



UNIVERSIDAD CENTRAL DE  
VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

# **MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA COMO FUENTE DE CÉLULAS EPITELIALES Y COMO BIOSUSTRATO**

## **TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Bachiller **Eliana Navarro Scioscia**, como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

**Tutor: Dra. Elizabeth Merentes Díaz**

CARACAS, VENEZUELA  
Marzo – 2013

## DEDICATORIA

*Quiero dedicarle este trabajo a las personas más importantes y valiosas en mi vida, mi familia, en especial, a mi madre Dora, a mi hermana Geraldine y a mi madrina Isabelita, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por todo su amor y apoyo incondicional.*

*Sin ustedes este sueño no habría sido posible.*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de este camino y ante todo por permitirme llegar a este punto tan importante en mi vida y en mi formación como profesional.

A mi madre, Dora, por guiarme y apoyarme siempre, por sus consejos, por su perseverancia, humildad, esfuerzo y constancia, por sus valores, por enseñarme a ser quien soy pero más que nada por su amor incondicional y fe en mí. Eres todo un ejemplo a seguir, una luchadora incansable y parte fundamental en mi vida, quien me ha acompañado a lo largo de mi formación como profesional y como persona motivándome e impulsándome siempre a realizar mis sueños. A ti quien me lo has dado todo, muchísimas gracias. Lo logramos!!!

A mi hermana, Geraldine, quien me ha cuidado, escuchado y apoyado siempre y me ha brindado su amor y amistad incondicional. Por estar a mi lado en aquellos momentos de alegría y de angustia. Por su fuerza, perseverancia, consejos, lealtad y paciencia, mil gracias. Eres parte de mí compinche!!

A mi padre, Gerardo, por siempre cuidarme, por su apoyo, consejos y fe en mí.

A mis primos Gianna y Carlos por su apoyo incondicional y aliento en los momentos difíciles.

A mi tutora, la Dra. Elizabeth Merentes, quien con sus conocimientos, experiencia y compromiso nos inspira a ser cada día mejores profesionales y seres humanos. Por su apoyo, dedicación, motivación, criterio y aliento. Por abrirme las puertas del laboratorio y mostrarme el maravilloso mundo del Cultivo de Tejidos, brindándome la oportunidad que me permite hoy de optar al título de Licenciada. Ha sido todo un privilegio poder contar con tan excelente persona y profesional desde el punto de vista académico y personal. Gracias por su paciencia, consejos, enseñanzas y por creer en mí.

Al Dr. González Terán de la Clínica Cristóbal Rojas quien me ha brindado una valiosa ayuda al abrirme las puertas de su consultorio y en la recolección de las muestras. Gracias por involucrarse con este proyecto.

Por supuesto, a los pacientes, en especial a las Familias Zubiri y Ruiz. Muchas gracias.

A la Prof. María Lorena Márquez y al Prof. Lisandro Romero, por su tiempo y dedicación en la realización y revisión de este trabajo quienes en su papel de evaluadores contribuyeron a la formación de este.

A todas y cada una de las personas que forman parte del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores; gracias por hacerme sentir como en mi casa. A mis compañeros de laboratorio por su apoyo y ayuda prestada; a Elianny, Ricardo, Valentina, a la Sra. Mery y a Felipe; y a aquellos que ya no están pero que me recibieron en mis inicios; a Emily, Lorena y Mariángela.

Al Prof. Gilberto Payares por la ayuda prestada y por abrirme las puertas del Bioterio del IBE y poner a mi disposición las instalaciones y el material que me fuese necesario. Gracias por compartir sus conocimientos y experiencias de vida conmigo.

A la Prof. Guillermina Alonso por permitirme utilizar las instalaciones de su laboratorio.

A la Prof. Cristina Sanoja, la Prof. Valentina Salas, el Prof. José Mejías y a cada uno de aquellos que forman parte del grupo del almuerzo, quienes hicieron de estos una agradable experiencia llena de alegrías, risas y anécdotas. Gracias por esos momentos.

A mis amigas, quienes de una u otra forma me han acompañado durante los momentos más importantes de mi carrera, brindándome su apoyo, ánimos y cariños, en especial a Karla y a Jessika por encontrar las palabras exactas y la frase correcta en aquellos momentos de estrés y angustia, a Inés por siempre creer en mi y motivarme a ser mejor. Gracias por cada uno de los momentos vividos, jamás los olvidaré. Sin ustedes la vida sería aburrida y sin sabor.

A mis pequeñines, Mathias y Paola por siempre hacerme reír con sus locuras e inventos.

A la Facultad de Ciencias, sobre todo a la Escuela de Biología, por brindarme la oportunidad de alcanzar esta meta. Gracias a los profesores e investigadores quienes durante mi estadía en esta casa de estudio se esmeraron en dar lo mejor para mi formación profesional, por los conocimientos adquiridos y las experiencias vividas.

## RESUMEN

Actualmente se conoce que las células madre embrionarias y adultas representará una fuente de células para ser empleadas en la medicina regenerativa. Sin embargo, a pesar de su potencial terapéutico ambos tipos de células tienen asociado ciertos problemas éticos que pueden limitar su disponibilidad y que están muy relacionados con su aplicación clínica (Evangelista y col., 2008).

La membrana amniótica es la membrana extraembrionaria más interna de la placenta y consiste de una delgada, translúcida y elástica membrana fetal que se encuentra en contacto directo con el líquido amniótico. Esta consta de tres capas: un epitelio simple de células cuboidales, una membrana basal y un estroma avascular (Toda y col., 2007; Niknejad y col., 2008; Mamede y col., 2012). En ella se ha señalado la existencia de dos poblaciones celulares que muestran algunas propiedades características de las células madre. Las células epiteliales amnióticas humanas o hAECs (Human Amnion Epithelial Cells), que derivan del ectodermo embrionario y las células mesenquimales del estroma o hAMSCs (Human Amnion Mesenchymal Stromal Cells), que derivan del mesodermo embrionario (Whittle y col., 2000; Díaz - Prado y col., 2011).

Se ha demostrado que las células epiteliales amnióticas tienen la capacidad de diferenciarse hacia tejidos derivados de las tres capas germinales incluyendo endodermo, ectodermo y mesodermo (Díaz-Prado y col., 2011). Esto sugiere que, al igual que las células madre embrionarias, las células epiteliales amnióticas pueden ser una fuente de células madre útil para la terapia celular y la medicina regenerativa (Miki y Strom, 2006).

La búsqueda de nuevas fuentes de donde extraer células madre sin complicaciones éticas y que se encuentren en gran cantidad, ha llevado al desarrollo de técnicas que permiten aislar, cultivar y caracterizar las células madre epiteliales extraídas de la membrana amniótica humana, la cual no acarrea problemas técnicos, éticos o morales ya que es un tejido extraembrionario de fácil acceso. Debido a que estas células son de fácil obtención, y a las ventajas que tienen en cuanto a su pluripotencia, baja inmunogenicidad y la falta de tumorigenicidad; las células madre derivadas del epitelio amniótico, pueden ser consideradas una fuente de células madre de gran utilidad en diversos campos de la bioingeniería y la terapia celular.

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) 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 epiteliales de la membrana amniótica humana, evaluando si éstas células mantienen su funcionalidad y viabilidad bajo ciertas condiciones de cultivo. Además, se diseñó un sistema de cultivo *in vitro* con el objetivo de evaluar el uso potencial de la membrana amniótica desnuda y comparar la población de células epiteliales de la membrana amniótica humana, en base a sus características morfológicas, propiedades de adhesión y expresión de algunos marcadores característicos, cuando son cultivadas sobre el estroma avascular de la membrana amniótica humana como un biosustrato tridimensional, bajo la influencia de diferentes condiciones de criopreservación.

El cultivo primario de las células epiteliales amnióticas se estableció de manera eficaz mediante la técnica de disgregación enzimática con la Dispasa, obteniéndose cultivos en monocapa donde se observó una heterogeneidad de célula constituido por 3 tipos principales de fenotipos celulares, en la que se pueden destacar células con morfología poligonal tipo epitelial, células con morfología fusiforme y células de amplio volumen citoplasmático. Las condiciones *in vitro* suministradas permitieron la adhesión, el mantenimiento y proliferación de las células epiteliales amnióticas, tanto en los cultivos como en los subcultivos, conservándose su fenotipo sin mostrar características asociadas a la senescencia. Mediante la caracterización inmunocitoquímica de los cultivos primarios y los subcultivos fue posible confirmar la presencia de células de naturaleza epitelial, indicado por la expresión de Pan-CK y E-cadherina,

Por su parte los ensayos realizados con las células epiteliales amnióticas cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica humana en fresco, criopreservada con glicerol y vitrificada, presentaron diferencias en el patrón de adhesión y crecimiento de las células. Sin embargo, el hecho de que las células epiteliales cultivadas sobre el estroma amniótico en fresco y vitrificado tengan una buena adhesión y crecimiento, además del mantenimiento de la morfología expresando los marcadores epiteliales Pan-CK y E-cadherina, nos indica que el estroma amniótico es un biosustrato tridimensional con un gran potencial para ser utilizado en los cultivos celulares.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Células Madre. Definición, clasificación y potencialidad.....	2
1.2. Factores que influyen sobre el comportamiento de las células.....	5
1.3. Sistemas de cultivo.....	8
1.4. Membrana amniótica humana: Origen, características y propiedades.....	8
1.5. Células epiteliales amnióticas.....	15
1.6. Aplicaciones de la membrana amniótica humana en la medicina regenerativa.....	17
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	21
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	27
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	28
4.1. Objetivo General.....	28
4.2. Objetivos Específicos.....	28
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	29
5.1. Material biológico.....	29
5.2. Obtención y transporte de la muestra .....	29
5.3. Aislamiento de la membrana amniótica humana.....	30
5.4. Estudio histológico de la membrana amniótica humana.....	31
5.5. Denudación de la membrana amniótica por medio de disgregación enzimática y/o agentes quelantes y obtención de las células epiteliales amnióticas para el establecimiento del cultivo primario.....	32
5.5.1. Denudación con enzimas.....	32
5.5.2. Denudación con agentes quelantes.....	34
5.6. Establecimiento de subcultivos.....	34
5.7. Caracterización morfológica e inmunocitoquímica de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.....	34
5.7.1. Observaciones periódicas al microscopio.....	35
5.7.2. Coloración histológica de rutina May Grünwald-Giemsa.....	35
5.7.3. Determinación inmunocitoquímica contra Pan-CK y E-cadherina.....	35
5.8. Criopreservación del estroma de la membrana amniótica humana.....	36
5.8.1. Glicerol.....	37
5.8.2. Vitricación.....	37

5.9. Evaluación de la criopreservación.....	37
5.10. Cultivo de las células epiteliales sobre el estroma de la membrana amniótica.....	37
5.11. Evaluación de los cultivos empleando el estroma de la membrana amniótica como biostrato tridimensional.....	39
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
6.1. Estudio histológico de la membrana amniótica humana.....	40
6.2. Evaluación histológica de la denudación de la membrana amniótica humana por medio de disgregación enzimática y/o agentes quelantes .....	41
6.3. Aislamiento de las células epiteliales amnióticas.....	42
6.4. Establecimiento de cultivos primarios y subcultivos de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.....	43
6.5. Caracterización morfológica e inmunocitoquímica de las células epiteliales de la membrana amniótica humana .....	47
6.6. Evaluación de la criopreservación.....	52
6.7. Evaluación morfológica e inmunocitoquímica de los cultivos de las células epiteliales amnióticas sobre el estroma de la membrana amniótica humana.....	53
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>62</b>
7.1. Características morfológicas de la membrana amniótica humana.....	62
7.2. Denudación de la membrana amniótica humana por medio de disgregación enzimática y/o agentes quelantes .....	63
7.3. Obtención de la membrana amniótica humana y aislamiento de las células epiteliales amnióticas....	65
7.4. Establecimiento de cultivos primarios y subcultivos de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.....	66
7.5. Caracterización morfológica e inmunocitoquímica de las células epiteliales de la membrana amniótica humana .....	69
7.6. Evaluación de la criopreservación.....	72
7.7. Evaluación morfológica e inmunocitoquímica de los cultivos de las células epiteliales amnióticas sobre el estroma de la membrana amniótica humana.....	75
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>78</b>
<b>9. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>79</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>80</b>
<b>11. APÉNDICES.....</b>	<b>109</b>

11.1. Medios y soluciones utilizadas en cultivo celular.....	109
11.1.1. Solución Buffer de Fosfato (PBS) libre de calcio y magnesio.....	109
11.1.2. Solución de Dispasa II 1,2 U/mL.....	109
11.1.3. Medio Nutritivo.....	109
11.1.4. Solución de Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,04%.....	110
11.1.5. Solución de Tripsina al 0,25%.....	110
11.1.6. Medio de Congelación.....	110
11.1.7. Solución de Equilibrio.....	110
11.1.8. Solución de Vitricación.....	110
11.1.9. Solución de Gelatina al 1%.....	111
11.2. Soluciones fijadoras.....	111
11.2.1. Solución de Formalina neutra al 10%.....	111
11.2.2. Solución de Albúmina de Mayer.....	111
<b>12. ANEXOS.....</b>	<b>112</b>
12.1. Consentimiento Informado entregado a las pacientes.....	112
12.2. Carta de aprobación para la realización del proyecto por parte del Comité de Bioética del Hospital Universitario de Caracas.....	118
12.3. Carta de aprobación para la realización del proyecto por parte del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.....	119

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Esquema simplificado de la generación de células madre embrionarias y somáticas.....	3
<b>Figura 2.</b> La placenta y sus capas.....	9
<b>Figura 3.</b> Origen del amnios.....	11
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de los estadios tempranos del desarrollo del amnios humano.....	12
<b>Figura 5.</b> Esquema representativo de las membranas extraembrionarias que rodean al feto humano.....	15
<b>Figura 6.</b> Placenta humana.....	29
<b>Figura 7.</b> Aislamiento de la membrana amniótica humana.....	30
<b>Figura 8.</b> Obtención de las células epiteliales amnióticas humanas.....	33
<b>Figura 9.</b> Sistema de cultivo empleado para el cultivo de las células epiteliales amnióticas sobre el estroma de la membrana amniótica humana.....	39
<b>Figura 10.</b> Corte longitudinal de la membrana amniótica. Coloración Hematoxilina-Eosina.....	41
<b>Figura 11.</b> Corte longitudinal de la membrana amniótica humana desnuda con Dispasa y EDTA Coloreadas con Hematoxilina-Eosina.....	42
<b>Figura 12.</b> Poblaciones celulares obtenidas del epitelio de la membrana amniótica humana. 3 días de cultivo primario.....	45
<b>Figura 13.</b> Secuencia del cultivo primario en monocapa de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.....	46
<b>Figura 14.</b> Subcultivos en monocapa de las células epiteliales de la membrana amniótica humana. Contraste de fases.....	47
<b>Figura 15.</b> Cultivo primario y subcultivos en monocapa de las células epiteliales de la membrana amniótica humana. Coloración May Grünwald-Giemsa.....	49
<b>Figura 16.</b> Cultivos primarios y subcultivos de las células epiteliales de la membrana amniótica humana. Determinación inmunocitoquímica de Pan-CK.....	50
<b>Figura 17.</b> Cultivos primarios y subcultivos de las células epiteliales de la membrana amniótica humana. Determinación inmunocitoquímica de E-cadherina.....	51
<b>Figura 18.</b> Evaluación histológica de la membrana amniótica humana completa y desnuda con Dispasa y posteriormente criopreservada. Coloración Hematoxilina – Eosina.....	53
<b>Figura 19.</b> Cultivo primario de las células epiteliales amnióticas humanas (CEMAH) sobre el estroma de la membrana amniótica humana (EMAH) fresco.....	55
<b>Figura 20.</b> Cultivo primario de las células epiteliales amnióticas humanas (CEMAH) sobre el estroma de la membrana amniótica humana (EMAH) vitrificado.....	56
<b>Figura 21.</b> Cultivo primario de las células epiteliales amnióticas humanas (CEMAH) sobre el estroma de la membrana amniótica humana (EMAH) criopreservado con glicerol.....	57
<b>Figura 22.</b> Evaluación histológicas de la membrana amniótica humana (MAH) desnuda que sirve de control.....	58

<b>Figura 23.</b> 1er subcultivo de las células epiteliales amnióticas humanas (CEMAH) sobre el estroma de la membrana amniótica humana (EMAH) vitrificada.....	59
<b>Figura 24.</b> Secciones histológicas de la membrana amniótica humana (MAH). Determinación inmunocitoquímica de Pan-CK y E-cadherina.....	60
<b>Figura 25.</b> Secciones histológicas de los cultivos de las células epiteliales amnióticas humanas (CEMAH) sobre el estroma de la membrana amniótica humana (EMAH). Determinación inmunocitoquímica de Pan-CK.....	61
<b>Figura 26.</b> Secciones histológicas de los cultivos de las células epiteliales amnióticas humanas (CEMAH) sobre el estroma de la membrana amniótica humana (EMAH). Determinación inmunocitoquímica de E-cadherina.....	62

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Expresión de marcadores de células madre.....	6
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los factores solubles.....	7
<b>Tabla 3.</b> Resumen de los tipos de citoqueratinas expresadas por las células epiteliales de la membrana amniótica humana.....	17
<b>Tabla 4.</b> Sistemas de cultivo a ensayar empleando el estroma de la membrana amniótica humana como buisustrato.....	39
<b>Tabla 5.</b> Resumen de las muestras de membrana amniótica humana procesadas.....	43
<b>Tabla 6.</b> Resumen de las evaluaciones de las diferencia en la intensidad del marcaje de las monocapas de las células obtenidas del epitelio de la membrana amniótica humana.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CD13/CD29/CD44/CD46/CD54/ CD166 CD9/CD24/CD30</b>	Marcadores de Superficie de Células Mesenquimales Amnióticas Marcador es de Superficie de Células Madre Embrionarias
<b>CD9/CD24/CD44/CD105/ CD166 CD90/CD44/CD105/CD166</b>	Marcadores de Superficie de Células Epiteliales Amnióticas Marcadores de Superficie de Células Madre Mesenquimales
<b>CEMAH</b>	Células epiteliales amnióticas
<b>CK</b>	Citoqueratina
<b>CK19</b>	Citoqueratina 19
<b>CMA</b>	Células Madre Adultas
<b>CME</b>	Células Madre Embrionarias
<b>DAB</b>	Diaminobencidina
<b>DMEM</b>	Medio Eagle Modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfoxido
<b>E-cad</b>	E-Cadherina
<b>EDTA</b>	Ácido Etildiaminotetraacético
<b>EGF</b>	Factor de Crecimiento Epidermal
<b>EMAH</b>	Estroma de la membrana amniótica humana
<b>FGF4</b>	Factor de Crecimiento Fibroblastos Tipo 4
<b>hAECs</b>	Células Epiteliales Amnióticas Humanas
<b>hAMSCs</b>	Células Mesenquimales del Estroma
<b>HBV</b>	Hepatitis B
<b>HCV</b>	Hepatitis C
<b>HLA</b>	Antígeno Leucocitario Humano
<b>HUC</b>	Hospital Universitario de Caracas
<b>IBE</b>	Instituto de Biología Experimental
<b>INF</b>	Interferón
<b>KGF</b>	Factor de Crecimiento Queratinocitos
<b>MA</b>	Membrana Amniótica
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>Nanog</b>	Factor de Transcripción Esencial y Específicos en Células Pluripotentes
<b>Oct - 4</b>	Octámeros de Proteínas de Unión
<b>Pan-CK</b>	Pan-Citoqueratina
<b>PBS</b>	Solución Buffer Fosfato
<b>PGF</b>	Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas
<b>SFB</b>	Suero Fetal de Bovino
<b>Sox - 2</b>	Factor se Transcripción Esencial y Específico en Células Pluripotentes
<b>SSEA - X</b>	Antígeno Embrionario Estadio - Especifico Tipo X

<b>Stro - 1</b>	Glicoproteínas Específicas que Reconocen Células Estromales
<b>TGF - B</b>	Factores de Crecimiento Transformadores Beta
<b>TRA - X</b>	Antígeno De Rechazo Tumoral Tipo X
<b>VIH</b>	Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida

# 1. INTRODUCCIÓN

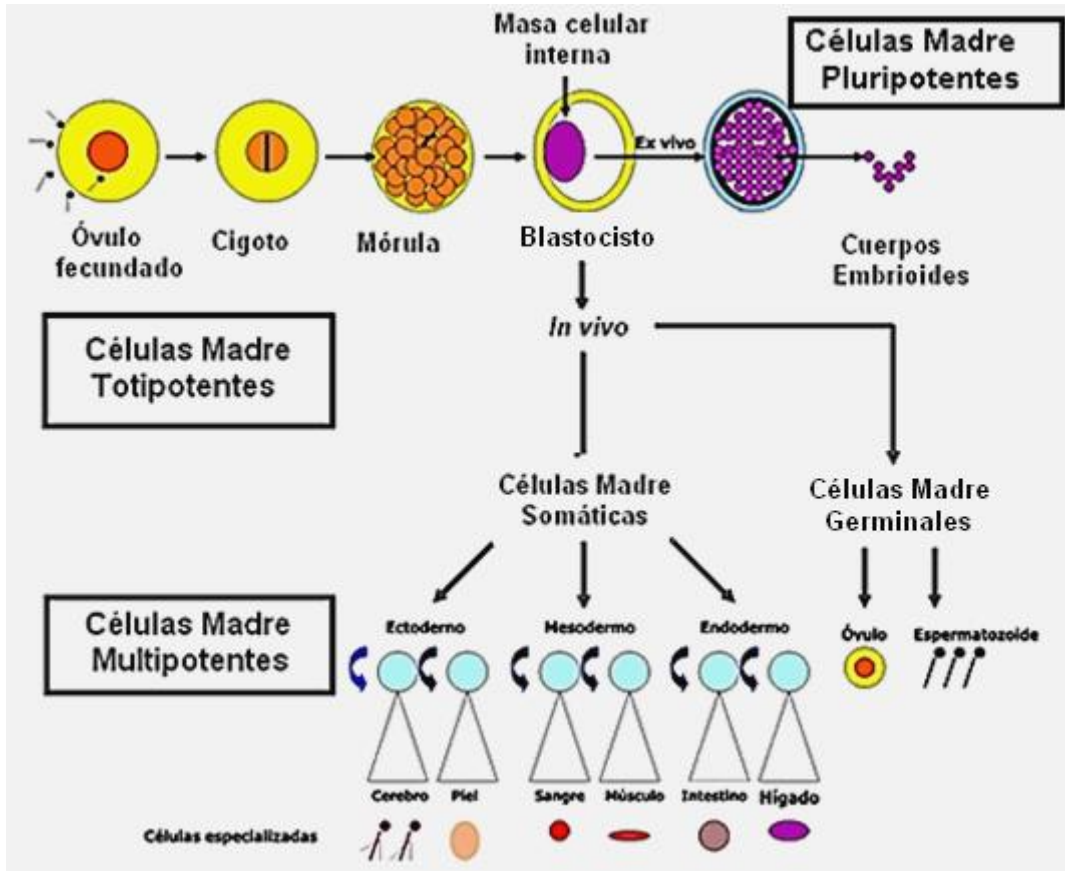
Los avances realizados en los últimos años en la investigación de la biología de las células madre han proporcionado información valiosa sobre los procesos de morfogénesis que rigen la formación tisular y de órganos, así como también los procesos que en el adulto garantizan la renovación y homeóstasis de las células capaces de regenerar los daños causados por la lesión tisular (Moraleta y col., 2004; Barrilleaux y col., 2006; Mimeault y col., 2007).

Todos estos conocimientos han despertado un gran interés no solo de la comunidad científica sino también de la sociedad en general abriendo el debate sobre la aplicación terapéutica de las células madre a través de la medicina regenerativa; esta especialidad multidisciplinaria tiene un gran potencial médico ya que fabrica sustitutos biológicos para mejorar, mantener y restaurar la función de tejidos u órganos que se han visto comprometidos por lesiones o enfermedades. Debido a su capacidad para diferenciarse hacia los distintos tipos celulares, las células madre juegan un papel clave en las estrategias desarrolladas en este campo (Evangelista y col., 2008), permitiendo obtener células de diferentes fuentes con la finalidad de ensayar técnicas de diferenciación celular *in vitro* e *in vivo* hacia diversos tipos de células especializadas que podrían utilizarse al ser inyectadas o trasplantarlas en tejidos u órganos dañado y de esta forma tratar a nivel endógeno numerosas enfermedades crónicas, degenerativas y lesiones tisulares, sin los problemas actuales asociados a los aloinjertos, trasplantes y uso de drogas terapéuticas (Bianco y Ghehrn, 2000; Minguell y col., 2001; Zuk y col., 2001; Dominic y col., 2006). Por consiguiente, se están empleando células madre obtenidas de diferentes fuentes, tales como: médula ósea, cordón umbilical, tejido adiposo y membrana amniótica con la finalidad de establecer protocolos reproducibles, ya que se ha señalado que la cantidad de células madre, fenotipos y potencialidad puede variar entre especies, lo que adiciona una variabilidad a los métodos que se encuentran en desarrollo actualmente (Terada y col., 2002; Schneider y col., 2008; Araos, 2009; Rodríguez, 2010; Meyer, 2012). Sin embargo, a pesar que estas células son una gran promesa y que hasta la fecha han sido ampliamente estudiadas, todavía existen limitaciones que deben superarse para lograr el desarrollo de tratamientos eficaces a nivel clínico.

## 1.1. Células Madre. Definición, clasificación y potencialidad.

En general, las células madre son aquellas células indiferenciadas, que tienen capacidad de auto-renovación durante toda la vida de un individuo y que bajo condiciones apropiadas o señales del microambiente pueden dar origen a células hijas capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares con características morfológicas y funcionales especializadas (Figura 1) (Ema y col., 2000; Watt y Hogan, 2000; Donovan y Gearhart, 2001; Ivanova y col., 2002). Muchos de los términos empleados para definir una célula madre, se deben al comportamiento de éstas en condiciones *in vivo* o *in vitro* (Weissmany col., 2001), de ahí que existan diversas clasificaciones. Según su potencial de diferenciación, las células madre pueden ser: totipotentes como el cigoto, las cuales tienen el potencial de diferenciarse en cualquier tipo celular y dar origen a un organismo totalmente funcional, así como también a los tejidos embrionarios (las tres capas embrionarias, el linaje germinal y el saco vitelino), y a los extraembrionarios (placenta); pluripotentes, presentes en la masa celular interna del blastocisto, las cuales pueden generar tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo), incluyendo las células germinales y el saco vitelino; multipotentes que se encuentran en los tejidos u órganos adultos y que bajo determinadas condiciones, pueden diferenciarse hacia un número limitado de tipos celulares o tejidos, restringiendo su potencial a tejidos derivados de una misma capa embrionaria. Es importante destacar que éstas células, una vez desarrolladas, se auto - renuevan durante toda la vida de un organismo, a diferencia de las células totipotentes y pluripotentes, que sólo se encuentran durante las primeras etapa embrionarias; y unipotentes, las cuales pueden dar origen únicamente a un tipo de célula. Estas se encuentran en tejidos adultos y en comparación con las células multipotentes, poseen un menor potencial de diferenciación (Raff, 2003; Prósper y col., 2006; Anzaldúa y col., 2007; Mihi y col., 2008; Ruiz y col., 2008).

Las células madre también se pueden clasificar de acuerdo a la etapa de desarrollo del organismo en las que son obtenidas, las células pueden provenir del embrión o de un organismo adulto, de ahí que se hable de células madre embrionarias y de células madre adultas (Mihi y col., 2008).



**Figura 1.** Esquema simplificado de la generación de células madre embrionarias y somáticas. Tomado de Hernández, 2004 y modificado por Navarro, 2013.

Las células madre embrionarias (CME) pueden ser obtenidas a partir de las primeras etapas de formación del embrión, específicamente de la masa celular interna del blastocisto en el estadio de embrión preimplantado (Prósper y col., 2006). El primer reporte obtenido acerca del establecimiento de líneas de células madre embrionarias humanas fue realizado por Thomson y col. (1998), quienes determinaron que éstas células pluripotentes tienen el potencial de propagarse indefinidamente, y además son capaces de diferenciarse a cualquiera de los tejidos de las tres capas embrionarias, incluyendo tejidos somáticos y células germinales, lo que permite que bajo ciertas condiciones puedan ser manipuladas *in vitro* con el fin de producir precursores de un linaje específico y contribuir así al tratamiento de diversas enfermedades. Las investigaciones realizadas sobre las células madre embrionarias humanas en los últimos años han representado un gran avance en la biología del desarrollo. Se ha demostrado que éstas células pueden ser aisladas fácilmente, ser establecidas en un corto período de tiempo y ser amplificadas mediante un cultivo de crecimiento que se considera un cultivo primario el cual conservan características similares a las de su

tejido de origen y mantienen su estabilidad cromosomal (Nagy y col., 1990; Toda y col., 2007). Sin embargo, a nivel terapéutico el uso de éstas células tiene asociado ciertos problemas éticos que pueden limitar su disponibilidad, son difíciles de controlar, y además podría presentar rechazo inmunológico luego del trasplante y riesgo de formación tumores, especialmente teratomas o teratocarcinomas (Smith, 2001; Rodríguez, 2005; Toda y col., 2007).

A diferencia de las células madre embrionarias, las células madre adultas (CMA) o somáticas son células no diferenciadas que se encuentran en tejidos y órganos adultos como por ejemplo: piel, sangre, médula ósea y su función principal es mantener la homeóstasis, además poseen la capacidad de diferenciarse a los tejidos de los distintos órganos de donde provienen, por lo que se consideran multipotentes (Irías, 2003). Éstas células actúan como un reservorio natural de células, involucradas en el mantenimiento y reparación de tejidos u órganos que se encuentran en continuo desgaste o dañados (Ruiz y col., 2008). A pesar de ser difíciles de aislar, pueden ser obtenidas directamente del paciente y por lo tanto son inmunológicamente compatibles, generalmente son difíciles de mantener en cultivo debido a que solo viven después de un número de pasajes determinados (Toda y col., 2007; Bianco y col., 2008). Sin embargo, la utilización de este tipo de células no presenta problemas éticos y además no forman teratomas.

En un principio se pensó que las células madre adultas estaban predeterminadas a diferenciarse a un tipo celular procedente de su mismo tejido de origen, sin embargo; esta idea ha sido reevaluada por varios grupos de investigadores, cuyos estudios han demostrado que las células madre de un tejido específico, si bien se desarrollan predominantemente hacia los linajes característicos del tejido al cual pertenecen, también pueden diferenciarse funcionalmente a células especializadas, procedentes de capas embrionarias distintas a las de su origen (Minguell y col., 2001; Rodríguez-Pardo, 2005). Esta condición propia de las células madre adultas, se fundamenta en la capacidad que tienen de alterar drásticamente su fenotipo en respuesta a los cambios y estímulos del microambiente local donde se desarrollan, y se le conoce como "Fenómeno de Plasticidad" (Verfaillie y col., 2002; Wagers y Weissman, 2004). Sin embargo, los mecanismos por el cual esto ocurre aún no ha sido dilucidado completamente (Hernández y Dorticós, 2004).

Actualmente se conoce que las células madre embrionarias y adultas aisladas representan una fuente de células para la medicina regenerativa. Sin embargo, a pesar de su potencial terapéutico, ambos tipos de células madre presentan una serie de limitaciones relacionadas con su aplicación clínica. Debido a toda la problemática que generan, se han buscado alternativas para encontrarlas en cantidades suficientes,

con una mayor capacidad de proliferación y diferenciación *in vitro*, además que sean incapaces de producir reacciones inmunológicas y cuya extracción no comprometa el desarrollo de un embrión. Una nueva fuente que cumple con todos estos requisitos es la placenta humana (Mihu y col., 2009), la cual ha generado un gran interés como fuente de células madre en la medicina regenerativa debido a su disponibilidad y a la plasticidad fenotípica de muchos de los tipos celulares aislados a partir de este tejido (Parolini y col., 2008; Abdulrazzak y col., 2010). En este caso no se requieren de procedimientos invasivos para la obtención de este órgano, ya que la placenta es expulsada luego del nacimiento del neonato. Además, no supone conflictos éticos, ya que es descartada luego de su obtención (Yen y col., 2005).

## **1.2. Factores que influyen sobre el comportamiento de las células**

Las características únicas de las células madre están determinadas por programas intrínsecos y por vías de señalización del nicho celular, que brinda a las células los factores necesarios para su mantenimiento, proliferación, diferenciación y metabolismo, pero tienen que estar estrictamente regulados por el microambiente de acuerdo con las necesidades fisiológicas del organismo. Schofield (1978) propuso una hipótesis en la cual las células madre se encuentran en un microambiente constituido por células vecinas, componentes de la matriz extracelular (MEC) y diversos factores que determinan su comportamiento y son los que forman el nicho celular. Esto sugiere, que el microambiente juega un papel clave en el mantenimiento del estado indiferenciado y en el control de la vía de diferenciación de las células madre a través de mecanismos epigénicos (Muraglia y col., 2000; Mitsiadis y col., 2007; Merentes, 2009).

Una célula madre después de comprometida, generalmente no va a cambiar de linaje, adquiriendo posteriormente, características propias de éste. Sin embargo, si ocurren alteraciones tempranas del ambiente inductor (antes de estar comprometidas), una célula puede cambiar su destino (Freshney, 2000). Actualmente se ha observado como el progreso del desarrollo de un organismo compromete la potencialidad de las células, encontrándose que la diferenciación celular, provoca una disminución en la potencialidad de las mismas, la cual puede ser determinada por medio de la expresión de marcadores de diferenciación específicos dependiendo del linaje que desarrollen o por medio de la expresión de proteínas específicas de CME como los altos niveles de actividad de la telomerasa, receptor del inhibidor de la leucemia, la expresión de marcadores de superficie, antígenos embrionarios específicos de los estadios tempranos del desarrollo (por ejemplo, SSEA-4), antígenos de rechazo tumoral (TRA 1-60, TRA 1-81), glicoproteínas específicas y

factores de transcripción esenciales y específicos en células pluripotentes (Nanog y Sox-2). Además, también muestran una alta expresión de octámeros de proteínas de unión 4 (Oct - 4) (Carlin y col., 2006) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Expresión de marcadores de células madre. Tomado de Dobrevá y col, 2010 y modificado por Navarro, 2013.

Tipo de Célula	Factores de Transcripción	Marcadores de superficie celular, factores secretados
<b>Células madre embrionarias</b>	Nanog, Oct-4, Rex1, Sox- 2	CD9, CD24, CD30, , c-Kit, E-cad, FGF4, Integrina $\alpha$ 6, Integrina $\beta$ 1, SSEA-3, SSEA-4, TRA 1-60, TRA 1 81, Vimentina
<b>Células epiteliales amnióticas</b>	Nanog, Oct-4, Rex1, Sox- 2	CD9, CD24, CD44, CD105/SH2, CD166, (cKit), E-cad, FGF4, Integrina $\alpha$ 5, Integrina $\alpha$ 6, Integrina $\beta$ 1, PAX6, PROM1, SSEA-3, SSEA 4, TRA 1-60, TRA 1-81
<b>Células mesenquimales amnióticas</b>	Nanog, Oct-4, Rex1, Sox- 2	CD13, CD29, CD44, CD46, CD54, CD59, CD166, CK19, (cKit), Integrina $\alpha$ 2, Integrina $\alpha$ 3, Integrina $\alpha$ 4, Integrina $\alpha$ 5, Nestina, SSEA-3, SSEA-4, Vimentina

La diferenciación de las células madre en células de distintos tejidos o de procedencia diferente, tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro*, se debe a la influencia de diversos factores solubles, los cuales pueden ser suministrados en el medio de cultivo (en el caso *in vitro*) o encontrarse en el microambiente donde son trasplantadas (en el caso *in vivo*) y son capaces de ejercer efecto en la activación de genes silenciados (Schuldiner y col., 2000; Zamudio, 2005; Calderón, 2007). Estos factores son producidos y secretados de forma natural por las células a su microambiente inmediato o por el torrente sanguíneo y pueden tener un efecto estimulador o inhibitorio, actuando sobre receptores dianas por distintas vías: endocrina, en donde participa una molécula transmisora que es secretada por una célula endocrina y es transportada por la circulación para actuar sobre una célula diana alejada; paracrina, la cual viene mediada por una molécula transmisora de señales que actúa localmente para regular el comportamiento de una célula vecina; y autocrina, en donde una célula responde a una molécula transmisora de señales que ella misma ha producido (Lodish y col., 2005). En un mismo organismo se llevan a cabo las tres vías, pero en cultivo, es decir *in vitro* solo ocurren dos vías, la paracrina y la autocrina, y son responsables, en parte, de la inducción a la diferenciación y transdiferenciación de las células.

