



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

**POTENCIAL CONDRÓGÉNICO DE LAS CÉLULAS  
EPITELIALES PROVENIENTES DE LA MEMBRANA  
AMNIÓTICA HUMANA.**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller **Dubelys Nieves Ponce**, como requisito para optar al título de Licenciado en Biología.

**Tutor:** Dra. María Lorena Márquez

CARACAS, VENEZUELA

JULIO, 2018

## **DEDICATORIA**

*A la razón de mi esfuerzo por el presente y el mañana,  
que me enseña diariamente el lado no amargo de la  
vida. A quien fue la motivación más grande para  
culminar este proyecto de tesis. Para ti Matías...*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por ser el pilar de mi fe, por atender mis oraciones y ante todo por permitirme llegar a este punto en la vida, dándome la fuerza para superar los obstáculos.

A mi madre, Ely, por sus consejos, sus valores, que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor; sin su apoyo no podría haber llegado hasta donde estoy, por eso y más mil gracias.

A mi esposo, Oscar, quien me ha dado siempre su amor y amistad cómplice. Por su honestidad, lealtad y apoyo en todo momento, así como por la motivación constante que me ha permitido mantenerme en pie en las situaciones difíciles. Por Matías y nosotros, ¡LO LOGRAMOS!

A mi familia, por enorgullecerse de mis éxitos como si fuesen propios, en especial a mi abuelo Carlos, por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre y a mis tíos, Elayne y Santiago; por apoyarme incondicionalmente y enseñarme el valor del lazo familiar.

A mi tutora, la Dra. María Lorena Márquez, por convertirse en más que una guía académica para mí. Por su dedicación, apoyo y comprensión. Por brindarme la oportunidad al abrirme las puertas del laboratorio, de hoy optar al título de Licenciada. Gracias por tenerme paciencia, creer en mí y confiar en mis decisiones.

A la Dra. Elizabeth Merentes, por su ayuda y sabiduría. Por aconsejarme siempre que lo necesité y por impulsar el desarrollo de mi formación profesional.

Al Dr. Pedro Hurtado y todo el equipo de obstetricia y ginecología del Instituto Médico Quirúrgico “Dr. Jiménez Rojas” por abrirme las puertas y brindarme tan preciada ayuda en el desarrollo de éste proyecto; a Nayari Colina, por todo su apoyo en la

recolección de las muestras. Muchas gracias.

A la Lic. Eliana Navarro, que junto a la Dra. Elizabeth Merentes en su papel de evaluadores, contribuyeron en la realización de este trabajo. Gracias por su tiempo y dedicación en la revisión del mismo.

A todas y cada una de las personas que me han acompañado en mi experiencia en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores y a mis compañeros de laboratorio que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional: Luis, Anna, Carla, Daniela. A Felipe y la Sra. Mery, por brindarme su apoyo, ánimos y cariños, siempre encontrando las palabras más adecuadas en aquellos momentos de estrés y angustias. Gracias por el ejemplo y por cada uno de los momentos vividos, jamás los olvidaré.

Al Dr. Gilberto Payares, por la ayuda prestada y poner a disposición el material que me fuese necesario. Gracias por compartir sus conocimientos y experiencias de vida conmigo.

A la Profa. Cristina Sanoja, la Profa. Valentina Salas, el Prof. José Mejías y todos aquellos que forman parte de la hora del almuerzo, por convertirlo en una agradable experiencia llena de risas y anécdotas, siendo una desconexión de la rutina diaria. Gracias por esos momentos.

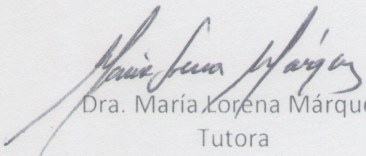
A mis amigas Gera y Marjorie, quienes me han acompañado en los momentos más importantes de mi carrera y brindado su apoyo incondicional, siempre me han tenido fe logrando que confíe más en mí misma y en mis capacidades.

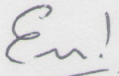
A la Facultad de Ciencias, sobre todo a la Escuela de Biología, la cual me brindó las herramientas y el adiestramiento necesario para hacer ciencia y alcanzar esta meta.

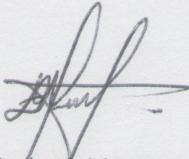
TRABAJO ESPECIAL DE GRADO TITULADO  
POTENCIAL CONDRÓGENICO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES PROVENIENTES  
DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA.

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Bachiller  
Dubelys Nieves Ponce como requisito para optar al título de Licenciado en Biología.

Defendido públicamente el día 25 de julio del 2018 y aprobado por los miembros del Consejo  
designados por el Consejo de la Escuela de Biología, quienes consideraron que dicho trabajo  
cumplió con los requisitos exigidos por los reglamentos respectivos.

  
Dra. María Koréna Márquez  
Tutora

  
Lic. Eliana Navarro  
Jurado

  
Dra. Elizabeth Merentes  
Jurado

## RESUMEN

Uno de los campos de la medicina que más expectativas ha despertado en los últimos años es la investigación con células madre. Las actuales fuentes de obtención de estas células plantean muchos problemas, tanto éticos como técnicos por lo que 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 humana, la cual es un tejido descartable que se compone de una sola capa de células epiteliales, una membrana basal gruesa y un estroma avascular; con dos poblaciones celulares con características de células madre. Las mismas no presentan mutaciones somáticas y son inmaduras desde el punto de vista inmunológico, favoreciendo la compatibilidad.

Diversos estudios hacen referencia a la potencialidad de diferenciación de estas células hacia linajes de origen mesodérmico como el condrogénico, mediante el suministro de nichos o microambientes particulares *in vitro* que pueden dar respuesta en un futuro al establecimiento de técnicas para el abordaje terapéutico de patologías asociadas al cartílago, ya que debido al comportamiento de los condrocitos en condiciones de cultivo donde existe un proceso de desdiferenciación, son poco viables para la producción de este tejido por bioingeniería.

Basándonos en lo anterior y en los antecedentes de la aplicación de la Membrana Amniótica Humana como biosustrato, que facilita la proliferación y el mantenimiento del fenotipo de los condrocitos luego de métodos de criopreservación, el objetivo de éste trabajo fue determinar el potencial de diferenciación condrogénica de las células epiteliales

provenientes de la membrana amniótica humana. Para ello, se aislaron y establecieron cultivos primarios de células epiteliales provenientes de la Membrana Amniótica Humana para luego subcultivar en sistemas en monocapa y sobre el estroma de la Membrana Amniótica Humana como sistema tridimensional, que permitieron posteriormente realizar los ensayos de diferenciación con el uso de un medio inductor condrogénico. La inducción hacia el linaje condrogénico se evaluó mediante técnicas histoquímicas como Azul de Toluidina y Azul Alcian pH 2,5. Nuestros resultados indican que bajo los sistemas de cultivos empleados se observa una diferenciación de las células epiteliales, ya que se demostró en mayor o menor medida la presencia de componentes de Matriz extracelular cartilaginosa como Glicosaminglicanos ácidos y Proteoglicanos, siendo importante el contacto célula – célula, célula – matriz y la acción de factores solubles específicos para el mantenimiento de las células, estimulación de su proliferación y biosíntesis de matriz.

**Palabras claves:** membrana amniótica, células epiteliales, inducción, condrogénico.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
<b>1.INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2.ANTECEDENTES.....</b>	<b>14</b>
<b>3.OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
1.  Objetivo General.....	23
2.  Objetivos Específicos.....	23
<b>4.MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
1.  Material biológico.....	24
2.  Aislamiento de la membrana amniótica humana.....	25
3.  Denudación de la membrana amniótica humana y establecimiento de los cultivos primarios en monocapa.....	26
4.  Establecimiento de subcultivos.....	27
5.  Obtención del estroma y criopreservación.....	27
6.  Caracterización morfológica de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.....	28
7.  Cultivo de las células epiteliales sobre el estroma de la membrana amniótica...29	
8.  Ensayos de inducción a la diferenciación condrogénica.....	30
4.8.1 Cultivos en monocapa.....	30
4.8.2 Cultivo sobre el biosustrato.....	30
9.Evaluación histoquímica de la diferenciación de las células epiteliales de la membrana amniótica.....	31

4.9.1 Cultivos en monocapa.....	31
4.9.2 Cultivo sobre el biosustrato.....	32
<b>5.RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
1. Evaluación histológica de la membrana amniótica humana y su criopreservación.....	34
2. Aislamiento de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.....	36
3. Establecimiento de los cultivos primarios de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.....	37
4. Caracterización morfológica de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.....	39
5. Establecimiento de los cultivos de las células epiteliales sobre el estroma de la membrana amniótica humana vitrificada.....	41
6. Diferenciación condrogénica de las células epiteliales amnióticas.....	43
5.6.1 Cultivos en monocapa.....	43
5.6.2 Cultivo sobre el biosustrato.....	45
5.7 Evaluación histoquímica de la diferenciación hacia el linaje condrogénico de las células epiteliales amnióticas.....	47
5.7.1 Evaluación en sistemas en monocapa.....	47
5.7.2 Evaluación en sistemas de cultivo sobre el estroma de la membrana amniótica humana como sistema tridimensional.....	52
<b>6.DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
<b>7.CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>8.RECOMENDACIONES.....</b>	<b>72</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>73</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Membranas fetales humanas al término de una gestación normal.....	7
<b>Figura 2.</b> Placenta humana.....	24
<b>Figura 3.</b> Material utilizado en el aislamiento de la MAH.....	25
<b>Figura 4.</b> Sistema empleado para el cultivo de las CEMAH sobre el estroma de la MAH.....	29
<b>Figura 5.</b> Corte longitudinal de la membrana amniótica humana (MAH) intacta y denudada con Dispasa, antes y después la de criopreservación. Coloración H– E.....	35
<b>Figura 6.</b> Esquema representativo de un corte longitudinal de amnios y corion Cultivo primario en monocapa de células epiteliales de la MAH. Contraste de fases.....	38
<b>Figura 7.</b> Cultivo primario de células epiteliales de la MAH (8 días). Coloración May Grünwald– Giemsa.....	40
<b>Figura 8.</b> Estroma de la MAH previo a los ensayos de diferenciación condrogénica. Contraste de fases.....	42
<b>Figura 9.</b> Diferenciación condrogénica en sistemas de cultivo en monocapa de las CEMAH provenientes del primer pasaje. Contraste de fases.....	44
<b>Figura 10.</b> Diferenciación de las CEMAH provenientes del primer pasaje cultivadas sobre el estroma de la MAH vitrificada. Contraste de fases.....	46

**Figura 11.** Evaluación morfológica de la diferenciación condrogénica en sistema de cultivo en monocapa de las CEMAH provenientes del primer pasaje a los 17 días de inducción. Coloración May Grünwald – Giemsa.....48

**Figura 12.** Cultivos en monocapa de CEMAH mantenidas en medio condrogénico coloreadas con Azul de Toluidina.....50

**Figura 13.** Cultivos en monocapa de CEMAH mantenidas en medio condrogénico coloreadas con Azul Alcían pH 2,5.....51

**Figura 14.** Cultivos en monocapa de CEMAH mantenidas en medio condrogénico coloreadas con Sudán III..... 52

**Figura 15.** Evaluación morfológica de la diferenciación condrogénica de las CEMAH provenientes del primer pasaje cultivada sobre el estroma de la MAH a los 17 días de inducción. Coloración H– E.....54

**Figura 16.** Cultivos de las CEMAH sobre el estroma mantenidas en medio condrogénico coloreadas con Azul Alcían pH 2,5..... 56

**Figura 17.** Cultivos de las CEMAH sobre el estroma mantenidas en medio condrogénico coloreadas con Azul de Toluidina..... 57

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Marcadores y factores de transcripción presentes en las células madre embrionarias expresados por las CEMAH.....	9
<b>Tabla 2.</b> Metodologías empleadas en el aislamiento de las CEMAH.....	15
<b>Tabla 3.</b> Rendimiento celular obtenido por membrana amniótica humana procesada.....	37

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**BMP-7:** Proteína Morfogenética Ósea tipo 7

**CD9/CD24/CD30:** Marcadores de superficie de células madre embrionarias

**CD90/CD44/CD105 / CD173 / CD166:** Marcador de Superficie de Células Madre Mesenquimales

**CEMAH:** Células epiteliales provenientes de la membrana amniótica

**CMA:** Células Madre Adultas

**CME:** Células Madre Embrionarias

**CMM:** Células Madre Mesenquimal

**CMMAH:** Células mesenquimales provenientes de la membrana amniótica

**DMEM:** Medio Eagle Modificado por Dulbecco

**DMSO:** Dimetil Sulfóxido

**DO:** Densidad Óptica

**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético

**EGF:** Factor de Crecimiento Epidérmico

**EMAH:** Estroma de la membrana amniótica humana

**FGF:** Factor de Crecimiento de Fibroblastos

**GAGs:** Glicosaminoglicanos

**HBV:** Hepatitis B

**HCV:** Hepatitis C

**IBE:** Instituto de Biología Experimental

**IL-6:** Interleucina 6

**MA:** Membrana Amniótica

**MAH:** Membrana Amniótica humana

**MEC:** Matriz Extracelular

**MO:** Médula ósea

**Nanog:** Factores de Transcripción Esencial y Específicos en Células Pluripotentes

**Oct-4:** Octámeros de proteínas de unión 4

**PBS:** Solución Buffer Fosfato

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**PGs:** Proteoglicanos

**RER:** Retículo endoplasmático rugoso

**SFB:** Suero Fetal Bovino

**Sox-2:** Factores de Transcripción Esencial y Específicos en Células Pluripotentes

**TGF- $\beta$ :** Factor de Crecimiento Transformante tipo  $\beta$

**TRA-X:** Antígeno de Rechazo Tumoral tipo X

**VIIH:** Virus de Inmunodeficiencia adquirida

## 1. INTRODUCCIÓN

La medicina regenerativa actualmente está enfocada en desarrollar nuevas aplicaciones clínicas destinadas al reemplazo de células y tejidos que lleven, posteriormente, a la restauración de la función normal de los órganos humanos. En este campo, la membrana amniótica, así como el cordón umbilical y el líquido amniótico, están emergiendo como una fuente inmensamente valiosa de células madre y progenitoras de fácil obtención que son consideradas como una posible herramienta terapéutica para el manejo de diversas enfermedades crónicas (Stoltz y col., 2015; Parolini y col., 2010, Fanti y col., 2017).

Uno de los tejidos cuyo deterioro está directamente relacionado con la edad es el cartílago hialino, el cual debido a su naturaleza hipocelular y avascular, posee una baja tasa reparativa experimentando con frecuencia una degeneración considerable que a menudo avanza a patologías articulares como la osteoartritis, donde la pérdida progresiva del cartílago articular da paso a una mayor formación del hueso subcondral causando discapacidad (Jin y col., 2007; Díaz – Prado y col., 2010b). Esta característica del tejido y la serie de dificultades intrínsecas relacionadas con el rendimiento limitado y los cambios en el fenotipo celular de los condrocitos autólogos producto de las técnicas de cultivo *in vitro* que se han encontrado en los tratamientos probados hasta la fecha, lo hacen un gran candidato para un enfoque de medicina regenerativa (Dale y Forsyth, 2018).

El cartílago es un tejido conectivo que carece de nervios, vasos sanguíneos y linfáticos; y se nutre del líquido sinovial, por un mecanismo de difusión que se realiza durante los movimientos articulares (García, 2012b). Su función se basa en proveer sostén, siendo una estructura fuerte y flexible que además ofrece poca resistencia a la presión, permitiendo el movimiento libre de los huesos a nivel de las articulaciones y sirviendo como precursor de

los huesos largos del organismo. Principalmente está compuesto por condrocitos, que son células especializadas que sintetizan y mantienen la abundante matriz extracelular (MEC) que se encarga de retener los factores de crecimiento que modulan la proliferación celular. La MEC del cartílago presenta una gran proporción de macromoléculas estructurales y una sustancia fundamental constituida en general por agua, minerales y sustancias inorgánicas (Paniagua y col., 2002).

Las macromoléculas estructurales del cartílago se clasifican en 3 grandes grupos: fibras de colágenos, los proteoglicanos (PG) y proteínas multiadhesivas. **Las fibras de colágenos** incluyen las de tipo VI, IX, X, XI y II, siendo este último el de mayor abundancia en el tejido cartilaginoso representando hasta un 95% aproximadamente del total de colágeno. Los colágenos tipo IX y XI se encuentran asociados al tipo II formando la matriz de fibrillas donde se encuentran atrapadas otras moléculas como los PG. El colágeno tipo VI conecta los condrocitos con su MEC circundante, mientras que el colágeno tipo X participa en el proceso de mineralización. Entre los **PG** del cartílago se encuentran el agregan, el sindecano, la decorina y el perlecan, los cuales constan de un núcleo de proteína unido covalentemente a una o más cadenas laterales de glucosaminoglicanos (GAGs) que son polisacáridos con abundancia de cargas negativas debido a los grupos amino, carboxilato o sulfato, permitiendo la difusión de sustancias nutritivas desde los vasos sanguíneos del tejido conectivo circundante. Los GAGs más representativos dentro del tejido cartilaginoso son el Hialuronano o ácido hialurónico, el Condroitín sulfato, el Heparán sulfato y el Queratán sulfato. Existen otras proteínas denominadas **proteínas multiadhesivas** que desempeñan un papel importante en la estabilización de la MEC y su vinculación con la superficie celular tales como la fibronectina que tiene a su cargo la adhesión y migración celular y la ancorina

CII que actúa como receptora del colágeno y de proteínas de fijación de los condrocitos (Ross y Pawlina, 2007; Sanchis, 2009 citado por Sandoval, 2012).

Este tipo de tejido se forma a partir de las células mesenquimáticas condroprogenitoras provenientes del mesodermo dorsal somítico que por acción de diversos factores paracrinos, activación de factores de transcripción y facilitado por la alta densidad de células, desencadena la diferenciación de dichas células en condroblastos, los cuales se van separando progresivamente conforme depositan matriz cartilaginosa a su alrededor y al quedar rodeados completamente reciben el nombre de condrocitos. La región más próxima al condrocito es un espacio denominado condroplasto, el cual es una laguna en la que se mantiene cada célula o conjunto de células, el interior de esta zona es llamado capsula o matriz territorial y a medida que la matriz se aleja del condrocito esta zona recibe el nombre de matriz interterritorial, diferenciándose de la anterior por su baja concentración de PG (Ross y Pawlina, 2007).

Su crecimiento ocurre mediante dos tipos de mecanismos: El primero es el **crecimiento aposicional**, el cual se da a partir de la capa interna del pericondrio generando de manera continua nuevas capas de cartílago y la aposición de estas capas sucesivas de células diferenciadas en condroblastos y su respectiva MEC generan un crecimiento hacia el exterior; el segundo es el **crecimiento intersticial**, donde los condrocitos se disponen en pequeños nidos celulares llamados grupos isógenos formados luego de varias divisiones mitóticas de un único condrocito y los cuales dependiendo de la dirección en la cual ocurren estas divisiones, se denominan grupos axiales (lineal) o coronarios (radial). Cuando el cartílago madura hay una pérdida de las células progenitoras y los nuevos condrocitos pierden

la capacidad de migrar, proliferar y participar en una respuesta reparadora por lo que la terapia con células madre toma gran importancia en la medicina regenerativa del cartílago.

Las células madre pueden ser aisladas de diversos tejidos y presentar diferentes potenciales de regeneración. Éstas son células indiferenciadas, que tienen capacidad de auto-renovación durante toda la vida de un individuo y 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 (Watt y Hogan, 2000; Ivanova y col., 2002). Según su potencial de diferenciación, las células madre pueden ser: **totipotentes** como es el caso del cigoto y las células resultantes de las primeras divisiones embrionarias hasta un estadio de división de ocho (8) células, las cuales pueden generar todos los tipos celulares de un ser completo, así como los tejidos extra embrionarios (placenta y anexos placentarios); **pluripotentes**, presentes en la masa interna del blastocisto (estadio ubicado entre los días 5 y 7 posteriores a la fertilización), pueden dar origen a las células de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) incluyendo a las células germinales, pero no poseen el potencial necesario para originar un individuo completo; **multipotentes**, las cuales se encuentran en el tejido adulto y tienen la capacidad de generar células restringidas a su misma capa embrionaria como por ejemplo células provenientes de la médula ósea, intestino, tejido adiposo, pulpa dental, entre otros; y **unipotentes** que sólo dan origen a células de una línea celular como por ejemplo las células madre espermatogónicas (Smith, 2006). Otro tipo de células madre son las células madre pluripotentes inducidas (iPSC del inglés induced Pluripotent Stem Cells), las cuales se obtuvieron experimentalmente a partir de células de ratón (Takahashi y Yamanaka, 2006) y posteriormente de células humanas (Takahashi y col., 2007), basándose en la inducción de la

expresión de varios genes exógenos, tales como Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4, que son capaces de des-diferenciar o reprogramar células adultas diferenciadas convirtiéndolas en una célula madre con características pluripotenciales.

También pueden clasificarse dependiendo de la fuente de obtención u origen, es decir, pueden provenir del embrión o de un organismo adulto y ser denominadas células madre embrionarias (CME) o células madre adultas (CMA), respectivamente. Las embrionarias, son células pluripotentes que 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 pre implantado (Prósper y col., 2006); mientras que las células madre adultas o somáticas están involucradas en el mantenimiento y reemplazo de las células diferenciadas dentro del propio tejido de origen como consecuencia de la renovación fisiológica. A pesar de ser difíciles de aislar y mantener en cultivo, debido a que solo viven después de un número de pasajes determinados, pueden ser obtenidas directamente del paciente y por lo tanto son inmunológicamente compatibles (Toda y col., 2007; Bianco y col., 2008).

Desde el inicio de la terapia celular, la Médula Ósea (MO) se ha considerado la fuente más importante de CMA. De este tejido es posible obtener al menos dos poblaciones de células madre: células madre hematopoyéticas (HSC del inglés Human Stem Cells) y células madre mesenquimales (MSC del inglés Mesenchymal Stem Cell), las cuales representan los tipos celulares mejor caracterizados y más utilizados en los ensayos pre-clínicos y clínicos. No obstante, debido a la dificultad de expansión, bajo rendimiento y al aparente compromiso de su potencial proliferativo relacionado con la edad avanzada y el estado de enfermedad del donante, su utilidad ha resultado limitada para una aplicación clínica amplia (García, 2012a). Por estas razones, la investigación se ha centrado en la identificación de nuevas fuentes de

células madre que estén disponibles en abundancia, sean fáciles de obtener, seguras para el donante y que no presenten rechazo en un receptor. Una nueva fuente que responde favorablemente con estos requisitos es la placenta humana, además de que al ser expulsada luego del nacimiento la convierte en un material de descarte, disminuyendo los conflictos éticos (Di Germanio y col., 2016).

