH3), CD44 y CD90. Igualmente, debe considerarse la expresión negativa de las moléculas CD45, CD34, CD14 ó CD11b, CD79 α ó CD19 y HLA-DR. 2) Las células mesenquimales se deben identificar por presentar adherencia al sustrato plástico en condiciones normales de cultivo. 3) Deben poseer la competencia de diferenciación *in vitro* a osteoblastos, condroblastos y adipocitos, en condiciones estándar de cultivo.

Como se mencionó anteriormente, las células mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana (hAMSC, por sus siglas en inglés) se encuentran dispersas dentro del estroma, abundante en colágeno, ubicado en la región inferior a la monocapa epitelial. En la actualidad, se considera que este tipo de células

mesenquimales además de poseer la capacidad de diferenciarse en los tres linajes típicos de origen mesodérmico (osteogénico, condrogénico y adipogénico), son capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares de las tres capas germinales: ectodermo (neuronas y glías), mesodermo (músculo esquelético, endotelio, cardiomiocitos) y endodermo (páncreas y hepatocitos) (Lindenmair y col., 2012). Igualmente, se ha mencionado que estas células cuentan con ciertas propiedades que les permiten escapar de los mecanismos de defensa inmunológicos y adicionalmente son capaces de suprimir una serie de funciones de células inmunocompetentes. Esto, en cierta manera se debe a la baja o moderada expresión de MHC-I de superficie así como la baja, o incluso ausencia de la expresión de MHC II y moléculas coestimuladoras. (Lindenmair y col., 2012). En general, las células madre mesenquimales obtenidas de tejidos (como la membrana amniótica) representan el tipo de célula madre más adecuado para la diferenciación en condrocitos. Inclusive, son consideradas las células más prácticas para la rama de la ingeniería de tejidos del cartílago. Esto, principalmente debido a las ventajas que manifiestan las células mesenquimales frente a los inconvenientes éticos, problemas de rechazo inmunológico y complicaciones de tumorigenicidad que pueden presentar las células madre de origen embrionario y las pluripotentes inducidas (Mahmoudifar y Doran, 2012).

El proceso de diferenciación celular *in vitro*, como se mencionó anteriormente, requiere de una serie de componentes y biomoléculas que puedan simular las condiciones del tejido *in vivo* (Algunas mostradas en la Tabla 1). Entre las biomoléculas más importantes está la proteína morfogenética del hueso (BMP), cuya cadena de señalización se caracteriza por activar factores de transcripción

que regulan la expresión génica mediante moléculas activadoras o represoras, esto se esquematiza en la figura 4. Además de esta proteína, existen una variedad de compuestos que son considerados inductores, entre los cuales se destacan: el ácido ascórbico y el β -glicerol fosfato. El ácido ascórbico contribuye en el proceso de diferenciación estimulando la secreción de componentes de la matriz extracelular (colágeno y glucosaminoglicanos); a diferencia del β -glicerol fosfato cuyo rol consiste en inducir la mineralización de la matriz durante la diferenciación osteogénica (Coelho y Fernandes, 2000; Liu y Niswander, 2005; Choi y col., 2008).

Tabla 1. Algunos ejemplos de biomoléculas y efectos involucrados en la condrogénesis *in vitro* (tomado de Mahmoudifar y Doran, 2012)

Moléculas	Efectos
Proteínas morfogenéticas del hueso (BMP2, -4,-6,-9,-12,-13)	Regula proliferación y maduración de condrocitos; regula la expresión de N-cadherina para promover interacciones célula-célula, mejora la acumulación de proteoglicanos y colágeno tipo II; promueve la expresión de SOX9; mejora los efectos estimulantes de TGF- β .
Dexametasona	Mejora la condrogénesis, como también los efectos estimulantes de TGF- β 3.
Factor de crecimiento de insulina-1 (IGF1)	Mejora la acumulación de matriz de cartílago, promueve la expresión de proteoglicanos y colágeno tipo II en combinación con TGF- β 1 o TGF- β 2 y FGF2.
Factor de crecimiento transformante- β (TGF- β 1, - β 2, - β 3)	Regula la expresión de fibronectina durante la condensación; induce la expresión de SOX9; estimulan la expresión de proteoglicanos, colágeno tipo II, N-Cadherina, NCAM, colágeno tipo XI, fibronectina, tenascina y decorina.

Por estas razones, es necesario conocer todas las propiedades y componentes que constituyen la estructura del cartílago y el hueso. En el caso del cartílago, entre los principales elementos que le brindan sus características biomecánicas están el colágeno tipo II y los glucosaminoglicanos (GAGs). Los condrocitos, células responsables de sintetizar y mantener el cartílago, componen sólo el 1%

del volumen tisular; mientras que el agua conforma aproximadamente el 60%-85% de la masa total del tejido. Se han encontrado diversos tipos de colágeno en el cartílago articular, sin embargo el 90%-95% está presente en la forma de filamentos de colágeno tipo II (Schulz y col., 2007; Athanasiou y col., 2010).

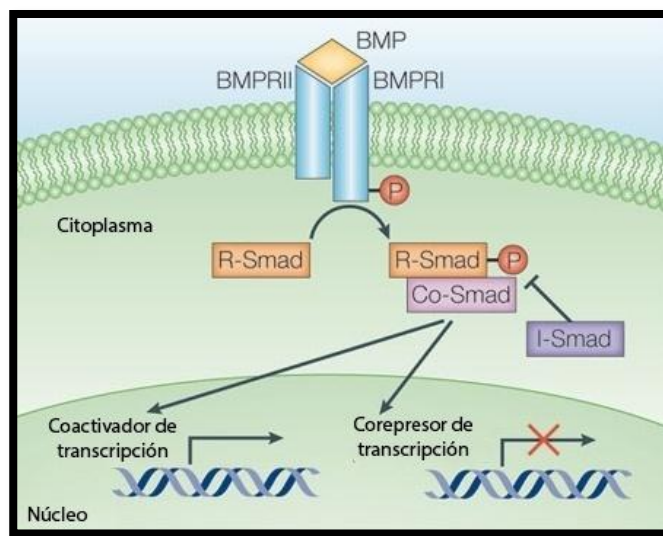


Figura 4. Esquema de la cadena de señalización de la proteína morfogenética del hueso (BMP) donde se observa cómo la fosforilación del receptor (BMPRI) conduce a la activación de proteínas (R-Smad y Co-Smad) que ingresan al núcleo para regular la expresión génica (Tomado de Liu y Niswander, 2005)

Como ya se describió previamente, las células mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana también representan una fuente óptima de células madre para ser inducidas a un proceso de diferenciación osteogénica. Para comprender este proceso, es importante destacar que la formación del hueso (osificación) puede ocurrir a través dos vías distintas; la osificación endocondral y la osificación intramembranosa. La osificación endocondral sucede por la acumulación y proliferación de células mesenquimales, las cuales expresan

inicialmente colágeno tipo II y se diferencian en condroblastos que, a su vez producen matriz cartilaginosa. Luego, se constituye un cartílago hialino con la forma general que tendrá el hueso, el cual se desarrollará cuando las células del pericondrio, en la región media del modelo cartilaginoso, dejan de producir condroblastos. Consecuentemente, en su lugar se originan células formadoras del tejido óseo (osteoblastos). Por otra parte, la osificación intramembranosa consiste en la formación del hueso mediante la diferenciación de células mesenquimales en osteoblastos. Esto ocurre por la expresión de diversos factores de transcripción (Runx2/Cbfa1) que conducen a la célula desde la conformación de un osteoprogenitor hasta un osteocito (Ross y Pawlina, 2007).

En cuanto a su estructura, el tejido óseo está compuesto en un 70% por material inorgánico e hidroxapatita, mientras que el porcentaje restante se encuentra conformado por una matriz orgánica (ver figura 5). De esta última, en su composición predomina la presencia del colágeno con un porcentaje de 95% aproximadamente, cualidad que le confiere fuerza y flexibilidad. Dentro de las proteínas diferentes al colágeno se destaca la fibronectina la cual contribuye con la adhesión, el crecimiento y la migración celular. De la misma forma, se enfatiza la función de la fosfatasa alcalina, cuya actividad enzimática es determinante para la deposición mineral durante el proceso de mineralización de la matriz extracelular (Coelho y Fernandes, 2000; Young, 2003; Hidalgo-Bastida y Cartmell, 2010).

Entre las moléculas que son consideradas dentro de los requisitos para la diferenciación osteogénica se consideran: factores de crecimiento (como el TGF-

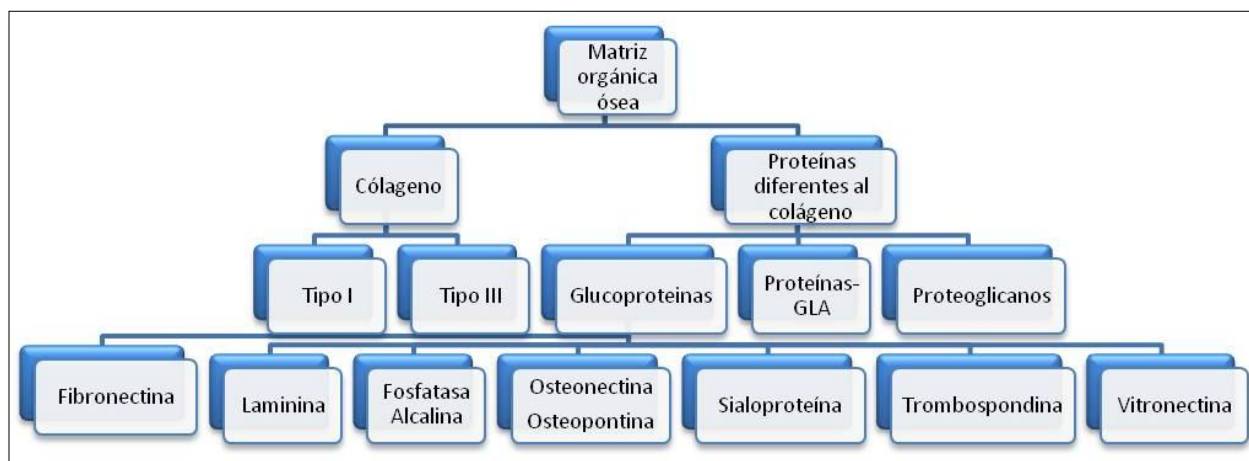


Figura 5. Componentes orgánicos de la matriz ósea (Tomado de Hidalgo-Bastida y Cartmell, 2010)

$\beta 1$), proteínas morfogenéticas del hueso 2; 7 (BMP-2, -7) y algunas proteínas de adhesión (Hidalgo-Bastida y Cartmell, 2010).

Actualmente, se han propuesto diversos sistemas de cultivo para estudiar la condrogénesis y osteogénesis *in vitro*. Entre estos métodos se destacan el cultivo celular en monocapa y el cultivo en agregados celulares o en micromasas. Si bien se puede definir el cultivo en monocapa como un sistema práctico de dos dimensiones que requiere de una siembra a bajas densidades; el sistema de cultivo en micromasas, consiste en una técnica tridimensional de cultivo, que estimula el número de interacciones célula-célula. En el caso de la diferenciación condrogénica, este modelo simula la condensación temprana durante la embriogénesis, previo al inicio de la condrogénesis y a la producción de matriz extracelular por parte de los condrocitos (Jähn y col., 2010).

Es preciso señalar, que dentro de la investigación desarrollada en el campo de cultivo de las células madre, se han descrito diferentes propiedades que califican a las células mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana como

una fuente importante, lo cual a su vez contribuye con los avances tanto a nivel terapéutico como en la disciplina experimental de la ingeniería de tejidos. En este contexto y en función de los proyectos de investigación relacionados a la bioingeniería tisular que se han venido desarrollando en el laboratorio (Merentes, 2009; Márquez y col., 2012; Merentes y col., 2012) y considerando que en nuestro país son muy pocos los estudios realizados con la membrana amniótica humana como fuente de obtención, se planteó el desarrollo de técnicas que permitieran el establecimiento de las condiciones óptimas para el aislamiento, mantenimiento, proliferación y caracterización de las células madre mesenquimales de la membrana amniótica humana, determinando si éstas células mantienen su potencialidad de diferenciación bajo ciertas estrategias de cultivo.

ANTECEDENTES

Una primera observación de células no hematopoyéticas fue descrita por primera vez por Conheim en el año 1867, en este trabajo se propuso la posibilidad de que la médula ósea podría ser la fuente de fibroblastos, los cuales depositan fibras de colágeno como parte del proceso de regeneración en heridas (Prockop, 1997). De igual manera, en 1976 Friedenstein y colaboradores realizaron trabajos que evidenciaron células de la médula ósea con la posibilidad de diferenciarse en otro tipo de células mesenquimales. Éstos sembraron las células de la médula ósea en placas plásticas de cultivo, al transcurrir 4 horas procedieron a descartar la mayoría de las células que se observaron como no adherentes. Es decir, desecharon casi en su totalidad las células hematopoyéticas. Consecuentemente, reportaron que las células que se mantenían adheridas al sustrato presentaban una apariencia heterogénea. Sin embargo existían unos grupos celulares que manifestaban una mejor adhesión. Estos grupos presentaban con una morfología del tipo fusiforme y al cabo de 2-4 días se desencadenó una proliferación rápida de las mismas. Luego de varios pasajes, las células se mostraron más homogéneas en cuanto a su apariencia característica de fibroblastos. Igualmente, evidenciaron células que podían diferenciarse en colonias que a su vez ensamblaban pequeños depósitos de hueso o cartílago. Estas observaciones fueron ampliadas por otros investigadores alrededor del año 1980 y se concluyó que las células aisladas por el método de Friedenstein eran multipotentes y podían diferenciarse en osteoblastos, condrocitos, adipocitos e incluso mioblastos.

Así como se mencionó previamente, en 2006 Dominici y colaboradores (sustentado por la Sociedad Internacional para la Terapia Celular) establecieron

que deben existir unos requisitos mínimos para constatar la presencia de una célula madre mesenquimal. Entre estos criterios se encuentran los descritos a continuación: 1) La expresión positiva y negativa de ciertas moléculas de superficie. 2) Las células deben presentar adherencia al sustrato plástico en condiciones normales de cultivo. 3) Deben poseer la competencia de diferenciación *in vitro* a osteoblastos, condroblastos y adipocitos.

A mediados del año 2004 fueron reportados hallazgos de células madre del tipo mesenquimal en diferentes tejidos de la placenta (Scherjon y col., 2004). Sin embargo, la membrana amniótica humana proveniente de la placenta posee un largo recorrido histórico en cuanto a sus aplicaciones a nivel terapéutico. Se reportó por primera vez que la membrana amniótica era empleada para la cura de heridas hace aproximadamente un siglo atrás (Davis, 1910). Así como también fue utilizada para tratar heridas producidas por quemaduras (Sabella, 1913). Inclusive en 1973; Robson y Krizek concluyeron que la cobertura con la membrana amniótica de quemaduras en ratas infectadas disminuía significativamente la contaminación bacteriana. En el presente, las membranas amnióticas constan de diversas aplicaciones como en úlceras, traumas provocados por intervenciones quirúrgicas, cirugía ocular e ingeniería de tejidos (Dobrevá y col. 2010). Del mismo modo, se ha referido al uso de la membrana amniótica como biosustrato (Díaz-Prado y col., 2010a; Navarro, 2013).

En la actualidad, se conoce que distintos tejidos de la placenta, entre ellos; la membrana amniótica, son una fuente óptima de células madre mesenquimales. Asimismo, se ha reportado que poseen un mayor potencial de expansión que otras fuentes de células madre como lo es, por ejemplo, la médula ósea (Scherjon y

col., 2004; Barlow y col., 2008; Brooke y col., 2008). Por esta razón es que luego en el año 2008 Parolini y colaboradores durante el primer taller internacional sobre células madre derivadas de la placenta, establecieron que entre las cuatro regiones distintas que componen a este órgano se puede distinguir el tejido mesenquimal amniótico, del cual a su vez se pueden aislar las células mesenquimales del estroma.

Recientemente, se ha demostrado que las células mesenquimales de la membrana amniótica humana (CMMAH) son capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares de las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo (Lindenmair y col., 2012). Cabe destacar, que el interés por la investigación sobre estas células no sólo se remite a su aislamiento a partir de tejidos humanos, ya que se han logrado aislar y caracterizar células mesenquimales de la membrana amniótica proveniente de equinos, que pueden ser una fuente muy útil como modelo de estudio, así como también en la terapia celular y la medicina regenerativa en el campo veterinario (Seo y col., 2013).

Hoy en día, un sinnúmero de estudios acerca de las CMMAH han revelado resultados prometedores en las áreas de la investigación y de la medicina regenerativa, tal es el caso de Teng y colaboradores, quienes en el año 2013 lograron establecer cultivos de líneas celulares inmortales con características de células madre. Igualmente, en ese mismo año, Pisano y colaboradores, reportaron una mejoría en la diferenciación de las CMMAH hacia cardiomiocitos a través de la sobreexpresión de diferentes factores de crecimiento. Aunado a ello, en el año en curso (2014), Kim y colaboradores describieron el potencial que poseen estas células para ser empleadas en terapias de enfermedades neurodegenerativas.

HIPÓTESIS

Si las células mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana aisladas logran adherirse al sustrato plástico, proliferar y diferenciarse hacia el linaje osteocondrogénico bajo diferentes estrategias inductoras entonces, se puede considerar que se está en presencia de células madre dentro de las poblaciones celulares.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Establecer cultivos de células mesenquimales a partir del estroma de la membrana amniótica humana y analizar la potencialidad de diferenciación osteocondrogénica de estas células.

Objetivos específicos:

1. Aislar las células mesenquimales a partir del estroma de la membrana amniótica humana y evaluar la viabilidad celular después de la disgregación enzimática utilizando diferentes tratamientos.
2. Establecer cultivos en monocapa de células mesenquimales aisladas y determinar las condiciones óptimas para el mantenimiento y crecimiento de las células en cultivo.
3. Caracterizar morfológicamente *in vitro* las células mesenquimales a través de técnicas de microscopia de luz e inmunocitoquímica.
4. Ensayar métodos inductores de la diferenciación *in vitro* de las células mesenquimales a un fenotipo óseo y condrogénico, usando diferentes estrategias de cultivo.

5. Evaluar la diferenciación mediante técnicas histoquímicas e inmunocitoquímicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Para el establecimiento del cultivo de células mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana, se utilizaron placentas humanas (n=7), que poseían entre 38 y 40 semanas de gestación. Éstas se extrajeron mediante parto por cesárea, por lo cual a cada madre gestante se le practicaron controles serológicos previos a la intervención quirúrgica (ver anexo 1). Inmediatamente, las muestras biológicas se transportaron al laboratorio en un envase estéril dentro de un contenedor con hielo a una temperatura aproximada de 4 °C para prevenir la contaminación y la acción de enzimas proteolíticas.

Las placentas fueron obtenidas de la clínica “Cristóbal Rojas” bajo consentimiento informado y con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela (ver anexo 2).

Establecimiento del cultivo primario de células mesenquimales de la membrana amniótica humana:

Aislamiento de la membrana amniótica humana de la placenta

Para llevar a cabo el aislamiento de la membrana amniótica, la placenta se procesó de acuerdo a lo descrito previamente por Navarro en 2013, de la siguiente manera:

Se separó el amnios del corion y de la placenta, esto se realizó manualmente haciendo un corte al nivel del cordón umbilical y en condiciones de asepsia bajo una campana de flujo laminar horizontal. Posteriormente, la membrana amniótica

se transfirió a un envase de vidrio estéril, en donde se efectuó uno de tres lavados sucesivos con agitación en diferentes envases, los cuales contenían una solución Buffer de fosfato (PBS) libre de calcio y magnesio; con una mezcla al 2% de antibióticos – antimicótico (penicilina 100 u/mL, estreptomicina 100 µg/mL y anfotericina B 0,25 µg/mL) + Gentamicina 100 µg/mL.

La membrana amniótica fue extendida sobre un conjunto de gasas estériles; esto con el motivo de remover los restos de sangre y cortar la membrana en secciones de menor tamaño mediante el uso de una tijera fina. Se continuó con tres lavados más y se realizaron dos pruebas de esterilidad (tioglicolato de sodio y caldo de infusión cerebro corazón) del líquido restante del primer, quinto y sexto envase. Esto se hizo con el objetivo de descartar la existencia de cualquier contaminación posible, producto de la manipulación dentro del quirófano o durante el proceso de lavado (ver figura 6).

Denudación de la membrana amniótica humana

Las secciones de membrana amniótica, obtenidas a partir de los cortes descritos en el procedimiento anterior, fueron colocadas en fiolas con medio F12 y con 2% de antibióticos – antimicótico (penicilina, estreptomicina y anfotericina B) + Gentamicina; manteniéndose refrigeradas a 4 °C por aproximadamente 16 horas. Luego, se lavaron las secciones de MAH con solución PBS para posteriormente ser incubadas en una mezcla de enzima Tripsina 0,05% (GIBCO) –Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,04% (Sigma) en base de medio F12, a 37 °C por 45 minutos, agitando cada 15 minutos.

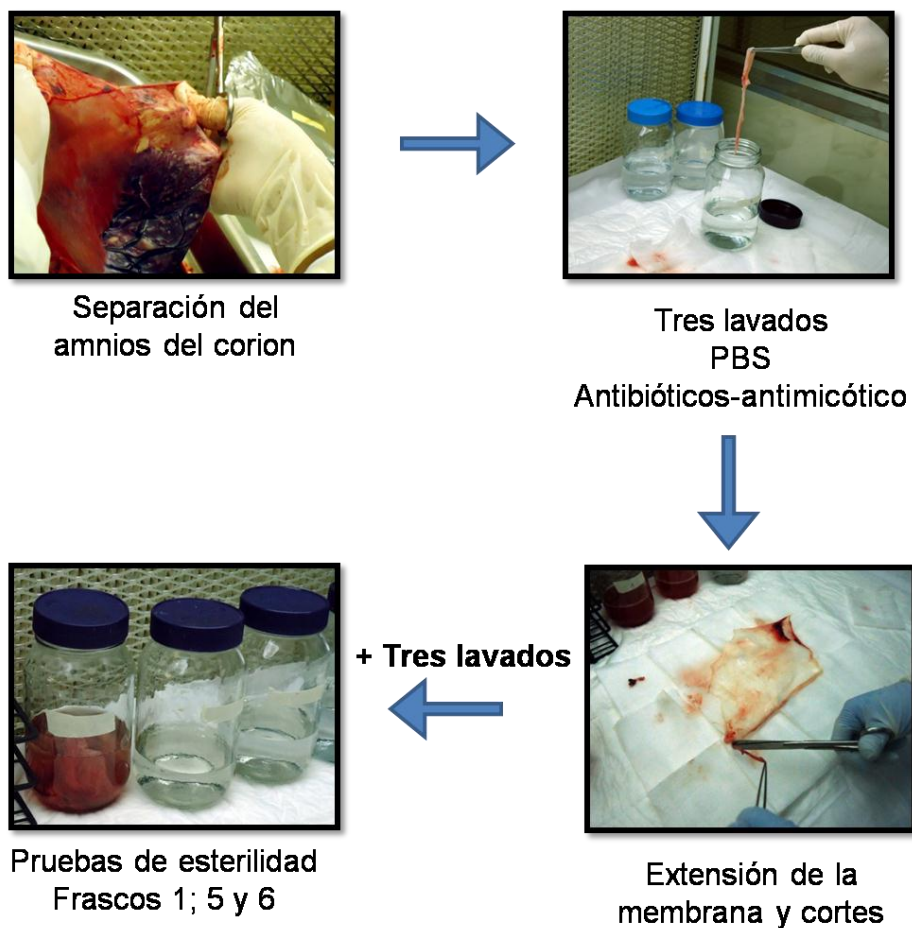


Figura 6. Protocolo de aislamiento de la membrana amniótica humana de la placenta.

