



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

**POTENCIAL OSTEO-CONDROGÉNICO DE LAS CÉLULAS
MADRE EPITELIALES DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA
HUMANA.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller **Daniela Pérez Reyes**, como requisito para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dra. M^a Lorena Márquez

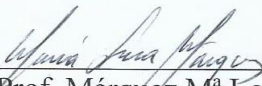
CARACAS, VENEZUELA
FEBRERO, 2019

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO TITULADO:

**“POTENCIAL OSTEO-CONDROGÉNICO DE LAS CELULAS
MADRE EPITELIALES DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA
HUMANA”**

Presentado por el Br. **Pérez Reyes Daniela Elizabeth**, C.I. 22.278.974,
ante la ilustre Universidad Central de Venezuela para optar al título de
Licenciado (a) en Biología.

Defendido públicamente el día 14 de febrero de 2019 y **aprobado** por
los miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de
Biología de la Facultad de Ciencias, quienes consideraron que dicho trabajo
cumplió con los requisitos exigidos por los reglamentos respectivos.


Prof. Márquez Mª Lorena

TUTOR




Prof. Merentes Elizabeth
JURADO


Prof. Navarro Eliana
JURADO

DEDICATORIA

Este trabajo especial de grado está dedicado a mis padres por haber sido mi apoyo y mi inspiración a lo largo de mi vida y a Fernando que a través de sus consejos, amor y paciencia me ayudo a concluir esta meta.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarme en el transcurso de mi vida, brindándome paciencia y sabiduría para culminar con éxito mis metas propuestas.

A mis padres Félix e Iris y a mis hermanos María Laura y Enrique por ser mi pilar, por apoyarme y estar siempre presente en mis días buenos y malos, por hacer que no me diera por vencida en ciertas etapas de la carrera y por su cariño incondicional. Gracias, esto es para ustedes.

A Fernando por correr a mi lado en todo momento, por tu paciencia, amor y por nunca decir no.

A mi tutora Lorena Márquez por abrirme las puertas del laboratorio, por su constancia y perseverancia, por sus consejos, cariño y su guía. Gracias por tenerme paciencia y creer en mí.

A la Lic. Eliana Navarro Dra. Elizabeth Merentes por su tiempo y dedicación y por apoyarme en mi trayecto en el laboratorio y en este trabajo.

Al Dr. Pedro Hurtado, David, la Señora Marisol, a todo el equipo de obstetricia del Instituto Médico Quirúrgico “Dr. Jiménez Rojas” y por supuesto a los pacientes que donaron parte de sí, para que nosotros podamos realizar nuestros experimentos.

Al Dr. Gilberto Payares, Dra. Cristina Sanoja, Dra. Valentina Salas y el Prof. José Mejías gracias por unas tardes llenas de risas y sabiduría.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio Anna, Dubelys, José, Carla, Felipe y la Sra. Merys y a mis lincees Naybeth, Carlos, Andreina, Cesar, Samuel y Eliezer por hacerme reír con sus locuras y hacerme una mejor persona.

Y por supuesto a esas personas que conozco desde primer semestre que se han vuelto parte de mi familia Diego, Estefanie, Karen, Hector, Jorlis, Anthony, Andreina, Eduardo y mi gran amiga Ariadna los quiero muchísimo, ustedes me han enseñado el verdadero valor de la amistad y lealtad.

RESUMEN

Las enfermedades artríticas y la osteoporosis son dos de las causas más comunes de la degeneración de huesos y cartílagos, por lo cual, para la reconstrucción de estos y otros tejidos, es importante buscar nuevas alternativas de células madre que no representen problemas de rechazo inmunológico ni éticos. Esta fuente podría ser la membrana amniótica (MA), la cual está compuesta por un epitelio simple, una membrana basal gruesa y un estroma avascular. Además, presenta dos poblaciones celulares que muestran propiedades características de las células madre; las células epiteliales (CEAhs) que derivan del ectodermo embrionario y las células mesenquimales (CMEAhs) del estroma que derivan del mesodermo embrionario. El objetivo del presente trabajo, fue determinar el potencial osteocondrogénico de las células madre epiteliales de la MA humana, para lo cual se aislaron las CEAhs y se establecieron cultivos en monocapa. Posteriormente, se realizó la inducción hacia los linajes osteo y condrogénico en dos sistemas de cultivo: en monocapa y en micromasas empleando medio osteogénico y condrogénico, respectivamente. La inducción fue evaluada mediante técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas. En esta investigación fueron procesadas 7 membranas amnióticas obteniendo un rendimiento celular promedio de 41.52×10^6 células por amnios y una viabilidad del 80.88%. Al evaluar la cinética de crecimiento se demostró que es similar a la de otros cultivos celulares, es decir, presentan las tres fases características del crecimiento, una fase de adaptación relativamente corta, una fase de crecimiento que inicio a los 4 días de cultivo y finalmente una fase de saturación. Así mismo, observamos un amplio rango de entre 7 y 14 días para que los cultivos alcancen la confluencia. En los cultivos primarios y subcultivos se evidenció una heterogeneidad de

las células epiteliales caracterizado por células con morfología poligonal tipo epitelial, células con morfología alargada o tipo fibroblasto y células con citoplasma amplio. Al evaluar la diferenciación condrogénica y osteogénica en los cultivos en monocapa, se pudo observar cambios en la morfología celular, además, en la inducción condrogénica en monocapa, se produjo la formación de agregados celulares, en los cuales se evidencio la presencia de glucosaminoglicanos mediante la coloración con Azul Alcian, mientras que en la diferenciación hacia el linaje osteogénico se pudo observar la presencia de algunos depósitos de fosfato de calcio en la matriz extracelular, mediante la coloración Von Kossa. En relación a la evaluación en los cultivos en micromasas inducidos hacia el linaje condrogénico se demostró la presencia de glucosaminoglicanos carboxilados y proteoglicanos en la matriz extracelular en el área periférica de las micromasas y en la inducción osteogénica la presencia de depósitos de fosfato de calcio en la matriz extracelular de las micromasas, aunado a esto, se realizaron ensayos inmunohistoquímicos donde se determinó una alta expresión de colágeno tipo II en la inducción condrogénica y de fosfatasa alcalina en la inducción osteogénica. Esos resultados en conjunto indican que las células epiteliales de la membrana amniótica humana tienen un alto potencial de diferenciación hacia el linaje condrogénico y osteogénico, permitiéndonos sugerir además que estas células se pueden considerar como células pluripotenciales.

Palabras claves: Células madre, Células epiteliales, Membrana Amniótica Humana, inducción Osteogénica, inducción Condrogénica.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	19
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivo General.....	28
3.2. Objetivos Específicos.....	28
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
4.1 Material biológico.....	29
4.2 Establecimiento del cultivo primario de células epiteliales de la membrana amniótica humana.....	30
4.2.1. Aislamiento de la membrana amniótica humana.....	30
4.2.2. Denudación de la membrana amniótica humana.....	32
4.3. Establecimiento de subcultivo.....	33
4.4. Ensayos de proliferación celular mediante curva de crecimiento.....	34
4.5. Caracterización morfológica de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.....	34
4.5.1 Tinción May- Grünwald-Giemsa.....	34
4.5.2 Caracterización inmunocitoquímica.....	35
4.6. Ensayos para la inducción de la diferenciación de las células epiteliales de la membrana amniótica humana	36
4.6.1 Inducción ósteo-condrogénica en cultivos en monocapa.....	37
4.6.2 Inducción ósteo-condrogénica en sistema de micromasas.....	37
4.7. Evaluación citoquímica de la inducción de la diferenciación de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.....	38
4.7.1. Inducción Condrogénica en cultivos en monocapa y micromasas.....	38
4.7.2 Evaluación de la inducción osteogénica en cultivos en monocapa y micromasas.....	39
4.8. Evaluación inmunohistoquímica de la inducción de la diferenciación de las células epiteliales de la membrana amniótica humana	40

5. RESULTADOS.....	41
5.1. Aislamiento de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.....	41
5.2. Establecimiento de los cultivos primarios de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.....	42
5.3. Ensayos de proliferación celular mediante curva de crecimiento de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.....	44
5.4. Caracterización morfológica o histológica de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.....	45
5.5. Ensayos para la inducción de la diferenciación de las células epiteliales de la membrana amniótica humana	47
5.5.1 Inducción ósteo-condrogénica en cultivos en monocapa.....	47
5.5.2. Inducción ósteo-condrogénica en sistema de micromasas.....	49
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	64
7. CONCLUSIONES.....	78
8. RECOMENDACIONES.....	79
9. BIBLIOGRAFÍA.....	80
10. ANEXOS.....	116

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Secuencia de etapas de la condrogénesis durante el desarrollo de huesos largos.....	4
Figura 2. Membrana amniótica.....	11
Figura 3. Placenta humana.....	29
Figura 4. Aislamiento de la membrana amniótica humana.....	31
Figura 5. Micrografía de contraste de fase del Cultivo Primario y subcultivo de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.....	43
Figura 6. Curva de crecimiento de las células epiteliales de la membrana amniótica humana, en medio de cultivo DMEM-F12 suplementado.....	45
Figura 7. Cultivo primario de células epiteliales de la MAH.....	46
Figura 8. Diferenciación de células epiteliales a los 17 días de inducción en sistema de cultivo en monocapa. Coloración azul alcian pH 2,5.....	48
Figura 9. Diferenciación de células epiteliales a los 17 días de inducción en sistema de cultivo en monocapa. Coloración Von Kossa.....	49
Figura 10. Sistemas de cultivo tridimensional tipo agregados celulares.....	50
Figura 11. Corte transversal de un Cultivo en micromasas de CEAhS mantenidas en medio control. Coloración azul alcian pH 2,5.....	52
Figura 12. Corte transversal de un Cultivo en micromasas de CEAhS mantenidas en medio de inducción condrogénico. Coloración azul alcian pH 2,5.....	53
Figura 13. Corte transversal de un Cultivo en micromasas de CEAhS mantenidas en medio control. Coloración azul de Toluidina.....	55
Figura 14. Corte transversal de un Cultivo en micromasas de CEAhS mantenidas en medio de inducción condrogénico. Coloración azul de Toluidina.....	56
Figura 15. Corte transversal del cultivo en micromasas de Células epiteliales de la membrana amniótica humana en medio control. Coloración Von Kossa.....	58

Figura 16. Corte transversal del cultivo en micromasas de Células epiteliales de la membrana amniótica humana mantenidas en medio osteogénico. Coloración Von Kossa.....	58
Figura 17. Corte transversal del cultivo en micromasas de Células epiteliales de la membrana amniótica humana en medio control. Inmunohistoquímica anti colágeno tipo II.....	60
Figura 18. Corte transversal del cultivo en micromasa de Células epiteliales de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas mantenidas en medio condrogénico. Inmunohistoquímica anti colágeno tipo II.....	61
Figura 19. . Corte transversal del cultivo en micromasa de Células epiteliales de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas mantenidas en medio control. Inmunohistoquímica Fosfatasa alcalina.....	62
Figura 20. Corte transversal del cultivo en micromasa de Células epiteliales de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas mantenidas en medio osteogénico. Inmunohistoquímica Fosfatasa alcalina.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de los factores solubles.....	14
Tabla 2. Medios de cultivo para la diferenciación “ <i>in vitro</i> ” de las CEAhS.....	22
Tabla 3. Factores a ensayar en el medio base para inducir la diferenciación osteogénica y condrogénica de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.....	37
Tabla 4. Rendimiento y viabilidad celular obtenida por membrana amniótica procesada...	42
Tabla 5. Niveles de expresión de los diferentes componentes identificados mediante histoquímica e inmunohistoquímica.....	63

LISTA DE ABREVIATURA

Ac: Anticuerpo

Ag: Antígeno

BMP: Proteína Morfogenética Ósea

BSP-1: Osteopontina

CD9: Molécula de Adhesión y Migración Células, Expresada en las Células Madre Embrionarias y Células Epiteliales Amnióticas

CD30: Molécula De Adhesión Celular, Receptor Del Factor De Necrosis Tumoral

CD24: Molécula De Adhesión Celular, Expresada en las Células Madre Embrionarias

CD90: Antígeno Presente en Células Estromales

CD44: Molécula de Adhesión Celular, Receptor Ácido Hialurónico

CD73: Marcador de Superficie de Células Madre Mesenquimales

CD105: Endoglina, Marcador de Superficie de Células Mesenquimales

CD166: Endoglina, Marcador de Superficie de Células Mesenquimales

Ceahs: Células Epiteliales de la Membrana Amniótica Humana

CK: Citoquinas

CM: Células Madre

Cma: Células Madre Adultas

Cme: Células Madre Embrionarias

Cmeahs: Células Mesenquimales del Estroma Amniótico Humano

Cmm: Células Madre Mesenquimales

Cmdah: Células Mesenquimales Derivadas del Tejido Adiposo Humano

Dmem- F12: Medio Eagle Modificado por Dulbecco

Edta: Acido Etilendiaminotetraacético

Egf: Factor de Crecimiento Epidérmico

Fa: Fosfatasa Alcalina

Fgf: Factor de Crecimiento de Fibroblastos

Gags: Glucosaminoglicanos

Hbv: Hepatitis B

Hcv: Hepatitis C

Hla: Antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad

Ibe: Instituto de Biología Experimental

Il: Interleucinas

Ipsc: Célula Madre Pluripotente Inducida

Kgf: Factor de Crecimiento de Queratinocitos

Ma: Membrana Amniótica

Mec: Membrana Extracelular

Mhc: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

Nanog: Factores de Transcripción Esencial y Específicos en Células Pluripotentes

Oct-4: Factor de Transcripción 4 de Unión a Octámeros

Pbs: Solución Buffer Fosfato

Sfb: Suero Fetal Bovino

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

Sox-9: Factor de Transcripción Expresado en Condrocitos y en Células de otros Tejidos

Ssea- X: Antígeno Embrionario Estadío – Específico Tipo X

Tgf-A: Factor de Crecimiento Tumoral

Tgf-β: Factor de Crecimiento Transformante.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente las enfermedades artríticas y la osteoporosis son dos de las causas más comunes en la degeneración de huesos y cartílagos, causando gran morbilidad, incapacidad y siendo motivo de importantes cargas económicas que afectan a individuos de todas las edades. (Becerra, 2006; Danisovic, 2012; Ma, y col, 2018). La regeneración de estos tejidos dañados sigue siendo un significativo desafío clínico para curar o reparar las lesiones y trastornos de estos. Los tratamientos médicos actuales son efectivos para reducir el dolor pero ineficaces al revertir el curso temporal de la degeneración musculoesquelética. Por lo tanto, a pesar de la variedad de técnicas quirúrgicas, la ingeniería tisular y la medicina regenerativa basada en células madre se consideran alternativas prometedoras en la reparación de los mismos (Becerra, 2006; Somoza, 2014; Tang y Wang, 2015; Ma y col, 2018).