Además, se conoce que la interacción célula – célula influye en la transcripción y en la vía de especialización de las células vecinas. La capacidad regeneradora de cualquier célula, órgano o tejido se produce por activación de las células madre que se localizan en nichos específicos. Esta activación está normalmente mediada por señales recibidas por receptores de la membrana celular y a través de transducción de señales, como: fosforilación de proteínas, segundo mensajeros, calcio, intercambio metabólico y cargas eléctricas, que promueven una secuencia de eventos estrictamente regulados por el microambiente circundante, y pueden activar o desactivar el proceso de síntesis y expresión de proteínas o el proceso de diferenciación celular (Freshney, 2000; Cascales, 2009). Esto ocurre a altas densidades celulares, ya que de ésta forma las células se encuentran más cercanas entre sí y se establece una mayor comunicación entre ellas. Esta interacción puede armonizar de alguna forma el patrón de expresión e iniciar la diferenciación hacia un determinado fenotipo celular.

También, se conoce que la interacción de las células con la matriz extracelular, es una fuente importante que influye en el comportamiento de las células a través de su composición, por medio de interacciones sinérgicas entre factores de crecimiento y moléculas de matriz y por los diferentes tipos de receptores presentes en la superficie celular, disparando señales intracelulares específicas que regulan la transcripción de genes relacionados con el crecimiento, migración, diferenciación y adhesión celular (Rodríguez, 2005; Meyer, 2012).

Estos factores solubles, entre los cuales se encuentran los fisiológicos y no fisiológicos (Tabla 2), junto con la interacción célula – célula, ya sea homóloga o heteróloga, la interacción célula – matriz extracelular, la polaridad y forma de la célula y la tensión de oxígeno, se han señalado como responsables de la regulación del proceso de diferenciación celular *in vitro* (Freshney, 2000).

**Tabla 2.** Clasificación de los factores solubles. Tomado y modificado de Freshney, 2000.

Factores Solubles Fisiológicos	Factores Solubles No Fisiológicos
Esteroides: Hidrocortisona y retinoides	Compuestos plano – polares: DMSO
Hormonas peptídicas: Melanotropina, Tirotróina e Insulina	Drogas citotóxicas; Genisteína, Mitomicina C, entre otras.
Citoquinas: Interferones. EGF, entre otros	
Vitaminas: E,K,D <sub>3</sub> entre otras	Modificadores de la señal de transducción: Ésteres de Forbol.
Minerales: Calcio	

### 1.3. Sistemas de cultivos

Para estudiar las células o tejidos *in vitro*, ya sea establecimiento de cultivos o inducciones, es necesario su mantenimiento en un sistema de cultivo apropiado que le suministre los compuestos requeridos para cumplir todas sus funciones, procurando mantener al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas, siempre tomando en cuenta lo que se desee realizar. La elección de un sistema de cultivo depende de las características de las células, su biología y la capacidad para adherirse o no a sustratos. Así, para las células anclaje – independientes se requieren cultivos en suspensión para mantenerlas *in vitro*, debido a que éstas células no expresan moléculas de adhesión, por el contrario las células anclaje – dependientes, es decir, aquellas que pueden adherirse a un sustrato, se utiliza por lo general cultivos en monocapa, los cuales consisten en sembrar sobre una superficie preferiblemente de plástico previamente tratada para facilitar el proceso de adhesión celular. Una variante de este tipo de cultivo es el cultivo sobre *feeder layer*, el cual consiste en hacer crecer una población de células deseadas sobre otra capa de células, específicamente fibroblastos, en las cuales se ha inactivado su división celular por irradiación con rayos X o por uso de Mitomicina C, en este tipo de cultivos los factores requeridos por las células deseadas son liberados por la capa de células en la que se hacen crecer, permitiendo además las interacciones necesarias para su correcto desarrollo (Freshney, 2000).

Otro tipo de cultivo es el sistema tridimensional, utilizado para inducciones ya que brinda la posibilidad de simular de alguna manera, la arquitectura del tejido *in vivo* permitiendo ubicar las células espacialmente y darles características muy parecidas al tejido nativo. Este tipo de cultivo incluye un conjunto de sustratos naturales como las matrices de colágeno tipo I, sintéticos y agregados celulares o micromasas (Freshney, 2000; Márquez y col., 2012). En el caso del epitelio, los sistemas tridimensionales permiten estudiar la proliferación, morfología e interacciones intra e inter celulares. De igual forma se puede evaluar el efecto de sustancias que pueden afectar tales interacciones. En este tipo de cultivo es posible mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen, sin embargo, la propagación celular es dependiente de las características de la biomatriz o soporte (Visconti y col., 2010).

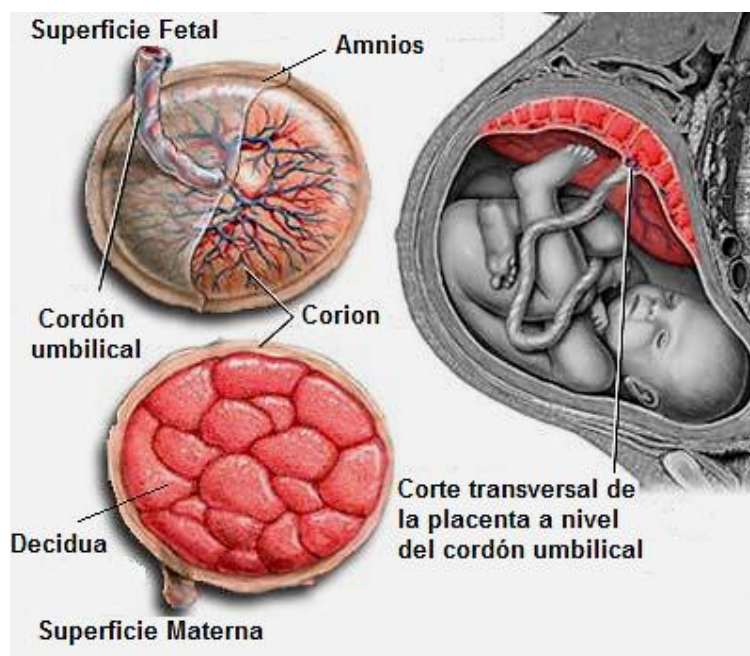
### 1.4. Membrana amniótica humana: Origen, características y propiedades

Recientemente, se demostró que la placenta también contiene células capaces de diferenciarse hacia distintos tipos celulares, y que además presentan características inmunomoduladoras que las hacen

excelentes candidatas para ser utilizadas en la terapia celular (Evangelista y col., 2007). Debido a esto, varios investigadores han centrado su atención en el estudio de la placenta humana como una importante fuente de células madre para ser aplicada clínicamente en la medicina regenerativa en el tratamiento de diferentes enfermedades (Jin y col., 2007; Kadam y col., 2010).

La placenta es un órgano materno - fetal característico de todos los mamíferos, y está implicada en el mantenimiento de la tolerancia del feto, al mismo tiempo permite la absorción de nutrientes y el intercambio gaseoso con la madre (Parolini y col., 2010). Además de proporcionar la secreción endocrina y el intercambio selectivo de sustancias solubles a través de una aposición de regiones vascularizadas entre el útero y el trofoblasto, procesa señales enviadas desde ambos compartimentos para regular las demandas fetales y el suministro materno de sustratos, asegurar sus propias demandas metabólicas y transferir sustancias de desecho fetal a la circulación materna (Von Versen - Höeynck y col., 2007; Gómez, 2009).

La placenta humana a término es redonda u oval con un diámetro de 15 – 20 cm, un espesor de 2 – 3 cm y pesa alrededor de 500 – 600 g (Miki y Strom, 2006; Gómez, 2009; Parolini y Soncini, 2011). Está formada por tres capas: el amnios, el corion y la decidua (Figura 2). Cada capa deriva de diferentes fuentes. La decidua deriva de la madre, mientras que el amnios y el corion derivan del embrión (Miki y col., 2005). Estas dos últimas forman la placa coriónica la cual se encuentra orientada hacia la cavidad amniótica (Benirschke y col., 2000).



**Figura 2.** La placenta y sus capas. Tomado de García, 2012 y modificado por Navarro, 2013

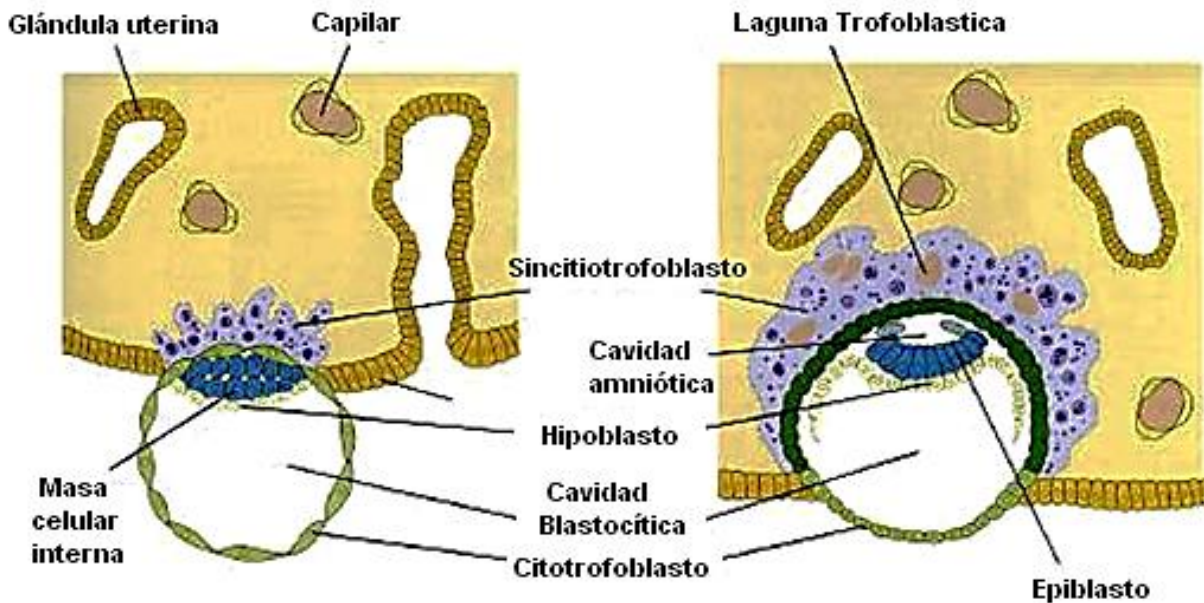
La implantación y la formación de la placenta son procesos altamente coordinados que implican interacciones entre las células maternas y embrionarias. La invasión de las células trofoblásticas en el epitelio uterino y el remodelado de los vasos sanguíneos uterinos de modo que los vasos sanguíneos maternos bañen a los vasos sanguíneos fetales, es lo que asegura que la unidad feto-placentaria en desarrollo reciba el suficiente suministro sanguíneo y que exista un transporte de nutrientes y gases eficiente, y una eliminación adecuada de las sustancias de desecho, principalmente dióxido de carbono y urea (Gilbert, 2006; Von Versen - Höeynck y col., 2007).

Al igual que la placenta, las membranas fetales facilitan el intercambio de gases y residuos, y desempeñan un papel fundamental como barrera de defensa, así como de mantenimiento del embarazo y del parto (Bourne, 1962).

La membrana amniótica (MA) o amnios, es la membrana extraembrionaria más interna de la placenta y consiste en una delgada, translúcida, elástica y semi - permeable membrana fetal que se encuentra en contacto directo con el líquido amniótico participando en el mantenimiento de la homeóstasis de éste (Díaz-Prado y col., 2011). Conjuntamente con el corion se extiende más allá de los márgenes del disco placentario para envolver al feto en la cavidad amniótica, brindarle protección durante su desarrollo y ofrecerle un ambiente de suspensión en el que pueda crecer sin distorsión por presión de las estructuras que lo rodean (Insausti y col., 2011). Se le ha atribuido la función de saco membranoso que contiene productos de la concepción y el líquido amniótico (Dobrevá y col., 2010). Es un biocontenedor ajustable que proporciona al feto un espacio limitado que permite su movimiento. Además, actúa como un filtro que protege y amortigua al feto contra infecciones, traumatismos y toxinas (Bourne, 1962; Schmidt, 1992; Calvin y Oyen, 2007; Dobrevá y col., 2010).

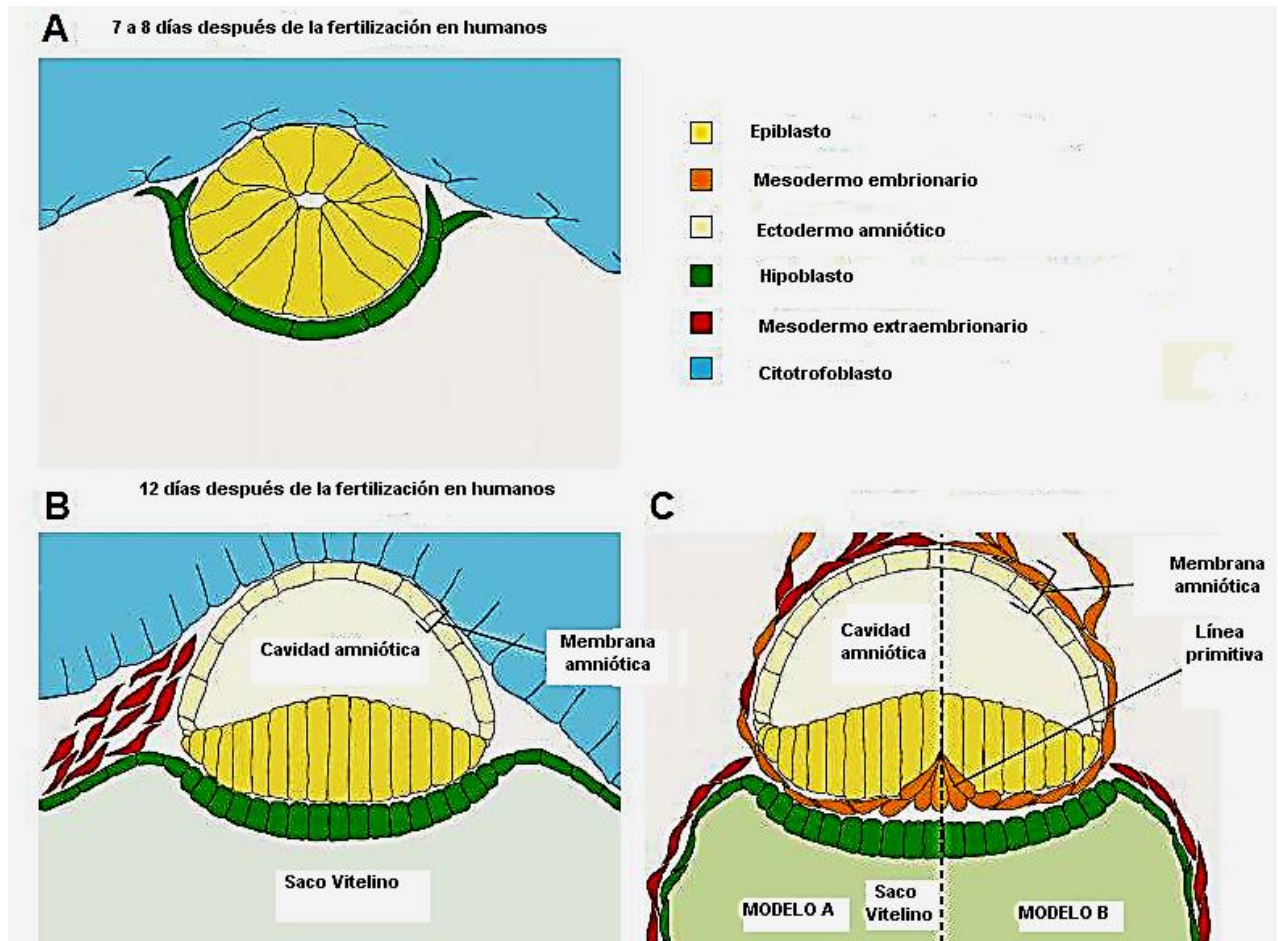
El momento y mecanismo de formación del amnios varía entre los diferentes amniotas. Estudios comparativos entre humanos y monos Rhesus han demostrado que el proceso de formación del amnios es básicamente equivalente en ambas especies. Sin embargo, la formación de la cavidad amniótica se inicia de manera diferente en ambas especies (Luckett, 1978; Dobrevá y col., 2010). El ectodermo embrionario (epiblasto) dará lugar a todos los tejidos fetales pero también al ectodermo amniótico. En humanos el desarrollo de las membranas fetales se inicia entre el sexto y octavo día después de la fertilización. Para ese momento, el blastocisto está formado por una masa de células internas, una cavidad blastocística y una pared externa de células trofoblásticas, que al unirse al endometrio proliferan rápidamente y dan origen al citotrofoblasto (capa interna) y al sincitiotrofoblasto (capa externa) (Figura 3). A medida que la implantación

progresa, la masa celular interna se diferencia en dos capas de células: una de células cilíndricas, el epiblasto, y una capa de células cuboidales adyacentes a la cavidad del blastocisto, el hipoblasto (Figura 3B) (Parolini y Soncini, 2006).



**Figura 3.** Origen del amnios. Tomado de Ilancheran y col., 2009 y modificado por Navarro, 2013.

Del epiblasto o ectodermo embrionario, aproximadamente el día ocho antes de la gastrulación, se origina el ectodermo amniótico o epitelio amniótico el cual es la primera estructura que se distingue del epiblasto inmediatamente después de la implantación (Bianchi y col., 1993; Dobrevá y col., 2010). Para su formación, las células del epiblasto comienzan a polarizarse y a reordenarse radialmente, y aparece una pequeña cavidad, llamada cavidad pro-amniótica, en el punto donde las células del epiblasto convergen radialmente (Figura 4A). Las células del epiblasto proliferan y adquieren una apariencia cuboidal en el área donde están en contacto con las células del citotrofoblasto y cilíndricas en el área de contacto con el hipoblasto. La cavidad aumenta, las células del epiblasto se incrementa y se forma la cavidad amniótica. Las células ectodérmicas que se encuentran hacia el citotrofoblasto constituyen el ectodermo amniótico o epitelio amniótico que rodea la cavidad amniótica, y el resto del ectodermo crece tangencialmente hacia el endodermo primitivo (Figura 4B) (Dobrevá y col., 2010)



**Figura 4.** Representación esquemática de los estadios tempranos del desarrollo del amnios humano. (A) Corte transversal de un embrión humano 7-8 días tras la fertilización. (B) Corte transversal de un embrión humano 12 días tras la fertilización. (C) Corte transversal de la región caudal del disco embrionario de un embrión humano a los 14 días tras la fertilización. Tomado de Dobrevy y col., 2010 y modificado por Navarro, 2013.

En humanos, el origen del mesodermo amniótico es objeto de controversias, pues se encuentra en contacto con el ectodermo amniótico a los diez o doce días después de la fertilización, y ello es incompatible con el proceso de gastrulación y la formación del mesodermo intra - embrionario que ocurre quince días después de la fertilización. Una revisión del tema realizada por Dobrevy y colaboradores en el 2010, demostró la existencia de dos modelos que podrían explicar la formación del mesodermo amniótico. Varios autores, basados en estudios morfológicos y citológicos, han señalado que el mesodermo amniótico tiene un origen extraembrionario por delaminación del citotrofoblasto. Otros, basados en la identificación de poblaciones de células localizadas en la proximidad del endodermo, señalan que proviene del hipoblasto o endodermo extraembrionario y del pequeño engrosamiento que se localiza en el margen caudal del disco

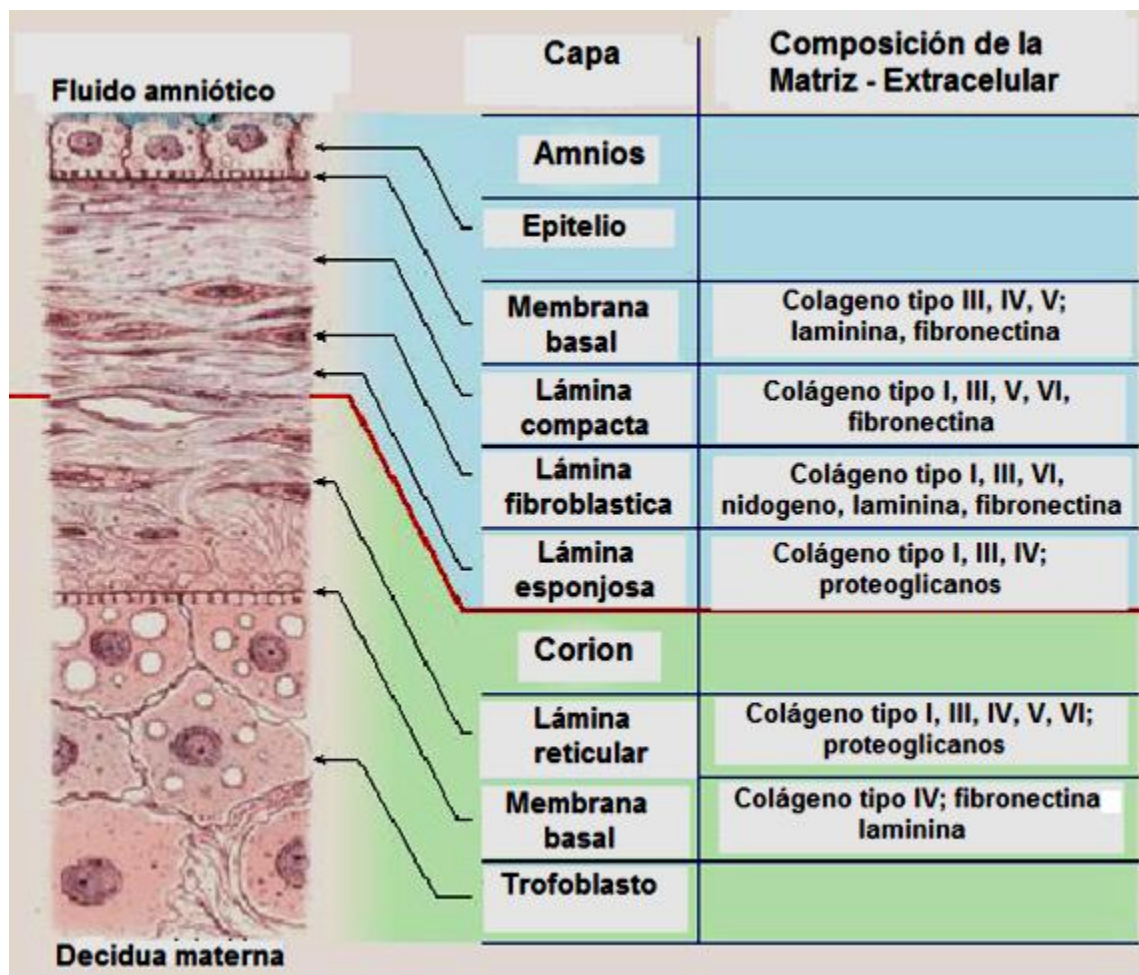
embrionario (Figura 4C, modelo A). Finalmente, los más recientes consideran que el mesodermo amniótico, al igual que el mesodermo embrionario tienen su origen en el epiblasto (Figura 4C, Modelo B).

Cualquiera que sea su origen, el mesodermo extraembrionario se organiza en un tejido conectivo que rodea la cavidad amniótica, entre la segunda y tercera semana de la fertilización, dando origen al mesodermo amniótico y coriónico en cuyo lecho se encuentra las células estromales o mesenquimales. Un origen común de las células epiteliales y las células mesenquimales derivadas del epiblasto podría explicar las similitudes que existen entre ellas. Se ha sugerido que éstas células madre pluripotentes derivadas del epiblasto embrionario se pueden mantener en el amnios incluso después del embarazo (Ilancheran y col., 2009). Por lo tanto, se ha señalado que el amnios puede retener las propiedades pluripotentes de las células tempranas del epiblasto (Miki y col., 2005).

La organización anatómica del corion y el amnios ha sido descrita en detalle por los estudios de Bourne en 1960. La membrana coriónica compone la capa externa que limita la bolsa que rodea al feto, mientras que la capa más interna de ésta, es la membrana amniótica. La misma está formada por una capa epitelial, una membrana basal gruesa, un estroma avascular, denominado mesodermo amniótico en el que se distinguen una capa compacta, una capa fibroblástica y una capa esponjosa que la separa del corion (Figura 5) (Bourne, 1962; Niknejad y col., 2008; Dobрева y col., 2010; García, 2012). La membrana amniótica no contiene vasos sanguíneos o nervios y los nutrientes que requiere son suministrados directamente por difusión desde el líquido amniótico o desde la decidua subyacente. La capa más interna y más cercana al feto, se llama epitelio amniótico, ésta forma un tapizado “simple”, continuo, ininterrumpido de células cuboidales, en contacto con el líquido amniótico que reposan sobre la membrana basal, la cual está formada por una red de fibras de colágeno tipo III y IV y glicoproteínas. La lámina compacta de la matriz estromal se encuentra adyacente a la membrana basal y constituye el esqueleto fibroso de la membrana amniótica. El colágeno de la lámina compacta es secretado por las células mesenquimales situadas en la lámina fibroblástica (Díaz-Prado y col., 2010b). La membrana basal está conectada con el mesodermo amniótico, que varía en grosor, y cuya parte proximal se distingue una capa compacta, acelular, compuesta de fibronectina, colágeno intersticial tipo I y III dispuestos en forma de haces paralelos que mantiene la integridad mecánica de la membrana amniótica, y colágeno tipo V y VI que forman conexiones filamentosas entre los colágenos intersticial y la membrana basal epitelial. La mayor fuerza ténsil del amnios es dada por los colágenos de la lámina compacta más que por el epitelio amniótico (Niknejad y col., 2008; Insausti y col., 2011). Por fuera de esta se encuentra una capa fibroblástica formada por células estromales de tipo

fibroblasto y escasos macrófagos, embebidas en una red de fibras reticulares. La capa intermedia o lámina esponjosa de la matriz estromal se encuentra adyacente a la membrana coriónica. La capa esponjosa es rica en elastina, proteoglicanos, glicoproteínas y fibras de colágeno, predominantemente tipo III, organizadas laxamente, que separa el amnios del corion (Niknejad y col., 2008; Dobрева y col., 2010). Su abundante cantidad de proteoglicanos y glicoproteínas es lo que le confiere su apariencia esponjosa en las preparaciones histológicas y además, contiene una malla no fibrilar en su mayoría de colágeno tipo III (Parry y Strauss, 1998). La presencia de proteoglicanos permite el paso del agua, facilitando el movimiento del amnios sobre el corion.

En cuanto a sus características biológicas, las células del amnios presentan funciones únicas. El epitelio amniótico funciona como cobertura, tiene actividad secretora y un intenso transporte intercelular y transcelular. La función secretoria juega un papel clave en la producción, formación e intercambio de fluidos. Además, se ha encontrado que produce diversos factores de crecimiento como por ejemplo Factores de Crecimiento Transformadores Beta (TGF- $\beta$ ), Factor de Crecimiento del Hepatocito, Factor de Crecimiento derivado de las Plaquetas (PGF), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y Factor de Crecimiento de Queratinocito (Klein y col., 1991). La membrana basal también expresa ciertos factores de crecimiento; ésta puede facilitar la migración de células epiteliales reforzando la adhesión de las células basales epiteliales, promueve la diferenciación epitelial y previene la apoptosis epitelial (Khodadoust y col., 1968). Por último, la matriz estromal tiene la propiedad de suprimir las células inflamatorias por estimulación rápida de la apoptosis y contiene varias formas de inhibidores de proteasas (Boudreau y col., 1995; Hurme y col., 1998).



**Figura 5.** Esquema representativo de las membranas extraembrionarias que rodean al feto humano. Adaptado de Parry y Srauss, 1998, tomado de Niknejad y col, 2008 y modificado por Navarro, 2013.

### 1.5. Células epiteliales amnióticas

En los últimos años la membrana amniótica ha despertado gran interés en la comunidad científica como una fuente alternativa de células madre. En el 2004, Tamagawa y col., reportaron el aislamiento de una línea de células madre pluripotentes derivadas de la membrana amniótica humana. En ella se ha demostrado la existencia de dos poblaciones celulares que muestran algunas propiedades características de las células madre. Las células epiteliales amnióticas humanas o hAECs (Human Amnion Epithelial Cells), que derivan del ectodermo embrionario y las células mesenquimales del estroma o hAMSCs (Human Amnion Mesenchymal Stromal Cells), que derivan del mesodermo embrionario (Whittle y col, 2000; Díaz - Prado y col., 2010b).

Como se ha señalado anteriormente, las hAEC, son células predominantemente cuboidales, cuya superficie apical, en contacto con el líquido amniótico, es ligeramente convexa con una serie de microvellosidades que sólo se pueden distinguir por microscopía electrónica. Estas se encuentran en contacto con la membrana basal a través de una serie de inter - digitaciones que forman uniones tipo hemidesmosomas con múltiples filamentos. El núcleo normalmente es grande, único, irregular, con uno o dos nucléolos prominentes. El citoplasma es abundante, denso y granular, y contiene numerosas vacuolas de diferentes tamaños y contenido, además poseen un sistema de canales y canalículos que parecen comunicar directamente con el espacio extracelular. Abundantes organelos, que incluyen retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Campos y Gris, 2002; Marengo y Vecchy, 2006; Muiños, 2010).

Debido a que las hAEC se originan en el epiblasto, se han considerado pluripotentes (McDonald y col., 2011). En este sentido, se han identificado en las células epiteliales amnióticas varios marcadores de superficie característicos de las células madre embrionarias (Tabla 1), tales como SSEA-4 y SSEA-3, antígenos de rechazo tumoral TRA-1-60 y TRA-1-81 y C-kit (Terada y col, 2000; Ilancheran y col, 2007; Miki y col, 2007; Toda y col, 2007; Díaz-Prado y col, 2010a). Estas células además, expresan marcadores moleculares de las células madre pluripotentes, como: Oct - 4, la proteína Sox - 2 y Nanog, estos son factores de transcripción claves para la auto-renovación y/o pluripotencia de las células (Chambers y col., 2003; Boiani y Scholer, 2005). También expresan marcadores comunes a las células madre mesenquimales como CD90, CD44, CD105 y CD166 (Wang y col., 2009), lo que sugiere que las células epiteliales amnióticas pueden compartir propiedades funcionales similares con las células madre mesenquimales.

Las células epiteliales además expresan citoqueratinas (CK) (Tabla 3) y E - cadherinas (Regauer y col., 1985; Ochsenbein-Kölbl y col., 2003; Niknejad y col., 2010). Las citoqueratinas son filamentos intermedios tipo I y II de naturaleza proteica, ricos en queratina que se encuentran en el citoesqueleto de las células epiteliales y que se utilizan como marcador para identificar las células de diferentes linajes. En cultivos en monocapa de células epiteliales amnióticas, prácticamente el 100% de las células reaccionan positivamente con anticuerpos para citoqueratina, lo que confirma su naturaleza epitelial (Miki y Strom, 2006). También se ha encontrado, que las hAEC expresan vimentina, una proteína de los filamentos intermedios tipo III, usualmente presentes en las células estromales (Sakuraguawa y col., 1996; Parolini y Soncini, 2006; Ilancheran y col., 2007; Parolini y col., 2010)

**Tabla 3.** Resumen de los tipos de citoqueratinas (CK) expresadas por las células epiteliales de la membrana amniótica humana (CEMAH)

Tipo de célula	Citoqueratinas que expresan
Células epiteliales de la membrana amniótica humana	4,5,6,7,8,10,14,13,18 y 19

Se ha demostrado que las hAEC tienen la capacidad de diferenciarse *in vitro* hacia tejidos derivados de las tres capas germinales incluyendo endodermo, ectodermo y mesodermo (Díaz-Prado y col., 2010b). En particular, pueden generar tipos celulares clínicamente relevantes, tales como cardiomiocitos, miocitos, osteocitos, adipocitos, células pancreáticas, hepatocitos, así como células neurales y astrocitos (Ilancheran y col., 2007; Miki y col., 2007). Esto sugiere que, al igual que las células madre embrionarias, las células epiteliales amnióticas pueden ser una fuente de células madre útil para la terapia celular y la medicina regenerativa (Miki y Strom, 2006). Otro aspecto que hace a las células epiteliales amnióticas humanas atractivas para posibles terapias es su baja antigenicidad, teniendo una falta o baja expresión de antígenos leucocitarios humanos, HLA clase I y II en su superficie (Sakuragawa y col., 1995). Dichas moléculas tienen la función de inducir la respuesta inmunológica lo cual explica, la baja inmunogenicidad de la membrana amniótica, dicha propiedad permite entonces reducir el riesgo de rechazo o de una reacción inmunológica al trasplante (Niknejad y col., 2008). Además, se ha señalado que la membrana amniótica tiene propiedades anti-inflamatorias, anti-bacterianas, de protección, facilita la migración epitelial, previene la apoptosis, secreta factores de crecimiento y mejora la cicatrización de heridas (Muiños, 2010).

Estas características han permitido el uso de la membrana amniótica en la ingeniería de tejidos, como sustrato para facilitar la transferencia de células tanto alogénicas como autólogas.

### **1.6. Aplicaciones de la membrana amniótica humana en la medicina regenerativa**

La ingeniería de tejidos es una ciencia que se encarga de desarrollar sustitutos biológicos con el fin de restaurar, mantener y mejorar la función de tejidos perdidos o lesionados por traumas o enfermedades, y requiere la aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y ciencias de la vida (Marler y col., 1998). Los sustratos son estructuras bidimensionales o tridimensionales que se han desarrollado con el fin de brindarles a las células una plataforma donde puedan adherirse promoviendo así la diferenciación y la

proliferación a lo largo de la formación de un nuevo tejido. Por lo tanto, el diseño y selección de los biomateriales usados como soporte es un paso importante en la bioingeniería tisular (Mano y col., 2007). Uno de los más antiguos biomateriales empleados como sustrato es la membrana amniótica. Esta se utilizó por primera vez en 1910 en el trasplante de piel (Davis, 1910). Posteriormente, se encontró que era eficaz en el tratamiento de las quemaduras, la creación de apósitos quirúrgicos, en la reconstrucción de la cavidad oral, la vejiga y la vagina, y en la reconstrucción de la superficie ocular (Fernández y col., 2005). En los últimos años ha adquirido una gran importancia debido a la capacidad que tiene para reducir la inflamación y las cicatrices, mejorar la cicatrización de heridas, y además funciona como un sustrato para la proliferación y diferenciación celular. La matriz extracelular de la membrana amniótica y sus componentes, tales como factores de crecimiento, sugieren que es un candidato excelente para utilizar como sustrato nativo en la ingeniería de tejidos (Niknejad y col., 2008). Al mismo tiempo permite reducir el tejido de granulación y cicatrices postquirúrgico, previniendo lesiones y cicatrices recurrentes. Muchos datos indican que contiene factores que tienen función de tipo antiviral como IFN (interferón), o antibacterial.

Un requisito importante para la elección de un sustrato es su biocompatibilidad, como resultado no debe producir efectos tóxicos y dañinos en el tejido vivo (Baguneid y col., 2006). Además, sus propiedades mecánicas deben incluir la permeabilidad, estabilidad, elasticidad, flexibilidad y la plasticidad para el reemplazo del tejido, que dependen básicamente de la constitución de la matriz extracelular y la membrana basal (Yang y col., 2001; Niknejad y col., 2008). Al mismo tiempo, los sustratos deben de permitir la adhesión celular y suministrar agentes biomoduladores tales como nutrientes, metabolitos, hormonas, factores de crecimiento y citoquinas (Walgenbach y col., 2001).

Para la aplicación de la membrana amniótica humana, así como también para su utilización como biosustrato de cultivo, la membrana ha sido preservada mediante diferentes métodos que incluyen el almacenamiento hipotérmico (a 4°C), liofilización, secado por congelación, gama - esterilización, preservación con soluciones crio - protectoras que contienen glicerol o DMSO y vitrificación (Von Versen - Höynck y col., 2004; Niknejad y col., 2008).

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de las características morfológicas y fisiológicas a bajas temperaturas (Ávila-Portillo y col., 2006). El comprender adecuadamente la criopreservación del material biológico es fundamental, por lo cual es relevante prestar especial atención a la conservación de tejidos, órganos y embriones para ser utilizados en investigación y en su posterior aplicación terapéutica (Shaw y col., 2000). Métodos de enfriamiento lento se han empleado usando

dimetilsulfoxido (DMSO) como crioprotector, para una amplia variedad de líneas de células madre mesenquimales establecidas a partir de médula ósea (Lee y col., 2004; Kotobuki y col., 2005), sangre de cordón umbilical (Erices y col., 2000; Lee y col., 2004) y células progenitoras hematopoyéticas (Zhao y col., 2001). Esta técnica de congelación lenta se ha desarrollado para reducir la formación de cristales de hielo y para eliminar los daños tóxicos y osmóticos mediante la exposición a bajas concentraciones de crioprotector, mientras se disminuye poco a poco la temperatura (Vajta y Nagy, 2006). Sin embargo, es difícil de eliminar por completo los daños provocados al citoplasma por la formación de hielo intracelular (Yousry y col., 2008). Alternativamente, la vitrificación, es un método de enfriamiento rápido que utiliza altas concentraciones del crio protector y altas tasas de enfriamiento. Por medio de este método se puede eliminar por completo la formación de cristales de hielo en el citoplasma de la célula durante la congelación (Kasai y Mukaida, 2004), por lo que se ha utilizado con éxito como método de conservación de ovocitos y embriones humanos (Rall y Fahy, 1985; Kuleshova y col., 1999; Cho y col., 2001; Dobrinsky, 2002) y de células mesenquimales de la membrana amniótica humana (Moon y col., 2008).