Las células epiteliales de la MAH presentes en la suspensión, se centrifugaron en frío a 2455 g por 10 minutos, luego se realizó el conteo de las mismas, se sembró en placas de cultivo y se incubó a 37 °C, en atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

El tejido restante, el cual se denomina estroma, se transfirió a un envase de vidrio estéril con medio F12. A partir de este estroma se aislaron las células mesenquimales de la membrana amniótica, las cuales son las células de interés en este trabajo.

El procedimiento que se siguió para lograr establecer el cultivo primario de las células mesenquimales será el cultivo en monocapa, el cual consiste en la siembra

sobre un sustrato en una interfase líquida-gaseosa de una suspensión celular proveniente de una disgregación enzimática, lo cual origina una monocapa de células adherentes. Éste método está relacionado con la densidad celular, la cual se encuentra determinada por la inhibición por contacto de las células, que a su vez depende de la superficie disponible del sustrato. Asimismo, la ventaja principal de este procedimiento es la facilidad del cambio de medio, es decir; solo hay que verter y reponerlo ya que las células se mantienen adheridas al sustrato de cultivo (Meyer, 2012).

Disgregación mecánica y enzimática del estroma de la membrana amniótica humana

La metodología empleada se realizó según el protocolo de Soncini y colaboradores en el 2007, con ciertas modificaciones descritas a continuación.

El estroma se disgregó mecánicamente mediante la obtención de trozos pequeños; utilizando tijeras finas sobre una placa de Petri con solución de PBS, bajo una campana de flujo laminar vertical. Seguidamente, el tejido se incubó en una solución de colagenasa tipo I (SIGMA) 0,075% disuelta en medio F12 a 37 °C durante 30 minutos. Al transcurrir este tiempo, se extrajo una primera fracción del sobrenadante y se le añadió medio de cultivo frío del tipo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) para inactivar la actividad de la colagenasa. Posteriormente, se le agregó más solución enzimática al tejido para ser incubado por 30 minutos adicionales e inactivar nuevamente con medio frío. Luego, esta segunda fracción enzimática se filtró a través de una gasa estéril, la solución filtrada se centrifugó en frío a 2113,3 g por un tiempo de 10 minutos. El taco celular obtenido de la

centrifugación se resuspendió en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de bovino, 1% de solución de antibióticos y antimicóticos, 1mM de L-Glutamina, 1% de piruvato de sodio y 1% de aminoácidos no esenciales. Posteriormente, se tomó una muestra de la suspensión celular para realizar el conteo de células viables con el colorante de exclusión azul Tripiano en la cámara de Neubauer. Una vez hecho el conteo, se sembraron las células en frascos de cultivo. Los cultivos celulares se incubaron a 37 °C, en atmósfera húmeda al 5 % de CO₂ (ver figura 7).

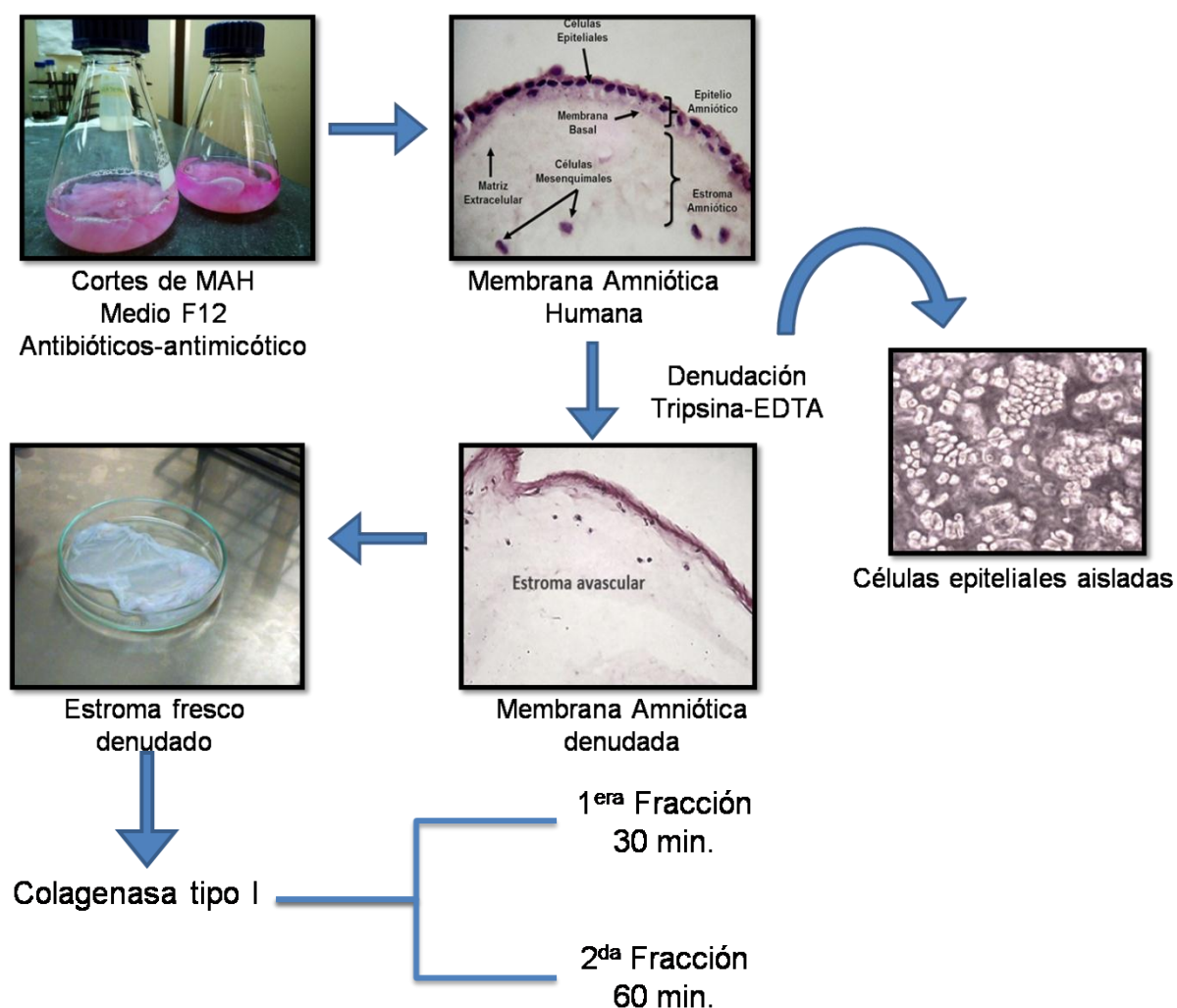


Figura 7. Protocolo de denudación y disgregación enzimática de la membrana amniótica humana (modificado de Merentes y col., 2014).

El medio de cultivo se reemplazó dos veces por semana, realizando previamente dos lavados con solución PBS para descartar restos de células y detritos. Una vez que se alcanzó entre un 80% y 90% de confluencia, se iniciaron los subcultivos con el objetivo de obtener una población de células más homogénea.

Establecimiento de subcultivos

Al revisar periódicamente los cultivos primarios provenientes de ambas fracciones, se decidió sólo subcultivar las células aisladas de la segunda fracción enzimática. Esto se logró a través del siguiente procedimiento:

Las células adheridas fueron sometidas a disgregación con Tripsina 0,125% - EDTA 0,02%. Incubándolas a 37 °C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ por un tiempo de 5 minutos. En seguida, se inactivó la reacción con medio nutritivo suplementado con suero fetal de bovino.

La amplificación celular se llevó a cabo en placas. Se realizaron cuatro pasajes de los subcultivos, a diferentes tiempos:

- 1^{er} pasaje, a los 6 días de cultivo.
- 2^{do} pasaje, a los 4 días de cultivo.
- 3^{er} pasaje, a los 3 días de cultivo.

Estos subcultivos se mantuvieron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para el cultivo primario.

Ensayos de proliferación celular mediante curva de crecimiento

La curva de crecimiento permite mantener un monitoreo constante del cultivo. Esto con el fin de evaluar su comportamiento y constatar que se está en presencia de un crecimiento celular óptimo. Consecuentemente, se hicieron disgregaciones enzimáticas empleando Tripsina-EDTA para luego realizar el conteo celular en la cámara de Neubauer con el colorante de exclusión azul tripano. Seguidamente, se graficó una curva de crecimiento celular, el comportamiento de esta curva se manifestó de acuerdo al número de células vivas en función del tiempo.

Para obtener los puntos de esta curva se emplearon células provenientes del tercer pasaje. Las cuales fueron sembradas a una densidad de 15000 células/pozo en una placa de 6 x 4 pozos, con el fin de contar con una muestra de $n = 6$ por cada punto. Los conteos se hicieron en los días: 2, 7, 13 y 16.

El crecimiento de la población celular también se determinó mediante el uso de un microscopio invertido de contraste de fases Olympus IX50, el cual se encuentra acoplado a una computadora con la cual se tomarán registros usando el programa TV TURNER. De igual manera se realizaron registros fotográficos digitales.

Caracterización morfológica de las células mesenquimales

La caracterización morfológica se realizó a través de cuatro técnicas diferentes en conjunto: registros fotográficos digitales tomados con un microscopio invertido de contraste de fases, una coloración de rutina MayGrunwald-Giemsa, microscopia de fluorescencia y la determinación inmunocitoquímica contra vimentina y Stro-1.

Registros con sondas fluorescentes

Estos registros se realizaron en la Sección de Microscopía del Instituto Anatómico José Izquierdo, para ello se contó con la colaboración del Dr. Marco Álvarez, Director del instituto.

Se utilizaron dos tipos de sondas fluorescentes: naranja de acridina y Hoechst (ambos SIGMA), para realizar marcaje de lisosomas y contrastar núcleos celulares respectivamente (Álvarez y col., 2011). Las sondas fueron usadas en células provenientes del 3^{er} pasaje, con 6 días de cultivo.

Los registros fueron tomados a través de un microscopio invertido CKX31 y un microscopio epifluorescente BX-UCB (ambos Olympus), equipado con una lámpara de mercurio modelo HBO 100 W.

Determinación inmunocitoquímica

La vimentina es una proteína que forma parte de los filamentos intermedios predominantemente sintetizados por células de origen mesodérmico. La determinación de la presencia de esta proteína en las células se hizo a través de un método indirecto mediante el uso de un kit (Vector Laboratories VECTASTAIN® ABC KIT) en el cual se empleó un anticuerpo primario en contra del sustrato, en este caso la vimentina; y se realiza una determinación indirecta basada en la interacción del complejo Estreptavidina-Biotina-peroxidasa y el crógeno Diaminobencidina.

Stro-1 es el marcador mejor conocido de células madre mesenquimales (Lin y col., 2011), para este procedimiento se utilizaron anticuerpos monoclonales anti Stro-1. Igualmente, se llevó a cabo el mismo protocolo anteriormente descrito.

Ensayos para la inducción de la diferenciación en cultivos

Las poblaciones homogéneas de las células del estroma con morfología fusiforme, obtenidas, se sembraron en dos diferentes sistemas: cultivo en monocapa y cultivos tridimensionales tipo agregados o micromasas. Además, se utilizaron los medios de inducción osteogénico y condrogénico que contienen diversos factores, considerados inductores (Ver tabla 2) (Zuk y col., 2002).

Tabla 2. Factores a ensayar en el medio base para inducir la diferenciación osteogénica y condrogénica.

Diferenciación celular	Medio nutritivo	% Suero Fetal Bovino	Suplementos
Control	DMEM	10	• 1% de solución de antibióticos y antimicóticos. • 1% de piruvato de sodio. • 1% de aminoácidos no esenciales. • 1mM de glutamina.
Osteogénica	DMEM	10	• 1% de solución de antibióticos y antimicóticos. • 5 µg/mL de insulina recombinante • 50 µg/mL de ácido ascórbico. • 1 x 10⁻⁷ M de dexametasona • 10 mM de β-Glicerol Fosfato.
Condrogénica	DMEM	10	• 1% de solución de antibióticos y antimicóticos. • 5 µg/mL de insulina recombinante • 50 µg/mL de ácido ascórbico. • 1 x 10⁻⁷ M de dexametasona.

Cultivos en monocapa

Estos cultivos se realizaron con células de morfología fusiforme del 3^{er} pasaje. Para ello, se sembró a una densidad de 48750 células/pozo en una placa de 3 x 3 pozos.

Antes de empezar la inducción, se dejó transcurrir unos 5 días, con el fin de que las células alcanzaran la confluencia. Posteriormente, se extrajo el medio nutritivo, se agregó el medio control y los medios de inducción a ensayar: medio de

inducción condrogénica y medio de inducción osteogénica. Estas placas se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ por un tiempo de 2 semanas con cambios periódicos de medios.

Cultivos en agregados celulares o micromasas

Estos cultivos tridimensionales se sembraron con el motivo de brindar a las células un microambiente circundante inductivo de la expresión de características de un fenotipo diferenciado. En este sentido, se emplearon células del 2^{do} pasaje. Para ello, las células fueron sometidas a digestión en una solución de tripsina-EDTA, incubándolas a 37 °C en atmósfera húmeda al 5 % de CO₂ por un tiempo de 5 minutos. Luego, se centrifugó a 724,5 g por un tiempo de 5 minutos y se resuspendió en medio nutritivo para hacer el conteo celular. Seguidamente, se trasvasaron alícuotas de 4×10^5 células/tubo a tres tubos de centrifuga de 15 mL, se centrifugó nuevamente y se completó hasta 5 mL con medio nutritivo. Al transcurrir 24 horas, se descartó el medio nutritivo y se añadió el medio que corresponde a cada ensayo. Por último, los tubos fueron incubados a 37 °C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ por un tiempo de 14 días con cambios periódicos de medios.

Evaluación citoquímica de la inducción de la diferenciación de las células mesenquimales de la MAH cultivadas en monocapa

Coloración azul alcian

La presencia de componentes de matriz extracelular, se evaluó por medio de la coloración con azul alcian pH 2.5 y pH 1 (Lev y Spicer, 1964), los cuales determinan la presencia de glucosaminoglicanos totales (ácido hialurónico y glicosaminoglicanos de los proteoglicanos) y glucosaminoglicanos sulfatados respectivamente; para ello los cultivos se fijaron en metanol, se lavaron en una solución de ácido acético al 3 % por 3 minutos y luego fueron coloreados por 30 minutos con azul alcian al pH indicado. Transcurrido este tiempo, se lavó durante 10 minutos con agua corriente y seguidamente con agua destilada para contrastar con hematoxilina de Harris por 2 minutos. Finalmente, se lavó con agua corriente y se deshidrató en una batería de etanol creciente con dos cambios en xilol para montar en un medio resinoso (Permout)

Coloración de von Kossa

La plata de la coloración von Kossa se deposita en los complejos cálcicos en forma de grupos de fosfatos o carbonatos. En este sentido, primero se lavaron los cultivos con agua destilada, luego se agregó una solución de nitrato de plata al 1 %; esto se hizo en presencia de luz, durante 20 minutos. Seguidamente, se lavó con una solución de hiposulfito de sodio al 5% y se dejó actuar sobre el cultivo por 20 minutos. Luego, se lavó con agua corriente, para después teñir con una solución de safranina al 0,01% durante 30 segundos.

Evaluación histoquímica e inmunohistoquímica de la inducción de la diferenciación de las células mesenquimales de la MAH

Cultivos en agregados celulares o micromasas

Las micromasas se fijaron con formalina neutra al 10% por 7 días, luego se deshidrataron en una batería creciente de etanol y fueron incluidos en parafina, para cortar secciones de 5 micras de espesor en un microtomo rotatorio (Spencer). Las secciones obtenidas se desparafinaron e hidrataron y luego se procesaron mediante la técnica de coloración azul alcian y rojo Von Kossa; siguiendo el protocolo anteriormente descrito para los cultivos en monocapa.

Los cortes histológicos fueron sometidos adicionalmente a las siguientes técnicas de evaluación histoquímica:

Azul de toluidina 1%

Esta coloración se realizó para evidenciar reacciones metacromáticas de los cortes, las cuales indican la presencia de proteoglicanos. Para ello, se incluyeron los cortes en una solución de azul de toluidina al 1%, por unos 20 minutos. Por último, se lavó dos veces con agua destilada.

Coloración de Van Gieson

La tinción de Van Gieson generalmente es empleada con el objetivo de identificar la presencia de colágeno en la matriz extracelular, el cual al reaccionar se tiñe de rojo, los núcleos de negro y el citoplasma de amarillo.

En primer lugar, se colorearon los núcleos con hematoxilina férrica de Weigert durante 10 minutos, luego se lavó con agua corriente por 5 minutos y se aclaró con agua destilada. Posteriormente se tiñó con la solución de trabajo de Van Gieson por 1 minuto, se secó con papel de filtro y se lavó rápidamente con etanol al 70%.

Al finalizar el protocolo de cada coloración, se procedió a deshidratar primero en etanol 96 %, después etanol absoluto y luego se aclaró en Xilol.

Inmunohistoquímica anti colágeno tipo II

Se hizo la determinación de la presencia del colágeno tipo II como componentes de matriz extracelular mediante los ensayos inmunohistoquímicos con el anticuerpo Anti-colágeno tipo II (MAB8887, Chemicon, Inc.), diluido 1:100 y siguiendo las técnicas inmunohistoquímicas descritas anteriormente.

RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos partiendo de la metodología previamente descrita. De este modo, se iniciará describiendo lo referente al aislamiento y establecimiento del cultivo de las células mesenquimales a partir del estroma de la membrana amniótica humana, así como el crecimiento de las mismas. Posteriormente, se mostrará la caracterización morfológica de las células; para finalmente exponer su potencial de diferenciación (osteocondrogénica) y su evaluación histoquímica e inmunocitoquímica.

Aislamiento y establecimiento del cultivo de células mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana (MAH).

El aislamiento de las células mesenquimales se constituyó en tres pasos distintos, los cuales se encuentran resumidos en la figuras 6 y 7. En consecuencia, luego del proceso de denudación y la disgregación enzimática del estroma, se obtuvieron los siguientes resultados:

En cuanto a las características de las células obtenidas de la primera fracción enzimática, se puede apreciar una población heterogénea de alta densidad celular (figura 8 A). De donde se pueden distinguir, bajo el microscopio de contraste de fases, dos tipos de morfologías. Sin embargo, predomina la presencia de un tipo celular con morfología poligonal, muy similar a la forma característica de las células epiteliales y algunas células tipo fusiforme (figura 8 B). A pesar de que el conteo de esta fracción arrojó un número significativo de células ($\bar{X} = 9,9 \times 10^6$

células), al transcurso de 6 días se evidenció una baja cantidad de células adheridas al sustrato.

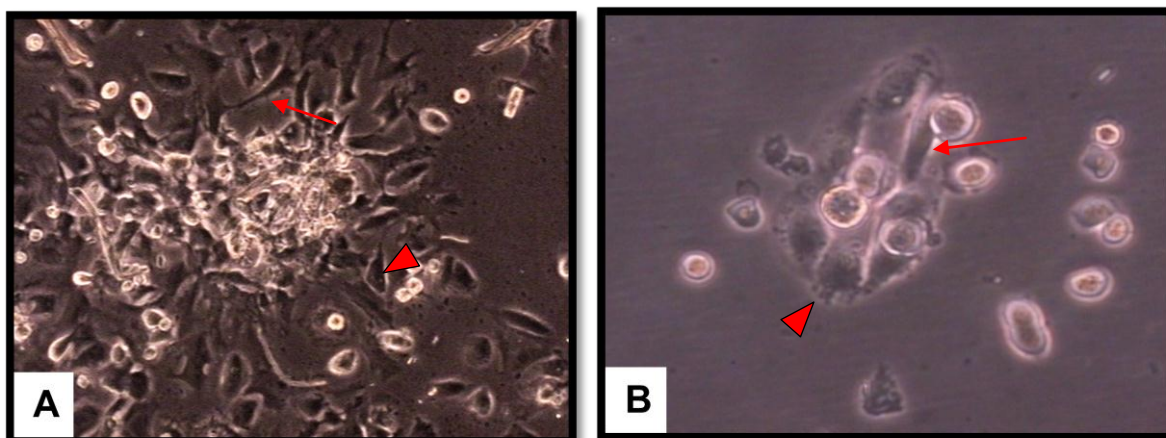


Figura 8. Cultivo primario de células aisladas del estroma de la membrana amniótica humana obtenidas de la primera fracción enzimática. A. Se observa una población celular heterogénea. 2 días de cultivo. 100x. **B.** Detalle de un grupo de células de morfología poligonal (◄) y fusiforme (←). 6 días de cultivo. 200x. Microscopio de contraste de fases.

La segunda fracción enzimática, también con una alta densidad celular ($\bar{X}$ = 13,2 x 10⁶ células) (figura 9 A), estuvo constituida en su mayoría, por células de tipo fusiforme. Éstas se mostraron adheridas al sustrato plástico con un citoplasma extendido de forma alargada, características que se asemejan al fenotipo típico de las células mesenquimales, esto se puede observar en detalle en la figura 9 C. El cultivo de células tipo mesenquimales aisladas del estroma de la MAH logró establecerse exitosamente, evidencia de ello se presenta en la figura 9 B; donde se aprecia la confluencia alcanzada por el cultivo primario al transcurrir un tiempo de 6 días.

Posteriormente, se procedió a realizar los subcultivos de las células mesenquimales; las mismas fueron sometidas a tres pasajes distintos. De igual manera, la proliferación celular se mantuvo constante, pues la confluencia se

alcanzó al cabo de 5 ó 7 días en cada uno de los pasajes (Figura 10 A y B). Sin embargo, en los cultivos a baja densidad celular, pudo notarse la presencia de dos subpoblaciones diferentes de células mesenquimales. Una primera subpoblación se encontraba conformada por células que presentaron una morfología fusiforme característica como se muestra en la figura 10 C y D. Por otra parte, la segunda subpoblación está compuesta por células con un amplio volumen citoplasmático, mostrado en la figura 10 C. A pesar de esto, ambos grupos celulares mantuvieron sus características morfológicas sin rasgos aparentes de senescencia hasta el 4^{to} pasaje.