La placenta es un órgano materno – fetal característico de los mamíferos, y está involucrada 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). De acuerdo al primer taller internacional sobre células madre derivadas de la placenta en 2007, la misma es de forma discoide con un diámetro de 15-20 cm, un espesor de 2-3 cm y está constituida por dos capas: la placa coriónica de origen fetal que está orientada hacia la cavidad amniótica, y está integrada por el amnios y el corión, y la placa basal formada por la decidua (basal y parietal) de origen materno (Figura 1).

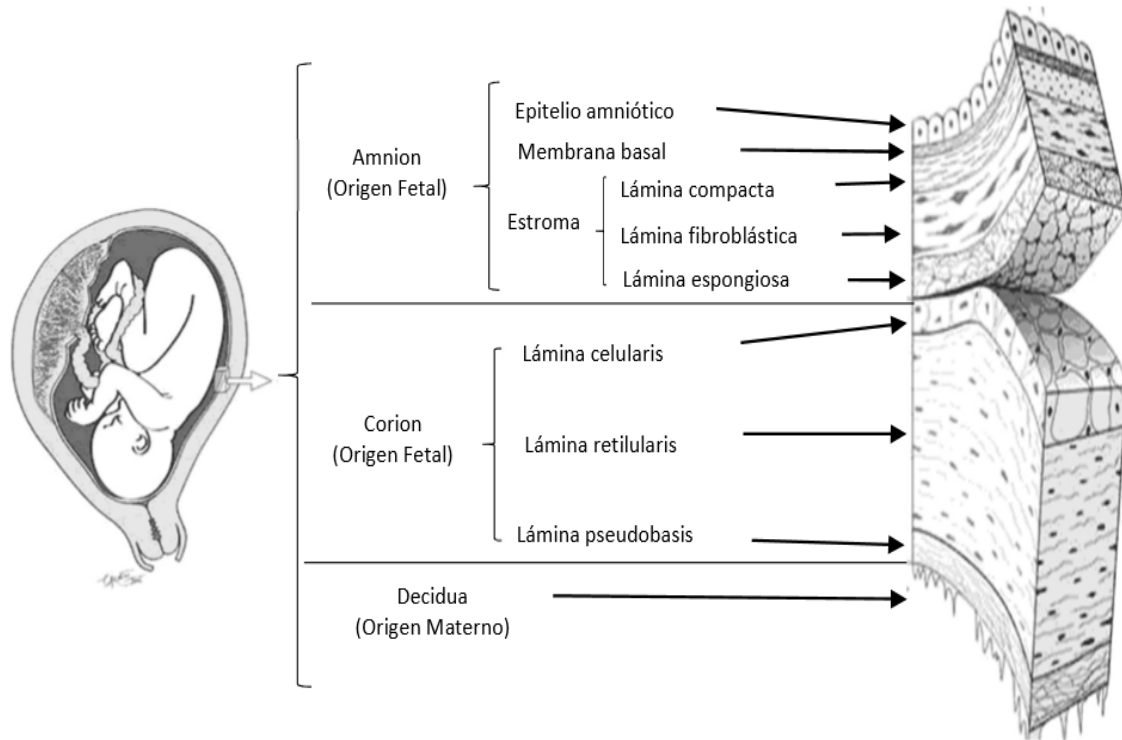


Figura 1. Membranas fetales humanas al término de una gestación normal. Tomado de Murube (2006) y modificado por Nieves (2016).

La membrana amniótica (MA) o amnios es una membrana translúcida compuesta por un epitelio amniótico el cual forma un tapizado simple y continuo de células cilíndricas, cuboidales o planas en contacto con el líquido amniótico, que reposa sobre una lámina basal bien definida compuesta de una malla de fibras de colágenos tipo III y IV, así como glicoproteínas (laminina, nidogen y fibronectina). Ésta a su vez se ubica sobre un estroma de tejido conectivo avascular denominado mesoderma amniótico, probablemente la más fuerte de todas las capas amnióticas, compuesta de fibronectina, colágeno intersticial tipo I y III dispuestos en forma de haces paralelos, y colágeno tipo V y VI que forman conexiones filamentosas entre el colágeno intersticial y la membrana basal. Es en ésta capa donde se ubican las células estromales de tipo fibroblastos denominadas mesenquimales y son separadas del corión por una capa esponjosa, rica en elastina, proteoglicanos hidratados

(especialmente perlecan), glicoproteínas que absorben agua, y fibras de colágeno, predominantemente tipo III, organizadas laxamente (García, 2012a). La membrana amniótica humana (MAH) contiene dos tipos de células de diferentes orígenes embriológicos, que muestran ciertas propiedades características de las células madre: las células epiteliales amnióticas humanas (CEMAH) del ectodermo embrionario y las células mesenquimales del estroma de amnios humano (CMAH) del mesodermo embrionario.

Diversas investigaciones indican que las CEMAH expresan marcadores moleculares de células madre con capacidad de diferenciarse hacia linajes de las tres capas germinales (Tabla 1), tales como Oct-4, la proteína Sox-2 y Nanog, además de antígenos de rechazo tumoral TRA-1-60 y TRA-1-81. Las CEMAH también expresan de forma heterogénea marcadores de superficie y factores de transcripción asociados con las Células madre embrionaria (CME), entre los que se encuentran SSEA-4 y SSEA-3, debido a que provienen del epiblasto embrionario que se forma producto de la división de la masa interna del blastocisto entre 8-9 días posterior a la fecundación (Gilbert, 2005). Así mismo, expresan marcadores comunes a las células madre mesenquimales como CD90, CD44 y CD166 que sugiere que ambas poblaciones tienen inmunofenotipo similar, aunque se diferencian en el rendimiento de las células obtenidas (Díaz-Prado y col., 2011).

Tabla 1. Marcadores y factores de transcripción presentes en las células madre embrionarias expresados por las CEMAH.

Marcadores	Referencias Bibliográficas
<p><b>-De superficie:</b> SSEA-3, SSEA-4, TRA 1-60, TRA 1-81, ABCG2/BCRP, CD9, CD24, CD29, CD73, CD90, CD166, CD44, E-cadherina, Integrina <math>\alpha</math>-6, c-Met (receptor de HGF).</p> <p><b>-Factores de transcripción:</b> Oct-4, Sox-2, Nanog y Rex-1.</p>	<p>(Miki y col., 2006; Miki y col., 2005; Ilancheran y col., 2007; Matusbara y col., 2004)</p>

Una de las ventajas del uso de éstas células es que no forman teratomas, además de la facilidad y alto rendimiento de obtención señalándose aislamientos de más de 100 millones de células epiteliales por amnios (Miki y col., 2005; Ilancheran y col., 2007) o de  $6.3 \pm 1.4 \times 10^6$  células por gramo de tejido húmedo (Bilic y col., 2008), así como la capacidad proliferativa sin la necesidad de un segundo tipo celular que actúe como una capa alimentadora.

Las CEMAH también expresan citoqueratinas (CK), que son filamentos intermedios tipo I y II de naturaleza proteica que se encuentran en el cito-esqueleto intracitoplasmático de las células epiteliales (Ilancheran y col., 2009; Miki y Strom, 2006). Según algunos investigadores, la mayoría de las CEMAH también expresa vimentina, una proteína filamento intermedio tipo III, usualmente presente en las células estromales y en los precursores neuronales (Parolini y col., 2010; Ilancheran y col., 2007; Sakuragawa y col., 1995). Otro aspecto que hace a las CEMAH atractivas para posibles terapias es su baja antigenicidad, teniendo una 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 que, sumado a sus propiedades anti-inflamatorias y anti-bacterianas, ha permitido su uso como sustrato en la ingeniería de tejidos.

En condiciones *in vivo*, la diferenciación de las células madre está influenciado por un microambiente especializado denominado nicho de la célula madre, el cual es el entorno que contiene los diversos factores y componentes necesarios para su mantenimiento, proliferación y metabolismo. Estos factores son producidos y secretados de forma natural y pueden tener un efecto estimulador o inhibitorio, actuando sobre receptores diana por distintas vías: endocrina, en donde participa una molécula transmisora que 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 sobre 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).

Al conocerse el mecanismo de acción de algunos factores en la diferenciación celular, son utilizados en los medios inductores de cultivo. En los medios de diferenciación condrogénica los factores de crecimiento de la superfamilia del Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) son ampliamente utilizados *in vitro* debido a que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis tanto del hueso subcondral como del cartílago articular (Zhen y Cao, 2014). Diversos estudios han mostrado que los TGF- $\beta$  son capaces de inducir la diferenciación de las CME a condrocitos, estimular su proliferación, aumentar la expresión de proteoglicanos, fibronectina, colágeno tipo II y XI, N- Cadherina, tenascina y decorina, principales componentes de la MEC, e inhibir la osificación endocondral (Mazor y col., 2014). Además, ayudan a mantener el fenotipo durante la

diferenciación condrogénica gracias a su capacidad de inducir la síntesis de Colágeno tipo II y PG en condrocitos primarios, siendo TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3 los representantes más destacados (Demoor y col., 2014).

De igual manera, la Dexametasona es un glucocorticoide sintético utilizado en los procesos de diferenciación celular hacia el linaje cartilaginoso, ya que mejora la condrogénesis así como también los efectos estimulantes de TGF- $\beta$ ; del mismo modo que la insulina, una hormona polipeptídica que estimula la incorporación de aminoácidos a la célula ósea y la síntesis de colágeno (Sánchez y col., 2006). El ácido ascórbico, está relacionado con la estimulación de la síntesis de matriz extracelular (MEC) principalmente la secreción de procolágeno y su conversión a colágeno (Portal, 2009 citado por Márquez, 2012); y las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) que regulan la proliferación y maduración de los condrocitos y mejora los efectos estimulantes del TGF- $\beta$ , entre otros efectos (Mahmoudifar y Doran, 2012).

Para las estrategias de ingeniería de tejidos, las células generalmente se combinan con factores inductivos y un sustrato como soporte. Se han descrito varias propiedades benéficas de la MAH incluyendo sus efectos anti-inflamatorios, anti-cicatrices, anti-fibróticos o de reducción del dolor (Dua y col., 2004; Ganatra 2003; Gomes y col., 2005; Ricci y col., 2013), representando un tejido que está bien establecido como biomaterial en áreas como por ejemplo, la oftálmica y la cirugía plástica.

Particularmente el uso de biomatrices en la ingeniería de tejido del cartílago ha brindado la posibilidad de simular de alguna manera la arquitectura del tejido y las condiciones “in vivo”, permitiendo ubicar las células espacialmente y retener sus funciones, lo cual resulta importante en la inducción de la expresión de un fenotipo, pues entran en juego

la acción de fuerzas químicas y mecánicas como la difusión y la tensión, además de afectar el comportamiento celular por medio de las interacciones MEC - célula y alterando las interacciones célula – célula (Merentes, 2009). Las propiedades mecánicas y biológicas de los biomateriales afectan significativamente a la condrogénesis y al mantenimiento a largo plazo de la integridad estructural del tejido de nueva formación (Fuentes-Boquete y col., 2008), por lo que estos deberían presentar las siguientes características (Demoor y col., 2014):

- Biocompatibles para minimizar, en la medida de lo posible, la respuesta inmune y ser capaces de integrarse con el tejido adyacente.
- Biodegradables. Se deberá reabsorber de manera gradual y simultánea al crecimiento celular y tisular.
- Porosos para permitir la migración celular y proporcionar un nicho para el intercambio de nutrientes a las células.
- Estructural y mecánicamente estables para soportar cargas y deformaciones sin pérdida de volumen.

En general, los biomateriales pueden dividirse en dos grandes grupos según la naturaleza de su procedencia: naturales o sintéticos. Por una parte, los biomateriales naturales suelen tener una magnífica biocompatibilidad, lo que permite que las células se integren y crezcan con una excelente viabilidad. Sin embargo, el principal problema radica en su limitada estabilidad mecánica y física (Musumeci, 2014).

En este sentido, la MAH, al tener abundantes componentes naturales del cartílago en su capa estromal, que son importantes en la regulación y el mantenimiento del metabolismo

de condrocitos normales, ha sido empleada como un andamio natural en fresco (denudada) y criopreservada para la ingeniería de tejidos del cartílago.

Los métodos utilizados para la esterilización/conservación de los tejidos, alteran de una manera u otra las características del mismo (Parolini y col., 2008) por lo que es básico el uso de agentes protectores de la congelación para evitar la formación de cristales que dañen irreversiblemente el citoplasma celular (Freshney, 2010). Perepelkin y col. (2016); Yazdanpanah y col. (2015) y Tanaka y Demirci (2016) evaluaron la MAH luego de someterse a la criopreservación obteniendo que además de preservar la membrana basal importante para la curación de las heridas en la terapia conjuntival, también mantiene su actividad moduladora sobre la angiogénesis y una viabilidad celular del 63%, la cual se encuentra dentro del rango de viabilidad reportado por Lindenmair y col. (2014) para la MAH en fresco siendo de 43 a 72%.

Debido al comportamiento de los condrocitos mantenidos en cultivo, donde se ha observado que a partir del segundo pasaje, pierden su morfología característica, ocurriendo un proceso de desdiferenciación (Márquez, 2009; Sandoval, 2012) y los antecedentes de la aplicación de la MAH como biosustrato observándose que facilita la proliferación y el mantenimiento del fenotipo de los condrocitos así como su alta viabilidad celular luego de métodos para la conservación de la misma, es de nuestro interés emplear el uso de factores inductores condrogénicos combinado con el uso del estroma de la MAH como andamio celular ya que de ésta manera se puede simular un microambiente natural que permita evaluar si la diferenciación condrogénica de las CEMAH se mantiene por un tiempo mayor al fenotipo de los condrocitos cultivados en monocapa, pudiéndose emplear como alternativa en la medicina regenerativa del cartílago al poseer éstas células una mayor tasa proliferativa.

## 2. ANTECEDENTES

Desde los primeros estudios de células madre obtenidas de la membrana amniótica se ha avanzado mucho en el conocimiento de las características de estas células, sus métodos de obtención y procesamiento, así como de su potencialidad.

Debido a la facilidad de aislamiento de las células, y la disponibilidad de la placenta como material de desecho, el amnios es una fuente potencialmente útil y no controversial de las células necesarias para el trasplante y la medicina regenerativa (Parolini y col., 2008). Existen diferentes métodos de aislamiento de las CEMAH pero usualmente comienzan con la separación manual de la MA del corión subyacente donde luego es sometida a soluciones de dispasa, hialuronidasas, y/o tripsina-EDTA a distintas concentraciones y tiempos de incubación (Tabla 2), con lo que se han señalado aislamientos de más de 100 millones de células epiteliales por amnios (Miki y col., 2005; Ilancheran y col., 2007; Gottipamula y Sridhar, 2018) o de  $6.3 \pm 1.4 \times 10^6$  células por gramo de tejido húmedo (Bilic y col., 2008).

Diferentes investigadores han realizado diversas evaluaciones de las propiedades de las células epiteliales aisladas de la MA. Entre ellos, Tamagawa y col. (2004) quienes fueron los primeros en describir su característica de pluripotencialidad al crear quimeras xenogénicas *in vitro* con células aisladas del amnios (epiteliales y mesenquimales) y células embrionarias de ratón. Las colonias aisladas provenientes del cultivo primario y marcadas con una proteína fluorescente mediante una transfección *in vitro*, fueron incubadas con las células madre embrionarias para la formación de cuerpos embrioides donde obtuvieron fluorescencia positiva para cada uno de los primordios de órganos (hígado, tubo neural, corazón, vasos sanguíneos y cartílago fetal), lo cual demuestra la contribución de las células humanas a la formación de células de las tres capas germinales (endodermo, ectodermo y mesodermo).

Tabla 2. Metodologías empleadas en el aislamiento de las CEMAH. Tomado de García (2012a) y modificado por Nieves (2018).

Autor	Digestión enzimática	Temperatura y tiempo de digestión
Miki y col. 2005	Tripsina/EDTA 0.05%	40 min a 37°C
Ilancheran y col. 2007	Dispasa 2.4U/ml; Tripsina 0.25%	7 min 37°C 20 min a 37°C con agitación
Whittle y col. 2000	Tripsina 0.25%	20 min 37°C agitación por 30 min
Bilic y col. 2008	Tripsina 0.25%; Dispasa 1.2 U/ml con raspado de la superficie epitelial	3 min a 37°C 60 min a 37°C
Wei y col. 2003	Hialuronidasa 0.03%; DNAasa 0.025%; Tripsina 0.25%	(1°) 30 min a 37°C (2°)30 min a 37°C
Sakuragawa y col. 1995	Tripsina 0.25% con raspado de la capa esponjosa	20 in a 37°C

Estudios posteriores indicaron que la diferenciación hacia células derivadas de las tres capas germinales de CEMAH puede ser dirigido bajo condiciones apropiadas de cultivo y en presencia de los inductores adecuados en experimentos *in vitro*: ectodermo (neuronas, y células gliales) (Kakishita y col., 2003; Miki y col., 2005; Ilancheran y col., 2007; Márquez y Nieves, 2016), endodermo (hepatocitos, células pancreáticas) (Miki y col., 2005; Portmann-Lanz y col., 2006; Takashima y col., 2004; Kakishita y col., 2003; Fanti y col., 2017) y mesodermo (osteocitos, adipocitos, cardiomiocitos, miocitos) (Ilancheran y col., 2007; Miki y col., 2005; Centurione y col., 2018; Lange-Consiglio y col., 2011). En el caso

de la diferenciación hacia linajes condrogénico, los medios inductores contienen principalmente una base de medio DMEM-F12, Suero Fetal Bovino (SFB), 6.25 g/ml insulina, 10 ng/ml TGF- $\beta$  y 50 ng/ml ácido ascórbico, los cuales han sido utilizado en los ensayos de diferenciación condrogénica en células mesenquimales provenientes de la membrana amniótica humana y el corion (Parolini y col., 2008, Portmann-Lanz y col., 2006) y del amnios de conejo y de búfalo (Borghesi y col., 2017; Ghosh y col., 2015), cuyos protocolos indican una duración de 3 semanas para lograr la diferenciación a células condrocíticas.

Con base a esto, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Facultad de Ciencias de la UCV, han sido estandarizados y utilizados medios inductores condrogénicos sin presencia de factores como el TGF en células mesenquimales provenientes de la membrana amniótica humana (López, 2014), del amnios de ratón (Meyer, 2012), de la gelatina de Wharton (Araos, 2009) y del tejido adiposo (Sandoval, 2012), obteniendo de igual manera cambios morfológicos acompañados de síntesis de componentes de MEC evaluados mediante técnicas histoquímicas como el Azul de Toluidina, Azul Alcían y Safranina O, que sugieren una diferenciación a células condrocíticas.

Pocos investigadores han reportado una diferenciación exitosa de las células epiteliales amnióticas hacia el linaje condrogénico. Díaz-Prado y colaboradores (2010a), aislaron, caracterizaron fenotípicamente las células derivadas de la MAH y analizaron su diferenciación *in vitro* hacia el linaje condrogénico además del adipogénico y osteogénico en sistemas de micromasas mediante inmunohistoquímica de las moléculas características del cartílago hialino. Sus resultados indican que ambas poblaciones celulares eran capaces de

diferenciarse (CMAAH con mayor potencial que CEMAH), presentando una expresión similar de marcadores de superficie de progenitores mesenquimales.

En 2011, Zhou y colaboradores evaluaron el papel de la proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7) en la condrogénesis de las células epiteliales amnióticas humanas en sistemas de micromasas, conocida por favorecer la acción del TGF- $\beta$  que interviene en la expresión de componentes de MEC fundamentales del cartílago. Luego de 3 semanas, los resultados fueron evaluados mediante PCR, la coloración histológica Azul Alcian a pH 2,5 e hibridación *in situ*, obteniendo que las CEMAH bajo este tratamiento expresaron marcadores correspondientes con componentes de MEC del cartílago tales como agregano, Sox-9, colágeno tipo II y X.

Lindenmair y colaboradores (2014) decidieron inducir la diferenciación condrogénica de la MAH intacta sin someterla a técnicas de criopreservación y determinar la viabilidad de la misma luego de 56 días de inducción. En sus resultados lograron la identificación inmunohistoquímica de áreas positivas para marcadores específicos de cartílago dentro de las secciones histológicas además de obtener una viabilidad intermedia durante 4 semanas entre 72,3 y 43,4%, siendo este el primer estudio que demuestra que tras la inducción *in vitro*, el amnios humano viable expresa marcadores específicos del cartílago y acumula GAG dentro de la biomatriz.

Debido a que solo se habían caracterizado las células epiteliales provenientes del amnios de humanos y de equinos, Rutigliano y colaboradores (2013) aislaron y caracterizaron por primera vez en la especie felina células madre de la porción epitelial del amnios, dentro de la cual realizaron ensayos de diferenciación hacia linajes mesodérmicos y ectodérmicos para demostrar su plasticidad. La inducción hacia el linaje condrogénico, evaluada con la

coloración Azul Alcían e inmunohistoquímicamente, resulto positiva; además observaron la co-expresión de marcadores de superficie mesenquimales infiriendo la posibilidad de estas células de presentar espontáneamente una transición epitelio-mesénquima.

La transición epitelial-mesenquimal es un proceso biológico en el que las células epiteliales polarizadas que normalmente interactúan con su membrana basal pierden su organización y las uniones intercelulares, reprograman la expresión génica y desarrollan múltiples cambios bioquímicos que las capacitan para adquirir un fenotipo mesenquimal, que incluye cambios en los programas de señalización que definen la forma y organización del citoesqueleto, lo que lleva a una capacidad migratoria aumentada, invasividad, resistencia a la apoptosis y producción elevada de componentes de la matriz extracelular (Lamouille y col., 2014; Tiwari y col., 2012; Kalluri y Weinberg, 2009). El concepto inicial de transformación epitelial-mesenquimal lo introdujo Elizabeth Hay, quien en 1967 se percató de su participación en el desarrollo embrionario (Acloque y col., 2008), y hoy en día es asociada a 2 contextos biológicos adicionales como los procesos de cicatrización y regeneración tisular y con la progresión tumoral.