La membrana amniótica humana ha sido utilizada para reconstruir superficies oculares en el tratamiento de varias condiciones como quemaduras por químicos, deficiencias parciales de células límbicas, cicatriz ocular (Tsubota y col., 1996; Tseng y col., 1998; Azuara-Blanco y col., 1999; Chen y col., 2000). Se ha utilizado como apósito biológico en la oftalmología, cirugía plástica, dermatología y ginecología (Morton y Dewhurst, 1986; Meller y col., 2000; Rinastiti y col., 2006; Santos y col., 2005; Tejwani y col., 2007). Además, se ha reportado que la matriz extracelular del amnios humano es un medio eficaz para la regeneración de nervios periféricos y que la membrana amniótica es un sustrato biodegradable con características bioquímicas y mecánicas únicas para la regeneración del nervio (Mohammad y col., 2000; Mligiliche y col., 2002). La membrana amniótica puede ser utilizada con su estructura íntegra, ya sea con el epitelio amniótico (MA íntegra) o sin este (MA desnuda) (Niknejad y col., 2008), y en cualquiera de los casos, como MA fresca o MA preservada. La membrana amniótica desnuda sirve como un portador de condrocitos, y se ha sugerido que puede servir como una matriz de soporte para la regeneración de cartílago (Jin y col., 2007; Muiñoz, 2010) lo que sugiere su uso para la ingeniería de tejidos de cartílago. Recientemente, se ha utilizado como sustrato para la proliferación de condrocitos humanos (Díaz –Prado y col., 2011) y para el cultivo de melanocitos (Redondo y col., 2011), logrando ya su aplicación clínica en pacientes. Se ha encontrado que cuando las células epiteliales y mesenquimales amnióticas son cultivadas sobre un biosustrato creado a partir de la membrana amniótica, las células son capaces de interconectarse y

de penetrar la superficie del sustrato amniótico, sugiriendo un nuevo enfoque para la reparación de la ruptura prematura de las membranas fetales (Portmann-Lanz y col., 2007). El cultivo y siembra de células epiteliales límbicas y de queratinocitos humanos sobre la membrana amniótica desnuda es un método frecuente empleado para la reconstrucción de la superficie ocular y la reconstrucción de la piel (Fátima y col, 2006; Yang y col, 2006). Actualmente, la membrana amniótica se está utilizando como injerto en la cirugía del pterigión primario (Fernández y col., 2012), como posible fuente de células madre en la regeneración del endometrio (Amer y col., 2012), en la reconstrucción del endotelio corneal humano (Fan y col., 2012) y como sustrato para promover la expansión de queratinocitos en la reconstrucción de la estructura dérmica (Huang y col., 2012).

## 2. ANTECEDENTES

El término de células madre aparece por primera vez en un trabajo publicado por el científico ruso Alexander Maksimov en 1908, en el que postuló la existencia de células capaces de regenerarse a sí mismas y de regenerar otras células de otras partes del organismo humano (Citado en Vargas y Esquivel, 2012). Posteriormente a principio de la década de 1960, se inician los primeros estudios con células madre realizados por Till y McCulloch (1961) y más tarde por Becker y col. (1963), estos investigadores inyectaron células de la médula ósea en ratones irradiados y notaron que en el bazo de los ratones se desarrollaron nódulos en proporción al número de células de la médula ósea inyectada, demostrando que cada nódulo surgía de una sola célula de la médula y que cada una de estas era capaz de auto - renovarse indefinidamente y generar todos los tipos de células *in vivo* (Mayani, 2011). Debido a su capacidad para inducir la formación de colonias en el bazo de los ratones trasplantados, dichas células recibieron el nombre de Unidades Formadoras de Colonias en el Bazo (CFU-S, por sus siglas en inglés).

La médula ósea es la principal fuente de células madre en el adulto que permite la regeneración de muchos tejidos, suministrando una fuente de células progenitoras de dos linajes en particular que han sido ampliamente estudiadas; las del linaje hematopoyético y las células mesenquimales que soportan la estructura de la médula y otros tejidos. Las células madre mesenquimales fueron inicialmente caracterizadas entre las décadas de los años 60 y 70 con los trabajos realizados por Friedenstein y col. (1974), quienes aislaron células madre adultas de la médula ósea, refiriéndose a éstas como células adherentes de morfología fibroblastoide, capaces de auto – renovarse y diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos (Pittenger y col., 1999; Flores y col., 2006). Posteriormente estas células fueron caracterizadas por expresar antígenos de superficie como CD73, CD90 y CD105 en ausencia de marcadores hematopoyéticos (Keating, 2006; Brinchmann, 2008; Ho y col., 2008).

Paralelamente a estas investigaciones se inicia en la década de los 70 los estudios sobre la biología de las células madre embrionarias con el establecimiento de los teratocarcinomas a partir de células germinales de ratón. Posteriormente, Evans y Kaufman (1981), lograron aislar por primera vez líneas de células madre embrionarias a partir de blastocisto de ratón introduciendo el término de células madre embrionarias para distinguirlas de las células madre provenientes de teratocarcinomas y demostraron su semejanza con células derivadas de carcinomas embrionarios (Rodríguez y Cibelli, 2010). Estas líneas

pueden ser establecidas en un corto periodo de tiempo y son consideradas cultivos primarios ya que conservan características muy similares a su tejidos de origen y pueden diferenciarse en estructuras complejas bajo ciertas condiciones *in vitro* (Merentes, 1993). Thomson y col. (1998) establecieron las primeras líneas de células madre embrionarias, aisladas a partir del blastocisto humano, producto de la fertilización *in vitro*, con fines reproductivos. Los embriones fueron cultivados hasta el estadio de blastocisto logrando establecer cinco líneas celulares (H1, H7, H9 y H14), las cuales mostraron cariotipos normales y una alta actividad de la telomerasa durante los subcultivos. Además encontraron la expresión de marcadores de superficie como el antígeno embrionario estadio específico (SSEA-3 y 4), antígeno marcador de carcinoma humano embrional 1-60 y 1-80 (TRA-1-60 y TRA-1-80) y la fosfatasa alcalina.

Desde principios del siglo XX se han venido utilizando las membranas fetales para diferentes aplicaciones clínicas. Según la bibliografía, Davis (1910), fue el primero en utilizar estas membranas como soporte, demostrándose, por tanto su biocompatibilidad, específicamente para el transplante de piel. A partir de este momento se comenzó a emplear como apósito para el tratamiento de ulceraciones y quemaduras (Sabella, 1913) obteniendo una ausencia de infección en las heridas, una importante reducción del dolor y un aumento en la velocidad de reepitelización de la superficie cutánea traumatizada. Posteriormente, se aplicó la membrana amniótica en la reconstrucción de heridas y úlceras cutáneas por traumatismo o quemaduras (Robson y Krizek, 1973), como tejidos de apoyo para la reconstitución quirúrgica de diversos órganos (Trefold y col., 1979), así como también en la regeneración de tendones (Ganatra, 2009)

En el área de la oftalmología su aplicación se inicia por primera vez en 1940 por De Roth, quien utilizó las membranas fetales frescas como implante para la reconstrucción de la superficie ocular para el tratamiento de defectos conjuntivales, obteniendo éxito solo en 1 de los 6 casos en los que lo intentó. Más tarde, Sorby y Symons (1946), aplicaron la membrana amniótica preservada como recubrimiento temporal en el tratamiento de lesiones oculares por quemaduras químicas. Con esta técnica lograron resultados favorables, sin embargo, su uso fue abandonado durante la próxima década, hasta que, Kim y Teng (1995), realizaron ensayos utilizando la membrana amniótica preservada para la reconstrucción de las corneas de conejos que presentaban defectos límbicos severos, obteniendo que un 40% de las córneas podían ser reconstituidas luego del tratamiento con la membrana amniótica preservada, con lo que se reintroduce la aplicación de la membrana amniótica en oftalmología (Insausti y col., 2011).

Estudios realizados por Tejwani y col. (2007), demostraron que en lesiones químicas y debidas a quemaduras es posible restaurar la superficie conjuntival utilizando la membrana amniótica. Se pudo obtener un alivio de los síntomas y una cicatrización del defecto ocular mayor del 90%.

En relación a los cultivos celulares, se logró establecer exitosamente por primera vez en 1955 el cultivo de células proveniente del tejido amniótico humano, posteriormente se establecieron y caracterizaron cultivos primarios y líneas celulares derivadas de la membrana amniótica (Okita y col., 1983) que fueron obtenidos por disgregación enzimática con tripsina.

En 1991, Casey y col. utilizaron dos poblaciones de células madre aisladas a partir de la membrana amniótica humana, células epiteliales y células mesenquimales. Estas células fueron mantenidas en cultivo hasta alcanzar la confluencia con el fin de evaluar la síntesis de los colágenos intersticiales producido por ambos tipos celulares. Se demostró que la síntesis de colágenos intersticiales era una función de las células mesenquimales por lo que señalan que la producción de colágeno es una propiedad intrínseca, pero no exclusiva, de estas células más que de las células epiteliales (Miki y col., 2005). Se observó que la mayor actividad de síntesis para el colágeno intersticial coincide con el aumento de la densidad de células mesenquimales por unidad de superficie del amnios y disminuye al momento del término de la gestación, sugiriendo una estrecha correlación entre la densidad de células mesenquimales en el amnios y la capacidad de síntesis del colágeno intersticial.

Más tarde, se demostró la pluripotencialidad de las células epiteliales amnióticas, al crear quimeras xenogénicas *in vitro* de células epiteliales aisladas del amnios humano con células madre embrionarias de ratón, logrando establecer la contribución de las células epiteliales amnióticas a la formación de las tres capas germinales en el embrión quimérico (Tamagawa y col., 2004).

Por su parte, Miki y col. (2005), aíslan y caracterizan cultivos de células madre epiteliales provenientes de la membrana amniótica humana. Estas células fueron aisladas por disgregación enzimática y posteriormente caracterizadas mediante estudios que demostraron la presencia de marcadores de superficie comunes al de las células madre embrionaria, incluyendo marcadores de superficie específicos de los estadios tempranos del desarrollo tales como, SSEA-3 y SSEA-4 y de rechazo tumoral TRA-1-60 y TRA-1-81. Además, expresaron marcadores característicos de las células pluripotentes como Oct-4, SOX-2 y Nanog. De igual manera, basados en determinaciones inmunohistoquímicas y análisis genéticos demostraron el potencial de diferenciación *in vitro* de estas células epiteliales logrando la diferenciación neurogénica, pancreática, cardíaca y hepática.

Asimismo, Ilancheran y col. (2007) demostraron que a pesar que las células epiteliales amnióticas son pluripotentes, estas no forman teratomas o teratocarcinomas cuando son transplantados en los testículos de ratones inmunodeficientes. Además, utilizando citometría de flujo encontraron que estas células tienen una baja o falta total de expresión de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) clase IA y IIA y como consecuencia una baja inmunogenicidad por lo tanto un menor riesgo de rechazo en el trasplante (Niknejad y col., 2008).

Posteriormente, Kang y col. (2012), aislaron células epiteliales de la membrana amniótica con el fin de utilizarlas como fuente de células madre para realizar trasplantes en ratones hembras que padecían de cáncer de mama. Se observó que en los co - cultivos de las células epiteliales y células cancerígenas se inhibió el crecimiento de tumor en un 67% mientras que en aquellos casos donde solo se utilizaron las células epiteliales amnióticas se observó una reducción significativa del volumen de los tumores en un 84%, además el tratamiento no produjo efectos secundarios, sugiriendo que estas células podrían ser empleadas para desarrollar una técnica terapéutica contra el cáncer de mama.

En ese mismo año, en estudios realizados por Evron y col. (2012), cultivaron células epiteliales amnióticas capaces de diferenciarse en células que expresan marcadores característicos de las células germinales cuando son cultivadas en medio nutritivo que contiene un sustituto del suero fetal bovino, el cual es utilizado en la reproducción asistida como suplemento proteico para medios de manipulación de embriones y gametos.

Recientemente, Roh y col. (2013) utilizan las células epiteliales amnióticas con efecto terapéutico en el tratamiento de lesiones inducidas en la médula espinal de ratas. Estos investigadores, trasplantaron células epiteliales amnióticas humanas alrededor de la lesión de la médula espinal. Dos semanas después realizaron estudios de inmunohistoquímica y análisis de western blot que demostraron que el trasplante de células epiteliales amnióticas sobre las lesiones de la médula espinal puede suprimir significativamente la alodinia mecánica en ratas, es decir, el dolor producido ante un estímulo que en condiciones normales no causa dolor.

En los últimos años la membrana amniótica se ha utilizado como sustrato para su aplicación clínica en la medicina regenerativa. En este sentido, se han usado como biomatriz para el cultivo de células epiteliales de origen oral y luego transplantadas en pacientes con lesiones de la mucosa oral logrando con éxito la regeneración de tejido (Nakamura y col., 2003; Niknejad y col., 2008; Amemiya y col., 2010).

Yang y col. (2009), utilizaron la membrana amniótica humana sin el epitelio como sustituto dérmico sobre el cual se cultivaron fibroblastos y queratinocitos como alternativa para el tratamiento de quemaduras, úlceras, heridas crónicas o defectos en la piel orientados hacia la creación equivalente de piel viva, consiguiendo una epidermis bien diferenciada, estratificada y polarizada. Igualmente, se pudo confirmar la presencia de uniones mediante hemidesmosomas, lo que garantiza una asociación estable entre la epidermis y el tejido subyacente.

Más tarde, Muñoz (2010), utilizó la membrana amniótica humana como fuente de células madre y como soporte biológico en el tratamiento de la osteoartritis. Para esto usaron modelos de reparación *in vitro* empleando condrocitos, células madre mesenquimales y células epiteliales derivadas del amnios sobre la membrana amniótica humana, revelando la síntesis de un tejido de reparación fibrocartilaginoso, que mostró una buena integración con el tejido nativo. Además, los resultados revelan que la reparación era de mayor calidad cuando se usaban células madre mesenquimales derivadas de la membrana amniótica, que cuando se utilizaban condrocitos humanos, sugiriendo que esta puede ser un modelo muy útil en la reparación de las lesiones y el deterioro de la integridad del cartílago hialino y hueso subcondral y en el mejoramiento de la comprensión de los eventos moleculares implicados en la condrogénesis. En ese mismo año, Díaz y col. (2010a), utilizan la membrana amniótica humana criopreservada como soporte para la proliferación de condrocitos obtenidos a partir de cartílago articular humano, logrando ya su aplicación clínica en la reparación del cartílago hialino en pacientes con osteoartritis.

Redondo y col. (2011), demostraron que la membrana amniótica desnuda es un tejido apropiado para ser empleado como sustrato para el cultivo de melanocitos autólogos, aislados de biopsias cutáneas de las zonas pigmentadas de pacientes con vitíligo. Los melanocitos fueron cultivados durante 10 a 14 días en los medios adecuados y posteriormente transferidos a la membrana amniótica humana desnuda y trasplantado en las lesiones de dichos pacientes, quienes recibieron una exposición al sol aproximadamente durante 6 meses para estimular la proliferación de los melanocitos, obteniendo excelentes resultados de repigmentación de la piel en un 90 - 95% de los pacientes tratados.

Asimismo, Rendal y col. (2012), cultivaron células madre límbicas directamente sobre la capa epitelial y la capa corionica de la membrana amniótica humana criopreservada, obteniendo que estas no se unen a la porción corionica provocando la liberación de las células cultivadas sobre el mismo, mientras que en la capa epitelial se adhieren directamente al epitelio amniótico demostrando que la membrana amniótica humana también es un excelente sustrato para ser empleado en la reconstrucción de la superficie ocular ya

que tiene propiedades que facilitan el crecimiento de células epiteliales que pueden controlar la inflamación y cicatrización.

Huang y col. (2012), utilizan la membrana amniótica desnuda para la expansión y trasplante de queratinocitos epidérmicos. Para ello la membrana amniótica humana fue desnuda sometiéndola a varios ciclos de congelamiento y a digestión con DNasa, consiguiéndose una membrana basal intacta con buena operatividad y estabilidad. Los queratinocitos fueron cultivados sobre el sustrato biológico y trasplantados a ratones que presentaban defectos de la piel, obteniendo una epidermis similar a la piel normal, demostrando de esta forma que la membrana amniótica permite la expansión de los queratinocitos *in vitro* y permite la reconstrucción de la estructura dérmica.

Al mismo tiempo, Fan y col. (2012), cultivaron células endoteliales de la córnea humana sobre la membrana amniótica desnuda y liofilizada para la reconstrucción *in vitro* de tejido endotelial de la córnea humana para su aplicación clínica en el trasplante de córnea para el tratamiento de endoteliopatía corneal.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de nuevas fuentes de donde extraer células madre sin complicaciones éticas y que se encuentren en gran cantidad, ha llevado al desarrollo de técnicas que permiten aislar, cultivar y caracterizar las células madre epiteliales extraídas de la membrana amniótica humana, la cual no acarrea problemas técnicos, éticos o morales ya que es un tejido extraembrionario de fácil acceso. Debido a que estas células son de fácil obtención, y a las ventajas que tienen en cuanto a su pluripotencia, baja inmunogenicidad y la falta de tumorigenicidad; las células madre derivadas del epitelio amniótico, pueden ser consideradas una fuente de células madre de gran utilidad en diversos campos de la bioingeniería y la terapia celular.

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) y considerando que en nuestro país son muy poco 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 epiteliales de la membrana amniótica humana, evaluando si éstas células mantienen su funcionalidad y viabilidad bajo ciertas condiciones de cultivo. Además, se diseñó un sistema de cultivo *in vitro* con el objetivo de evaluar el uso potencial de la membrana amniótica desnuda y comparar la población de células epiteliales de la membrana amniótica humana, en base a sus características morfológicas, propiedades de adhesión y expresión de algunos marcadores característicos, cuando son cultivadas sobre el estroma avascular de la membrana amniótica humana como un biosustrato tridimensional, bajo la influencia de diferentes condiciones de criopreservación

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Utilizar la membrana amniótica humana como fuente de células madre epiteliales y como biosustrato *in vitro* caracterizando los cultivos de células epiteliales en monocapa y en la biomatriz preservada.

### 4.2. Objetivos Específicos

1. Obtener la membrana amniótica de la placenta humana y aislar las células epiteliales mediante disgregación enzimática y/o agentes quelantes, evaluando la viabilidad celular.
2. Caracterizar la membrana amniótica humana y evaluar su denudación por técnicas histológicas.
3. Establecer cultivos en monocapa de las células epiteliales aisladas y determinar las condiciones óptimas de mantenimiento y crecimiento de las células *in vitro*.
4. Caracterizar morfológicamente las células epiteliales mantenidas *in vitro* mediante técnicas de microscopía de luz, determinaciones histoquímicas e inmunocitoquímicas.
5. Criopreservar el estroma de la membrana amniótica por vitrificación y congelación para su utilización como biosustrato tridimensional.
6. Cultivar las células madre epiteliales sobre el biosustrato y caracterizarlas por medio de técnicas histológicas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Material biológico

Para el establecimiento del cultivo de células epiteliales de la membrana amniótica se utilizaron placentas humanas (n=7) de entre 38-40 semanas de gestación (Figura 6), obtenidas de la Clínica Cristóbal Rojas por el Dr. González Terán y del Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de Caracas (HUC), bajo consentimiento informado y con la aprobación del Comité de Bioética del HUC y de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela (UCV) (Ver Anexo 1).



Figura 6. Placenta humana

### 5.2. Obtención y transporte del material biológico

Para la obtención de la placenta humana, los médicos tratantes de la sala de parto de la Clínica Cristóbal Rojas y del HUC realizaron cesáreas electivas a mujeres sanas, mayores de edad, en pleno uso de sus facultades, con un embarazo normal y controlado, sin patologías placentarias y con pruebas serológicas del primer trimestre negativas (Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida - VIH, Hepatitis B - HBV, Hepatitis C - HCV y Sífilis). Una vez extraída la placenta, esta se recolectó y almacenó en envase plástico previamente esterilizados; posteriormente fueron transportadas a una temperatura de 4°C hasta el laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Facultad de Ciencias.

### 5.3. Aislamiento de la membrana amniótica humana

Para la obtención de las células de la membrana amniótica, el amnios fue separado del corion y de la placenta de forma manual y asépticamente en la campana de flujo laminar horizontal (Figura 7), haciendo una incisión seguida de un corte transversal sobre el disco placentario. La membrana amniótica fue retirada, desechando la placenta y el corion según los reglamentos del laboratorio. Seguidamente se transfirió a envases de vidrio estériles donde fue lavada con agitación unas tres veces en Solución Buffer de Fosfato (PBS. Ver apéndice 11.1.1) libre de calcio y magnesio, el cual contenía una mezcla al 2% Antibióticos-Antimicótico (Penicilina, Estreptomicina, Gentamicina y Anfotericina B). Posteriormente, fue extendida sobre gasas estériles para eliminar los restos de sangre y cortada usando tijeras finas hasta obtener secciones pequeñas (Figura 7). Las secciones se transfirieron a envases de vidrio estériles donde fueron lavadas tres veces con agitación en solución PBS y fueron sometidas a distintos tratamientos, una parte fue fijada en Formalina al 10% para su evaluación histológica.



**Figura 7.** Aislamiento de la membrana amniótica humana

#### 5.4. Estudio histológico de la membrana amniótica humana

La preparación de las muestras para su observación al microscopio óptico, se realizó en cinco pasos principales: fijación, deshidratación, aclarado, inclusión, corte y tinción. Los cortes obtenidos fueron posteriormente contrastados y observados al microscopio óptico.

Las secciones de membrana amniótica con buena integridad estructural, fueron fijadas usando Formalina al 10% (Ver apéndice 11.2.1) luego de lo cual fueron lavadas y deshidratadas en una batería creciente de etanol alcanzando de manera paulatina el etanol al 100% con dos cambios de tolueno. Posteriormente, las muestras se infiltraron en un medio de inclusión (parafina) que permitió darle un soporte suficientemente sólido al tejido para ser cortado en secciones de 5 µm de espesor en un micrótopo rotatorio marca Spencer. Los cortes obtenidos fueron colocados en portaobjetos, previamente cubiertos con una película de la Solución de Albúmina de Mayer (Ver apéndice 11.2.2). Por último, fueron desparafinados en xilol e hidratados en una batería de concentración decreciente de etanol hasta agua destilada y agua corriente. La caracterización histológica del tejido se realizó mediante la coloración de rutina Hematoxilina – Eosina.

La coloración Hematoxilina-Eosina es una técnica que consiste en una combinación de los dos colorantes. La combinación de estos dos tiñe los núcleos de azul y los citoplasmas en rosa. La Hematoxilina es un colorante básico que tiene una carga neta positiva en su parte coloreada y que tiñe los núcleos de azul oscuro mientras que la eosina es un colorante ácido que tiene una carga neta negativa en su parte coloreada (Ross y Pawlina, 2007). La Eosina es el colorante empleado en soluciones alcohólicas, que tiñe el citoplasma en diferentes tonos de rosa.

Una vez hidratadas las muestras, se procedió a contrastar los núcleos con Hematoxilina, se lavó el exceso con agua corriente y se pasaron por etanol 50% para finalmente contrastar el citoplasma con Eosina. Por último, las muestras fueron deshidratadas sumergiéndolas rápidamente en una batería creciente de etanol. Finalmente se dejaron unos minutos en xilol, para después realizar el montaje permanente en un medio resinoso (Permount) (Urbaneja y col., 1975).

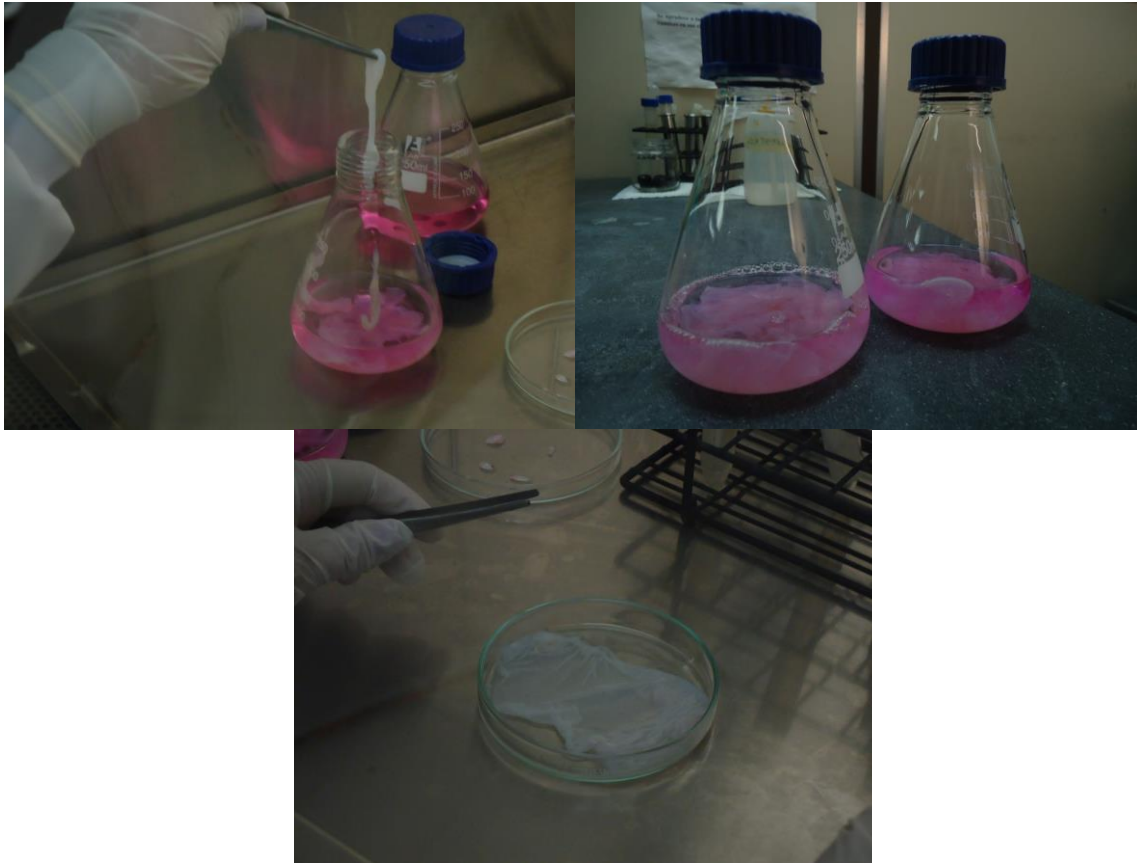
## **5.5. Denudación de la membrana amniótica por medio de disgregación enzimática y/o agentes quelantes y obtención de las células epiteliales amnióticas para el establecimiento del cultivo primario**

La estrategia utilizada para establecer el cultivo primario de células epiteliales, fue la de cultivo en monocapa.

Para la obtención de las células epiteliales de la membrana amniótica se realizó la metodología propuesta por Miki y col. (2005), con algunas modificaciones.

### **5.5.1. Denudación con enzimas**

Las secciones de tejido obtenidas fueron incubadas sin agitación con una mezcla de la enzima Dispasa II 1,2 U/mL (GIBCO. Ver apéndice 11.1.2) en base de medio Ham - F12 (GIBCO), a 4°C durante 18 horas (Bello y col., 1998) (Figura 8). Seguidamente, los trozos de tejido se transfirieron a una placa de Petri estéril, donde fueron extendidos y cortados usando tijeras finas hasta obtener secciones de 4 cm por 4 cm (Figura 8), asépticamente bajo la campana de flujo laminar vertical. Luego, con ayuda de un rastrillo se obtuvieron las células epiteliales, las cuales fueron resuspendidas en PBS y se centrifugaron en frío a 2446,66 g por 10 minutos, por dos veces. También se centrifugó la solución restante de Dispasa II que se utilizó para llevar a cabo la denudación de la membrana amniótica. Posteriormente las células, se resuspendieron en el medio nutritivo que consiste de una mezcla de medio de cultivo Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO) y Ham-F12 (GIBCO) en proporción 3:1 suplementado con 15% de Suero Fetal de Bovino (SFB, GIBCO), 1% de Aminoácidos no esenciales (GIBCO), 1% de Antibióticos – Antimicótico (GIBCO), 10 ng/mL de Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), 2mM de L-Glutamina y 1mM de Piruvato de Sodio (GIBCO), como fuente extra de energía (Ver apéndice 11.1.3). La suspensión celular resultante se agitó manualmente durante unos minutos y se filtró a través de una gasa estéril. Se realizó el conteo celular para cuantificar el número de células dentro del cultivo y la cantidad de células viables, la cual fue determinada por medio del colorante de exclusión azul tripano (B.D.H) y el uso de un hematocitómetro o cámara de Neubauer (BOECO). Finalmente, fueron sembradas aproximadamente entre 1.500.000 – 7.000.000 células en frasco o placas de cultivo estériles, las cuales fueron previamente cubiertas con una película de Gelatina al 1% (GIBCO. Ver apéndice 11.1.9).



**Figura 8.** Obtención de las células epiteliales amnióticas humanas

Es importante destacar que el protocolo empleado para el aislamiento de las células epiteliales amnióticas obtenidas de las primeras 4 muestras se realizaron de forma similar a la metodología mencionada anteriormente con algunas modificaciones, las cuales se describe a continuación.

Las células epiteliales amnióticas obtenidas por disgregación enzimática con la Dispasa II fueron lavadas varias veces con PBS y se centrifugaron en frío a 2446,66 g por 10 minutos. El taco celular obtenido fue resuspendido en una mezcla de la enzima Tripsina 0.05% - EDTA 0.02% en una proporción 1:4, e incubadas sin agitación a 37°C durante 20 minutos. Posteriormente la suspensión celular resultante se agitó manualmente durante unos minutos y se le agregó medio nutritivo para inactivar el efecto de la tripsina y se centrifugó en frío a 2446,66 g por 10 minutos. El taco celular obtenido fue resuspendido en medio nutritivo y se realizó el conteo celular. Finalmente, este fue sembrado de la misma forma y bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

Los cultivos fueron mantenidos en una incubadora a 37°C, en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se realizaron 6 lavados con PBS y se cambió el medio de manera aséptica en la campana de flujo laminar vertical a los 3 días de cultivo para así eliminar los restos de células y detritus. Los cultivos se mantuvieron hasta alcanzar la semiconfluencia con cambios de medios periódicos. Una vez que las células proliferaron cubriendo el 80% - 90% del espacio disponible del recipiente de cultivo, se realizaron los subcultivos con el fin de amplificar la población celular.

### **5.5.2. Denudación con agentes quelantes**

Las secciones de tejido obtenidas fueron incubadas sin agitación con Ácido Etilendiaminotetraacético al 0,02% (EDTA, Sigma. Ver apéndice 11.1.4) a 37°C sin agitación durante 2 horas. Para el aislamiento de las células epiteliales, se procedió de la misma forma y bajo las mismas condiciones que para la denudación realizada con la enzima Dispasa II.

### **5.6. Establecimientos de subcultivos**

Los cultivos en monocapa fueron sometidas a un proceso de tripsinización, el cual consistió en someter a las células en cultivo a la acción de una solución de Tripsina al 0,125 % (Ver apéndice 11.1.5) y EDTA al 0,02% en una proporción 1:1, incubándolos a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> por 5 minutos.

La amplificación celular se llevó a cabo en placas o frascos de cultivo, previamente tratadas con Gelatina al 1% como se mencionó anteriormente. El mantenimiento de los subcultivos se realizó de la misma forma y bajo las mismas condiciones que para los cultivos primarios, descritos anteriormente.

Es importante destacar que las células obtenidas de los cultivos primarios y de los subcultivos fueron utilizadas posteriormente en la siembra sobre el estroma de la membrana amniótica humana.

### **5.7. Caracterización morfológica e inmunocitoquímica de las células epiteliales de la membrana amniótica humana**

Una vez logrado el establecimiento y mantenimiento de los cultivos, se realizaron, entre otros; los estudios de caracterización morfológica de las células de la membrana amniótica. La caracterización

morfológica se llevó a cabo mediante observaciones al microscopio invertido de contraste de fases, coloraciones de rutina con May Grünwald – Giemsa y determinaciones inmunocitoquímicas contra Pan - citoqueratina y E - cadherina.

#### **5.7.1. Observaciones periódicas al microscopio**

Con el fin de observar las características morfológicas y el desarrollo *in vitro* de las células epiteliales amnióticas en los diferentes cultivos primarios y subcultivos, se llevaron a cabo observaciones periódicas al microscopio invertido de contraste de fases Olympus IX50, el cual se encuentra acoplado a una computadora con la cual se tomaron los registros fotográficos, digitalizando la imagen observada, usando el programa TV TURNER (Araos, 2009).

#### **5.7.2. Coloración histológica de rutina May Grünwald - Giemsa**

Para llevar a cabo la coloración, las células que crecían sobre la superficie de cultivo fueron fijadas con metanol 100% por 5 minutos. Posteriormente se añadió el colorante May Grünwald (MERCK) y se dejó actuar por unos minutos, se lavó el exceso y se colocó el colorante Giemsa (MERCK), previamente filtrado y diluido en la proporción 1:18 con agua destilada, por 20 minutos. Por último, se deshidrataron la muestra en una batería de deshidratación: acetona, acetona - xilol (2:1), acetona - xilol (1:2) y finalmente se dejó unos minutos en xilol, para luego realizar el montaje permanente en medio Permount (Urbaneja y col., 1975).

#### **5.7.3. Determinación inmunocitoquímica contra Pan-CK y E-cadherina**

Para evidenciar la expresión de proteínas específicas del linaje epitelial como la queratina y la E - cadherina, se realizaron determinaciones inmunocitoquímicas empleando el kit VECTASTAIN ABC el cual realiza una determinación indirecta. El kit hace uso de un anticuerpo secundario Biotilnado, que se une al complejo Estreptavidina – Biotina – Peroxidasa, el cual reacciona con el sustrato de la peroxidasa, el cromógeno Diaminobencidina (DAB), junto con la activación enzimática y la oxidación del cromógeno, se producirá una reacción visible por precipitación de este, que permitirá evidenciar el sitio donde se localiza el antígeno.

Para ello se utilizaron como marcadores específicos, un anticuerpo primario en contra de Pan- CK (anticuerpo monoclonal que reconoce a la CK 4, 5, 6, 8, 10, 13 y 18 aislado de la A-432 carcinoma epidérmico, dilución 1:100, Santa Cruz Biotechnology), el cual es una proteína de filamentos intermedios expresado en el citoesqueleto de las células de origen epitelial y como marcador de la morfogénesis epitelial temprana un anticuerpo contra E - cadherina (anticuerpo que reconoce los aminoácidos 600 – 707 del dominio extracelular e - cadherinas, dilución 1:100, Santa Cruz Biotechnology).

Para llevar a cabo el marcaje, las células fueron fijadas con metanol 100% por 5 minutos y luego incubadas por 10 minutos con la Solución de Peróxido de Hidrogeno al 3% para inactivar a la peroxidasa endógena. Posteriormente, fueron lavadas con PBS durante 10 minutos e incubadas durante una hora con el suero bloqueador y se incubó durante 24 horas a 4°C con el anticuerpo primario a ensayar. Se lavó con PBS y se incubó por 30 minutos con el anticuerpo secundario biotilado. Seguidamente, se lavó con PBS para incubar por 30 minutos con el complejo Estraptividina – Biotina – Peroxidasa HRP. Posteriormente, se lavó con PBS y se incubó durante 10 minutos con una solución diluida del sustrato para la peroxidasa (DAB, 1 gota de ImmPACT DAB cromógeno concentrado por cada mL de ImmPACT diluido). Finalmente, las muestras fueron lavadas con agua bidestilada desionizada, contrastados los núcleos con Hematoxilina y deshidratadas en una batería creciente de etanol con dos cambios de xilol para luego realizar el montaje en medio Permout.

Como control negativo se utilizaron muestras procesadas mediante el protocolo estándar del sistema inmunocitoquímico VECTASTAIN ABC sin añadir el anticuerpo primario. Se empleó una escala subjetiva, utilizando éstas muestras como valor negativo, definido por ningún signo positivo.

## **5.8. Criopreservación del estroma de la membrana amniótica**

Para el mantenimiento y conservación de la membrana amniótica humana se aplicaron ambos métodos, los trozos de tejidos desnudos y sin desnudar fueron extendidos y cortados sobre papel de nitrocelulosa estéril en las dimensiones requeridas para luego ser introducidas en tubos de centrifuga para su criopreservación con glicerol y/o vitrificación.