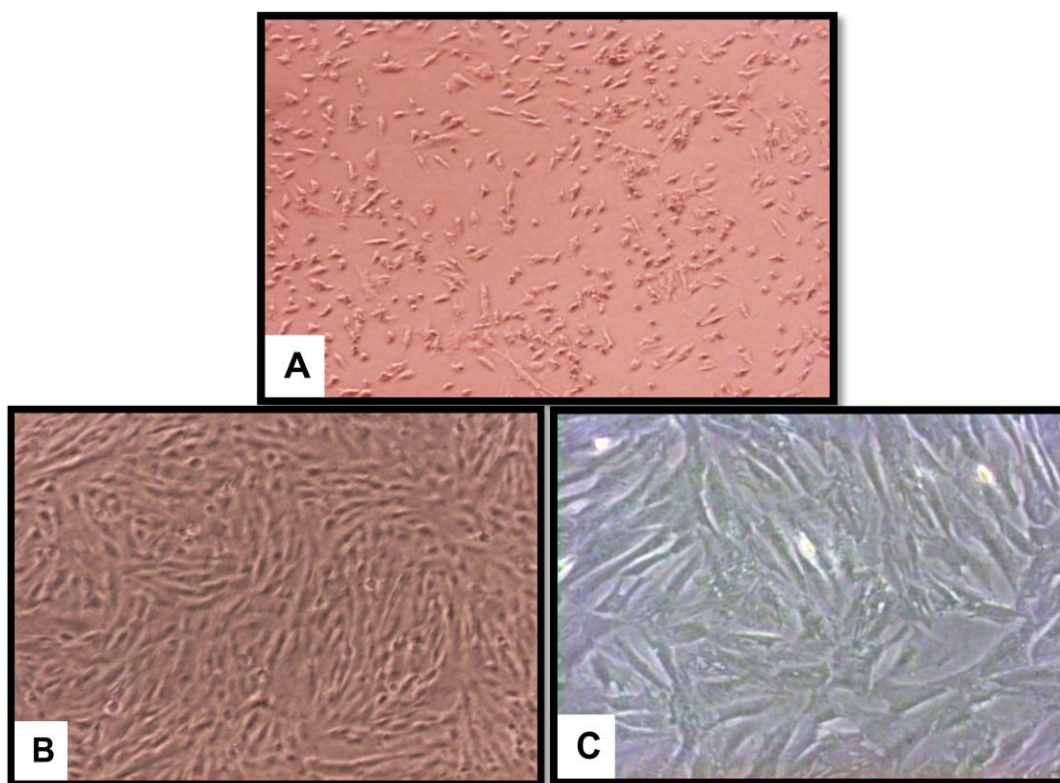


Figura 9. Cultivo primario de células tipo mesenquimales aisladas del estroma de la membrana amniótica humana obtenidas de la segunda fracción enzimática. A. Población de células, la mayoría son de morfología fusiforme. 3 días de cultivo.40x B. y C. Monocapa homogénea de células fusiformes. 6 días de cultivo.40x y 100x.

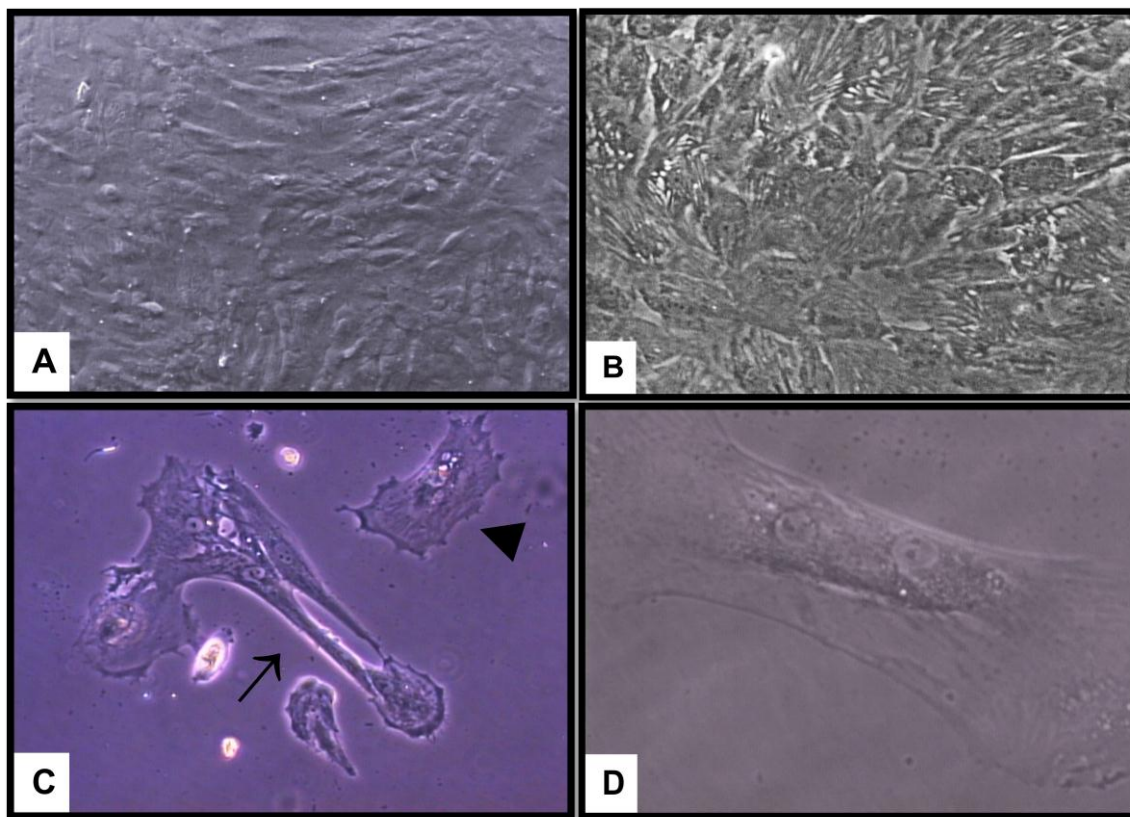


Figura 10. Subcultivos de células tipo mesenquimales aisladas del estroma de la membrana amniótica humana. A y B. Monocapa de células en el primer pasaje. 5 días de cultivo. 40x y 100x. **C.** Detalle donde se evidencian dos tipos de morfología distintas, de células mesenquimales, unas con amplio volumen citoplasmático (◄) y otras de tipo fusiforme (→). Tercer pasaje. Dos días de cultivo. 100x. **F.** Célula mesenquimal binucleada con morfología típica fusiforme. Tercer pasaje. 10 días de cultivo 200x.

Curva de crecimiento de las células mesenquimales de la membrana amniótica humana

La curva de crecimiento se realizó con células del cuarto pasaje cultivadas en medio nutritivo DMEM suplementado. Estas células exhibieron el comportamiento típico en condiciones normales de cultivo, conformado por tres etapas: una etapa de latencia, luego una etapa exponencial y por último una etapa estacionaria (figura 11).

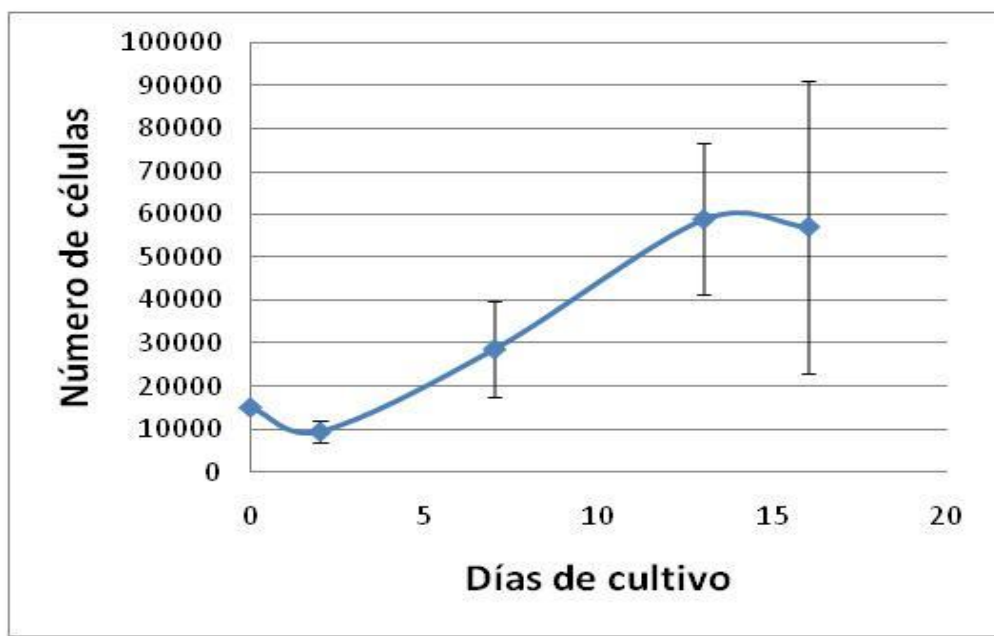


Figura 11. Curva de crecimiento de las células mesenquimales de la membrana amniótica humana. Células cultivadas en medio DMEM suplementado. (n = 6).

Cada punto de la curva representa el promedio del número de células calculado con un n = 6. También se indican las desviaciones estándar para cada punto en el eje de las ordenadas.

Caracterización morfológica de células mesenquimales del estroma de la MAH.

En función de llevar a cabo una caracterización precisa de las células mesenquimales, se realizó una coloración de rutina May Grünwald-Giemsa (MGG), un ensayo con sondas fluorescentes como Naranja de Acridina (NA) y Hoescht; y una inmunocitoquímica mediante el uso de dos anticuerpos diferentes contra los antígenos Stro-1 y vimentina.

Al realizar la coloración de rutina (MGG), se confirmó la heterogeneidad de la población celular en el cuarto pasaje. Esto se logra apreciar en la figura 12 A de la cual se infiere que se obtuvieron células de dos morfologías distintas, una subpoblación fusiforme y otra subpoblación de amplio volumen citoplasmático. De este mismo modo, se observaron con mayor resolución los detalles fenotípicos de las células (figura 12 B), entre los que se destacan las prolongaciones citoplasmáticas en células con apariencia fusiforme y la presencia de un núcleo central con múltiples nucléolos en ambas grupos.

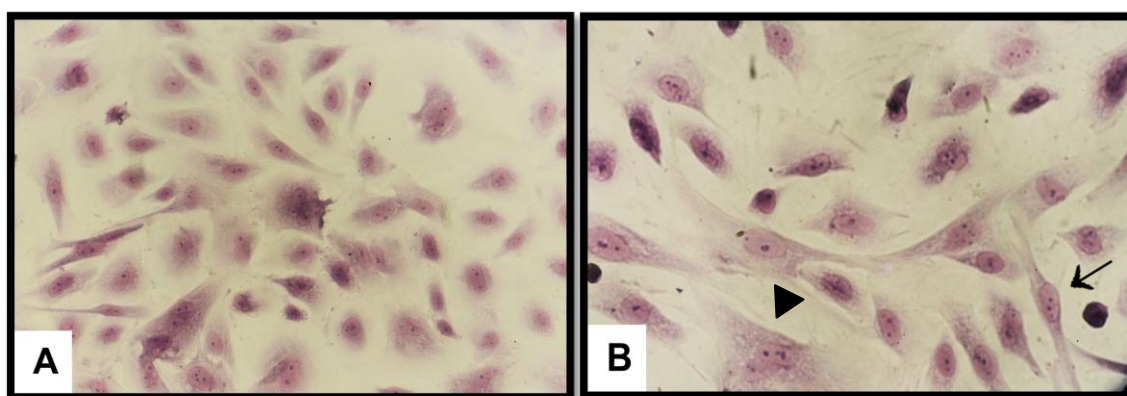


Figura 12. Células tipo mesenquimales aisladas del estroma de la membrana amniótica humana. Coloración de rutina May Grünwald-Giemsa. **A.** Se evidencia heterogeneidad en cuanto a la morfología de las células. Cuarto pasaje. 6 días de cultivo. 100x. **B.** Se observan en detalle las características de las células mesenquimales, con morfología fusiforme (→) y células de un amplio volumen citoplasmático (◄) con un núcleo central con uno o varios nucléolos. 250x

Los ensayos con microscopía de fluorescencia permitieron verificar nuevamente diversos caracteres de cada subpoblación celular. En la figura 13, el marcaje verde fluorescente con NA (el cual permea dentro de los lisosomas) evidencia la extensión del citoplasma de una célula a lo largo del campo, así como también el contraste con Hoechst revela de azul fluorescente los núcleos al unirse al ADN

(figura 13 A y B). Igualmente, en la figura 13 B, se destaca la presencia significativa de células de amplio volumen citoplasmático que interactúan entre sí. Al detallar la Figura 13 C es notable una alta densidad de gránulos verdes fluorescentes que resultan del marcaje de lisosomas marcados con NA en la región perinuclear del citoplasma.

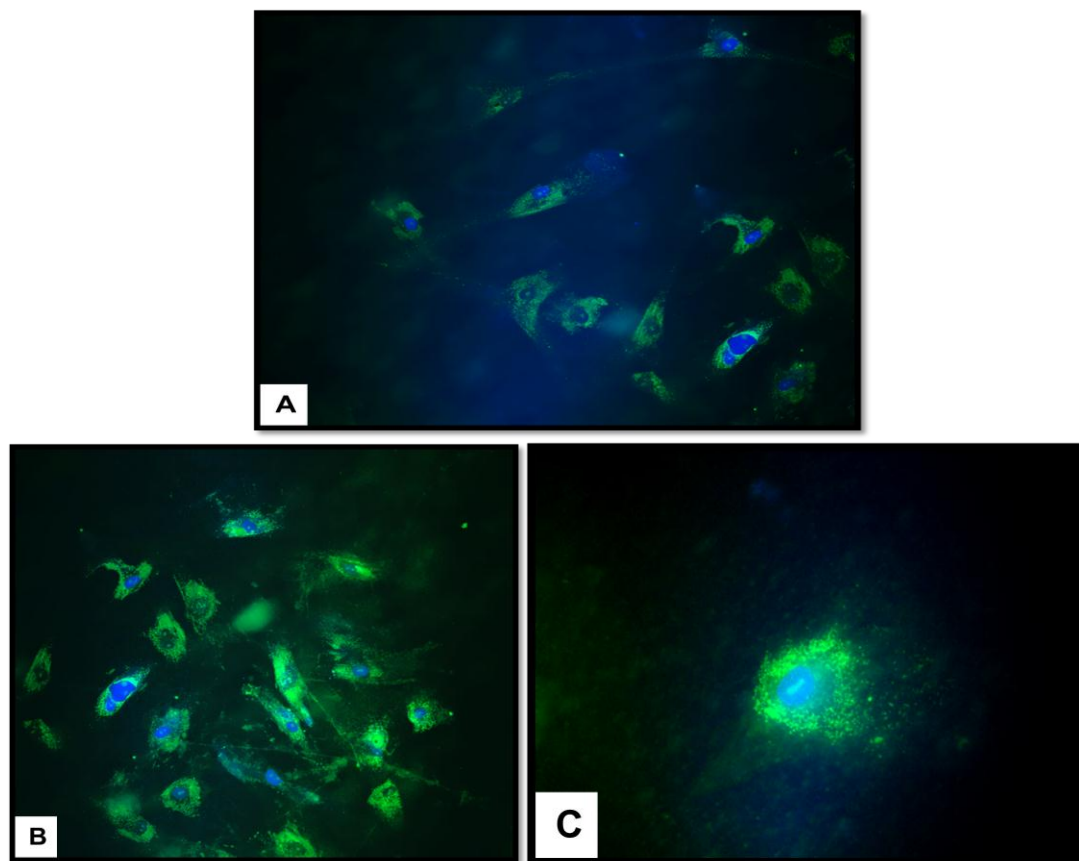


Figura 13. Células tipo mesenquimales aisladas del estroma de la membrana amniótica humana. Marcaje con sondas fluorescentes: Naranja de Acridina (NA) y Hoescht. A. Se observan células tipo fusiforme.100x. **B.** Se aprecia una subpoblación de células con distinta morfología. 100x. **C.** Detalle de una célula con amplio volumen citoplasmático donde se observa el marcaje fluorescente de lisosomas con naranja de acridina de forma granulada en la región perinuclear del citoplasma. Tercer pasaje. 6 días de cultivo. Microscopía de fluorescencia. 600x

A través de la determinación inmunocitoquímica con el anticuerpo Stro-1, el cual se reveló positivamente, se comprobó la presencia de células madre mesenquimales en el cultivo. Aunado a ello, al emplear el anticuerpo contra

vimentina, se corroboró la naturaleza mesenquimal de las células en cultivo. Al comparar la figura 14 A con las figuras 14 B y C, se aprecia el revelado color marrón del cromógeno diaminobencidina.

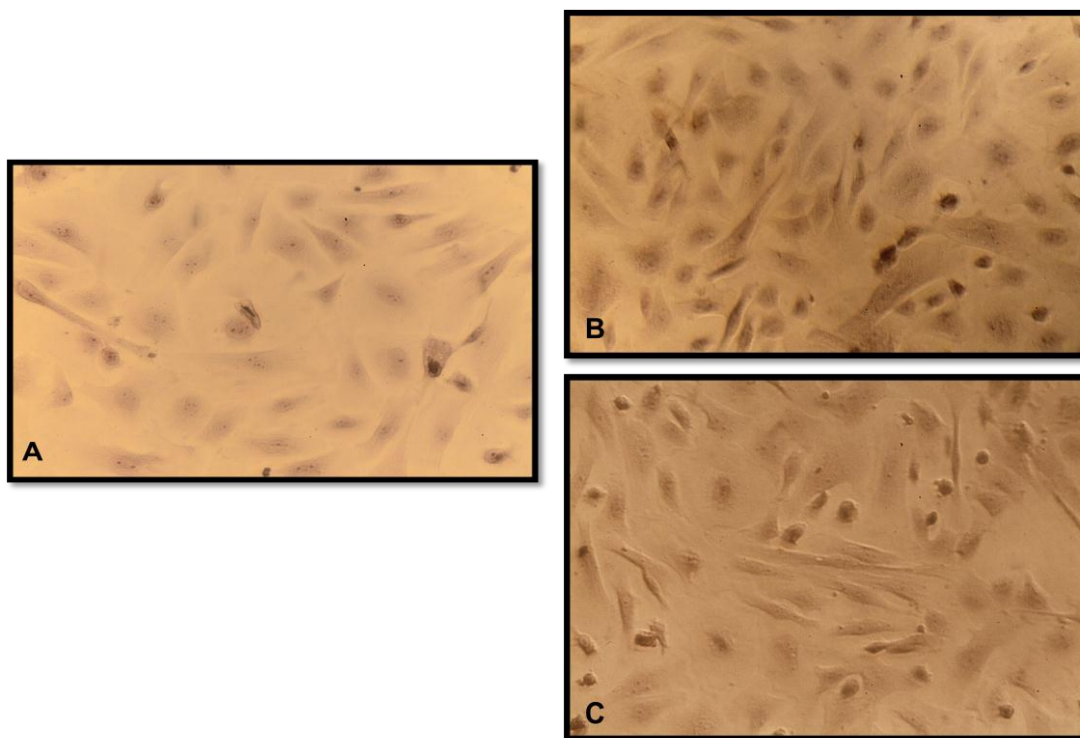


Figura 14. Determinación inmunocitoquímica de cultivos de células tipo mesenquimales aisladas del estroma de la membrana amniótica humana. A. Control. No se aprecia algún marcaje positivo por parte de las células (background). 200x. **B.** Evaluación con el anticuerpo en contra de Stro-1. La mayoría de las células presentaron marcaje positivo. 200x. **C.** Evaluación con el anticuerpo en contra de vimentina. Igualmente, se observa marcaje positivo en la mayoría de las células. 200x. Cuarto pasaje. 6 días de cultivo.

Inducción de la diferenciación de las células mesenquimales del estroma de la MAH.

La inducción de la diferenciación se realizó hacia dos linajes distintos (condrogénico y osteogénico), usando dos estrategias de cultivo diferentes (monocapa y micromasas), con un ensayo control en paralelo y diferentes

suplementos inductores. Los resultados descritos a continuación variaron de acuerdo a la composición de los medios, expuesta en la Tabla 2

Diferenciación de células mesenquimales en cultivos en monocapa

La evaluación de la diferenciación de los cultivos en monocapa se llevó a cabo mediante dos ensayos distintos: la coloración de azul alcian a pH 2,5 para la inducción condrogénica y la coloración de Von Kossa para la inducción osteogénica.

En la figura 15, se evidencian las diferencias existentes entre las células cultivadas con el medio control y las cultivadas con el medio de inducción condrogénico. Al observar la figura 15 B, se aprecia con claridad una coloración azul de tonalidad clara en el centro del campo (ausente en la figura 15 A), lo cual es una demostración de la presencia de Glucosaminoglicanos (GAGs) en las células inducidas. A pesar de que la tinción azul alcian resultó positiva, este patrón de coloración se reveló en algunas zonas del cultivo, mas no en la mayoría de su superficie. Sin embargo, se logró detallar otra diferencia significativa que consistió en las características morfológicas que exhibieron las células.

Entre las diferencias morfológicas presentadas, se puede destacar que las células cultivadas en el medio control conservaron su aspecto inicial tipo fusiforme (figura 15 C) en comparación con las células inducidas, las cuales sí modificaron su apariencia. Esto se puede notar en detalle al ver la figura 15 D cuya morfología se muestra con un amplio citoplasma de forma irregular, sin exhibir las extensiones citoplasmáticas delgadas características de las células mesenquimales.