En este sentido, autores como Lange-Consiglio y col., (2014) y So y col., (2015) han caracterizado esta condición en células progenitoras amnióticas equinas, donde ocurre de manera espontánea, y en la interacción entre células cancerígenas y células madre mesenquimales, respectivamente. So y colaboradores se plantearon que la transición epitelio-mesénquima en el microambiente tumoral está mediada por la interacción entre las células cancerosas y las células madre mesenquimales humanas por lo que identificaron cuales citocinas específicamente, pueden considerarse como potentes inductores de la transición, obteniendo que la expresión de interleucina 6 (IL-6) tiene un papel crítico en la

transformación epitelio-mesénquima oncogénica. Por otra parte, Lange-Consiglio y col., (2014) realizaron una caracterización glicoproteica utilizando histoquímica de lectinas donde observaron que las células transformadas espontáneamente tienen un perfil específico de glucanos en la superficie celular que es distinto al perfil observado en la transición de células tumorales y mantenían su multipotencialidad.

En la medicina regenerativa del cartílago, el desarrollo de nuevos planteamientos se enfoca en el uso de matrices o andamios que permitan mejorar el mantenimiento del fenotipo tanto de los condrocitos, que en condiciones 2D de cultivo tienden a la desdiferenciación en células fibroblásticas, como de las células que tengan la potencialidad de diferenciarse al linaje condrogénico. Entre algunos de los sustratos de cultivos tridimensionales más usados encontramos las matrices de colágeno tipo I (Rosenzweig y col., 2013; Compañ, 2016; Horbert y col., 2018), los hidrogeles de ácido hialurónico (Zhu y col., 2016) y actualmente la MAH, que al tener abundantes componentes estructurales del cartílago y por el bajo costo de la preparación de injertos a partir del amnios con muy buenos resultados clínicos, la han convertido en una alternativa natural viable frente a otros apósitos sintéticos en la ingeniería tisular del cartílago.

Davis y col. (1910) fueron los primeros en utilizar membranas fetales (amnios y corion) en aplicaciones clínicas, específicamente en el trasplante de piel. En oftalmología su empleo fue señalado por primera vez en 1940 por De Rotth quien utilizó las membranas fetales en la superficie ocular como un apósito biológico para el tratamiento de defectos conjuntivales.

Jin y col. (2007) evaluaron la viabilidad de la MAH como portador de condrocitos mediante la evaluación del mantenimiento del fenotipo *in vitro*, así como la regeneración del cartílago *in vivo*. Los condrocitos articulares de conejo se sembraron en el lado epitelial de

MAH intacta, en el lado basal de MAH denudada y en el lado estromal de MAH denudada. Estas muestras de sustrato celular fueron cultivadas durante 4 semanas, examinando la velocidad de proliferación celular y la estabilidad fenotípica en las semanas 1 y 4. Como resultado obtuvieron que los condrocitos tuvieron un crecimiento en monocapa en los sustratos intacto y lado basal de la MAH denudada pero al ser cultivados sobre el lado estromal los mismos penetraron y se diseminaron en todo el espesor de la capa estromal. Además, la expresión de colágeno tipo II aumentó gradualmente con el tiempo en el sustrato con los condrocitos en el lado estromal, mientras que disminuyó gradualmente en los condrocitos sobre el lado basal o no se detectó en absoluto en el grupo de MAH intacta. Estos resultados sugieren que la MAH denudada fue capaz de mantener el fenotipo *in vitro*, aparentemente más favorable cuando se utilizó el lado estromal de la MAH denudada. En base a estos datos, esta última fue utilizada para cubrir el defecto osteocondral de conejo con el lado estromal haciendo contacto y luego de realizar la tinción Safranina O apreciaron que el área del defecto se regeneró exitosamente con cartílago hialino, indicando que la MAH denudada podría ser una de las matrices portadoras de células ideales para la regeneración del cartílago.

Liu y col. (2014) también evaluaron el efecto reparador de la MAH denudada en el defecto del cartílago articular de conejo pero esta vez como soporte de células madre mesenquimales de medula ósea (CMMO). Para el experimento colocaron en el área de las lesiones el complejo MAH-CMMO en el primer grupo y MAH sola en el segundo, observándose mediante microscopia e histología en la semana 8 y 12 post-operatoria la formación de células densas similares a cartílago en el primer grupo. Posteriormente evaluaron el nivel del defecto articular asignándole una puntuación de  $5,31 \pm 0,68$  en la

semana 8 y de  $3,23 \pm 0,52$  en la semana 12, indicando un buen efecto de reparación del defecto articular.

Para garantizar estos resultados *in vivo*, es necesario la conservación de la actividad celular (factores de crecimiento y citocinas) junto a las propiedades anti-inflamatorias, anti-bacterial y anti-fibrogénica de la MAH en el tiempo, por tal motivo muchos autores indican el uso de agentes protectores tales como el DMSO. Yazdanpanah y col., (2015) realizaron una comparación entre la MA criopreservada y sin criopreservar en la actividad de modulación de la angiogénesis en un modelo animal, obteniendo que después de 6 meses de criopreservación la respuesta en el proceso de angiogénesis fue similar a la MA en fresco.

Navarro (2013) evaluó el uso del estroma de la MAH como biosustrato comparando dos métodos de preservación: criopreservación con glicerol y la vitrificación utilizando etilenglicol como crioprotector. Luego de 10 días de criopreservación obtuvo que las características intrínsecas del estroma se mantenían tales como la membrana basal y la matriz extracelular, siendo mejor la adhesión y proliferación de las células epiteliales subcultivadas en el estroma vitrificado.

Finalmente, en 2010b, Diaz-Prado y colaboradores evaluaron el uso potencial de la MAH criopreservada como soporte para los condrocitos en la reparación del cartílago en humanos. Los condrocitos aislados del cartílago articular humano, se cultivaron sobre el lado epitelial y estromal de la MAH, y la reparación se evaluó a las 4, 8 y 16 semanas mediante análisis histológico. Los condrocitos cultivados en la MAH revelaron que las células crecían en la capa estromal pero no en el lado epitelial, expresando colágeno tipo II pero no tipo I, lo que indica que después de estar en cultivo durante 3-4 semanas no había desdiferenciación. Los experimentos de reparación *in vitro* mostraron formación de un nuevo tejido en el cartílago

OA que expresa colágeno tipo II, indicando que las MAH criopreservadas se pueden usar para apoyar la proliferación de condrocitos para la terapia de trasplante para reparar el cartílago OA.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Determinar el potencial de diferenciación condrogénica de las células epiteliales provenientes de la membrana amniótica humana.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Aislar las células epiteliales a partir de la membrana amniótica.
- Establecer el cultivo en monocapa de las células epiteliales de la membrana amniótica y caracterizar las células mantenidas “in vitro”.
- Criopreservar el estroma de la membrana amniótica.
- Establecer el cultivo de las células epiteliales de la membrana amniótica sobre el estroma criopreservado.
- Inducir las células epiteliales hacia el linaje condrogénico, en los diferentes sistemas de cultivo.
- Evaluar la diferenciación condrogénica de las células epiteliales de la membrana amniótica.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Material biológico

Para el establecimiento del cultivo de células epiteliales de la membrana amniótica se utilizaron placentas humanas (n=9) entre 38-40 semanas de gestación, obtenidas mediante cesáreas electivas desde el Instituto Médico Quirúrgico Dr. Jiménez Rojas por el Dr. Pedro Hurtado, realizadas a mujeres sanas, mayores de edad, con un embarazo sin patologías placentarias y con pruebas serológicas del primer trimestre negativas (Virus de Inmunodeficiencia Adquirida - VIH, Hepatitis B – HBV, Hepatitis C – HCV y Sífilis), bajo consentimiento informado y con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela (UCV). Las mismas fueron recolectadas en un envase plástico previamente esterilizado y 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.



**Figura 2.** Placenta humana.

#### 4.2 Aislamiento de la membrana amniótica humana (Navarro, 2013).

Se separó el amnios del corion y de la placenta de forma manual realizando un corte transversal a nivel del cordón umbilical en condiciones de asepsia bajo una campana de flujo laminar horizontal. Posteriormente, la membrana amniótica fue transferida a un envase de vidrio estéril, en donde se lavó con agitación manual, en Solución Buffer de Fosfato (PBS) libre de calcio y magnesio suplementado con una mezcla al 2% de Antibióticos – Antimicóticos (Penicilina, Estreptomina y Anfotericina B) + Gentamicina 100 µg/mL. Se repitió el procedimiento 2 veces más para luego extender la membrana sobre una placa de Petri, eliminar restos de sangre y cortarla en secciones pequeñas. Luego se realizaron tres lavados adicionales y se fijó una parte en Formalina neutra al 10% para su evaluación histológica. Se realizaron pruebas de esterilidad de las soluciones del primer, quinto y sexto de lavado, con el objetivo de descartar la presencia de contaminación durante la manipulación y procesamiento de la misma.



**Figura 3.** Material utilizado en el aislamiento de la MAH.

### **4.3 Denudación de la membrana amniótica humana y establecimiento de cultivos primarios en monocapa.**

Las secciones de membrana amniótica fueron incubadas en una mezcla de enzima Dispasa II 1,2 U/mL en base de medio Ham-F12, a 4 °C por aproximadamente 18 h. Pasado éste tiempo, los trozos de tejido se transfirieron a una placa de Petri estéril donde se extendieron y cortaron en secciones de 4 x 4 cm aproximadamente, bajo condiciones de asepsia. Empleando un raspador de células, se obtuvieron las células epiteliales las cuales fueron recogidas en PBS, trasvasadas a tubos de centrifuga de 50 mL y resuspendidas vigorosamente con la ayuda de una pipeta, para luego ser centrifugadas a 4°C y 2446,66 g por 10 min. El taco celular obtenido se resuspendió en PBS y se filtró a través de una gasa estéril, realizando varios lavados y centrifugando nuevamente en las condiciones antes mencionadas. Una vez obtenidas las células se resuspendieron en medio nutritivo, el cual consiste en una mezcla de medio de cultivo Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) y medio Ham-F12 en proporción 3:1 y suplementado con 15% de Suero Fetal de Bovino (SFB), 1% de Antibióticos – Antimicóticos, 10 ng/mL de Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), 2 mM de L-Glutamina y 1 mM de Piruvato de Sodio, como fuente extra de energía; y se realizó el conteo celular. Para esto se utilizó el colorante de exclusión Azul de tripano así como un hemocitómetro o cámara de Neubauer (BOECO) con lo cual se obtuvo el número de células viables presentes dentro del total de la población celular aislada. Finalmente fueron sembradas aproximadamente entre 1.000.000 – 5.000.000 células en placas o frascos de cultivo estériles preparados previamente con una capa de Gelatina al 1%. Los cultivos celulares fueron mantenidos en una incubadora a 37 °C, en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo fue reemplazado inicialmente a los 3 días de cultivo para así eliminar

restos de células y detritus sin interferir en el proceso de adhesión celular y posteriormente los cambios de medio fueron de manera periódica. Al alcanzar entre el 80 – 90% de confluencia en la superficie de cultivo, se iniciaron los subcultivos con el fin de amplificar y obtener una población más homogénea.

#### **4.4 Establecimiento de los subcultivos.**

Las células adheridas de la monocapa fueron sometidas a un proceso de disgregación con una solución de Tripsina al 0,125% - EDTA al 0,02 % en una proporción 1:1, incubándolas a 37 °C en atmósfera húmeda al 5 % de CO<sub>2</sub> por un tiempo de 5 minutos. La enzima se inactivó con medio nutritivo y la suspensión fue centrifugada a 2446,66 g por 10 minutos. Las células del primer pasaje se sembraron a una concentración aproximada de 2 x10<sup>5</sup> células para el sistema de inducción en monocapa y con una concentración aproximada de 2 x 10<sup>6</sup> células para los cultivos sobre el estroma vitrificado de la membrana amniótica. El mantenimiento de los subcultivos se realizó bajo las mismas condiciones descritas para los cultivos primarios.

#### **4.5 Obtención del estroma y criopreservación.**

Después de obtener la membrana amniótica, parte de los trozos intactos y los trozos de tejidos desnudos fueron lavados en PBS y luego extendidos y cortados sobre papel de nitrocelulosa esterilizado por autoclave en las dimensiones requeridas para luego ser introducidos individualmente en criotubos para su vitrificación.

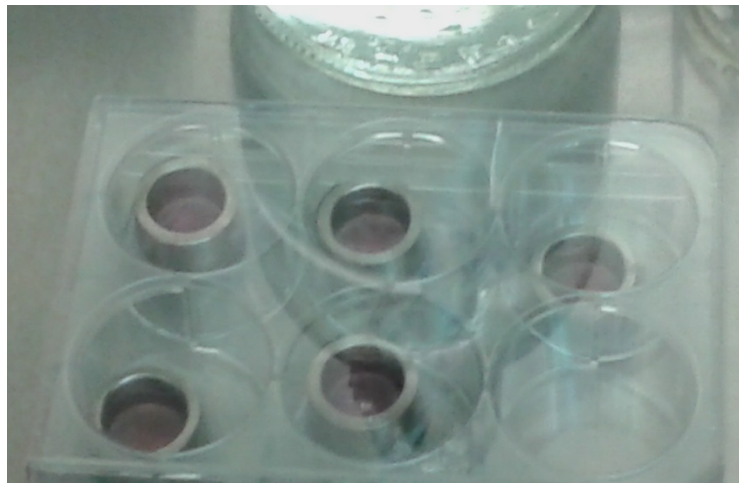
La vitrificación se realizó según la metodología propuesta por Moon y col. (2008), con algunas modificaciones. Para éste procedimiento las secciones de tejido en conjunto con el papel se incubaron en una solución de equilibrio compuesta por 20% Etilenglicol en una base de PBS, por 10 min. Posteriormente, se descartó el exceso y se incubó en la solución de vitrificación a 4 °C que contiene 40% Etilenglicol, 18% Linfoprep, 0.3M Sacarosa y 20% SFB, y se sumergieron directamente en nitrógeno líquido a -180 °C hasta su posterior uso.

#### **4.6 Caracterización morfológica de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.**

Una vez logrado el establecimiento y mantenimiento de los cultivos, se realizó el estudio de caracterización morfológica mediante observaciones y registros periódicos al microscopio invertido de contraste de fases Olympus IX50 el cual se encuentra acoplado a una computadora, así como coloraciones de rutina con May Grünwald –Giemsa. Para ello las células se fijaron con metanol 100 % por 5 minutos. Luego se añadió el colorante May Grünwald y se dejó actuar por 3 minutos, lavando el exceso para en seguida colocar el colorante Giemsa, previamente filtrado y diluido en una proporción 1:18 en agua destilada, por 20 minutos. Por último, se deshidrataron las muestras pasándola rápidamente por: acetona, acetona- xilol (2:1), acetona- xilol (1:2), xilol; dejándolas en éste último unos minutos y posteriormente se realizó el montaje permanente en medio Permount (Urbaneja y col., 1975).

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

El estroma de la membrana amniótica criopreservado fue descongelado de forma gradual sometándolo a las siguientes temperaturas:  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 min,  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 min y por ultimo baño de María a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Se descartó el líquido de vitrificación y fue rehidratado en solución PBS. La población homogénea de células epiteliales provenientes del primer subcultivo (P1) se sembró sobre él siguiendo el procedimiento descrito por Navarro (2013). Las células fueron sembradas en placas multipozos de  $3 \times 2$  que contenían un anillo de acero inoxidable (Figura 4) el cual delimita el área del biosustrato y se incubaron en medio nutritivo por 2 días bajo las condiciones antes mencionadas para que las células se adhieran al sustrato, haciéndole seguimiento con observaciones al microscopio invertido de contrastes de fases.



**Figura 4.** Sistema empleado para el cultivo de las CEMAH sobre el estroma de la MAH.

#### **4.8 Ensayos para la diferenciación condrogénica.**

Para la inducción condrogénica las CEMAH del primer pasaje en cultivo en monocapa o tridimensional (sembradas sobre el estroma de la MA) fueron mantenidas con el medio inductor condrogénico (DMEM:F12 en una relación 1:1 suplementado con 10 % SFB, 50 mg/mL ácido ascórbico, 10 mg/mL insulina recombinante,  $1 \times 10^{-7}$  M dexametasona, 1% Antibióticos – Antimicóticos) según el protocolo propuesto por Márquez (2012), mientras que los cultivos controles de CEMAH de ambos sistemas, se mantuvieron en medio nutritivo no inductor.

##### **4.8.1 Cultivo en monocapa**

Las células epiteliales del primer pasaje fueron cultivadas en monocapa en placas multipozos de 3 x 4 donde se realizó la inducción, para lo cual fueron mantenidas en medio inductor condrogénico a 37 °C en atmósfera húmeda al 5 % de CO<sub>2</sub> durante 17 días, con cambios periódicos de medio. Las observaciones y registros fotográficos se realizaron en un microscopio de contraste de fases Olympus IX acoplado a una computadora.

##### **4.8.2 Cultivo sobre el biosustrato**

Las células epiteliales del primer pasaje previamente sembradas sobre el estroma de la membrana amniótica, fueron mantenidas en medio inductor condrogénico a 37 °C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> durante 17 días, con cambios periódicos de medio y observaciones al microscopio de contraste de fases. Transcurrido el tiempo de inducción, las placas se fijaron con Formalina neutra al 10% para su posterior evaluación histológica.

#### **4.9 Evaluación histoquímica de la diferenciación de las células epiteliales de la membrana amniótica (CEMAH).**

Con la finalidad de evaluar los cambios a nivel de morfología y características histológicas que ocurrieron durante la diferenciación “*in vitro*” de las CEMAH en ambos sistemas de cultivo, se realizaron observaciones periódicas al microscopio invertido de contraste de fases adicional a las coloraciones descritas a continuación:

##### **4.9.1 Cultivos en monocapa**

La coloración con Azul de Toluidina (Lynch y Mellor, 1985) indica la presencia de componentes de matriz extracelular como el heparán sulfato y el agregano, proteoglicanos característicos del cartílago joven, gracias a su capacidad metacromática; para ello, las muestras fijadas con metanol 100% se hidrataron con agua corriente y fueron coloreadas con una solución de Azul de Toluidina diluida en agua al 0,1 % dejando actuar el colorante por 10 minutos que posteriormente fue lavada con agua corriente para su visualización al microscopio.

Así mismo se realizó una coloración con Azul Alcían a pH 2,5 (Prophet, 1995), la cual pone en manifiesto la presencia de glucosaminoglucanos (GAGs) con grupos sulfatados y carboxilados, donde la muestra fijada en metanol 100% se incubo con una solución de ácido acético al 3 % durante 3 minutos para inmediatamente teñir con la solución de Azul Alcían por 50 minutos y después se lavó con agua corriente por 10 minutos. Por último se contrastaron los núcleos con hematoxilina férrica (30 segundos), se lavó con agua corriente y con agua destilada y se observaron al microscopio.

Adicional se realizó una coloración con Sudan III, que permite evidenciar la presencia de lípidos. Para ello las muestras fijadas en formalina neutra al 10 % fueron teñidas con la solución Sudan III filtrada previamente por 5 min y luego se lavaron con etanol 70% y agua destilada. Los núcleos fueron contrastados con hematoxilina férrica durante 5 min y lavados con agua corriente para su posterior montaje en medio acuoso semipermanente de Jalea de Glicerina.

#### **4.9.2 Cultivo sobre el biosustrato.**

Para la preparación de las muestras se siguió la metodología descrita por Navarro, (2013): Las secciones de membrana amniótica fueron fijadas en formalina al 10% luego de lo cual se lavaron y deshidrataron en una batería creciente de etanol alcanzando de manera gradual el 100% de la concentración, después de lo cual fueron aclaradas con dos cambios de tolueno. Posteriormente, las muestras se incluyeron en parafina permitiendo darle un soporte suficientemente sólido al tejido para ser cortado en secciones de 5  $\mu\text{m}$  de espesor en un micrótopo rotatorio marca Spencer. Los cortes obtenidos fueron colocados en portaobjetos, previamente cubiertos con una película de Gelatina al 1%. 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 descrita para el cultivo en monocapa además de la coloración de rutina Hematoxilina- Eosina.

La coloración Hematoxilina – Eosina es una técnica que consiste en una combinación de los dos colorantes que dan contrastes entre tonalidades azul- violácea y el rosa, indicando

la ubicación dentro del tejido de los componentes básicos o basófilos teñidos por la Hematoxilina y los componentes ácidos o eosinófilos que son afines a la eosina respectivamente.

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

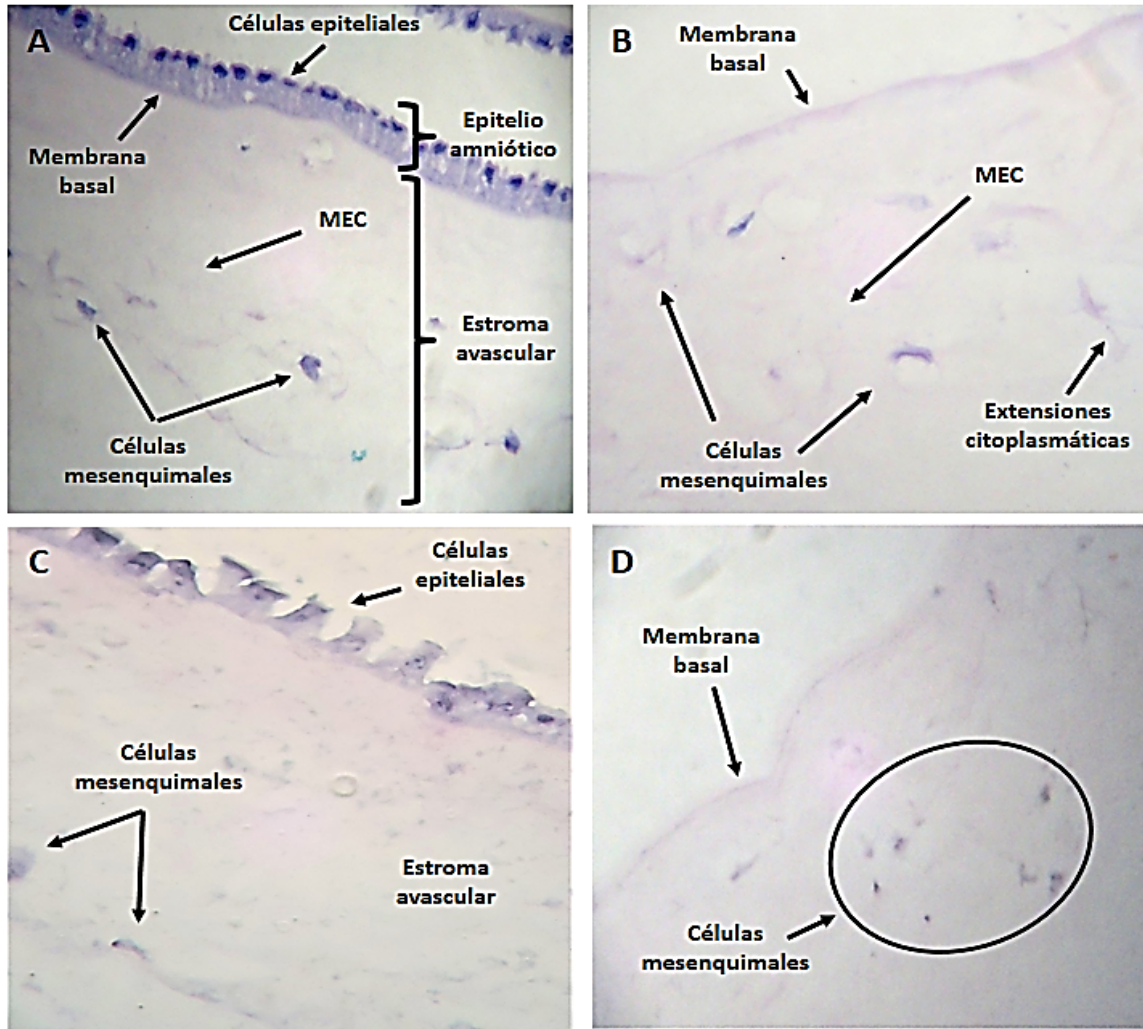
## 5. RESULTADOS

Los resultados expuestos a continuación corresponden al estudio del potencial de diferenciación condrogénica de las células epiteliales provenientes de la membrana amniótica humana (CEMAH) en sistemas de cultivo en monocapa y sobre el estroma de la membrana amniótica humana usado como biosustrato tridimensional. También se incluyen las características histológicas de la MAH intacta y denudada, así como el establecimiento y caracterización de los cultivos de las células epiteliales amnióticas.