### **5.8.1. Glicerol**

Para la preservación de la membrana amniótica con Glicerol se realizó la metodología propuesta por Irfan y col. (2010), con algunas modificaciones.

Las secciones de tejido en conjunto con el papel fueron colocadas en tubos de centrifuga e incubadas en medio de congelación a 4°C, en una proporción 1:1 de DMEM: Glicerol (MERCK) (Ver apéndice 11.1.6) y guardadas en el congelador a -70°C.

### **5.8.2. Vitrificación**

Para la vitrificación de la membrana amniótica se realizó la metodología propuesta por Moon y col. (2008), con algunas modificaciones.

Las secciones de tejido en conjunto con el papel fueron colocadas en tubos de centrifuga e incubadas en una Solución de Equilibrio (Ver apéndice 11.1.7), 20% Etilenglicol en una base de PBS, por unos 10 minutos. Posteriormente, se descartó el exceso y se incubó en Solución de Vitrificación (Ver apéndice 11.1.8) a 4°C, que contenía 40% Etilenglicol, 18% Linfoprep, 0.3M Sacarosa y 20% SFB, y se sumergieron directamente en nitrógeno líquido a -180°C.

## **5.9. Evaluación de la criopreservación**

Con el fin de evaluar el efecto del procedimiento de criopreservación sobre la membrana amniótica denudada y sin denudar, las muestras fueron descongeladas en un baño de María a 37°C, se rehidrataron en solución PBS y se fijaron con Formalina al 10% para luego realizar la evaluación histológica correspondiente (Sección 5.3).

## **5.10. Cultivo de las células epiteliales sobre el estroma de la membrana amniótica**

La población homogénea de células epiteliales con morfología poligonal obtenidas del cultivo primario (Sección 5.5.1) y de los diferentes subcultivos (Sección 5.2), fueron utilizadas para la siembra sobre el estroma de la membrana amniótica siguiendo el procedimiento que se describe a continuación y

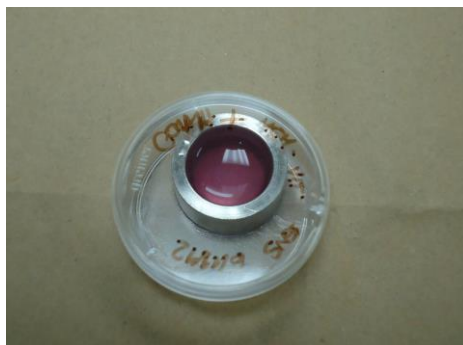
repetiéndolo para cada condición empleada para criopreservar el estroma de la membrana amniótica humana (Tabla 4).

**Tabla 4.** Cultivos de las células epiteliales amnióticas empleando el estroma de la membrana amniótica

Cultivo Tridimensional	CEMAH	CEMAH
	Cultivo Primario	Subcultivo
Estroma Fresco	✓	No se realizó
Estroma Vitrificado	✓	✓
Estroma Criopreservada	✓	No se realizó

Luego de realizar el conteo de las células viables se realizó una suspensión celular, la cual se resuspendió en medio nutritivo de la misma forma y bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Luego fueron sembradas en placas de 35 cm que contenían un anillo de acero inoxidable que sostenía y delimitaba el área del biosustrato tridimensional para cada una de las condiciones a ensayar (Figura 9), a una densidad de 2.000.000 células/placa y dejando transcurrir unos 2 días para que las células se adhirieran al sustrato biológico. Seguidamente, el medio fue extraído con mucho cuidado y se agregó medio fresco. Posteriormente, se incubó a 37 °C en atmosfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> por 10 y 14 días, con cambios periódicos de medio. Transcurrido el tiempo, las placas se fijaron con Formalina al 10% y finalmente se realizaron las evaluaciones histológicas correspondientes como se describe en la sección 5.3.

Como control negativo se utilizaron al mismo tiempo muestras de membranas amnióticas frescas recién denudadas y fijadas en Formalina al 10%, que posteriormente fueron procesadas para su evaluación histológica.



**Figura 9.** Sistema de cultivo empleado para el cultivo de las células epiteliales amnióticas sobre el estroma de la membrana amniótica humana

### **5.11. Evaluación de los cultivos empleando el estroma de la membrana amniótica como biosustrato tridimensional**

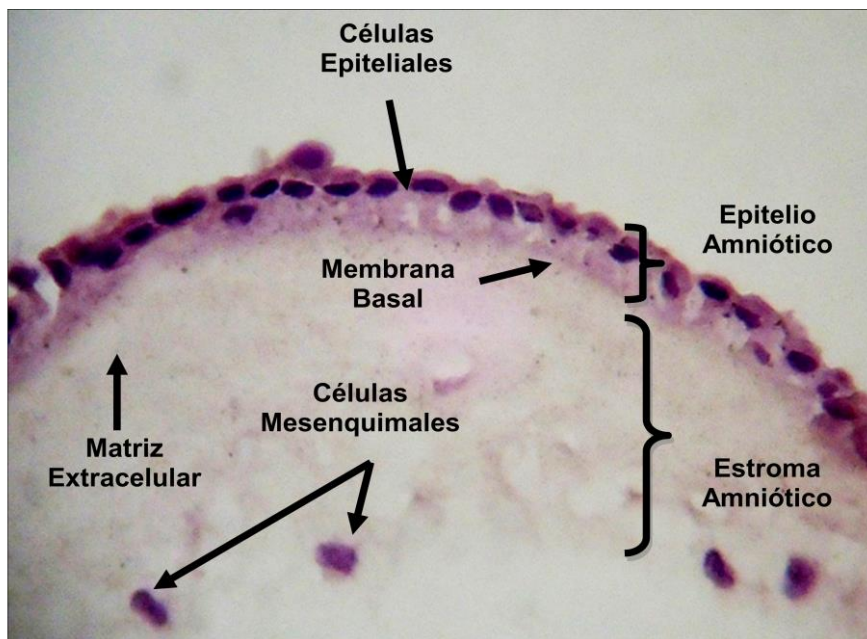
Con el fin de evaluar los cambios morfológicos que ocurrieron durante el cultivo *in vitro* de las células epiteliales sobre el estroma de la membrana amniótica, se llevaron a cabo observaciones periódicas al microscopio invertido de contraste de fases, tomándose registros fotográficos digitales. Además, se realizó la caracterización histológica e inmunocitoquímica de los cultivos de la misma forma y bajo las mismas condiciones previamente mencionadas.

## 6. RESULTADOS

A continuación expondremos una serie de resultados correspondientes a las características histológicas de la membrana amniótica humana completa y denudada, luego se muestra el establecimiento y caracterización de los cultivos de células epiteliales amnióticas humanas y por último serán presentados los resultados de la evaluación a nivel histológico e inmunohistoquímico del estroma de la membrana amniótica humana cuando es usado como biosustrato tridimensional para cultivar células epiteliales amnióticas.

### 6.1. Estudio histológico de la membrana amniótica humana

Con la finalidad de examinarlas características morfológicas de la membrana amniótica humana se realizaron secciones histológicas utilizando la coloración Hematoxilina – Eosina (Figura 10).



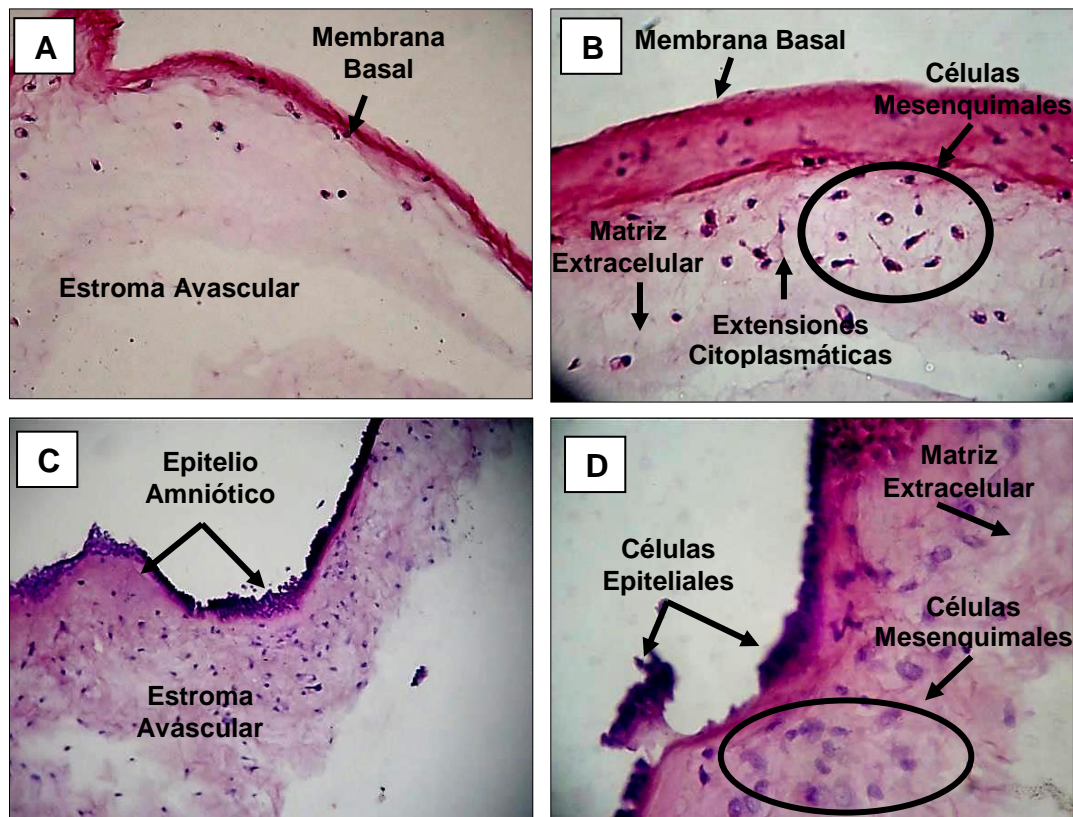
**Figura 10.** Corte longitudinal de la membrana amniótica. Coloración Hematoxilina-Eosina. Detalle de la estructura del amnios donde se puede apreciar las características morfológicas de las células epiteliales y mesenquimales que la conforman. 400X.

Se pudo apreciar (Figura 10) como el amnios está formado una capa epitelial, constituido por un tapizado simple, continuo, ininterrumpido de células cuboidales de las cuales se distingue un citoplasma medianamente basófilo con núcleos grandes, redondos, céntrico e intensamente basófilos. Esta se extiende sobre la membrana basal gruesa que separa el epitelio amniótico del estroma avascular y que presenta una

tonalidad medianamente basófila. Por debajo de esta, se encuentra adherida una capa estromal avascular, cuyo grosor puede variar no sólo entre individuos, sino también entre los diferentes estadios gestacionales. En ella se observan las células mesenquimales fusiformes que la conforman, con extensiones citoplasmáticas levemente basófilas al igual que núcleos esféricos intensamente basófilos; estas se encuentran inmersas en una matriz extracelular que las rodea y sostiene, y que además es secretada por ellas mismas.

## 6.2. Evaluación histológica de la denudación de la membrana amniótica humana por medio de disgregación enzimática y/o agentes quelantes

Con la finalidad de evaluar la efectividad del proceso de denudación de la membrana amniótica utilizando tanto, la técnica de disgregación enzimática con la Dispasa como la técnica del agente quelante, se realizaron cortes histológicos que fueron coloreados con Hematoxilina – Eosina (Figura 11).



**Figura 11.** Corte longitudinal de la membrana amniótica humana denudada con Dispasa y EDTA. Coloreadas con Hematoxilina-Eosina. A.- Membrana amniótica humana denudada con la enzima Dispasa. 250X. B.- Detalle de la membrana amniótica sin el epitelio donde se observan claramente las células mesenquimales del estroma y la matriz extracelular. 400X. C.- Membrana amniótica humana denudada con el agente quelante EDTA. 100X. D.- Detalle de la membrana amniótica donde se observa la ausencia de las células epiteliales solo en algunas zonas de la membrana. 400X.

Se observa la membrana amniótica luego de ser tratada para su denudación tanto, por medio de disgregación enzimática (Figura 11A y 11B) como por el agente quelante (Figura 11C y 11D). Se pudo evidenciar que al realizar la denudación por medio de disgregación enzimática utilizando la Dispasa se logra la remoción completa de las células epiteliales, demostrando que la denudación con la enzima es eficaz ya que rompe las uniones proteicas que existen entre las células epiteliales sin alterar la composición de la membrana basal ni la matriz extracelular, manteniendo la integridad del estroma avascular (Figura 11B). Sin embargo, tras el tratamiento con el agente quelante EDTA, se observa gran parte de las células epiteliales integradas al epitelio amniótico y solo se logra apreciar la remoción de las células epiteliales en algunas regiones de la membrana amniótica (Figura 11D).

### 6.3. Aislamiento de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.

En la tabla 5, se resumen los resultados obtenidos para el procesamiento de cada una de las muestras de membrana amniótica humana aisladas de las diferentes placentas humanas (n=7). Se observa que con cada muestra de la membrana amniótica humana utilizada, hubo un aumento progresivo en el número de células epiteliales amnióticas obtenidas, sugiriendo que la eficiencia con la cual se logra aislar las células epiteliales amnióticas fue mayor con cada procesamiento, lográndose establecer en todos los casos el cultivo primario. Sin embargo, donde se obtuvo un mayor rendimiento celular fue en las muestras 6 y 7 lo que nos indica que se logró estandarizar la metodología apropiadamente para obtener las células epiteliales amnióticas viables que se pudieron mantener hasta el segundo pasaje.

**Tabla 5.** Resumen de las muestras de membrana amniótica humana procesadas

Número de muestra (n)	Número de células obtenidas (cél)	Cultivo Primario	Subcultivo
1	660.000	+	-
2	1.720.000	+	-
3	2.600.000	+	-
4	2.120.000	+	-
5	3.320.000	+	-
6	14.320.000	+	+
7	12.000.000	+	+
<b>Promedio</b>	<b>5.248.571 ± 5.300.000</b>		

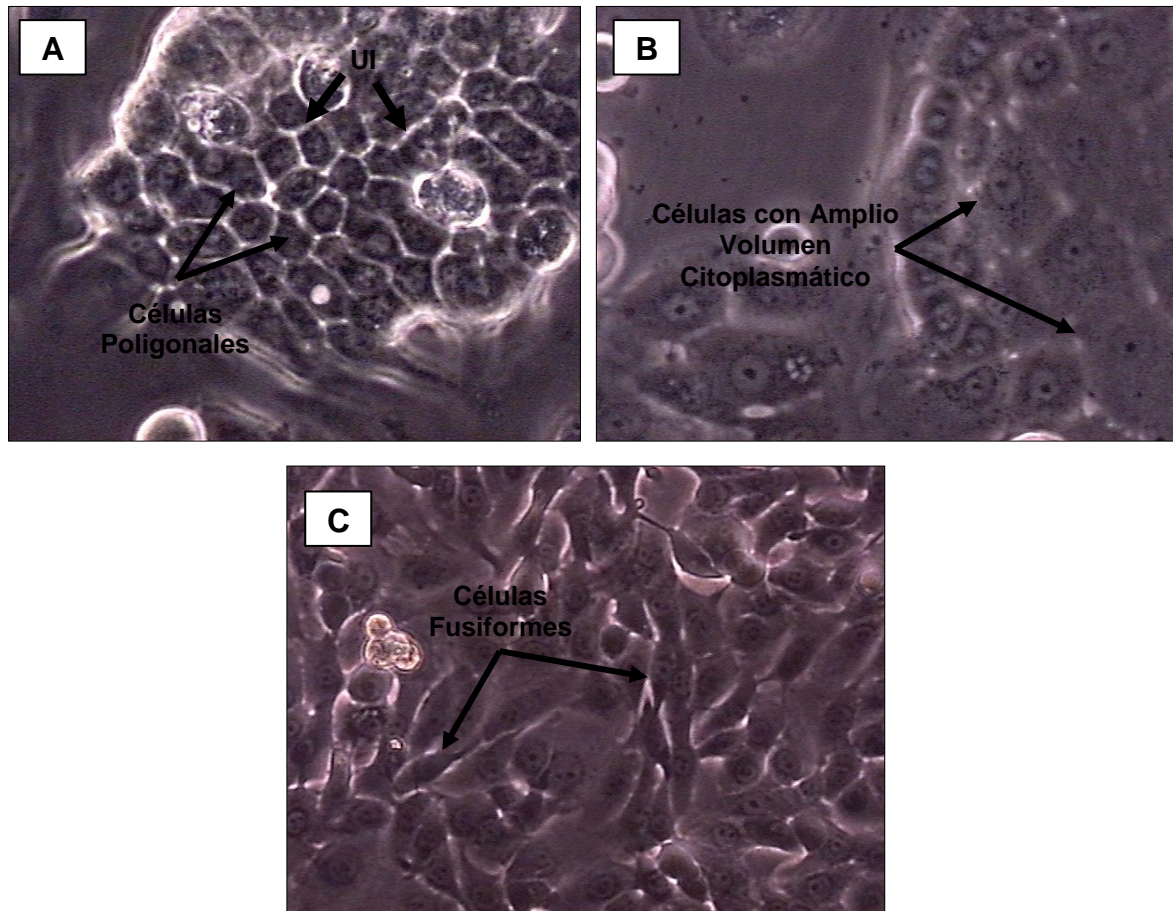
#### **6.4. Establecimiento de los cultivos primarios y subcultivos de las células epiteliales de la membrana amniótica humana**

El cultivo primario se estableció de manera eficaz utilizando la técnica de disgregación enzimática, demostrando así que las células retienen su capacidad proliferativa después de ser sometidas a la acción enzimática.

Al analizar los aspectos morfológicos de las células adherentes del epitelio de la membrana amniótica humana y su comportamiento *in vitro* en los cultivos en monocapas, se pudo observar en las etapas iniciales, una población heterogénea de células constituido por 3 tipos principales de fenotipos celulares, los cuales fueron evidenciados con microscopia de contraste de fases.

Los tipos celulares observados en los cultivos primarios se pueden agrupar de la siguiente manera:

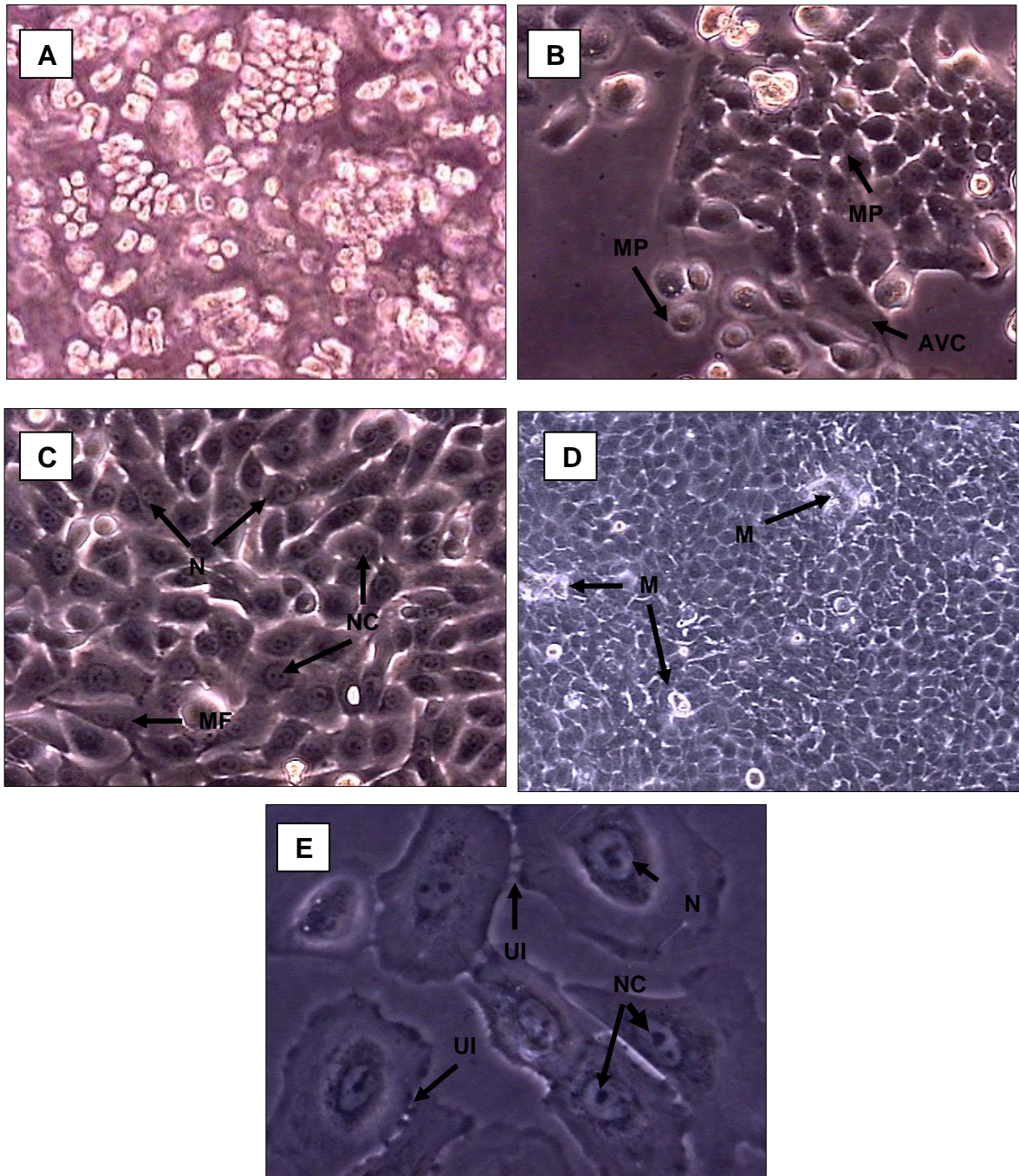
- Células con morfología poligonal tipo epitelial (MP), con un núcleo esférico, voluminoso y de ubicación central, con uno o más nucléolos, donde la relación núcleo/citoplasma es baja (Figura 12A), que crecen en mosaico y las cuales formaron colonias homogéneas en los cultivos primarios.
- Células con amplio volumen citoplasmático (AVC) (Figura 12B), con núcleo ovalado excéntrico, un nucléolo central y una gran proporción de granulaciones citoplasmáticas.
- Células con morfología fusiforme (MF), con un núcleo ovalado y central, varios nucléolos y delgadas prolongaciones citoplasmáticas (Figura 12C)



**Figura 12.** Poblaciones celulares obtenidas del epitelio de la membrana amniótica humana. 3 días de cultivo primario. Contraste de fases. 400X. **A.-** Grupo de células con morfología poligonal donde se observan las uniones intercelulares (UI), evidentes y características de las células epiteliales. **B.-** Células con amplio volumen citoplasmático. **C.-** Población heterogénea donde se aprecian células con morfología fusiforme.

En relación al comportamiento “*in vitro*” de los cultivos primarios de las células epiteliales de la membrana amniótica humana se puede observar en los primeros días de cultivo una alta proporción de células con morfología poligonal, que se encuentran formando colonias (Figura 13A y 13B), además de las células fusiformes (Figura 13C) y con amplio volumen citoplasmático (Figura 13B) que se encuentran en menor proporción.

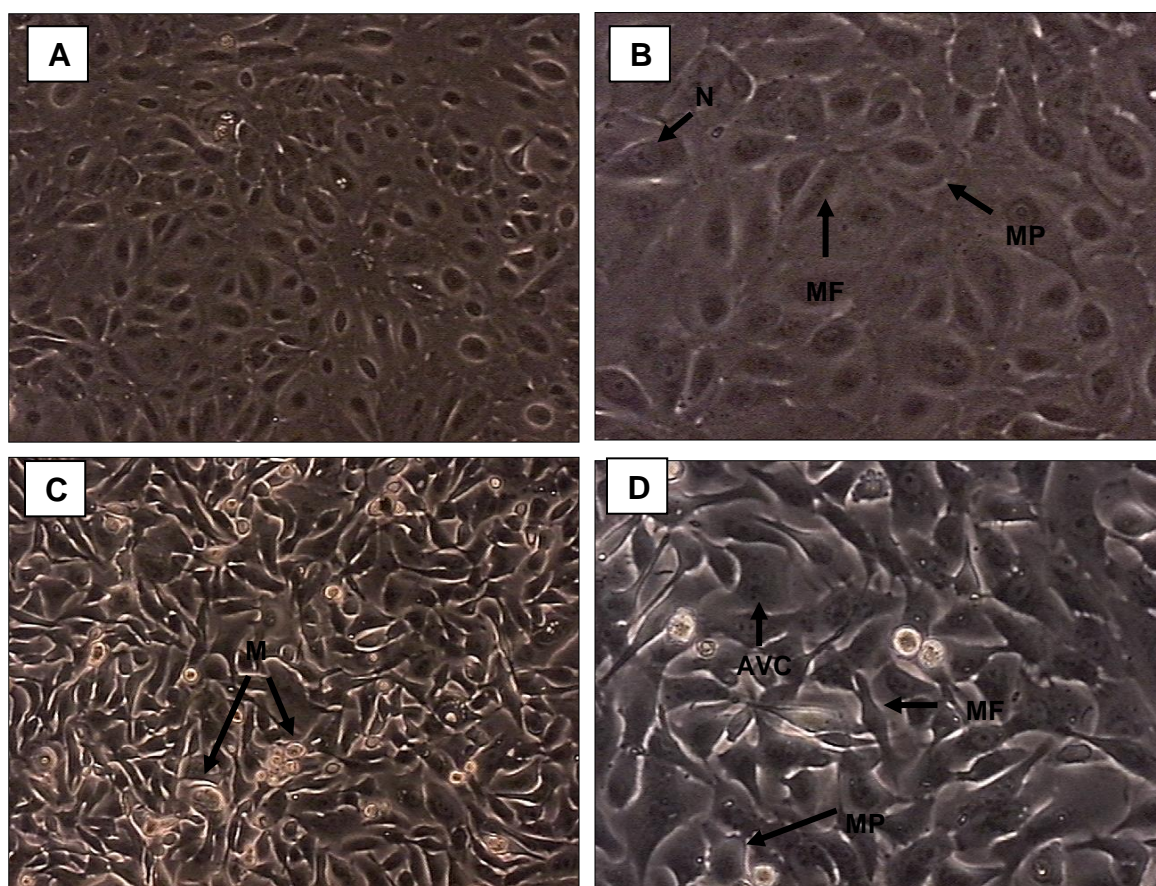
La confluencia del cultivo se alcanzó generalmente alrededor de los 8 días donde se pudo apreciar una monocapa con un patrón típico de células epiteliales en mosaico (Figura 13D), evidenciándose claramente uniones intercelulares similares a desmosomas, características típicas de este tipo celular (Figura 13E). Es importante mencionar que algunos cultivos alcanzaron la confluencia a los 17 días después de establecer el cultivo.



**Figura 13.** Secuencia del cultivo primario en monocapa de las células epiteliales de la membrana amniótica humana. Contraste de fases. **A.-** Día del establecimiento del cultivo. Se observan las células en suspensión formando algunos agregados. Contraste de fases. 400X. **B.-** Se puede apreciar una población heterogénea de células poligonales tipo epiteliales (MP) y células con amplio volumen citoplasmático (AVC). Cultivo de 3 días.200X. **C.-** Se observa detalle de las células poligonales, con núcleos esféricos (N) y múltiples nucléolos (NC) y algunas células con morfología fusiforme (MF). Cultivo de 6 días. 200X. **D.-** Los cultivos celulares han alcanzado la confluencia manteniendo su fenotipo celular. Se observan numerosas células en mitosis (M). Cultivo de 8 días. 100X. **E.-** Detalle de las células similares a epiteliales donde se observa los núcleos (N), nucléolos (NC) y las uniones intercelulares (UI) y una región perinuclear más densa que el resto del citoplasma. Cultivo de 8 días. Contraste de fases. 400X

Una vez alcanzada la confluencia se realizaron los subcultivos, en los cuales se sigue manteniendo los 3 fenotipos celulares que se observaron en los cultivos primarios sin rasgos aparentes de diferenciación y de senescencia (Figura 14).

Las condiciones *in vitro* suministradas a los cultivos primarios, permitieron la adhesión, proliferación y mantenimiento a mediano plazo de células poligonales del epitelio de la membrana amniótica, lográndose mantenerlas hasta el 2<sup>do</sup> pasaje, conservando su fenotipo sin mostrar características morfológicas asociadas a la senescencia.



**Figura 14.** Subcultivos en monocapa de las células epiteliales de la membrana amniótica humana. Contraste de fases. **A.-** Panorámica donde se observan células con morfología similar poligonal. 1<sup>er</sup> subcultivo, 3 días de cultivo. 200X. **B.-** Detalle de la población de células con morfología poligonal (MP) con núcleos esféricos (N) localizados en el centro, también se observan algunas células con morfología fusiforme (MF). 1<sup>er</sup> subcultivo, 5 días de cultivo. 100X. **C.-** Se observan numerosas células en mitosis (M). 2<sup>do</sup> subcultivo, 3 días de cultivo. 200X. **D.-** Detalle de las células donde se puede observar la morfología poligonal, redondeada y similar a epiteliales (MP), también se observan algunas células con morfología fusiforme (MF) y de amplio volumen citoplasmático (AVC). 2<sup>do</sup> subcultivo, 5 días de cultivo. 200X.

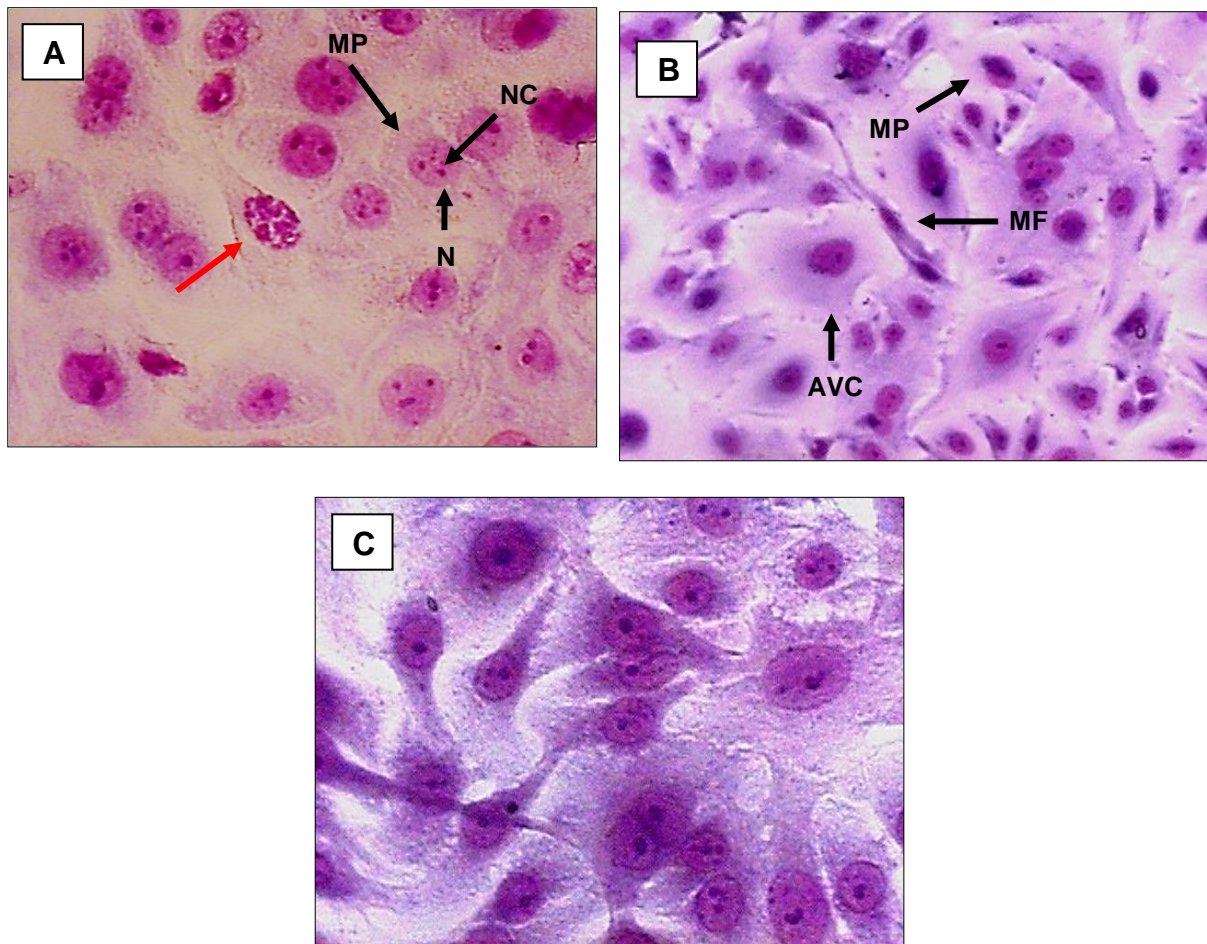
Es importante destacar la presencia de numerosas células en mitosis que se identifican por los rebordes citoplasmáticos refringentes, tanto en los cultivos primarios (Figura 13C) como en los subcultivos (Figura 14C).

### **6.5. Caracterización morfológica e inmunocitoquímica de las células epiteliales de la membrana amniótica humana**

Una vez logrado el establecimiento y el mantenimiento de los cultivos, se realizaron, entre otros; los estudios morfológicos de las células a través de la coloración de rutina May Grünwald – Giemsa, la cual nos permitió visualizar con más detalle los componentes ácidos y básicos de los 3 fenotipos celulares presentes en los cultivos primarios y subcultivos de las células epiteliales de la membrana amniótica humana (Figura 15), esto es, células poligonal tipo epitelial (MP), células fusiformes tipo fibroblasto (MF) y células con amplio volumen citoplasmático (AVC), predominando las primeras a medida que avanzaban los días de cultivo pero sin dejar estar presentes los otros tipos celulares.

En las figuras 15A, se puede apreciar una población de células con morfología poligonal, donde se evidencian el citoplasma homogéneo con núcleos esféricos y levemente basófilos localizados en la parte central, prominentes con uno o más nucléolos intensamente basófilos.

En relación a las células con morfología fusiforme el citoplasma es ahusado levemente basófilo, núcleos ovalados, prominentes, localizados en la región más engrosada del citoplasma y en cuyo interior se encuentran múltiples nucléolos (Figura 15B), mientras que las células con amplio volumen citoplasmático, las cuales poseen una morfología irregular (Figura 15B y 15C) presentan una coloración citoplasmática moderadamente basófila con núcleos esféricos, excéntricos y nucléolos intensamente basófilos.