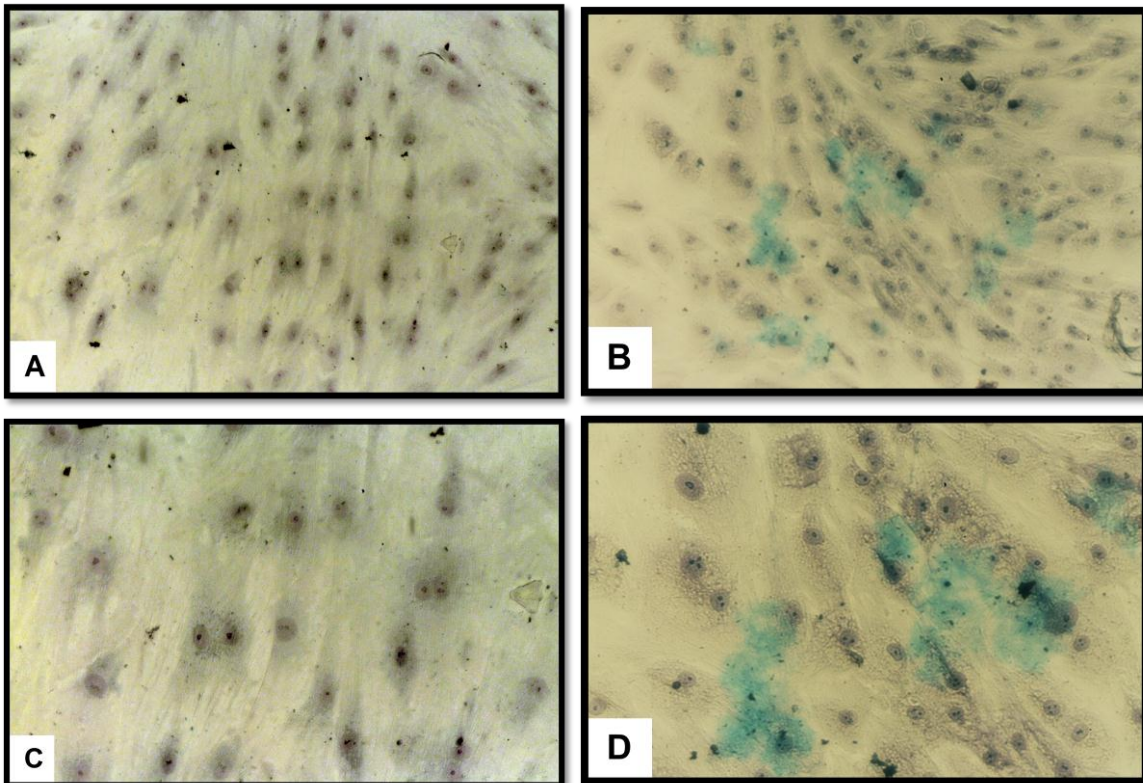


Figura 15. Diferenciación de células tipo mesenquimales en el sistema de cultivo en monocapa. Coloración azul alcian pH 2,5. A. y C. Células en medio control. No se observa coloración. 100x y 200x B. y D. Células en medio de inducción condrogénica. Se observan algunas zonas con coloración azul, indicando la presencia de glucosaminoglicanos. Tercer pasaje. 15 días de cultivo. 100x y 200x.

Los resultados obtenidos con el ensayo de coloración von Kossa, presentaron un patrón similar a los ya descritos con azul alcian. En este sentido, si se observa la figura 16 A, resulta evidente la ausencia de la tinción oscura que se revela claramente en la figura 16 C, en tres áreas diferentes; de esto se podría inferir que existen depósitos de calcio en la matriz de algunas células inducidas. No obstante, es importante señalar que esta coloración (como se mencionó previamente), no se reveló positivamente en la mayoría de la superficie de la monocapa.

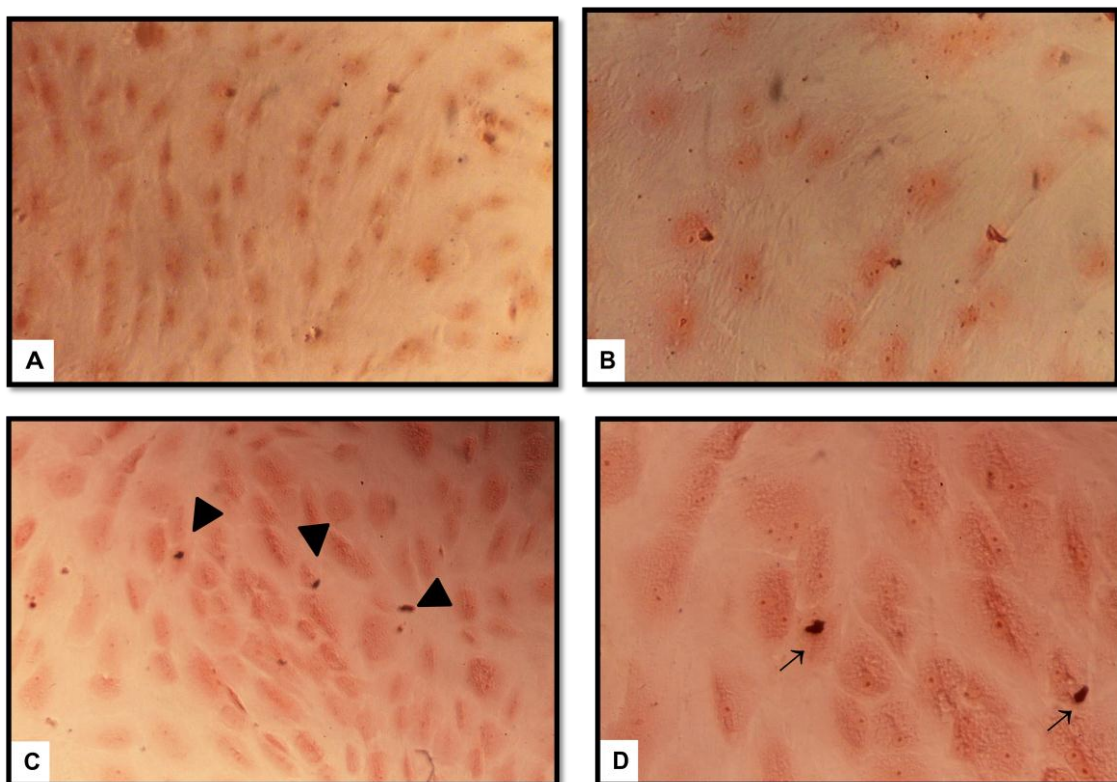


Figura 16. Diferenciación de células tipo mesenquimales en el sistema de cultivo en monocapa. Coloración de von Kossa. A. y B. Células en medio control. No se evidencia mineralización de la matriz. 100x. y 200x **C. y D.** Células en medio de inducción osteogénica, se aprecian pocos depósitos teñidos de negro (◄)(→); indicativo de la presencia de fosfatos de calcio. 100x. y 200x.

Otra diferencia observada, fue el cambio en la morfología de las células inducidas hacia el linaje osteogénico. Esta modificación se aprecia al comparar las figuras 16 B y D. De esta manera, al examinar la figura 16 B se destaca la presencia de una morfología análoga a la de las células mesenquimales mantenidas en cultivo. En cambio, si se detalla la figura 16 D se evidencia una variación en la morfología, pues estas células poseen un aspecto poligonal que difiere significativamente de las células cultivadas en medio control.

Diferenciación de células mesenquimales en sistema tridimensional de micromasas

En primer lugar, los agregados celulares cultivados exhibieron variaciones en cuanto a sus dimensiones. Esto se puede notar al observar la figura 17, donde al organizar las micromasas de forma creciente en función de su tamaño, se puede ubicar primero la imagen A (medio control), luego la imagen B (medio de inducción condrogénico) y por último la imagen C (medio de inducción osteogénico).

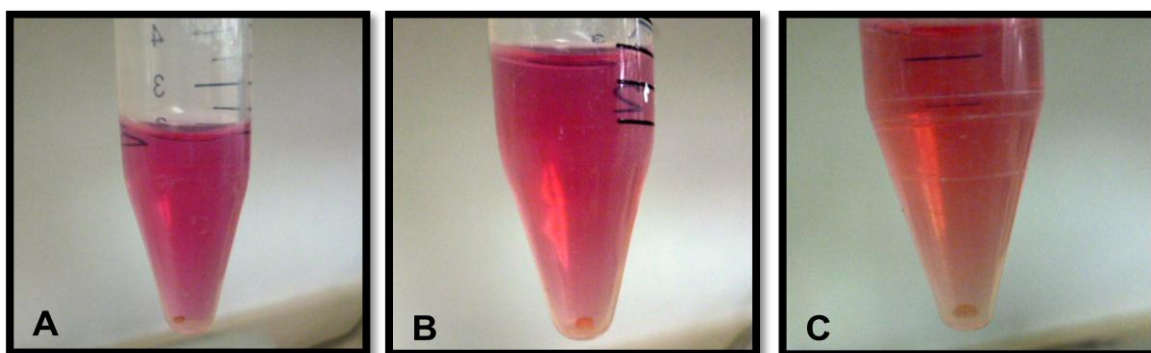


Figura 17 Sistema de cultivo en micromasas de células tipo mesenquimales. Tamaño de los agregados. 14 días de inducción en medio de cultivo. **A.** Medio control. **B.** Medio de inducción condrogénica. **C.** Medio de inducción osteogénica.

Con el motivo de evaluar la diferenciación de las células cultivadas en micromasas, se realizaron cortes histológicos de cada uno de los agregados. Luego, se practicaron diversas coloraciones e inmunohistoquímica a cada corte para analizar su estructura y composición. Los resultados obtenidos al utilizar estas coloraciones se describen a continuación.

En general, la mayoría de los cortes histológicos realizados presentaron un patrón de distribución de células que se divide en una región periférica, otra intermedia y una central, esto se esquematiza en cada una de las figuras siguientes.

Coloración azul alcian pH 2,5

El objetivo de esta evaluación consistió en revelar la presencia de los glucosaminoglicanos ácidos carboxilados. Para esta coloración se hizo un control positivo, que consistió en un corte histológico de cartílago humano, éste se puede observar en la figura 18. De la misma forma, se tiñeron los cortes correspondientes al medio control, condrogénico y osteogénico.

En la figura 19 A, se aprecia la esquematización del corte correspondiente a las células cultivadas en medio control. Igualmente, es notable la delimitación de cada una de las regiones ocupadas por las células. En la región N° 1 (Figura 19 B), se evidencian células alargadas que presentan un marcaje positivo de azul alcian. Seguidamente, se encuentra la región N° 2 (figura 19 B) y la región N° 3 (figura 19 C), las cuales presentan una gran cantidad de matriz extracelular pero con una coloración de menor intensidad. Con la diferencia que la región central resultó de una mayor densidad celular.

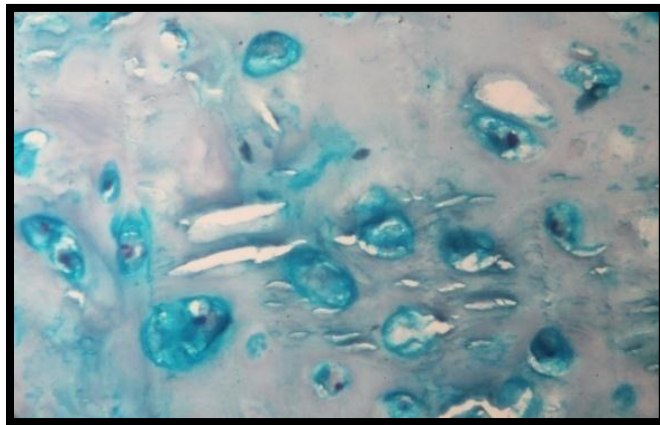


Figura 18. Cartílago humano teñido con azul alcian pH 2,5. Control positivo. Indicativo de presencia de GAGs. 250x

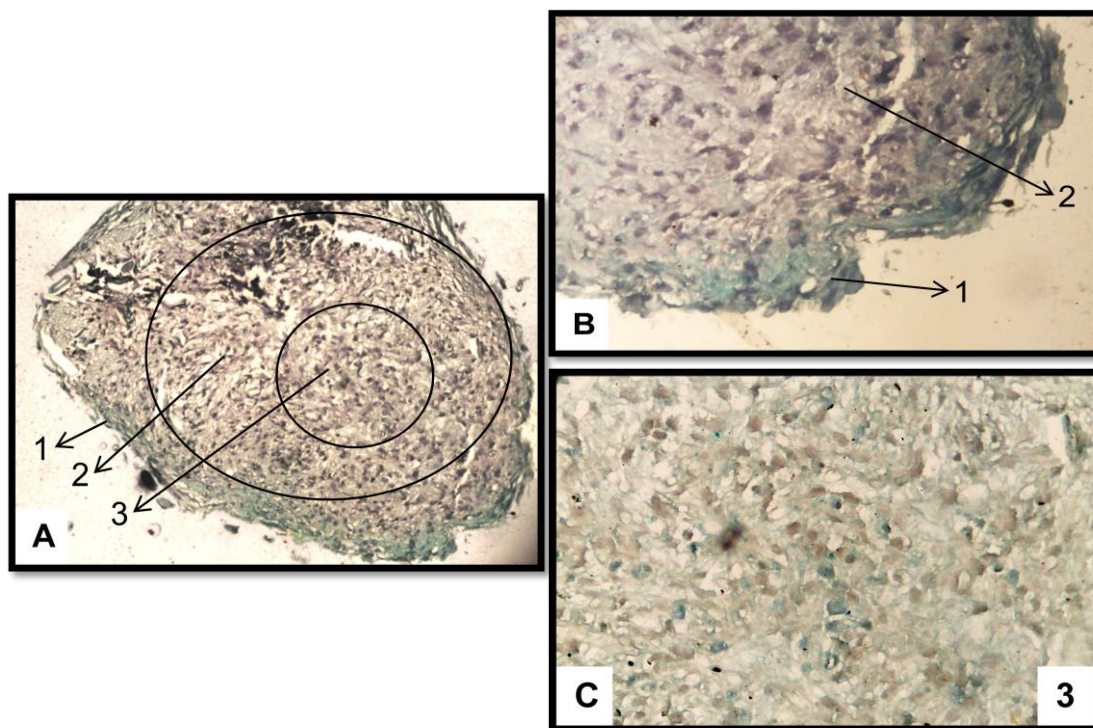


Figura 19. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana cultivadas en micromasas. Medio control. Coloración Azul alcian pH 2,5
A. Se distinguen tres regiones diferentes. 1) Periférica, 2) Intermedia, 3) Central.100x.
B. Regiones periférica e intermedia. En la región 1) se aprecian claramente las células alargadas alineadas intensamente coloreadas de azul, indicativo de presencia de GAGs. Mientras que en la región intermedia no se observa coloración. 250x
C. Se observa coloración azul en algunas zonas de la matriz extracelular de la región. central.250x.

En cuanto a la evaluación de las células inducidas hacia el linaje condrogénico, en la figura 20 A se puede notar una mayor homogeneidad celular, pues no hay una regionalización de la micromasa. Esto se detalla en la figura 20 B, donde se aprecian células alargadas con una cantidad significativa de matriz extracelular teñida de azul en toda la superficie. Sin embargo, se destaca una diferencia en la zona de la periferia (figura 20 C); debido a que ésta, si bien se encuentra conformada igualmente por células alargadas, las mismas se mostraron alineadas en el borde con una menor cantidad de matriz extracelular y una expresión más baja de la coloración azul alcian.

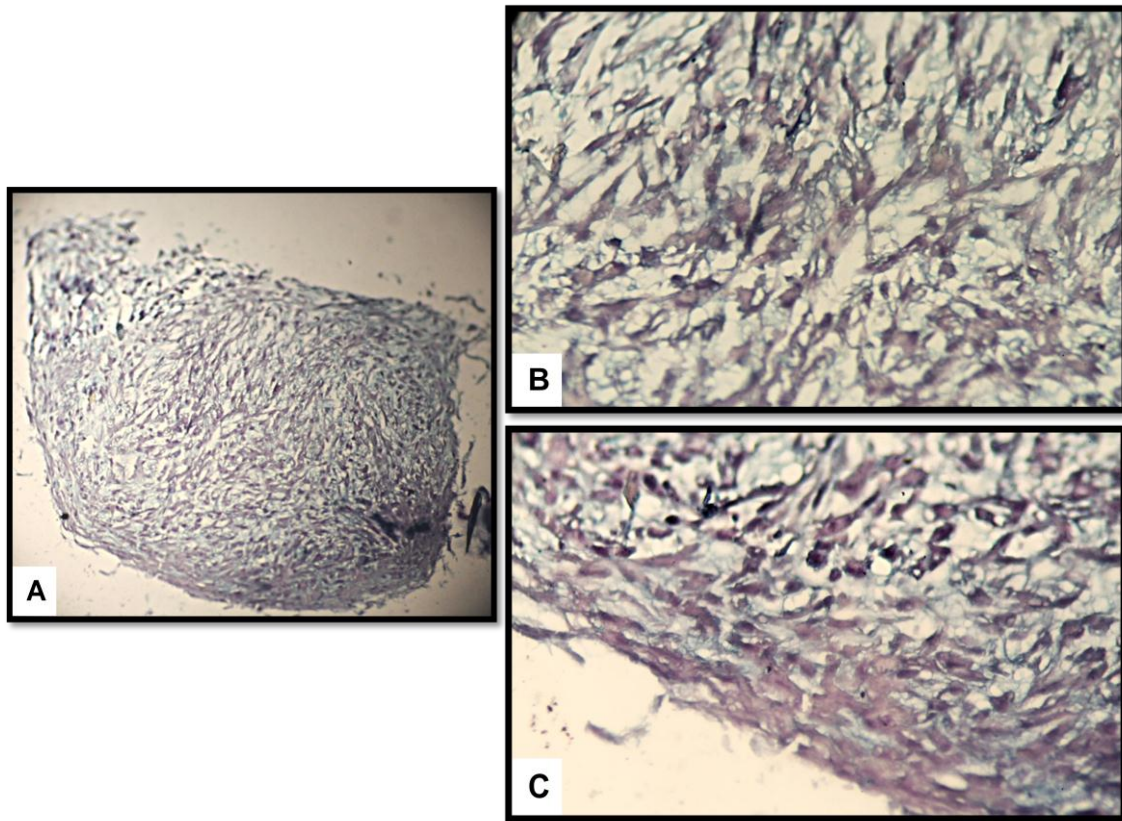


Figura 20. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas. Medio de inducción condrogénica. Coloración Azul alcian pH 2,5. **A.** No presenta regionalización como en los casos anteriores. Se aprecia una distribución homogénea de la coloración en toda la superficie del corte.100x. **B.** Detalle de la coloración que indica la presencia de GAGs. 250x **C.** Se observan células alineadas en la periferia con coloración de igual intensidad 250x.

Las células cultivadas con medio de inducción osteogénico exhibieron resultados similares a los descritos en el experimento control. En la figura 21 A, se presenta un patrón de distribución semejante, pues al detallar la figura 21 B, se aprecia una tinción azul acentuada en las células de la región periférica (N° 1). No obstante, la organización de las mismas resultó diferente ya que estas células se ubicaron de forma dispersa, sin ningún patrón de alineamiento. Paralelamente, la región intermedia (N° 2) está conformada por células alargadas, éstas se condensan

progresivamente a medida de que se aproximan a la región central (N ° 3); zona donde se dificulta distinguir las uniones intercelulares, lo cual sugiere la formación de un sincitio celular (figura 21 C).

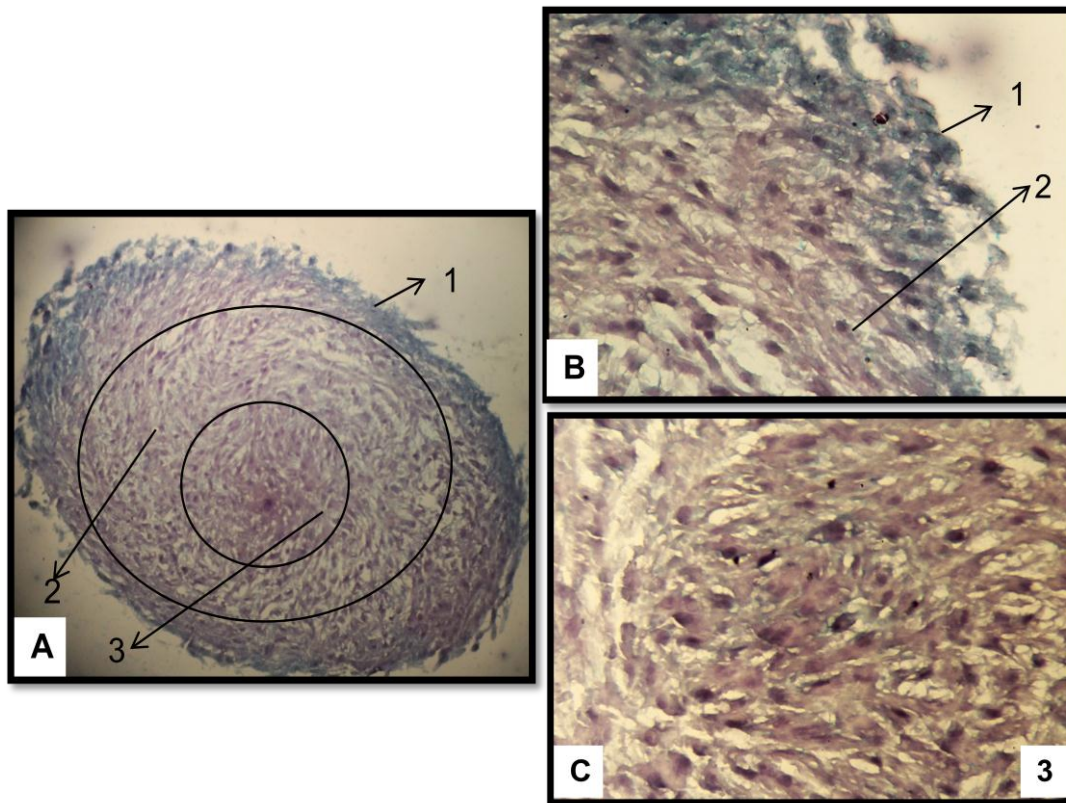


Figura 21. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas. Medio de inducción osteogénica. Coloración azul alcian pH 2,5 **A.** Se distinguen tres regiones diferentes: 1) Periférica, 2) Intermedia, 3) Central.100x. **B.** En la región periférica se aprecia la coloración, lo cual indica la presencia de GAGs en esta zona. En la región intermedia no se observa coloración. 250x **C.** En la región central, se observa poca coloración en algunas zonas. 250x.

Coloración azul alcian pH 1

El objetivo de esta coloración es determinar la presencia de glucosaminoglicanos sulfatados. Estos se revelaron en los tres experimentos realizados, cada uno con diferentes patrones de coloración, los cuales se describen a continuación.

En primer lugar, al examinar la estructura del corte histológico conformado por las células cultivadas en el medio control (Figura 22), se destaca cómo se repite el patrón de distribución previamente descrito (Figura 22 A). Cabe destacar, que en este caso tanto las células de la región periférica como un sector de la región intermedia se tiñeron de azul. A pesar de esto la coloración no se manifestó homogéneamente en cada una de estas regiones. Igualmente, la región intermedia se encuentra abarcada por una cantidad considerable de matriz extracelular con células alargadas; similares a las células alineadas al borde de la periferia, las cuales concentran menor cantidad de matriz extracelular (Figura 22 B).