### 5.1 Evaluación histológica de la membrana amniótica humana y su criopreservación.

Una vez realizado los cortes histológicos, se utilizó la coloración Hematoxilina-Eosina para examinar las características morfológicas de la MAH (Figura 5).

Se observa la capa epitelial del amnios (Fig. 5A) la cual está constituida por un epitelio simple y continuo de células cilíndricas o cuboidales en ciertas zonas, poseen un núcleo redondeado céntrico e intensamente basófilo con un citoplasma basófilo. Esta se dispone sobre una membrana basal gruesa que presenta una tonalidad medianamente basófila y separa el epitelio amniótico del estroma avascular. Bajo la misma, se encuentra adherida la capa estromal, cuyo grosor puede variar entre individuos y entre los diferentes estadios gestacionales. Histológicamente, esta capa es levemente eosinófila y en ella se observan las células mesenquimales, las cuales son fusiformes, con extensiones citoplasmáticas levemente basófilas y sus núcleos esféricos u ovalados intensamente basófilos, inmersas en una matriz extracelular que son secretadas por ellas mismas.



**Figura 5.** Corte longitudinal de la membrana amniótica humana (MAH) intacta y denudada con Dispasa, antes y después la de criopreservación. Coloración Hematoxilina – Eosina. 400X. A) MAH intacta sin vitrificar. B) MAH denudada sin vitrificar. C) MAH intacta vitrificada. D) MAH denudada vitrificada.

En esta micrografía también se observa que después de la disgregación enzimática utilizando Dispasa, se logró la remoción completa de las células epiteliales sin afectar la composición de la membrana basal ni la matriz extracelular, manteniendo la integridad del estroma (Fig. 5B).

Con el fin de mantener la funcionalidad y viabilidad del estroma de la membrana amniótica humana para su uso como biosustrato en los ensayos de diferenciación condrogénica, se sometió el tejido intacto y desnudo a un proceso de vitrificación (Fig. 5C y 5D), y una vez comparado con el tejido fresco se pueden observar diferencias en la morfología celular que conforman ambas capas (epitelial y estromal). Por ejemplo, existe una pérdida de volumen en los núcleos, además se evidenciaron solo algunas células mesenquimales viables en el estroma y en otras solo se aprecian núcleos picnóticos, asimismo la MEC luego de la vitrificación se ve más compacta. No obstante, y a pesar de estas diferencias, la membrana basal y la MEC mantienen sus características intrínsecas después del tratamiento, lo que sugiere la conservación del estroma para ser utilizado como biosustrato.

## **5.2 Aislamiento de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.**

En la tabla 3, se muestra la cantidad de células obtenidas por cada una de las membranas procesadas. Allí podemos ver que inicialmente la cantidad de células obtenidas fue mucho menor que en las muestras subsiguientes. En este sentido es importante mencionar que para el aislamiento de las células epiteliales se utilizó la Dispasa II en la metodología. Al inicio de la investigación se observó que al concentrar las células aisladas se forma una sustancia mucosa. Luego de procesar 4 membranas, y con la intención de aumentar el rendimiento celular, se decidió adicionar un paso en el protocolo de aislamiento y utilizar Tripsina /EDTA 1:4 (muestra 5), luego del cual se observó que la sustancia mucosa se disolvió y se obtuvo un rendimiento similar al promedio, sin embargo aumentó la mortalidad de las células y no pudiéndose realizar el cultivo de estas células, se retomó el protocolo

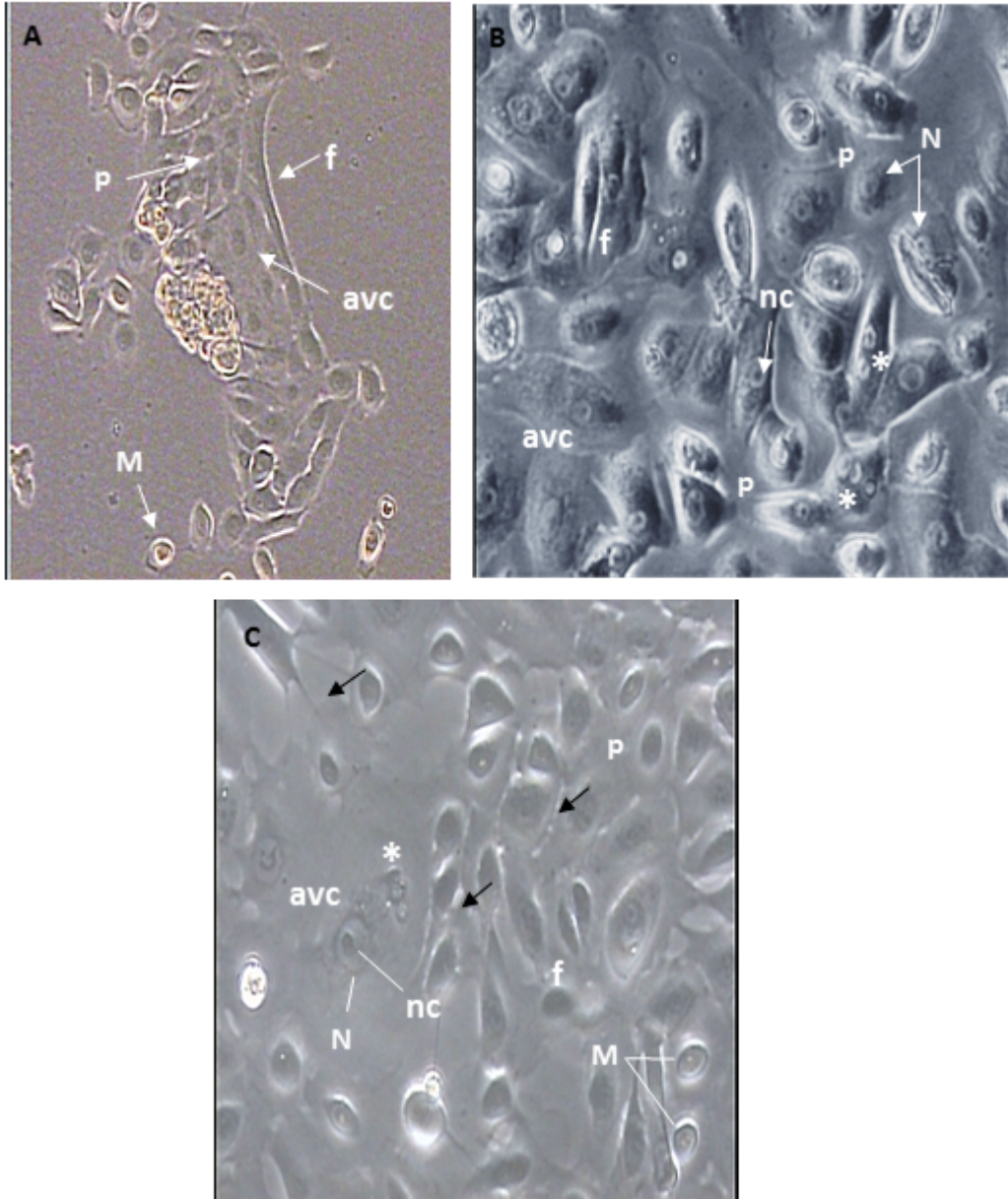
original a partir de la muestra 6. En la tabla N° 3 podemos ver que el rendimiento promedio fue  $16,3 \times 10^6 \pm 10,06 \times 10^6$  células.

**Tabla 3.** Rendimiento celular obtenido por membrana amniótica humana procesada.

Número de muestra (n)	Número de células obtenidas (cél.)	Cultivo primario	Subcultivo
1	940.000	-	-
2	2.062.500	+	-
3	19.950.000	+	+
4	33.700.000	+	+
5	12.950.000	+	-
6	16.800.000	-	-
7	19.875.000	-	-
8	19.350.000	+	+
9	20.960.000	+	+
<b>Promedio</b>	$16,3 \times 10^6 \pm 10,06 \times 10^6$		

### 5.3 Establecimiento de los cultivos primarios de las CEMAH.

Una vez aisladas las células epiteliales se realizó el cultivo primario en monocapa. En la figura 6 se muestra la evolución del cultivo desde el cuarto hasta el décimo día. En esta podemos observar que inicialmente hay colonias dispersas en las cuales se pueden diferenciar al menos tres tipos celulares (Fig. 6A); unas células alargadas tipo fibroblastos (f) que se disponen en la periferia de las colonias, rodeando a los otros tipos celulares que se observan, como las células de amplio volumen citoplasmático (avc) y células poligonales, morfología característica de las células epiteliales.



**Figura 6.** Cultivo primario en monocapa de células epiteliales de la MAH. Contraste de fases. Se observan células en mitosis (M), así como tres tipos de morfologías: grupos celulares alargadas o tipo fibroblastos (f), grupos de células poligonales con amplio volumen citoplasmático (avc) y grupos de células poligonales de tipo epitelial (p). A) Colonia establecida a los 4 días de cultivo. Se observa una disposición periférica de las células similares a fibroblastos. 100X. B) 8 días y C) 10 días de cultivo, donde se aprecian los núcleos redondeados (N) que presentan 1 o 2 nucléolos (nc) y la presencia de vacuolas citoplasmáticas identificadas con asteriscos (\*). Uniones intercelulares (adherentes) están identificadas con flechas (→). 200X.

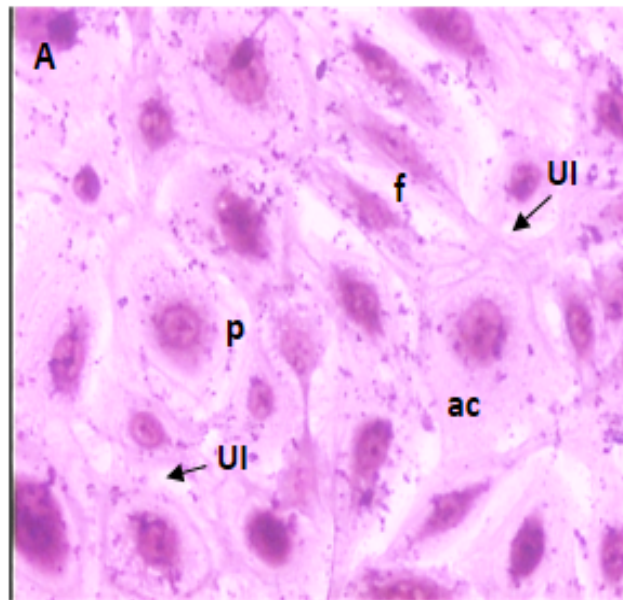
A medida que pasa el tiempo de cultivo (Fig.6 B y C) observamos una mayor cantidad de células poligonales (p) las cuales presentan un núcleo central redondeado y de gran tamaño, y puede presentar uno o dos nucléolos (nc). El citoplasma es denso y granular en la región perinuclear y presentan vacuolas. Las células de amplio volumen citoplasmático, como su nombre lo indica, presentan un citoplasma amplio y su forma tiende a ser redondeada, presentan un núcleo central con un nucléolo prominente y también pueden presentar vacuolas (Fig. 6C). Como se mencionó previamente, se observa otro tipo celular en menor proporción, las células tipo fibroblastos (f) con una morfología ahusada, un núcleo central ovalado con nucléolo prominente y en estas también se pueden observar vacuolas.

En relación al tiempo de cultivo, se determinó que los cultivos primarios alcanzaron la confluencia generalmente entre los 12 y 15 días; luego de lo cual se realizaron los subcultivos. En este trabajo, se observó que luego del quinto pasaje disminuyó la proliferación y las células presentaron características de senescencia (resultados no mostrados). Con base en estos resultados, se decidió emplear las células del primer subcultivo para realizar la diferenciación condrogénica.

#### **5.4 Caracterización morfológica de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.**

Para la caracterización morfológica de los cultivos primarios, se realizó una coloración de rutina May-Grünwald – Giemsa, la cual permite visualizar los componentes ácidos y básicos las células presentes en el cultivo.

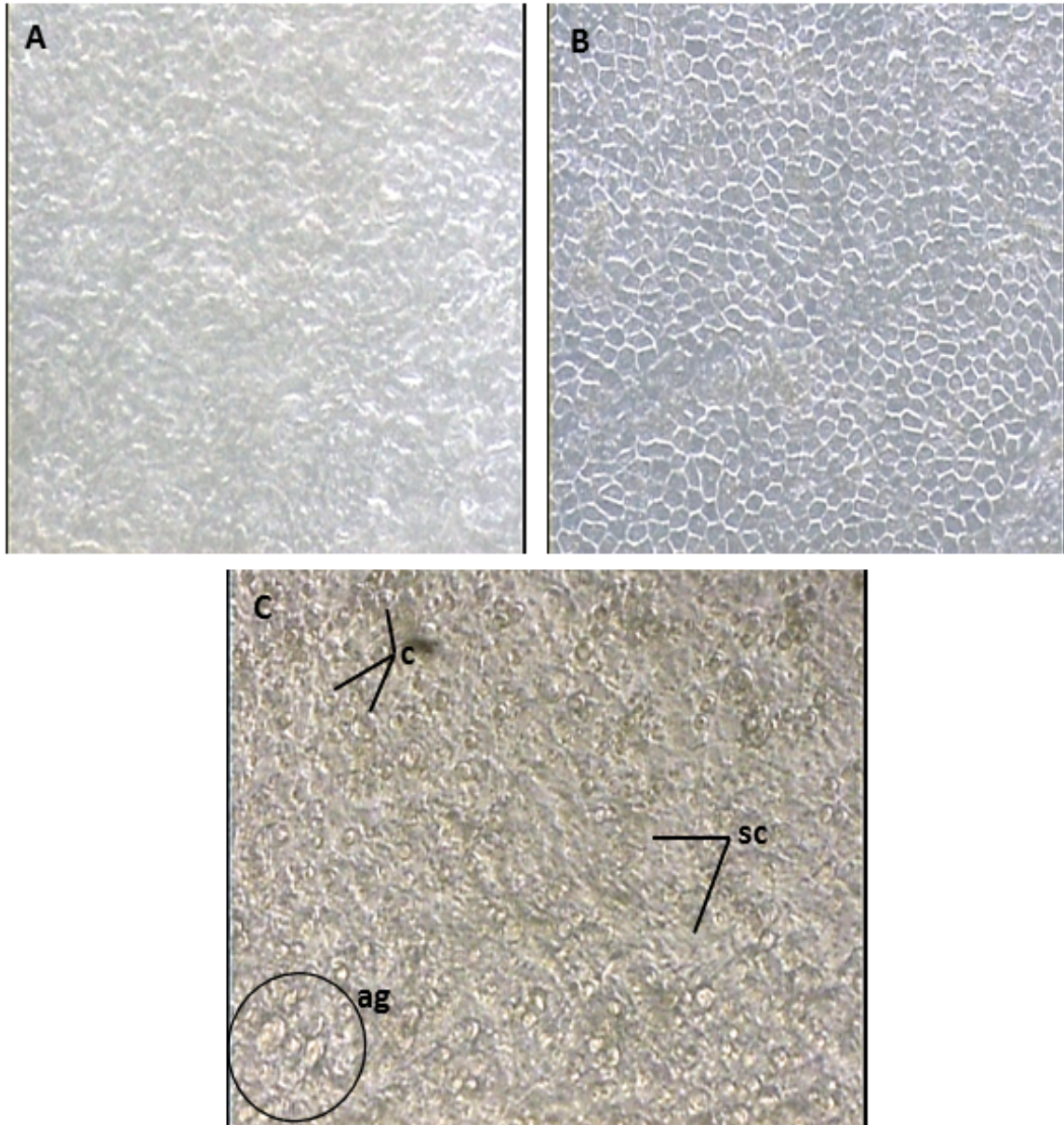
En la Figura 7 se pueden ver los 3 fenotipos celulares previamente descritos. Allí vemos que estas células presentan núcleos basófilos, eucromáticos con la heterocromatina dispuesta en la periferia, con morfología redondeada y dos nucléolos intensamente basófilos. El citoplasma es levemente basófilo y en el caso de las células poligonales de amplio volumen citoplasmático, la coloración es homogénea en comparación a las poligonales de tipo epitelial y las alargadas que presentan una región intensamente basófila cercana al núcleo. Así mismo, se puede observar las uniones adherentes (UI) similares a desmosomas que representa la comunicación, reconocimiento e interacción entre las células.



**Figura 7.** Cultivo primario de células epiteliales de la MAH (8 días). 200X. May Grünwald - Giemsa. Se observan tres tipos celulares: alargadas o tipo fibroblastos (f), poligonales con amplio citoplasma (ac) y poligonales de tipo epitelial (p), además de las Uniones intercelulares (UI).

### **5.5 Establecimiento de los cultivos de las CEMAH sobre el estroma de la membrana amniótica vitrificado.**

Las células epiteliales amnióticas provenientes del primer pasaje fueron cultivadas sobre el estroma denudado de la MAH previamente vitrificado, para lograr el establecimiento de las mismas previo a la inducción. Se dejaron al menos dos días con medio nutritivo y durante este tiempo se realizaron observaciones al microscopio de contraste de fases. Como controles se mantuvieron de manera similar, la membrana amniótica denudada (estroma) y la membrana amniótica intacta (Figura 8), donde se puede ver que la disposición de las células epiteliales es a modo de una capa simple tipo mosaico cuyo predominio es la morfología poligonal tipo epitelial (Fig. 8B), mientras que al evaluar las células del primer pasaje cultivadas sobre el estroma (Figura 8C), se aprecia que la morfología de las células es redondeada y que existe una alta adhesión de las mismas sobre la capa estromal, formando en algunas zonas agregados celulares, así mismo, existen otras regiones donde no hay células adheridas que se identifican al compararla con el estroma denudado (Fig. 8A). De igual manera, se pudo ver que en el tiempo de cultivo bajo las condiciones de inducción no se formó una monocapa continua de células.



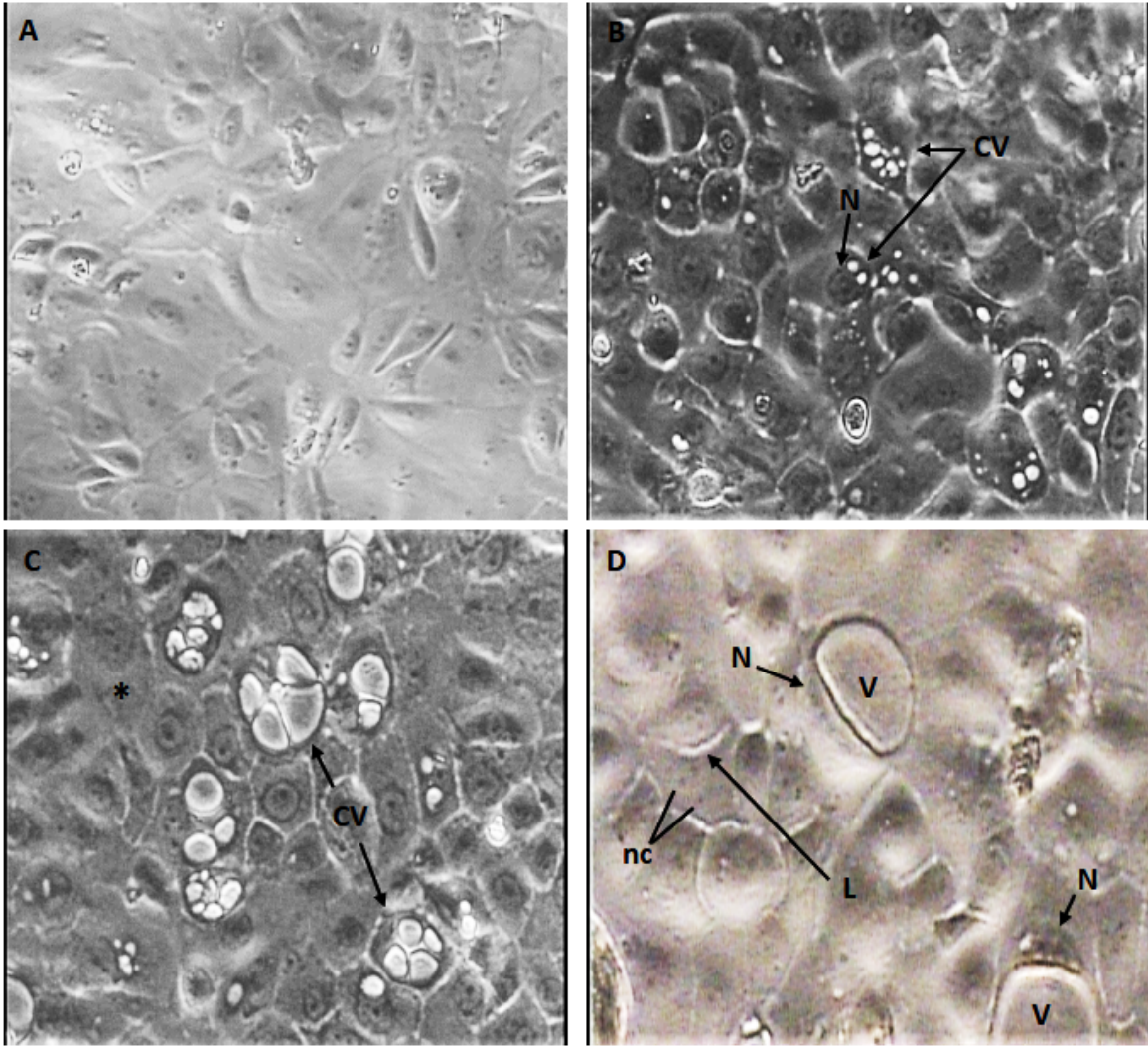
**Figura 8.** Estroma de la MAH previo a los ensayos de diferenciación condrogénica. Contraste de fases. 100X. A) Estroma de MAH denudado donde no se observan células. B) Estroma de MAH intacto se puede ver las células poligonales y las uniones entre ellas y C) Cultivo de las CEMAH provenientes del Primer pasaje sobre el estroma denudado, se pueden ver zonas donde hay células adheridas (c), zonas sin células (sc) y zonas donde hay agregados (ag ).