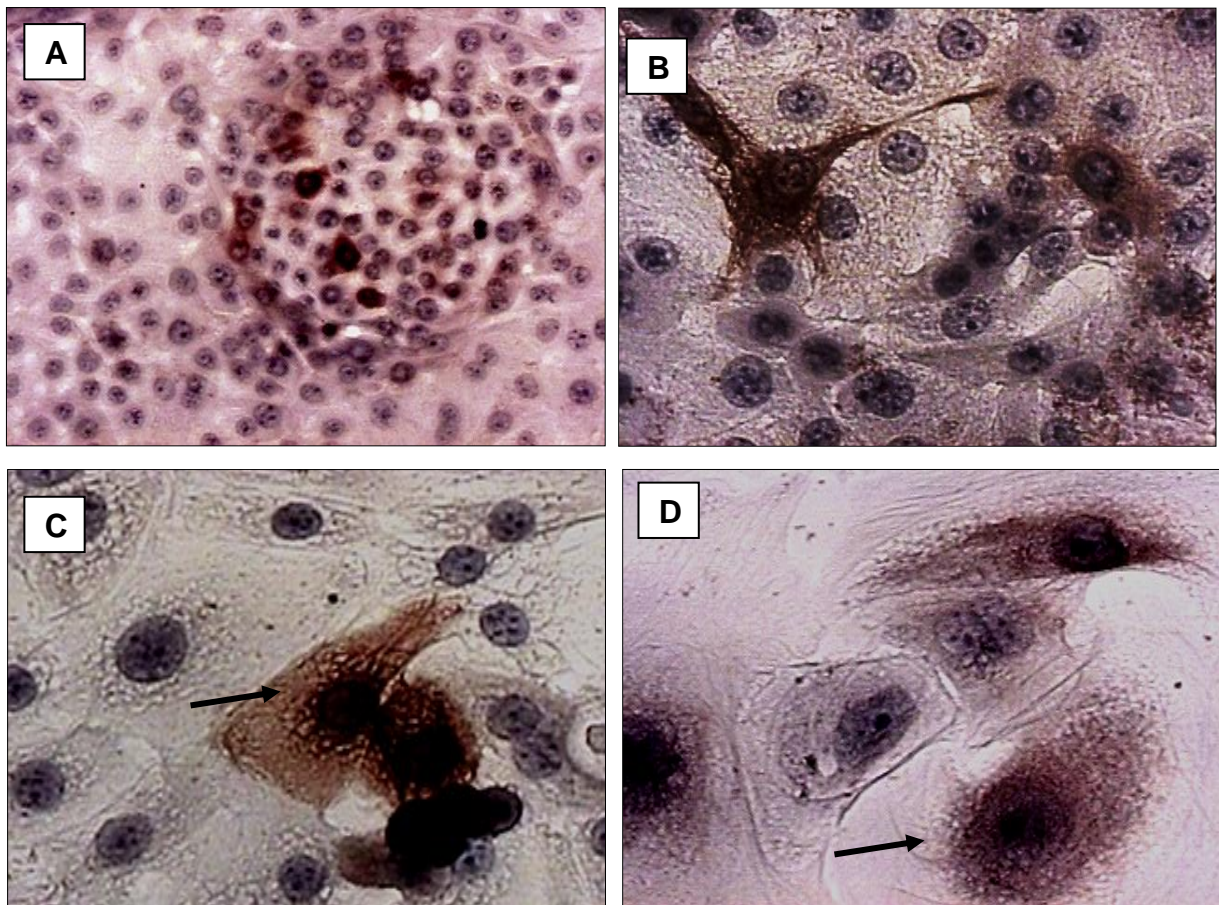


**Figura 15.** Cultivo primario y subcultivos en monocapa de las células epiteliales de la membrana amniótica humana. Coloración May Grünwald-Giemsa. **A.-** Detalle de las células poligonales (MP) donde se aprecia el citoplasma homogéneo, el núcleo (N) levemente basófilo con uno o más nucléolos (NC), y una célula en profase (→). Cultivo primario, 17 días de cultivo. 400X. **B.-** Población donde se observan los 3 tipos celulares. 1er subcultivo, 16 días de cultivo. 200X. **C.-** Detalle de las células. 2do subcultivo, 3 días de cultivo. 400X

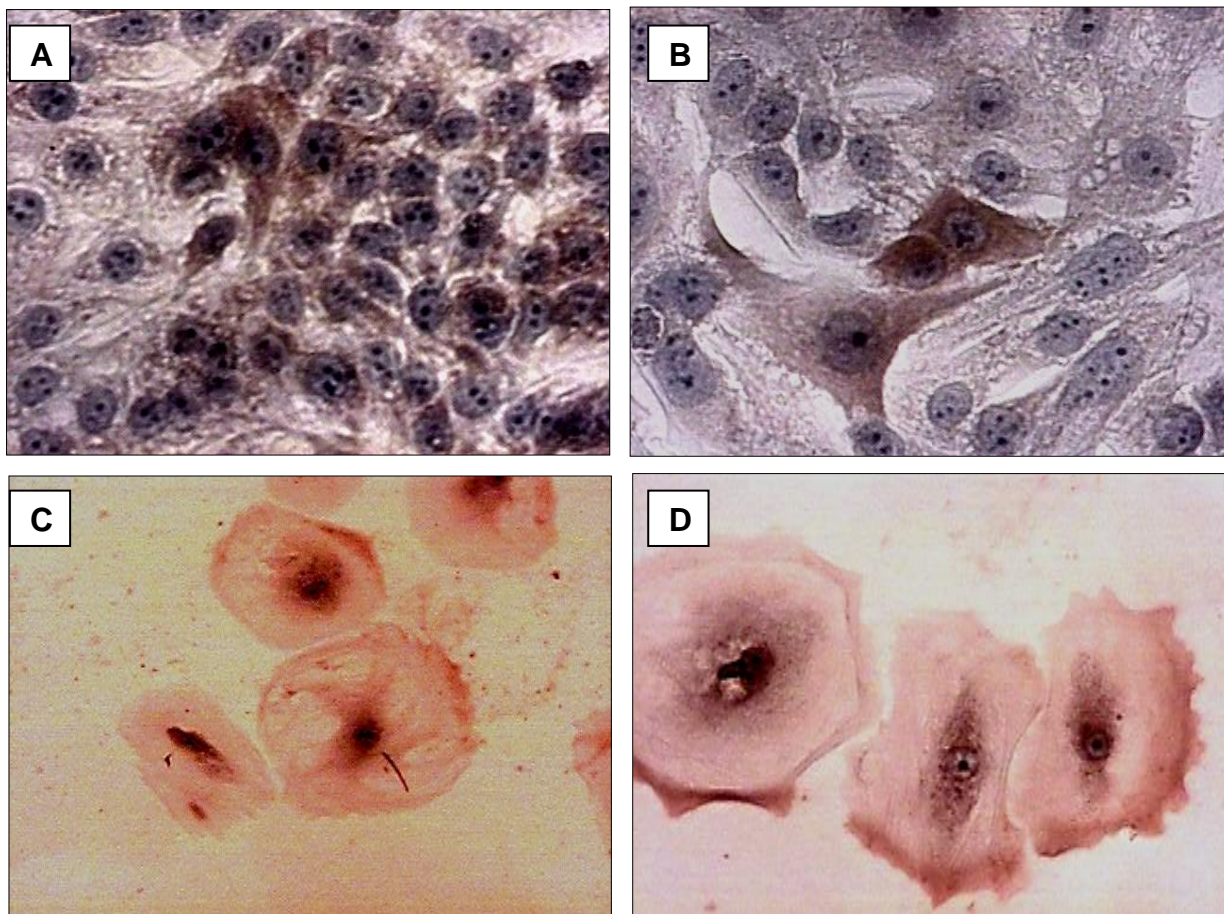
La caracterización inmunocitoquímica de estas células se realizó tanto, en los cultivos primarios como en los subcultivos, mediante un inmunomarcaje de las proteínas específicas del linaje epitelial, como la expresión de citoqueratinas y E-cadherinas. Se observan células aisladas a partir del epitelio de la membrana amniótica humana que resultaron positivas a la expresión de Pan-CK (Figura 16) y E-cadherinas (Figura 17), tanto en los cultivos primarios como en los subcultivos en distintas intensidades de marcaje desde pardo claro hasta marrón oscuro. Se pudo apreciar que la expresión de la Pan-CK se localizó tanto en el citoplasma (Figura 16B y 16C) como en la zona perinuclear (Figura 16D). En general, se evidenció que más del 90% de las células reaccionaron positivamente con el anticuerpo para Pan-CK, confirmando la naturaleza epitelial de estas células y demostrando que no hubo contaminación con otros tipos celulares, tales como fibroblastos mesenquimales u otro tipo de células de origen no epitelial. Por otro lado, la mayoría

de las células expresan la E-cadherina a nivel del citoplasma y en los sitios de interacción celular en los cultivos primarios (Figura 17B y 17C), mientras que en los subcultivos la expresión se localizó más hacia la periferia de las células específicamente en ciertas regiones de la membrana celular (Figura 17D y 17E).

Es importante mencionar que se realizaron los controles para ambas determinaciones y resultaron negativos.



**Figura 16.** Cultivos primarios y subcultivos de las células epiteliales de la membrana amniótica humana. Determinación inmunocitoquímica de Pan-CK. **A.-** Se observan células intensamente positivas con diferentes intensidades de marcaje a Pan-CK. Cultivo primario, 8 días de cultivo. 200X. **B.-** Detalle donde se observan algunas células que expresan intensamente Pan-CK. Cultivo primario, 8 días de cultivo. 400X. **C.-** Células positivas (→) a Pan-CK. 1<sup>er</sup> subcultivo, 5 días de cultivo. 400X. **D.-** Células que expresan levemente Pan-CK en el citoplasma. 2<sup>do</sup> subcultivo, 5 días de cultivo. 400X.



**Figura 17.** Cultivos primarios y subcultivos de las células epiteliales de la membrana amniótica humana. Determinación inmunocitoquímica de E-cadherina. **A.-** Se observan células que expresan E-cad en las uniones celulares y a nivel del citoplasma. Cultivo primario, 8 días de cultivo. 200X. **B.-** Detalle donde se observan algunas células que expresan intensamente E-cad. Cultivo primario, 8 días de cultivo. 400X. **C.-** Se observan células que expresan E-cad a nivel de la periferia y en el citoplasma. 1<sup>er</sup> subcultivo, 16 días de cultivo. 100X. **D.-** Grupo de células que expresa un fuerte marcaje para E-cad hacia su periferia. 2<sup>do</sup> subcultivo, 5 días de cultivo. 400X.

En la tabla 4, se resumen los resultados de la caracterización inmunocitoquímica realizada a los cultivos en monocapas de las células adherentes del epitelio de la membrana amniótica humana. El porcentaje de células positivas disminuyó en los subcultivos en relación al cultivo primario.

La inmunocitoquímica en contra de Pan-CK y E-cadherina, permitió corroborar la naturaleza epitelial de estas células en cultivo, incluso después de los diferentes subcultivos.

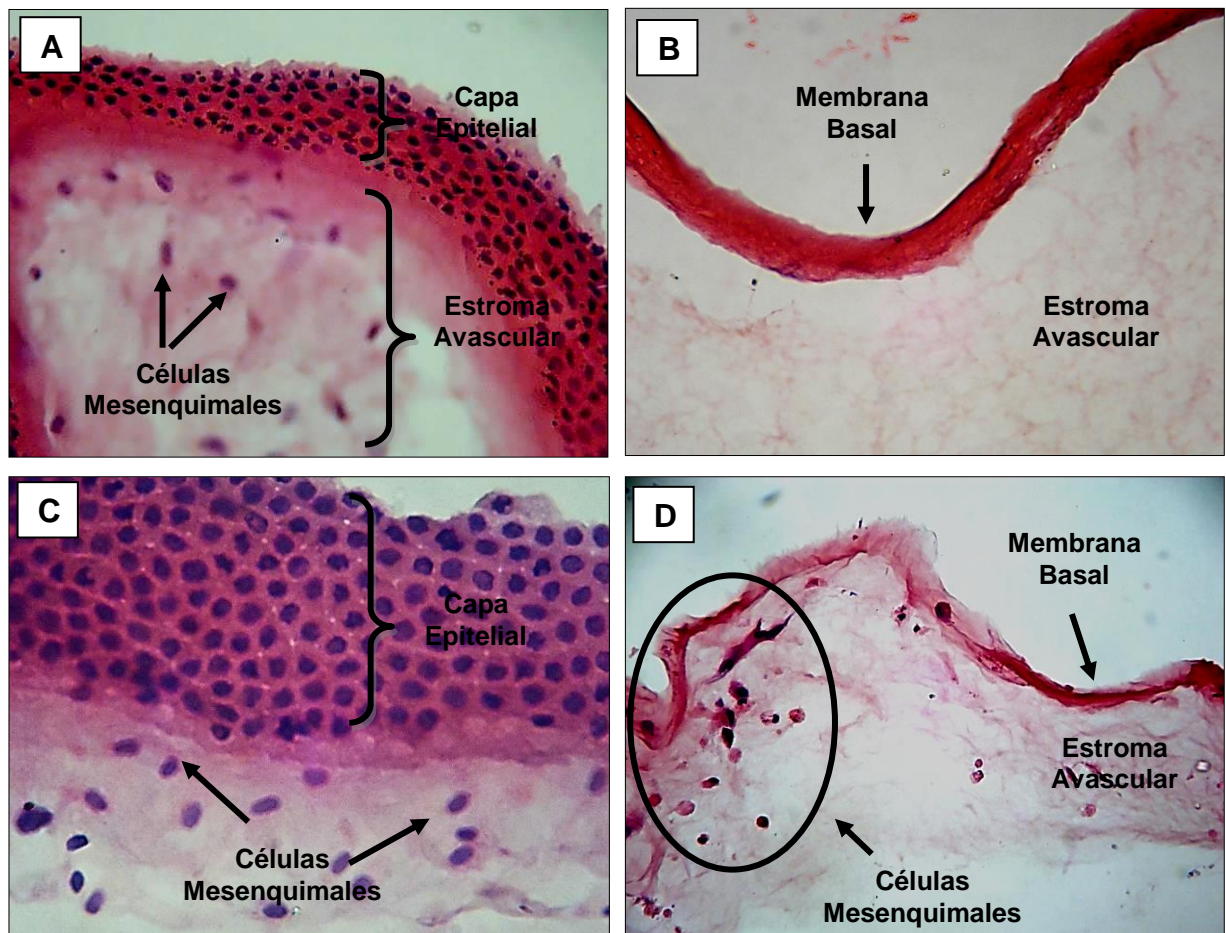
**Tabla 6.** Resumen de las evaluaciones en la intensidad del marcaje de las monocapas de las células en monocapa obtenidas del epitelio de la membrana amniótica humana.

Determinación Inmunocitoquímica	Cultivos Control	Cultivo Primario	1 <sup>er</sup> Subcultivo	2 <sup>do</sup> Subcultivo
Pan-citoqueratina (Pan-CK)	-	+++	++	+
E-cadherina (E-cad)	-	+++	++	+

Leyenda: +++: Marcaje fuertemente positivo; ++: Marcaje medianamente positivo; +: Marcaje positivo; - Marcaje negativo.

## 6.6. Evaluación de la criopreservación

Con el fin de determinar el efecto de la criopreservación tanto por glicerol como vitrificación y observar de la membrana amniótica humana, se realizaron cortes histológicos utilizando la coloración Hematoxilina – Eosina, lo que nos permitió realizar un análisis microscópico de las estructuras de la misma (Figura 18).



**Figura 18.** Evaluación histológica de la membrana amniótica humana completa y denudada con Dispasa y posteriormente criopreservada por 10 días. Coloración Hematoxilina – Eosina. **A.-** Membrana amniótica humana completa y criopreservada con glicerol. 400X. **B.-** Membrana amniótica humana denudada y criopreservada en glicerol. 250X. **C.-** Membrana amniótica humana completa y vitrificada. 400X. **D.-** Membrana amniótica humana denudada y vitrificada. 250X.

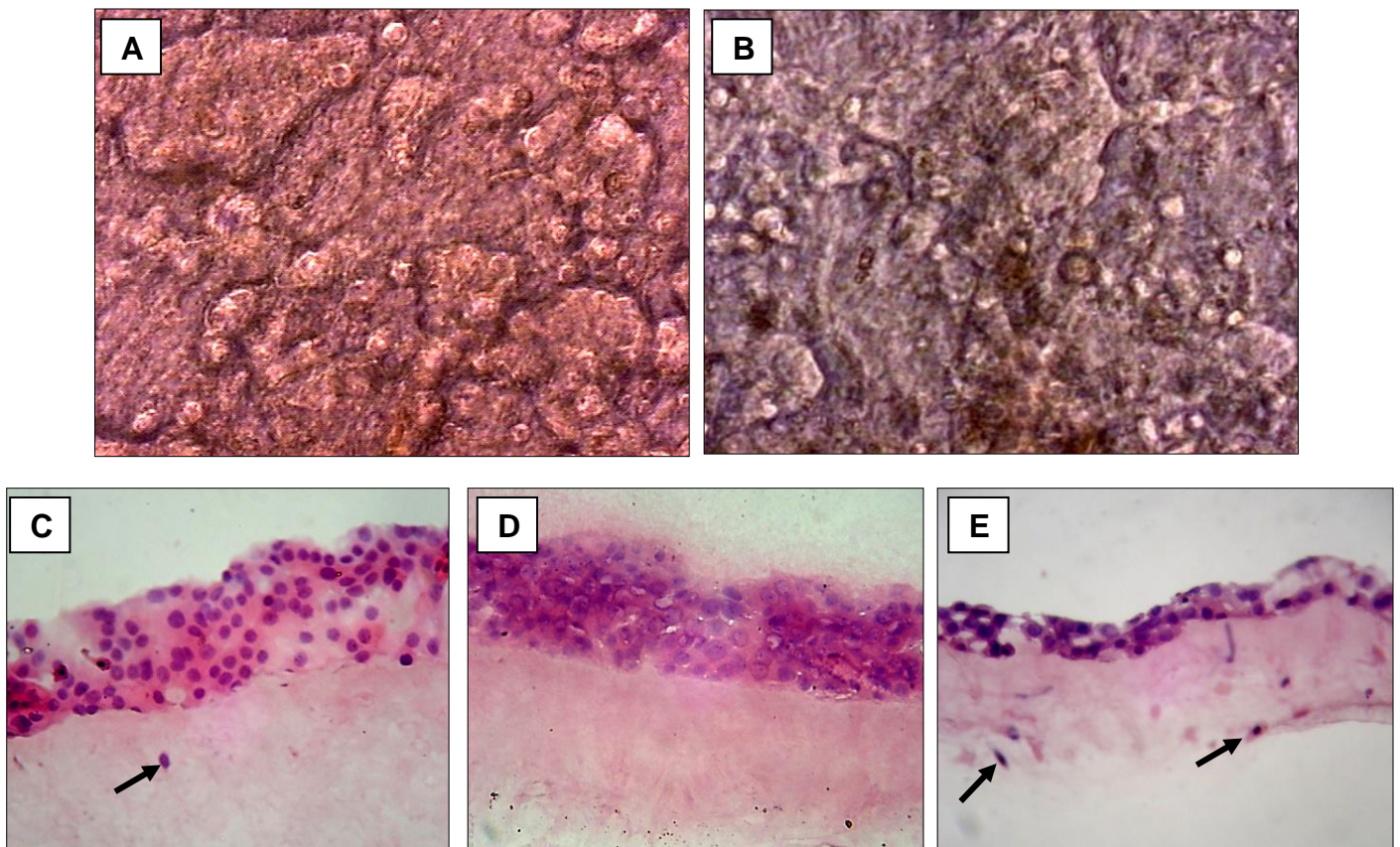
Al examinar histológicamente la membrana amniótica humana completa, criopreservada tanto por glicerol como por vitrificación, se observa diferencias en la morfología de las células que conforman la capa epitelial y el estroma de la membrana amniótica humana (Figura 18A y 18C) cuando se compara con la morfología de las células epiteliales y mesenquimales de la membrana amniótica no criopreservada (Figura 10B), por ejemplo hay una pérdida de volumen en los núcleos. Al mismo tiempo, al evaluar las características morfológicas de las muestras del estroma de la membrana amniótica desnuda y posteriormente criopreservadas tanto por, glicerol (Figura 18B) como por vitrificación (Figura 18D), se pudo observar algunas similitudes y diferencias en las células que componen el estroma de la membrana amniótica, al compararlas con la membrana amniótica desnuda con dispa y procesada histológicamente después de su obtención (Figura 11B). Al criopreservar el estroma amniótico con glicerol, no se observó la presencia de las células mesenquimales, a diferencia del estroma vitrificado en el cual, se evidenció solo algunas células mesenquimales viables y otras solo se aprecian núcleos picnóticos. También es posible notar que la matriz extracelular del estroma criopreservado tiene una organización mucho más laxa y menos fibrosa en comparación con el estroma vitrificado el cual se observa mucho más denso. Sin embargo, a pesar de las diferencias encontradas en ambos métodos, la membrana basal y la matriz extracelular del estroma mantienen sus características intrínsecas después del tratamiento sugiriendo que la criopreservación con glicerol y por vitrificación permite conservar el estroma de la membrana amniótica para ser usado como biosustrato tridimensional en los cultivos celulares.

#### **6.7. Evaluación morfológica e inmunocitoquímica de las células epiteliales amnióticas cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica humana**

Los cambios morfológicos y funcionales de las células epiteliales amnióticas cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica humana fueron evidenciados mediante observaciones periódicas al microscopio de contraste de fase, evaluaciones histológicas y por la determinación antigénica de Pan-CK y E-cadherina.

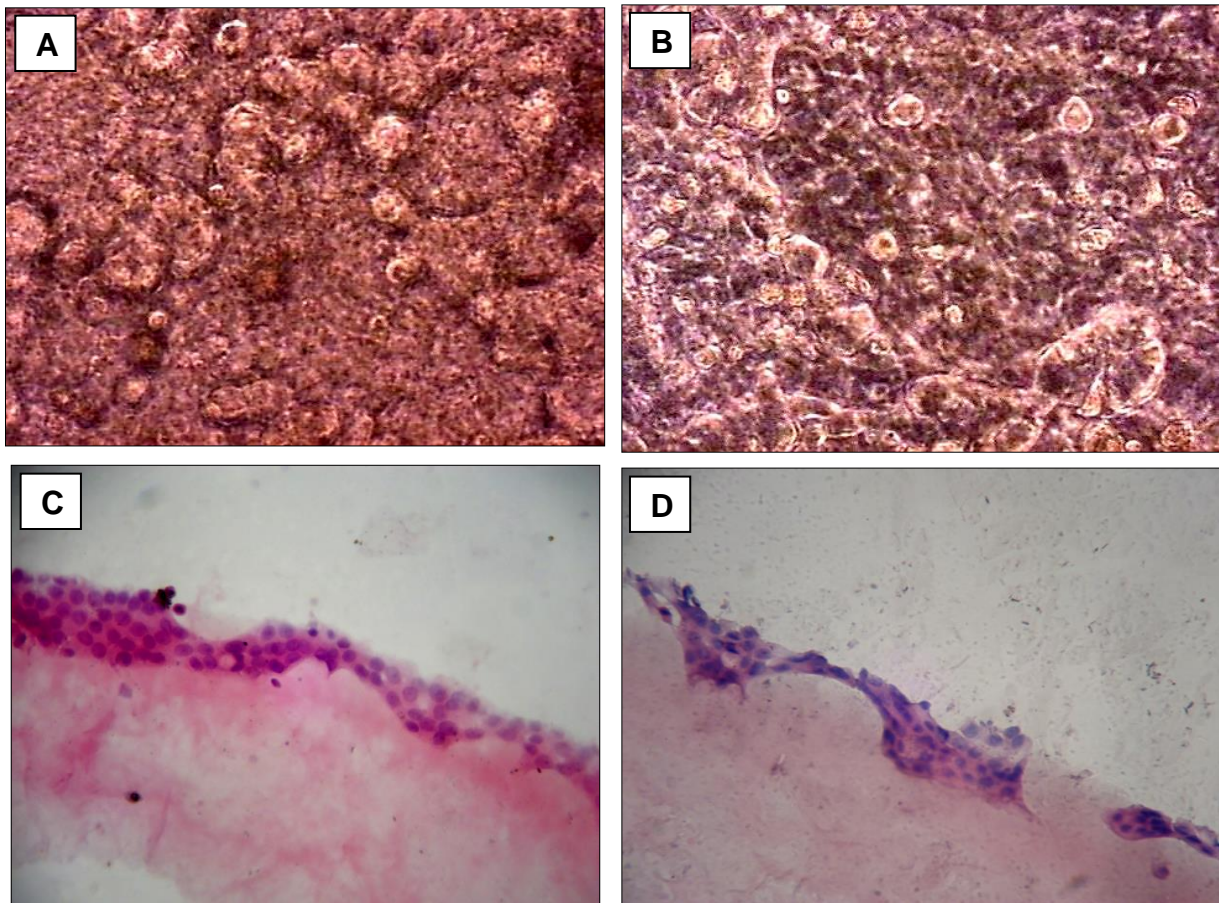
Los resultados de los cultivos de las células epiteliales amnióticas humanas sobre el estroma de la membrana amniótica humana variaron dependiendo del estroma si era fresco, criopreservado con glicerol o vitrificado, por lo que se describirán los resultados más resaltantes.

Con respecto a las células epiteliales amnióticas cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica en fresco sin criopreservación, se observa una alta adhesión de las células epiteliales sobre dicha capa estromal, formando agregados celulares desde la primera semana de cultivo (Figura 19A). A medida que transcurrieron los días, se forma una monocapa (Figura 19B). En ese momento, se realizaron los estudios histológicos mediante la coloración Hematoxilina – Eosina donde se pudo apreciar una alta adhesión y un crecimiento en monocapa de las células epiteliales amnióticas las cuales se distribuyeron uniformemente sobre la superficie del estroma fresco y además mostraron una excelente integración con el tejido, manteniendo la morfología y estructura típica de células epiteliales con núcleos grandes y redondos e incluso mostraron una estrecha unión intercelular, semejante a un epitelio simple cubico (Figura 19C, 19D y 19E).



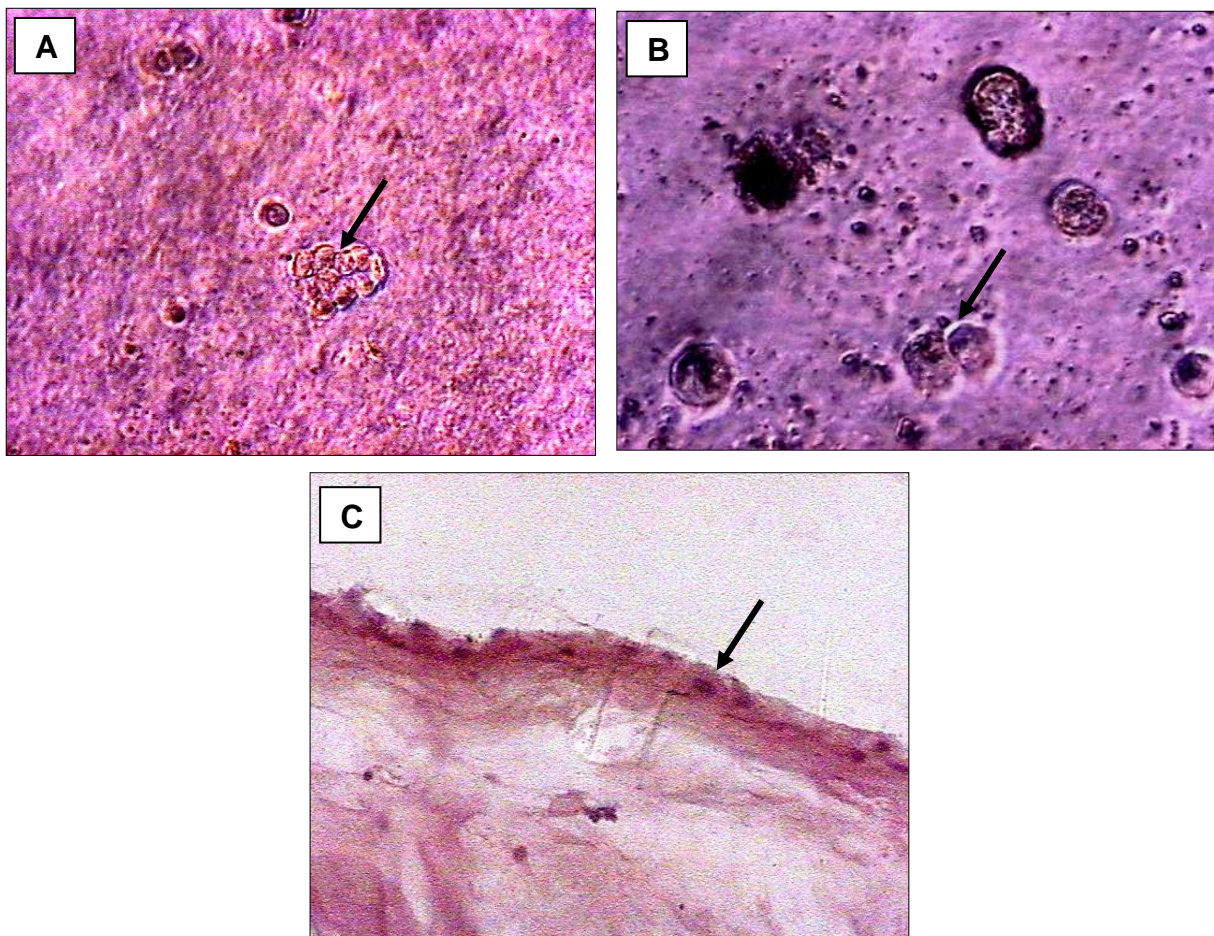
**Figura 19.** Cultivo primario de las células epiteliales amnióticas humanas (CEMAH) sobre el estroma de la membrana amniótica humana (EMAH) fresca. **A.-** EMAH fresca. 6 días de cultivo. Contraste de fases. 200X. **B.-** EMAH fresca. 10 días de cultivo. Contraste de fases. 200X. **C.-** Se observan células epiteliales amnióticas adheridas y células mesenquimales en el estroma (→). Sección histológica de las CEMAH cultivadas sobre EMAH fresca. 10 días de cultivo. Coloración Hematoxilina-Eosina. 250X. **D.-** Sección histológica de las CEMAH cultivadas sobre EMAH fresca, 14 días de cultivo. Coloración Hematoxilina-Eosina. 250X. **E.-** Se observan células epiteliales amnióticas adheridas y células mesenquimales en el estroma (→). Sección histológica de las CEMAH cultivadas sobre EMAH fresca, 17 días de cultivo. 250X.

En cuanto a los cultivos de las células epiteliales sobre el estroma de la membrana amniótica vitrificada, se pudo apreciar un comportamiento similar a lo observado en los cultivos sobre la membrana amniótica en fresco; es decir, un gran número de células epiteliales adheridas al biosustrato tridimensional vitrificado (Figura 20A), las cuales proliferaron rápidamente a medida que transcurrieron los días de cultivo hasta formar una monocapa (Figura 20B). Sin embargo, al observar características histológicas de estas células epiteliales sobre el estroma vitrificado, se pudo evidenciar un tapizado simple e interrumpido de células donde se encontraron algunas zonas donde hubo una buena adhesión (Figura 20C y 20D).



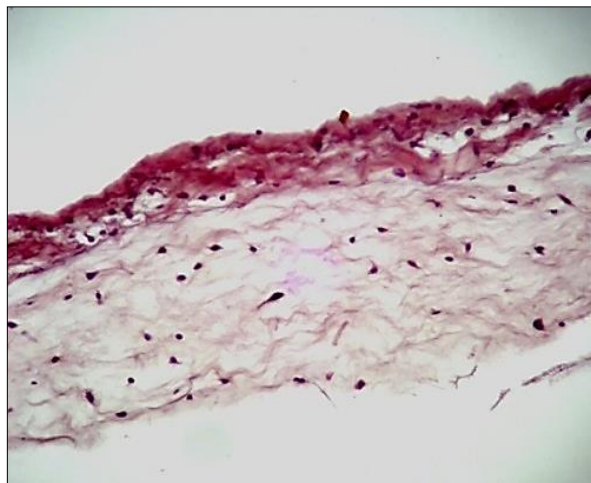
**Figura 20.** Cultivo primario de las células epiteliales amnióticas humanas (CEMAH) sobre el estroma de la membrana amniótica humana (EMAH) vitrificado. **A.-** EMAH vitrificada. 6 días de cultivo. Contraste de fases. 200X. **B.-** EMAH vitrificada. 10 días de cultivo. Contraste de fases. 200X. **C.-** Secciones histológicas CEMAH cultivadas sobre EMAH vitrificado. 10 días de cultivo. Coloración Hematoxilina – Eosina. 250X. **D.-** Secciones histológicas CEMAH cultivadas sobre EMAH vitrificado. 14 días de cultivo. 250X.

En contraste a lo observado anteriormente las células epiteliales amnióticas sobre el estroma de la membrana amniótica criopreservada con glicerol, se pudo observar poca adhesión de las células epiteliales al sustrato amniótico criopreservado y una baja proliferación celular a medida que transcurrieron los días de cultivo (Figura 21A y 21B). Luego de 17 días de cultivo, se realizaron las evaluaciones histológicas correspondientes donde se pudo observar poca interacción entre las células epiteliales y el tejido criopreservado, lo cual se evidenció por la baja cantidad de células epiteliales adheridas al estroma criopreservado con glicerol (Figura 21C).



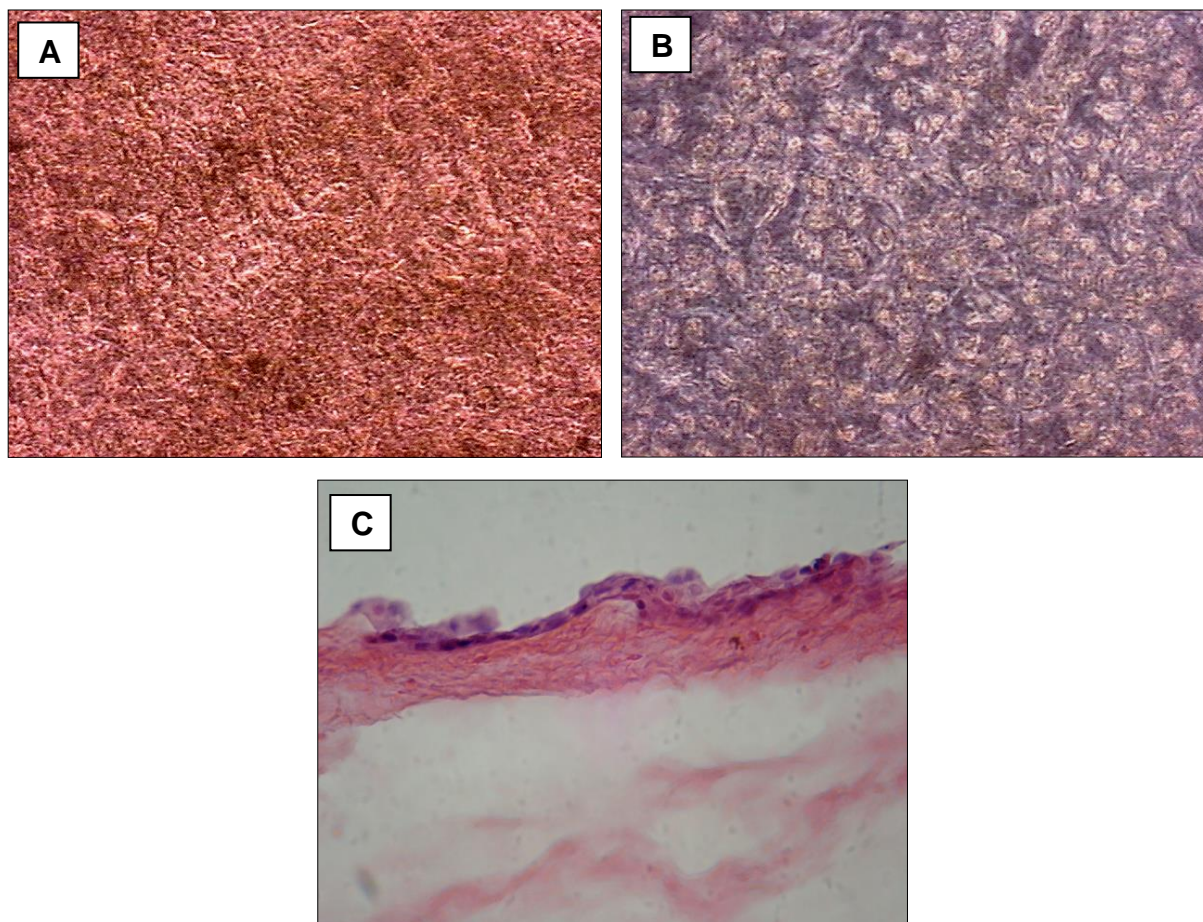
**Figura 21.** Cultivo primario de las células epiteliales amnióticas humanas (CEMAH) sobre el estroma de la membrana amniótica humana (EMAH) criopreservada con glicerol. **A y B.**- EMAH criopreservada donde se observa algunos grupos de células (→). 5 y 11 días de cultivo respectivamente. Contraste de fases. 200X. **C.**- Secciones histológicas CEMAH cultivadas sobre EMAH criopreservada. Se aprecian los núcleos de las células (→). 17 días de cultivo. Coloración Hematoxilina – Eosina. 200X.

Es importante mencionar que la evaluación histológica de la membrana amniótica humana que sirve de control negativo antes de la criopreservación, nos reveló una membrana amniótica denudada completamente libre de células epiteliales demostrando que la denudación fue excelente al remover por completo el epitelio amniótico. Además, se pudo notar la presencia de una membrana basal intacta formando un plano por debajo de la cual se distingue claramente las células mesenquimales incluidas en la matriz extracelular (Figura 22).



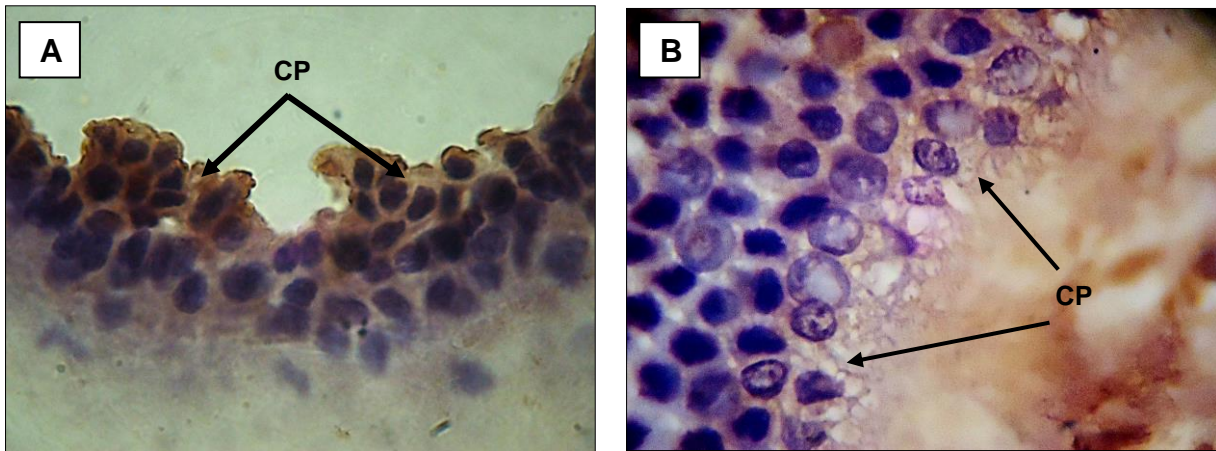
**Figura 22.** Evaluación histológica de la membrana amniótica humana denudada que sirve de control negativo. Coloración Hematoxilina-Eosina. 100X

En base a los resultados anteriores donde las células del cultivo primario cultivadas sobre la membrana amniótica vitrificada tienen una buena adhesión y proliferación, se decidió evaluar las células epiteliales subcultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica vitrificada. En este sentido, se pudo observar al microscopio de contraste de fases un gran número de células epiteliales amnióticas adheridas al sustrato vitrificado (Figura 23A). A medida que transcurrían los días, estas células epiteliales proliferaron rápidamente formando una monocapa (Figura 23B). Esto fue corroborado a nivel histológico donde se visualiza la formación de una capa continua y simple de células epiteliales con morfología cuboidal, con núcleos grandes y redondos, adheridas al estroma de la membrana amniótica vitrificado, indicando una buena integración de estas células con el tejido vitrificado (Figura 23C).