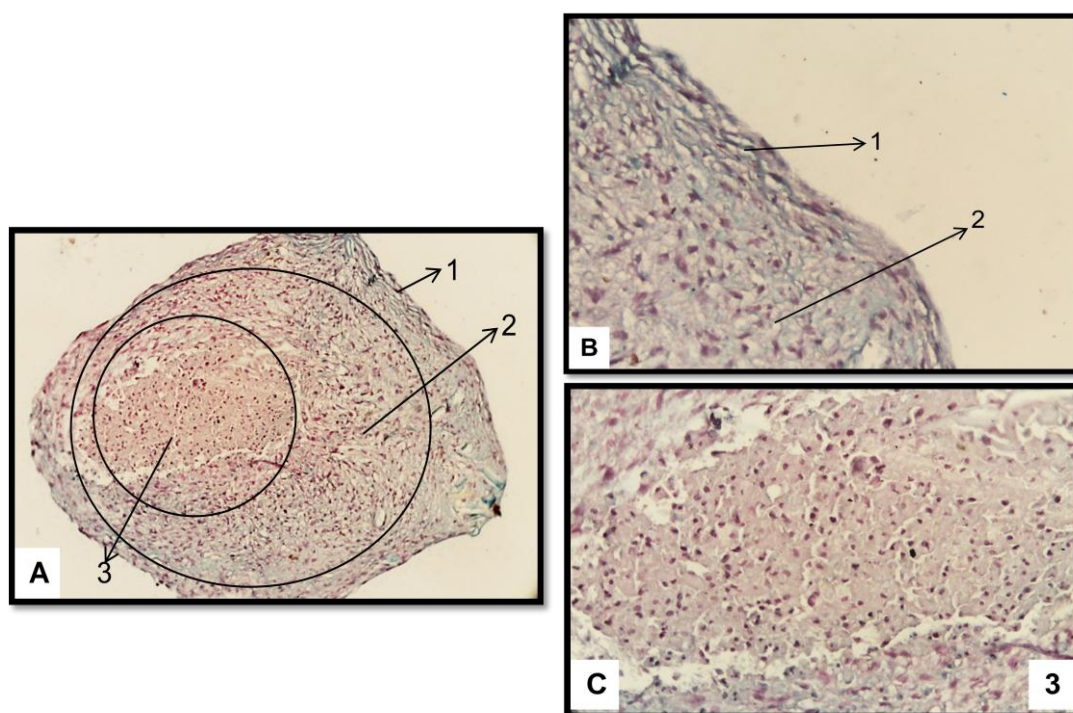


Figura 22. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana cultivadas en micromasas. Medio control. Coloración azul alcian pH 1. **A.** Se distinguen tres regiones diferentes: 1) Periférica, 2) Intermedia, 3) Central. 100x. **B.** En ambas regiones, periférica e intermedia se señala la presencia de coloración azul alcian. 250x **C.** De la región central se destaca en detalle la presencia de un sincitio celular. 250x.

La región central (figura 22 C), se conformó por una gran densidad de células planas, con una morfología diferente a las células tipo fusiforme que se ubican en las otras dos regiones ya descritas. De igual manera, se detallan múltiples núcleos en la región N° 3 con la constitución aparente de un sincitio, en el cual no se reveló presencia alguna de GAGs debido a la ausencia de la coloración azul alcian.

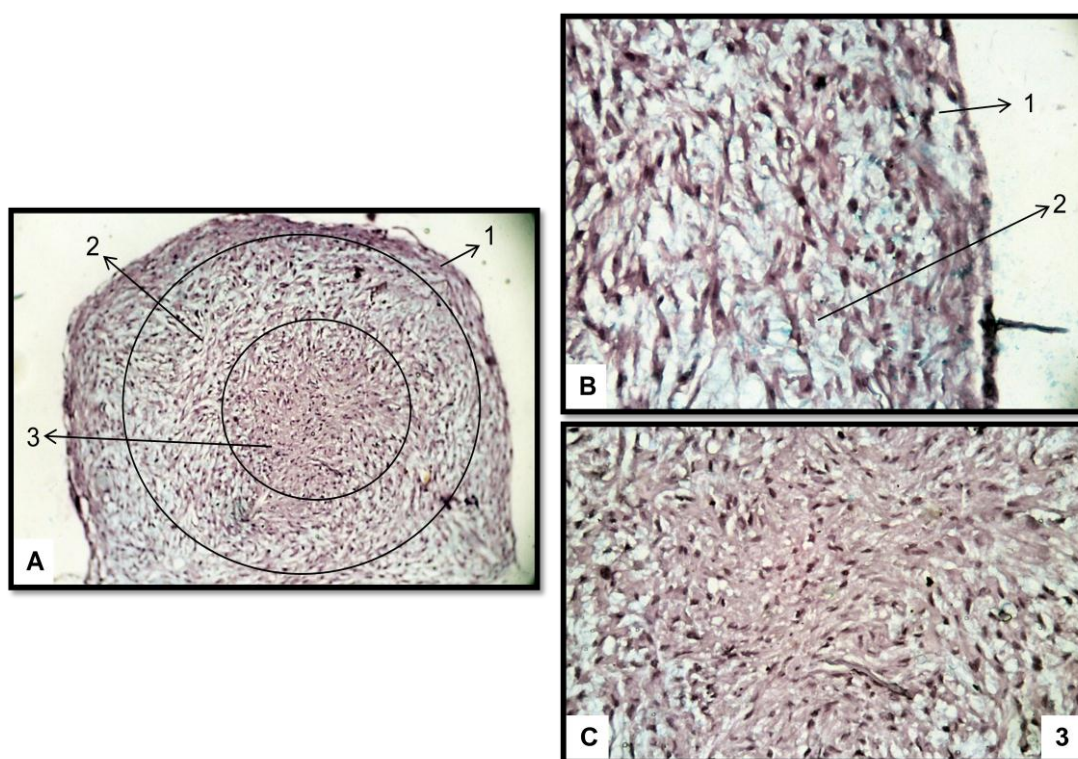


Figura 23. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas. Medio de inducción condrogénico. Coloración azul alcian pH 1. A. Se distinguen tres regiones diferentes. 1) Periférica, 2) Intermedia, 3) Central. 100x. **B.** Se observa una ligera coloración azul en la región intermedia, esta se extiende muy tenue hacia la región periférica. 250x **C.** En la región central sólo se observa un cúmulo de células. 250x.

Las células inducidas hacia el linaje condrogénico que se aprecian en la figura 23 son relativamente homogéneas en cuanto a su morfología, ya que todas se asemejan a la tipología fusiforme. A pesar de esto, resultan notables las diferentes

regiones que se constituyen en su arquitectura. Por ende, al observar la figura 23 A, en la región periférica específicamente estas células se organizan alineadas, paralelas a las que se ubican en la región intermedia; compuesta por células menos alargadas con una ligera presencia de GAGs sulfatados los cuales se revelaron de color azul a lo largo de toda la superficie ocupada por esta región. Por último, se logra distinguir en la figura 23 C a un grupo de células condensadas en el centro, donde se dificulta diferenciar las delimitaciones entre las mismas.

Las células inducidas hacia el linaje osteogénico presentaron ciertas desigualdades en cuanto a su morfología y a la evaluación con la coloración azul alcian. Estas diferencias se distinguen con facilidad al examinar la figura 24 A. Más aún, al detallar la figura 24 B se evidencian células de tipo fusiforme en ambas regiones (intermedia y periférica), no obstante la intensidad de la coloración azul es considerablemente más intensa en la región periférica indicando una mayor cantidad de GAGs en esta área.

En la figura 24 C se observan en detalle las células que componen la región central, cuya morfología difiere drásticamente con las exhiben las otras regiones. Estas células, con una morfología más plana, abarcan una superficie significativa, de esta misma forma poseen indicios de formación de un sincitio celular y no revelaron presencia alguna de GAGs sulfatados.

Azul de toluidina

Se llevó a cabo la tinción de azul de toluidina en cada uno de los cortes. Esto con el objetivo de evaluar una posible metacromasia, lo cual es indicativo de la presencia de proteoglicanos.

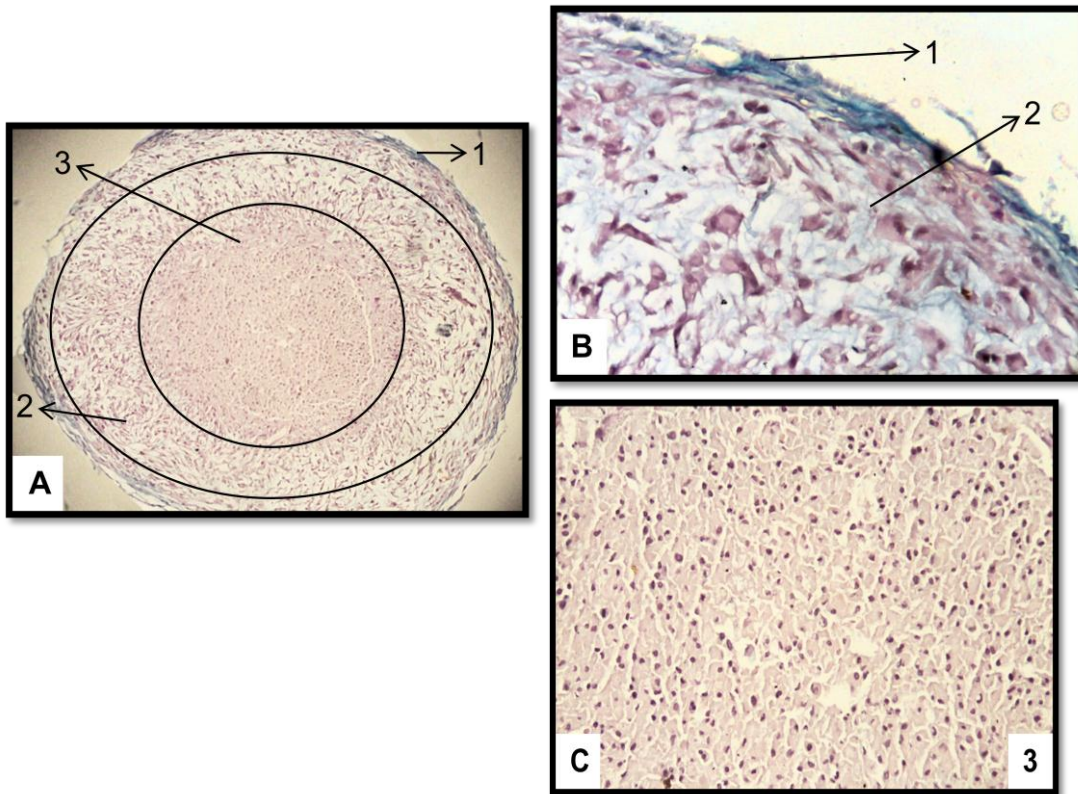


Figura 24. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas. Medio de inducción osteogénico. Coloración azul alcian pH 1. **A.** Se distinguen tres regiones diferentes. 1) Periférica, 2) Intermedia, 3) Central. 100x. **B.** Se observa una coloración azul en la región intermedia, la cual se hace más intensa hacia la región periférica, indicando la presencia de GAGs sulfatados. 250x. **C.** En la región central sólo se observa un grupo de células conformando un sincitio. 250x.

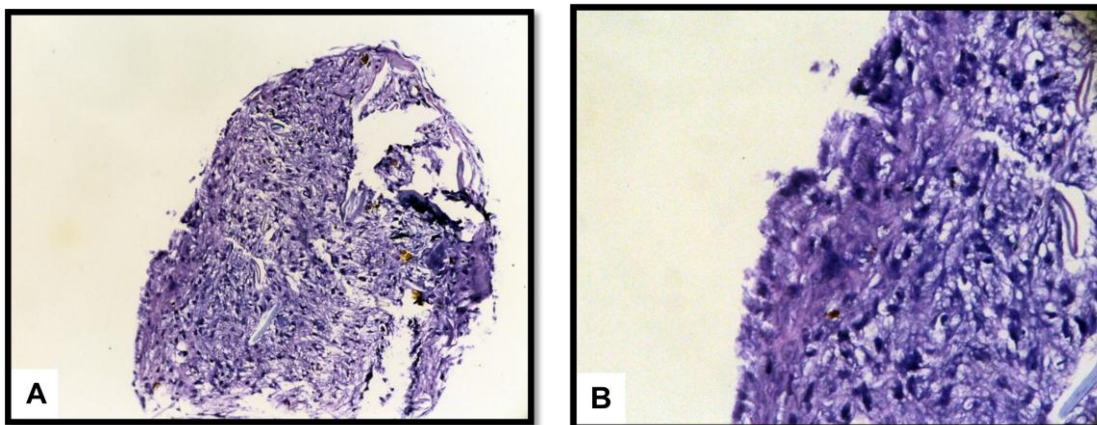


Figura 25 Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana cultivadas en micromasas. Medio control. Azul de Toluidina. **A.** Se observa una distribución homogénea de las células, con una diferencia en la tonalidad de la coloración hacia la periferia. 100x. **B.** Detalle de un sector de la periferia donde se aprecia una coloración más tenue de tono púrpura. 250x.

La coloración de las células cultivadas en medio control (figura 25 A) presentó una diferencia de tonalidad sólo en un sector de la periferia. Esta se detalla en la figura 25 B; donde se observa una región púrpura más clara. Por otra parte, en las células inducidas en medio condrogénico se observó una coloración clara de tono violeta, esto es constancia de una metacromasia evidente (figura 26 A). Esta metacromasia se distribuyó de forma homogénea en todo el corte, al igual que la morfología de las células que consistió únicamente en las de tipo fusiforme. Ambos detalles se aprecian con nitidez en la figura 26 B.

Al analizar las células sometidas a inducción osteogénica se observó la presencia de metacromasia, así como también se notaron diferencias morfológicas de las células en distintas regiones (figura 27 A). La metacromasia se hizo evidente sólo en las células ubicadas hacia la región periférica, cuya morfología es de tipo fusiforme, esto se muestra en la figura 27 B. En otro sentido, las regiones intermedia y central no revelaron evidencias de metacromasia. Sin embargo, se destaca que las células ubicadas en la región central poseen una morfología irregular y no de tipo fusiforme, lo cual se aprecia en la figura 27 C.

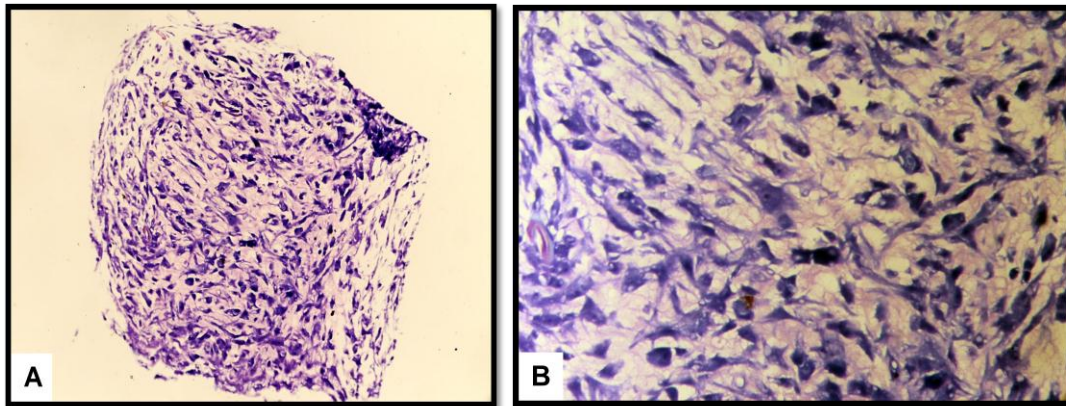


Figura 26. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas. Medio de inducción condrogénico. Azul de toluidina. A. Se aprecia una distribución homogénea, es notable la presencia de una tonalidad clara color violeta entre las células, evidencia de metacromasia en toda la superficie.100x. **B.** Detalle donde se observa metacromasia presente en todo el campo. 250x

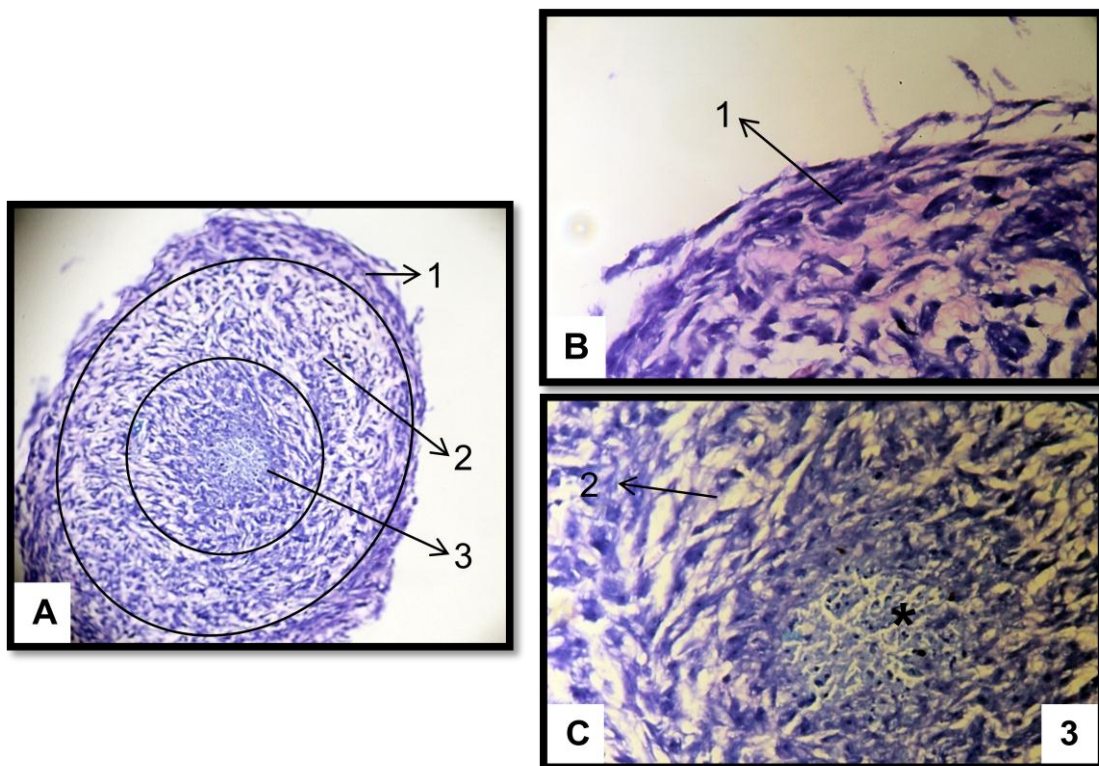


Figura 27. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas. Medio de inducción osteogénico. Azul de toluidina. A. Se distinguen tres regiones diferentes. 1) Periférica, 2) Intermedia, 3) Central. 100x. **B.** En la región periférica se indica la presencia de metacromasia por su tonalidad clara color rosa. 250x **C.** Detalle de región intermedia y región central. Se destaca la presencia de un grupo pequeño de células con morfología irregular. 250x.

Coloración de Van Gieson

Esta coloración se empleó principalmente con el objetivo de identificar la presencia de colágeno en la matriz extracelular, el cual al reaccionar se tiñe de rojo, los núcleos de negro y el citoplasma de amarillo. A pesar de que no se logró revelar el color rojo que caracteriza a esta tinción cuando el colágeno está presente, se consiguieron distinguir diversas diferencias estructurales y morfológicas importantes descritas a continuación.

Las células cultivadas en medio control se tiñeron de color púrpura en su totalidad, esto se observa en la figura 28 A. Asimismo, los núcleos se colorearon de negro, sólo se apreció una tonalidad más clara hacia el lado de la periferia (figura 28 B). Cabe destacar que la morfología celular resultó ser homogénea en toda la superficie del corte.

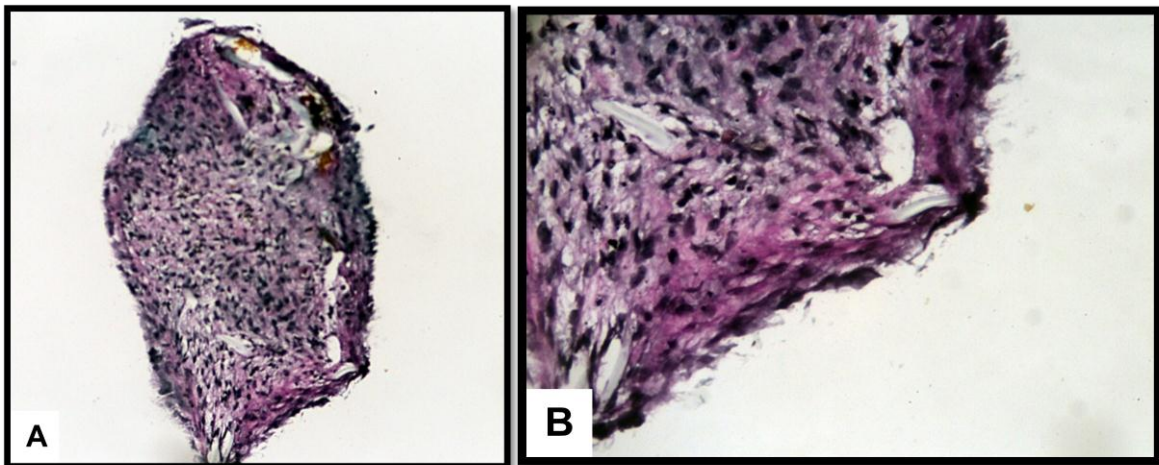


Figura 28. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana cultivadas en micromasas. Medio control. Tinción de Van Gieson. A. Se observa una tonalidad púrpura, con núcleos teñidos de color negro en toda la superficie. 100x. **B.** Detalle de una tonalidad púrpura más clara hacia la periferia. 250x

En la figura 29 se aprecian los resultados de la tinción a las células inducidas hacia el linaje condrogénico. Al examinar la figura 29 A, se evidencia una homogeneidad en cuanto a la morfología celular ya que todas son de tipo fusiforme. A pesar de ello, al detallar la figura 29 B, se nota cierta diferencia en la intensidad de la coloración con respecto a la anteriormente observada en el experimento control, ya que en la figura 29, se puede afirmar la existencia una tonalidad púrpura de menor intensidad en la matriz extracelular.

Distintamente, en el corte conformado por células inducidas hacia el linaje osteogénico, se logró identificar tres regiones con células de morfología diferente, las cuales también presentaron variaciones con respecto a su coloración (figura 30).

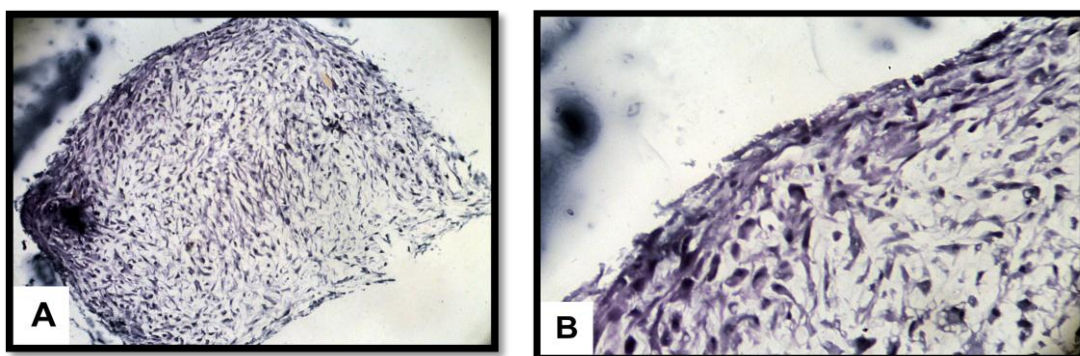


Figura 29. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas. Medio de inducción condrogénica. Tinción de Van Gieson. **A.** Se aprecia una tonalidad púrpura de baja intensidad en toda el área, igualmente los núcleos de color negro.100x. **B.** Detalle de la periferia donde se hace un poco más intensa la coloración. 250x.