El cartílago es un tejido con un potencial de reparación limitado debido al bajo potencial mitótico de los condrocitos y a sus propiedades intrínsecas; falta de inervación y suministro vascular. Este es un tejido conectivo especializado avascular de consistencia coloidal, flexible y desprovisto de vasos sanguíneos y linfáticos, constituido por condrocitos y una matriz extracelular (MEC). Éste se encuentra rodeado por una capa de tejido conjuntivo denso, el pericondrio, el cual aporta sustancias nutritivas al tejido permitiéndole su crecimiento y mantenimiento. (Gartner y Hiatt, 2001; Perera y col, 2012; Ross y Pawlina, 2015).

Más del 95 % del volumen del cartílago corresponde a la matriz extracelular, un elemento funcional de este tejido. Los condrocitos son escasos pero indispensables para la producción y el mantenimiento de la matriz. La matriz extracelular del cartílago es sólida y firme pero también un tanto maleable, a lo cual se debe su flexibilidad. Puesto que no existe una red vascular en el cartílago, la composición de la matriz extracelular es crucial para la supervivencia de los condrocitos. (Ross y Pawlina, 2015).

El cartílago es un tejido fundamental para el desarrollo del esqueleto fetal y para el de la mayoría de los huesos en crecimiento. Según las características de su matriz, se distinguen tres tipos de cartílago que difieren en cuanto a su aspecto y sus propiedades mecánicas:

- **Cartílago hialino:** caracterizado por ser el más abundante del cuerpo humano, formado en su mayoría por fibrillas de colágeno tipo II, glucosaminoglucanos (GAGs), proteoglucanos y glucoproteínas multiadhesivas. Podemos encontrarlo en los extremos articulares de los huesos largos, nariz, laringe, tráquea, bronquios y extremos ventrales de las costillas. Los condrocitos en este tipo de cartílago son células esféricas, con un núcleo central voluminoso y uno o dos nucléolos (Sanchis, 2009 citado por Sandoval, 2012).
- **Cartílago elástico:** este tipo de cartílago está compuesto por fibras y laminillas elásticas, material de matriz de cartílago hialino y colágeno tipo II. Se encuentra presente en el pabellón auricular, paredes del conducto auditivo externo, trompa de Eustaquio y epiglotis. Los condrocitos en este tipo de cartílago suelen ser más abundantes y de mayor tamaño en comparación con el cartílago hialino (Sanchis, 2009 citado por Sandoval, 2012).

- **Cartílago fibroso (fibrocartílago):** está constituido por abundantes fibras de colágeno tipo I y material de matriz del cartílago hialino, no obstante, no contiene pericondrio. Se encuentra presente en los discos intervertebrales, sínfisis púbica, menisco de rodilla, y en la inserción de los tendones con los huesos. La presencia del fibrocartílago en estos sitios es indicativa de que el tejido debe soportar fuerzas de compresión y distensión ya que actúa como amortiguador (Sanchis, 2009 citado por Sandoval, 2012).

El cartílago hialino no es una sustancia simple, inerte y homogénea, sino un tejido vivo y complejo. Este provee una superficie de baja fricción, participa en la lubricación de las articulaciones sinoviales y distribuye las fuerzas aplicadas al hueso subyacente. La matriz extracelular del cartílago hialino se encuentra compuesta por una gran proporción de macromoléculas estructurales como lo son los GAGs, proteoglicanos como agregan, decorina, fibromodulina y perlecan, además de fibras de colágeno y elastina. (Ross y Pawlina, 2015; Wang y col, 2009). En el cartílago también predominan diferentes tipos de colágeno como lo son el colágeno tipo II, IX, XII y los colágenos tipo III, VI, XIII y XVI en menores proporciones (Dobrevá, y col, 2010). La MEC provee al tejido un sostén mecánico y estructural, además de una fuerza tensora, mientras que los componentes de la MEC forman un sistema dinámico e interactivo que informa a las células sobre los cambios bioquímicos y mecánicos de su entorno extracelular. (Ross y Pawlina, 2015)

Para el desarrollo del cartílago es necesario la condensación de las células mesenquimales condroprogenitoras, conocidas como nódulo condrogénico. Este proceso depende de diversos factores paracrinos, activación de factores de transcripción y de señalizaciones iniciadas por interacciones célula-célula, célula-matriz extracelular, además de interacciones

asociadas con el incremento de la adhesión celular, cambios en el citoesqueleto, entre otros. En esta primera etapa la matriz extracelular temprana es rica en colágeno tipo I, ácido hialurónico y colágeno tipo II con el exón 2 que codifica al propéptido propio de colágenos no cartilagosos. También se encuentran presentes moléculas asociadas a la adhesión celular como N-CAM, regulada por fibronectina, que a su vez es estimulada por la producción de TGF- β . (González, 2012). Luego, las células que conforman dicho esbozo comienzan a diferenciarse en condroblastos que secretan matriz cartilaginosa y aumentan su tamaño, posteriormente estos condroblastos se separan entre sí por efecto de la abundante MEC y al quedar atrapados por dicha matriz se transforman en condrocitos los cuales, son las células cartilaginosas maduras. A la par de este proceso, el tejido mesenquimatoso que hay justo alrededor del nódulo condrogénico da origen al pericondrio (Geneser, 2001)

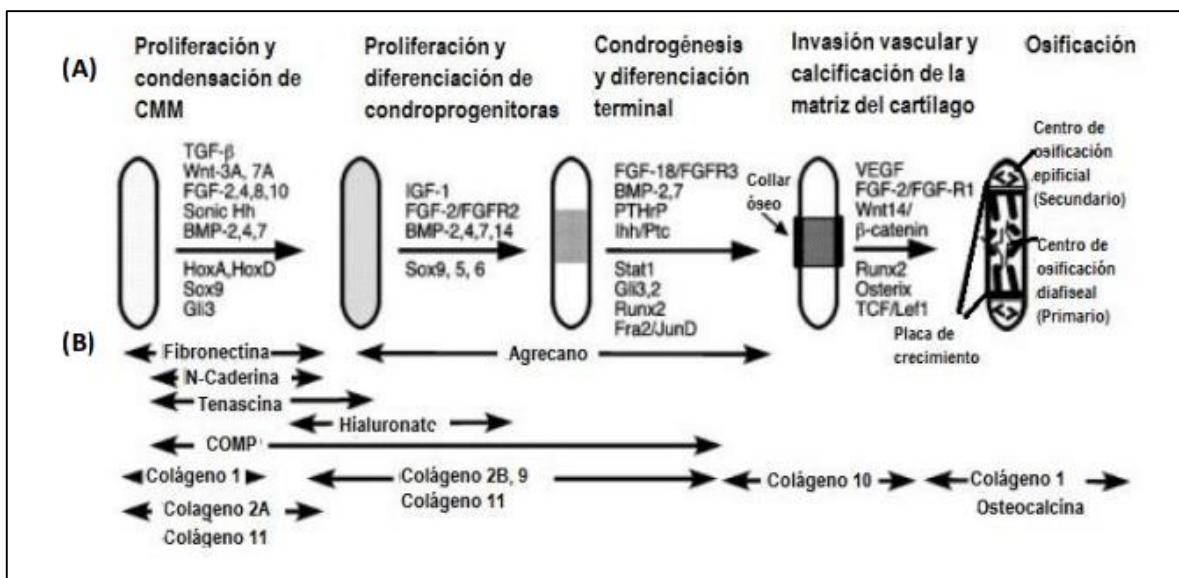


Figura 1. Secuencia de etapas de la condrogénesis durante el desarrollo de huesos largos. (A) Esquema de las etapas y los factores de crecimiento asociados a cada transición en la parte superior de la flecha y los factores de transcripción activados por debajo de la flecha. (B) Se indican las proteínas de la MEC que se expresan en las diferentes etapas. (Tomado de González, 2012)

Con el inicio de la secreción de la matriz, el crecimiento del cartílago continúa por una combinación de dos procesos: 1. **Crecimiento por aposición**, proceso en el cual se forma cartílago nuevo sobre la superficie de un cartílago preexistente y 2. **Crecimiento intersticial**, proceso de formación de cartílago nuevo en el interior de un cartílago preexistente. (Ross y Pawlina, 2015). En el crecimiento aposicional las células cartilagosas nuevas se derivan de la capa interna del pericondrio circundante. Estas células se asemejan a los fibroblastos en cuanto a forma y función y producen el componente de colágeno del pericondrio (colágeno tipo I). Sin embargo, cuando el crecimiento del cartílago se inicia, las células sufren un proceso de diferenciación guiado por la expresión del factor de transcripción SOX-9. Este factor produce cambios morfológicos que determinan la conversión de la célula en un condroblasto (Bi y col, 1999). Los condroblastos a su vez segregan componentes de matriz cartilaginosa, incluida la secreción de colágeno tipo II. Entonces, el cartílago crece generando de manera continua nuevas capas de cartílago (Ross y Pawlina, 2015). El otro tipo de crecimiento es el intersticial, donde los condrocitos se disponen en pequeños grupos celulares llamados isógenos, los cuales provienen de otros condrocitos que han sufrido varias divisiones mitóticas. En esta las células hijas de los condrocitos en división ocupan la misma laguna, a medida que se secreta una matriz nueva, se forma una división entre ambas células hijas y dependiendo de la dirección en la cual ocurren estas divisiones se denominan en grupos axiales donde la mitosis se desarrolla en una sola dirección o coronarios donde ocurre de forma radial (Cardona y col, 2006). En consecuencia, el crecimiento global del cartílago es el producto de la secreción intersticial del nuevo material de matriz por los condrocitos y de la aposición de matriz secretada por los condroblastos recién diferenciados. (Ross y Pawlina, 2015)

Para el desarrollo del tejido óseo la distinción entre el desarrollo endocondral e intramembranoso radica en si un modelo de cartílago sirve como el precursor óseo (osificación endocondral), donde las condensaciones de células mesenquimáticas dan lugar a un patrón de cartílago hialino que posteriormente es destruido y sustituido por hueso formado por nuevas células madre mesenquimales (CMM) que se diferencian en osteoblastos, y al invadir el espacio dejado por las células cartilaginosas (condrocitos hipertróficas) mueren por apoptosis dando origen a los huesos planos que incluyen el cráneo y clavículas medias; o si el hueso está formado por un método más sencillo, es decir, sin la intervención de un cartílago precursor (osificación intramembranosa) donde las CMM de las condensaciones mesenquimáticas dan origen al tejido óseo formando los huesos largos que comprenden el esqueleto apendicular, huesos faciales y clavículas laterales. (Becerra, 2006; Ross y Pawlina, 2015)

El tejido óseo es el único capaz de repararse a sí mismo de manera completa por medio de la reactivación de procesos que tuvieron lugar durante su embriogénesis (Davies y col, 2000). Este es una forma especializada de tejido conjuntivo compuesto de células y una matriz extracelular. La característica que distingue al tejido óseo de otros tejidos conjuntivos es la mineralización de su matriz, la cual produce un tejido muy duro capaz de proporcionar sostén y protección. El principal componente estructural de la matriz ósea es el colágeno tipo I y en menor medida, el colágeno tipo V. En la matriz también se han encontrado vestigios de otros tipos de colágeno, como los tipos III, XI y XIII. Todas las moléculas de colágeno constituyen alrededor del 90 % del peso total de las proteínas de la matriz ósea. (Ross y Pawlina 2015). Además, la matriz contiene otras proteínas no colágenas, que conforman la sustancia fundamental del tejido óseo y constituyen sólo el 10 % del peso total de proteínas de la matriz

ósea. Dichas proteínas son esenciales para el desarrollo, el crecimiento, el remodelado y la reparación ósea. Tanto el colágeno como los componentes de la sustancia fundamental se mineralizan para formar el tejido óseo. Los cuatro grupos principales de proteínas no colágenas que se encuentran en la matriz ósea son macromoléculas de proteoglicanos, glucoproteínas multiadhesivas, proteínas dependientes de vitamina K, osteoespecíficas y factores de crecimiento y citosinas (Ross y Pawlina, 2015). Mientras que las células que se encuentran en la matriz ósea son las siguientes: 1) Osteocitos son las células óseas maduras. 2) Células osteoprogenitoras, que son células derivadas de las células madre mesenquimales y dan origen a los osteoblastos. 3) Osteoblastos, que son células que secretan la matriz extracelular del hueso; una vez que estas células quedan rodeadas por la matriz secretada, pasa a llamarse osteocitos. 4) Células de revestimiento óseo, que permanecen en la superficie ósea donde no hay crecimiento activo y derivan de aquellos osteoblastos que quedan después del cese del depósito óseo. 5) Osteoclastos, que son células de resorción ósea presentes en las superficies óseas donde el hueso se está eliminando o remodelando (reorganizando) o donde el hueso ha sido dañado. (Oakes, 2004)

El sistema esquelético se encuentra expuesto a un sin fin de patologías, además con el aumento en la actividad de los jóvenes y la longevidad de personas mayores, la prevalencia de trastornos articulares que afectan al cartílago y al hueso está aumentando (Perera y col, 2012). En vista de estos problemas se hace necesaria la búsqueda de nuevas soluciones donde la terapia con células madre aparece como una opción para restaurar, mantener o mejorar la función de estos tejidos dañados mediante la creación de sustitutos biológicos que incluyan células cultivadas en matrices tridimensionales, o en medios de cultivo

suplementados con factores de crecimiento entre otros (Estrada y col, 2006; Pérez y col 2007; Ma y col, 2018).

Las células madre (CM) son aquellas células indiferenciadas, que poseen la capacidad de dividirse por períodos indefinidos (auto-renovarse) y de originar células hijas que pueden permanecer en un estado indiferenciado y/o células que pueden comprometerse en determinadas rutas del desarrollo. Esta capacidad les permite convertirse a través de la diferenciación celular en distintos tipos celulares especializados de forma morfológica y funcional. (Weissman y col, 2001; Kirschstein y Skirboll, 2001; Rippon y Bishop, 2004). Según su potencialidad o capacidad de diferenciación se clasifican en: 1) **Totipotentes** como el cigoto, las cuales son capaces de originar a un organismo completo, así como también al linaje germinal y a los tejidos que darán lugar a las membranas extraembrionarias. 2) **Pluripotentes** presentes en la masa celular interna del blastocisto que son capaces de diferenciarse en células de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo). 3) **Multipotentes** presentes en los tejidos u órganos adultos y se pueden diferenciar a células de las misma capa embrionaria. 4) **Unipotentes** como los eritroblastos, los cuales se pueden diferenciar a células de su mismo linaje. (Weissman y col., 2001; Osbourne y col., 2007; Bernard, 2014). 5) **Células** madre pluripotentes inducidas (**iPSC** del inglés induced Pluripotent Stem Cells) un tipo de células madre obtenida a partir la reprogramación nuclear de células de ratón (Takahashi y Yamanaka, 2006) y de células humanas adultas (Takahashi y col, 2007), convirtiéndolas en células madre con características pluripotenciales mediante la expresión de varios genes exógenos, como lo son Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc. (Sayed y col, 2016)

Las CM también se pueden clasificar de acuerdo a su origen, es decir, la etapa de desarrollo del organismo de las que son obtenidas, y estas incluyen: las células madre embrionarias (CME) y las células madres adultas (CMA). 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). Pueden ser aisladas fácilmente, establecidas y amplificadas en un corto período (Nagy y col, 1990). Mientras que las células madre adultas, son células multipotentes presentes en la mayoría de los tejidos y órganos de los mamíferos; estas pueden ser obtenidas directamente del paciente y por lo tanto son inmunológicamente compatibles; generalmente son difíciles de mantener en cultivo debido a que solo viven un número determinado de pasajes y además pueden poseer mutaciones que se manifiesten al momento de la recolección (Toda y col, 2007, Beyer y Da Silva, 2006).