## **5.6 Diferenciación condrogénica de las células epiteliales amnióticas.**

Para la inducción condrogénica las células epiteliales del primer pasaje en ambos sistemas de cultivo fueron mantenidas durante 17 días en el medio inductor condrogénico (DMEM: F12 en una relación 1:1 suplementado con 10 % SFB, 50 mg/mL ácido ascórbico, 10 mg/mL insulina recombinante,  $1 \times 10^{-7}$  M dexametasona, 1% Antibióticos – Antimicóticos), mientras que los cultivos controles de CEMAH se mantuvieron en medio nutritivo no inductor.

### **5.6.1 Diferenciación en sistemas de cultivo en monocapa.**

Mediante el monitoreo por microscopia de contraste de fases se pudo determinar que a partir de los cuatro días de inducción las CEMAH comenzaron a mostrar cambios morfológicos, los cuales fueron incrementando a través del tiempo como se puede ver en la figura 9. En esta se puede ver que a los siete días de inducción (Fig. 9B) hay grupos de células redondeadas con un núcleo esférico y excéntrico, también presentan vacuolas. A los once días post-inducción (Fig. 9C) se observan algunas células con citoplasma amplio y que presentan una forma esférica y con múltiples vacuolas, siendo estas más grandes que las observadas previamente. A los diecisiete días de inducción (Fig. 9D) se muestra a mayor aumento, un cultivo en el que se pueden ver células con características típicas de un condrocito maduro como la presencia de una vacuola (V) la cual desplaza al núcleo (N) hacia la periferia, excéntrico. Y además se pueden ver células con una morfología elipsoidal (L) semejantes a la morfología de los condrocitos jóvenes.



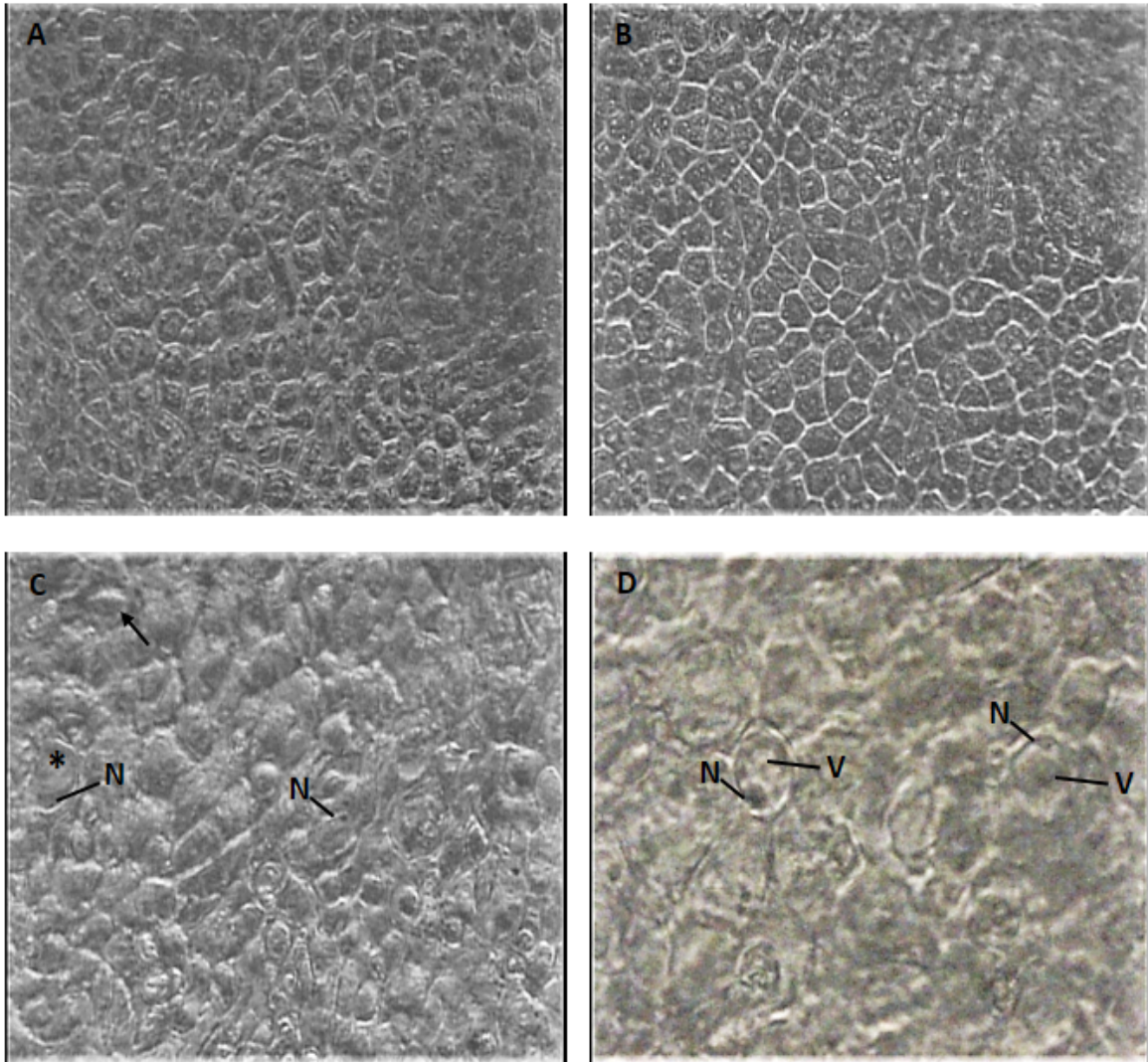
**Figura 9.** Diferenciación condrogénica en sistemas de cultivo en monocapa de las CEMAH provenientes del primer pasaje. Contraste de fases. A) Cultivo control de CEMAH (17días). Se observan las distintas morfologías celulares descritas en los cultivos primarios. 100X. B) CEMAH 7 días post-inducción Se observan células con morfología poligonal y con núcleos (N) redondeados levemente excéntricos. Se aprecian algunas células con pequeñas vacuolas (CV). 200X. C) CEMAH 11 días post-inducción. Se puede ver células con distintos grados de vacuolización (CV) y células con un mayor volumen citoplasmático (\*). 200X. D) CEMAH 17 días post-inducción. Se muestran células con morfología similar a un condrocito maduro, con una única vacuola (V) y un núcleo (N) desplazado a la periferia. Además se observan células con morfología elíptica, semejante a condrocitos jóvenes (L) y con múltiples nucléolos (nc). 400X.

### **5.6.2 Diferenciación sobre el estroma de la MAH como sistema tridimensional de cultivo.**

Para evaluar la diferenciación de las CEMAH sobre el estroma de la membrana denudada (Fig. 10 C y D) se incluyeron 4 controles, esto es, la membrana amniótica humana intacta en medio nutritivo (Fig. 10 A) y medio inductor (Fig. 10 B), y la membrana amniótica humana denudada en medio nutritivo y medio inductor (resultados no mostrados).

En la figura 10, se puede ver como la membrana amniótica intacta conserva su morfología característica aun cuando se mantuvo en medio condrogénico (Fig. 10B). En relación a los controles con el estroma denudado mediante microscopia de contraste de fases no se observó ningún cambio (resultados no mostrados).

Cuando las células epiteliales aisladas fueron subcultivadas sobre el estroma denudado e inducidas las células hacia el linaje condrogénico, se pudo observar cambios que incluyen presencia de una vacuola de gran tamaño, la cual desplaza el núcleo hacia la periferia, viéndose aplanado, siendo esta morfología semejante a la de los condrocitos maduros. En menor proporción, como se aprecia en la Figura 10C, se observan otras células con morfología elipsoidal con núcleos ovalados semejantes a condrocitos jóvenes. A los 17 días de inducción, hay una mayor cantidad de células redondeadas semejantes a los condrocitos (Fig. 10D).



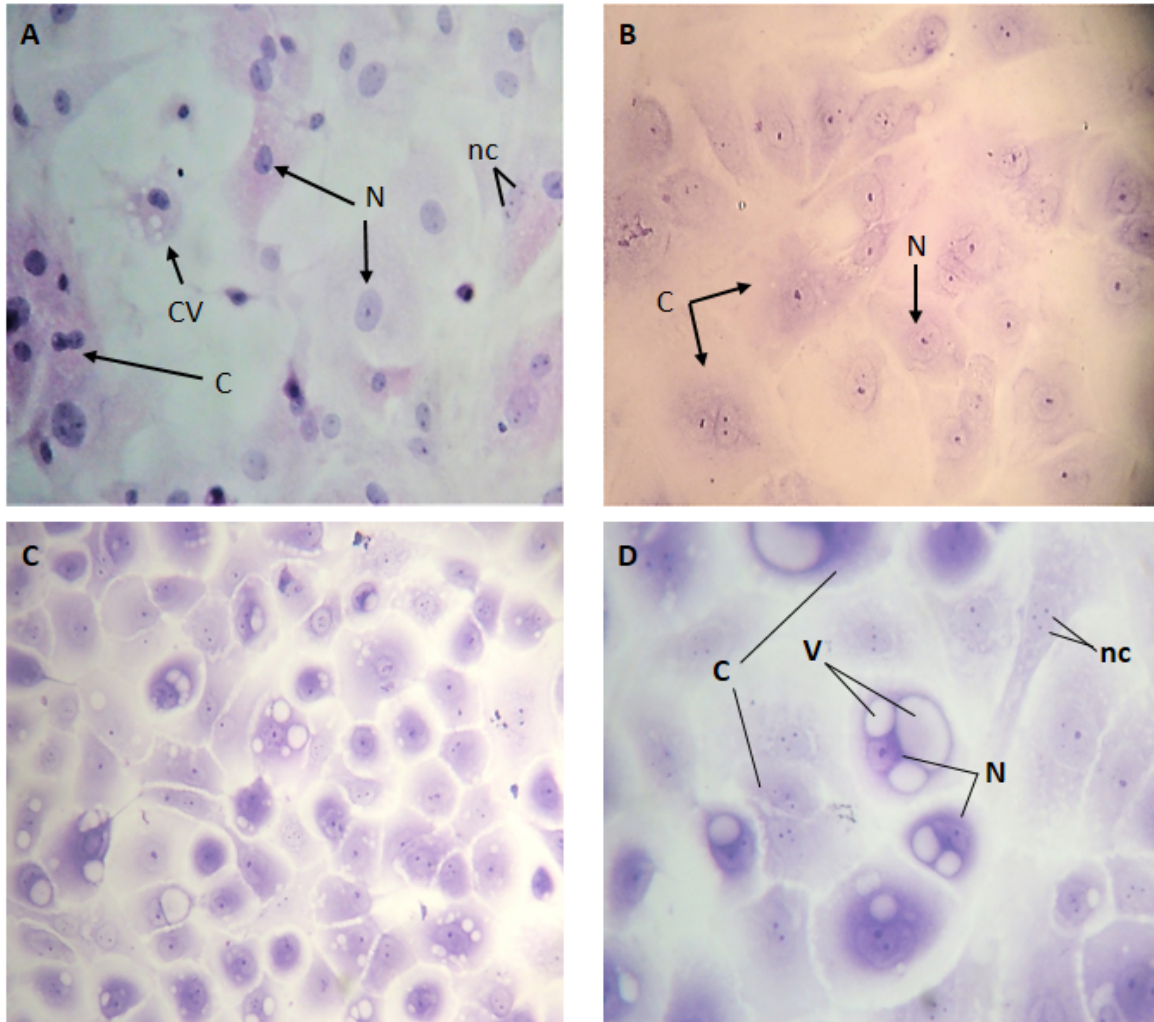
**Figura 10.** Diferenciación de las CEMAH provenientes del Primer pasaje cultivadas sobre el estroma de la MAH vitrificada. Contraste de fases. A) MAH Intacta mantenida en medio nutritivo a los 11 días. 200X. B) MAH Intacta en medio inductor a los 13 días. 200X. C) CEMAH inducidas sobre el estroma a los 7 días. Se observan células con núcleos (N) excéntricos y algunas presentan vacuolas (\*), así como células con morfología lenticular indicada con flecha. 200X. D) CEMAH inducidas sobre el estroma a los 17 días. Mayor presencia de células con morfología redondeada y vacuolas (V). 400X.

## **5.7 Evaluación histoquímica de la diferenciación hacia el linaje condrogénico de las CEMAH.**

La evaluación de la diferenciación condrogénica en ambos sistemas de cultivo se realizó mediante técnicas histoquímicas como la coloración May-Grünwald – Giemsa o Hematoxilina – Eosina para el componente morfológico y las coloraciones Azul de toluidina, el cual gracias a su capacidad metacromática indica la presencia de componentes de matriz extracelular como proteoglicanos característicos del cartílago joven; y la coloración Azul Alcían pH 2,5 que pone en manifiesto la presencia de glucosaminoglucanos (GAGs) con grupos ácidos. En los sistemas en monocapa se realizó adicionalmente una coloración con Sudan III, para descartar la posibilidad de que la inducción que se produjo fuese hacia el linaje adipogénico.

### **5.7.1 Evaluación en sistemas en monocapa.**

En los cultivos en monocapa, al comparar con el cultivo control (Fig. 11 B), se pudo observar que luego de la inducción se produjeron cambios morfológicos en las células epiteliales (Figura 11 C y D). Así mismo, al comparar con un cultivo de condrocitos (Fig. 11 A) podemos ver que muestran semejanzas con estos. En este sentido, en los cultivos de células inducidas se observan células cuya morfología es redondeada y cuyo citoplasma es basófilo con múltiples vacuolas, su núcleo es excéntrico y puede presentar más de dos nucléolos, estas son características típicas de los condrocitos. Desde el punto de vista histoquímico, se puede ver que en estos cultivos las células más vacuoladas son más basófilas que las otras, lo cual indica posiblemente una mayor actividad metabólica.

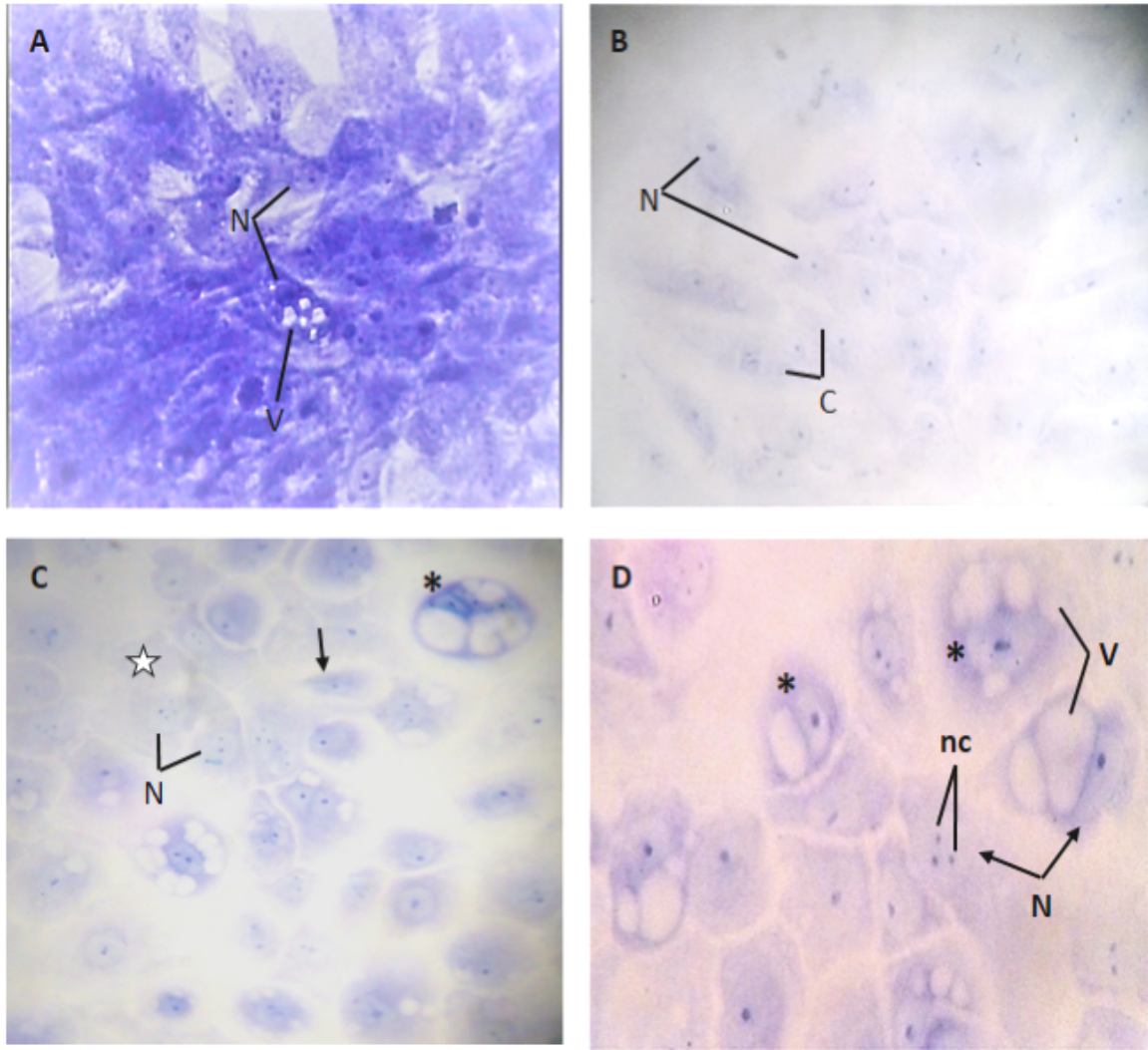


**Figura 11.** Evaluación morfológica de la diferenciación condrogénica en sistema de cultivo en monocapa de las CEMAH provenientes del primer pasaje a los 17 días de inducción. A) Cultivo en monocapa de condrocitos del primer pasaje coloreados con Hematoxilina – Eosina tomado de Sandoval (2012). Se pueden observar células de morfología poliédrica con núcleos (N) prominentes, más de un nucléolo (nc) y citoplasma (c) moderadamente basófilo, así como células vacuoladas (cv). 250X. B) CEMAH mantenidas en medio nutritivo. Coloración May-Grünwald – Giemsa. 250X. C) CEMAH a los 17 días de inducción. Se observa que las células con vacuolas presentan mayor basofilia. 250X. D) Detalle de las CEMAH inducidas, donde se señalan células con una o varias vacuolas (V) núcleos excéntricos y citoplasma muy basófilo, semejantes a condrocitos. Coloración May-Grünwald – Giemsa. 400X.

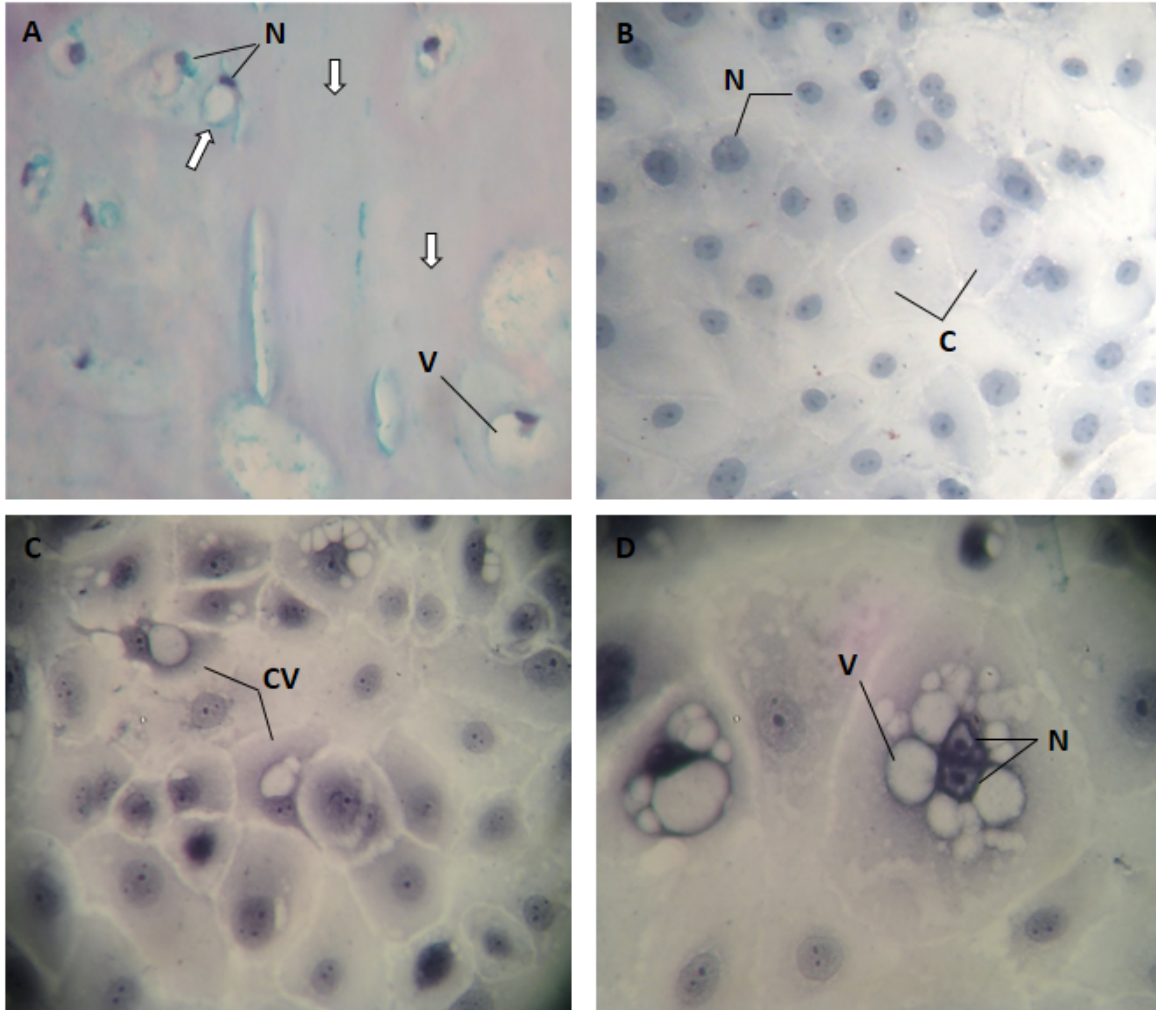
Al evaluar los cultivos con Azul de toluidina y al comparar las células inducidas (Figura 12C y 12D) con las células epiteliales cultivadas en medio nutritivo (Figura 12B), observamos que hay cambios morfológicos en la expresión de PGs ya que hay células vacuoladas que exhiben una coloración violeta (Figura 12D) la cual es más intensa si las mismas están agrupadas como lo muestra la figura 12C, semejante a lo que se observa en el control (Fig. 12 A). Por otra parte, en el mismo cultivo existen células donde no se evidencia el cambio de coloración siendo similar a las células epiteliales, es decir, estas células no fueron inducidas y por lo tanto no hay producción de PGs (Figura 12B).