**Figura 23.1**<sup>ef</sup> subcultivo de las células epiteliales amnióticas humanas (CEMAH) sobre el estroma de la membrana amniótica humana (EMAH) vitrificada. **A.-** EMAH vitrificada. 5 días de cultivo. Contraste de fases. 100X. **B.-** EMAH vitrificada. 7 días de cultivo. Contraste de fases. 200X. **C.-** Sección histológica CEMAH cultivadas sobre EMAH vitrificada, 7 días de cultivo. Coloración Hematoxilina-Eosina. 250X.

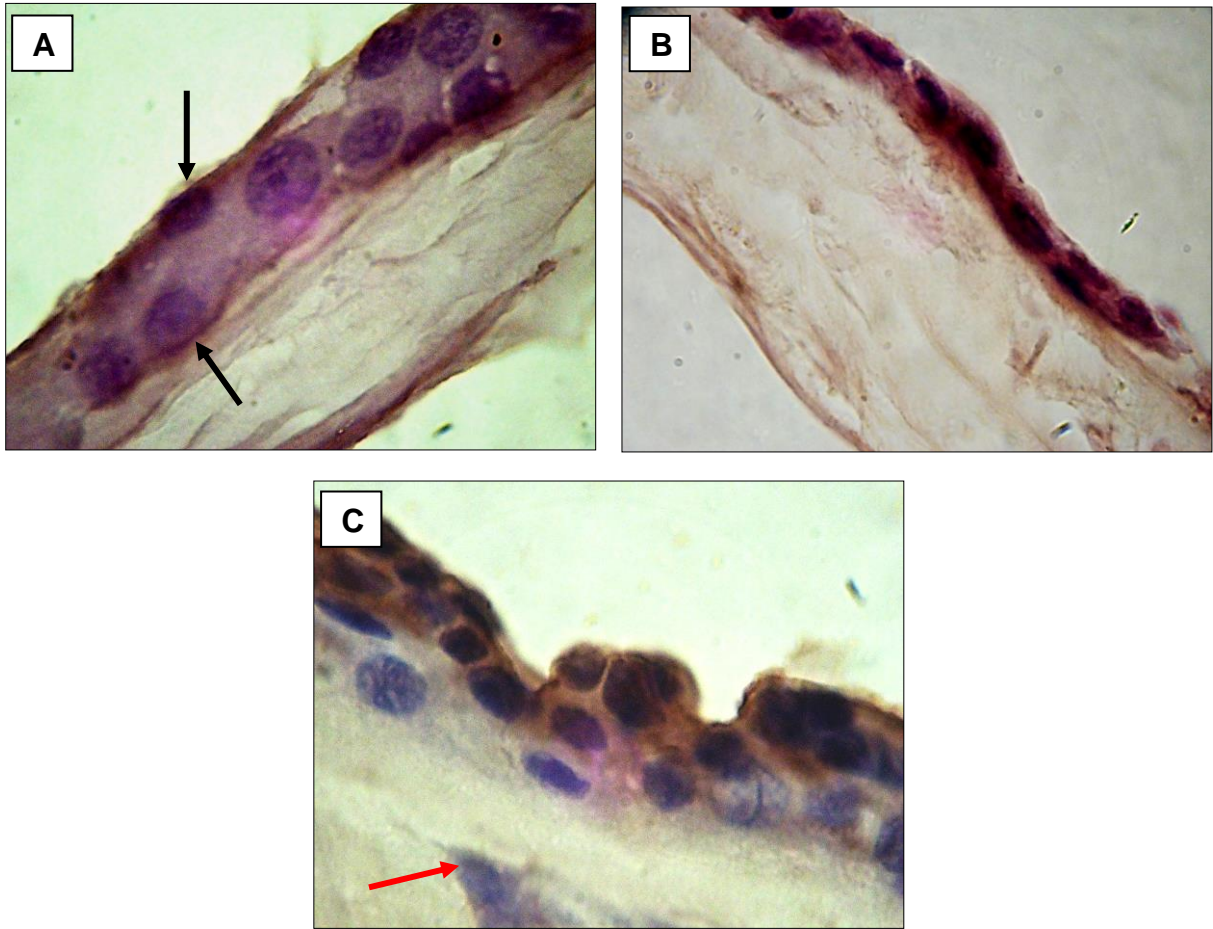
Es importante mencionar que al realizar el control negativo para la determinación inmunohistoquímica de la Pan-CK y E-cadherina en las células epiteliales amnióticas de las membranas amnióticas completas, no se apreció marcaje únicamente la coloración con la hematoxilina (Figura 24A), mientras que en las membrana amniótica humana utilizada como patrón de referencia de la expresión se observaron la mayoría de las células positivas a la expresión de Pan-CK (Figura 24B) y al marcaje E-cadherina en algunas uniones intercelulares (Figura 24C)



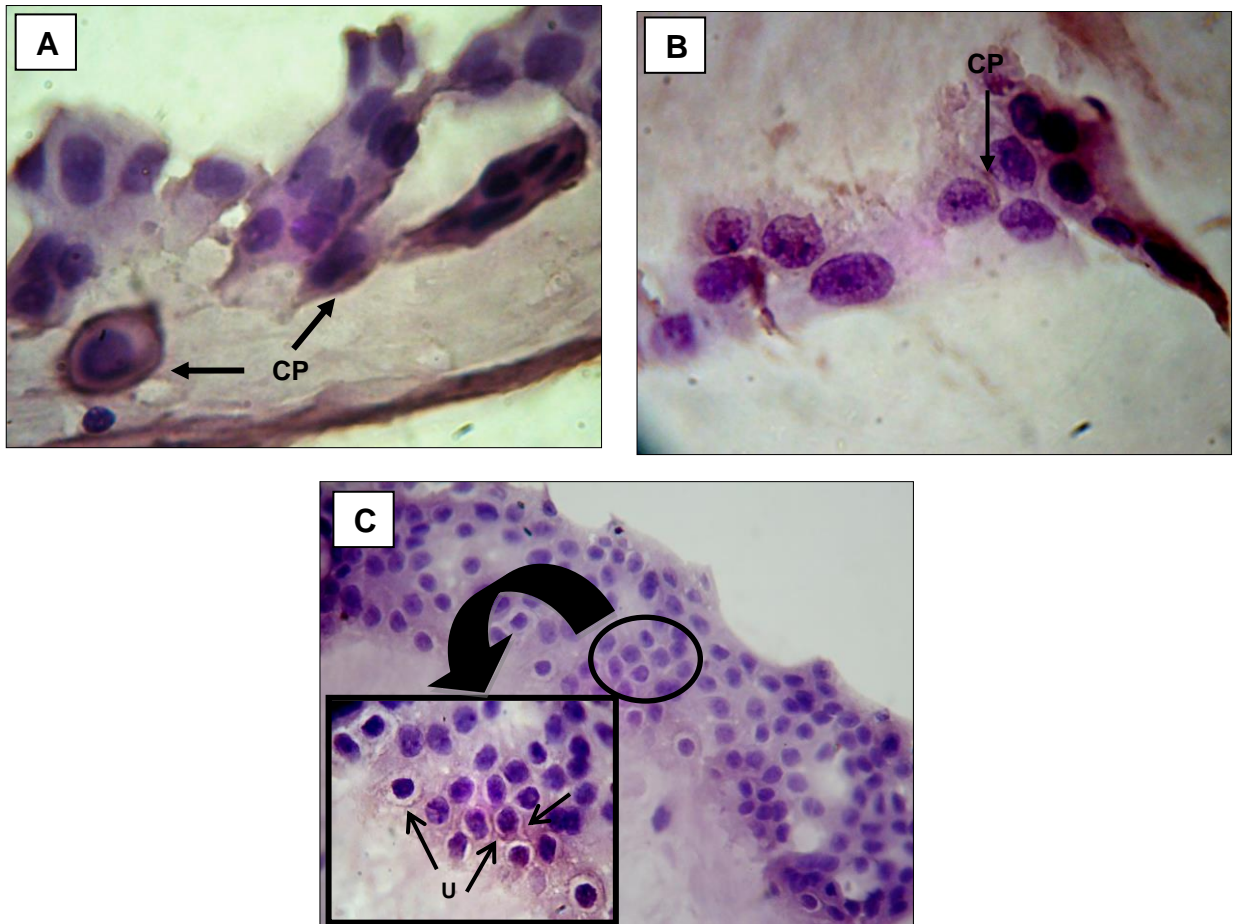
**Figura 24.** Secciones histológicas de la membrana amniótica humana (MAH). Determinación inmunocitoquímica de Pan-CK y E-cadherina. **A.-** Se observan células positivas (→) a Pan-CK hacia la periferia. 1000X. **B.-** Se observa (CP) marcaje a E-cadherina en algunas uniones intercelulares. 1000X.

Por otro lado, también se caracterizó inmunohistoquímicamente las células epiteliales en los cultivos de las células epiteliales amnióticas sembradas sobre el estroma de la membrana como biosustrato tridimensional, determinando así la presencia de Pan-CK (Figura 25) y E-cadherina (Figura 26) marcadores característicos del fenotipo epitelial.

Se pudo observar una expresión positiva moderadamente intensa para Pan-CK de las células epiteliales amnióticas cultivadas sobre el estroma amniótico fresco (Figura 25A y 25B) y vitrificado (Figura 25C).



**Figura 25.** Secciones histológicas de los cultivos de las células epiteliales amnióticas humanas (CEMAH) sobre el estroma de la membrana amniótica humana (EMAH). Determinación inmunocitoquímica de Pan-CK. **A.-** Se observan células positivas a Pan-CK(→). Cultivo sobre EMAH fresca. 10 días de cultivo. 1000X. **B.-** Cultivo sobre EMAH fresca, 14 días de cultivo. 1000X. **C.-** Se observan células epiteliales positivas a Pan-CK y células mesenquimales en el estroma negativas (→).Cultivo sobre EMAH vitrificada, 10 días de cultivo. 1000X.



**Figura 26.** Secciones histológicas de los cultivos de las células epiteliales amnióticas humanas (CEMAH) sobre el estroma de la membrana amniótica humana (EMAH). Determinación inmunocitoquímica de E-cadherina. **A.-** Se observan células (CP) que expresan E-cad. Cultivo sobre EMAH fresca. 10 días de cultivo. 1000X. **B.-** Se observa marcaje positivo a E-cad a nivel de las uniones intercelulares de algunas células. Cultivo sobre EMAH fresca. 14 días de cultivo. 1000X. **C.-** Detalle donde se observan células que expresan E-cad en las uniones intercelulares (U). Cultivo sobre EMAH vitrificada. 10 días de cultivo. 1000X.

En cuanto a la expresión de E-cadherina, se aprecia claramente en algunas regiones la expresión de esta proteína en las uniones que se observan entre célula – célula de las células epiteliales amnióticas cultivadas tanto en la membrana amniótica fresca (Figura 26A y 26B) como en la vitrificada (Figura 26C). Sin embargo, la expresión de esta proteína se hizo más débil a medida que transcurrían los días de cultivo, tanto en las células cultivadas sobre el estroma fresco como en aquellas cultivadas sobre el estroma vitrificado (Resultados no mostrados).

## 7. DISCUSIÓN

Actualmente las células presentes en la membrana amniótica humana son de gran interés ya que se consideran una fuente alternativa de células madre con propiedades de autorenovación y diferenciación para ser empleadas en la Medicina Regenerativa o Ingeniería de Tejidos.

En vista de la importancia que tienen estas células madre epiteliales como modelo de estudio básico en la biología del desarrollo y su aplicación en la medicina regenerativa para el tratamiento de diversas enfermedades. En este trabajo se presenta una serie de metodologías que permitieron aislar y establecer los cultivos de células epiteliales de la membrana amniótica humana, evaluando además sus características morfológicas, expresión de algunos marcadores celulares, mantenimiento y comportamiento bajo condiciones *in vitro*. Así mismo, se determinó el potencial que posee el estroma avascular de la membrana amniótica para ser usado como biosustrato tridimensional en los cultivos de las células epiteliales amnióticas. En este contexto los resultados se discutirán bajo tres aspectos fundamentales:

1. Características morfológicas de la membrana amniótica humana.
2. Comportamiento de las células epiteliales de la membrana amniótica humana durante el establecimiento del cultivo así como también sus características morfológicas y la expresión de citoqueratinas y E-cadherinas en condiciones *in vitro*.
3. Características de los cambios morfológicos y expresión de marcadores en las células epiteliales de la membrana amniótica humana cultivadas sobre el estroma avascular de la membrana amniótica humana, bajo diferentes condiciones de criopreservación.

### 7.1. Características morfológicas de la membrana amniótica humana

Las características morfológicas del tejido de la membrana amniótica humana observadas en este trabajo corresponden a las descritas por numerosos autores y corroboran la homología histológica entre el amnios de ratón y de humano (Bourne, 1962; Marcus y col., 2008; Niknejad y col., 2008; Ilancheran y col., 2009; Díaz-Prado y col., 2010b; Dobrevá y col., 2010; Meyer, 2012). En ella se observaron y localizaron las células madre epiteliales derivadas de la membrana amniótica humana (Alviano y col., 2007; Wolbank y col., 2007). Como se pudo apreciar, estas forman una capa continua de células cuboidales derivadas del

ectodermo dispuestas sobre la membrana basal, la cual se encuentra fuertemente adherida a una capa estromal compuesta de colágeno tipo I, II y V (Tamagawa y col., 2008). Las células epiteliales amnióticas se observaron con grandes núcleos y grandes nucléolos, lo que se corresponde con los trabajos realizados por Sadler en (2000). Por otra parte, la membrana basal contiene grandes cantidades de proteoglicanos que sirven como una barrera permeable a macromoléculas y otro tipo de moléculas con una función estructural que permite el mantenimiento de la integridad de la membrana amniótica (King, 1985; Wolf y col., 1991; Akashi y col., 1999). En cuanto a la capa estromal, se pudo evidenciar que esta, a su vez, esta formada por: una capa compacta, que forma el esqueleto fibroso principal de la membrana amniótica humana; una capa fibroblástica, en la cual se encuentran las células fusiformes tipo fibroblastos derivadas del mesodermo embrionario; y una capa esponjosa desprovista de células. Estos resultados concuerdan con los de otros investigadores quienes corroboraron las características histológicas de la membrana amniótica humana (Parry y Strauss, 1998; Toda y col., 2007; Muiños, 2010).

## **7.2. Denudación de la membrana amniótica humana por medio de disgregación enzimática y/ agentes quelantes**

Numerosos protocolos se han descrito para llevar a cabo la denudación de la membrana amniótica humana de las células epiteliales amnióticas, algún autores han empleado agentes quelantes tales, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para romper químicamente las uniones que se produce entre célula – célula, mediante modulación de los niveles de calcio extracelular presentes (Seder y Forte, 1964; Koizumi y col., 2000a), mientras que otros han utilizado tratamientos con enzimas proteolíticas como la Dispasa II (Meller yT seng, 1999; De Melo y col., 2007). Sin embargo, en ambos casos ha sido necesario remover las células mecánicamente mediante un rastrillo luego de la exposición a las diferentes sustancias (Hopkinson y col., 2008).

Con el fin de analizar el efecto de la denudación se ensayó y comparó la acción del EDTA y la Dispasa II sobre la membrana amniótica humana. En este sentido los resultados evidenciaron que el patrón de denudación de las células epiteliales de la membrana amniótica humana, presentaron diferencias en cuanto a la eficiencia con la cual ambos protocolos fueron capaces de remover las células de la capa epitelial de la membrana amniótica.

Al observar los resultados obtenidos tras el tratamiento de la membrana amniótica con el agente quelante EDTA, se pudo apreciar que bajo nuestras condiciones no fue posible la remoción de las células epiteliales de la membrana amniótica demostrando que este agente quelante no es tan eficaz para ser empleado en la denudación de la membrana amniótica a diferencia de lo reportado por varios autores en estudios similares (Koizumi y col., 2007; Hopkinson y col., 2008). Asimismo, se ha demostrado que el EDTA permite la remoción de otro tipo de epitelios y este es un método muy utilizado en el tratamiento ocular para la separación del epitelio conjuntival (Gibson, 1989).

Probablemente los resultados obtenidos se deban a la concentración y el tiempo de incubación como lo han señalado otros autores, quienes han reportado diferentes concentraciones de EDTA a las cuales es posible para llevar a cabo la denudación de la membrana amniótica, encontrándose que la mínima concentración requerida para lograr la separación del epitelio amniótico de la membrana amniótica es de 0.02% y que esta puede variar máximo hasta 0.25%, obteniendo excelentes resultados en todos los casos (Nakamura y col., 2004; Sun y col., 2005; Li y col., 2006).

A diferencia de lo observado en la denudación con EDTA al denudar la membrana amniótica con la Dispasa II, se pudo evidenciar una remoción completa de las células epiteliales de la membrana amniótica demostrando que la denudación con la enzima es eficaz ya que rompe las uniones proteicas que existen entre las células epiteliales lo que concuerda con lo reportado por Koizumi y col. (2000b), esto sin alterar la membrana basal y el estroma avascular como se ha señalado en estudios similares realizados por varios autores (Ti y col., 2002; Yam y col., 2002; Ohno-Matsui y col., 2005). De la misma forma, en trabajos realizados con otros tipos de tejidos se ha encontrado que tras el tratamiento con Dispasa II se obtienen excelentes resultados en la separación de la epidermis de la dermis (Bello y col., 1998), así como en la remoción de la mucosa nasal (Rodríguez y col., 2001), de la córnea y el limbo (Gipson y Grill, 1982; Geggel y Gipson., 1989; Espana y col., 2003).

A diferencia del EDTA, la Dispasa actúa enzimáticamente a nivel de las uniones tipo hemidesmosomas que se encuentran en la membrana basal por acción proteolítica. Se ha demostrado que esta proteasa neutral obtenida del *Bacillus polymyxa*, tiene una alta especificidad para la fibronectina y el colágeno IV, lo que la hace particularmente adecuada para separar fácilmente el epitelio del tejido conectivo circundante, además permite mantener viables las células epiteliales disgregadas debido a la baja toxicidad de la Dispasa como se ha demostrado en trabajos realizados por Romero y col. (1995) y Merentes (2000).

### **7.3. Obtención de la membrana amniótica humana y aislamiento de las células epiteliales amnióticas**

Como se pudo apreciar en los resultados, el aislamiento de las células epiteliales amnióticas humanas obtenidas por disgregación enzimática mediante la enzima Dispasa fue posible obteniéndose un promedio de aproximadamente 5.300.000 células de cada membrana amniótica procesada en su totalidad, indicando que la técnica de disgregación enzimática con la Dispasa permite el aislamiento de las células epiteliales amnióticas, coincidiendo nuestros resultados con los reportado por otros autores quienes han utilizado métodos de aislamiento similar así como también combinación de enzimas y agentes quelantes (Wei y col., 2003; Bilic y col., 2008; Ilancheran y col., 2009).

Los resultados evidenciaron una diferencia en el rendimiento en el número de células obtenidas con cada procesamiento, observándose un mayor rendimiento celular en las muestras 6 y 7. Durante los primeros ensayos las células epiteliales eran sometidas a varios procesos de disgregación enzimática tanto con Dispasa y posteriormente con la Tripsina. Se ha señalado que la viabilidad de las células es inversamente proporcional a la concentración de enzima utilizada, el período de incubación del tejido en la solución y el tiempo transcurrido entre la extracción y el procesamiento de la membrana amniótica. (Hennerbichler y col., 2007a) por lo que el rendimiento celular obtenido durante los primeros procesamientos se debe a la metodología empleada, lo cual es reflejado en nuestros resultados en la viabilidad y en el patrón de proliferación de las células epiteliales de la membrana amniótica humana, ya que una vez lograda la estandarización de la metodología se obtuvo células viables que se mantuvieron hasta el 2do pasaje.

Otro factor que influyó en el óptimo mantenimiento y proliferación de los cultivos de las células epiteliales amnióticas, fue la densidad celular empleada para establecer los cultivos primarios. Varios investigadores han determinado, que la mínima densidad celular requerida para que ocurra la proliferación de las células epiteliales amnióticas es de 1.000.0000 células/mL (Sakuragawa, 1997; Miki y col., 2005; Bilic y col., 2008). Se ha señalado que cuando las células epiteliales son sembradas a bajas densidades estas no logran mantenerse en cultivo y entran en una etapa de senescencia y posteriormente se produce la muerte celular, como ocurrió con los cultivos primarios establecidos a partir de los primeros aislamientos, donde hubo una baja densidad que posiblemente llevó a un proceso de senescencia.

A diferencia de lo antes mencionado se ha demostrado que cuando las células epiteliales amnióticas son sembradas a altas densidades celulares se logra el establecimiento y el mantenimiento de los cultivos primarios por varios días y posteriormente su amplificación. Las células entran en contacto entre sí

incrementando la proliferación y aumentando la población celular, hasta alcanzar la confluencia cubriendo 80-90% del espacio disponible del recipiente de cultivo. Este comportamiento se encuentra asociado a la activación de los genes ligados a la proliferación y a mecanismos moleculares complejos que involucran a las integrinas, receptores del EGF y la interacción célula – célula como se ha sido señalado por diversos autores (Freshney, 2000; Miki y col. 2005) y como lo reflejan nuestros resultados luego de ser estandarizada la metodología. Al cultivar las células epiteliales amnióticas a altas densidades celulares fue posible establecer los cultivos primarios que posteriormente fueron llevados hasta un 2do pasaje sin rasgos aparentes de senescencia.

#### **7.4. Establecimiento de cultivos primarios y subcultivos de las células epiteliales de la membrana amniótica humana**

En la etapa inicial de los cultivos primarios se apreciaron células poligonales que proliferaron rápidamente con numerosas divisiones mitóticas bajo las condiciones *in vitro* suministradas siendo la morfología similar a las observadas en los diferentes estudios que se han realizado sobre estas células epiteliales amnióticas humanas (Terada y col., 2000; Ochsenbein-Kölble y col., 2003; Miki y col., 2005; Toda y col., 2007; Bilic y col., 2008; Parolini y col., 2008; Dobrevá y col., 2010; Muiñoz, 2010; Díaz-Prado y col., 2011; Pratama y col., 2011). Así mismo, estas características morfológicas que adquieren en cultivo son parecidas a las reportadas en trabajos establecidos a partir de células epiteliales provenientes de la membrana amniótica de ratones (Nakajima y col., 2001; Marcus y col. 2008). Sin embargo, para determinar que realmente son células madre, es necesario la utilización de marcadores específicos como: Sox-2, Nanog, SSEA-4, SSEA-3, Tra1-60, Tra 1-81, entre otros.

Aunque en los cultivos primarios se evidenciaron en su mayoría células con morfología poligonal, es importante mencionar que presento una heterogeneidad celular en la que se puede destacar células con morfología fusiforme y células con amplio volumen citoplasmática desde los primeros días de cultivo.

Las células tipo fusiforme podrían formar parte de una subpoblación de células tipo fusiformes o puede que sean liberadas durante el aislamiento y procesamiento de la membrana amniótica probablemente cuando es sometida a la acción de la enzima. Se ha encontrado que en algunos casos se liberan algunas células mesenquimales durante el aislamiento (Miki y col., 2005; Muiños, 2010), para determinar esto se

requiere la utilización de marcadores específicos de células madre mesenquimales tales como, CD105, CD173, SH-1, SH-2, SH-3 y SH-4.

Por su parte, las células de amplio volumen citoplasmático, se caracterizan por permanecer vivas por largos periodos de tiempo, aumentando de tamaño y aplanándose (Meyer, 2012). Estas células concuerdan con una subpoblación celular existente en la Gelatina de Wharton, reportada por Karahuseyinoglu y colaboradores en el 2007 (Citado en Araos, 2009), los cuales indicaban que no se trataban de células senescentes sino de células semejantes a células progenitoras. Las células de citoplasma ancho permanecen en cultivo conjuntamente con las células de morfología poligonal y presentan una forma indeterminada, debido a las alteraciones de los filamentos del citoesqueleto, lo que las hace visibles y forman las barras citoplasmáticas a las cuales se asocian las mitocondrias paralelas (Céspedes y Reyes, 2007).

Esta heterogeneidad encontrada ha sido señalada por muchos autores y se debe a la composición celular en las etapas iniciales de los cultivos primarios, la cual se asemeja a las características intrínsecas del tejido *in vivo*, el cual está compuesto por diversos tipos de células, que pueden ser liberadas una vez que el tejido es degradado por las enzimas, por lo que los distintos tipos celulares pueden explicarse por las características histológicas de la membrana amniótica y la estrecha relación que guarda un tipo celular con otro dentro del mismo (Niknejad y col., 2008; Dobrevá y col., 2010; Muiños, 2010; Insausti y col., 2011).

Varios grupos de investigadores han demostrado la importancia del factor de crecimiento EGF en los medios de cultivo de las células epiteliales amnióticas, se ha señalado que en medio libre de EGF la proliferación de las células epiteliales amnióticas disminuye hasta que inclusive se pierde el potencial de diferenciación de dichas células. Por el contrario en presencia de EGF, las células epiteliales amnióticas proliferan rápidamente y forman una monocapa de células que muestran una forma poligonal típica de las células epiteliales, además mantienen su potencial de diferenciación, canalizándolas hacia diversos linajes celulares según el microambiente circundante (Xu y col., 2002; Wei y col., 2003; Alviano y col., 2007; Hennerbichler y col., 2007a).

De acuerdo a lo observado las células cultivadas en monocapa y obtenidas por disgregación enzimática, permitieron la adherencia, el óptimo crecimiento y mantenimiento de las células poligonales del epitelio de la membrana amniótica humana bajo diferentes condiciones de cultivo (Medio nutritivo en presencia de EGF, sustrato de gelatina, entre otros) coincidiendo nuestros resultados con los conseguidos por Miki y col. (2005).

Por su parte, en los subcultivos se observaron las diferentes morfologías que se evidenciaron en el cultivo primario, sin embargo la mayoría son células poligonales. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por otros investigadores quienes obtuvieron una heterogeneidad al realizar los subcultivos de las células epiteliales amnióticas (Bilic y col., 2008; Stadler y col., 2008; Pratama y col., 2011; García, 2012), obteniéndose un cultivo celular compuesto por células poligonales, células fusiformes y células con amplio volumen citoplasmático.

Las células con amplio volumen citoplasmático permanecen en cultivo aunque en menor proporción con respecto a las células cuboidales. Este fenómeno es dependiente de la densidad celular, el tiempo de cultivo y del número de pasaje. Así como la acción de factores paracrinicos y autocrinicos secretados por las mismas células, los cuales contribuyen en el mantenimiento de la morfología sin rasgos aparentes de senescencia, actúan como mitógenos y mantienen el potencial de diferenciación mediante un mecanismo de acción desconocido (Schuldiner y col., 2000; Forbes y col., 2002). La variación en la proporción de los tipos celulares, demuestran la selectividad de los subcultivos y la colonización de los mismos por las células con mayor capacidad proliferativa. A medida que los cultivos alcanzan la confluencia, las células se observan con una forma poligonal, sin embargo, en presencia de una baja densidad celular, estas tienden a adquirir una morfología más aplanada, extendiendo sus citoplasmas para así lograr contacto con las células adyacentes. Estos resultados podrían explicar el aumento desde el 2<sup>do</sup> pasaje en la densidad de células de amplio citoplasma a baja densidad celular, sin necesidad de que estas formaran parte de la subpoblación de células de amplio volumen citoplasmático observado en los cultivos primarios, concordando además con lo reportado por otros investigadores, donde las células van cambiando de morfología a medida que alcanzan la confluencia.

En contraste, la subpoblación de células tipo fusiforme mostraron un aumento notable en la población celular a lo largo de los diferentes pasajes, encontrándose en mayor proporción con respecto a las observadas en los cultivos primarios. Esto posiblemente se deba a que bajo las condiciones suministradas se favorece su adhesión, mantenimiento y proliferación. Estos resultados observados, corresponden a los descritos por numerosos autores (Manuelpillai y col., 2011; Pratama y col., 2011; García, 2012) quienes han obtenido resultados similares al cultivar células epiteliales de la membrana amniótica.

Se ha señalado que cuando los condrocitos humanos son sembrados a altas densidades estos muestran una morfología esférica o poliédrica que se mantiene durante las primeras semanas de cultivo e inclusive hasta el 2<sup>do</sup> pasaje, pero luego de subsecuentes subcultivos tienden a mostrar una morfología tipo

fibroblasto pasando por un proceso de desdiferenciación cuando son subcultivadas a muy bajas densidades (Melero-Martin y AlRubei, 2007; Márquez y col., 2012).

Sin embargo, se ha observado en varios estudios que luego de varios pasajes, las células epiteliales amnióticas pueden pasar por una transición epitelio – mesenquima, en el que las células pierden sus propiedades epiteliales, esto es, su organización polarizada, las uniones célula- célula, sufren cambios a nivel del citoesqueleto y en la forma celular, adquiriendo características de células mesenquimales (Stadler y col., 2008; Bilic y col., 2008; Gómez, 2009; Pratama y col., 2011; García, 2012). El motivo para estos cambios sigue siendo incierta pero pueden deberse a las modificaciones epigenéticas, a los factores autocrinos/paracrinos y los factores de crecimiento tales, como EGF que se saben inducen a este tipo de transición epitelio - mesenquima (Kalluri y Weinberg, 2009). En la mayoría de los casos la ocurrencia de este proceso ha sido más a nivel observacional que mecanístico (Sakuragawa y col., 2004; Portmann-Laz y col., 2006; Bilic y col., 2008; Stadler y col., 2008) pero se sabe que tiene una función muy importante en la embriogénesis y en el desarrollo de los órganos (Kalluri, 2009), por lo que es necesario realizar una serie de estudios que incluyen: determinación de marcadores de membrana, proteínas del citoesqueleto, investigación de genes y mediadores responsables (García, 2012) para determinar si lo que está ocurriendo con las células epiteliales en los subcultivos es una transición epitelio – mesenquima, ya que bajo nuestras condiciones de cultivo suministradas no es posible confirmar o descartar este hecho.

En estudios *in vitro* se ha observado la presencia de subpoblaciones de células que pueden variar en cuanto a potencialidad y compromiso así como el tamaño y granularidad. Adicionalmente, estas características pueden variar de un individuo a otro (Díaz y col., 2010a; Muiños, 2010). Esto adiciona una variable a los cultivos, lo que resulta importante para la selección, pureza y comportamiento de las células en cultivo (Rodríguez, 2010).

#### **7.5. Caracterización morfológica e inmunocitoquímica de las células epiteliales de la membrana amniótica humana**

Al realizar la coloración citoquímica May Grünwald - Giemsa se pudo evidenciar con mas detalle los componentes ácidos y básicos de las células y se observó que desde el punto de vista morfológico, los cultivos presentaban básicamente 3 tipos celulares, esto es; células de morfología cuboidal, tipo epitelial,

células con morfología fusiforme y células con amplio volumen citoplasmático, predominando las primeras a medida que aumentaba la densidad celular en cultivo como se ha mencionado anteriormente.

Las células tipo epitelial presentaron una morfología poligonal con una baja relación núcleo/citoplasma y núcleos grandes basófilos ubicados en la región central con uno o varios nucléolos homogéneos como ha sido reportado de igual manera al realizarse los aislamientos celulares con procedimientos similares en membrana amniótica humana y de rata (Wei y col., 2003; Miki y col., 2005; Marrenco y Del Vecchy, 2006; Wu y col., 2006; Marcus y col., 2008; Ilancheran y col., 2009)

Estudios previos han determinado que las células poligonales tipo epitelial poseen abundantes organelos que incluyen un retículo endoplasmático desarrollado, un aparato de Golgi perfectamente definido, mitocondrias y muchas vesículas picnóticas (Sinha, 1971; Marengo y Del Vecchy, 2006).

La leve basofilia citoplasmática observada tanto en las células con morfología fusiforme como en las células de citoplasma ancho, indica un aumento en la cantidad de retículo endoplasmático rugoso que se asocia con una síntesis proteica (Ross y Pawlina, 2007). Esta característica en la coloración que presentan las células, aunado a su persistencia durante los subcultivos y la ausencia de rasgos propios de células senescentes; respalda la hipótesis de que estos tipos celulares constituye una subpoblación de las células tipo poligonal.

Con respecto a la caracterización inmunocitoquímica, se demostró la presencia de marcadores que previamente han sido descritos para las células de origen epitelial, como son las citoqueratinas y E-cadherina (Sierra, 1991; Martínez y Martínez, 2010). El patrón de expresión de antígenos de las células de interés obtenidas en este estudio resultó consistente con los datos publicados previamente para células epiteliales aisladas tanto de la membrana amniótica humana como del líquido amniótico y de otras regiones placentarias (Regauer y col., 1985; Ochsenbein-Kölbl y col., 2003; Miki y col., 2005; Ilancheran y col., 2007; Mihy y col., 2008; Parolini y col., 2008; Dobrev y col., 2010; Niknejad y col., 2010; Moodley y col., 2010; Manuelpillai y col., 2011; Pratama y col., 2011)

La técnica inmunocitoquímica permite la identificación de determinantes antigénicos característicos de distintas líneas celulares. La aplicación directa de anticuerpos policlonales o monoclonales sobre secciones tisulares permite la localización microanatómica de su expresión y su correlación con los parámetros morfológicos, aumentando la sensibilidad y especificidad del estudio y proporcionando información adicional en muchos casos (Sierra, 1991; Ross y Pawlina, 2007). Para una mejor comprensión los resultados obtenidos, se discutirá separadamente la expresión de cada marcador

La citoqueratina es una proteína que pertenece a la familia de filamentos intermedios, ricos en queratina que se encuentran presentes en el citoesqueleto de las células y desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la integridad del citoplasma y morfología celular, soporte y anclaje de las organelas y en la organización del citoesqueleto. En el citoplasma forman una malla que se extiende desde la superficie del núcleo hasta la periferia para lograr un contacto estrecho y el anclaje con los desmosomas y los hemidesmosomas (Jacques y col., 2005; Aquino y Santa, 2008). La expresión de esta proteína es típica en células de origen epitelial, por lo que actualmente es empleada como un marcador de las mismas. En los resultados se pudo apreciar que tanto los cultivos primarios como los subcultivos de las células epiteliales amnióticas expresaron Pan-CK confirmando su naturaleza epitelial y la mínima presencia de contaminación con otro tipo de células, tales como fibroblastos mesenquimales lo cual concuerda con lo observado en trabajos anteriores (Regauer y col., 1985; Miki y Strom, 2006; Miki y col., 2007; Niknejad y col., 2010; Manuelpillai y col., 2011).

Por otra parte la expresión de E-cadherina en los cultivos de las células epiteliales amnióticas humanas está relacionada con el establecimiento y mantenimiento de uniones celulares que promueven la integridad celular. Como se conoce la E-cadherina es una glicoproteína transmembrana de la superficie celular, que está involucrada en el establecimiento de uniones intercelulares, la cual es específica de los epitelios y es necesaria para la regulación de la adhesión celular y la polaridad, la diferenciación, la migración, la supervivencia de las células epiteliales y para mantener la integridad de los epitelios (Bravo, 2003; Geneser, 2003; Sueblinvong y col., 2007; Schneider y col., 2008). Así mismo, algunos autores han señalado que la expresión de E-cadherina está relacionada con la morfogénesis temprana epitelial (Sueblinvong y col., 2007; Schneider y col., 2008; Vossmerbaeumer y col., 2009) y es típica en estas células tipo epitelial, derivadas del ectodermo; características reportadas en diversos estudios (Ochsenbein-Kölble y col., 2003; Pratama y col., 2011) y la cual concuerda con lo observado en este trabajo

Al observar los resultados obtenidos podemos notar que a medida que transcurren los días de cultivo hay una disminución en la intensidad del marcaje tanto para Pan-CK como para E-cadherina y que además este se presenta en diferentes niveles de expresión en los cultivos y subcultivos. Probablemente este fenómeno pueda deberse a que incluso en cultivos en monocapa morfológicamente homogéneos pueden contener subpoblaciones celulares con diferentes características metabólicas.