Debido a las limitaciones que presentan ambos tipos celulares, se han buscado fuentes alternativas de células madre que no acarreen problemas éticos, morales o religiosos, que provean un material suficiente y numeroso en contraste con el número de células madre obtenidas de otras fuentes y que no produzcan reacciones inmunológicas. La nueva fuente que cumple con todos estos requisitos y permite el desarrollo de investigaciones que conlleven a nuevas terapias celulares y al mejoramiento de las ya existentes, es la placenta humana (Kaviani y col, 2001; Niknejad y col, 2008; Mihy y col, 2008 Meyer y col, 2011; Dobrova y col, 2010). Esta es reconocida como una fuente rica de células madre multipotentes, representando un reservorio de progenitores, células madre mesenquimales y células madre epiteliales en las cuales se ha demostrado que se diferencian en varios tipos de linajes, incluidos los linajes: adipogénicos, osteogénicos, miogénicos, hepatogénicos,

además de los linajes cardiaco, pancreático, endotelial, pulmonar y neurogénico. (Antoniadou y David, 2015).

La placenta es un órgano materno - fetal característico de todos los mamíferos, es redonda u oval con un diámetro de 15 – 20 cm, un espesor de 2 – 3 cm, pesa alrededor de 500 – 600 g (Miki y Strom, 2006; Gómez, 2009; Parolini y Soncini, 2011) y es notablemente fuerte y elástica. Está formada por dos capas: la placa coriónica de origen fetal que está orientada hacia la cavidad amniótica y está constituida por el amnios y el corión, y la placa basal formada por la decidua de origen materno (Benirschke y Kaufman, 2000; Miki y col, 2005). La membrana amniótica humana (MAH), o amnios, es una membrana delgada avascular que recubre la placenta por su cara fetal, constituyendo la capa más interna de la placenta. Está formada por un epitelio simple compuesto por células planas, cuboidales y columnares procedentes del ectodermo extraembrionario; y se encuentra en contacto directo con el líquido amniótico. Estas células reposan sobre una membrana basal continua formada principalmente por laminina y colágenos de tipo III, IV, VII y XVII (Insausti y col, 2011). A su vez, la membrana basal se encuentra adherida a una fina capa de tejido conectivo subyacente, resto del mesodermo extraembrionario, que se corresponde con la matriz estromal. El espesor de la matriz estromal puede variar ampliamente entre distintas placentas e incluso entre distintas zonas de la misma placenta. La matriz estromal se divide en una capa compacta formada por un tejido compacto y desprovisto de células, y una capa fibroblástica formada por fibroblastos y células de Hofbauer (figura 2). Esta matriz es avascular, rica en colágeno y mucopolisacáridos y con escasas células. (Burkitt y col., 1996; Insausti y col, 2011).

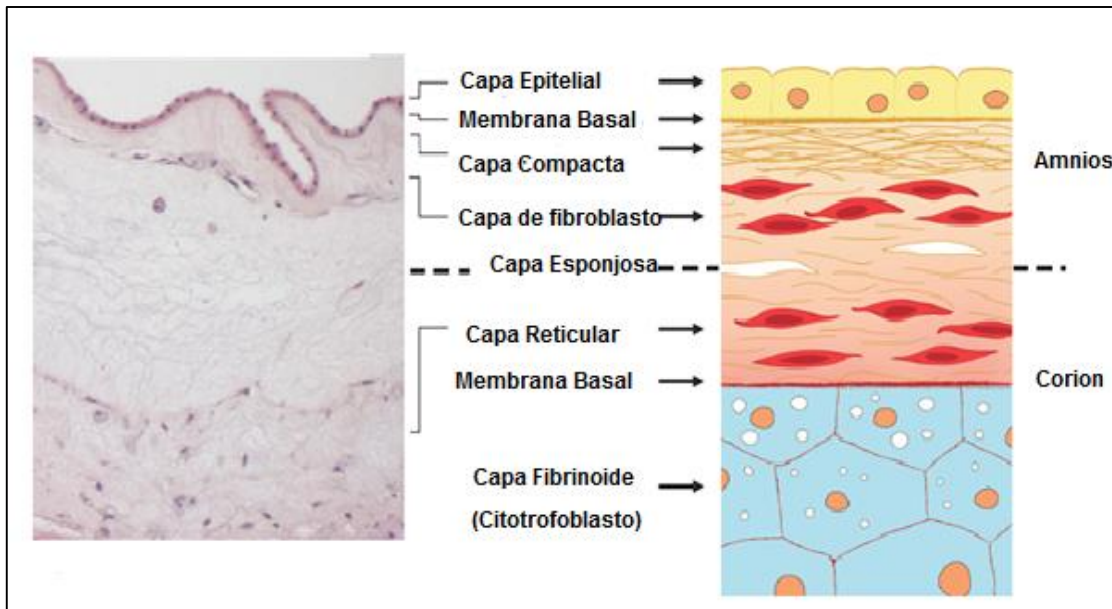


Figura 2.- Membrana amniótica (tomado y modificado de Dobрева y col, 2010).

La creciente evidencia ha demostrado que las células derivadas de la membrana amniótica secretan varias proteínas y citoquinas, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento humano y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), que potencialmente afectan el crecimiento y proliferación celular (Díaz-Prado y col, 2011). Además, poseen una baja o nula inmunogenicidad (Bailo y col, 2004) y tienen una serie de propiedades que permiten que su uso clínico sea exitoso. Esto incluye su efecto antiinflamatorio, antiangiogénico y bacteriostático. Además, promueven la reepitelización, previenen las cicatrices, y funcionan como una barrera de evaporación (Dua y col, 2004; Ganatra, 2003; Gomes y col, 2005; Hao y col, 2000).

La Membrana amniótica tiene dos tipos de células de diferentes orígenes embriológicos con propiedades características de células madre; las células epiteliales amnióticas humanas que

derivan del ectodermo embrionario, y células las mesenquimales del estroma que derivan del mesodermo embrionario (Díaz-Prado y col, 2011)

Las células epiteliales amnióticas humanas (CEAhs) son células predominantemente cuboidales, aunque pueden hacerse cilíndricas en la zona que recubre al disco placentario y aplanadas en diversas zonas del amnios. La base o polo externo se encuentra en contacto con la membrana basal a través de una serie de inter-digitaciones que forman uniones tipo hemidesmosomas con múltiples filamentos. El núcleo normalmente es grande, único e irregular, con uno o dos nucléolos prominentes. El citoplasma es abundante, denso y granular, con numerosas vacuolas de diferentes tamaños y contenido, además, posee un sistema de canales y canalículos que parecen comunicar directamente con el espacio extracelular. Poseen abundantes organelos, que incluyen retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Campos y Gris, 2002; Marengo y Vecchy, 2006; Muiños, 2010). Las CEAhs recién aisladas a pesar de tener una morfología homogénea, expresan un fenotipo heterogéneo, con diferentes grados de expresión antigénica, pareciendo indicar la existencia de subpoblaciones celulares (Whittle y col, 2000; Miki y col, 2005; Navarro, 2013).

Diferentes autores señalan que las CEAhs poseen un alto potencial de diferenciación y expresan marcadores específicos de células madre pluripotentes como: OCT-4, la proteína Sox - 2 y Nanog, pudiéndose diferenciar de manera “*in vitro*” hacia células de las tres capas germinales. (Alviano y col., 2007; De Coppi y col., 2007; Ilancheran y col, 2007; Kim y Blanco, 2007; Miki y col, 2005; Tamagawa y col, 2007; Zheng y col, 2008). Adicionalmente, expresan varios marcadores de superficie característicos de las células madre embrionarias, tales como SSEA-4 y SSEA-3, antígenos de rechazo tumoral TRA-1-60 y TRA-1-81 y C-kit

(Terada y col, 2000; Ilancheran y col, 2007; Miki y col, 2007; Toda y col, 2007; Díaz-Prado y col, 2010). Asimismo, expresan marcadores comunes a las células madre mesenquimales como CD90, CD44, CD105 y CD166 (Wang y col, 2009), lo que sugiere que las células epiteliales amnióticas pueden compartir propiedades funcionales similares con las células madre mesenquimales.

De la misma manera, las CEAhS expresan citoqueratinas (CK), una proteína que se expresa en los filamentos intermedios tipo I y II, rica en queratina y localizada en el citoesqueleto intra-citoplasmático de las células epiteliales. (Ilancheran y col, 2009; Miki y Strom, 2006). Según ciertos autores, la mayoría de las CEAhS expresan vimentina, una proteína de los filamentos intermedios tipo III, usualmente presente en las células estromales y en los precursores neuronales (Sakuragawa y col, 1996; Parolini y Soncini, 2006; Ilancheran y col, 2007; Parolini y col, 2010). Además, las CEAhS expresan bajos niveles de antígenos de superficie clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y no expresan antígenos del MHC de clase II, sugiriendo que las CEAhS al igual que las células madre embrionarias están inmunológicamente privilegiadas, por lo que la hace una fuente apropiada para la medicina regenerativa. (Wolbank y col, 2007)

En los últimos años, se ha reportado que la proliferación celular es estimulada de manera “*in vitro*” por diversos factores y componentes solubles, los cuales pueden ser suministrados en el medio de cultivo (en el caso “*in vitro*”) o encontrarse en el microambiente donde son trasplantadas (en el caso “*in vivo*”) (Zamudio, 2008). Este microambiente o nicho celular es el entorno que rodea a las células y es el que permite mantener la homeostasis del tejido, conservar un equilibrio de quiescencia y la actividad celular, y está conformado por

componentes de matriz extracelular con factores que nutren a las células madre (Moore y col, 2006).

Estos factores son principalmente producidos de manera natural y son secretados por las células a su microambiente inmediato o al torrente sanguíneo, teniendo efecto estimulador o inhibidor, actuando sobre receptores de células dianas por tres diferentes vías:

1) Endocrina: donde las células secretoras liberan factores a la sangre, alcanzando a distancia células dianas; 2) Paracrina: donde una célula produce una molécula señal la cual difunde hasta una célula diana vecina o adyacente y 3) Autocrina: donde ocurre unión de una célula y una molécula señal que es producida por ella misma (Lodish y col, 2005). En cultivos “*in vivo*” ocurren las tres vías en contraste, a las condiciones “*in vitro*” en las que solo ocurren las dos últimas vías.

De la misma manera, se ha señalado que los factores solubles en conjunto con la interacción célula – célula, sea homóloga o heteróloga, la interacción célula – matriz extracelular, la polaridad y forma de la célula, y la tensión de oxígeno, son los responsables de la regulación del proceso de diferenciación celular “*in vitro*” (Freshney, 2010). Estos factores solubles los podemos encontrar de dos formas los fisiológicos y los no fisiológicos (Tabla 1)

Tabla 1. Clasificación de los factores solubles. Tomado y modificado de Freshney, 2010.

Factores Fisiológicos	Factores No Fisiológicos
Esteroides: Hidrocortisona y retinoides	Compuestos plano – polares: DMSO
Hormonas peptídicas: Melanotropina, Tirotroína e Insulina	Drogas citotóxicas; Genisteína, Mitomicina C, entre otras.
Citoquinas: Interferones. TGF, entre otros	

Vitaminas: E,K,D3 entre otras	Modificadores de la señal de transducción
Minerales: Calcio	

TGF: Factor de crecimiento transformante.

Hoy en día, se continua investigando la acción de ciertos factores solubles y vías de señalización en el control del proceso de diferenciación celular (Murdoch y col, 2007; Zhang y col, 2011 Wang y col, 2018). Esto se realiza mediante la suplementación de medios de inducción, un ejemplo de esto son los medios inductores condrogénicos, los cuales contienen dexametasona, ácido ascórbico e insulina (Pittenger y col, 1999, Muraglia y col, 2003), y los medios de inducción osteogénico, que contienen dexametasona, ácido ascórbico y β -Glicerolfosfato (Wang y col, 2014). Con relación a los factores solubles utilizados en esta investigación, la dexametasona es un potente glucocorticoide sintético con acciones que se asemejan a las de las hormonas esteroides, el mismo mejora la condrogénesis, semeja los efectos estimulantes de TGF- β (Mahmoudifar y Doran, 2012). Además, en condiciones fisiológicas puede inducir la diferenciación hacia un fenotipo osteoblástico, aumentar la actividad de la fosfatasa alcalina (FA) y promover la mineralización de la matriz celular (Cheng y col, 1994)

Otros factores importantes para la diferenciación celular hacia los linajes osteogénico y condrogénico son el ácido ascórbico el cual es un cofactor que induce un aumento en la actividad de la fosfatasa alcalina, la expresión del ácido ribonucleico ARN de la osteocalcina y estimula la secreción de componentes de la matriz extracelular como lo son colágeno y los glucosaminoglicanos (Franceschi y col, 1994), la insulina la cual mejora la acumulación de matriz de cartílago, promueve la expresión de proteoglicanos y colágeno tipo II en combinación con TGF- β 1 o TGF- β 2 (Mahmoudifar y Doran, 2012), también favorece la

síntesis de matriz ósea y su mineralización (Rodríguez, 2010 citado por Meyer, 2012) y su efecto puede ser potenciado por el factor de crecimiento epidermal (EGF) (Borisov y col, 2009) y el β -Glicerolfosfato el cual es un fosfato orgánico que al encontrarse en concentraciones de 10^{-6} M promueve la mineralización de la MEC (Choi y col, 2008).

En los medios de diferenciación celular también se agrega SFB proporcionándole a las células aminoácidos, lípidos, factores de crecimiento, vitaminas, hormonas e inhibidores de proteasas potenciando así la acción de unos factores epigenéticos sobre otros (Bianco y col, 2001; Sandoval 2012). Además, se añaden factores de crecimiento como por ejemplo la proteína morfogenética ósea (BMP) la cual regula la proliferación y maduración de los condrocitos; la expresión de N-cadherina para promover interacciones célula-célula; mejora la acumulación de proteoglicanos y colágeno tipo II; promueve la expresión SOX9; y potencia los efectos estimuladores del TGF- β . El TGF- β ; regula la expresión de la fibronectina durante la condensación celular; induce la expresión SOX9; estimula la expresión de proteoglicanos, colágeno tipo II, N-cadherina, NCAM, colágeno tipo XI, fibronectina, tenascina y decorina (Mahmoudifar y Doran, 2012). El factor de crecimiento epidermal (EGF) es un péptido que promueve el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular a través del ligando con su receptor (EGFR) presente en la superficie celular (Causa y Vila, 2014).