Al detallar la figura 30 A, se pueden apreciar tres tonalidades de colores diferentes. Tanto la región periférica como la intermedia se constituyeron por células tipo fusiformes teñidas de un tono púrpura (figura 30 B), con la diferencia de que las células ubicadas en la periferia se tiñeron de una tonalidad púrpura

más clara. Al contrario de éstas, las células de morfología plana contenidas en la región central; exhibieron una coloración amarillenta en su citoplasma, con múltiples núcleos teñidos de color negro. Esta región se asemeja a un sincitio celular (figura 30 C).

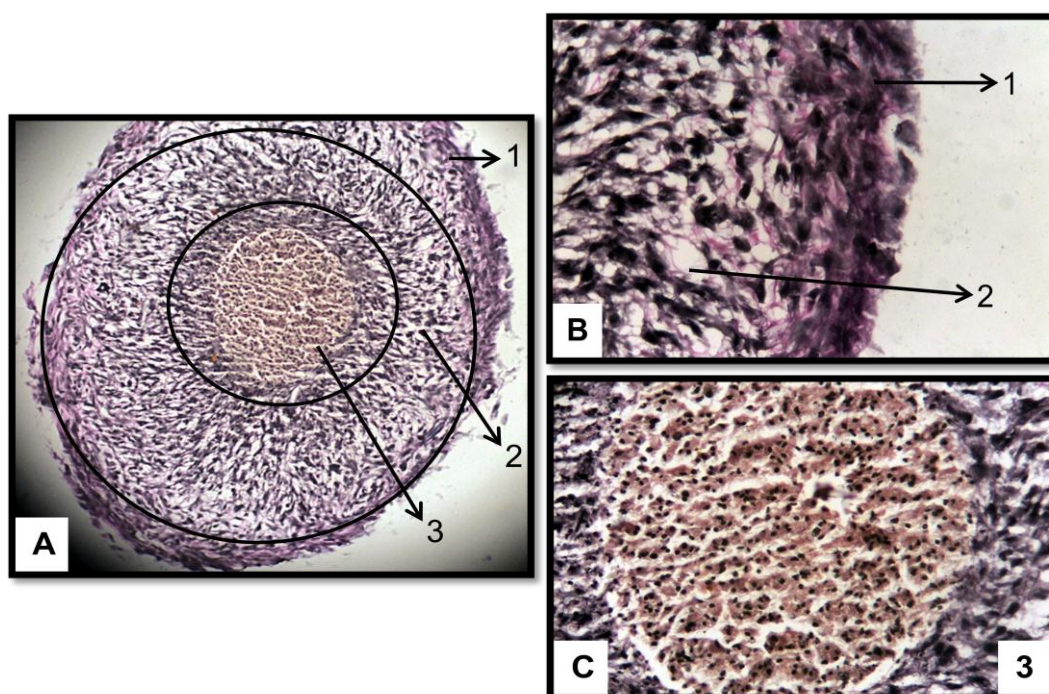


Figura 30. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas. Medio de inducción osteogénica. Tinción de Van Gieson. A. Se distinguen tres regiones diferentes. 1) Periférica, 2) Intermedia, 3) Central. 100x. **B.** Detalle donde se observan núcleos teñidos de negro junto con el citoplasma púrpura, se aprecian zonas de una tonalidad más clara. 250x **C.** Se destaca la coloración amarilla de las células ubicadas en la región central, lo que simula un sincitio, con múltiples núcleos de color negro. 250x.

Inmunohistoquímica anti colágeno tipo II

Este ensayo inmunológico se realizó con el fin de revelar la presencia de colágeno tipo II. Para esta inmunohistoquímica en primer lugar se hizo un control positivo utilizando un corte histológico de cartílago humano (figura 31). Igualmente, se

aplicó el ensayo para cada uno de los cortes correspondientes al medio control, medio condrogénico y medio osteogénico.

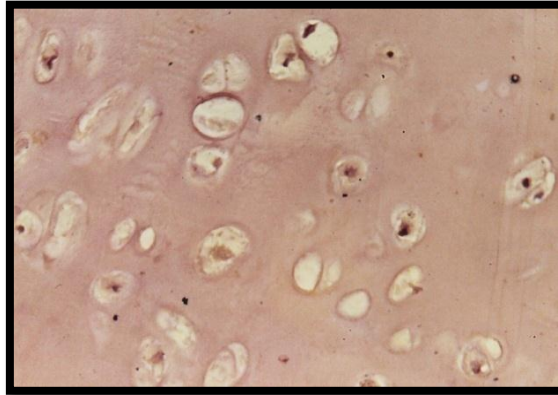


Figura 31. Cartílago humano.
Inmunohistoquímica anti colágeno tipo 2.
Control positivo. 250x.

Los resultados obtenidos de la técnica inmunohistoquímica aplicada a las células mantenidas en medio control se muestran en la figura 32. Si se examina la figura 32 A, se aprecia cómo existe una regionalización del agregado, donde cada una de estas regiones reveló distintos niveles de expresión de colágeno tipo II. Por consiguiente, al observar la figura 32 B, es notable un revelado de baja intensidad en la región periférica, así como un revelado de intensidad moderada en la región intermedia. Contrariamente, en la figura 32 C, se observa la región central, donde no hubo expresión.

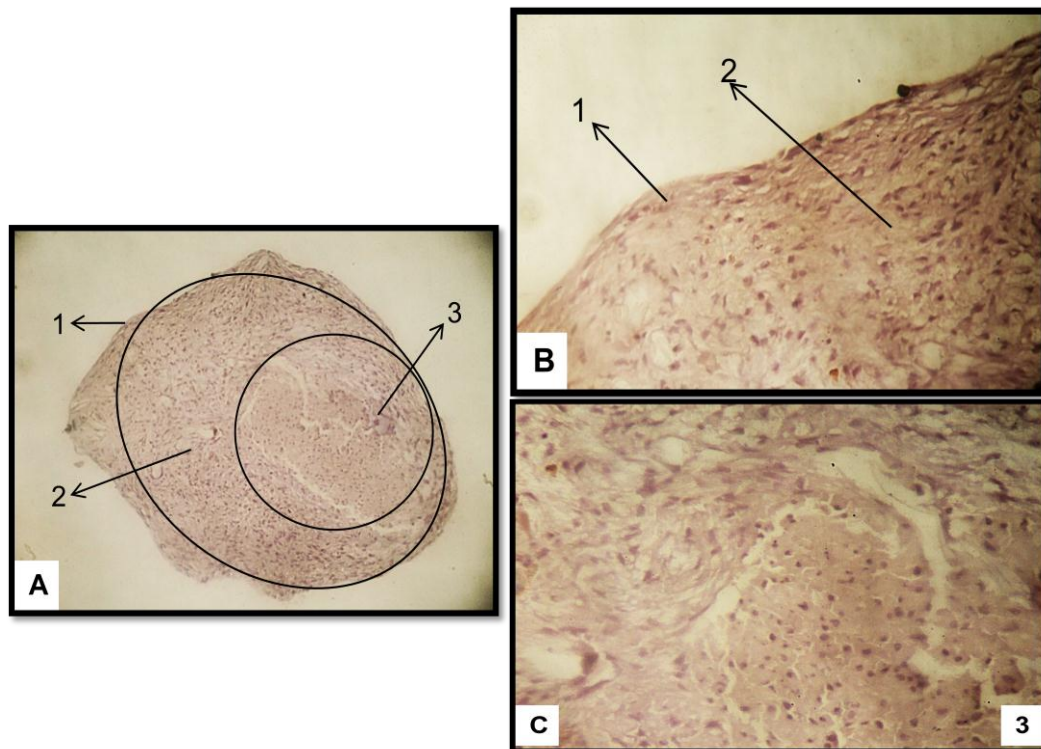


Figura 32. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana cultivadas en micromasas. Medio control. Inmunohistoquímica anti colágeno tipo II. **A.** Se distinguen tres regiones diferentes. 1) Periférica, 2) Intermedia, 3) Central. 100x. **B.** Detalle de regiones periférica e intermedia donde se aprecia un color parduzco menos intenso al marcaje positivo. 250x **C.** Región central donde no se aprecia un color parduzco, conformado por un sincitio aparente. 250x.

El agregado mostrado en la figura 33 A no presentó regionalización alguna, de éste se pueden analizar los distintos niveles de expresión de colágeno tipo II por parte de las células cultivadas en medio de inducción condrogénica. Cabe destacar que las células se revelaron positivamente en el área cercana a la periferia (figura 33 B), a diferencia de la zona interna, donde se presencia en la figura 33 C, un marcaje positivo de intensidad moderada.

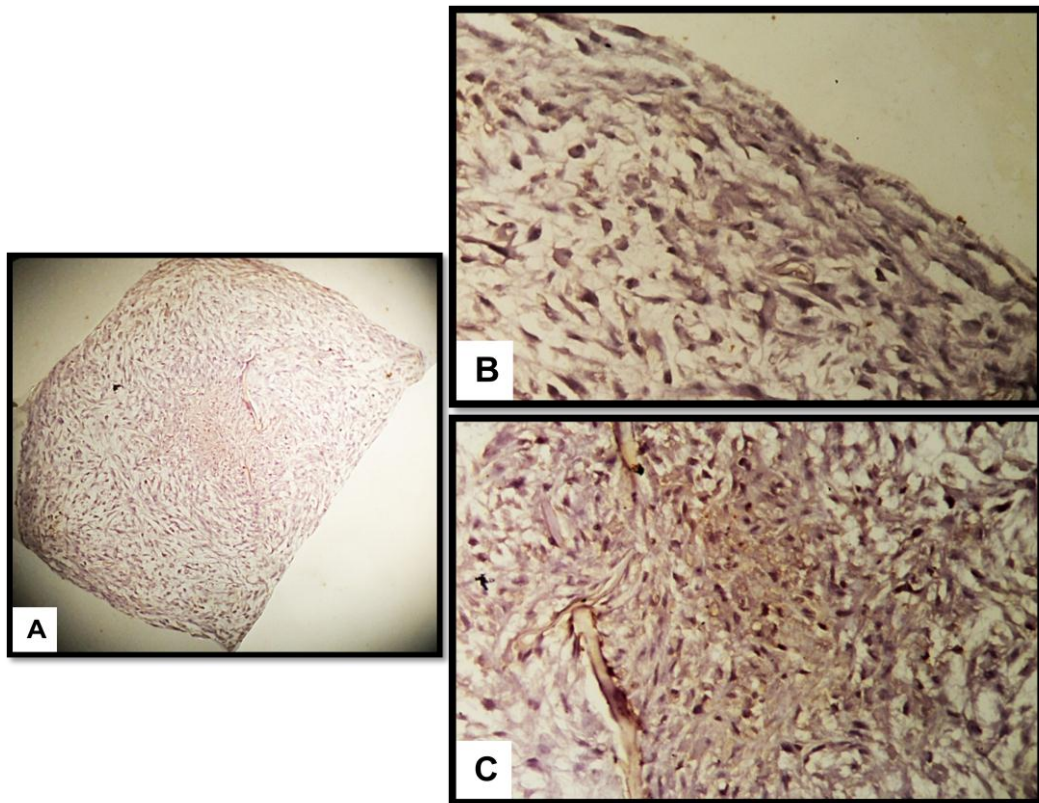


Figura 33. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana cultivadas en micromasas. Medio de inducción condrogénica. Inmunohistoquímica anti colágeno tipo II. A. Se observa una distribución homogénea sin regionalización. 100x. **B.** En las áreas cercanas a la periferia se observa una baja expresión. 250x **C.** Detalle del área interna central donde se observa un marcaje positivo con mayor intensidad en una zona con más densidad celular. 250x

En la figura 34 A, se observa claramente que existe un marcaje positivo en toda la superficie del agregado. Sin embargo, en cada región se manifestaron distintos niveles de expresión. En primer lugar, en la región periférica e intermedia el marcaje se revela de forma baja y moderada respectivamente (figura 34 B). Distintamente, en la figura 34 C se aprecia un nivel de expresión más intensa.

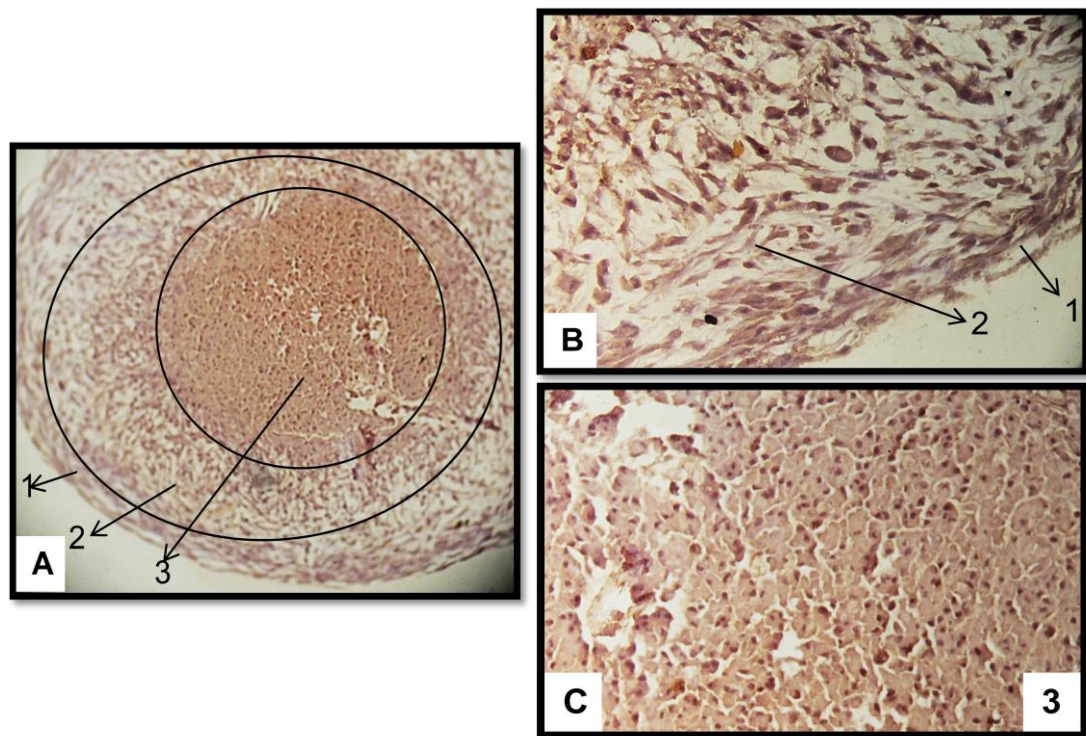


Figura 34. Células tipo mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana cultivadas en micromasas. Medio de inducción osteogénica. Inmunohistoquímica anti colágeno tipo II. **A.** Se distinguen tres regiones diferentes. 1) Periférica, 2) Intermedia, 3) Central. 100x. **B.** En las regiones intermedia y periférica se señalan las zonas donde se observa con mayor intensidad el marcaje positivo ante la presencia de colágeno tipo II. **C.** Detalle de un grupo celular numeroso teñido de color parduzco, señalando una expresión intensa. De igual manera se aprecia la formación de un sincitio celular. 250x

En síntesis, al revisar las figuras previamente expuestas, se puede inferir la existencia de ciertas diferencias entre cada una de las micromasas. Entre las principales diferencias se destacan: el patrón de regionalización, el tamaño y los niveles de expresión. La regionalización y el tamaño de cada agregado se esquematizan en la figura 35, donde se logra observar la existencia de tres regiones distintas en los agregados de las células cultivadas en medio control y las células cultivadas en medio de inducción osteogénica. En cambio, las células cultivadas en medio de inducción condrogénica no exponen estas regiones.

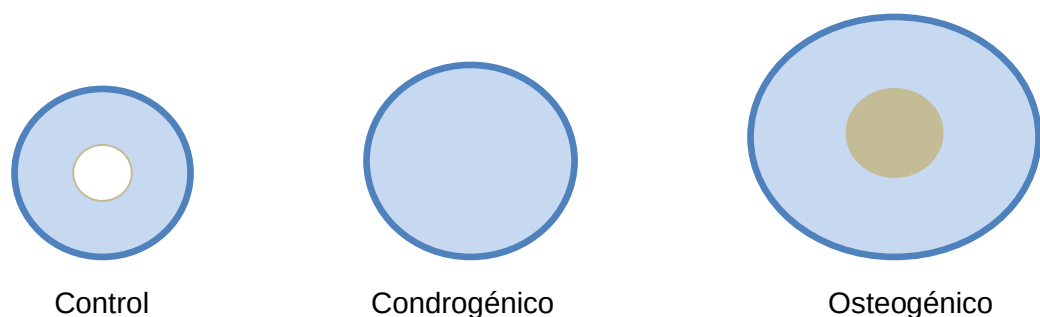


Figura 35. Esquematización del patrón general que exhiben las micromasas en cada ensayo. Se disponen de forma creciente

En último lugar, en la tabla 3 se resumen las diferencias presentadas por cada ensayo en cuanto a los niveles de coloración o de expresión según sea el caso. Estos niveles, varían incluso por cada región de un agregado determinado, en una escala que se desplaza desde una ausencia de la expresión hasta un nivel intenso.

Tabla 3. Niveles de expresión y de coloración de los ensayos de histoquímica e inmunohistoquímica aplicados en cada región de las micromasas. Se representa como sigue: intensa (+++), moderada (++), bajo (+) y ausente (-).

	Control			Condrogénico		Osteogénico		
Regionalización Micromasa	Periferia	Intermedia	Central	Periferia	Interna	Periferia	Intermedia	Central
GAG carboxilados	+++	-	+	+	++	+++	-	+
GAG sulfatados	++	+	-	+	+	++	+	-
Metacromasia	+	-	-	-	+	+	-	-
Colágeno (Van Gieson)	++	+	-	-	-	++	+	-
Colágeno tipo II	+	++	-	+	++	+	++	+++

DISCUSIÓN

En la actualidad, el interés por el estudio de las células madre mesenquimales se ha intensificado progresivamente, sobre todo dentro del campo de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos. Es de saber, que a estas células se les confieren ciertas ventajas debido a su potencial de diferenciación y a su fácil obtención.

Las células mesenquimales se han presentado como una opción prometedora, puesto que se ha comprobado que además de su alto potencial de diferenciación en comparación a otras poblaciones celulares de tejidos neonatales, las células madre mesenquimales del estroma de la MAH, poseen una baja inmunogenicidad y no presenta inconvenientes de índole bioético ya que la placenta siempre es descartada en las intervenciones quirúrgicas.

Aislamiento y establecimiento del cultivo de células mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana

La metodología empleada para aislar las células mesenquimales de la MAH fue efectiva, ya que se logró obtener una alta densidad celular ideal para la proliferación de estas células y el posterior establecimiento del cultivo primario.

En primer lugar, es importante conocer la estructura de la MAH, resaltando las características de su histología y composición, lo cual permitió diseñar una metodología adecuada para la extracción de las células mesenquimales presentes en el estroma. Es preciso señalar, que estas células en su condición *in vivo* se encuentran embebidas en una matriz principalmente conformada por colágeno tipo I (capa compacta y mesoderma adyacente) y colágeno tipo IV (membrana basal y

conexiones entre: capa mesenquimal y epitelio). Es por esta razón que varios autores han hecho referencia al uso de la collagenasa tipo I como una enzima eficaz para el proceso de disgregación enzimática de la MAH desnuda (Soncini y col., 2007; Barlow y col., 2008; Brooke y col., 2008; Semenov y col., 2010; Díaz-Prado y col., 2010b. No obstante, también se ha llevado a cabo el proceso de aislamiento únicamente a través de la disgregación mecánica (Scherjon y col., 2004).

Cabe destacar, que diversos investigadores coinciden en emplear la collagenasa tipo I a una temperatura de 37 °C, sin embargo éstos difieren en sus metodologías con respecto a los parámetros de concentración, agitación y tiempo de incubación utilizados (tabla 4)

Tabla 4. Parámetros aplicados en distintas referencias para la disgregación enzimática de la MAH desnuda.

Concentración Collagenasa I	Tiempo (Horas)	Agitación	Rendimiento (N° de células)	Referencia
0,75 mg/mL	3	No	10×10^6	Soncini y col., 2007
0,75 mg/mL	3	No	2×10^6	Díaz-Prado y col., 2010b
100 U/mL	2	Sí	---	Barlow y col., 2008
100 U/mL	2	Sí	---	Brooke y col., 2008
12,5 U/mL	1	No	$4-10 \times 10^4$	Semenov y col., 2010

Tomando en cuenta lo expuesto por estos autores, se decidió emplear un protocolo con ciertas modificaciones que permitiera obtener un rendimiento óptimo sin afectar la viabilidad de las células mesenquimales del estroma de la MAH. En

consecuencia, se realizó una disgregación enzimática fraccionada en dos partes, cada una de estas fracciones arrojó resultados distintos en cuanto a su rendimiento y morfología celular.

La primera fracción enzimática se conformó por una población heterogénea de dos morfologías: un grupo mayoritario de células poligonales y otro de células fusiformes; ninguna de éstas proliferó en las condiciones de cultivo seleccionadas. Las células de morfología poligonal podrían provenir de la capa epitelial de la MAH, es decir posiblemente se trate de una subpoblación de células tipo epiteliales. Por lo tanto, el bajo crecimiento de las mismas probablemente se deba a la ausencia del Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), el cual resulta fundamental para el establecimiento del cultivo de este tipo de células. Asimismo, esta subpoblación ha sido reportada como heterogénea en cuanto a su fenotipo, debido a la expresión de diferentes marcadores de superficie, como también se les ha conferido una baja proliferación celular cuando las mismas son sembradas a bajas densidades (Parolini y col., 2008)

En cuanto a la segunda fracción enzimática, ésta se conformó en su mayoría por células tipo fusiformes, muy semejantes a la morfología descrita de las células mesenquimales; con un rendimiento eficiente, ubicado dentro del intervalo referido por distintos investigadores ($1-2 \times 10^6$ células/g de tejido) (Parolini y col., 2008; Bilic y col, 2008). Además, las condiciones de cultivo utilizadas fueron óptimas para que las células tipo mesenquimales proliferaran adecuadamente y así pudiera establecerse el cultivo primario, cuya confluencia es alcanzada en un tiempo acorde con lo descrito en trabajos previos (7-10 días) (Casey y Macdonald 1996; Paracchini y col., 2012).

Debido a la confluencia presentada en los cultivos primarios de las células tipo mesenquimales del estroma de la MAH (segunda fracción enzimática), se llevaron a cabo los subcultivos de las mismas, los cuales mantuvieron un ritmo de proliferación constante. A pesar de esto, se apreció cierta heterogeneidad morfológica debido a la presencia de dos subpoblaciones. La primera de ellas, constituida por células tipo fusiformes y la segunda por células de un amplio volumen citoplasmático, esto coincide con lo que ha sido reportado previamente en referencia a distintas poblaciones de células mesenquimales además de las aisladas de la membrana amniótica, entre las cuales se pueden mencionar: células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales del estroma del corion (Docheva y col., 2008; Leyva-Leyva y col., 2012; Zhu y col., 2013).