Mediante la coloración Azul Alcian pH 2,5 no se observó la presencia de GAGs ácidos en este sistema de cultivo ya que como podemos apreciar en la Figura 13, no se produjo reacción con dicho colorante al compararlo con el tejido control (Figura 13 A) sugiriendo la ausencia de estos componentes de MEC en el cultivo.

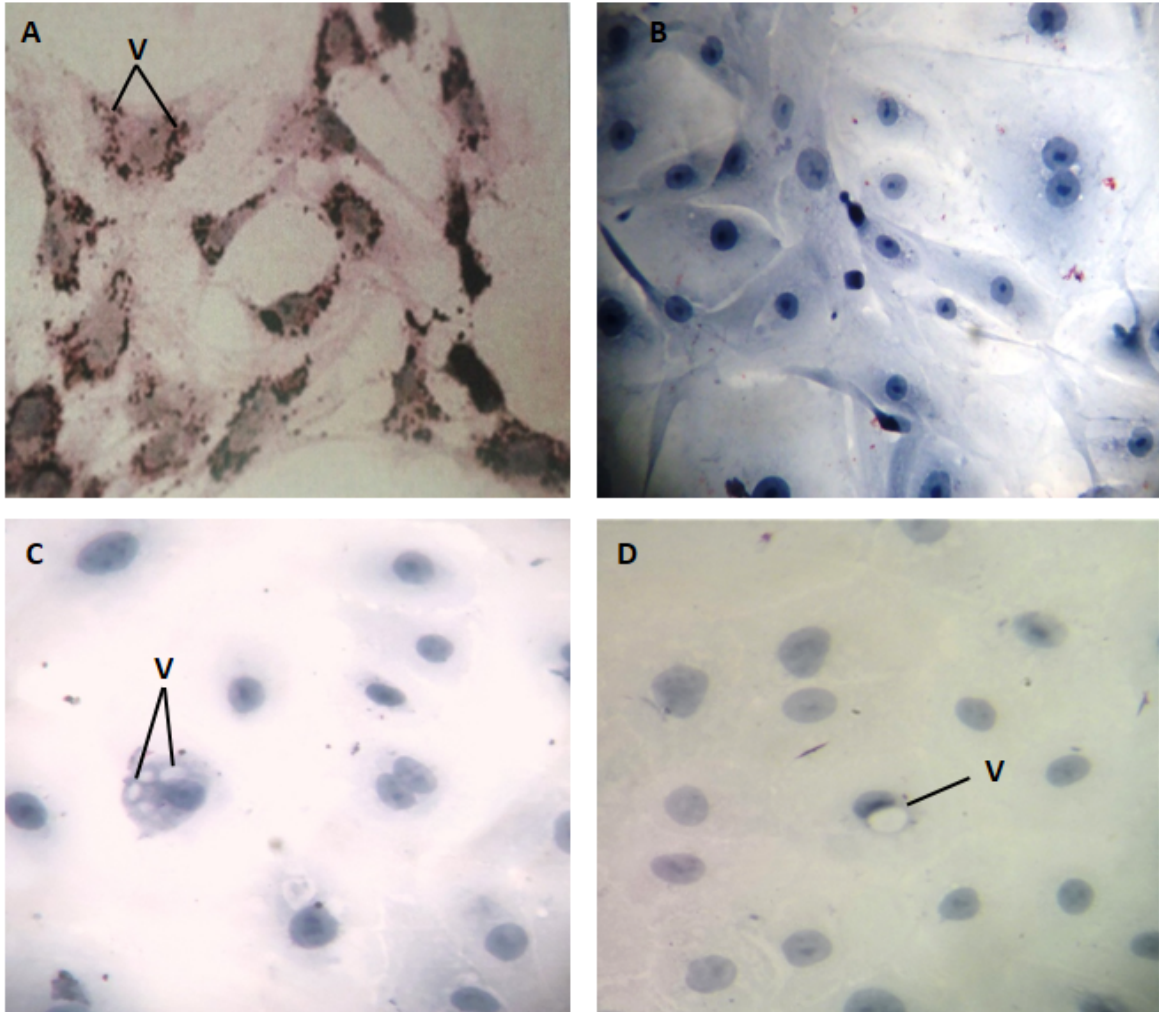
Así mismo, se realizó la coloración Sudán III con la finalidad de evaluar si las vacuolas formadas eran de naturaleza lipídica, especialmente porque se conoce que algunos de los factores que intervienen en la diferenciación condrogénica también tienen un efecto positivo en la inducción hacia el linaje adipogénico, el cual no está dentro de los objetivos planteados en este trabajo. Como se puede ver en la figura 14 las vacuolas no se colorearon, lo que indica que las células con los cambios morfológicos no corresponden con células del tejido adiposo.



**Figura 12.** Cultivos en monocapa de CEMAH mantenidas en medio condrogénico coloreadas con Azul de Toluidina. A) Cultivo en monocapa de condrocitos del primer pasaje tomado de Sandoval (2012). Se aprecian células con vacuolas (V) y la intensa coloración. 200X. B) CEMAH mantenidas en medio nutritivo. 250X. C) CEMAH a los 17 días de inducción. Se observan grupos de células que reaccionan con mayor intensidad (\*) y células que no expresan reacción con el colorante (☆).250X. D) Detalle del cultivo con 17 días de inducción. Se muestran algunas células ahusadas con núcleos (N) excéntricos presentan múltiples nucléolos (nc), y se ve que la reacción es mayor en las células que presentan vacuolas (V) indicándose con asteriscos (\*). 400X.



**Figura 13.** Cultivos en monocapa de CEMAH mantenidas en medio condrogénico coloreadas con Azul Alcian pH 2,5. A) Corte histológico de cartílago nasal. Se observan los condrocitos con núcleos (N) desplazados por una vacuola (V) y la coloración positiva que reconoce la presencia de GAGs ácidos en la MEC indicadas con flechas ( ⇨ ), siendo mayor en la periferia de los condrocitos.400X B) CEMAH mantenidas en medio nutritivo con coloración negativa para el Azul Alcian. 250X. C) y D) CEMAH a los 17 días de inducción a 250X y 400X respectivamente. Presencia de células vacuoladas (CV) que a mayor aumento se aprecia que no hay reacción del colorante, sugiriendo ausencia de GAGs.

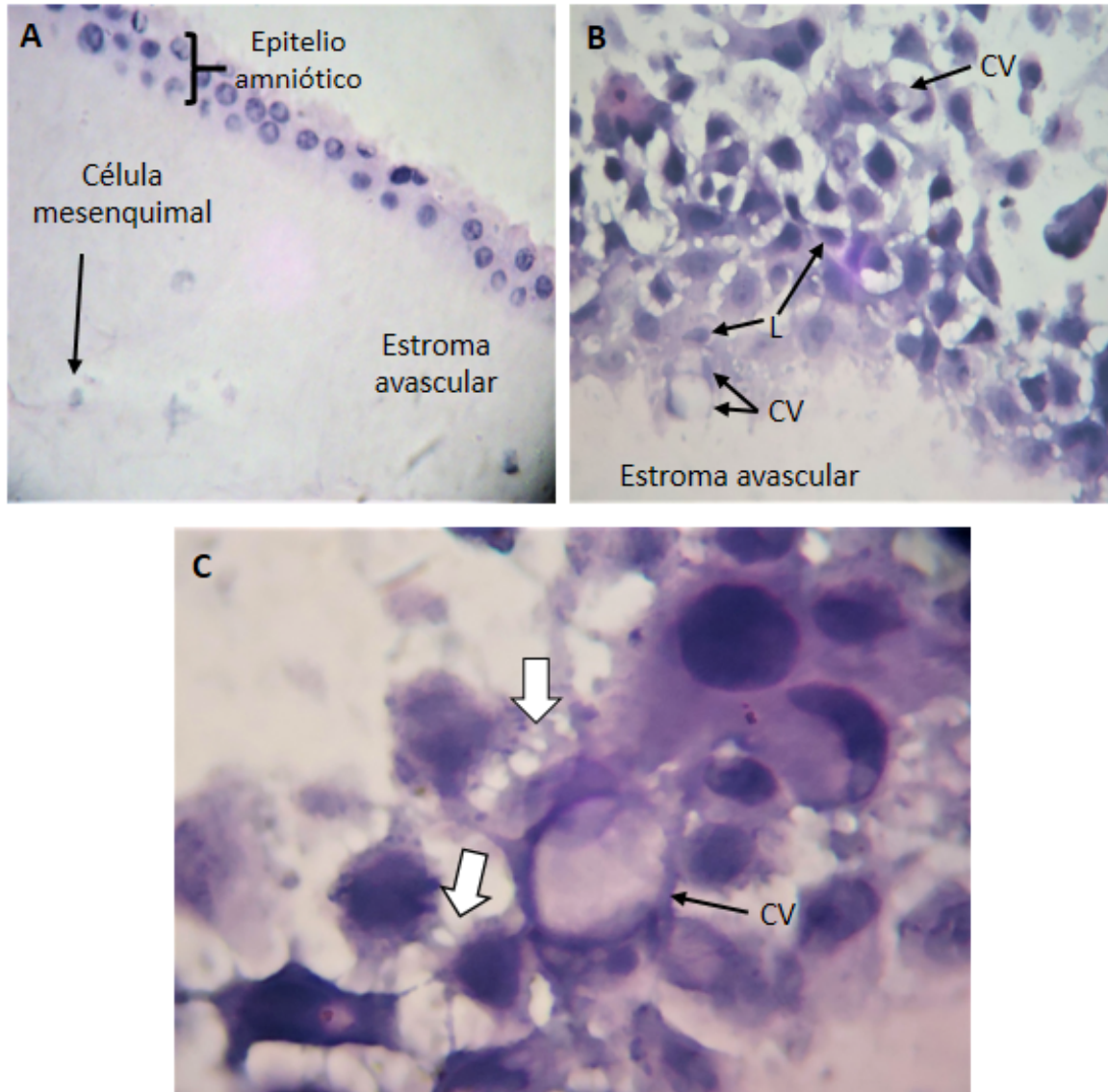


**Figura 14.** Cultivos en monocapa de CEMAH mantenidas en medio condrogénico coloreadas con Sudán III. A) Células del estroma del tejido adiposo de rata, positivas para la coloración histoquímica Sudán III con diferentes grados de maduración. Tomado de Merentes (2009). 100X. B) CEMAH mantenidas en medio nutritivo como control negativo para la coloración. 250X. C) y D) CEMAH a los 17 días de inducción donde se observa que las vacuolas (V) no presentan inclusiones lipídicas. 250X.

### 5.7.2 Evaluación en sistemas de cultivo sobre el estroma de la MAH como sistema tridimensional.

Como se mencionó en la sección 5.6.2, en la inducción se establecieron 4 controles a los cuales se le realizó el procesamiento histológico y a nivel morfológico mediante la coloración de rutina Hematoxilina – Eosina, no se observaron cambios en la capa epitelial

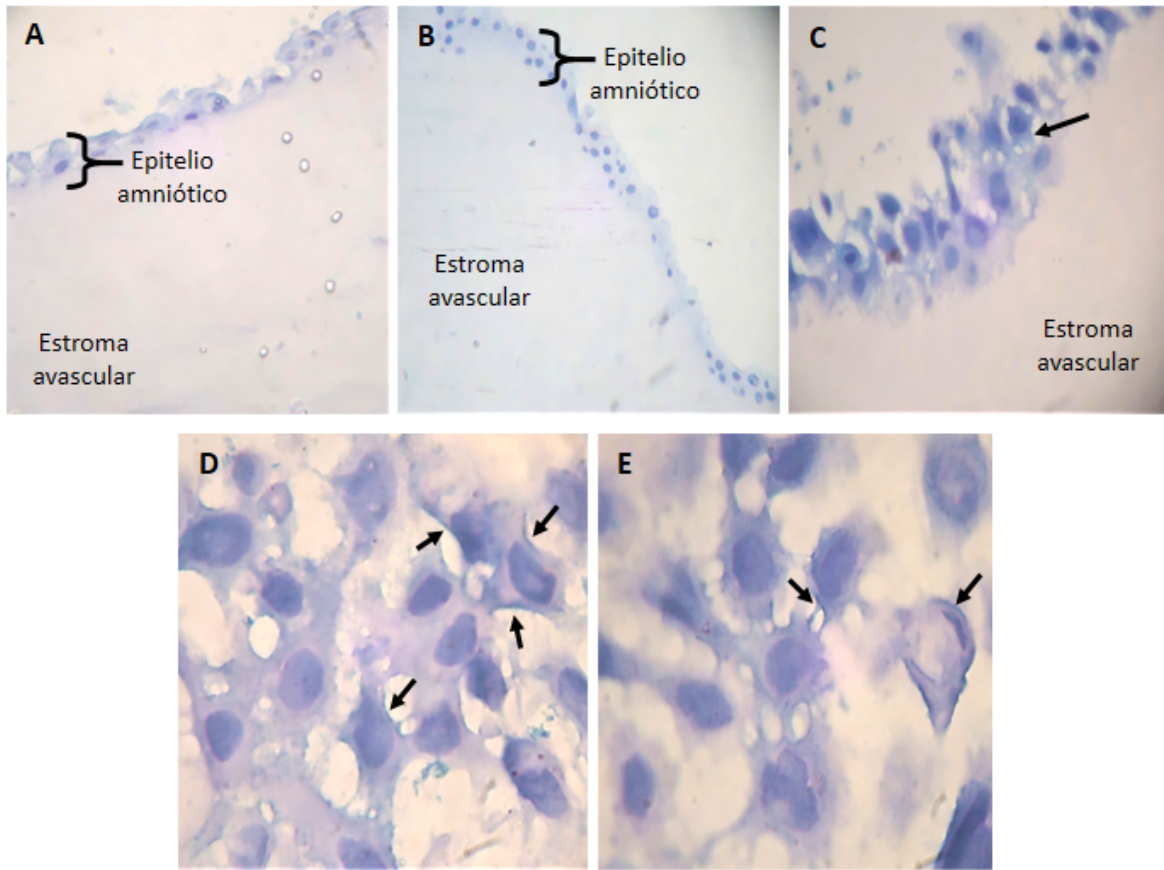
de la MAH intacta mantenida en medio nutritivo y medio inductor. De la misma manera, en las células mesenquimales estromales no se apreciaron cambios que dan indicios sobre procesos de diferenciación en los estromas desnudos (resultados no mostrados). Sin embargo, en las células epiteliales subcultivadas sobre el estroma e inducidas si se pudo demostrar cambios morfológicos (Figura 15). Aquí vemos como la disposición de las células inducidas sobre la membrana basal no es lineal como se observa en la membrana amniótica intacta (Figura 15A) y hay espacios intercelulares a diferencia de lo observado en el tejido epitelial. Los núcleos de las células son redondeados, intensamente basófilos excéntricos y presentan prolongaciones citoplasmáticas igualmente basófilas, que le permite la interacción célula – célula y célula – sustrato al mismo tiempo que le confieren una morfología estrellada como se detalla en la figura 15C. Existen células vacuoladas, de tipo poliédrica y otras con morfología elipsoidal que son de menor tamaño dentro del fenotipo observado en los agregados celulares formados al momento del establecimiento del cultivo sobre el estroma de la MAH.



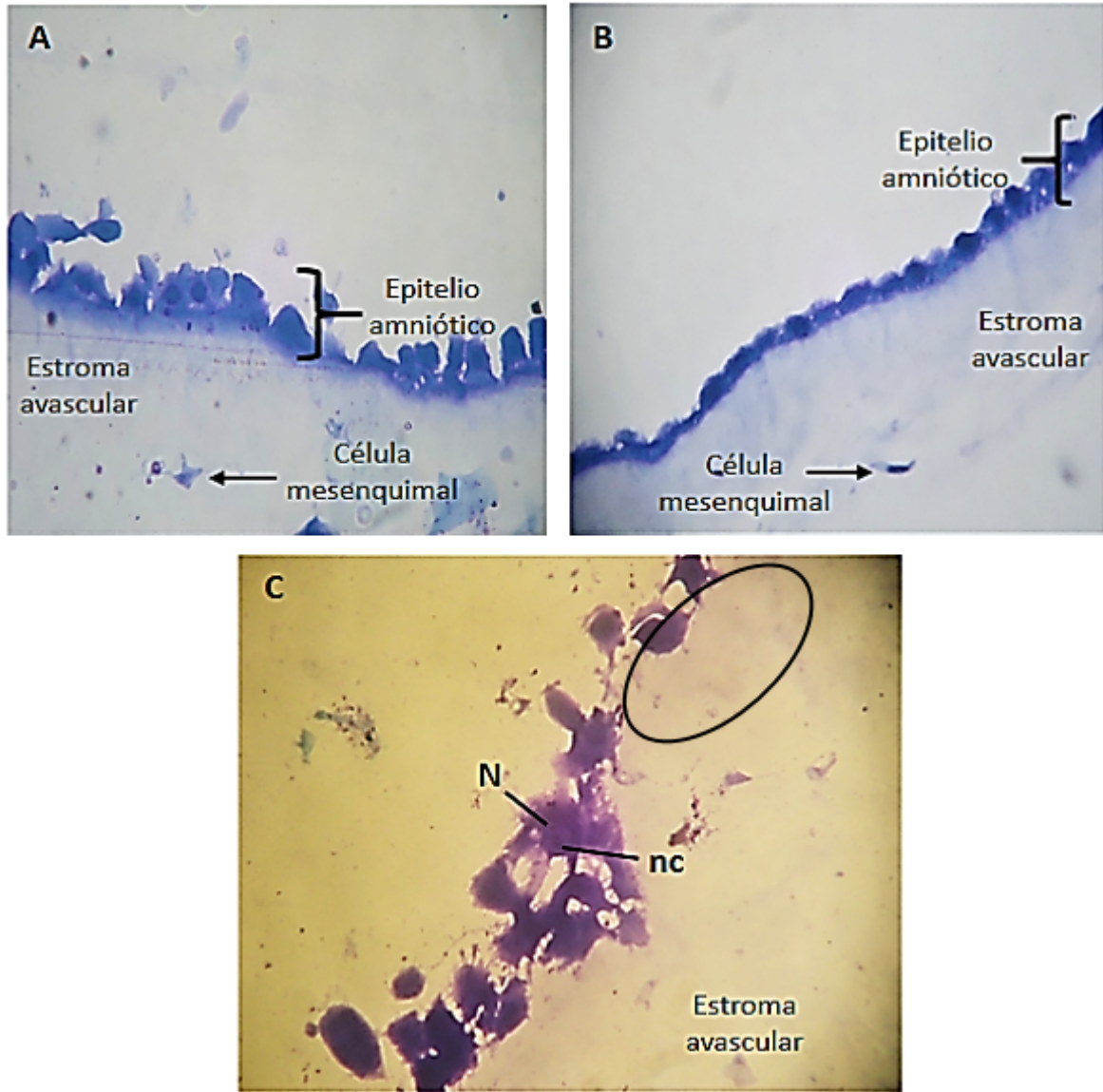
**Figura 15.** Evaluación morfológica de la diferenciación condrogénica de las CEMAH provenientes del primer pasaje cultivada sobre el estroma de la MAH a los 17 días de inducción. Coloración Hematoxilina – Eosina. A) MAH intacta inducida. Se aprecia la distribución uniforme del epitelio amniótico con células de núcleos grandes y redondeados, así como la presencia de células mesenquimales en el estroma de la misma. 400X. B) CEMAH inducidas sobre el estroma de la MAH. Se observa que no hay una disposición uniforme de las células sobre el estroma, también se observan células con grandes vacuolas (CV) emparejadas y células con morfología lenticular (L). 400X. C) Detalle de las CEMAH inducidas, donde se ve como las células interactúan a través de proyecciones citoplasmáticas ( $\Rightarrow$ ) y el espacio que existe entre células. 1000X.

Mediante la coloración con Azul Alcian pH 2,5 observamos una reacción ubicada principalmente en las regiones donde se encuentran los agregados, zonas donde existe una alta interacción célula – célula necesaria para la diferenciación hacia linajes condrogénicos. Se identifica una coloración azul muy leve (Figura 16C) no observado en ninguna de las MAH intactas que se tienen como control (Figura 16A y 16B) y al realizar una observación a mayor aumento, se detalla la presencia de células positivas para el reconocimiento de GAGs ácidos en la región periférica del citoplasma (Figura 16D y 16E).