Hoy en día, el mantenimiento de los fenotipos celulares diferenciados “*in vitro*” continúa siendo un desafío para los investigadores, principalmente en los tejidos evaluados en esta investigación. Varios estudios realizados con células en cultivo de pollos, conejos, bovinos, porcinos y humanos han sugerido que el fenotipo está determinado por la forma de la célula y las condiciones de cultivo (Aulthouse y col, 1989). Estas condiciones de cultivo influyen

sobre todo en el caso de los condrocitos humanos y de conejo ya que al ser sembrados en monocapa luego de varios pasajes las células suelen perder su morfología característica comenzando a secretar colágeno tipo I y III y fibronectina, es decir, sufren una desdiferenciación celular (Aulthouse y col, 1989; Márquez, 2009; Sandoval, 2012). Por lo tanto, la elección de un sistema de cultivo es importante y depende de las características de las células, su biología y la capacidad para adherirse o no, a sustratos. Para las células anclaje – independientes se requieren cultivos en suspensión para mantenerlas “*in vitro*”, debido a que éstas células no expresan moléculas de adhesión, mientras que para las células anclaje – dependientes, es decir, aquellas que pueden adherirse a un sustrato, se utiliza por lo general cultivos en monocapa, los cuales consisten en sembrar sobre una superficie preferiblemente de plástico previamente tratada para facilitar el proceso de adhesión celular. Por otro lado, se encuentran los sistemas tridimensionales. Estos constituyen un elemento fundamental en la ingeniería tisular y la medicina regenerativa, ya que permiten simular las condiciones *in vivo* en que se encuentran las células. Este tipo de cultivo puede separarse en un conjunto de sustratos como matrices de colágeno tipo I, artificiales y los agregados celulares o micromasas. (Freshney, 2010).

Adicionalmente, proporcionan a las células el apoyo necesario para su proliferación y mantenimiento de sus funciones diferenciadas, permitiendo conservar la arquitectura del tejido (Kim y Blanco, 2007). Además, estos cultivos simulan las condiciones “*in vivo*” en que se encuentran las células e induce la liberación de factores de crecimiento y diferenciación (Lin y Chang, 2008) permitiendo crear la condiciones biológicamente favorables para la interacción célula-célula (Mauck y Tuan, 2009).

Debido a los pocos avances en el mantenimiento del fenotipo de los condrocitos y osteocitos humanos, a su limitada disponibilidad y al pequeño tamaño de muestras obtenida de los pacientes, en conjunto con los pocos estudios realizados en nuestro país relacionados a este tema y los antecedentes descritos en nuestro laboratorio sobre las células madre derivadas de la membrana amniótica humana, se planteó utilizar dos tipos de sistemas de cultivo como lo son monocapa y agregados celulares o micromasas, para evaluar la diferenciación osteocondrogénica de las CEAhs, estos últimos en conjunto con medios inductores específicos para cada linaje, los cuales proporcionan un entorno similar al que se encuentran las células en condensación del pre-cartílago durante el desarrollo embrionario (Johnstone y col, 1998; Zhang y col, 2010) y se pueden emplear como alternativa en la medicina regenerativa del cartílago y hueso.

2. ANTECEDENTES

El término “célula madre” fue introducido en la literatura científica en el año 1868 por Ernst Haeckel, un biólogo alemán que utilizó la palabra alemana “Stammzelle” para describir el organismo unicelular ancestral a partir del cual se originaban todos los organismos multicelulares, así como para definir al huevo fertilizado que daba origen a todas las células del organismo. En esa misma época con motivo de las investigaciones sobre el desarrollo y regeneración del sistema hematopoyético, el término célula madre fue propuesto por aquellos que defendían la hipótesis de un modelo unitario de hematopoyesis, para definir la existencia de un precursor común para todas las células de la sangre. (Ramalho, 2007; García, 2012).

Posteriormente, a principios de 1910, Davis utilizó por primera vez la membrana amniótica como andamio biológico para el tratamiento de defectos de la piel, ganando popularidad como apósito biológico y/o andamio para la regeneración de tejidos (citado en Riboh 2016). Poco después, se aplicó la membrana amniótica en el tratamiento de lesiones por quemaduras empleando injertos de amnios, proporcionando así una cobertura permanente (Sabella, 1913). Y es hasta el año de 1955 cuando se logra establecer exitosamente por primera vez el cultivo de células proveniente del tejido amniótico humano, lo que permitió que más adelante en 1983, un grupo de investigadores conformados por Okita y colaboradores, establecieran y caracterizaran cultivos primarios, así como líneas celulares derivadas de la membrana amniótica humana, las cuales fueron obtenidas por disgregación enzimática con tripsina al 0,25%.

Consecuentemente, Dell'acqua y Gaffney en 1982, evidenciaron el crecimiento de cultivos primarios del amnios humano en medio basal rico en nutrientes (de Dulbecco medio Eagle modificado (DMEM) y Ham's F-12 mezclados en una misma proporción), suplementado con insulina, factor de crecimiento epidermal (EGF) y proteínas séricas accesorias tales como transferrina y triyodotironina aunque libres de suero. Sus resultados señalaron que en medio DMEM: F12 el número de células no incrementó y las células se separaron de las placas de cultivo en comparación con los ensayos realizados con medio suplementado.

Para la época de los 90, Casey y colaboradores aislaron y establecieron el cultivo primario de las células presentes en la membrana amniótica humana con el fin de evaluar la síntesis de los colágenos intersticiales producidos por ambos tipos celulares, demostrando que la síntesis de colágenos intersticiales era una función de las células mesenquimales, sugiriendo así, que la producción de colágeno es una propiedad intrínseca y no exclusiva de estas células más que de las células epiteliales (citado en Miki y col, 2005). Para el año 2000, Whitte y colaboradores estandarizaron una técnica para el aislamiento y cultivo de las células epiteliales por medio de digestión enzimática empleando tripsina al 0,25%; obteniendo células con forma poligonales y formadoras de colonias en la placa de cultivo. Así mismo, varios investigadores han señalado aislamientos exitosos de las células epiteliales de la membrana amniótica humana obteniendo más de 100 millones de células por amnios (Miki y col, 2005; Ilancheran y col, 2007; Gottipamula y col, 2017; Centurione y col, 2018).

Miki y colaboradores en el 2005, examinaron las características que poseían las células epiteliales del amnios como células madre, planteando que el tejido placentario que normalmente se descarta puede ser una fuente útil de células para trasplante y medicina

regenerativa, Asimismo, sus estudios demostraron que el amnios contiene células con una plasticidad y un potencial de diferenciación significativos y que debido a esto se pueden desarrollar métodos para una diferenciación eficiente a otros tipos celulares específicos. Posteriormente, Ilancheran y colaboradores en 2007 demostraron que las células epiteliales amnióticas no forman teratomas o teratocarcinomas cuando son transplantados en los testículos de ratones inmunodeficientes. Además, utilizando citometría de flujo se ha encontrado que estas células poseen una baja expresión de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) clase IA y IIA y como consecuencia una baja inmunogenicidad, por lo tanto, presentan un menor riesgo de rechazo en el trasplante (Niknejad y col, 2008).

Como se mencionó anteriormente, varios estudios han demostrado la capacidad de diferenciación “*in vitro*” de las células epiteliales de la membrana amniótica humana hacia distintos tipos celulares de las tres capas germinales: ectodermo, endodermo y mesodermo (Miki y col, 2005). Los medios de cultivo empleados para tales diferenciaciones han sido variados, aunque en su mayoría han copiado su composición y dosis de los factores inductores empleados en la diferenciación de las células madre embrionarias humanas (García y col, 2012) (ver tabla 2)

Para el año 2010, Díaz-Prado y colaboradores evaluaron la capacidad de diferenciación “*in vitro*” de las células madre provenientes de la membrana amniótica humana. En este estudio usaron condrocitos, células madre mesenquimales y células epiteliales derivadas del amnios sobre la membrana amniótica humana, obteniendo la síntesis de un tejido de reparación fibrocartilaginoso. Igualmente sus estudios revelaron que tanto las células mesenquimales como las epiteliales tienen igual capacidad de diferenciarse hacia el tejido óseo, mientras que

las células mesenquimales del estroma amniótico mostraron mayor capacidad de diferenciación condrogénica y adipogénica.

Tabla 2. Medios de cultivo para la diferenciación “*in vitro*” de las CEAs. (García y col, 2012 modificado por Pérez, 2018)

Capa Germinal	Diferenciación	Autores	Medios inductores
Ectodermo	Neurogénica	Ilancheran y col, 2007 Niknejad y col, 2008 Miki y col, 2005 Márquez y Nieves, 2016	DMEM, 10% SFB, 55µM 2-mercaptoetanol, 1mM piruvato de sodio, 5x10 ⁻⁵ M ácido all-trans retinoico, 10ng/ml FGF-4
Endodermo	Hepática	Miki y col, 2005 Takashima y col, 2004 Sakuragawa y col, 2000 Ilancheran y col, 2007	DMEM, 10% SFB, 20 ng/ml HGF, 10ng/ml FGF-2, 10 ng/ml de oncostatina M, 100nM dexametasona, 10 U/ml de heparina sódica.
Endodermo	Pancreática	Miki y col 2005 Ilancheran y col, 2007 Wei y col, 2003	DMEM-Hams F-12, N2, 10mM nicotinamida.
Mesodermo	Cardiomocítica	Miki y col, 2005 Ilancheran y col, 2007	DMEM, 10%SFB, 55µM 2-mercaptoetanol, 1mMpiruvato de sodio, 1mM ácido ascórbico 2 – fosfato.
Mesodermo	Miogénica	Portmann-Lanz y col, 2006 Bilic y col, 2008; Gottipamula y Sridnar, 2018.	DMEM-Hams F-12, 5 ng/ml recombinante humano PDGF-AB, 5 ng/ml TGF-β1, 30 µmol/L L-ácido ascórbico y 10% SFB.
Mesodermo	Osteogénica	Portmann-Lanz y col, 2006 Bilic y col, 2008 Ilancheran y col, 2007 Parolini, 2008 Gottipamula y Sridnar, 2018	DMEM alta glucosa o DMEM-Hams F-12, 10%SFB, 10 µM dexametasona, 10nM 1-a-25-dehidroxivitamina D3, 50 µg/ml ácido ascórbico, 10 mM α-glicerolfosfato.
Mesodermo	Adipogénica	Portmann-Lanz y col, 2006 Ilancheran y col, 2007	DMEM-Hams F-12, 10%SFB, 0,5 mM isobutilmetilxantina, 1 µM dexametasona, 10 µM insulina, 200 µM indometacin.

Mesodermo	Condrogénico	Portmann-Lanz y col, 2006 Miki y col., 2005; Centurione y col., 2018; Lange-Consiglio y col, 2011, Gottipamula y Sridnar, 2018.	DMEM alta glucosa, 1% SFB, 6.25 µg/ml insulina, 10 ng/ml TGF- α 1. 50ng/ml ácido ascórbico
-----------	--------------	--	---

Recientemente, Topoluk y col, (2017) compararon la capacidad de diferenciación hacia linajes osteogénico y condrogénico de las células mesenquimales derivadas del tejido adiposo humano (CMDAh) y las células del amnios humano. Estos autores encontraron que tanto las células epiteliales, como las células mesenquimales amnióticas humanas, exhibieron una alta proporción de marcadores de superficie de células mesenquimales del estroma (CD90, CD105, CD73), además, las CEAh y CMEAh demostraron una expresión génica significativamente mayor de osteocalcina, agrecano y colágeno tipo 2 en comparación con CMDAh. De igual forma, tanto las CEAh como las CMEAh produjeron cantidades significativamente mayores de matriz mineralizada y cartilaginosa en comparación con las CMDAh, cuando se cultivaron en condiciones de diferenciación osteogénicas y condrogénicas idénticas. Demostrando que las células derivadas de amnios muestran un mayor potencial de diferenciación hacia el hueso y el cartílago al ser comparadas con las células estromales mesenquimales del tejido adiposo.

En 2018, Gottipamula y Sridnar evaluaron el aislamiento, la ampliación y la caracterización de las células epiteliales amnióticas. Este aislamiento y expansión de las CEAh se realizó por medio de pases secuenciales, con estudios de cinética de crecimiento, caracterizando las células con el anticuerpo monoclonal contra pancitoqueratina por ensayos inmunocitoquímicos, observándose que mantienen sus características después del segundo

pasaje. Estos autores, además determinaron que éstas se pudieron diferenciar hacia los linajes osteogénico, condrogénico, adipogénico y miogénico.

Cabe mencionar que el interés por estas células no solo se remite a su aislamiento y caracterización a partir de tejidos humanos, ya que a mediados del año 2012 comenzaron a reportarse estudios con células de la membrana amniótica en diferentes modelos animales los cuales han dado resultados prometedores. Uno de estos fue el trabajo de Lange-Consiglio y col, (2011) quienes aislaron, por primera vez células epiteliales y mesenquimales de la membrana amniótica del caballo, definiendo las propiedades biológicas de estas células. Por otro lado, Mattioli y colaboradores, en el mismo año, caracterizaron las células epiteliales de la membrana amniótica de oveja evaluando la potencialidad hacia el linaje osteogénico. Posteriormente, Rutigliano y col, (2013) aislaron y caracterizaron las células madre de la porción epitelial del amnios en felinos; Ghosh y col, (2016) y Borghesi y col, (2017) estandarizaron métodos de aislamiento en células mesenquimales provenientes de la membrana amniótica de búfalo y conejo respectivamente.

Hoy en día los investigadores han centrado su mayor esfuerzo en identificar cuáles son los factores solubles de diferenciación, que imitan estas señales, por lo que han dejado a un lado la importancia de los factores insolubles en la diferenciación celular “*in vitro*”, como la adhesión celular, la forma celular, las fuerzas mecánicas, la rigidez del sustrato en la diferenciación de células madre y la densidad celular (Engler y col, 2006; Ruiz y Chen, 2008). Gao y col, en (2010) señalan que durante la morfogénesis, las células experimentan cambios en la forma al diferenciarse en distintos linajes; por ejemplo, las células osteogénicas inicialmente adquieren una morfología poligonal, un mayor tamaño y la formación de

nódulos al momento en que se comienza a calcificar la matriz, mientras que las células condrogénicas y adipogénicas al inicio de su diferenciación, se redondean.

Es importante resaltar que la diferenciación hacia estos linajes se suele producir si las células se mantienen a densidades apropiadas. McBeath y col, en (2004) revelaron que las diferencias en las densidades celulares confieren diferencias en la forma celular y que esta forma actúa como una señal en el proceso de compromiso celular. Watt y col, en (1988) y Márquez y col, en (2012) determinaron que cuando los condrocitos son cultivados en monocapa hay un cambio en la expresión de los componentes de la matriz extracelular y se comienza a expresar colágeno tipo I, como resultado de este proceso (desdiferenciación celular) aparece un fenotipo tipo fibroblástico.