Curva de crecimiento de las células mesenquimales de la membrana amniótica humana

Las células mesenquimales aisladas del estroma de la MAH presentaron un crecimiento celular típico. Sin embargo no se realizó una medida de la tasa de proliferación para obtener un dato más representativo acerca de su comportamiento. Se ha mencionado que las células mesenquimales aisladas de la placenta en general, poseen una mayor proliferación que las células mesenquimales aisladas de la médula ósea (Barlow y col, 2008).

Caracterización morfológica de células mesenquimales del estroma de la MAH.

A través de los métodos de caracterización morfológica aplicados, se confirmó la permanencia de la heterogeneidad en los subcultivos hasta el 4^{to} pasaje. Sin embargo, la coloración de rutina May Grünwald-Giemsa permitió la observación de una cantidad mayoritaria de la subpoblación de células tipo fusiforme en comparación a la subpoblación de células de amplio volumen citoplasmático. Esto último, podría tener cierta correspondencia con lo descrito por Docheva y col. (2008), quienes evidenciaron este mismo tipo de heterogeneidad en cultivos de células madre mesenquimales de la médula ósea, donde las células tipo fusiforme se destacaron por autorrenovarse más rápidamente.

En otro sentido, a las células madre de amplio volumen citoplasmático provenientes de distintos tejidos se les han observado diferentes características. A las células provenientes de la médula ósea se les ha detectado cierta actividad de la fosfatasa alcalina, una baja tasa de proliferación y mejores propiedades de adhesión en comparación a las células de tipo fusiforme. A su vez, a las células obtenidas de la membrana amniótica, se les ha conferido una muy baja expresión del marcador CD 105; positivo para células madre mesenquimales (Colter y col., 2001; Prockop y col, 2001; Docheva y col., 2008; Leyva-Leyva y col., 2012).

Adicionalmente, estas diferencias morfológicas puede que estén atribuidas a una respuesta de la célula frente al microambiente, produciendo cambios en la organización de su citoesqueleto.

Las alteraciones que presenta una célula en su citoesqueleto pueden estar relacionadas con la elasticidad y motilidad de la misma (Docheva y col., 2008).

Esto podría corresponderse con lo observado en los registros de marcaje con sondas fluorescentes, donde se destaca la elongación de las extensiones citoplasmáticas de las células de tipo fusiforme.

Los registros de marcaje con sondas fluorescentes mediante Hoechst y Naranja de Acridina (NA) respaldaron la caracterización morfológica de las células mesenquimales del estroma de la MAH. Del mismo modo, la sonda de Naranja de Acridina reveló la presencia de lisosomas en la región perinuclear de algunas células con amplio volumen citoplasmático. El principio del marcaje con NA se rige por su capacidad de permear a través de las membranas (tanto en membranas celulares como en las membranas de los organelos), ya que una vez que la célula es protonada, el NA se almacena en las regiones de pH bajo, es decir se acumula en los organelos que poseen estructuras ácidas. Por su parte, los lisosomas cuentan con una bomba protónica que genera un gradiente de pH significativo, lo cual favorece el ingreso del NA dentro de la estructura lisosomal. Este proceso es suficientemente eficiente para concentrar NA en el interior de los lisosomas, lo que conlleva a la formación de un precipitado en forma de gránulos (Darzynkiewicz, 1991; Traganos y Darzynkiewicz, 1994; Uchimoto y col., 1999; Darzynkiewicz y col., 2004).

La alta densidad de lisosomas marcados con NA en la región perinuclear posiblemente esté relacionada con la capacidad de autofagia por parte de la célula. La autofagia, es un proceso catabólico que involucra el reciclaje de proteínas y organelos citoplasmáticos a través de la actividad hidrolítica de los lisosomas, por lo tanto estos participan en la degradación de organelos defectuosos para la célula. Es por esta razón, que al tratarse de un mecanismo de

reciclaje intracelular, la autofagia cumple con un papel importante en la eliminación de proteínas y organelos innecesarios que se acumulan durante la autorrenovación, proliferación y diferenciación de una célula madre (Cooper, 2000; Phadwal y col., 2013).

La importancia de la autofagia en cada una de las propiedades particulares de las células madre ha sido referida por diversos autores. En primer lugar se ha mencionado que la autofagia es esencial para la autorrenovación y diferenciación debido a que estos procesos requieren de un control estricto del recambio proteico y la digestión de organelos. Inclusive, la autofagia contribuye con el objetivo de la célula madre de alcanzar una morfología y funciones específicas a través de la regulación de la expresión una proteína kinasa llamada mTOR. Del mismo modo, se ha constatado que en las células madre quiescentes, la autofagia participa en la eliminación de macromoléculas defectuosas que podrían causar la pérdida de esta quiescencia (Coller y col. 2006; Zeng y Zhou; 2007).

Otro ensayo que se tomó en cuenta para la caracterización de la población de células mesenquimales de la MAH, fue el de inmunocitoquímica. En el que se emplearon anticuerpos en contra de Stro-1 y vimentina; éstos revelaron distintos niveles de expresión en cada una de las subpoblaciones celulares.

El Stro-1 es un antígeno presente en células de unidades formadoras de colonia de fibroblastos (UFC-F) en la médula ósea y que potencialmente define la existencia de subpoblaciones precursoras de células madre mesenquimales (Simmons y Torok-Storb, 1991; Dennis y col., 2001). Es preciso señalar, que hubo una mayor expresión en las células tipo fibroblasto que en las células de amplio volumen citoplasmático. Esto posiblemente se deba a que las células de amplio

volumen citoplasmático se encuentran levemente comprometidas hacia la diferenciación en algún linaje, lo cual concordaría con lo referido por Arévalo y col. (2007) con respecto a la expresión de Stro-1 en células madre mesenquimales aisladas de la médula ósea, donde se describe que el Stro-1 es un marcador que se expresa en el desarrollo temprano de estas células y éste declina su expresión cuando genes asociados a la diferenciación y expansión osteogénica (como el *cbfa1*) interactúan con osteopontina y osteocalcina.

La vimentina es una de las proteínas más abundantes de los filamentos intermedios pertenecientes al citoesqueleto de las células mesenquimales, frecuentemente utilizada como marcador en el desarrollo de estas células (Eriksson y col., 2009).

Ambas subpoblaciones estudiadas revelaron positivamente la presencia de vimentina, no obstante, se evidenció una mayor expresión de la proteína en las células de tipo fibroblasto. Lo cual sugiere, que las células de amplio volumen citoplasmático, están más próximas a una etapa de madurez celular en comparación a las células de tipo fusiforme, esto coincide con lo propuesto por distintos autores, quienes describen una variación en los niveles de expresión de vimentina en función del desarrollo de la célula (Bornemann y Schmalbruch, 1993; Vater y col. 1994; Vaitinen y col., 2001).

Inducción de la diferenciación de las células mesenquimales del estroma de la MAH.

A través de la inducción de la diferenciación osteogénica y condrogénica, se evidenciaron distintas expresiones en cada sistema de cultivo, debido a que cada

uno de ellos posee características distintas. En primer lugar, en el cultivo en monocapa las células crecen adheridas al sustrato hasta alcanzar la confluencia, lo cual le confiere a este sistema algunas ventajas en cuanto a la cuantificación, caracterización y muestreo de réplicas. A pesar de esto, este sistema carece de la presencia significativa de interacciones célula-célula y célula-matriz. Estas interacciones se encuentran involucradas en la regulación de la proliferación, migración, apoptosis y diferenciación celular; por este motivo se ha mencionado que las funciones específicas para la diferenciación se mantienen con mayor facilidad en los cultivos tridimensionales, los cuales al aproximarse más a la configuración del tejido *in vivo*, incrementan el número de las interacciones mencionadas (Freshney, 2010). Tal es el caso de los cultivos en micromasas, pues varias investigaciones han señalado la efectividad de este sistema para diferenciación de células madre mesenquimales humanas en tejidos como el cartílago (Carlberg y col., 2001; Eslaminejad y col., 2006; Sudo y col., 2007; Kang y col., 2012).

Diferenciación de cultivos de células mesenquimales en monocapa

Los ensayos que se aplicaron para evaluar la inducción de la diferenciación en los sistemas de cultivo en monocapa reflejaron bajos niveles de coloración. Pese a esto, se evidenciaron detalles de cambios morfológicos en cada caso de inducción, tanto condrogénica como osteogénica.

Inicialmente, se puede inferir que ocurrieron pocos indicios de diferenciación condrogénica en el sistema de cultivo bidimensional ya que en pocas zonas de la monocapa se corroboró, a través de la coloración azul alcian (pH 2,5), la presencia

de glucosaminoglicanos (carboxilados y sulfatados) y proteoglucanos unos de los principales componentes de la matriz extracelular del cartílago. La expresión de estos elementos se debe a la utilización de compuestos inductores como la dexametasona, el cual consiste en un glucocorticoide que a través de receptores citoplasmáticos, induce la expresión de genes y la síntesis de proteínas de una variedad de marcadores de la matriz del cartílago. Asimismo, se ha reportado que es un componente esencial para formación de osteoprogenitores a partir de células madre mesenquimales (Derfoul y col., 2006; Oshina y col., 2007). Otro compuesto que contribuye con la expresión de los proteoglucanos es el Factor de Crecimiento de la insulina (IGF), el cual además incrementa la síntesis de proteínas como el colágeno tipo II, estimula la proliferación, regula la apoptosis; y promueve la supervivencia, el desarrollo y la maduración de los condrocitos (Luyten y col., 1988; Nixon y col., 1999; Longobardi y col., 2006; An y col., 2010). Del mismo modo, en los cultivos de monocapa inducidos hacia la condrogénesis, se presenciaron algunas modificaciones morfológicas, donde las células crecidas en medio control conservaron su morfología fusiforme y las células inducidas exhibieron una morfología irregular, lo cual coincide con lo observado por Wei y colaboradores (2009), quienes igualmente describen un cambio en la morfología de las células inducidas.

Las células inducidas hacia el linaje osteogénico, presentaron un patrón similar en cuanto a sus señales de diferenciación. Uno de estos se evidenció a través de la coloración de von Kossa, cuyo principio consiste en la detección de fosfatos o carbonatos de calcio, los cuales son elementos de la matriz extracelular mineralizada presente en el tejido óseo. En consecuencia, se observaron estos

depósitos en muy pocos sectores de la monocapa, como también se apreciaron diferencias morfológicas en estas células. Los depósitos observados son el resultado del β -glicerolfosfato incluido en el medio inductor, pues este compuesto es hidrolizado por la fosfatasa alcalina (marcador temprano de osteogénesis), lo que trae como consecuencia la producción de altos niveles de iones fosfato, esto último genera las condiciones químicas ideales para la deposición mineral (Coelho y Fernandes; 2000).

La baja efectividad de las inducciones condrogénica y osteogénica del sistema en monocapa puede deberse a dos factores críticos distintos. El primero de ellos consiste en el tiempo de inducción, ya que las células mesenquimales se mantuvieron bajo el medio inductor sólo por 14 días, de hecho, se difiere con lo expuesto por distintos investigadores, los cuales señalan protocolos donde los cultivos con el medio de inducción se incuban por un tiempo de 21 días. (Portmann-Lanz y col., 2006; Soncini 2007; Díaz-Prado y col., 2010b). El segundo factor importante es el de las interacciones célula-célula y célula matriz, ambas vitales para la estimulación de la diferenciación celular, por esta razón representan una desventaja en los sistemas de cultivo bidimensionales.

Diferenciación de células mesenquimales en sistema tridimensional de micromasas

El sistema de micromasas ha sido considerado como uno de los métodos más eficientes para la inducción condrogénica de las células mesenquimales del estroma de la MAH (Alviano y col., 2007; Sudo y col., 2007; Díaz-Prado y col., 2010b). Los agregados estudiados variaron de acuerdo a sus dimensiones,

patrones de regionalización y niveles de expresión en cada región. Incluso, se presentaron diferencias morfológicas entre las células de un mismo agregado. Cabe destacar, que el agregado control y osteogénico presentaron patrones de coloración y regionalización muy similares.

Inicialmente, a través de las coloraciones de azul alcian (pH 2,5 y pH 1) se constató la presencia de GAGs carboxilados (evidencia de proteoglicanos) y GAGs altamente sulfatados en las tres micromasas. Esto se confirmó mediante la coloración de azul de toluidina, un compuesto que también revela (entre tonos rojo y violeta) la existencia tanto de proteoglicanos ácidos como proteoglicanos altamente sulfatados (Bancroft y Gamble; 2008).

La presencia de colágeno en los agregados celulares se evaluó empleando dos técnicas histoquímicas distintas, la primera de ellas se trató de la coloración de Van Gieson, la cual reveló una ligera expresión solamente en los agregados control y de inducción osteogénica. La segunda técnica consistió en la detección inmunohistoquímica. Ésta, al ser de carácter más específico, reveló la existencia de colágeno tipo II en los tres agregados, con una expresión más alta en el agregado en presencia de inductores osteogénicos.

Al integrar todos estos resultados, se podría deducir que se inició un proceso de diferenciación condrogénica en el agregado inducido hacia este linaje. Esto, precisamente se justifica por la presencia de GAGs, proteoglicanos y colágeno tipo II, elementos esenciales de la matriz del cartílago. En este mismo sentido, se podría estimar que la condrogénesis se encuentra en su etapa inicial, debido a la morfología tipo fusiforme que mantienen las células embebidas dentro de la matriz, resultado que coincide con lo que ha sido descrito previamente por

Ichinose y col. (2005); y Chung y col. (2012). Como es de saber, el proceso de condrogénesis empieza con la condensación de células tipo mesenquimales condroprogenitoras que forman un cúmulo celular redondeado y denso, este cúmulo de células mesenquimales señala el sitio de formación de un cartílago hialino. Sin embargo, no es hasta que se expresa el factor de transcripción SOX-9 que se lleva a cabo la diferenciación en condroblastos (Ross y Pawlina, 2007).

La evaluación de la diferenciación en el agregado de inducción osteogénica exhibió una expresión y coloración positiva de todas las técnicas histoquímicas ensayadas. Igualmente, presentó un patrón de regionalización bien definido con diferencias tanto de expresión como morfológicas entre cada una de estas regiones. A partir de lo observado, se podría interpretar que pudiese estar ocurriendo una condrogénesis en una etapa más avanzada (en comparación con el agregado bajo inducción condrogénica). Esto se complementa con lo que se describió previamente acerca del proceso de diferenciación condrogénica; ya que se puede apreciar una condensación de células mesenquimales en la región intermedia. Aunado a ello, el sincitio aparente ubicado en la región central posiblemente esté conformado por condroblastos, ya que en el proceso de condrogénesis *in vivo*, luego de la expresión de SOX-9, las células pierden sus prolongaciones citoplasmáticas y expresan colágeno tipo II. En otro sentido, se podría suponer el inicio de una osificación endocondral ya que este proceso empieza de la misma manera que la condrogénesis donde las células mesenquimales expresan inicialmente colágeno tipo II y luego se diferencian en condroblastos, los cuales producen una matriz cartilaginosa. Sin embargo, no se puede aseverar que ocurrió una diferenciación osteogénica debido a que los

agregados no alcanzaron la etapa de mineralización de la matriz extracelular, esto se comprobó con la prueba de von Kossa (resultados no mostrados) (Ross y Pawlina, 2007).

Al comparar los agregados de inducción osteogénica y control es notable la similitud que presentan con respecto a sus patrones de regionalización e intensidad de coloración y expresión. En primera instancia, resulta atípica la expresión positiva de moléculas como proteoglicanos, glucosaminoglicanos y colágeno tipo II en el agregado control; no obstante esto podría estar sujeto a varias razones. Una de estas razones consiste en que las micromasas simulan un microambiente tridimensional *in vitro*, donde hay una marcada interacción celular favoreciendo condiciones apropiadas para que las células se comprometan hacia el linaje condrogénico espontáneamente sin añadir biomoléculas inductoras, y de esta manera sintetizan componentes de MEC. Igualmente, se ha demostrado que células mesenquimales provenientes de otros tejidos como la médula ósea, obedecen un orden jerárquico, en el cual las células pueden presentar señales de diferenciación sin estar bajo condiciones de inducción, inclusive se les ha considerado como progenitores mesenquimales, que pierden su potencial de diferenciación, generando progenitores osteocondrogénicos (Muraglia y col., 2000; Lee y col., 2010). Esto podría estar relacionado con lo investigado por Docheva y col. (2008) quienes también reconocieron subpoblaciones de células mesenquimales obtenidas de la médula ósea con un amplio volumen citoplasmático, estas células expresaron actividad de fosfatasa alcalina y presentaron características muy similares a las de osteoblastos humanos. Del mismo modo, recientemente Leyva-Leyva y col. (2012) identificaron una

subpoblación de células mesenquimales aisladas del estroma de la MAH que poseían un mayor potencial osteoblástico, pues presentaron una mejor deposición de calcio que el resto de la población.

CONCLUSIONES

- Se logró aislar con éxito las células mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana. Asimismo, se estableció el cultivo primario en condiciones óptimas de cultivo con un crecimiento celular típico. De esta población aislada, se identificaron subpoblaciones de células distintas en dos fracciones enzimáticas consecutivas, donde la primera de ellas no proliferó en condiciones normales de cultivo y la segunda proliferó hasta la confluencia. Ésta técnica fraccionada no ha sido ensayada previamente según la literatura consultada.
- La caracterización morfológica evidenció dos subpoblaciones celulares; una mayor subpoblación de células con morfología fibroblástica típica que expresa marcadores de células mesenquimales progenitoras; Stro-1, vimentina y otra segunda subpoblación de células de amplio volumen citoplasmático que contiene numerosos lisosomas en la región perinuclear del citoplasma. Cabe destacar, que en este trabajo se describe por primera vez el estudio subcelular de lisosomas pertenecientes a células mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana. Sin embargo, se necesita llevar a cabo un estudio más exhaustivo y cuantitativo acerca de la cantidad de lisosomas presentes en las dos subpoblaciones en cuestión, así como la evaluación de su morfología en diferentes etapas del cultivo.

- Se confirmó la presencia de glucosaminoglicanos en los cultivos en monocapa inducidos hacia el linaje condrogénico de células mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana. Del mismo modo, en los cultivos en monocapa inducidos hacia el linaje osteogénico, se constató la presencia de indicios de mineralización de la matriz extracelular de algunas células. A pesar de esto, se requiere realizar la inducción por un tiempo más prolongado antes de hacer la evaluación y llevar a cabo un estudio más detallado de la caracterización morfológica de las células inducidas.
- La presencia de GAG carboxilados y sulfatados, de proteoglicanos en la matriz extracelular de las micromasas, así como también la expresión de colágeno tipo II, principal marcador de condrogénesis indican que las células mesenquimales de la membrana amniótica humana se diferenciaron hacia el linaje condrogénico bajo todas las condiciones ensayadas, pero no se logró la diferenciación a nivel osteogénico. Inclusive, este sistema tridimensional de agregado *in vitro* permite que las células mesenquimales de la MAH en presencia de medio control en ausencia de inductores conocidos se diferencien espontáneamente hacia el linaje condrogénico, mientras que con el sistema bidimensional en monocapa no se constató síntesis de GAG en este mismo medio.

- Para obtener características más similares al tejido cartilaginoso *in vivo* se debe realizar la inducción por un tiempo más prolongado. De esta misma manera, en función de comprender la presencia de indicios de diferenciación de agregados cultivados en medio control, se debe realizar una determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina y el porcentaje de la expresión de marcadores de células madre mediante técnicas inmunocitoquímicas de ambas subpoblaciones celulares previo al establecimiento del cultivo tridimensional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts, B., Johnson A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter P. 2008. Molecular Biology of the Cell. Garland Science. Quinta Edición, Nueva York, E.U.A.
2. Alison, M.R., Islam, S. 2008. Atributtes of adult stem cells. *J Pathol.* **217**: 144-160.
3. Alvarez, M., Villanueva, Á., Acedo, P., Cañete, M., Stockert, J. C. 2011. Cell death causes relocalization of photosensitizing fluorescent probes. *Acta Histochem.* **113**: 363-368.
4. Alviano, F., Fossati, V., Marchionni, C., Arpinati, M., Bonsi, L., Franchina, M., Lanzoni G. y colaboradores. 2007. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol.* **7**: 11.
5. Amabile, G., Meissner, A. 2009. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med.* **15**: 59-68.
6. An, C., Cheng, Y., Yuan, Q., Li, J. 2010. IGF-1 and BMP-2 induces differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes-like cells. *Ann Biomed Eng.* **38**: 1647-1654.
7. Arévalo Romero, J. A., Páez Guerrero, D. M., Rodríguez Pardo, V. M. 2007. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *NOVA Publ Cient.* **5**: 177-184.
8. Athanasiou, K. A., Darling, E. M., Hu, J. C. 2010 Articular Cartilage Tissue Engineering. Morgan & Claypool. Primera Edición, Davis, California, E.U.A.

9. Avancini, R., Costola-Souza, C., Palmeira, C.A., Goncalves L., Favaron, P., Miglino, M.A. 2012. Placental tissues as sources of stem cells-Review. *Open Journal of Animal Sciences*. **2**: 166-173.
10. Bachmaier, N., Graf R. 1999. The anchoring zone in the human placental amnion: bunches of oxytalan and collagen connect mesoderm and epithelium. *Anat Embryol*. **200**: 81-90.
11. Bancroft, J. D., Gamble, M. 2008. Theory and practice of histological techniques. Elsevier Health Sciences. Sexta Edición, Philadelphia, Pennsylvania, E.U.A.
12. Barlow, S., Brooke, G., Chatterjee, K., Price, G., Pelekanos, R., Rossetti, T., Doody, M. y colaboradores. 2008. Comparison of Human Placenta- and Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev*. **17**: 1095-1108.
13. Bilic, G., Zeisberger, S. M., Mallik, A. S., Zimmermann, R., Zisch, A. H. 2008. Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy. *Cell Transplant*. **17**: 955-968.
14. Bornemann, A., Schmalbruch, H. 1993. Anti-vimentin staining in muscle pathology. *Neuropath Appl Neuro*. **19**: 414-419.
15. Brooke, G., Rossetti, T., Pelekanos, R., Ilic, N., Murray, P., Hancock, S., Antonenas, V. y colaboradores. 2008. Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials. *Brit J Haematol*. **144**: 571-579.