Los resultados obtenidos para la coloración Azul de toluidina (Figura 17) evidencian la presencia de PGs en las células epiteliales inducidas mostrando metacromasia muy marcada; en la porción estromal más próxima a las células inducidas de algunas zonas se detalla una ligera coloración violeta (Figura 17C). A nivel del estroma, no se observaron cambios morfológicos en las células mesenquimales. En ambos controles de MAH intacta (Figura 17A y 17B) también se observa una coloración más intensa en la región más cercana a la membrana basal que en el resto del estroma.



**Figura 16.** Cultivos de las CEMAH sobre el estroma mantenidas en medio condrogénico coloreadas con Azul Alcían pH 2,5. A) MAH intacta en medio nutritivo. 400X. B) MAH intacta inducida. 250X. Ninguna de las condiciones muestra una reacción positiva a la coloración. C) CEMAH inducidas sobre el estroma de la MAH. Se aprecia una leve coloración azul principalmente en las zonas donde están los agregados celulares indicados con flecha. 400X. D) y E) Detalle de la coloración en las CEMAH inducidas. Las flechas indican la positividad en la periferia del citoplasma. 1000X.



**Figura 17.** Cultivos de las CEMAH sobre el estroma mantenidas en medio condrogénico coloreadas con Azul de Toluidina. A) MAH intacta en medio nutritivo. 400X. B) MAH intacta inducida. 250X. Ambas condiciones son negativas para la coloración. C) CEMAH inducidas sobre el estroma. Se puede observar la intensa coloración en las células indicando la presencia de PGs ácidos, además de una leve coloración en la zona del estroma avascular más próxima a las células epiteliales inducidas. N= núcleo, nc= nucléolo. 400X.

## 6. DISCUSIÓN

Hasta la fecha, la investigación con células madre ha significado un gran avance para la terapia celular y la ingeniería de tejidos (Alizadeh y col., 2016; Guo y col., 2017). En tejidos como el cartílago, con baja tasa de regeneración espontánea y que además en algunos casos su reparación conlleva a la formación de cicatrices fibróticas con mala calidad tisular y propiedades mecánicas, los métodos utilizados para corregir estos problemas abarcan desde microfractura, condroplastia, injertos osteocondrales (Steadman y col., 2001; Bartha y col., 2006), hasta artroplastia por abrasión (Hangody y col., 2004) y la implantación de condrocitos autólogos (ACI), un procedimiento quirúrgico ampliamente utilizado que involucra una manipulación invasiva sin mencionar que el número y la capacidad de auto-renovación de los mismos disminuye significativamente con la edad del donante (Gotherstrom y col., 2005).

Por tal razón, fuentes alternativas como el amnios (Bilic y col., 2008), el líquido amniótico (Gao y col., 2014; Zuliani y col., 2018), sangre de cordón umbilical (Kim y col., 2017) y la gelatina de Wharton (Taghizadeh y col., 2011), al ser ricos en células madre con características de facilidad de obtención, plasticidad, auto-renovación y baja inmunogenicidad, han captado la atención de los investigadores.

En vista de la importancia que tienen estas células madre como modelo de estudio básico en la biología del desarrollo y su aplicación en la medicina regenerativa para el tratamiento de diversas enfermedades, nos enfocamos en presentar en este trabajo una serie

de metodologías que permitieron aislar y establecer cultivos de células epiteliales provenientes de la membrana amniótica humana además de evaluar su potencial de diferenciación hacia el linaje condrogénico bajo condiciones *in vitro*.

Basándonos en nuestro estudio histológico de la MAH, se pudo apreciar que las células epiteliales forman una capa continua de células cuboidales o cilíndricas mayormente pero pueden observarse regiones del amnios que se asemejan a un epitelio estratificado con citoplasma medianamente basófilo y núcleos esféricos de gran tamaño, siendo encontradas estas mismas características de heterogeneidad morfológica de las células epiteliales en los cortes histológicos por Centurione y col., (2018). Así mismo, las CEMAH están conectadas a la membrana basal, la cual contiene altos contenidos de proteoglicanos que sirven como una barrera permeable a macromoléculas manteniendo la integridad de la membrana amniótica (King, 1985; Wolf y col., 1991, citados por Navarro, 2013). En relación a la capa estromal, fueron observadas las 3 capas que están definidas teóricamente y han sido corroboradas por otros investigadores (Muiños, 2010; Navarro, 2013; Perepelkin y col., 2016) como son: la capa compacta que forma el elemento fibroso principal de la membrana amniótica; la capa fibroblástica donde están las células mesenquimales dispersas y embebidas en sus componentes extracelulares; y una capa con aspecto esponjoso sin presencia de células. Las características morfológicas del tejido observadas en nuestros resultados corresponden a las descritas por varios autores para el amnios humano (Ilancheran y col., 2007; Díaz-Prado y col., 2010a; Navarro, 2013) e inclusive para el amnios de otras especies, como felinos (Rutigliano y col., 2013), equinos (Lange-Consiglio y col., 2011) y

búfalos (Ghosh y col., 2015); corroborando una homología histológica que permite la localización de las células epiteliales.

Estas poblaciones celulares producen factores biológicos que contribuyen a los efectos beneficiosos de la membrana amniótica, por lo que se han desarrollado varios enfoques como el almacenamiento hipotérmico, la liofilización, la conservación química y la criopreservación (Allen y col., 2013; Tehrani y col., 2013 citados por Perepelkin y col., 2016), con el fin de preservarla sin modificar drásticamente su composición estructural y bioquímica que son cruciales para su uso terapéutico previsto.

El protocolo de criopreservación más común informado en la literatura implica el uso de 50% de glicerol y almacenamiento a -80 °C (Addis y col., 2001; Shortt y col., 2009; Hermans, 2011; Schulze y col., 2012; Cooke y col., 2014), pero se ha reportado que las células epiteliales amnióticas y las células mesenquimales estromales presentan síntomas de daño que resulta en baja viabilidad a pesar de que la morfología y la estructura del tejido se mantienen (Shortt y col., 2009; Cooke y col., 2014). En este estudio, se utilizó un protocolo de vitrificación donde se empleó una mezcla de crioprotectores como el etilenglicol, de bajo peso molecular, el cual es menos tóxico en comparación con otros crioprotectores como el glicerol que penetra lentamente en las células favoreciendo la formación de cristales extracelulares durante el proceso de congelación y descongelación, y aditivos con altos pesos moleculares como la sacarosa, que reduce la toxicidad de la solución vitrificante mediante la disminución de la concentración de agentes permeables (Navarro, 2013). Adicionalmente, el almacenado se llevó a cabo en fase de vapor de nitrógeno líquido a -180 °C, el cual es muy

utilizado para la vitrificación de embriones de ratones y células madre embrionarias (Kasai y Mukaida, 2004; Nie y col., 2009).

Nuestros resultados evidencian pequeñas diferencias a nivel de morfología en las células que componen la capa epitelial y el estroma avascular principalmente una leve disminución del volumen de núcleos que ocurre en menor proporción en las células epiteliales, similar con lo observado por Navarro (2013) y Yazdanpanah y col. (2015), indicando este último que mantuvo una viabilidad aproximada de 50% así como los efectos sobre la angiogénesis en los tejidos criopreservados. Al no verse afectada la continuidad de la membrana basal y mantenerse la viabilidad del estroma luego de la vitrificación, indica que el mismo puede funcionar como andamio y debido a poseer abundantes componentes naturales del cartílago que son importantes en la regulación y el mantenimiento de los condrocitos normales metabolismo (Jin et al., 2007), se vuelve un elemento clave en nuestro ensayo de diferenciación condrogénica de las células epiteliales amnióticas. Sin embargo, es necesario la utilización de anticuerpos contra componentes de la MEC (Fibronectina, proteoglicanos y colágeno tipo I) y componentes de la membrana basal como laminina y colágeno tipo IV, que permitan una evaluación más específica sobre la viabilidad de la MAH luego del proceso de vitrificación.

Para la obtención de las células epiteliales se utilizó un tratamiento enzimático con la Dispasa II, con la que se pudo apreciar la remoción completa de las mismas demostrando su eficacia en el proceso de denudación y logrando un promedio de aproximadamente 16.287.500 células/amnios procesado. La Dispasa actúa enzimáticamente a nivel de las uniones proteicas que se encuentran entre las células epiteliales y la membrana basal,

teniendo una alta especificidad por la fibronectina y al colágeno tipo IV, lo que la hace adecuada para separar fácilmente el epitelio del tejido conectivo circundante. De igual manera, permite mantener viables las células epiteliales disgregadas debido a su baja toxicidad alcanzando rendimientos de 10 a 118 millones de células aisladas con viabilidad mayor al 70% demostrado por Bilic y col. (2008), Lange-Consiglio y col. (2011) y Gottipamula y Sridhar (2018) en sus trabajos.

Los resultados expresaron una diferencia en el rendimiento en el número de células obtenidas con cada procesamiento, observándose que en conjunto hay un incremento y que el mayor rendimiento celular se tuvo en las muestras 4 y 9. Durante los primeros procesamientos, tanto el tejido como las células epiteliales luego de la denudación, eran sometidos a varios procesos de disgregación enzimática con Dispasa y posteriormente con Tripsina que basándose en la concentración utilizada, el período de incubación del tejido en la solución y el tiempo de acción de las mismas, afectaron la viabilidad y el patrón de proliferación de las células epiteliales y la integridad del tejido en sí, que condujo a la formación de la viscosidad que se presenció hasta la muestra 5.

Otro factor que influyó en el mantenimiento y proliferación de los cultivos de las células epiteliales amnióticas fue la densidad celular empleada al establecer los cultivos primarios la cual a su vez está relacionada con la superficie de cultivo. Algunos investigadores han determinado que la mínima densidad celular requerida para que ocurra la proliferación es de 1.000.000 cel/mL (Miki y col., 2005; Bilic y col., 2008) mientras que otros plantean hasta 5.000.000 cel/mL (Navarro, 2013). Siguiendo lo planteado anteriormente, cuando las células epiteliales son sembradas a bajas densidades en el mayor de los casos no logran mantenerse en cultivo y entran en una etapa de senescencia que evita

el establecimiento del cultivo primario y su posterior amplificación, como ocurrió con las muestras 1, 2 y 5.

Se conoce que la mayor parte de las células inician su proliferación una vez adheridas a un sustrato, llamadas anclaje-dependientes, a excepción de las células hematopoyéticas maduras que son capaces de mantenerse en cultivos en suspensión debido a la fisiología del tejido de origen (González, 2017). Para las células epiteliales, este es un factor importante en el establecimiento de los cultivos como se evidenció en las muestras 6 y 7 ya que al no verificar la formación adecuada de la película de gelatina que funciona como sustrato, aparecieron los problemas de adherencia. Al cultivar las células epiteliales amnióticas a altas densidades celulares, se garantizó el contacto entre ellas que permite la activación de los genes ligados a la proliferación y a mecanismos moleculares complejos que involucran factores autocrinos (Freshney, 2010) siendo posible establecer los cultivos primarios que se mantuvieron viables hasta los subcultivos necesarios para los posteriores ensayos de diferenciación condrogénica sin rasgos aparentes de senescencia, demostrando que la metodología fue estandarizada en los últimos procesamientos.

En las etapas iniciales de los cultivos primarios se apreciaron células poligonales que proliferaron rápidamente bajo las condiciones *in vitro* suministradas siendo la morfología similar a la reportada por la mayoría de los autores que han realizado diversos estudios sobre estas células (García, 2012b; Díaz-Prado y col., 2011; Ghosh y col., 2016; Gottipamula y Sridhar, 2018). A pesar de que en su mayoría la morfología celular era poligonal, el cultivo frecuentemente presentaba heterogeneidad celular en el que se pueden destacar células con morfología fusiforme y células con amplio volumen citoplasmático desde los primeros días de cultivos. Estos resultados coinciden con lo descrito por Navarro (2013) y Rutigliano y col.

(2013), quienes luego de obtener células epiteliales provenientes del amnios humano y felino respectivamente, observaron heterogeneidad morfológica tanto en los cultivos primarios como en los subcultivos haciendo acotación a la presencia de subpoblaciones. Se ha encontrado en algunos casos que durante el aislamiento pueden liberarse algunas células mesenquimales cuando se somete la membrana amniótica a la acción enzimática, por lo que para diferenciar si las células de tipo fibroblasto son células mesenquimales o si por el contrario son una subpoblación de las células epiteliales se necesitan la utilización de marcadores específicos de células madre mesenquimales como lo son el CD105, CD173, SH-1, SH-2, SH-3 y SH-4 (Navarro, 2013).

Numerosos investigadores han demostrado la importancia del EGF en los medios de cultivo (Miki y Strom, 2006; Parolini y col., 2008; Miki y col., 2005; Ilancheran y col., 2007; Terada y col., 2000), el cual es un factor que induce la proliferación celular de diferentes epitelios, queratinocitos y endotelios por la unión específica a su receptor en estas células (Vachkova y Bivolarski, 2007) además de que se conoce que es sintetizado por estas células y puede actuar de manera autocrina (García, 2012a) por lo que es importante en los procesos de re-epitelización y por ende en el mantenimiento del fenotipo característico de las células epiteliales. De acuerdo a lo observado, podemos decir que las células cultivadas en monocapa bajo las diversas condiciones suministradas (Medio nutritivo en presencia de EGF, sustrato de gelatina, entre otros) permitieron el óptimo mantenimiento de las células poligonales del epitelio de la MAH.

La confluencia de los cultivos primarios se obtuvo entre los 12 y 15 días de cultivo, luego de lo cual se realizó la caracterización morfológica y los subcultivos. Investigadores

como Ghosh y col., (2016) y García, (2012a) indican que la confluencia de los cultivos primarios se alcanzaba de 4 a 5 días, opuesto a lo obtenido en nuestros experimentos. Esto puede deberse a la hipótesis planteada por Rutigliano y col. (2013), que indica que los cultivos donde la población celular era heterogénea tanto morfológicamente como en la expresión de marcadores de superficie, tenían una tasa de proliferación menor con respecto a los cultivos donde únicamente estaba presente un tipo de morfología agilizando el proceso de reconocimiento entre células.

Los componentes celulares de naturaleza aniónica (ácida) o basófilos, tales como el ADN, mitocondrias, ribosomas y citoplasma de células ricas en ARN se tiñen en variados tonos que van del azul al púrpura-negro, mientras los componentes celulares de naturaleza catiónica (básicos) o eosinófilos, se tiñen en variados tonos de naranja y rojo (Ross y Pawlina, 2007). Las 3 morfologías celulares presentes en los cultivos de células epiteliales, presentan núcleos grandes basófilos ubicados centralmente con uno o 2 nucléolos. La coloración del citoplasma intensamente basófila cercana al núcleo en el caso de las células poligonales de tipo epitelial y las alargadas, puede indicar un aumento en la cantidad de RER que se asocia a una síntesis protéica como se ha determinado por estudios previos (Marengo y Del Vecchy, 2006 citado en Navarro, 2013)

Los cultivos llevados a cabo sobre el estroma de la MAH (EMAH) vitrificada exhibieron una alta adherencia así como una alta tasa proliferativa que se mantuvo inclusive durante el tiempo de inducción por lo que al realizar la evaluación histológica, se pudo evidenciar una capa de células dispuestas sobre el estroma pero sin llegar a formar una capa continua y con la formación de agregados celulares, contrario a lo observado en los cultivos en monocapa y en la MAH intacta. Al establecer un cultivo celular se seleccionan las células que van a crecer en función de numerosos criterios y sólo formarán parte del subcultivo

aquellas que sean capaces de superar el proceso de disgregación, de adherirse al sustrato y de proliferar en forma de monocapa en plástico (González, 2017), por lo que al tener activados mecanismos de transcripción y señalización interna adicionales a las que están en el tejido intacto, pueden ser más sensibles a la influencia de los factores paracrinos del nuevo microambiente llegando a intervenir en los procesos de migración, fusión, polaridad y agregación celular; similar a lo observado por Sandoval (2012) al realizar co-cultivos de CMM en membranas de policarbonato donde las mismas se condensaron formando cúmulos.

En éste trabajo de investigación, se comparó el potencial de diferenciación hacia el linaje condrogénico de las CEMAH en 2 sistemas de cultivo, planteándose el uso del EMAH como biosustrato en la estrategia de cultivo tridimensional, el cual brinda la posibilidad de simular un microambiente y un soporte estructural análogo al que se encuentra en condiciones *in vivo*. Los cambios morfológicos fueron observados a partir del cuarto día en medio inductor para ambos sistemas y se hicieron enfáticos durante los 17 días de inducción.

Las CEMAH mantenidas bajo condiciones inductoras adquirieron principalmente, una morfología poligonal con citoplasma uniforme y presencia de vacuolas de diferentes tamaños, y a medida que incrementaba la formación de las inclusiones de glucógeno (negativas para Sudán III) presentaron una morfología redondeada similar a un condrocito maduro. Esto coincide con lo reportado por López (2014) y Borghesi y col., (2017) en la inducción de las células mesenquimales provenientes del estroma de la membrana amniótica humana y de conejo respectivamente en sistema de cultivo en monocapa y lo obtenido por Zhou y col. (2011) para las CEMAH y Zuliani y col. (2018) para las células madre mesenquimales provenientes de fluidos amnióticos para sistemas en micromasas, observando

al mismo tiempo la expresión de factores de transcripción, como Sox9 (Bi y col., 1999), Sox5 y Sox6, que regulan los genes que codifican colágeno tipo II, agregano y otros componentes de la MEC junto a los cambios morfológicos (Sekiya y col., 2000; Stokes y col., 2001; Hangody y col., 2004). Además en el sistema tridimensional, la morfología con proyecciones citoplasmáticas de las células dejaban grandes espacios entre ellas que posiblemente sea destinado a la ubicación de la sustancia fundamental, la cual es sintetizada por los condrocitos cuyo nivel de actividad celular puede evidenciarse en el aspecto del citoplasma. Los que están más activos en la producción de MEC exhiben regiones más basófilas en el citoplasma, lo que indica síntesis proteica (Ross y Pawlina, 2007). En nuestro caso esto fue lo observado en la mayoría de las células inducidas sobre el estroma de la membrana amniótica mientras que en los cultivos en monocapa sólo estuvo restringido principalmente, a las células que presentaban vacuolas.

La matriz extracelular del cartílago (MEC) se compone de una red, que incluye colágenos, proteoglicanos y otros componentes más pequeños. El colágeno representa aproximadamente 70-80% del peso del tejido seco del cartílago y asegura su fortaleza y organización estructural. El Agregano es el segundo componente más importante y proporciona las propiedades mecánicas que permiten la compresión del cartílago así como sitios de unión covalente para los GAGs ácidos y el ácido hialurónico (Burstein y col., 2009). Entre las evaluaciones histológicas que permiten la identificación de dichos componentes se encuentra el colorante Azul de toluidina que gracias a su capacidad metacromática indica la presencia principalmente de PGs ácidos cambiando la coloración de azul a morado; y la coloración Azul Alcian pH 2,5 que pone en manifiesto la presencia de GAGs ácidos (sulfatados y carboxilados) característicos del cartílago (Sandoval, 2012).

Las células epiteliales mantenidas en medio inductor en el sistema en monocapa resultaron negativas para la presencia de GAGs en contraste a las células inducidas sobre el biosustrato, donde se pudo ver una reacción positiva para la coloración con Azul Alcían en lo que corresponde a la región capsular de la MEC. Esta matriz ubicada justo alrededor de los condrocitos forma parte de la matriz territorial; es la primera en formarse debido a su función protectora y se caracteriza por contener fibrillas de colágeno tipo VI que fijan los condrocitos a la matriz y una alta concentración de PGs (Ross y Pawlina 2007), los cuales fueron evidenciados en las células en monocapa por la leve metacromasia observada principalmente en las células vacuoladas mientras que en las células cultivadas sobre el EMAH, la intensa coloración morada sugiere que hubo una mayor síntesis de PGs y de componentes de una MEC incipiente en general.

Estos resultados tienen sentido debido a que para la condrogénesis, el cultivo a altas densidades en un entorno tridimensional permite que las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular sean similares a las del desarrollo embrionario adicional a los componentes de la matriz extracelular de la MAH que incluyen colágenos (tipos I, III, IV, V y VI), fibronectina, nidogen, laminina, hialuronano y proteoglicanos, así como factores de crecimiento que contribuye a suministrar las características del tejido *in vivo* a las condiciones *in vitro* de diferenciación (Niknejad y col., 2008; Jin y col., 2007; Zuliani y col., 2018).

Investigadores como Rutigliano y col. (2013), Lange-Consiglio y col. (2014), Gottipamula y Sridhar (2018) indican el reconocimiento de GAGs mediante el colorante Azul Alcían y Colageno tipo II y Agrecano por inmunohistoquímica y PCR, en ensayos de diferenciación condrogénica de las células epiteliales cultivadas en monocapa que fueron

mantenidas en medios inductores que contenían TGF- $\beta$ 3 durante 3 semanas. La diferencia en los resultados obtenidos puede deberse a la metodología empleada, ya que si bien el medio de inducción posee varios factores que participan en la diferenciación, tales como la dexametasona, insulina y ácido ascórbico, carece de factores de crecimiento como el TGF- $\beta$  que inician vías de señales intracelulares que complementan en gran medida la síntesis de proteínas esenciales para la formación del cartílago “in vitro” (Wang y col., 2009 citado por Sandoval, 2012), además del tiempo de inducción que fue menor en nuestro caso. Pineda y col. (2004) reportaron una baja producción de GAGs en cultivos de condrocitos en monocapa y mediante técnicas bioquímicas evidenciaron que la mayor parte de éstos difunden al medio de cultivo debido a la falta de una matriz que los retenga, factor que también pudiese estar influyendo en la diferenciación condrogénica de las CEMAH para el mismo sistema de cultivo y que no fue evaluado en este estudio.

En la diferenciación sobre el estroma de la MAH se visualizaron algunas zonas del estroma con una leve reacción de metacromasia, quizás debido al inicio de acumulación de PGs provenientes de las células epiteliales inducidas que comienzan a generar componentes de MEC adicionales a los que posee el estroma naturalmente a nivel de la membrana basal, la cual permanece intacta luego de la vitrificación, ya que no fueron observados cambios morfológicos ni histoquímicos que indiquen diferenciación por parte de las células mesenquimales y su contribución a la formación de MEC cartilaginosa asociada a la capa estromal como lo describen Lindenmair y col. (2014) al lograr inducir la MAH intacta en medios suplementados con FGF.