Jahn y colaboradores en (2010) señalan que esta dificultad de diferenciación de los condrocitos y osteoblastos puede solucionarse por medio de cultivos en 3D, ya que en este tipo de cultivo se simula las condiciones “*in vivo*” o ambiente hipóxico en que se encontraban las células y estimula las interacciones célula-célula. Este tipo de cultivo incluye un conjunto de sustratos como matrices de colágeno tipo I, cultivos de pellets o agregados celulares, agarosa, alginato y alginato de fibrina. (Johnstone y col, 1998; Buschmann y col, 1992; Freshney, 2010; Ho y col, 2008).

Watts y col, en (2013) señalan que el cultivo de pellets o agregados celulares es un sistema de cultivo estable, libre de biomateriales, el cual es usado generalmente para los estudios de rediferenciación de condrocitos, así como para los estudios de diferenciación de células madre mesenquimales “*in vitro*”. Cabe destacar que existen muy pocas investigaciones desarrolladas con la utilización de este sistema de cultivo para las inducciones de las células madre epiteliales de la membrana amniótica humana, y que la mayoría de estos estudios han

sido realizados con células mesenquimales provenientes de la médula ósea (Muraglia y col, 2003; Whitaik y col, 2011; Watts y col 2013), tejido adiposo (Rodríguez, 2005; de la membrana amniótica (Nogami y col, 2012; Ullah y col, 2010; Gholizadeh y col, 2106; Muiños-Lopez, 2107), así como también de células madre adultas (Kafienah y col, 2007), células madre de líquido amniótico humano (Zuliani y col, 2018) obteniendo la expresión de componentes de MEC propia de cartílago y hueso y mineralización de matriz.

En Venezuela el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Facultad de Ciencias de la UCV ha contribuido en los avances a nivel experimental en la campo de la ingeniería de tejidos, ya que se han estandarizados protocolos de diferenciación de las células madre de diferentes procedencias, entre las cuales podemos mencionar la membrana amniótica humana, hacia los linajes condrogénicos y osteogénicos mediante diferentes medios inductores y a través diferentes estrategias de cultivo. Araos en (2009) estableció cultivo en monocapa y en sistema de micromasas de células madre mesenquimales **del cordón umbilical humano**, evaluando la diferenciación a tejidos condrogénico y osteogénico, ese mismo año Márquez aisló condrocitos del **cartílago nasal humano** obtenidos de cirugías estéticas y evaluó las características morfológicas de estas células en monocapa y en una matriz de colágeno tipo I. Sandoval (2012) realizó una diferenciación condrogénica de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo en **co-cultivos con cartílago de ratón**. Meyer (2012) evaluó la diferenciación de las células mesenquimales de la membrana amniótica de ratón hacia un linaje osteogénico y condrogénico. Navarro, (2013) evaluó la viabilidad y funcionalidad de las células epiteliales amnióticas humanas y comparó la población en base a sus características morfológicas, propiedades de adhesión y expresión de algunos

marcadores característicos. López (2014) estableció cultivos de células mesenquimales del estroma de la membrana amniótica por medio de cultivos en monocapa y sistema de micromasas, evaluando el potencial de diferenciación osteo-condrogénico. Por último, Nieves (2018) Evaluó el potencial condrogénico de las células epiteliales de la membrana amniótica usando dos sistemas de cultivo, en monocapa y sobre el estroma de la MAH. En estas investigaciones se han obtenido resultados prometedores a partir de las inducciones de las células madre de distintos orígenes; entre estos las provenientes de la membrana amniótica hacia los distintos linajes, sin embargo, el conocimiento sobre la diferenciación y plasticidad de las células epiteliales de la membrana amniótica es muy escaso, es por ello que en este trabajo se plantea la inducción de las células epiteliales de la membrana amniótica humana hacia el linaje osteo-condrogénico en los sistemas en monocapa y micromasas, utilizando medios inductores osteogénico y condrogénico respectivamente.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- Determinar el potencial osteo-condrogénico de las células madre epiteliales de la membrana amniótica humana.

3.2. Objetivos Específicos.

- Aislar las células epiteliales de la membrana amniótica humana.
- Establecer cultivos en monocapa a partir de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.
- Caracterizar morfológicamente e inmunohistoquímicamente las células epiteliales de la membrana amniótica humana.
- Inducir las células epiteliales de la membrana amniótica humana hacia un linaje osteogénico y condrogénico en un sistema en monocapa y en un sistema en micromasas.
- Evaluar la inducción de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material Biológico

Para el establecimiento del cultivo de las células epiteliales de la membrana amniótica humana, fueron utilizadas placentas humanas (n=7), las cuales presentaban entre 38 y 40 semanas de gestación. Éstas fueron obtenidas a partir de cesáreas programadas y suministradas por el Instituto Médico “Dr. Jiménez Rojas” con la colaboración del Dr. Pedro Hurtado; bajo el consentimiento informado de las pacientes. Además, se contó con la aprobación del comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.



Figura 3. Placenta humana.

Luego de la intervención quirúrgica las placentas fueron recolectadas en un envase de plástico estéril, colocadas dentro de un contenedor de hielo a una temperatura aproximada de 4°C y transportadas al laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología Experimental (IBE).

Los criterios de selección y exclusión previos a la intervención quirúrgica que cumplieron las madres seleccionadas fueron los siguientes:

Criterios de Selección

- Madre sana, mayor de edad, en pleno uso de sus facultades mentales.
- Embarazo sano y controlado por un período no menor a seis meses.
- Feto sano, sin patologías placentarias.
- Parto por cesarí programada sin ruptura de la bolsa.
- Madre y feto libres de infecciones transmisibles.
- Consentimiento materno, médico y de un testigo.
- Serología del primer trimestre del embarazo negativas (Virus de Inmunodeficiencia adquirida –VHI, Hepatitis B-HBV, Hepatitis C-HCV y Sífilis).
- Placenta sin restos de meconio.

Criterios de exclusión

- Infección materna crónica o aguda.
- Infección fetal crónica o aguda.
- Cesarías de emergencia.

4.2 Establecimiento del cultivo primario de células epiteliales de la membrana amniótica humana

4.2.1. Aislamiento de la membrana amniótica humana

Este procedimiento se realizó según la metodología empleada por Navarro (2013) con algunas modificaciones, de la manera siguiente:

En la campana de flujo laminar horizontal, se procedió a separar el amnios del corion de manera manual, para lo cual se realizó un corte a nivel del cordón umbilical. Una vez separada la membrana amniótica, fue transferida a envases de vidrio estériles donde fue lavada tres veces con agitación manual en una solución tampón fosfato (PBS) libre de calcio y magnesio, con una mezcla de antibiótico- antimicótico al 2% (100 µg/ml de estreptomicina, 100 unidades/ml penicilina y 2,5 µg/ml anfotericina B). Luego del tercer lavado, la membrana se extendió en una gasa estéril para eliminar los restos de sangre coagulada y posteriormente, ésta se transfirió a los envases de vidrio, donde se realizaron 3 lavados más. Durante este procedimiento, se realizaron pruebas de esterilidad de caldo nutritivo y tioglicolato al 1er, 5to y 6to lavado con la finalidad de descartar la presencia de contaminación durante la manipulación y procesamiento de la membrana amniótica.

Posteriormente los fragmentos de membrana fueron transferidos a una placa de Petri estéril donde se cortaron en secciones de aproximadamente 4X4 cm. Estas secciones fueron incubadas en una solución de Dispasa II 1,2 U/mL en base medio Ham-F12 (GIBCO) con 2% de antibiótico-antimicótico (estreptomicina, penicilina y anfotericina B) a 4°C durante un periodo de 13-18 horas.



Figura 4. Aislamiento de la membrana amniótica humana

4.2.2. Denudación de la membrana amniótica humana

Después del período de incubación en Dispasa las secciones de membrana amniótica se colocaron en una placa de Petri estéril y se extendieron dejando expuesta la capa epitelial. Posteriormente, se procedió a denudar la membrana utilizando un rastrillo con el fin de desprender esta capa epitelial, las células aisladas fueron recolectadas en PBS y centrifugadas a 2446,66g a 4°C por 10 minutos, dos veces.

El taco celular obtenido fue resuspendido en PBS, filtrado a través de una gasa estéril, y centrifugado en las condiciones antes mencionadas.

Posteriormente el taco celular obtenido, se resuspendió en medio nutritivo, el cual consistió 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 (100 µg/ml de estreptomina, 100 unidades/ml penicilina y 2,5 µg/ml anfotericina B), 2 mM de L-Glutamina y 1 mM de Piruvato de Sodio, como fuente extra de energía.

Por último, se realizó el conteo y viabilidad celular con el método de azul de tripano en la cámara de Neubauer. Para esto se tomó una muestra de 20µl de la suspensión celular en un y se mezcló con un volumen equivalente de 20µl de azul de tripano a temperatura ambiente, seguidamente se tomó una muestra de 10 a 15µl de la mezcla y se colocó en la cámara de Neubauer.

La determinación de la viabilidad se realizó con la misma preparación utilizada para el recuento celular, contando las células vivas y las células muertas, calculando la proporción del total representado por las células vivas según la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad} = \left[\frac{\text{n}^\circ \text{ células vivas}}{\text{n}^\circ \text{ células vivas} + \text{n}^\circ \text{ células muertas}} \right] \times 100$$

Una vez estimado el número y la viabilidad de células obtenidas, se continuó con la siembra de células a densidades entre 1.5×10^6 - 5×10^6 células en placas o frascos de cultivo estériles preparados previamente con una capa de Gelatina a 1%.

Cabe destacar que los cultivos celulares fueron mantenidos en una incubadora a 37 °C, en atmósfera húmeda al 5 % de CO₂. A estos se le realizaron cambios de medio periódicos hasta que los cultivos alcanzaron entre el 80 – 90% de confluencia en la superficie del cultivo.

4.3. Establecimiento de subcultivos

Una vez alcanzada la confluencia, las células adheridas de los cultivos primarios obtenidos, fueron sometidos a un proceso de tripsinización, el cual se basa en someter a las células a la acción de una mezcla enzimática de tripsina 0,125% Gibco-EDTA 0,02% en una proporción 1:1, durante 5 minutos a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂; Luego de lo cual se inactivó la acción de la enzima con medio DMEM-F12 que contenía 10% SFB y se centrifugó a 724,5g por 10 min. El taco celular obtenido fue resuspendido en medio nutritivo suplementado, y se realizó la siembra de las células a densidades de 1×10^5 en placas de cultivo 3x4 para los ensayos de diferenciación celular en cultivos en monocapa, y densidades de 7×10^5 células en tubos de centrifuga para los ensayos de diferenciación en cultivos en micromasas.

4.4. Ensayos de proliferación celular mediante curva de crecimiento

Para evaluar el comportamiento del cultivo celular, las células epiteliales del primer pasaje fueron sembradas a bajas densidades, 20.000 células/pozo en placas de 6x4 pozos, permitiéndonos tener muestras con un n=6 por cada punto. Posteriormente se realizó el conteo celular en los días 4, 8, 14 y 17. A partir de estos datos, se realizó una curva de crecimiento celular expresada por el logaritmo del número de células vivas en función del tiempo.

El crecimiento de la población también se evaluó microscópicamente mediante el uso de un microscopio invertido de contraste fases Olympus IX50, el cual se encuentra acoplado a una computadora con la que se tomaron los registros fotográficos digitales usando el programa TV TURNER.

4.5. Caracterización morfológica de las células epiteliales de la membrana amniótica humana

Los estudios de caracterización morfológica de las células epiteliales de la membrana amniótica se realizaron por medio de registros fotográficos digitales tomados con un microscopio invertido de contraste de fases Olympus IX50 acoplado a una computadora, una coloración de rutina May- Grünwald-Giemsa, e inmunocitoquímica contra Pancitoqueratina (PAN-CK) de Santa Bárbara Biotechnology.

4.5.1 Tinción May- Grünwald-Giemsa.

La Coloración May Grünwald-Giemsa es una técnica que consiste en una combinación de dos coloraciones sucesivas, la de May Grünwald en base a eosina y posteriormente la de Giemsa en base a azul de metileno, ambos colorantes neutros. Es muy sensible al pH, de

manera que estructuras celulares con carácter básico fijan los colorantes ácidos (eosina), mientras que las que poseen carácter ácido fijan los colorantes básicos (azul de metileno), por lo cual tiñe diferencialmente el citoplasma y el núcleo celular (Urbaneja y col, 1975; García y col, 2006). El procedimiento utilizado fue el siguiente:

Las células epiteliales fueron fijadas con metanol 100% por 5 min, posteriormente se agregó el colorante May Grünwald y se dejó actuar por 5 min, se lavó el exceso y se agregó el colorante Giemsa, el cual se encontraba previamente filtrado y diluido en la proporción 1:18 en agua destilada, durante 20 min. Posteriormente se deshidrató la muestra en una batería de: acetona, acetona - Xilol (2:1), acetona - Xilol (1:2) y se dejó unos minutos en Xilol, por último se realizó el montaje final en medio permount. (Urbaneja y col, 1975)

4.5.2 Caracterización inmunocitoquímica

La determinación inmunocitoquímica consiste en la detección y localización de antígenos (Ag) *in situ* (cortes de tejido, extensiones celulares e incluso pequeños organismos u órganos) utilizando anticuerpos (Ac) seleccionados para identificar antígenos específicos (Montuenga y col, 2009).

Para determinar la presencia de citoqueratina se usó el anticuerpo monoclonal en contra de Pan-CK (que reconoce a la CK 4, 5, 6,8,10,13 y 18 aislados de carcinoma epidérmico A-432) de Santa Bárbara Biotechnology. La citoqueratina es una proteína de los filamentos intermedios, la cual se expresa en el citoesqueleto de las células de origen epitelial. Las células fueron reveladas empleando el kit de revelado de la misma empresa siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante: el anticuerpo secundario Biotilnado, se une al complejo

Estreptavidina – Biotina – Peroxidasa, el cual reacciona con el sustrato de la peroxidasa, el cromógeno Diaminobencidina (DAB), junto con la activación enzimática y la oxidación del cromógeno, se producirá una reacción visible por precipitación de este, que permitirá evidenciar el sitio donde se localiza el antígeno.

Las células provenientes del cultivo primario fueron fijadas con metanol 100% por 5 minutos, luego incubadas por 5 minutos en una Solución de Peróxido de Hidrógeno al 3% con el fin de inactivar a la peroxidasa endógena. Se realizó un lavado con PBS durante 2 minutos y se incubó las células durante 20 min con el suero bloqueador, inmediatamente después se incubó con el anticuerpo primario a ensayar, durante toda la noche. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS, y se incubó por 30 minutos con el anticuerpo secundario biotilado. Seguidamente, se lavó la muestra con PBS 2 veces, luego se incubó por 30 minutos con el complejo Estraptavidina-Biotina-Peroxidasa HRP. Se lavó dos veces con PBS y se incubó en una solución diluida del sustrato para la peroxidasa (Diaminobencidina, DAB) durante 10 minutos. Las muestras fueron lavadas con agua bidestilada y se contrastaron los núcleos con Hematoxilina. Posteriormente, las células se deshidrataron en una batería creciente de Acetona –Xilol, y por último se realizó el montaje en medio permount.