## 7.6. Evaluación de la criopreservación

La criopreservación es un importante método que nos permite mantener células y tejidos durante largos períodos de tiempo para su investigación biológica y aplicación en áreas de la medicina, tales como la ingeniería de tejidos, la terapia génica, el trasplante de células, ensayos farmacológicos y en futuras indicaciones terapéuticas (Bahadori y col., 2009).

Con el fin de evaluar el efecto de la criopreservación se comparó la acción del glicerol y la vitrificación sobre la membrana amniótica humana completa y desnuda con Dispasa. En los resultados se pudo evidenciar pequeñas diferencias en cuanto a la morfología de las células que componen la capa epitelial y el estroma avascular de la membrana amniótica humana para ambos métodos de criopreservación al comparar estas con las células que conforman la membrana amniótica humana fresca.

Al observar los resultados obtenidos tras el tratamiento de la membrana amniótica humana completa con el glicerol, se puede apreciar que luego de 10 días de haber sido almacenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  ocurre una pérdida de volumen en los núcleos de las células epiteliales las cuales se evidenciaron picnoticas como ha sido reportada en estudios realizados por Heng (2009) con células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea las cuales fueron criopreservadas con glicerol. Se ha encontrado que luego de la criopreservación con glicerol las células epiteliales amnióticas y las células mesenquimales estromales presentan síntomas de daño y no son capaces de mostrar signos de viabilidad, ya sea con algún colorante o en cultivos *in vitro* (Kruse y col., 2000), posiblemente este fenómeno de reducción en el tamaño de los núcleos que se observa en las células epiteliales se deba a este proceso de pérdida de la viabilidad que se ha reportado en trabajos previos. Por su parte, al observar los resultados obtenidos para la criopreservación del estroma de la membrana amniótica humana con glicerol se pudo observar una ausencia total de las células mesenquimales del estroma y alteraciones en la composición de la matriz extracelular que se evidencia por una leve basofilia del estroma avascular en comparación con el estroma de la membrana amniótica vitrificada, lo que no se corresponde con estudios realizados por varios autores (Kruse y col., 2000; Irfan y col., 2010). Diferentes investigadores han realizado una serie de determinaciones inmunocitoquímicas con el fin de evaluar la presencia de colágeno (tipo I, III, IV y V) y fibronectina en la membrana amniótica humana luego de ser criopreservada con glicerol, encontrado que si hay expresión positiva hacia los colágenos y la fibronectina en la membrana amniótica criopreservada indicando que este método permite mantener la matriz extracelular luego de la criopreservación (Malak y col., 1999; Fukuda y

col., 1999). Debido a las diferencias observadas en la composición del estroma de la membrana amniótica luego de la criopreservación sería necesario realizar otro tipo de estudios para determinar si bajo nuestras condiciones es posible mantener cada uno de los componentes que conforman la matriz extracelular.

Con respecto a los resultados obtenidos para el método de criopreservación por vitrificación tanto de la membrana amniótica completa como del estroma de la membrana amniótica humana, se pudo evidenciar que luego de 10 días de almacenamiento a  $-120^{\circ}\text{C}$  es posible conservar la membrana amniótica y el estroma sin presentar alguna alteración en las características morfológicas típicas de la membrana basal y el estroma avascular de la membrana, demostrando que la vitrificación es un método eficaz que permite preservar la membrana amniótica humana y el estroma amniótico como en el tejido fresco, sin alterar la integridad del tejido como se ha demostrado en los estudios realizados con células mesenquimales derivadas de la membrana amniótica humana (Moon y col., 2008), de la medula ósea (Bahadori y col., 2009), en oocitos y embriones humanos (Cho y col., 2001; Kalliopi y col., 2008). Al observar los resultados obtenidos para la vitrificación de la membrana amniótica completa se apreció una leve reducción en el tamaño de los núcleos que conforman las células de la capa epitelial, sin embargo esta pérdida de volumen ocurre en menor proporción en comparación con las células epiteliales amnióticas que se encuentran en la membrana amniótica criopreservada con glicerol donde es mucho más evidente y en donde además la coloración es intensamente basófila, lo que concuerda con estudios realizados por Bahadori y col. (2009), quienes demostraron que por el método de vitrificación es posible obtener una mayor viabilidad celular en comparación con los métodos tradicionales de congelamiento lento, similar a lo obtenido por Kalliopi y col. (2008) tras comparar la criopreservación de embriones por glicerol y vitrificación.

En este estudio, se estableció un protocolo de vitrificación donde se empleó el etilenglicol como crioprotector, el cual es muy utilizado para la vitrificación de embriones de ratones (Kasai y col., 2004), blastocitos humanos (Cho y col., 2001) y de células madre embrionarias (Nie y col., 2009) concordando nuestros resultados con los obtenidos por Gajada y col. (2007), encontrando que el etilenglicol es mucho menos tóxico para la vitrificación en comparación con otros crioprotectores. Además del etilenglicol, la solución de vitrificación también emplea aditivos con altos pesos moleculares, tales como la sacarosa, los cuales pueden reducir significativamente la toxicidad por disminución de la concentración de agentes permeables necesarios para la solución de vitrificación, y agentes como el Ficoll o en nuestro caso el Linfoprep, el cual es una macromolécula que promueve la penetración del crioprotector, y que se ha demostrado tiene varias ventajas en cuanto a toxicidad, mayor solubilidad y menor viscosidad (Kasai y col.,

2004). Al igual que el etilenglicol se ha encontrado que el glicerol tiene baja toxicidad para la mayoría de las células, sin embargo el principal inconveniente con este crioprotector es que penetra lentamente en las células a diferencia del etilenglicol (Gil-Loyzaga, 2011).

Se ha señalado que durante el almacenamiento a temperaturas muy bajas (-130°C) los procesos biológicos se detienen y no hay deterioro de las muestras. El daño potencial de la criopreservación tiene lugar durante los procesos de congelación y descongelación. Cuando las células se congelan a 0°C la presencia de solutos impide la formación de hielo, pero si la congelación continúa (-5°C a -15°C) comienza la formación de hielo, preferentemente en el espacio extracelular. La formación del hielo extracelular da lugar a cambios en la permeabilidad de la membrana de la célula, dando como resultado la salida de agua de la célula. El daño resultante va a depender de la velocidad descongelación. Si las células se congelan lentamente continúa saliendo agua de la célula y los cristales de hielo crecen, las células se contraen y el contenido celular se concentra como se observa en los resultados obtenidos para la evaluación de la criopreservación con glicerol de la membrana amniótica completa. El incremento de la concentración de solutos dentro de las células puede llegar a niveles tóxicos y es una de las causas más importantes de muerte celular (Rota y col., 2005). La formación de hielo extracelular no es excesivamente peligrosa en el caso de las células en suspensión, pero puede dañar tejidos y órganos, en los cuales el mantenimiento de la arquitectura extracelular es crucial. Cuando la congelación es rápida, las células no son capaces de depender del agua para mantener el equilibrio, sufren un super - enfriamiento y eventualmente, alcanzan el equilibrio por congelación intracelular lo que puede inducir el daño celular (Gil-Loyzaga, 2011). Sin embargo, se ha demostrado que cuanto más rápida es la velocidad de congelación, más pequeños son los cristales, así si el enfriamiento es suficientemente rápido, los cristales que se forman son muy pequeños y las células toleran mejor su presencia aumentando la viabilidad como se observa en los resultados obtenidos para la vitrificación de la membrana amniótica completa y el estroma de la membrana.

En ambos métodos de criopreservación es posible mantener una membrana basal continua pero solo por medio de la vitrificación es posible obtener un estroma avascular intacto, indicando que el método de criopreservación por vitrificación permite preservar mejor la membrana amniótica desnuda en comparación con la criopreservación con glicerol. Sin embargo, como se ha señalado para la aplicación de la membrana amniótica y del estroma de la membrana amniótica humana como biosustrato y en terapia el requisito primordial es la conservación de la membrana basal y la matriz extracelular mas no de las células epiteliales y/o células mesenquimales estromales (Niknejad y col., 2008; Muñoz, 2010).

## **7.7. Evaluación morfológica e inmunocitoquímica de los cultivo de las células epiteliales amnióticas sobre el estroma de la membrana amniótica humana**

Con el fin de analizar la capacidad del estroma de la membrana amniótica humana como biosustrato se ensayó el cultivo de células epiteliales amnióticas sobre el estroma avascular fresco, criopreservado por glicerol y vitrificado usando como estrategia de cultivo, el cultivo tridimensional. Particularmente, el uso de este modelo de cultivo, ha brindado la posibilidad de simular un microambiente y un soporte estructural similar al que se encuentra en condiciones *in vivo* permitiendo examinar las características morfológicas, la proliferación e interacción intercelular de las células epiteliales amnióticas cuando son cultivadas sobre un biosustrato tridimensional derivado de la membrana amniótica humana. En este sentido los resultados evidenciaron que el patrón de adhesión de las células epiteliales amnióticas humanas, presentaron diferencias en cuanto a la capacidad de adhesión y proliferación característica de las células cuando éstas son cultivadas sobre el estroma amniótico fresco, criopreservado con glicerol y vitrificado.

De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo observar en la evaluación histológica realizada a la membrana amniótica humana recién denudada con la enzima Dispasa II (control negativo), la ausencia de la capa epitelial amniótica indicando que la denudación fue completa y exitosa, y que al momento de realizar el cultivo de las células epiteliales sobre el estroma de la membrana amniótica no habían restos de células epiteliales amnióticas sobre este. Además nos permitió evidenciar la presencia de una membrana basal intacta formando un plano por debajo del cual se distinguen las células mesenquimales incluidas en la matriz extracelular.

Con respecto a las células epiteliales amnióticas cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica en fresco (sin criopreservación), se pudo apreciar una buena adhesión por parte de las células epiteliales sobre dicha capa estromal, las cuales formaron una monocapa donde se evidenciaron una gran cantidad de células con morfología similar a poligonal organizadas unas al lado de las otras e integradas con el tejido formando un epitelio similar a un epitelio simple que resultaron positivo a la expresión de Pan-CK y E-cadherina, encontrando que las características histológicas de estas células fue similar a las observadas en la membrana amniótica humana completa (Niknejad y col., 2008; Ilancheran y col., 2009; Dobrova y col., 2010; Díaz-Prado y col., 2011). Además, la membrana amniótica humana en fresco provee un microambiente favorable que permite la proliferación y el mantenimiento *in vitro* del fenotipo de las células como se ha encontrado en trabajo realizados por Yang y col. (2006), quienes demostraron que el amnios

denudado sirve como sustrato para la construcción de una equivalente de piel humana al cultivar queratinocitos sobre la membrana amniótica denudada.

Por su parte, en los cultivos de las células epiteliales amnióticas sobre el estroma de la membrana amniótica vitrificada se observaron células epiteliales adheridas sobre el biosustrato vitrificado y una alta proliferación de las células que fue corroborado por la evaluación histológica, donde se evidenció una capa epitelial formada por células con morfología poligonal dispuestas a lo largo de la membrana basal con una organización similar a la observada en los cultivos de las células epiteliales sobre el estroma amniótico fresco, las cuales fueron positivas contra Pan-CK y E-cadherina. Estudios recientes han demostrado que las células madre limbales pueden proliferar rápidamente y formar un epitelio normal sobre la membrana amniótica humana denudada y vitrificada (Baharvand y col., 2007; Rendal y col., 2012). De igual manera, al realizar los subcultivos de las células epiteliales amnióticas sobre el estroma de la membrana vitrificado se obtuvo la formación de una capa epitelial simple con células poligonales adheridas al estroma e integradas al tejido como habría de esperarse de acuerdo a lo expuesto anteriormente demostrándose que la membrana amniótica humana vitrificada sirve de sustrato para amplificar los cultivos de las células epiteliales amnióticas similar a lo obtenido en cultivos de las células epiteliales del limbo (Meller y col., 2000).

En contraste, al observar los resultados para las células epiteliales amnióticas cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica criopreservado con glicerol, se pudo apreciar baja adhesión de las células epiteliales al estroma amniótico y algunos grupos de células bajo las condiciones de conservación suministradas al estroma. Así mismo, al realizar el análisis histológico se evidenciaron células con morfología poligonal adheridas al estroma criopreservado lo que no concuerda con lo reportado por varios autores al cultivar células epiteliales límbicas (Koizumi y col., 2000b; Baharvand y col., 2007), endoteliales de la córnea (Ishino y col., 2004) y melanocitos (Redondo y col., 2011) sobre la membrana amniótica humana denudada y criopreservada con glicerol. Además, se pudo observar que la tasa de adhesión entre los diferentes cultivos presentó un patrón de diferencia, encontrándose una baja tasa de adhesión al cultivar células epiteliales amnióticas sobre el estroma criopreservado con glicerol en comparación a lo encontrado en los cultivos de las células epiteliales sobre el estroma fresco y vitrificado, donde se obtuvo una alta adhesión y proliferación de las células desde el primer día de cultivo. Estas diferencias en el patrón de adhesión podrían explicarse por las propiedades que presentan los sustratos luego de su criopreservación y además a las interacciones resultantes entre las células y la matriz extracelular (Jin y col., 2007).

Las células epiteliales obtenidas a partir de la membrana amniótica humana mantuvieron la característica morfológica poligonal y aparentes uniones intercelulares que expresan en el tejido nativo. Esto se debe a la simulación de un microambiente constituido por un medio apropiado (DMEM/F12, 15% SFB, EGF) y un biosustrato rico en colágeno y fibronectina, el cual favorece el cultivo de las células epiteliales. Además, se ha señalado que el EGF mantiene y estimula el crecimiento de las células epiteliales manteniéndose las uniones intercelulares y la interacción con la membrana basal.

Como se ha mencionado anteriormente, se han empleado una serie de anticuerpos monoclonales que permiten reconocer específicamente a las células epiteliales. De esta forma en diversos estudios se han utilizado Pan-CK y E-cadherinas. En este trabajo, los resultados obtenidos para las determinaciones inmunocitoquímicas realizadas a las células epiteliales amnióticas cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica humana en fresco y vitrificada mostraron una expresión positiva y una amplia distribución de estos marcadores en las células presentes en la capa epitelial de la membrana amniótica, alrededor del núcleo y en las uniones intercelulares, indicando que las células presentes en el nuevo epitelio formado era de naturaleza epitelial, lo que concuerda con los diferentes estudios que se han realizado sobre estas células epiteliales amnióticas (Regauer y col., 1985; Miki y col., 2005; Ilancheran y col., 2009; Díaz-Prado y col., 2010a; Niknejad y col., 2010; Manuelpillai y col., 2011) y con células epiteliales del iris cultivadas sobre la membrana amniótica desnuda y criopreservada en glicerol (Ohno-Matsui y col., 2006).

## 8. CONCLUSIONES

1. La caracterización histológica de la membrana amniótica humana, reveló la obtención de un tejido semi-transparente y delgado formado por un epitelio simple de células cuboidales, una membrana basal gruesa y un estroma avascular.
2. La denudación de la membrana amniótica humana con la enzima Dispasa es un método efectivo y útil para la remoción del epitelio amniótico de la membrana amniótica humana, lo que permite el aislamiento y la fácil obtención de las células epiteliales viables para lograr establecer los cultivos celulares.
3. La heterogeneidad de las poblaciones presentes en los cultivos primarios y subcultivos nos puede indicar que existen subpoblaciones celulares en el epitelio de la membrana amniótica humana.
4. Se establecieron las condiciones óptimas que permitieron el mantenimiento y proliferación a mediano plazo de las células epiteliales amnióticas, tanto en los cultivos primarios como en los subcultivos. Estas fueron expandidas hasta un 2<sup>do</sup> pasaje sin rasgos aparentes asociadas a senescencia.
5. La caracterización morfológica e inmunocitoquímica de los cultivos, revelaron la presencia de células con características de células epiteliales amnióticas, las cuales en su mayoría, corresponden a células con morfología poligonal en estado indiferenciado y de origen epitelial, indicado por el buen grado de expresión de Pan-CK y E-cadherina, respectivamente.
6. La criopreservación de la membrana amniótica humana, permite mantener las características de la membrana basal y del estroma avascular.
7. El hecho de que las células epiteliales cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica en fresco y vitrificada tenga una buena adhesión, crecimiento, además del mantenimiento de la morfología epitelial expresando los marcadores Pan-CK y E-cadherina nos permite validar su uso como biosustrato tridimensional para los cultivos celulares.

## 9. RECOMENDACIONES

1. Ampliar los ensayos de caracterización celular, incluyendo determinaciones inmunocitoquímicas con marcadores específicos de superficie expresados en células madre de naturaleza epitelial, las cuales podrían ser evaluadas, por medio de citometría de flujo y análisis ultraestructural mediante microscopia electrónica de transmisión.
2. Realizar determinaciones histoquímicas e inmunohistoquímicas con marcadores específicos para determinar la presencia de colágeno, fibronectina y laminina en la matriz extracelular del estroma de la membrana amniótica, con el propósito de determinar la composición de la matriz antes y después de la criopreservación.
3. Ampliar los ensayos de evaluación del potencial del estroma de la membrana amniótica como biosustrato mediante el uso de otros tipos celulares para determinar adhesión, proliferación y migración de las células cultivadas sobre el mismo.

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Abdulrazzak, H., Moschidou, D., Jones, G., Guillot, O. 2010. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *J. R. Soc. Interface.* **7**:S869 – S706.
2. Adam, J. Watt, F. 1993. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Dev.* **117**: 1183 – 1198.
3. Akashi, T., Miyagi, T., Ando, N., Suzuki, Y., Nemoto, T., Eishi, Y., Nakamura, K. y colaboradores. 1999. Synthesis of basement membrane by gastrointestinal cancer cell lines. *J. Pathol.* **187**: 223 – 228.
4. Alviano, F., Fossati, V., Marchionni, C., Arpinati, M., Bonsi, L., Franchina, M., Lanzoni, G., Cantoni, S. Y colaboradores. 2007. Term amniotic membrane is a high throughput source formultipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells *in vitro*. *Bmc. Dev. Biol.* **7**:11.
5. Amemiya, T., Nakamura, T., Yamamoto, T., Kinoshita, S., Kanamura, N. 2010. Tissue engineering by transplantation of oral epithelial sheets cultivated on amniotic membrane for oral mucosal reconstruction. *Inflammation and Regeneration.* **30(3)**: 176 – 180.
6. Amer, M., Abd-El-Maebound, K., Alloub, A. 2012. Amnion graft as a possible source of stem cells for endometrial regeneration after lysis of severe intrauterine adhesions. *Middle East Fertility Society Journal.* **17(1)**: 54 – 56.
7. Anzaldúa, S., Juárez, L., Villaseñor, H., Ríos, M., Cornejo, M., Meraz, M. 2007. ¿Qué son las células troncales o células madre? *Veterinaria México.* **38(1)**: 81 – 104.

8. Araos, C. 2009. Cultivo de células madre mesenquimales del cordón umbilical humano. Potencialidad ósteo – condrogénica *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central De Venezuela. Caracas, Venezuela.
9. Aquino, C., Santa, F. 2008. Citoqueratinas en dermatología. *Rev. Mex.* **52(6)**: 254 – 256.
10. Ávila-Portillo, L., Madero, J., López, C., León M., Acosta L., Gómez, C., Delgado, L. y colaboradores (2006). Fundamentos de criopreservación. *Rev. Colomb. Obstetricia Y Ginecología*. **57 (4)**: 291 – 300.
11. Azuara-Blanco, A., Pillai, C., Dua, H. 1999. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br. J. Ophthalmol.* **83**: 399 - 402.
12. Baguneid, M., Seifalian, A., Salacinski, H., Murray, D., Hamilton, G., Walker, M. 2006. Tissue engineering of blood vessels. *Br. J. Surg.* **93**: 282 - 290.
13. Bahadori, M., Soltani, B., Mirzajani, E., Babaei, P., Masou, M., Jalali, M. 2009. Cryopreservations of rat bone marrow derive mesenchymal stem cells by two conventional and open-pulled straw vitrification methods. *Yakhteh Medical Journal.* **11(3)**: 317 – 326.
14. Baharvand, H., Heidari, M., Ebrahimi, M., Valadbeigi, T., Salekdeh, G. 2007. Proteomic analysis of epithelium-denuded human amniotic membrane as a limbal stem cell niche. *Mol. Vis.* **13**: 1711 – 1721.
15. Barrilleaux, B., Phinney, D., Prockop, D., O'Connor, K. 2006. Review: *ex vivo* engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Eng.* **12**: 3007 - 3019.
16. Becker, A., McCulloch, E., Till, J. 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. **197**: 452 – 454.
17. Bello, G., Merentes, E., Arvelo, F. 1998. Cultivo de queratinocitos humanos *in vitro*. *Gaceta Médica.* **106(4)**: 491 – 495.

18. Benirschke, K., Kaufman, P. 2000. Pathology of the human placenta. Editorial Springer, cuarta edición. New York, United States Of America.
19. Bianchi, D., Wilkins-Haug, L., Enders, A., Hay, E. 1993. Origin of extraembryonic mesoderm in experimental animals: relevance to chorionic mosaics in humans. *Am. J. Med. Genet.* **46**: 542 -550.
20. Bianco, P., Gehron, P. 2000. Marrow stromal cells. *J. Clin. Invest.* **105**: 1663 – 1668.
21. Bianco, P., Gehron, P., Simmons, P. 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts and assays. *Stem Cells.* **2**: 313 – 319.
22. Bilic, G., Zeisberger, S., Mallik, A., Zimmermann, R., Zisch, A. 2008. Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy. *Cell Transplantation.* **17**: 955 - 968.
23. Boiani, M., Scholer, H. 2005. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**: 872 – 884.
24. Boudreau, N., Sympon, C., Werb, Z. 1995. Suppression of ice and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science.* **256**: 891 – 893.
25. Bourne, G. 1960. The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *Obstet. Gynec.* **79**: 1070 – 1073.
26. Bourne, G. 1962. The foetal membranes. A review of the anatomy of normal amnion and chorion and some aspects of their function. *Postgrad. Med. J.* **38**: 193 – 201.
27. Brinchmann, J. 2008. Expanding autologous multipotent mesenchymal bone marrow stromal cells. *Cytotherapy.* **14**: 320 – 330.

28. Calderón, D. 2007. Establecimiento del cultivo de células mesenquimales del cordón umbilical humano y estudio de su potencialidad de diferenciación *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad De Carabobo. Valencia, Venezuela.
29. Calvin, S., Oyen, M. 2007. Microstructure and mechanics of the chorioamnion membrane with and emphasis on fracture properties. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1101**: 166-185.
30. Campos, Z., Gris, D. 2002. Aplicaciones de la membrana amniótica en patología ocular. *Annals.D`Oftamologia*.**10 (3)**: 128 – 141.
31. Carlin, R., Davis, D., Weis, M., Schultz, B., Troyer, D. 2006. Expression of early transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog by porcine umbilical cord (puc) matrix cells. *Reprod. Biol. Endocrin.* **4**: 8 – 21.
32. Casaroli, R., Martines, E., Otero, N., Agusti, E. Adán, A., Trías, E., Miranda, B. 2008. Estudio comparativo a corto y mediano plazo de los métodos de conservación para la membrana amniótica con finalidad bio-sustitutiva y terapéutica. III Congreso de la Asociación Española de Bancos de Tejidos. Valencia, España.
33. Cascales, M. 2009. Envejecimiento de las células madre. Instituto de la Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, España.
34. Casey, M., Word, R., Macdonald, O. 1991. Endothelin-1 gene expression and regulation of endothelin mRNA and protein biosynthesis in avascular human amnion. Potential source of amniotic fluid endothelin. *J. Biol. Chem.* **266**: 5762 - 5768.
35. Cespedes, R., Reyes, A. 2007. Marcadores de estrés oxidativo en ratas senescentes. *Rev. Cubana Inest. Bioméd.***26**: 12 – 25.

36. Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. **113**: 643 - 655.
37. Chen, H., Pires, R., Tseng, S. 2000. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. *Br. J. Ophthalmol.* **84**: 826 - 833.
38. Chian, R., Kuwayama, M., Tan, J., Kato, O., Nagai, T. 2004. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. *J. Reprod. Dev.* **50**: 685 – 696.
39. Cho, H., Son, W., Yoon, S., Lee, S., Lim, J. 2001. An improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts. *Hum. Reprod.* **17**: 2419 – 2422.
40. Davis, J. 1910. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med. J.* **15**: 307
41. De Roth. 1940. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch. Ophthalmol.* **23**: 522 – 525.
42. De Melo. G., Gomes, J., Da Gloria, M., Martinsm M., Haapalainen, E. 2007. Morphological assessment Of: Different amniotic membrane epithelial denuding techniques. *Arq. Bras. Oftalmol.* **70**: 407 – 411.
43. 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(2)**: 183 – 195.
44. Díaz-Prado, S., Muiños, E., Hermida, T, Rendal, M, Fuentes, I., De Toro, F., Blanco, F. 2010b. Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J. Cell. Biochem.* **111**: 846 - 857.

45. Díaz-Prado, S., Muiños, E., Hermida-Gómez, T, Cicione, C., Rendal, M., Fuentes, I., De Toro, F. y colaboradores. 2011. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. *Differentiation*.**1**: 162 – 171.
46. Dobreva, M., Pereira, P., Deprest, J., Zwijsen, A. 2010. On the origin of amniotic stem cells: of mice and men. *Int. J. Dev. Biol.* **54**: 761 – 777.
47. Dobrinsky, J. 2002. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*. **67**: 285 – 302.
48. Dominic, M., Le Blanc, K., Muller, I. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*.**8**: 315 – 317.
49. Donovan, P., Gearhart, J. 2001. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*. **414**: 92 - 97.
50. Ema, H., Takano, H., Sudo, K., Nakauchi, H. 2000. In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* **192**: 1281-1288
51. Erices, A., Conget, P., Minguell, J. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.***109**: 235 – 242.
52. Espana, E., Romano, A., Kawakita, T., Di Pascuale, M., Smiddy, R., Tseng, N. 2003. Novel enzymatic isolation of an entire viable human limbal epithelial sheet. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**: 4275 – 4281.
53. Evangelista, M., Soncini, M., Parolini, O. 2008. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? *Cytotechnology*. **58(1)**: 33 – 42.

54. Evans, M., Kaufman, M. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. **292**: 154 – 156.
55. Evron, A., Goldman, S., Shalev, E. 2012. Human amniotic epithelial cells differentiate into cells expressing germ cell specific markers when cultured in medium containing serum substitute supplement. *Reprod. Biol. Endocrin.* **10**: 108 – 120
56. Fan, T., Sui, H., Zhao, J., Cong, R. 2012. Method for reconstructing tissue engineered human corneal endothelium. DOI: EP2412799a1. <http://www.freepatentsonline.com>. Consulta: [10 de Enero de 2013].
57. Fatima, A., Sangwan, V., Iftekhar, G., Reddy, P., Matalia, H., Balasubramanian, D., Vemuganti, G. 2006. Technique of cultivating limbal derived corneal epithelium on human amniotic membrane for clinical transplantation. *J. Postgrad. Med.* **52**: 257 - 261.
58. Fernández, K., Gómez, Z., Castillo, A., Pérez, Z., Jareño, M., Perea, C. 2012. Autoinjerto conjuntival y membrana amniótica en la cirugía del pterigión primario. *Rev. Cubana Oftalmología*. **25(2)**: 1561 – 3070. <http://www.revoftalmologia.sld.cu/index.php/oftalmologia/article/view/42/html>. [Consulta: 7 de Enero de 2013].
59. Fernández, M., Sridhar, M., Sangwan, V., Rao, G. 2005. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Cornea*. **24**: 643 - 653.
60. Flores, E., Montesinos, J., Mayani, H. 2006. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *RIC*. **58**: 498 – 511.
61. Forbes, S., Vig, P., Poulsom, R., Wright, N., Alison, M. 2002. Adult stem cells plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. *Clin. Sci.* **103**: 355 – 369.
62. Freshney I. 2000. Culture of animal cells. A manual of basic technique. Editorial Wiley-liss, cuarta edición. Toronto, Canada.

63. Friedenstein, A., Gorskaja, J., Kulagina, N. 1974. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. *Exp. Hematol.* **2**: 83 – 92.
64. Fukuda, K., Chikama, T., Nakamura, M., Nishida, T. 1999. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea and conjunctiva. *Cornea*. **18 (1)**: 73 – 79.
65. Gajada, B., Katska-Ksiazkiewicz, L., Rynska, B., Bochenek, M., Smorag, Z. 2007. Survival of bovine fibroblasts and cumulus cells after vitrification. *Cryo. Letters.* **23(2)**: 271 – 279.
66. Ganatra, M. 2003. Amniotic membrane in surgery. *J. Pak. Med. Assoc.* **53**: 29 – 32.
67. García, C. 2012. Aislamiento y caracterización de las células madre de la membrana amniótica. Una nueva fuente para terapia celular e inmuno-modulación. Tesis Doctoral. Universidad De Murcia, España.
68. Geneser, F. 2003. Histología. Editorial Médica Panamericana, tercera edición. Buenos Aires, Argentina.
69. Geggel, H., Gipson, I. 1985. Removal of viable sheets of conjunctival epithelium with dispase II. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **26**: 15 – 22.
70. Gibson, I., Grill, S. 1982. A technique for obtaining sheets of intact rabbit corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **23**: 269 – 273.
71. Gibson, I. 1989. The epithelial basement membrane zone of the limbus. *Eye.* **3(2)**: 132.
72. Gil-Loyzaga, P. 2011. Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa. Editorial Visión Libros. Primera Edición. Madrid, España

73. Gilbert, S. 2006. *Biología del desarrollo*. Editorial Médica Panamericana, séptima edición. Buenos Aires, Argentina.
74. Gómez, R. 2009. Human amniotic epithelial cells: isolation and characterization. Editorial Vvb Laufer Weiler, primera edición, Giessen, Alemania.
75. Heng, B. 2009. Effect of rho-associated kinase (rock) inhibitor y-27632 on the post-thaw viability of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Cell*. **41(5)**: 376 – 380.
76. Hennerbichler, S., Reichl, B., Pleiner, D., Gabriel, C., Eibl, J., Redl, H. 2007a. The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. *Cell Tissue Bank*. **8(1)**: 1 – 8.
77. Hennerbichler, S., Reichl, B., Wolbank, S., Eibl, J., Gabriel, C., Redl, H. 2007b. Cryopreserved amniotic membrane releases angiogenic factors. *Wound Rep. Reg.* **15**: A51.
78. Hernández, P., Dorticós, E. 2004. Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. *Rev. Cubana. Hematol. Inmunol.* **20 (3)**: 0 – 0.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s086402892004000300001&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s086402892004000300001&lng=es&nrm=iso).  
 [Consulta: 24 de Abril de 2012].
79. Ho, A., Wagner, W., Franke, W. 2008. Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy*. **14**: 320 – 330.
80. Hopkinson, A., Shanmuganathan, V., Gray, T., Yeung, A., Lowe, J., James, D., Dua, H. 2008. Optimization of amniotic membrane (am) denuding for tissue engineering. *Tissue Eng. Part. C. Methods*. **14**: 371 -381.
81. Huang, G., Ji, S., Luo, P., Liu, H., Zhu, S., Wang, G., Zhou, P. y colaboradores. 2012. Accelerated expansion of epidermal keratinocyte and improved dermal reconstruction achieved by engineered

- amniotic membrane. *Cell Transplant*.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23067579>. [Consulta: 20 De Enero De 2012].
82. Hurme, M., Lahdenpohja, N., Santtila, S. 1998. Gene polymorphisms of interleukins 1 and 10 in infectious and autoimmune diseases. *Ann. Med.* **30**: 469 – 473.
83. Ilancheran, S., Michalska, A., Peh, G., Wallace, E., Pera, M., Manuelpillai, U. 2007. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol. Reprod.* **77**: 577 - 588.
84. Ilancheran, S., Moodley, Y., Manuelpillai, U. 2009. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta*.**30**: 2 – 10.
85. Insausti, C., Blanquer, M., Majado, M., Insausti, A., Moraleda, J. 2011. Utilidad terapéutica potencial de las células madre de la membrana amniótica. *Rev. Menatol. Mex.* **12(4)**: 276 – 286.
86. In't Anker, P., Scherjon, S., Kleijburg, C., De Groot, G., Claas, F., Fibbe, W., Kanhai, H. 2004. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells.* **22**: 1338 – 1345.
87. Irfan, Z., Fareeha, A., Wajid, A. 2010. Technique for processing and preservation of human amniotic membrane for ocular surface reconstruction world academy of science. *Engineering and Technology.* **69**: 763 – 766.
88. Irías, A. 2003. Medicina Del Futuro. Las células madre. *Rev. Med. Hond.* **71(4)**: 215 – 217.
89. Ishino, Y., Sano, Y., Nakamura, T., Connon, C., Rigby, H., Fullwood, N., Kinoshita, S. 2004. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45(3)**: 800 – 806.

90. Ivanova, N., Dimos, J., Schaniel, C., Hackney, J., Moore, K., Lemichka, I. 2002. A stem cell molecular signature. *Science*. **298**: 601 - 604.
91. Jacques, C., De Aquino, A., Ramos, S. 2005. Cytokeratins and dermatology. *Skinmed*.**4**: 354 – 360.
92. Jin, C., Park, S., Choi, B., Lee, K., Kang, C., Min, B. 2007. Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair. *Tissue Eng*. **13**: 693 – 702.
93. Kadam, S., Muthyala, S., Nair, P., Bhonde, R. 2010. Human-placenta derived mesenchymal stem cells and islet-like cell clusters generated from these cells as a novel source for stem cell therapy in diabetes. *Rev. Diabet. Stud*. **7(2)**: 168 – 182.
94. Kalliopi, L., Kolibianakis, E., Venetis, C. 2008. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. **90**: 186 – 193.
95. Kalluri, R. 2009. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J. Clin. Invest*. **119**: 1417 - 1419.
96. Kalluri, R., Weinberg, R. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest*. **119**: 1421 -1428.
97. Kang, N., Yi, B., Lim, S., Hwang, K., Baek, Y., Kang, K., Choi, K. 2012. Human amniotic membrane-derived epithelial stem cells display anticancer activity in balb/c female nude mice bearing disseminated breast cancer xenografts. *Internacional JournalOf Oncology*. **40(6)**: 2022 – 2028.
98. Kasai, M., Mukaida, T. 2004. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod. Biomed*. **9**:164 – 170.
99. Keating, A. 2006. Mesenchymal stromal cells. *Curr. Opin. Hematol*. **13**: 419 – 425.

100. Khodadoust, A., Silverstein, A., Kenton, D. 1968. Adhesion of regenerating corneal epithelium. The role of basement membrane. *Am. J. Ophthalmol.* **65**: 339 – 348.
101. Kim, J., Tseng, S. 1995. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea.* **14**: 473 – 484.
102. King, B. 1985. Related distribution and characterization of amniotic sites in the basal lamina of developing human amniotic epithelium. *Anat. Rec.* **212**: 57 – 62.
103. Klein, C., Dressel, D., Steinmayer, T., Mauch, C., Eckes, B., Krieg, T., Banker, R. y colaboradores. 1991. Integrin alpha 2 beta 1 is up-regulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen fibrils. *J. Cell Biol.* **115**: 1427 – 1436.
104. Knight, E., Evans, G. 2004. Tissue engineering: progress and challenges. *Plast. Reconstr. Surg.* **114**:26E - -37E.
105. Koizumi, N., Fullwood, N., Bairaktaris, G., Inatomi, T., Kinoshita, S., Quantock, A. 2000a. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41(9)**: 2506 – 2513.
106. Koizumi, N., Inatomi, T., Quantock, A., Fullwood, N., Dota, A., Kinoshira, S. 2000b. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea.***19**: 65 – 71.
107. Koizumi, N., Rigby, H., Fullwood, N., Kawasaki, S., Tanioka, H., Koizumi, K., Kociok, N. y colaboradores. 2007. Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. *Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **245**: 123 – 134.

108. Kotobuki, N., Hirose, M., Machida, H., Katou, Y., Muraki, K., Takakura, Y., Ohgushi, H. 2005. Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. *Tissue Eng.***11**: 663 – 673.
109. Kuleshova, L., Gianaroli, L., Magli, C., Ferraretti, A., Trounson, A. 1999. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum. Reprod.* **14**: 3077 – 3079.
110. Kruse, F., Jousseaume, A., Rohrschneider, K. 2000. Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **238**: 68 – 75.
111. Lee, M., Choi, J., Yang, M., Moon, Y., Park, J., Kim, H., Kim, Y. 2004. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**: 273 – 278.
112. Li, W., He, H., Kuo, C., Gao, Y., Kawakita, T., Tseng, S. 2006. Basement membrane dissolution and reassembly by limbal corneal epithelial cells expanded on amniotic membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.***47**: 2381 – 2389.
113. Lim, L., Riau, A., Poh, R., Tan, D., Beuerman, R., Mehta, J. 2009. Effect of dispase denudation on amniotic membrane. *Molecular Vision.***15**: 1962 – 1970.
114. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Ziprosky, L y colaboradores. 2005. Biología celular y molecular. Editorial Médica Panamericana. Quinta edición. Caracas, Venezuela.
115. Lockett, W. 1978. Origin and differentiation of the yolk sac and extraembryonic mesoderm in presomite human and rhesus monkey embryos. *Am. J. Anat.***152**: 59 - 97.
116. Malak, T., Ockleford, C., Bell, S., Dalglish, R., Bright, N., Macvicar, J. 1999. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta.* **14**: 385 – 406.