16. Carlberg, A. L., Pucci, B., Rallapalli, R., Tuan, R. S., Hall, D. J. 2001. Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture by retroviral gene transfer of BMP-2. *Differentiation*. **67**: 128-138.
17. Casey, M. L., MacDonald, P. C. 1996. Interstitial collagen synthesis and processing in human amnion: a property of the mesenchymal cells. *Biol Reprod*. **56**: 1253-1260.
18. Choi, K. M., Seo, Y. K., Yoon, H. H., Song, K. Y., Kwon, S. Y., Lee, H. S., Park, J. K. 2008. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived stem cell proliferation and differentiation. *J Biosci Bioeng*. **106**: 586-594.
19. Chung, C. R., Kim, H. N., Park, Y., Kim, M. J., Oh, Y. J., Shin, S. J., Choi J. Y. y colaboradores. 2012. Morphological evaluation during in vitro chondrogenesis of dental pulp stromal cells. *Restorative Dentistry and Endodontics*. **37**: 34-40.
20. Coelho M.A., Fernandes M.H. 2000 Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, β -glicerophosphate and dexamethasone in osteoblastic differentiation. *Biomaterials*. **2**: 1095-1102.
21. Coller, H. A., Sang, L., Roberts, J. M. 2006. A new description of cellular quiescence. *Plos Biol*. **4**: e83.
22. Colter, D. C., Sekiya, I., Prockop, D. J. 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **98**: 7841-7845.

23. Cooper, G. M. 2000. The cell: a molecular approach. Sinauer Associates, Segunda Edición, Sunderland, Massachusetts, E.U.A.
24. Daley G.Q. 2010. Stem cells: roadmap to the clinic. *J Clin Invest.* **120**: 8-10.
25. Darzynkiewicz, Z. 1991. Flow cytometric methods for RNA content analysis. *Methods.* **2**: 200-206.
26. Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Srouf, E. F. 2004. Differential staining of DNA and RNA. *Current Protocols in Cytometry.* 7-3.
27. Davis, J., 1910. Skin transplantation with a review of 550 cases at the John Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med. J.* **15**: 307
28. De Miguel, M. P., Fuentes-Julián, S., Alcaina, Y. 2010. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Rev Rep.* **6**: 633-649.
29. Dennis, J. E., Carbillet, J. P., Caplan, A., Charbord, P. 2001. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs.* **170**: 73-82.
30. Derfoul, A., Perkins, G. L., Hall, D. J., Tuan, R. S. 2006. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells.* **24**: 1487-1495.
31. Díaz-Prado, S., Rendal, M., Muiños, E., Hermida, T., Rodríguez, M. 2010a. Potential use of the human amniotic membrane as a scaffold in human articular cartilage repair. *Cell Tissue Bank.* **11**: 183 – 195.
32. Díaz-Prado, S., Muiños-López, E., Hermida-Gómez, T., Rendal-Vázquez, M. E., Fuentes-Boquete, I., de Toro, F. J., Blanco, F. J. 2010b. Multilineage

- differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J Cell Biochem.* **111**: 846-857.
33. Dobрева, M. P., Pereira, P. N., Deprest, J., Zwijssen, A. 2010. On the origin of amniotic stem cells: of mice and men. *Int J Dev Biol.* **54**: 761-777.
34. Docheva, D., Padula, D., Popov, C., Mutschler, W., Clausen-Schaumann, H., Schieker, M. 2008. Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy. *J Cell Mol Med.* **12**: 537-552.
35. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R.J. y colaboradores 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* **8**: 315-317.
36. Eriksson, J. E., Dechat, T., Grin, B., Helfand, B., Mendez, M., Pallari, H. M., Goldman, R. D. 2009. Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest.* **119**: 1763-1771.
37. Eslaminejad, M. B., Nikmahzar, A., Piriea, A. 2006. The structure of human mesenchymal stem cells differentiated into cartilage in micro mass culture system. *Yakhteh Med J.* **3**: 162-171.
38. Freshney, I. 2010. Culture of animal cells. A manual of basic technique and specialized applications. Wiley-Blackwell. Sexta Edición, Hoboken, New Jersey, E.U.A.
39. Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., Kulagina, N. N. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* **4**: 267-274.

40. Hass, R., Kasper, C., Bohm, S., Jacobs, R. 2011. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. **9**: 12.
41. Hidalgo-Bastida, L. A., Cartmell, S.H. 2010. Mesenchymal stem cells, osteoblasts and extracellular matrix proteins: enhancing cell adhesion and differentiation for bone tissue engineering. *Tissue Eng Pt B-Rev*. **16**: 405-412.
42. Ichinose, S., Tagami M., Muneta T., Sekiya I. 2005. Morphological examination during in vitro cartilage formation by human mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res*. **322**: 217-226.
43. Ilic, D., Polak, J. M. 2011. Stem cells in regenerative medicine: introduction. *Brit Med Bull*. **98**: 117-126.
44. Jähn, K., Richards, R. G., Archer, C. W., Stoddart, M. J. 2010. Pellet culture model for human primary osteoblasts. *Eur Cell Mater*. **20**: 149-161.
45. Kang, J. W., Koo, H. C., Hwang, S. Y., Kang, S. K., Ra, J. C., Lee, M. H., Park, Y. H. 2012. Immunomodulatory effects of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci*. **13**: 23-31.
46. Kim, E. Y., Lee, K. B., Kim, M. K. 2014. The Potential of Mesenchymal Stem Cells Derived from Amniotic Membrane and Amniotic Fluid for Neuronal Regenerative Therapy. *BMB Rep*. **47**: 135-140.
47. Kobayashi, A., Sugiyama, K., Li, W., Tseng, S. C. 2008. In vivo laser confocal microscopy findings of cryopreserved and fresh human amniotic membrane. *Ophthalmic Sur La Im*. **39**: 312-318.

48. Kolios, G., Moodley, Y. 2012. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. **85**: 3-10.
49. Lee, C. C. I., Christensen, J. E., Yoder, M. C., Tarantal, A. F. 2010. Clonal analysis and hierarchy of human bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells. *Exp Hematol*. **38**: 46-54.
50. Lev, R., Spicer, S.S. 1964. Specific staining of sulfate group with alcian blue at low pH. *J Histochem Cytochem*. **12**: 309-314.
51. Leyva-Leyva, M., Barrera, L., López-Camarillo, C., Arriaga-Pizano, L., Orozco-Hoyuela, G., Carrillo-Casas, E. M., Calderón-Pérez, J y colaboradores. 2012. Characterization of mesenchymal stem cell subpopulations from human amniotic membrane with dissimilar osteoblastic potential. *Stem Cells Dev*. **22**: 1275-1287.
52. Lin, G., Liu, G., Banie, L., Wang, G., Ning, H., Lue, T. F., Lin, C. S. 2011. Tissue distribution of mesenchymal stem cell marker Stro-1. *Stem Cells Dev*. **20**: 1747-1752.
53. Lindenmair, A., Hatlapatka, T., Kollwig, G., Hennerbichler, S., Gabriel, C., Wolbank, S., Redl, H. y colaboradores. 2012. Mesenchymal stem or stromal cells from amnion and umbilical cord tissue and their potential for clinical applications. *Cells*. **1**: 1061-1088.
54. Liu, A., Niswander, L. A. 2005. Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci*. **6**: 945-954.
55. Longobardi, L., O'Rear, L., Aakula, S., Johnstone, B., Shimer, K., Chytil, A., Horton W. A. y colaboradores. 2006. Effect of IGF-I in the chondrogenesis

- of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF- β signaling. *J Bone Miner Res.* **21**: 626-636.
56. Luyten, F. P., Hascall, V. C., Nissley, S. P., Morales, T. I., Reddi, A. H. 1988. Insulin-like growth factors maintain steady-state metabolism of proteoglycans in bovine articular cartilage explants. *Arch Biochem Biophys.* **267**: 416-425.
57. Magatti, M., De Munari, S., Vertua, E., Gibelli, L., Wengler, G. S., Parolini, O. 2008. Human amnion mesenchyme harbors cells with allogeneic T-Cell suppression and stimulation capabilities. *Stem Cells.* **26**: 182-192.
58. Mahmoudifar, N., Doran, P. M. 2012. Chondrogenesis and cartilage tissue engineering: the longer road to technology development. *Trends Biotechnol.* **30**: 166-176.
59. Márquez M. L., Hernández A., Scioscia D., Merentes E. 2012. Cultivo de células de cartílago nasal humano. *Gac Med.* **120**: 48-54.
60. Merentes, E. 2009. Fuentes de obtención de células madre mesenquimales. Potencialidad de diferenciación *in vitro*. Trabajo de Ascenso a Titular. Universidad Central De Venezuela. Caracas, Venezuela.
61. Merentes, E., Márquez, M.L., Rodríguez, M. 2012. Fuentes de células para la bioingeniería de tejidos. *MIBE* **6**: 73-76.
62. Merentes E., Márquez, M. L., Navarro, E., López, R. González, E. 2014. Membrana amniótica humana como fuente de células madre para la bioingeniería de tejidos. *MIBE.* **7**: por publicar.
63. Meyer M. 2012. Establecimiento del cultivo de células madre mesenquimales de la membrana amniótica. Caracterización y diferenciación

- in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
64. Moore, R. M., Mansour, J. M., Redline, R. W., Mercer, B. M., Moore, J. J. 2006. The physiology of fetal membrane rupture: insight gained from the determination of physical properties. *Placenta*. **27**: 1037-1051.
 65. Muraglia, A., Cancedda, R., Quarto, R. 2000. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*. **113**: 1161-1166.
 66. Navarro, E. 2013. Membrana amniótica humana como fuente de células epiteliales y biosustrato. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
 67. Nixon, A. J., Fortier, L. A., Williams, J., Mohammed, H. 1999. Enhanced repair of extensive articular defects by insulin-like growth factor-I-laden fibrin composites. *J Orthop Res*. **17**: 475-487.
 68. Oshina, H., Sotome, S., Yoshii, T., Torigoe, I., Sugata, Y., Maehara, H, Marukawa E. y colaboradores. 2007. Effects of continuous dexamethasone treatment on differentiation capabilities of bone marrow-derived mesenchymal cells. *Bone*. **41**: 575-583.
 69. Paracchini, V., Carbone, A., Colombo, F., Castellani, S., Mazzucchelli, S., Di Gioia, S., Degiorgio, D. y colaboradores. 2012. Amniotic mesenchymal stem cells: a new source for hepatocyte-like cells and induction of CFTR expression by coculture with cystic fibrosis airway epithelial cells. *J Biomed Biotechnol*. **12**: 1-15.

70. Parolini, O., Alviano, F., Bagnara, G. P., Bilic, G., Bühring, H. J., Evangelista, M., Strom, S. C. y colaboradores 2008. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*. **26**: 300-311.
71. Phadwal, K., Watson, A. S., Simon, A. K. 2013. Tightrope act: autophagy in stem cell renewal, differentiation, proliferation, and aging. *Cell Mol Life Sci*. **70**: 89-103.
72. Pisano, F., Mura, M., Cervio, E., Danieli, P., Malpasso, G., Ciuffreda, M. C., Gneccchi, M. 2013. Overexpression of growth factors to improve cardiac differentiation of human mesenchymal stem cells derived from the amniotic membrane. *Eur Heart J*. **34**: 5692.
73. Portmann-Lanz, C. B., Schoeberlein, A., Huber, A., Sager, R., Malek, A., Holzgreve, W., Surbek, D. 2006. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre-and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol*. **194**: 664-673.
74. Prockop, D. J. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. **276**: 71-74
75. Prockop, D. J., Sekiya, I., Colter, D. C. 2001. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy*. **3**: 393-396.
76. Prósper, F., Herreros, J. 2004. Células madre adultas. *Rev Argent Cardiol*. **72**: 68-73.

77. Robson, M. C., Krizek, T. J. 1973. The effect of human amniotic membranes on the bacteria population of infected rat burns. *Ann Surg.* **177**: 144.
78. Ross, M.H., Pawlina, W. 2007. Histología texto y atlas color con biología celular y molecular. Editorial Médica Panamericana, Quinta Edición, Buenos Aires, Argentina.
79. Rossant, J. 2001. Stem cells from the mammalian blastocyst. *Stem cells*. **19**: 477-482.
80. Rossant, J. 2008. Stem cells and early lineage development. *Cell*, **132**: 527-531.
81. Sabella, N. (1913). Use of fetal membranes in skin grafting. *Med Rec NY*. **83**: 478.
82. Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G. M., Claas, F. H., Fibbe, W. E., Kanhai, H. H. 2004. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*. **22**:1338-1345.
83. Schulz, R. M., Bader, A. 2007. Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *Eur Biophys J*. **36**: 539-568.
84. Semenov, O. V., Koestenbauer, S., Riegel, M., Zech, N., Zimmermann, R., Zisch, A. H., Malek, A. 2010. Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation. *Am J Obstet Gynecol*. **202**: 193-e1.
85. Seo, M. S., Park, S. B., Kim, H. S., Kang, J. G., Chae, J. S., Kang, K. S. 2013. Isolation and characterization of equine amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. *Jpn J Vet Sci*. **14**: 151-159.

86. Simmons, P. J., Torok-Storb, B. 1991. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. **78**: 55-62.
87. Smith, A. 2006. A glossary for stem-cell biology. *Nature*. **441**:1060-1060.
88. Soncini, M., Vertua, E., Gibelli, L., Zorzi, F., Denegri, M., Albertini, A., Parolini, O., y colaboradores. 2007. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen M*. **1**: 296-305.
89. Sudo, K., Kanno, M., Miharada, K., Ogawa, S., Hiroyama, T., Saijo, K., Nakamura, Y. 2007. Mesenchymal progenitors able to differentiate into osteogenic, chondrogenic, and/or adipogenic cells in vitro are present in most primary fibroblast-like cell populations. *Stem Cells*. **25**: 1610-1617.
90. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. **131**: 861-872.
91. Takashima, S., Yasuo, M., Sanzen, N., Sekiguchi, K., Okabe, M., Yoshida, T., Nikaido, T., y colaboradores. 2008. Characterization of laminin isoforms in human amnion. *Tissue and Cell*. **40**: 75-81.
92. Teng, Z., Yoshida, T., Okabe, M., Toda, A., Higuchi, O., Nogami, M., Yoneda M. y colaboradores. 2013. Establishment of Immortalized Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells. *Cell transplant*. **22**: 267-278.
93. Traganos, F., Darzynkiewicz, Z. 1994. Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocyte subpopulations. *Method Cell Biol*. **41**: 185-195.

94. Uchimoto, T., Nohara, H., Kamehara, R., Iwamura, M., Watanabe, N., Kobayashi, Y. 1999. Mechanism of apoptosis induced by a lysosomotropic agent, L-Leucyl-L-Leucine methyl ester. *Apoptosis*. **4**: 357-362.
95. Vaittinen, S., Lukka, R., Sahlgren, C., Hurme, T., Rantanen, J., Lendahl, U., Eriksson J. E. y colaboradores. 2001. The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. *J Neuropath Exp Neur*. **60**: 588-597.
96. Van Herendael, B. J., Oberti, C., Brosens, I. 1978. Microanatomy of the human amniotic membranes. A light microscopic, transmission, and scanning electron microscopic study. *Am J Obstet Gynecol*. **131**: 872.
97. Vater, R., Cullen, M. J., Harris, J. B. 1994. The expression of vimentin in satellite cells of regenerating skeletal muscle *in vivo*. *Histochem J* **26**: 916-928.
98. Wagers, A. J., Weissman, I. L. 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. **116**: 639-648.
99. Wei, J. P., Nawata, M., Wakitani, S., Kametani, K., Ota, M., Toda, A., Konishi I. y colaboradores. 2009. Human amniotic mesenchymal cells differentiate into chondrocytes. *Cloning Stem Cells*. **11**: 19-26.
100. Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G. M., Hayek, A., Ding, S. 2006. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc Natl Acad Sci Biol*. **103**: 6907-6912.

101. Young, M. F. 2003. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporosis Int.* **14**: 35-42.
102. Zeng, M., Zhou, J. N. 2008. Roles of autophagy and mTOR signaling in neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells. *Cell Signal.* **20**: 659-665.
103. Zhu, S. F., Zhong, Z. N., Fu, X. F., Peng, D. X., Lu, G. H., Li, W. H., Xu, H. Y. y colaboradores. 2013. Comparison of cell proliferation, apoptosis, cellular morphology and ultrastructure between human umbilical cord and placenta-derived mesenchymal stem cells. *Neurosci Lett.* **541**: 77-82.
104. Zuk, P., Zhu, M, Ashjian, P., De Ugarte, D., Huang, J., Mizuno, H., Alfonso, C. y colaboradores. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *MBC.* **13**: 4279-4295.

ANEXO 1

DESCRIPCIÓN Y OBLIGACIONES DEL ESTUDIO

Las placentas serán obtenidas de la Unidad de Partos de La Clínica.

Si Ud. da su consentimiento, su participación consistirá en donar su placenta de manera voluntaria, la cual se extraerá mediante el proceso de cesárea, bajo las condiciones de rutina que se usan en la clínica.

El protocolo de selección de las donantes de placentas sigue las mismas evaluaciones que los donantes de órganos y tejidos para trasplante. Para que se produzca la donación real, la embarazada deberá cumplir con una serie de requisitos que se detallan a continuación:

Criterios de selección:

- Madre sana, mayor de edad (dieciocho años), en pleno uso de sus facultades mentales.
- Embarazo sano y controlado por un período no menor a seis meses.
- Feto sano, sin patología placentaria.
- Parto por cesárea programada sin ruptura de bolsa.
- Madre y feto libres de infecciones transmisibles (virales, bacterianos y otros microorganismos).
- Consentimiento materno, médico y de un testigo.
- Serología del primer trimestre del embarazo negativa o test de amplificación de ácidos nucleicos negativos.
- Placenta sin restos de meconio.

Criterios de exclusión:

- Infección materna crónica o aguda.
- Infección fetal crónica o aguda.

- Infección o inflamación de las membranas fetales.
- Gestación inferior a 34 semanas.

Adicionalmente a la paciente donadora se le realizarán los controles serológicos mostrados en la Tabla 1, ya que al tratarse de un donante vivo es necesario cubrir el periodo ventana de estas enfermedades.

Tabla 1.- Controles serológicos realizados a las pacientes donadoras de las placentas antes del parto.

Cribado Serológico de las Donantes	
Anticuerpos Virus Inmunodeficiencia Humana	HIV I y II
Descarte de Sífilis	VDRL
Virus de la Hepatitis B	HBV
Virus de la Hepatitis C	HCV
Anticuerpos para Citomegalovirus	CMV

CONFIDENCIALIDAD Y ANONIMATO

Toda la información obtenida de éste estudio, relativas a Ud. mismo, quedarán estrictamente confidenciales y anónimas: Sólo los médicos que se ocupan directamente de la gestión de este estudio tendrán acceso a su historia médica, y estarán bajo las reglas estrictas del secreto médico.

Los datos registrados en este estudio serán tratados y analizados en un sistema de informática y Ud. tendrá derecho a acceder a los mismos en todo momento.

Otras Disposiciones

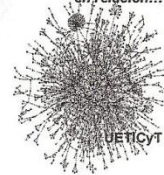
Si Ud. desea obtener información complementaria antes de decidirse a participar en este estudio, Ud. puede solicitarlas al responsable científico. Es libre de rechazar su participación en el proyecto en todo momento, retirar su consentimiento sin tener que justificarse y sin que ésta decisión de ninguna forma afecte la calidad de cuidado que se le dará por el médico tratante.

ANEXO 2

Unidad de Ética de la Ciencia y la Tecnología
Comité de Ética
Facultad de Ciencias. UCV

Caracas 8 Noviembre 2011.

La Vida es diversidad
en relación...



PROFESORA
LORENA MARQUEZ (Investigador Principal)

Título del Proyecto

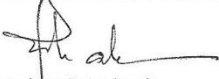
Caracterización y diferenciación *in vitro* del Células Madre Mesenquimales de la Membrana Amniótica

De nuestra mayor consideración,

Por medio de la presente le comunicamos que en el día de la presente fecha, el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, ha evaluado el proyecto de investigación arriba señalado y ha recomendado la elaboración de la presente carta aval al mismo, con el compromiso de que su realización se desarrollará conforme a los Principios Bioéticos fundamentales contemplados en la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela, en la Ley Orgánica de Ciencia, Tecnología e Innovación y en el propio Reglamento del Comité. Todo ello con la finalidad de velar por el adecuado trato y respeto a la dignidad de la vida de los seres vivos participantes en el proyecto.

Dejamos constancia que los Miembros del Comité de Ética que han participado en la evaluación del proyecto señalado no están involucrados, ni en modo alguno tienen conflictos de intereses, en la realización del mismo.

Con nuestras sentidas muestras de aprecio y consideración, muy atentamente,


Izaskun Petralanda
Por el Comité de Ética


Pío Arias
Coordinador de Investigación




Conforme y en conocimiento:
Lorena Marquez



CONSENTIMIENTO INFORMADO

En las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores ubicado en el Instituto de Biología Experimental (IBE), perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela (UCV), se está realizando el estudio titulado "***Caracterización y Diferenciación de Células Madres Mesenquimales provenientes de la Membrana Amniótica Humana***" para así analizar y evaluar la potencialidad de éstas células, bajo diferentes estrategias de inducción.

Yo, _____
C.I. _____ Nacionalidad _____ Estado
Civil _____ Domiciliado en _____ siendo
mayor de 18 años en USO pleno de mis facultades mentales y sin que medie coacción ni violencia alguna, en completo conocimiento de la naturaleza, forma, y propósito; relacionados con el estudio indicado anteriormente, en calidad de paciente, declaro mediante la presente:

1.- Haber sido informada de manera objetiva, clara y sencilla, por parte de mi doctor tratante, _____ y del grupo de Investigadores del Instituto de Biología Experimental (I.B.E.), de todos los aspectos relacionados al proyecto de Investigación.

2.- Tener conocimiento claro del objetivo fundamental del trabajo antes señalado, habiendo leído el documento de información relativo a este estudio donde observé bien el carácter puramente científico y por el cual yo no obtendré ningún beneficio económico.

3.- Haber sido informada de que mi participación en el proyecto consiste en donar mi placenta de manera voluntaria para el presente estudio, la cual se me extraerá mediante el proceso de cesárea, bajo las condiciones de rutina que se usan en la institución.

4.- Que el equipo de investigadores me ha garantizado confidencialidad relacionada tanto a mi identidad como de cualquier información relativa a mi persona a la que tengan acceso por concepto de mi participación en el proyecto antes mencionado.

DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO:

Luego de haber leído, comprendido y recibido las respuestas a mis preguntas con respecto a este formato de consentimiento y por cuanto mi participación en este estudio es totalmente voluntaria; acuerdo:

A.- Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores ubicado en el Instituto de Biología Experimental (IBE), a realizar el referido estudio con las muestras de Placenta que acepto donar a los fines indicados anteriormente.

B.- Reservarme el derecho de revocar esta autorización así como mi participación en el proyecto, en cualquier momento, sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa para mi persona.

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR:

Luego de haber explicado detalladamente al voluntario la naturaleza del protocolo mencionado. Certifico mediante la presente que, a mi leal saber, el

sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza de la participación en este estudio. Ningún problema de índole médica, de idioma o de instrucción han impedido al sujeto tener una clara comprensión de su compromiso con este proyecto.

Firma del Donante _____

Nombre y Apellidos

C.I. _____

Lugar _____

Fecha _____

Firma del Investigador _____

Nombre y Apellidos

C.I. _____

Lugar _____

Fecha _____

Firma del Doctor Tratante _____

Nombre y Apellidos

C.I. _____

Lugar _____

Fecha _____