4.6. Ensayos para la inducción de la diferenciación de las CEAhs

Para la inducción condrogénica y osteogénica de los cultivos en monocapa y en sistema de micromasas se utilizaron medios inductores compuestos por diversos suplementos a diferencia de los cultivos controles los cuales se mantuvieron en medio nutritivo no suplementado según el protocolo propuesto por López (2014) (Ver tabla 3). Estos medios les

brindaron a las células un microambiente inductivo para la expresión de características de un fenotipo diferenciado.

Tabla 3. Factores a ensayar en el medio base para inducir la diferenciación osteogénica y condrogénica de las células epiteliales de la membrana amniótica humana.

Diferenciación Celular	Medio Nutritivo	%Suero fetal Bovino (SFB)	Suplementos
Control	DMEM-F12	10% SFB	<ul style="list-style-type: none"> • 1% de solución de antibióticos y antimicóticos • 1% de piruvato de sodio. • 1% de aminoácidos no esenciales • 1 mM de glutamina.
Osteogénica	DMEM-F12	10% SFB	<ul style="list-style-type: none"> • 1% de solución de antibióticos y antimicóticos. • 5µg/ml de insulina recombinante. • 50µg/ml de ácido ascórbico. • 1x10⁻⁷ M de dexametasona • 10 mM β-Glicerol Fosfato.
Condrogénica	DMEM-F12	10% SFB	<ul style="list-style-type: none"> • 1% de solución de antibióticos y antimicóticos • 5µg/ml insulina recombinante. • 50µg/ml ácido ascórbico. • 1x10⁻⁷ M dexametasona

4.6.1 Inducción ósteo-condrogénica en cultivos en monocapa

Las células epiteliales obtenidas del 1^{er} pasaje fueron sembradas en placas de cultivo de 12 pozos, a una densidad de 1x 10⁵ células/pozo. Posteriormente, fueron agregados los medios de inducción osteogénico o condrogénico respectivamente y se incubaron a 37°C en atmosfera húmeda al 5% de CO₂ durante 17 días.

4.6.2 Inducción ósteo-condrogénica en sistema de micromasas

Para la diferenciación en micromasas o agregados celulares se utilizaron las células epiteliales obtenidas del cultivo primario y del 1^{er} pasaje siguiendo el protocolo propuesto

por López (2014). Una vez que los cultivos estuvieron confluentes, fueron sometidos a digestión enzimática en tripsina al 0,125% durante 5 min a 37°C, luego de lo cual se inactivó la acción enzimática con medio suplementado con suero fetal bovino y se centrifugaron a 724,5 g por 5 min. Se eliminó el sobrenadante, y se resuspendió el taco celular. Se emplearon aproximadamente 7×10^5 células/tubo para realizar las micromasas; para ello se centrifugó nuevamente y una vez obtenido el taco, se completó con 5ml de medio nutritivo y se mantuvo a 37°C y 5% CO₂ durante 24 horas, pasado este tiempo, se descartó el medio nutritivo y se añadieron los medios de inducción (osteogénico y condrogénico respectivamente). Estos cultivos fueron mantenidos a 37°C y 5% CO₂, entre 17 y 21 días, realizando cambios de medio 2 veces por semana. Una vez finalizado el tiempo de inducción, los agregados celulares o micromasas fueron fijados en formaldehído neutro al 10% durante una semana, luego de lo cual se deshidrataron en una batería creciente de Etanol, se incluyeron en parafina y fueron cortados en secciones de 5µm de espesor en un micrótopo rotatorio (Leica RM2125 RTS). Los cortes fueron desparafinados en Xilol e hidratados en para su posterior coloración.

4.7. Evaluación citoquímica de la inducción de la diferenciación de las células epiteliales de la MAH

4.7.1. Inducción Condrogénica en cultivos en monocapa y micromasas

Para la evaluación citoquímica de la inducción condrogénica tanto en cultivos en monocapa como en micromasas, se empleó la coloración Azul Alcian pH 2,5 la cual pone de manifiesto la presencia de glucosaminoglicanos sulfatados y carboxilados. Además, para la inducción de los cultivos en micromasas también fue evaluada mediante la coloración con azul de toluidina el cual pone de manifiesto la presencia de residuos aniónicos de tipo sulfato,

propios de los proteoglicanos (PGs) ácidos sulfatados, presentes en la matriz extracelular del cartílago joven mediante una coloración púrpura; gracias a la capacidad metacromática de éste (Montuenga y col, 2009).

- **Coloración azul Alcian pH 2,5 (Prophet, 1995)**

Las muestras previamente fijadas fueron lavadas con una solución de ácido acético al 3% por 3 min, y se coloreados con azul Alcian a pH 2,5 por 30 minutos. Posteriormente, se lavaron durante 10 min con agua corriente, con agua destilada, y finalmente fueron contrastados con Hematoxilina de Harris por 2 min. Se lavaron con agua corriente y las muestras del cultivo en monocapa se deshidrataron en una en una batería de deshidratación acetona –xilol mientras que las micromasas se deshidrataron en una batería creciente de etanol con dos cambios de Xilol y finalmente se realizó el montaje permanente con Permount.

- **Azul De Toluidina 1%. (Linch y Mellor. 1985).**

Las micromasas se colorearon con una solución de azul de toluidina al 0,1% por 10 min. Se lavaron con agua destilada 3 veces, y se deshidrataron rápidamente en acetona/xilol para finalmente llevar a cabo el montaje permanente con Permount

4.7.2 Evaluación de la inducción osteogénica en cultivos en monocapa y micromasas

Para la evaluación citoquímica de la diferenciación osteogénica en ambos sistemas de cultivos se les realizó la coloración Von Kossa. La cual evidencia la presencia de fosfatos, oxalatos y carbonatos presentes en el tejido óseo, además, es posible visualizar procesos de mineralización de los osteoblastos primarios (Breen y col, 1994; Bonewald y col, 2003).

- **Coloración Von Kossa 5 (Prophet, 1995)**

Las muestras previamente fijadas, se lavaron con agua destilada, y se incubaron en una solución de nitrato de plata al 1%, en presencia de luz durante 20min. Posteriormente, se lavó con una solución de hiposulfito de sodio al 5% y se dejó actuar sobre la muestra por unos 20 min., se lavó con agua corriente y se tiñó con una solución de safranina al 0,01% durante 30 segundos. Finalmente se deshidrataron y se realizó el montaje permanente con Permount.

4.8. Evaluación inmunohistoquímica de la inducción de la diferenciación de las células epiteliales de la MAH.

Para la evaluación de la diferenciación hacia el tejido condrogénico, se determinó la presencia de colágeno tipo II como componente de la matriz extracelular por medio de ensayos inmunohistoquímicos con el anticuerpo Anti-colágeno tipo II (Santa Bárbara Biotechnology), diluido 1:100. Mientras que, para la evaluación de la diferenciación osteogénica, se determinó la presencia de fosfatasa alcalina mediante ensayos inmunohistoquímicos con el anticuerpo Anti-fosfatasa alcalina (Santa Bárbara Biotechnology). Siguiendo la metodología descrita en la sección 4.5.2. Como control negativo se utilizaron cultivos de células epiteliales de la membrana amniótica humana mantenidas en medio nutritivo sin factores inductores. Además, de los cultivos de células inducidas hacia los linajes condrogénicos y osteogénicos sin incluir el anticuerpo primario en el procedimiento.

5. RESULTADOS

A continuación, se muestran los resultados obtenidos al evaluar el potencial osteocondrogénico de las células madre epiteliales de la membrana amniótica humana en dos sistemas de cultivo, esto es, cultivos en monocapa y micromasas mediante histoquímica e inmunohistoquímica. Asimismo se describe el aislamiento, establecimiento, crecimiento y caracterización de los cultivos de las células epiteliales amnióticas humanas.

5.1. Aislamiento de las células epiteliales de la membrana amniótica humana

Con el apoyo del Instituto Médico “Dr. Jiménez Rojas” se pudieron procesar placentas humanas (n=7) provenientes de madres sanas, con edades comprendidas entre los 23 y los 35 años, con embarazos no complicados y tiempo de gestación entre 38 y 40 semanas. Las células de la MA se aislaron del amnios, tras ser éste separado manualmente del corion y procesada siguiendo la metodología descrita por Navarro, (2013).

En la tabla 4, se muestra el rendimiento de células epiteliales obtenidas por membrana amniótica procesada (n=7) y el número de células viables. En esta se puede observar que el rendimiento celular promedio fue de 41.52×10^6 células por amnio con una viabilidad aproximada del 80.88%. De igual manera, se observó que después de varios procesamientos la cantidad de células epiteliales obtenidas fue aumentando, sin embargo la viabilidad celular hasta la muestra número 3 no aumentó, por lo cual a partir de la cuarta muestra se redujo el tiempo de denudación de la membrana así como el período de incubación del tejido en la solución de Dispasa II (máximo 13 horas a 4°C), obteniendo una viabilidad mayor al del

promedio, de esta manera se estandarizó la metodología de aislamiento con la que se alcanzó tener mayor número de células viables que se mantuvieran hasta el primer pasaje.

Tabla 4. Rendimiento y viabilidad celular obtenida por membrana amniótica procesada.

Número de muestra (n)	Número de células obtenidas por membrana amniótica	Viabilidad celular (% células vivas)	Cultivo primario	Subcultivo
1	43.000.000	84%	+	+
2	48.000.000	73%	+	-
3	76.000.000	79%	+	-
4	30.000.000	80%	+	-
5	29.400.000	81%	+	+
6	29.650.000	83%	+	+
7	34.650.000	85%	+	+
Promedio	41.528.571±16,83x10 ⁶	80.85%		

5.2. Establecimiento de los cultivos primarios de las células epiteliales de la membrana amniótica humana

Para lograr el establecimiento y mantenimiento de las CEAhs en cultivo, éstas fueron sembradas a una densidad de (3 - 3.5) x10⁶ células por frasco de cultivo y en ausencia de EGF.

La confluencia de los cultivos primarios se alcanzó alrededor de los 7 y 14 días de cultivo (Figura 5B). En relación a las características morfológicas “*in vitro*” de los cultivos primarios de las CEAhs, en la figura 5 se muestra el desarrollo de los cultivos de estas células desde el día 6 hasta el día 11 mediante microscopía óptica de contraste de fases. Pudiéndose observar una población heterogénea desde el inicio del cultivo. Dicha población está formada por tres subpoblaciones celulares, entre las cuales tenemos: células con morfología poligonal tipo

epitelial (CP fig. 5A). Esto es, células con un núcleo esférico, de gran tamaño y ubicado en el área central de la célula, que presenta uno o dos nucléolos y un citoplasma denso y granular. Este tipo celular forma colonias homogéneas y se encuentra en una alta proporción en relación a los otros fenotipos celulares. Células con citoplasma amplio (CCA) situadas en los centros de las colonias, con una morfología redondeada, con un núcleo ovalado y central, un nucléolo central prominente, y una gran proporción de granulaciones citoplasmáticas. Y células con morfología alargada o tipo fibroblasto (CF) las cuales poseen un núcleo ovalado y central, varios nucléolos y un citoplasma alargado o en forma de huso. Estas se encuentran principalmente en la periferia de las colonias rodeando a las células adyacentes. De igual manera en la figura 5 se puede observar uniones intercelulares (UI) similares a desmosomas y algunas células se ven refringentes lo cual indica división celular (Div).

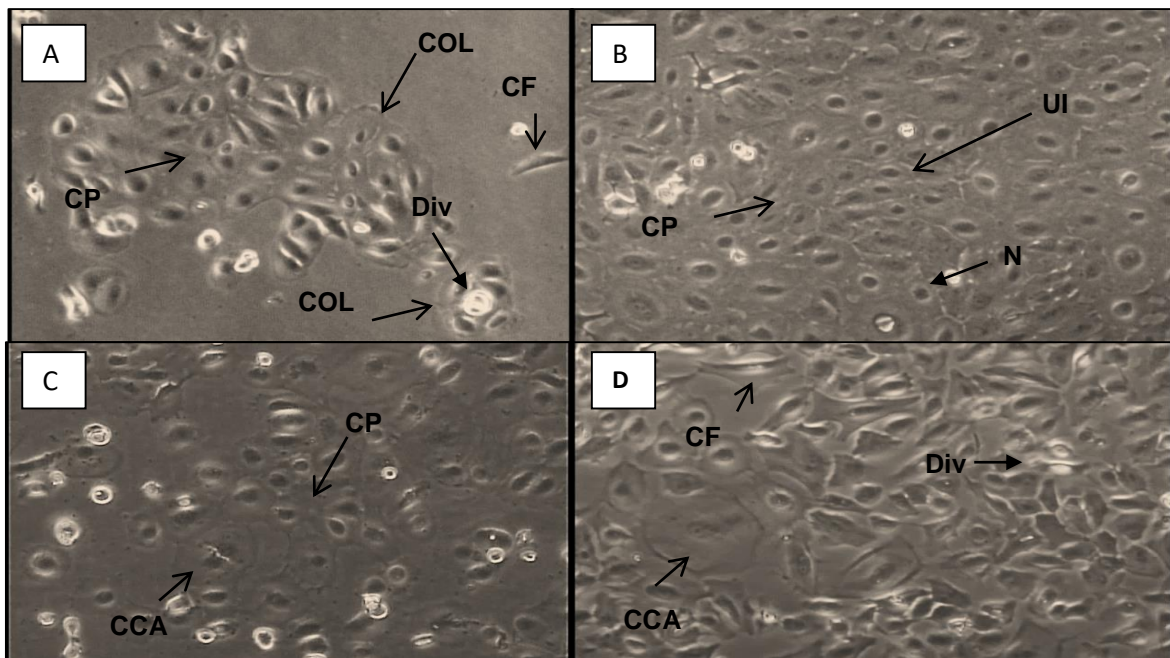


Figura 5. Se muestran las micrografías de contraste de fase del Cultivo Primario y subcultivo de las células epiteliales de la membrana amniótica humana. A) 6 días de cultivo y B) 11 días de cultivo. C) 1^{er} Subcultivo 13 días y D) 1^{er} Subcultivo 21 días 100X. Allí se observan tres subpoblaciones de células epiteliales con morfología diferente: células poligonales de tipo epitelial (CP), células alargadas o tipo fibroblasto (CF) y células poligonales con citoplasma amplio (CCA). Además, al inicio del cultivo se observan algunas colonias aisladas (COL) y células en división (Div).

En referencia a los subcultivos de las CEAhS, se puede observar en las figuras 5C y 5D que las células mantuvieron las mismas características de los cultivos primarios, esto es, se observaron tres subpoblaciones diferenciadas y una marcada proliferación celular sin rasgos aparentes de senescencia durante los 21 días de evaluación.