117. Mamede, A., Carvalho, M., Abrantes, A., Laranjo, M., Maia, C., Botelho. 2012. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell Tissue Res.* **349**: 447 – 458.
118. Mano, J., Silva, G., Azevedo, S., Malafaya, P., Sousa, R., Silva, S., Boesel, L. y colaboradores. 2007. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J. R. Soc. Interface.* **4**: 999 - 1030.
119. Manuelpillai, U., Moodley, Y., Borlongan, C., Parolini, O. 2011. Amniotic membrane and amniotic cells: potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis?. *Placenta.* **32**: s320 – s325.
120. Marcus, A., Coyne, T., Rauch, J., Woodbury, D., Negro, I. 2008. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. *Differentiation.* **76**: 130 – 144.
121. Marengo, A., Vechyo, C. 2006. Cobertura temporal con membrana amniótica radio –esterilizada. *Cirugía Plástica.* **16(3)**: 121 – 125.
122. Marler, J., Upton, J., Langer, R., Vacanti, J. 1998. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **33**:165 - 82.
123. Márquez, M., Hernández, A., Scioscia, D., Merentes, E. 2012. Cultivo de células de cartílago nasal humano. *Gaceta Médica.* **120(1)**: 48 - 54.
124. Martínez, J., Martínez, J. 2010. Revisión sobre filamentos intermedios, con especial referencia a las citoqueratinas. *Revista Complutense De Ciencias Veterinarias.* **4(2)**: 1 – 11.
125. Mayani, R. 2011. 50 años del descubrimiento de las células troncales hematopoyéticas. *Rev. Hemato. Mex.* **12 (1)**: 5 – 6.

126. McDonald, C., Siatskas, C., Bernard, C. 2011. The emergence of amnion epithelial stem cells for the treatment of multiple sclerosis. *Inflammation And Regeneration*. **31(3)**: 256 – 271.
127. Melero-Martin, J., Alrubei, M. 2007. In vitro expansion of chondrocytes. *Topics Tissue Eng*. **3**: 1 - 37.
128. Meller, D., Tseng, S. 1999. Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. **40**: 878 – 886.
129. Meller, D., Pires, R., Mack, R., Figueiredo, F., Heiligenhaus, A., Park, W., Prabhasawat, P., y colaboradores. 2000. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology*. **107**: 980 - 989.
130. Merentes, E. 1993. Establishment of embryonic stem cells lines (ES) and their developmental potentiality. Tesis Doctoral. Universidad De Ciencias Eötvös Lorand, Budapest, Hungría.
131. Merentes, E. 2000. Modelos *in vitro* para el estudio de la diferenciación celular. Trabajo de Ascenso a Asociado. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela
132. 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.
133. Meyer, M. 2012. Establecimiento del cultivo de células madre mesenquimales de la membrana amniótica de fetos de ratón. Caracterización y diferenciación *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central De Venezuela. Caracas, Venezuela.
134. Mihiu, C., Mihiu, D., Costin, N., Ciucă, D., Şuşman, S., Ciortea, R. 2008. Isolation and characterization of stem cell from the placenta and the umbilical cord. *Rom. J. Morphol. Embryo*. **49(4)**: 441 – 446.

135. Miħu, C., Ciucă, D., Soritău, O., Őuşman, S., Miħu, D. 2009. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. *Rom. J. Morphol. Embryo*. **50(1)**: 73 – 77.
136. Miki, T., Lehmann, T., Cai, H., Stolz, D., Strom, S. 2005. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*.**23**: 1549 – 1559.
137. Miki, T., Strom, S. 2006. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Rev.* **2**:133 – 142.
138. Miki, T., Mitamura, K., Ross, M., Stolz, D., Strom, S. 2007. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J. Reprod. Immunol.***75**: 91 - 96.
139. Mimeault, M., Hauke, R., Batra, S. 2007. Stem cells: a revolution in therapeutics- recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin. Pharmacol. Ther.***82 (3)**: 252 - 264.
140. Minguell, J., Erices, A., Conget, P. 2001. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.***226**: 507 – 520.
141. Mitsiadis, T., Barradon, O., Rochat, A., Barrandon, Y., De Bari, C. 2007. Stem cell niches in mammals. *Exp. Cell Res.***313**: 3377 – 3385.
142. Mligiliche, N., Endo, K., Okamoto, K., Fujimoto, E., Ide, C. 2002. Extracellular matrix of human amnion manufactured into tubes as conduits for peripheral nerve regeneration. *J. Biomed. Mater. Res.* **63**: 591 – 600.
143. Mohammad, J., Shenaq, J., Rabinovsky, E., Shenaq, S. 2000. Modulation of peripheral nerve regeneration: a tissue-engineering approach. The role of amnion tube nerve conduit across a 1-centimeter nerve gap. *Plast. Reconstr. Surg.***105**: 660 – 666

144. Moodley, Y., Ilanchera, S., Samuel, G., Vaghjiani, V., Adenza, D. 2010. Human amnion epithelial cell transplantation abrogates lung fibrosis and augment repair. *Am. J. Repair. Crio. Care. Med.* **182**: 643 – 651.
145. Moon, J., Lee, J., Jee, B., Suh, Ch., Kim, S., Lim, H., Kim, H. 2008. Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. *Hum. Reprod.* **23(8)**: 1760 –1770.
146. Moraleda, J., Ruiz, F., Blanquer, M., Arriba, F. 2004. ¿Qué son las células madre? *Hematología Mol.* **3**: 2 - 5.
147. Morton, K., Dewhurst, C. 1986. Human amnion in the treatment of vaginal malformations. *Br. J. Obstet. & Gynaecol.* **93**: 50 - 4.
148. Muiños, E. 2010. La membrana amniótica humana: caracterización de las células madre y su aplicación en terapia celular para reparar lesiones de cartílago articular humano. Tesis Doctoral. Universidad De Coruña, España.
149. 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.
150. Nagy, A., Gócza, E., Merentes, E., Prideaux, V., Iványi, E., Markkula, M., Rossant, J. 1990. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development.* **110**: 815 – 821.
151. Nakajima, Y., Enosawa, S., Mitani, T., Li, X-K., Suzuki, S., Amemiya, H., Koiwai, O. y colaboradores. 2001. Cytological examination of rat amniotic epithelial cells and cell transplantation to the liver. *Cell Transplantation.* **10(4)**: 423 – 427.

152. Nakamura, T., Endo, K., Cooper, L., Fullwood, N., Tanifuji, N., Tsuzuki, M., Koizumi, N y colaboradores. 2003. The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44(1)**: 106 – 116.
153. Nakamura, T., Yoshitani, M., Rigby, H., Fullwood, N., Ito, W., Inatomi, T., Sotozono, C. 2004. Sterilized, freeze – dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**: 93 – 99.
154. Nie, Y., Bergendahi, V., Hei, D., Jones, J., Palecek, S. 2009. Scalable culture and cryopreservation of human embryonic stem cells on microcarriers. *Biotechnol. Prog.* **25(1)**: 20 – 31.
155. Niknejad, H., Peirovi, H., Jorjani, M., Ahmadiani, A., Ghanavi, J., Seifalian, A. 2008. Properties of amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur. Cells Mater.* **15**: 88 – 99.
156. Niknejad, H., Peirovi, H., Ahmadiani, A., Ghanavi, J., Jorjani, M. 2010. Differentiation factors that influence neuronal markers expression *in vitro* from human amniotic epithelial cells. *Eur. Cells Mater.* **19**: 22 – 29.
157. Ochsenbein-Kolbe, N., Bilic, G., Hall, H., Huch, R., Zimmermann, R. 2003. Inducing proliferation of human amnion epithelial and mesenchymal cells for prospective engineering of membrane repair. *J. Perinat. Med.* **31**: 287 - 294.
158. Ohno-Matsui, K., Ichinose, S., Nakahama, K., Yoshida, T., Kojima, A., Mochizuki, M., Morita, I. 2005. The effect of amniotic membrane on retinal pigment epithelial cell differentiation. *Mol. Vis.* **11(1)**: 1 – 10.
159. Ohno-Matsui, K., Mori, K., Ichinose, A., Sato, T., Wang, J., Shimada, N., Kojima, A. y colaboradores. 2006. In vitro and in vivo characterization of iris pigment epithelial cells cultured on amniotic membranes. *Mol. Vis.* **12**: 1022 – 1032.

160. Okita, J., Sagawa, N., Casey, L., Snyder, J. 1983. A comparison of human amnion tissue and amnion cells in primary culture by morphological and biochemical criteria. *In Vitro*. **19(2)**: 117 – 126.
161. Parolini, O., Soncini, M. 2006. Human placenta: a source of progenitor/stem cells? *J.Reprod. Med. Endokrinol.***3(2)**: 117 – 126.
162. Parolini, O., Alviano, F., Bagnara, G., Bilic, G., Bühring, H., Evangelista, M., Hennerbichler, S., 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.
163. Parolini, O., Alviano, F., Bergwerf, I., Boraschi, D., De Bari, C., De Waele, P., Dominici, M. y colaboradores. 2010. Toward cell therapy using placenta derived cells: disease mechanisms, cell biology, preclinical studies, and regulatory aspects at the round table. *Stem Cells Dev*. **19(2)**: 143 – 155.
164. Parolini, O., Soncini, M. 2011. Regenerative medicine using pregnancy-specific biological substances. Editorial Springer. London, Inglaterra.
165. Parry, S., Strauss, J. 1998. Premature rupture of the fetal membranes. *N. Eng. J. Med.***338**: 663 – 670.
166. Pittenger, M., Mackay, A., Beck, S., Jaiswal, R., Douglas, R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. **284**: 143 – 147.
167. Portmann-Lanz, C., 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.

168. Portmann-Lanz, C., Ochsenbein-Kolble, N., Marquardt, K., Luthi, U., Zisch, A., Zimmermann, R. 2007. Manufacture of a cell-free amnion matrix scaffold that support amnion cell outgrowth *in vitro*. *Placenta*. **28**: 6 – 13.
169. Pratama, G., Vaghjiani, V., Yang, J., Han, Y., Chan, J., Tam, Ch., Murthi, P. y colaboradores 2011. Changes in culture expanded human amniotic epithelial cells: implications for potential therapeutic applications. *Plos one*. **6(11)**: 1 – 12.
170. Prósper, F., Gavira, J., Herreros, J., Rábago, G., Luguin, R., Moreno, J., Robales, J. y colaboradores. 2006. Transplante celular y terapia regenerativa con células madre. *An. Sanit. Navar*. **29**: 219 – 234.
171. Raff, M. 2003. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. **19**: 1 – 22.
172. Rall, W., Fahy, G. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °c by vitrification. *Nature*. **313**: 573 – 575.
173. Redondo, P., Gimenez, A., Marques, L., Garcia-Guzman, M., Andreu, E., Prosper, F. 2011. Amniotic membrane as a scaffold for melanocyte transplantation in patients with stable vitiligo. *Dermatology Research And Practice*. DOI: 10.1155/2011/532139
174. Regauer, S., Franke, W., Virtanen, I. 1985. Intermediate filament cytoskeleton of amnion epithelium and cultured amnion epithelial cells: expression of epidermal cytokeratins in cells of a simple epithelium. *J. Cell Biol*. **100**: 997 - 1009.
175. Rendal, M., San Luis A., Pimente, M., López, I., Domenech, N., Andión, C., Blanco, F. 2012. Culture of limbal stem cells on human amniotic membrane. *Cell Tissue Bank*. DOI:10.1007/S10561-012-9300-X. <http://www.springerlink.com/content/e4u4037037628j41>. [Consulta: 21 de Mayo de 2012].

176. Rinastiti, M., Harijadi, Santoso, A., Sosroseno, W. 2006. Histological evaluation of rabbit gingival wound healing transplanted with human amniotic membrane. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.* **35**: 247 - 51.
177. Robson, M., Krizek, T. 1973. The effect of human amniotic membranes on the bacteria population of infected rat burns. *Ann. Surg.* **177**: 144 – 149.
178. Rodríguez, J., Romero, L., Merentes, E., Arvelo, F., Hernández, J., Hernández, C. 2001. Efecto citotóxico de la cocaína en cultivo primario de células del epitelio nasal respiratorio. *Rev. Toxicol.* **18(3)**: 150 – 151.
179. Rodríguez, M. 2005. Establecimiento del cultivo de células del estroma de tejido adiposo de rata y su potencialidad osteo - condrogénica *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
180. Rodríguez-Pardo, V. 2005. Células madre: conceptos generales y perspectivas de investigación. *Universitas. Scientiarum.* **10(1)**: 5 – 14.
181. Rodríguez, M. 2010. Estudio comparativo del potencial de diferenciación hacia el linaje epitelial de las células mesenquimales provenientes del tejido adiposo de rato y humano. Tesis doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
182. Rodríguez, R., Cibelli, J. 2010. Medicina regenerativa y células madre. Editorial consejo superior de investigaciones científicas. España, Madrid.
183. Roh, D., Seo, M., Choi, H., Park, S., Han, H., Beitz, A, Kang, K. y colaboradores. 2013. Transplantation of human umbilical cord blood or amniotic epithelial stem cells alleviates mechanical allodynia after spinal cord injury in rats. *Cell Transplant*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23294734>. [Consulta: 10 de Enero de 2013].

184. Romero, L., Merentes, E., Quijada, G., Arevalo, F. 1995. Utilización de la lectina griffonia simplicifolia (gsII) como marcador de diferenciación *in vitro* de la mucosa gástrica de ratones. *Acta Científica Venezolana*. **46(1)**: 27.
185. Ross, M., Pawlina, W. 2007. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Editorial Panamericana. Quinta edición. Argentina, Buenos Aires.
186. Rota, A., Milani, Ch., Cabianca, G., Martini, M. 2005. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*.**65**: 1848 – 1858.
187. Ruiz, G., Moreno, M., López, M., Vega, M. 2008. *Medicina regenerativa y terapia celular*. Editorial fundación española para el desarrollo de la investigación en genómica y proteómica. Madrid, España.
188. Sabella, N. 1913. Use of fetal membranes in skin grafting. *Med. Rec. Ny*. **83**: 478.
189. Sadler, W. 2000. *Embriología Médica*. Editorial Wolters Kluwer Health. Onceava Edición. España, Barcelona.
190. Sakuragawa, N., Thangavel, R., Mizuguchi, M., Hirasawa, M., Kamo, I. 1995. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. *Neuro. Sci. Lett.***209**: 9 – 12.
191. Sakuragawa, N., Misawa, H., Ohsugi, K., Kakishita, K., Ishii, T., Thangavel, R., Tohyama, J. y colaboradores. 1997. Evidence for active acetylcholine metabolism in human amniotic epithelial cells: applicable to intracerebral allografting for neurologic disease. *Neurosci. Lett.* **232**: 53 - 56.
192. Sakuragawa, N., Kakinuma, K., Kikuchi, A., Okano, H., Ushida, S., Kamo, I. 2004. Human amnion mesenchymal cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. *J. Neurosci. Res.* **78**: 208 - 214.

193. Santos, M., Gomes, J., Hofling-Lima, A., Rizzo, L., Romano, A., Belfort, R. 2005. Survival analysis of conjunctival limbal grafts and amniotic membrane transplantation in eyes with total limbal stem cell deficiency. *Am. J. Ophthalmol.* **140**: 223 - 30.
194. Seder, A., Forte, J. 1964. Effect of calcium depletion on the junctional complex between oxyntic cells of gastric glands. *J. Cell Biol.***30**: 173 – 188.
195. Schmidt, W. 1992. The amniotic fluid compartment: the fetal habitat. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* **127**: 1 – 100.
196. Schneider, R., Neuss, S., Stainforth, R., Laddach, N., Bovi, M., Knuechel, R., Perez-Bouza, A. 2008. Three-dimensional epidermis-like growth of human mesenchymal stem cells on dermal equivalents: contribution to tissue organization by adaptation of myofibroblastic phenotype and function. *Differentiation.* **76**: 156 – 167.
197. Schofield, R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cells and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.***4**: 7 - 25.
198. Schuldiner, M., Yanuka, O., Eldor, J., Melton, D., Benvenisty, N. 2000. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells. *Dev. Biol.* **97**: 11307 – 11312.
199. Shaw, J., Oranratnachai, A., Trounson, A. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocyte and ovarian tissue. *Theriogenology.***53**: 59 – 72.
200. Sierra, R. 1991. Inmunocitoquímica: marcadores epiteliales. Trabajo presentado en el V Congreso Venezolano de Dermatología. Caracas, Venezuela.
201. Sinha, A. 1971. Ultrastructure of human amnion and amniotic plaques of normal pregnancy. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.***122**: 1 – 14.

202. Smith, A. 2001. Embryo - derived stem cells: of mice and men. *Rev. Cell Dev. Biol.* **17**: 435 – 456
203. Sorby, A., Symons, H. 1946. Amniotic membrane graft in caustic burns of eye. *Br. J. Ophthalmol.* **30**: 337 – 345.
204. Sueblinvong, V., Loi, R., Eisenhauer, P., Bernstein, I., Suratt, B., Spess, J., Wiss, D. 2007. Derivation of lung epithelium from human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.***177**: 701 – 11.
205. Sun, C., Cheng, C., Chien, C., Pang, J., Kum W., Chen, P., Yang, C. 2005. Role of matrix metalloproteinase-9 in ex vivo expansion of human limbal epithelial cells cultured on human amniotic membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.***46**: 808.
206. Stadler, G., Hennerbichler, S., Lindenmair, A., Peterbauer, A., Hofer, K., Van Griensven, M., Gabbriel, C., Redl, H. y colaboradores. 2008. Phenotypic shift of human amniotic epithelial cells in culture is associated with reduced osteogenic differentiation *in vitro*. *Cytotherapy.* **10**: 741 - 752.
207. Takashima, S., Ise, H., Zhao, P., Akaike, T., Nikaido, T. 2004. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte – like characteristics and functions. *Cell. Struct. Funct.* **29**: 73 – 84.
208. Tamagawa, T., Ishiwata, I., Saito, S. 2004. Establishment and characterization of a pluripotent stem cell line derived from human amniotic membranes and initiation of germ layers *in vitro*. *Hum. Cell.* **17**: 125 - 130.
209. Tamagawa, T., Ishiwata, I., Ishikawa, H., Nakamura, Y. 2008. Induced *in vitro* differentiation of neural-like cells from human amnion-derived fibroblast-like cells. *Hum Cell.* **21**: 38 - 45.
210. Tejwani, S., Kolari, R., Sangwan V., Rao, G. 2007. Role of amniotic membrane graft for ocular chemical and thermal injuries. *Cornea.***26**: 21 - 6.

211. Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D., Nakano, Y., Meyer, E., Morel, L., Petersen, B., Scott, E. 2002. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cell by spontaneous cell fusion. *Nature*.**416**: 542 – 545.
212. Terada, S., Matsuura, K., Enosawa, S., Miki, M., Hoshika, A., Suzuki, S., Sakuragawa, N. 2000. Inducing proliferation of human amniotic epithelial (HAE) cells for cell therapy. *Cell Transplant*. **9**: 701 – 704.
213. Thomson, J., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S., Waknitz, M., Swiergiel, J., Marshall, V., Jones, J. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. **282**: 1145- 1147.
214. Ti, S., Anderson, D., Touhami, A., Kim, C., Tseng, S. 2002. Factors affecting outcome following transplantation of ex vivo expanded limbal epithelium on amniotic membrane for total limbal deficiency in rabbits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*.**43**: 2584 – 2592.
215. Till, J., McCulloch, E. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res*.**14**: 213 - 222.
216. Toda, A., Okabe, M., Yoshida, T., Nikaido, T. 2007. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J. Pharmacol. Sci*. **105**: 215 – 228.
217. Trefold, J., Trefold-Sauer, M. 1979. The amnion in surgery, past and present. *Am. J. Obstet. Gynecol*. **134**: 833 – 845.
218. Tseng, S., Prabhasawat, P., Barton, K., Gray, T., Meller, D. 1998. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allograft for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch. Ophthalmol*. **116**: 431 - 441.

219. Tsubota, K., Satake, Y., Ohyama, M., Toda, I., Takano, Y., Ono, M., Shinozaki, N. y colaboradores. 1996. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson Syndrome. *Am. J. Ophthalmol.* **122**: 38 - 52.
220. Urbaneja, M., Gugig, M., Bello, R. 1975. Cultivo de tejidos animales. Trabajo de Laboratorio. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
221. Vajta G, Nagy Z. 2006. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed.* **12**: 779–796.
222. Verfaillie, C., Pera, A., Lansdorp, P. 2002. Stem cells: hype and reality. *Hematology.* 369-387
223. Vargas, E., Esquivel, M. 2012. Importancia de células madre tumorales y cultivos de neuroesferas en neurooncología. Biblioteca Nacional de Salud y Seguridad Social. **(25)1**: 55 – 60.
224. Visconti, R., Ksyarov, V., Gentile, C., Zhang, J., Markwold, R., Mironov, V. 2010. Toward organ printing: engineering an intra-organ branched vascular tree. *Expert Opin Biol. Th.* **10(3)**: 409 – 420.
225. Von Versen-Höeynck, F., Powers, R. 2007. Maternal-fetal metabolism in normal pregnancy and preeclampsia. *Front Biosci.* **12**: 2457 – 70.
226. Vossmerbaeumer, U., Ohnesorge, S., Kuehl, S., Haapalahti, M., Kluter, H., Jonas, J., Thierse, H., Bieback, K. 2009. Retinal pigment epithelial phenotype induced in human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.***11**: 177 – 188.
227. Wagers, A., Weissman I. 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell.* **116**: 639 – 648.
228. Walgenbach, K., Voigt, M., Riabikhin, A., Andree, C., Schaefer, D., Galla, T., Bjorn. G. 2001. Tissue engineering in plastic reconstructive surgery. *Anat. Rec.* **263**: 372 – 378.

229. Wang, M., Yang, T., Tang, D., Luo, F., Liang, W., Guo, Sh., Xu, J. 2009. The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells *in vitro*. *Immunology*.**126**: 220 - 232.
230. Watt, F., Hogan, L. 2000. Stem cell and their niches. *Science*. **287**:1427.
231. Wei, J., Zhang, T., Kawa, S., Aizawa, T., Ota, M., Akaike, T., Kato, K. y colaboradores. 2003. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose instreptozotocin-induced diabetic mice.*Cell Transplant*. **12(5)**: 545 – 552.
232. Weismann, I., Anderso, D., Gag, F. 2001. Stem and progenitors cells: origins, phenotypes, lineages commitments, and transdifferentiations. *Dev. Biol*. **17**: 387 – 403.
233. Whittle, W., Gibb, W., Challis, J. 2000. The characterization of human amnion epithelial and mesenchymal cells: the cellular expression, activity and glucocorticoid regulation of prostaglandin output. *Placenta*. **21**: 394 - 401.
234. Wilshaw, S., Kearney, J., Fisher, J., Ingham, E. 2006. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Eng*. **12**: 2117 - 2129.
235. Wolbank, S., Peterbauer, A., Fahrner, M., Hennerbichler, S., Van Griensven, M., Stadler, G. 2007. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng*. **13**: 1173 - 1183.
236. Wolf, H., Schmidt, W., Drenckhahn, D. 1991. Immunocytochemical analysis of the cytoskeleton of the human amniotic epithelium. *Cell Tissue Res*. **266**: 385 – 389.
237. Wu, Z., Hui, G., Lu, Y., Wu, X., Guo, L. 2006. Transplantation of human amniotic epithelial cells improves hindlimb function in rats with spinal cord injury. *Chin. Med. J.***119**: 2101 – 2107.

238. Wu, Z., Hui, G., Lu, Y., Liu, T., Huang, Q., Guo, L. 2012. Human amniotic epithelial cells express specific markers of nerve cells and migrate along the nerve fibers in the corpus callosum. *Neural Regen. Res.* **7(1)**: 41 - 45.
239. Xu, R., Chen, X., Li, D., Li, R., Addicks, G., Glennon, C., Zwaka, T., Thomson, J. 2002. Bmp4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat. Biotechnol.* **20(12)**: 1261 – 1264
240. Yam, H., Pang, C., Fan, D., Fan, B., Yu, E., Lam, D. 2002. Growth factor changes in ex vivo expansion of human limbal epithelial cells on human amniotic membrane. *Cornea.* **21**: 101 – 105.
241. Yang, L., Shirakata, Y., Shudou, M., Dai, X., Tokumaru, S., Hirakawa, S., Sayama, K. y colaboradores. 2006. New skin-equivalent model from de-epithelialized amnion membrane. *Cell. Tissue. Res.* **326**: 69 - 77.
242. Yang, L., Shirakata, Y., Tokumaru, S., Xiojo, D., Tohyama, M., Hanakawa, Y., Hirakawa, S. 2009. Living skin equivalents constructed using human amnions as a matrix. *J. Dermable. Sci.* **56**: 188 – 95.
243. Yang, S., Leong, K, Du, Z., Chua, C. 2001. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Rissue. Eng.* **7**: 679 – 689.
244. Yen, L., Huang, H., Chien, Ch., Jui, H., Ko, B., Yao, M., Shun, Ch. y colaboradores. 2005. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells.* **23**: 3 – 9.
245. Youssry, M., Ozmen, B., Zohni, K., Diedrich, K., Al-Hasani, S. 2008. Current aspects of blastocyst cryopreservation. *Reprod Biomed. Online.***16**: 311 – 320.
246. Zhao, J., Hao, H., Thomas, R., Lyman, W. 2001. An efficient method for the cryopreservation of fetal human liver hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells.* **19**: 212 – 218.

247. Zuk, P., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **7**: 211 – 228.

### **Consultas En Línea**

248. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/17010.htm>[Consulta: 24 De Abril De 2012]

249. Bravo, Y. Capitulo 3. Tejido epitelial [En Línea]. 2003.  
[http://www.http://medicina.unmsm.edu.pe/publicaciones\\_online/libro%20histologia/cap%203\\_tejido%20epitelial%20final.pdf](http://www.http://medicina.unmsm.edu.pe/publicaciones_online/libro%20histologia/cap%203_tejido%20epitelial%20final.pdf). [Consulta: 10 de Febrero de 2013].

250. Zamudio, T. Regulación jurídica de la biotecnología. 3.2. Células madre: embrionarias y de adulto. [En Línea]. 2005. <http://www.biotech.bioetica.org/clase2-17.htm>. [Consulta: 1 de Diciembre de 2012].

## 11. APÉNDICES

### 11.1. Medios y soluciones utilizadas en cultivo celular

**11.1.1. Solución Buffer de Fosfato (PBS) libre de calcio y magnesio** (Cantidades necesarias para preparar 1000 mL)

Cloruro de Sodio (NaCl)	8 grs
Cloruro de Potasio (KCl)	0,2 grs
Di-sodio Hidrógeno Fosfato Dodecahidrato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ )	2,9 grs
Di-hidrógeno de Potasio Primario ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0,2 grs
Agua Bidestilada Deionizada	1000 mL
Antibióticos - Antimicótico	20 mL

**11.1.2. Solución de Dispasa II 1,2 U/mL** (Cantidades necesarias para preparar 100 mL)

Dispasa II 1,8 U/mg	0,0666 grs
Medio de cultivo Ham F-12	100 mL

**11.1.3. Medio nutritivo** (Cantidades necesarias para preparar 1000 mL)

Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO)	637,5 mL
Medio Ham-F12 (F12, GIBCO)	212,5 mL
Suero Fetal de Bovino (SFB.GIBCO)	150 mL
Piruvato de Sodio [1mM]	10 mL
Aminoácidos No Esenciales [1mM]	10 mL
Estreptomicina	400 $\mu\text{L}$ [100 $\mu\text{g/mL}$ ]
Penicilina	1 x $10^5$ U [100 U/mL]
Anfotericina B	2.5 mg [2,5 $\mu\text{g/mL}$ ]
Factor de Crecimiento Epidermal (STOCK 50 $\mu\text{g/mL}$ )	200 $\mu\text{L}$

**11.1.4. Solución de Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,04%** (Cantidades necesarias para preparar 100 mL)

Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA)	0,04 grs
Agua Bidestilada Deionizada	100 mL

**11.1.5. Solución de Tripsina al 0,25%** (Cantidades necesarias para preparar 1000 mL)

Cloruro de Sodio (NaCl)	8 grs
Cloruro de Potasio (KCl)	0,4 grs
Di-sodio Hidrógeno Fosfato Dodecahidrato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ )	0,1 grs
Glucosa Monohidratada	1 grs
Trizma-Base	3 grs
Rojo Fenol	0,01 grs
Penicilina G	0,06 grs
Tripsina	2,5 grs
Solución Buffer de Fosfato (PBS)	1000 mL

**11.1.6. Medio de Congelación** (Cantidades necesarias para preparar 100 mL)

Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO)	50 mL
Glicerol	50 mL

**11.1.7. Solución de Equilibrio** (Cantidades necesarias para preparar 100 mL)

Etilenglicol	20 mL
Solución Buffer de Fosfato (PBS)	80 mL

**11.1.8. Solución de Vitrificación** (Cantidades necesarias para preparar 100 mL)

Etilenglicol	40 mL
Linfoprep	18 mL

Sacarosa	42 mL
----------	-------

Esta solución es suplementada con 20% de SFB.

#### **11.1.9. Solución de Gelatina al 1%** (Cantidades necesarias para preparar 100 mL)

Gelatina	1 grs
----------	-------

Agua Bidestilada Deionizado	100 mL
-----------------------------	--------

### **11.2. Soluciones fijadoras**

#### **11.2.1. Solución de Formalina neutra al 10%** (Cantidades necesarias preparar 100 mL)

Formaldehido al 37%	27 mL
---------------------	-------

Solución Buffer de Fosfato (PBS)	100 mL
----------------------------------	--------

#### **11.2.2. Solución de Albúmina de Mayer** (Cantidades necesarias para preparar 12 mL)

Clara de Huevo	5 mL
----------------	------

Glicerina	5 mL
-----------	------

Timol	2 mL
-------	------

## 12. ANEXOS

### 12.1. Consentimiento informado entregado a las pacientes



#### 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 "**Membrana Amniótica Humana como Fuente de Células Epiteliales y Como Biosustrato**" 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, Dr. \_\_\_\_\_ y/o del grupo de Investigadores del Instituto de Biología Experimental (I.B.E.), coordinados por las Dra. Elizabeth Merentes y Dra. María Lorena Márquez, de todos los aspectos relacionados al proyecto de Investigación titulado "**Membrana Amniótica Humana como Fuente de Células Epiteliales y Como Biosustrato**"

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 clínica.

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 ha impedido al sujeto tener una clara comprensión de su compromiso con este proyecto

Firma del Voluntario _____ Nombre y Apellidos _____ C.I. _____ Lugar _____ Fecha _____	Firma del Investigador _____ Nombre y Apellidos _____ C.I. _____ Lugar _____ Fecha _____
--	--

Firma del Testigo _____ Nombre y Apellidos _____ C.I. _____ Lugar _____ Fecha _____	Firma del Doctor Tratante _____ Nombre y Apellidos _____ C.I. _____ Lugar _____ Fecha _____
---	---

### **FORMULARIO DE INFORMACIÓN**

El doctor tratante le propone participar en este estudio. Esta nota de información es dirigida a Ud., para que le permita obtener orientación antes de decidir participar y firmar el formulario de consentimiento.

Este estudio es de naturaleza científica y solo será utilizado para estos fines experimentales.

Ésta investigación persigue el objetivo de desarrollar diferentes técnicas, las cuales permitan estandarizar la metodología para el aislamiento, caracterización y cultivo *in vitro* de células madre epiteliales de la membrana amniótica de fetos humanos, además del mantenimiento a largo plazo de éstas. La población celular aislada por disgregación enzimática con Dispasa II, será cultivada en monocapa y caracterizada con coloraciones de rutina y determinación Inmunocitoquímica, para posteriormente, ensayar sistemas de cultivo empleando el estroma de la membrana amniótica como biosustrato tridimensional. Este estudio es importante para poder determinar si estas células pueden expresar características propias fenotípicas y bioquímicas de una célula funcionalmente madura, propias del tejido hacia donde serán diferenciadas.

Es importante que conozca que con este estudio, Ud. no recibirá beneficio económico alguno.

### **¿Por qué proponer éste estudio?**

Uno de los ámbitos de la medicina del futuro que más expectativas ha despertado en los últimos años es la investigación con células madre. El aislamiento de células madres embrionarias, la aparente e inesperada potencialidad de las células madre adultas y el desarrollo de la bioingeniería de tejidos, ha llevado a imaginar un porvenir esperanzador para un importante número de estudios básicos, clínicos y terapéuticos.

Las actuales fuentes de obtención de estas células plantean muchos problemas, tanto éticos como técnicos. El hallazgo de otras opciones que no acarreen dichos inconvenientes, sea de fácil acceso sin que suponga ningún riesgo para el donante y provean un material suficiente y numeroso; han proporcionado grandes progresos en este ámbito. Una nueva fuente que cumple con todos estos requisitos es la membrana amniótica fetal, la cual es un tejido descartable, rico en células madre epiteliales. Estas células son células jóvenes que no presentan mutaciones somáticas y son inmaduras desde el punto de vista inmunológico, favoreciendo la compatibilidad.

### **Descripción y Obligaciones del Estudio**

Las placentas serán obtenidas de la Sala de Partos del Hospital Universitario de Caracas.

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 u Hospital.

El protocolo de selección de las donantes de placentas sigue las mismas evaluaciones que los donantes de órganos y tejidos para trasplante, siendo criterios de exclusión específicos los siguientes:

- ✓ Embarazo no controlado.
- ✓ Historia obstétrica con alteraciones.
- ✓ Presencia de síntomas de infección en el neonato.
- ✓ Fiebre materna superior a 38°C.
- ✓ Gestación inferior a 34 semanas.
- ✓ Bolsa rota más de 12 horas antes del parto.
- ✓ Presencia de meconio

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.

<b>Cribado Serológico de las Donantes</b>	
Anticuerpos Virus Inmunodeficiencia Humana	HIV 1 y 2
Descarte de Sífilis	VDRL

### **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.

12.2. Carta de Aprobación para la realización del Proyecto por parte del Comité de Bioética del Hospital Universitario de Caracas



INSTITUTO AUTÓNOMO  
HOSPITAL UNIVERSITARIO  
DE CARACAS

COMITÉ DE BIOÉTICA

INTEGRANTES:

DR. CLAUDIO UROSA- COORDINADOR  
LIC. BERTHA Y. ÁLVAREZ. - SECRETARIA INTERINA  
DR. JOSÉ M. GUEVARA IRIBARREN  
DR. JULIO BORGES ITURRIZA  
DR. JOSÉ JOAQUÍN FIGUEROA  
DR. FRANK PÉREZ ACUÑA  
DR. OSCAR IVÁN SILVA  
DR. Pbro. ALFREDO RINCÓN M.  
DRA. MARGARITA SALAZAR  
DRA. OMAIRA VERA R.  
DRA. CLARA PACHECO  
LIC. ALECIA DE ACOSTA

CBE N° 12 /2012

Caracas, 12 de abril de 2012

Ciudadana  
Dra. Hilda Ponte  
Adjunto Docente  
Hospital Universitario de Caracas  
Presente.-

En nombre del Comité de Bioética del Hospital Universitario de Caracas, me dirijo a usted, en la ocasión de informarle que en Reunión Ordinaria N° 06 de fecha 12-4-2012, hemos considerado y evaluado el Proyecto de Investigación "CARACTERIZADA Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES PROVENIENTES DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA", que será realizado por la bachiller: **Eliana Navarro**, Estudiante de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, tomando la decisión de **APROBARLO**.

Sin otro particular a que hacer referencia, me suscribo de usted.

Atentamente,



*Claudio Urosa P.*  
CLAUDIO L. UROSA P.  
Coordinador

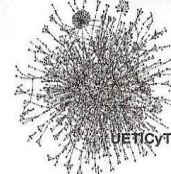
CLUP/yn.-

### 12.3. Carta de Aprobación para la realización Proyecto por parte del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela

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.

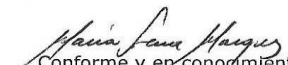
Dejamos constancia que los Miembros del Comité de Ética que han participado en la evaluación del proyecto señalado no están involucrados, ni en modo alguno tienen conflictos de intereses, en la realización del mismo.

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