Nuestros resultados sugieren que se mantuvo durante las condiciones de diferenciación condrogénica, la viabilidad tanto de EMAH como de las células epiteliales cultivadas en ambos sistemas. Finalmente es importante destacar que en la literatura consultada acerca de la diferenciación condrogénica de células epiteliales amnióticas para esta investigación, no se reportan la obtención de células con morfología alargadas con núcleo elipsoidal similar a la morfología de los condrocitos inmaduros denominados condroblastos (Rosales, 2008), las cuales fueron obtenidas bajo las condiciones aplicadas en este trabajo. Finalmente, se requiere de la aplicación de técnicas bioquímicas (electroforesis) y el uso de anticuerpos específicos contra proteoglicanos, colágeno tipo II y tipo VI, que presentan una mayor sensibilidad y permite una mejor identificación del proceso de inducción condrogénica.

## 7. CONCLUSIONES

1. La denudación de la MAH con la enzima Dispasa es un método eficaz para el fácil aislamiento de células epiteliales amnióticas viables que sumado a la presencia de un sustrato adherente (Gelatina 1%) y a una alta densidad celular, son factores claves para el establecimiento de estos cultivos.
2. Las células epiteliales de la MAH en cultivo muestran una heterogeneidad, que se mantiene hasta el quinto pasaje, a partir del cual aparecen características morfológicas asociadas a senescencia.
3. Luego del proceso de vitrificación, el estroma de la membrana amniótica mantuvo propiedades que favorecieron la adhesión y proliferación celular.
4. Se demuestra la potencialidad de las CEMAH de diferenciarse hacia el linaje condrogénico tanto en el sistema en monocapa como en el sistema tridimensional.
5. El sistema tridimensional proporcionado por el estroma de la membrana amniótica junto con el medio condrogénico empleado, favoreció en mayor grado la inducción condrogénica de las CEMAH, en comparación con el sistema en monocapa.

## 8. RECOMENDACIONES

1. Ampliar los ensayos de caracterización celular, incluyendo determinaciones inmunocitoquímicas con marcadores específicos de superficie expresados en células troncales de naturaleza epitelial, las cuales podrían ser evaluadas además, por medio de citometría de flujo y análisis ultraestructurales mediante microscopía electrónica de transmisión.
2. Ampliar los ensayos de evaluación de la diferenciación celular condrogénica mediante el uso de marcadores específicos para determinar la presencia de colágeno tipo II y agregán (PG). También pueden realizarse análisis de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).
3. Ensayar otros métodos inductores de la diferenciación *in vitro* en las CEMAH, usando diferentes sistemas de cultivo tridimensionales, tales como sistema de micromasas, matrices artificiales o co-cultivos, incluyendo además otros factores solubles inductores reportados tales como el BMP y TGF- $\beta$ , capaces de ejercer diferenciación condrogénica.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Acloque H., Thiery, JP., Nieto, MA. 2008. The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the epithelial-mesenchymal transition. *EMBO Rep.* **9(4)**:322-6.
2. Adds, P., Hunt, C., Dart, J. 2001. Amniotic membrane grafts, “fresh” or frozen? A clinical and in vitro comparison. *Br J Ophthalmol* **85**:905–907.
3. Alizadeh, A., Moztarzadeh, F., Ostad, SN., Azami, M., Geramizadeh, B., Hatam, G., Bizari, D., y colaboradores. 2016. Synthesis of calcium phosphate-zirconia scaffold and human endometrial adult stem cells for bone tissue engineering. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* **44**:66–73.
4. 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.
5. Bartha, L., Vajda, A., Duska, Z., Rahmeh, H., Hangody, L. 2006. Autologous osteochondral mosaicplasty grafting. *J Orthop Sports Phys Ther.* **36(10)**:739-750.
6. Bi, W., Deng, JM., Zhang, Z., Behringer, R., de Crombrughe B. 1999. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet.* **22(1)**:85-9.
7. Bianco, P., Gehron, P., Simmons, P. 2008. Mesenchymal stem cells: revisting history, concepts and assays. *Stem Cells.* **2**: 313- 319.
8. 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.

9. Borghesi, J., Mario, L.C., Oliveira, A. C., Miglino, M. A., Oliveira, P. 2017. Phenotype and multipotency of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) amniotic stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. **8**:27.
10. Burstein, D., Gray, M., Mosher, T., Dardzinski, B. 2009. Measures of molecular composition and structure in osteoarthritis. *Radiol Clin North Am*. **47(4)**:675-686.
11. Centurione, L., Passaretta, F., Centurione, MA., De Munari, S., Vertua, E., Silini, A., Liberati, M., y colaboradores. 2018. Mapping of the human placenta: experimental evidence of amniotic epithelial cell heterogeneity. *Cell Transplant*. **27(1)**: 12–22.
12. Compañ Parodi, A. 2016. Ingeniería tisular del cartilago empleando células mesenquimales estromales sobre soportes de Col I. Trabajo de Maestría. Universidad de A Coruña. España.
13. Cooke, M., Tan, E., Mandrycky, C., He, H., O'Connell, J., Tseng, S. 2014. Comparison of cryopreserved amniotic membrane and umbilical cord tissue with dehydrated amniotic membrane/chorion tissue. *J Wound Care*. **23**:465–476.
14. Dale, T., Forsyth, N. 2018. Ectopic telomerase expression fails to maintain chondrogenic capacity in three-dimensional cultures of clinically relevant cell types. *BioResearch Open Access*. **7(1)**:10–24.
15. Davis, J. 1910. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med. J*. **15**: 307
16. De Roth. 1940. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch. Ophthalmol*. **23**: 522-525.
17. Demoor, M., Ollitrault, D., Gomez-Leduc, T., Bouyoucef, M., Hervieu, M., Fabre, H., Lafont, J. y colaboradores. 2014. Cartilage tissue engineering: Molecular control of

chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim. Biophys. Acta.* **1840(8)**: 2414-2440.

18. Di Germanio, C., Bernier, M., Petr, M., Mattioli, M., Barboni, B., de Cabo, R. 2016. Conditioned medium derived from rat amniotic epithelial cells confers protection against inflammation, cáncer, and senescence. *Oncotarget.* **7(26)**: 39051-39064.

19. Díaz-Prado, S., Muiños, E., Hermida, T., Rendal, M., Fuentes, I., De Toro, F., Blanco, F. 2010a. Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J. Cell. Biochem.* **111**: 846-857.

20. Díaz-Prado, S., Muiños, E., Herminda-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.

21. Díaz-Prado, S., Rendal, M., Muiños, E., Herminda, T., Rodríguez, M. 2010b. Potential use of the human amniotic membrane as a scaffold in human articular cartilage repair. *Cell Tissue Bank.* **11(2)**: 183- 195.

22. Dua, H., Gomes, J., King, A., Maharajan, V. 2004. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv. Ophthalmol.* **49**:51–77.

23. Fanti, M., Gramignoli, R., Serra, M., Cadoni, E., Strom, S., Marongiu, F. 2017. Differentiation of amniotic epithelial cells into various liver cell types and potential therapeutic applications. *Placenta.* **59**: 139-145.

24. Freshney, I. 2010. Culture of animal cells. A manual of basic technique. Editorial Wiley-Liss, 6th Edition, Toronto, Canadá.

25. Fuentes-Boquete, I., Arufe Gonda, M., Diaz Prado, S., Gomez, T., Santos, F., Blanco, F. 2008. Cell and tissue transplant strategies for joint lesions. *Open J. Transplan.* **2(1)**:21-28.

26. Ganatra, M. 2003. Amniotic membrane in surgery. *J Pak. Med. Assoc.* **53**:29–32.
27. Gao, Y., Zhu, Z., Zhao, Y., Hua, J., Ma, Y., Guan, W. 2014. Multilineage potential research of bovine amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci.* **15**:3698–3710.
28. García, C. 2012a. 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.
29. García, D. 2012b. Efectos de la utilización de membrana amniótica en fresco en la regeneración condral en ovejas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
30. Ghosh, K., Kumar, R., Singh, J., Gahlawat, S.K., Kumar, D., Yadav, S.P., Gulati, B.R., y colaboradores. 2015. Buffalo (*Bubalus bubalis*) term amniotic-membrane-derived cells exhibited mesenchymal stem cells characteristics in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **51(9)**:915-921.
31. Ghosh, K., Selokar, N.L., Gahlawat, S.K., Kumar, D., Kumar, P., Yadav, P.S. 2016. Amnion epithelial cells of buffalo (*Bubalus Bubalis*) term placenta expressed embryonic stem cells markers and differentiated into cells of neurogenic lineage in vitro. *Animal Biotechnology.* **27(1)**:38-43.
32. Gilbert, S. 2005. Biología del Desarrollo. Editorial Medica Panamericana, 7ma edición. Buenos Aires, Argentina.
33. Gomes, J., Romano, A., Santos, M., Dua, H. 2005. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **16**:233–240.
34. Gotherstrom, C., West, A., Liden, J., Uzunel, M., Lahesmaa, R., Le Blanc, K. 2005. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica.* **90**:1017–1026.

35. Gottipamula, S., Sridhar, K. 2018. Large-scale isolation, expansion and characterization of human amniotic epithelial cells. *Stem Cells Int.* **11**:87-95
36. Guo, D., Wang, Z., Xiong, L., Pan, L., Zhu, Q., Yuan, Y., Liu, Z. 2017. Hepatogenic differentiation from human adipose-derived stem cells and application for mouse acute liver injury. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* **45**:224–232.
37. Hangody, L., Rathonyi, G., Duska, Z., Vasarhelyi, G., Fules, P., Modis, L. 2004. Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am.* **86(1)**:65-72.
38. Hermans, M. 2011. Preservation methods of allografts and their (lack of) influence on clinical results in partial thickness burns. *Burns.* **37**:873–881.
39. Horbert, V., Xin, L., Foehr, P., Brinkmann, O., Bungartz, M., Burgkart, R., Graeve, T., y colaboradores. 2018. In vitro analysis of cartilage regeneration using a collagen type I hydrogel (CaReS) in the bovine cartilage punch model. *Cartilage.* **1(18)**.
40. Ilancheran, S., Michalska, A., Peh, G., Wallace, E., Pera, M., Manuelpillai, U. 2007. Stem cell derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol. Reprod.* **77**:577-588.
41. Ilancheran, S., Moodley, Y., Manuelpillai, U. 2009. Human Fetal membranes: A source of stem cells for tissue regeneration and repair. *Placenta.* **30**: 2-10.
42. Ivanova, N., Dimos, J., Schaniel, C., Hackney, J., Moore, K., Lemichka, I. 2002. A stem cell molecular signature. *Science.* **298**: 601 – 604.
43. 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.

44. Kakishita, K., Nakao, N., Sakuragawa, N., Itakura, T. 2003. Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res.* **980**: 48–56.
45. Kalluri, R., Weinberg, R.A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**: 1420–1428.
46. Kasai, M., Mukaida, T. 2004. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod. Biomed.* **9**:164-170.
47. Kim, H., Lee, J., Roh, K., Jun, H., Kang, K., Kim, T. 2017. Clinical trial of human umbilical cord blood-derived stem cells for the treatment of moderate-to-severe atopic dermatitis: phase I/IIa studies. *Stem Cells.* **35**:248–255.
48. Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **15**(3):178-96.
49. Lange-Consiglio, A., Accogli, G., Cremonesi, F., Desantis, S. 2014. Cell surface glycan changes in the spontaneous epithelial-mesenchymal transition of equine amniotic multipotent progenitor cells. *Cells Tissues Organs.* **200**:212–226.
50. Lange-Consiglio, A., Corradetti, B., Bizzaro, D., Magatti, M., Ressel, L., Tassan, S., Parolini, O., y colaboradores. 2011. Characterization and potential applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **6**(8):622-635.
51. Lindenmair, A., Nürnberger, S., Stadler, G., Meinel, A., Hackl, C., Eibl, J., Gabriel, C. 2014. Intact human amniotic membrane differentiated towards the chondrogenic lineage. *Cell Tissue Bank.* **15**:213–225.
52. Liu, P. F., Guo, L., Zhao, D. W., Zhang, Z. J., Kang, K., Zhu, R. P., Yuan, X. L. 2014. Study of human acellular amniotic membrane loading bone marrow mesenchymal stem cells in repair of articular cartilage defect in rabbits. *Genet Mol Res.* **13**(3):7992-8001.

53. 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.
54. López, R. 2014. Establecimiento del cultivo de células mesenquimales del estroma de la membrana amniótica humana. Potencialidad osteocondrogénica. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
55. Lynch, R., Mellor, S.I. 1985. Métodos de Laboratorio. Segunda Edición Editorial Interamericana. México.
56. Mahmoudifar, N., Doran, P. 2012. Chondrogenesis and cartilage tissue engineering: the longer road to technology development. *Trends Biotechnol.* **30**: 166 – 176.
57. Márquez, M.L. 2009. Cultivo de células de cartílago nasal humano: establecimiento y caracterización. Trabajo de Ascenso a la categoría de Asistente. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
58. Márquez, M.L. 2012. Células madre mesenquimales del tejido adiposo de ratón: influencia del medio y del sistema de cultivo en la diferenciación condrogénica. Trabajo de Ascenso a la categoría de Agregado. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
59. Márquez, M.L., Nieves, D. 2016. Inducción neurogénica de las células epiteliales de la membrana amniótica humana. Resultados preliminares. Jornadas de Investigación y Extensión, Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 230.
60. Matusbara, S., Iwasaki, R. 2004. Golgi apparatus and mitochondria of human amniotic epithelial cells. *Acta Histochem. Cytochem.* **37**:407-409.
61. Mazor, M., Lespessailles, E., Coursier, R., Daniellou, R., Best, T., Toumi, H. 2014. Mesenchymal stem-cell potential in cartilage repair: an update. *J. Cell. Mol. Med.* **18(12)**:2340-2350.

62. 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.
63. 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.
64. Miki, T., Lehmann, T., Cai, H., Stolz, D., Strom, S. 2005. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. **23**:1549-1559.
65. Miki, T., Strom, S. 2006. Amnion derived pluripotent / multipotent stem cells. *Stem Cell Rev*. **2**:133-142.
66. Moon, J., Lee, J., Lee, 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.
67. 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 Da Coruña. Santiago de Compostela, España.
68. Murube, J., Rivas, L., Rebolleda, G., Candela, I., Murube, I., Sales-Sanz, M., García-Pérez, JL., y colaboradores. 2006. Placenta, cordón umbilical y membrana amniótica en oftalmología. *Studium Ophthalmologicum*. **26**:133-157.
69. Musumeci, G. (2014). New perspectives for articular cartilage repair treatment through tissue engineering: A contemporary review. *WJO*. **5(2)**:80.
70. Navarro, E. 2013. Membrana amniótica humana como fuente de células epiteliales y biosustrato. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

71. 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.
72. Niknejad, H., Peirovi, H., Jorjani, M., Ahmadiani, A., Ghanavi, J., Seifalian, A. 2008. Properties of the Amniotic Membrane for potential use in tissue engineering. *Europ Cells mat.* **15**:88-99.
73. Paniagua, R., Nistal, M., Pilar, M., Uria, M., Anadón, R., Fraile, B., Sáez, C. 2002. Citología e histología vegetal y animal. Tercera Edición. Editorial Interamericana. Madrid, España.
74. 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.
75. 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**:143-154.
76. Perepelkin, N., Hayward, K., Mokoena, T., Bentley, M., Ross-Rodriguez, L., Márquez-Curtis, L., McGann, L. y colaboradores. 2016. Cryopreserved amniotic membrane as transplant allograft: viability and post-transplant outcome. *Cell Tissue Bank.* **17(1)**:39-50.
77. Pineda, K., Merentes, E., Starosta, R. 2004. Caracterización morfológica y bioquímica de condrocitos in vitro. *INHRR.* **35(1)**.

78. Portmann-Lanz, C., Schoeberlein, A., Huber, A., Sager, R., Malek, A., Holzgreve, W., Surbek, DV. 2006. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **194**: 664– 673.
79. Prophet, E. B., Millis, B., Arrington, J. B., Sobin, L. H. 1995. Métodos histoquímicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América, Washington D. C., E. U. A.
80. Prósper, F., Gaviria, 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.
81. Ricci, E., Vanosi, G., Lindenmair, A., Hennerbichler, S., Peterbauer-Scherb, A., Wolbank, S., Cagnoni, A., y colaboradores. 2013. Antifibrotic effects of fresh and cryopreserved human amniotic membrane in a rat liver fibrosis model. *Cell Tissue Bank* **14(3)**:475–488.
82. Rosales, R. 2008. Aislamiento y control de calidad microanalítico para ingeniería tisular de los condrocitos del tejido cartilaginoso hialino y fibroso. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España.
83. Rosenzweig, D. H., Chicatun, F., Nazhat, S. N., Quinn, T. M. 2013. Cartilaginous constructs using primary chondrocytes from continuous expansion culture seeded in dense collagen gels. *Acta biomaterialia.* **9(12)**:9360-9369.
84. Ross, M., Pawlina, W. 2007. Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular. Editorial Panamericana. Quinta edición. Argentina, Buenos Aires.
85. Rutigliano, L., Corradetti, B., Valentini, L., Bizzaro, D., Meucci, A., Cremonesi, F., Lange-Consiglio, A. 2013. Molecular characterization and in vitro differentiation of feline progenitor- like amniotic epithelial cells. *Stem Cell Research & Therapy.* **4**:133.

86. 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. *Neurosci. Lett.* **209**:9-12.
87. Sánchez, J., Navarro, D., Hernández, A. 2006. Acción fisiopatológica integrada de las hormonas sobre el tejido óseo. *Rev. Cubana Endocrino.* **17 (2)**.
88. Sandoval, E. 2012. Diferenciación condrogénica de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo en co-cultivos con cartílago de ratón. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
89. Schulze, U., Hampel, U., Sel, S., Goecke, T., Thäle, V., Garreis, F., Paulsen, F. 2012. Fresh and cryopreserved amniotic membrane secrete the trefoil factor family peptide 3 that is well known to promote wound healing. *Histochem Cell Biol.* **138**:243–250.
90. Sekiya, I., Tsuji, K., Koopman, P., Watanabe, H., Yamada, Y., Shinomiya, K., Nifuji, A., y colaboradores. 2000. SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is upregulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem.* **275(15)**:10738-44.
91. Shortt, A.J., Secker, G., Lomas, R., Wilshaw, S., Kearney, J., Tuft, S., Daniels, J. 2009. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials.* **30**:1056–1065.
92. Smith, A. 2006. A glossary for stem cell biology. *Nature.* **44**: 1060-1061.
93. So, KA., Min, KJ., Hong, JH., Lee, JK. 2015. Interleukin-6 expression by interactions between gynecologic cancer cells and human mesenchymal stem cells promotes epithelial-mesenchymal transition. *Int J Oncol.* **47**:1451–1459.
94. Steadman, J., Rodkey, W., Rodrigo, J. 2001. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res.* **(391)**:362-369.

95. Stokes, D., Liu, G., Dharmavaram, R., Hawkins, D., Piera-Velazquez, S., Jimenez, SA. 2001. Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors. *Biochem J.* **360(2)**:461-470.
96. Stoltz, J., De Isla, N., Li, Y., Bensoussan, D., Zhang, L., Huselstein, C., Chen, Y., y colaboradores. 2015. Stem cells and regenerative medicine: myth or reality of the 21th century. *Stem Cells Int.* **2015**:734731.
97. Taghizadeh, R., Cetrulo, K., Cetrulo, C. 2011. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. *Placenta.* **32(4)**:311–315.
98. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* **131(5)**:861-72.
99. Takahashi, K., Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* **126(4)**:663-76.
100. 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.
101. 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.
102. Tanaka, T.S., Demirci, H. 2016. Cryopreserved ultra-thick human amniotic membrane for conjunctival surface reconstruction after excision of conjunctival tumors. *Cornea.* **35(4)**:445-50.

103. Terada, S., Matsuura, K., Enosawa, S., Hoshika, A., Suzuki, S., Sakuragawa, N. 2000. Inducing proliferation of human amniotic epithelial (HAE) cells for cell Therapy. *Cell transplant.* **5**: 701-704.
104. Tiwari, N., Gheldof, A., Tatari, M., Christofori, G. 2012. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *Semin. Cancer Biol.* **22(3)**:194-207.
105. 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(3)**:215-28.
106. Urbaneja, M., Gugig, M., Bello, R. 1975. Cultivo de tejidos animales. Trabajo de Laboratorio. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
107. Vachkova, E., Bivolarski, B. 2007. Origin, structure and physiological role of the epidermal growth factor: A review. *Bulg. J. Vet. Med.* **10**:223-233.
108. Watt, F., Hogan, L. 2000. Stem cell and their niches. *Science.* **287**:1427.
109. Wei, J., Zhang, T., Kawa, S., Aizawa, T., Ota, M., Akaike, T., Kato, T., y colaboradores. 2003. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell. Transplant.* **12**:545-552.
110. Whittle, W., Gibb, W., Challis, J. 2000. Characterization of Human Amnion Epithelial and Mesenchymal Cells: The Cellular Expression, Activity and Glucocorticoid Regulation of Prostaglandin output. *Placenta.* **21**:394-401.
111. Yazdanpanah, G., Paeini-Vayghan, G., Asadi, S., Niknejad, H. 2015. The effects of cryopreservation on angiogenesis modulation activity of human amniotic membrane. *Cryobiology.* **71 (3)**: 413-418.
112. Zhen, G., Cao, X. 2014. Targeting TGF $\beta$  signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis. *Trends Pharmacol. Sci.* **35 (5)**:227-2

113. Zhou, J., Yu, G., Cao, Ch., Pang, J., Chen, X. 2011. Bone morphogenetic protein-7 promotes chondrogenesis in human amniotic epithelial cells. *Int. Orthop.* **35**:941–948.
114. Zhu, M., Feng, Q., Sun, Y., Li, G., Bian, L. 2016. Effect of cartilaginous matrix components on the chondrogenesis and hypertrophy of mesenchymal stem cells in hyaluronic acid hydrogels. *J Biomed Mater Res.* **105(8)**:2292-2300.
115. Zuliani, C., Bombini, M., Andrade, K., Mamoni, R., Pereira, A., Coimbra, I. 2018. Micromass cultures are effective for differentiation of human amniotic fluid stem cells into TEG\_Dubelys Nieves.3.CorregidaLMchondrocytes. *Clinics.* **73**:e268.

**Consultado en línea:**

Gonzales, J. 2017. Introducción al Cultivo Celular. Universidad del País Vasco. ([http://www.ehu.eus/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo\\_celular.pdf](http://www.ehu.eus/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo_celular.pdf)) [Consultado: 6/7/2018]