5.3. Ensayos de proliferación celular mediante curva de crecimiento de las células epiteliales de la membrana amniótica humana

La capacidad de proliferación celular se evaluó por medio de una curva de crecimiento, la cual nos permitió observar y estudiar el óptimo crecimiento y mantenimiento de las células en cultivo a través del tiempo. Este ensayo se realizó con células del primer pasaje mantenidas en medio nutritivo DMEM-F12 suplementado. Cada punto de la curva representa el promedio del número de células calculados con un $n=6$, además se calculó la desviación estándar para cada punto.

La figura 6 nos revela un patrón de comportamiento típico de las células mantenidas “*in vitro*”, conformado por tres fases: una fase de latencia, luego una fase exponencial que inicia a partir del día 4 de cultivo, y por último, una fase estacionaria o plateau que se visualiza desde el día 14 en adelante.

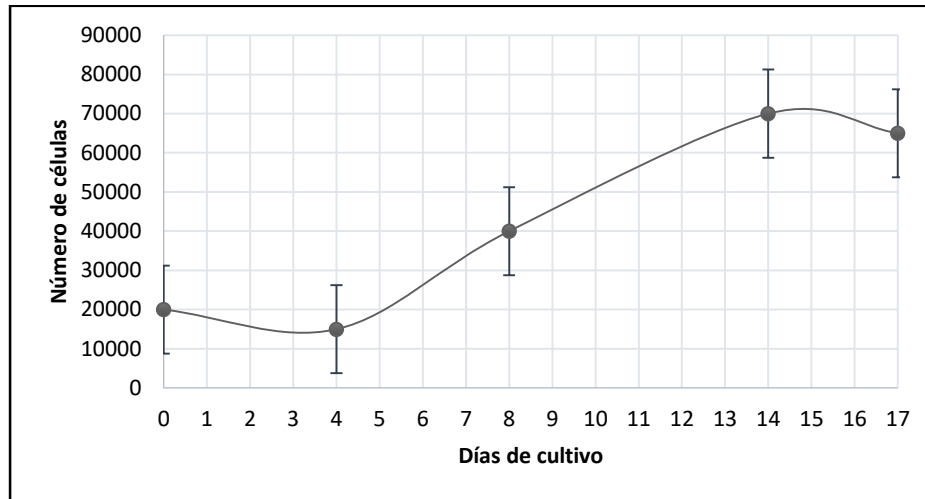


Figura 6. Curva de crecimiento de las células epiteliales de la membrana amniótica humana, en medio de cultivo DMEM-F12 suplementado (n=6). Las células epiteliales mostraron un desarrollo caracterizado por tres fases. Donde se observa un comienzo de la fase exponencial al cuarto día de cultivo.

5.4. Caracterización citológica de las células epiteliales de la membrana amniótica humana

Una vez establecidos los cultivos de las CEAhs, se realizó la caracterización citoquímica de las mismas, por medio de una coloración de rutina May Grünwald – Giemsa.

En la figura 7 se observa con detalle las células que conforman el cultivo corroborando la heterogeneidad de las células epiteliales de la membrana amniótica en cultivos en monocapa, donde se puede apreciar las tres subpoblaciones celulares descritas previamente, además se puede observar que las células con morfología poligonal tipo epitelial (CP) predominan en comparación a las células fusiformes tipo fibroblasto (CF) y células con citoplasmático amplio (CCA). De igual modo, se aprecian las uniones intercelulares (UI) tipo desmosomas. En esta micrografía además, se puede observar que las células con morfología poligonal (CP) presentan un citoplasma levemente basófilo y homogéneo, con núcleos basófilos centrales y esféricos, cuya heterocromatina se ubica en la periferia y presentan uno o dos nucléolos intensamente basófilos. En cuanto a las células de citoplasma amplio (CCA), estas

poseen una morfología redondeada y presentan un citoplasma levemente basófilo principalmente en el área perinuclear de las células, con núcleos esféricos ubicados en el centro y entre uno o dos nucléolos (n) intensamente basófilos. Mientras que las células tipo fibroblasto (CF), tienen una morfología fusiforme con citoplasma ahusado y basófilo, núcleos ovalados levemente basófilos y múltiples nucléolos intensamente basófilos.

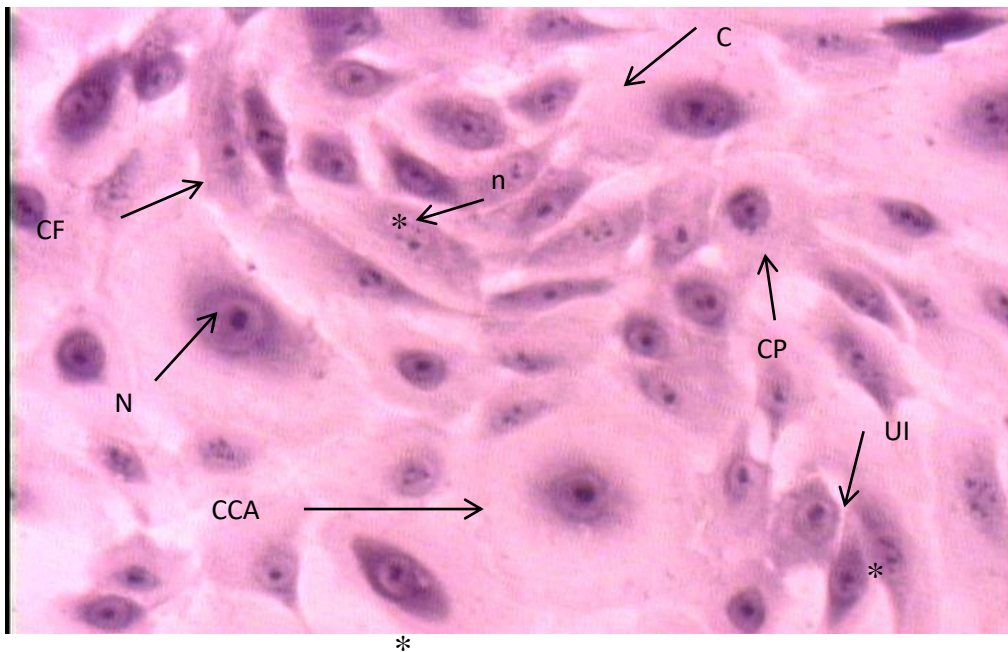


Figura 7. Cultivo primario de células epiteliales de la MAH (11 días de cultivo). 200X. Se observan tres subpoblaciones celulares: células alargadas o tipo fibroblastos (CF), circulares con citoplasma amplio (CCA) y poligonales de tipo epitelial (CP), de igual manera se observaron uniones intercelulares (UI) y diferentes tonalidades de la tinción en núcleos (N), citoplasma (C) y los nucléolos (n), observándose alta basófila en la región perinuclear de algunas células (*). May-Grünwald-Giemsa.

5.5. Ensayos para la inducción de la diferenciación de las CEAhS.

Como se mencionó previamente, para los ensayos de inducción de la diferenciación hacia los linajes osteogénico y condrogénico se utilizaron células del cultivo primario y del primer pasaje, en dos sistemas de cultivo monocapa y agregado celular, los cuales fueron mantenidos en medios inductores durante 17 y 21 días, respectivamente (tabla 3). Cada uno de estos ensayos contó con un cultivo control, el cual fue mantenido en medio nutritivo no inductor.

5.5.1 Inducción ósteo-condrogénica en cultivos en monocapa

El potencial osteo-condrogénico de los cultivos en monocapa fue evaluado a los 17 días de inducción por medio de dos técnicas histoquímicas: la coloración azul alcian a pH 2,5 para la inducción condrogénica y la coloración Von Kossa para la inducción osteogénica.

Al analizar los aspectos morfológicos de los cultivos en monocapa diferenciados hacia el linaje condrogénico (Fig., 8B y 8C) se observó que las células exhibieron algunos cambios en comparación al cultivo control (Fig. 8A). En este sentido, se pudo observar células con morfología esférica o redondeada, con núcleos ovalados excéntricos con un nucléolo y una vacuola en su citoplasma, características morfológicas similares a los condrocitos cultivados “*in vitro*”.

No obstante, también se observaron células que conservaron su morfología epitelial inicial tipo poligonal (Fig.8B). Además, en estos cultivos se pudo observar la formación de agregados o cúmulos celulares (Cu) en algunas zonas del cultivo (Fig. 8B), los cuales mostraron una reacción positiva sugiriendo que las células están produciendo GAGs, así mismo se sugiere que estas células pueden estar pasando por un proceso de condensación análogo al inicio de la condrogénesis “*in vivo*”.

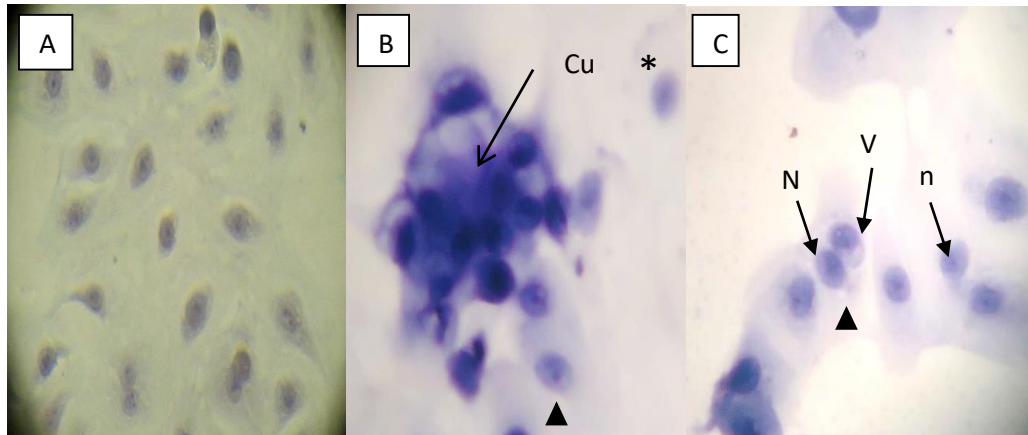


Figura 8. Diferenciación de células epiteliales a los 17 días de inducción en sistema de cultivo en monocapa. Coloración azul alcian pH 2,5. A) Células en medio control. Se puede observar que no hay coloración con el azul alcian 250X. B) Células en medio de inducción condrogénico, donde se observan cúmulos (Cu) o agregados celulares, en los cuales se evidencia una reacción con el colorante principalmente dentro del cúmulo, y células sin cambios morfológicos (*) 250X C) Se observan células con una morfología típica de condrocito() con núcleos (N) excéntricos, un nucléolo (n) y vacuolas (V). 250X

Para evaluar la inducción hacia el linaje osteogénico se realizó la coloración Von Kossa mediante la cual se detectan los depósitos de calcio. En la figura 9, se muestra el cultivo control (9 A) y el inducido (figuras (9 B y C). En los cultivos inducidos podemos apreciar algunos cambios morfológicos, entre ellos el aumento de tamaño de las células. Se observa que aun cuando tienen una forma poligonal (CP) son de mayor tamaño en comparación con las células que se logran apreciar en el cultivo control. Además es posible notar que los núcleos (N) aunque son redondeados como los de las células control, son excéntricos y presentan un único nucléolo (n). Estas características morfológicas, aunado al hecho de que se pudieron detectar algunos depósitos de calcio en los límites intercelulares en la MEC; nos permiten sugerir que estas células se asemejan a osteoblastos; (figuras 9B y 9C). Estos cambios no se observaron en el cultivo control (Fig.9A). Es importante mencionar que este patrón solo se apreció en algunas zonas del cultivo.

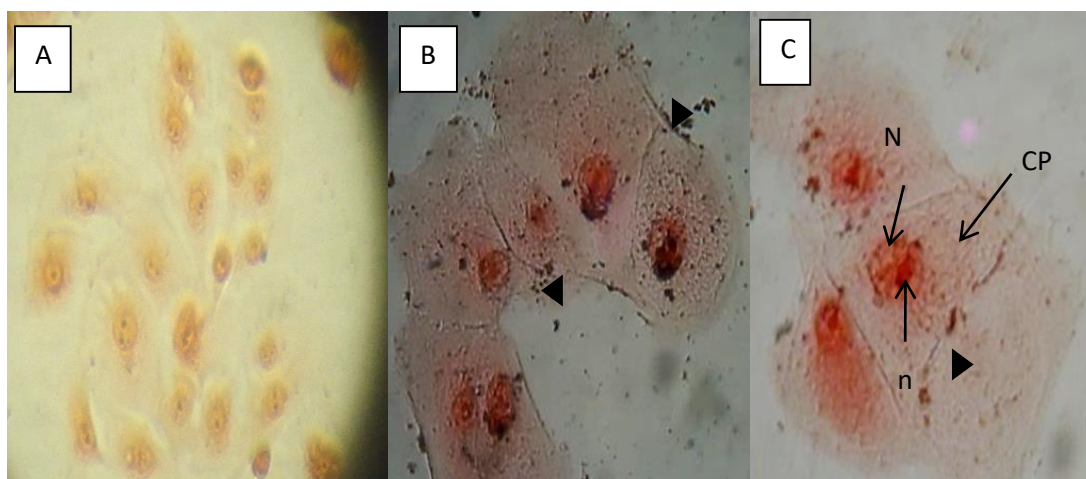


Figura 9. Diferenciación de células epiteliales a los 17 días de inducción en sistema de cultivo en monocapa. Coloración Von Kossa. A) Células en medio control. No se observa mineralización de matriz. 250X. B) Células en medio inductor osteogénico, las cuales mostraron pocos depósitos de calcio teñidos de negro (▶) indicando la presencia de fosfatos de calcio. 250X. C) A mayor aumento podemos apreciar que estas células presentan una morfología poligonal (CP) que difieren del control, con núcleos (N) redondeados y excéntricos y un único nucléolo (n) 250X.

5.5.2. Inducción ósteo-condrogénica en sistema de micromasas

Para la evaluación de la inducción en los cultivos en micromasas (Fig. 10) se usaron células del cultivo primario. Después de 21 días de inducción, estas micromasas fueron fijadas y procesadas histológicamente. Una vez realizado los cortes se procedió a evaluar la inducción mediante histoquímica e inmunohistoquímica.

Para la evaluación histoquímica se utilizaron las coloraciones azul alcian a pH 2,5 y azul de toluidina, para la inducción condrogénica, mientras que para la inducción osteogénica, se utilizó la coloración Von Kossa. Ahora bien, para la inmunohistoquímica, se utilizó el anticuerpo anti-colágeno tipo II en la inducción condrogénica, y el anticuerpo anti-fosfatasa alcalina para la osteogénica.

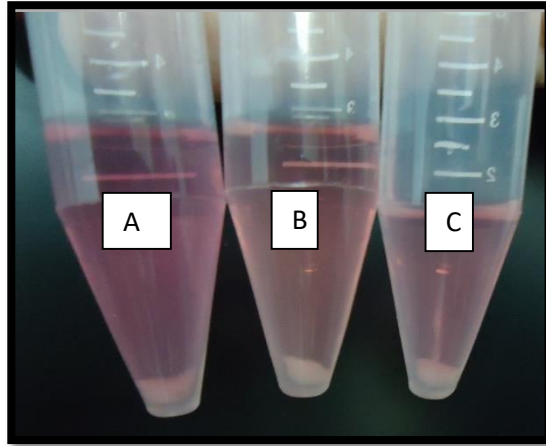


Figura 10. Sistemas de cultivo tridimensional tipo agregados celulares. 21 días de inducción. A) Medio control. B) Medio de inducción condrogénica. C) Medio de inducción osteogénica.

- **Coloración azul Alcian pH 2,5.**

Como se ha mencionado previamente, la coloración azul alcian pone en manifiesto la presencia de glucosaminoglicanos ácidos carboxilados presentes en la matriz celular. En la figura 11 se observa una micrografía a diferentes aumentos del cultivo de CEAs mantenidas en medio control; en esta se puede notar un patrón de coloración homogéneo dentro de la micromasa (Figura 11B y 11C), podemos apreciar que la morfología de estas células se mantiene, es decir, son células poligonales con núcleos esféricos centrales, con uno o dos nucléolos, sin embargo se puede notar que muchos de los núcleos son picnóticos.

Cuando las micromasas son mantenidas en medio de diferenciación condrogénico, se logra observar dos zonas de coloración diferentes (Figura 12A y 12B). Una región que clasificamos como n° 1, la cual corresponde a la periferia de la micromasa, en la cual podemos observar una reacción positiva bastante intensa a la coloración con azul Alcian que nos indica la presencia de glucosaminoglicanos en la MEC y nos sugiere además, que hubo

diferenciación hacia el linaje condrogénico, y una región n°2 o regional central de la micromasa, en la cual no se observó una reacción positiva con el colorante, en esta zona la coloración es semejante a la observado en el control, por lo cual podemos sugerir que en esta zona no hubo diferenciación.

En la Figura 12C, se muestra, a mayor aumento, un área de la región periférica de la micromasas donde se puede notar que las células sufrieron diversos cambios morfológicos entre los cuales podemos observar una forma irregular, núcleos esféricos granulares y excéntricos, además en el citoplasma se puede observar la presencia de vacuolas las cuales se encuentran cerca del núcleo. En la región n° 2 (Figura 12D) se puede apreciar células con dos morfologías diferentes, esto es, células con forma redondeada con núcleos esféricos y centrales, y citoplasma poco extendido; y células con morfología típica de las CEAhS, con una forma poligonal, con núcleos ovalados y centrales, con uno o varios nucléolos. Cabe destacar que las células con morfología redondeada presentaron una leve coloración positiva en la periferia de las mismas en contraste con las de morfología poligonal.

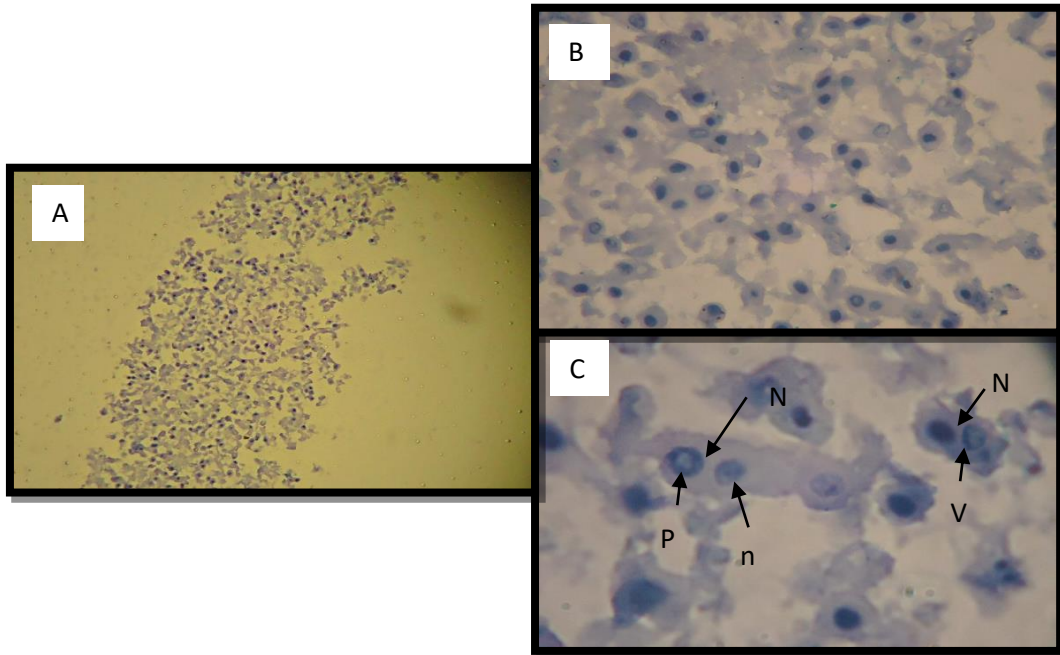


Figura 11. Corte transversal de un Cultivo en micromasas de CEAs mantenidas en medio control. Coloración azul alcian pH 2,5. A). corte de las micromasas en el que se aprecia una coloración homogénea en toda la superficie 100X. B. No se observa reacción positiva con el colorante 400X. C. A mayor aumento, se puede observar cómo se mantiene la morfología poligonal tipo epitelial, con núcleo (N) esférico central y con uno o dos nucléolos (n), se observa también la presencia de vacuolas (V) y el citoplasma no se colorea (*) Así mismo, se observan núcleos picnóticos (P) 1000X.

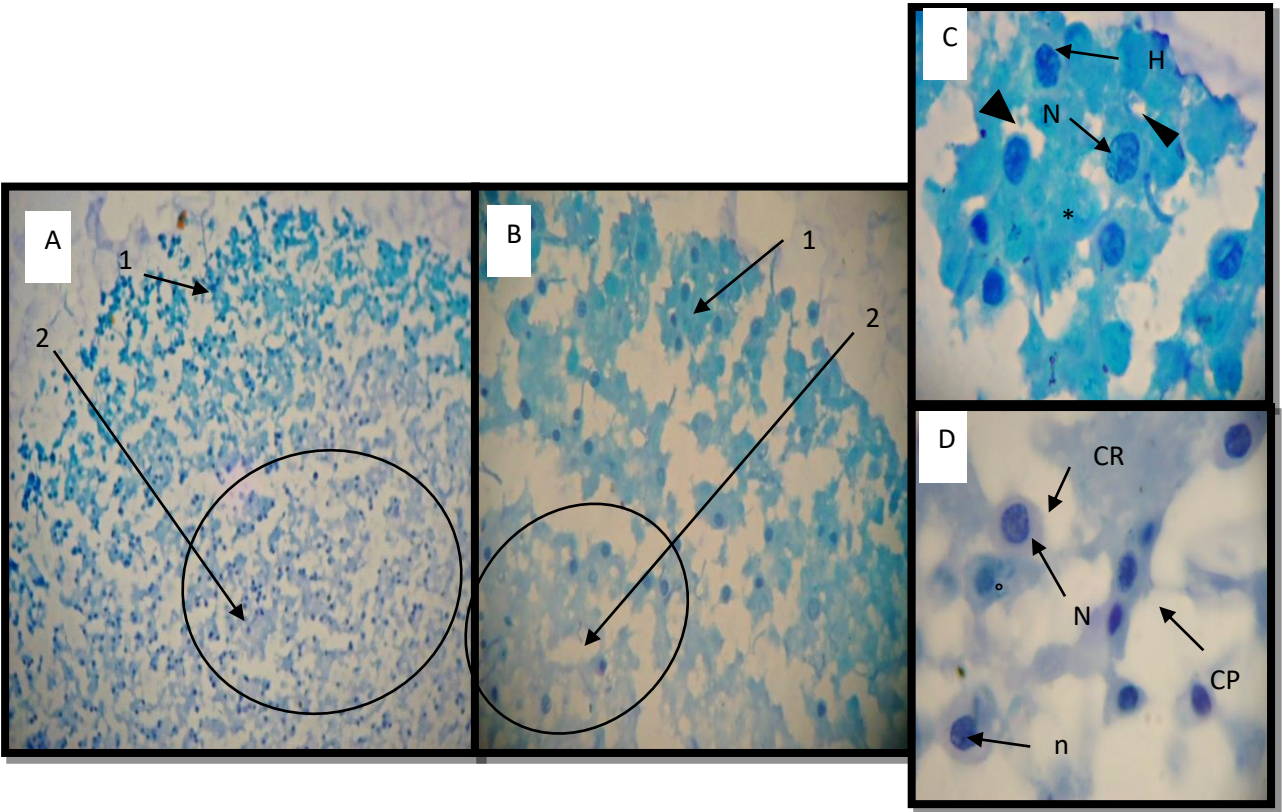


Figura 12. Corte transversal de un Cultivo en micromasas de CEAs mantenidas en medio de inducción condrogénico. Coloración azul alcian pH 2,5 A). Se observa que en las micromasas hay dos regiones diferentes 1) Periférica, 2) Central. 100X. B. En la región periférica (1) se aprecia una reacción positiva azul Alcian observándose una intensa coloración, lo cual sugiere la presencia de GAGs, mientras que en la región central de la micromasa (2) no se observa la misma reacción con el colorante. 400X. C). A mayor aumento en la región periférica las células presentan una morfología redondeada irregular, con núcleos esféricos granulares y excéntricos, y con citoplasma intensamente basófilo (*) además se observan unas vacuolas adyacentes al núcleo (▶). 1000X, mientras que en la región central D) la mayoría de las células mantienen su morfología poliédrica, aun cuando se pueden observar algunas con morfología esférica (°) 1000X. Coloración azul alcian pH 2,5. (CP: células poliédricas; CR: células redondeadas; N: núcleo y n: nucléolo)

- **Azul De Toluidina 1%**

La coloración azul de toluidina evidencia la presencia de residuos aniónicos de tipo sulfato de los proteoglicanos ácidos sulfatados presentes en la MEC del cartílago, esta coloración vira de azul a rojo, efecto que se denomina metacromasia.

Al observar las micromasas mantenidas en medio control (figura 13A y 13B) se observa una coloración con una tonalidad azul de baja intensidad en toda la superficie de la micromasa indicándonos la ausencia de proteoglicanos en la MEC. En la figura 13C se aprecia que estas células mantienen la morfología característica de las células epiteliales, esto es, una morfología poligonal, cuyo citoplasma puede presentar vacuolas, se observa un tanto extendido y presenta una coloración muy tenue. Estas células además presentan núcleos más oscuros, ovalados y centrales.

En cuanto a los cultivos de las CEAhS mantenidos en medio de diferenciación condrogénico se pudo observar una intensa coloración violeta, es decir se produjo una metacromasia muy marcada en ciertas regiones de la micromasa. Como se muestra en un corte transversal de la micromasa (Figura 14A) la mayor intensidad de coloración se produjo en la periferia de las y esta va disminuyendo al acercarse a la parte interna o central. Las células ubicadas en la región periférica e intermedia (Figura 14B) presentan una distribución homogénea de la coloración indicando una mayor cantidad de proteoglicanos en esta zona, mientras que en las células en la región central, la metacromasia solo presentan en los bordes de las células (Figura 14C). De igual manera, en las figuras 14B y 14C podemos observar como varía la organización de las células en las diferentes regiones, en este sentido, apreciamos que en la región n° 1 las células se observan agrupadas mientras que en la región n° 3 se encuentran dispersas.

A mayor aumento, en la figura 14D se pueden observar los cambios morfológicos de las células ubicadas en la periferia de la micromasa, donde las células presentan una morfología redondeada con núcleos ovalados y esféricos. En la región intermedia, figura 14E, las células presentan una morfología un tanto ovalada, con un citoplasma amplio, y algunas presentan núcleos ovalados; así mismo, se observaron células redondeadas con núcleos esféricos y en algunas células se pudo apreciar algunas vacuolas. En la figura 14F se observa que las células de la región central son similares a las células mantenidas en los cultivos control (figura 14C). Todos estos cambios que se observan en las regiones periférica e intermedia de las micromasas aunado con la Metacromasia observada en las mismas, nos permite sugerir que en estas regiones se ha producido una diferenciación.

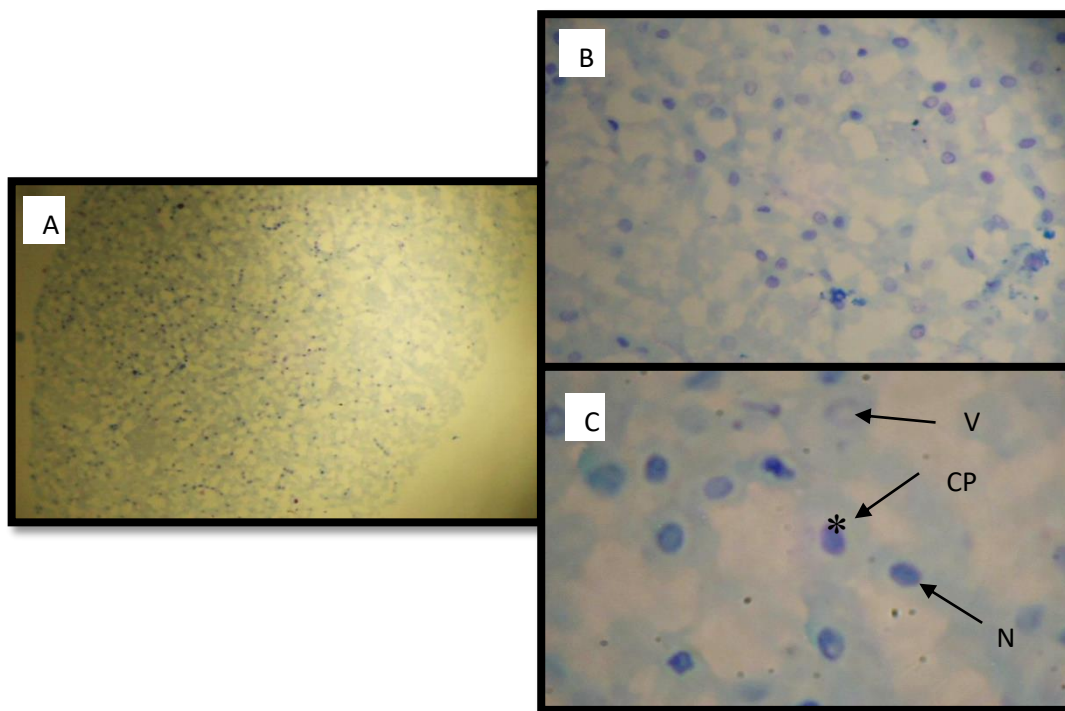


Figura 13. Corte transversal de un Cultivo en micromasas de CEAs mantenidas en medio control. Coloración azul de Toluidina. A. Panorámica de las micromasas donde se observa una tonalidad azul de baja intensidad en toda la superficie del corte 100X. B. Se evidencia una reacción negativa con el colorante indicándonos que no hay presencia de proteoglicanos. 400X. C. Detalle de la coloración donde se observa la morfología poligonal tipo epitelial (CP) con núcleo (N) ovalado central de color más intenso, con presencia de vacuolas (V) y citoplasma sin coloración positiva (*) 1000X.

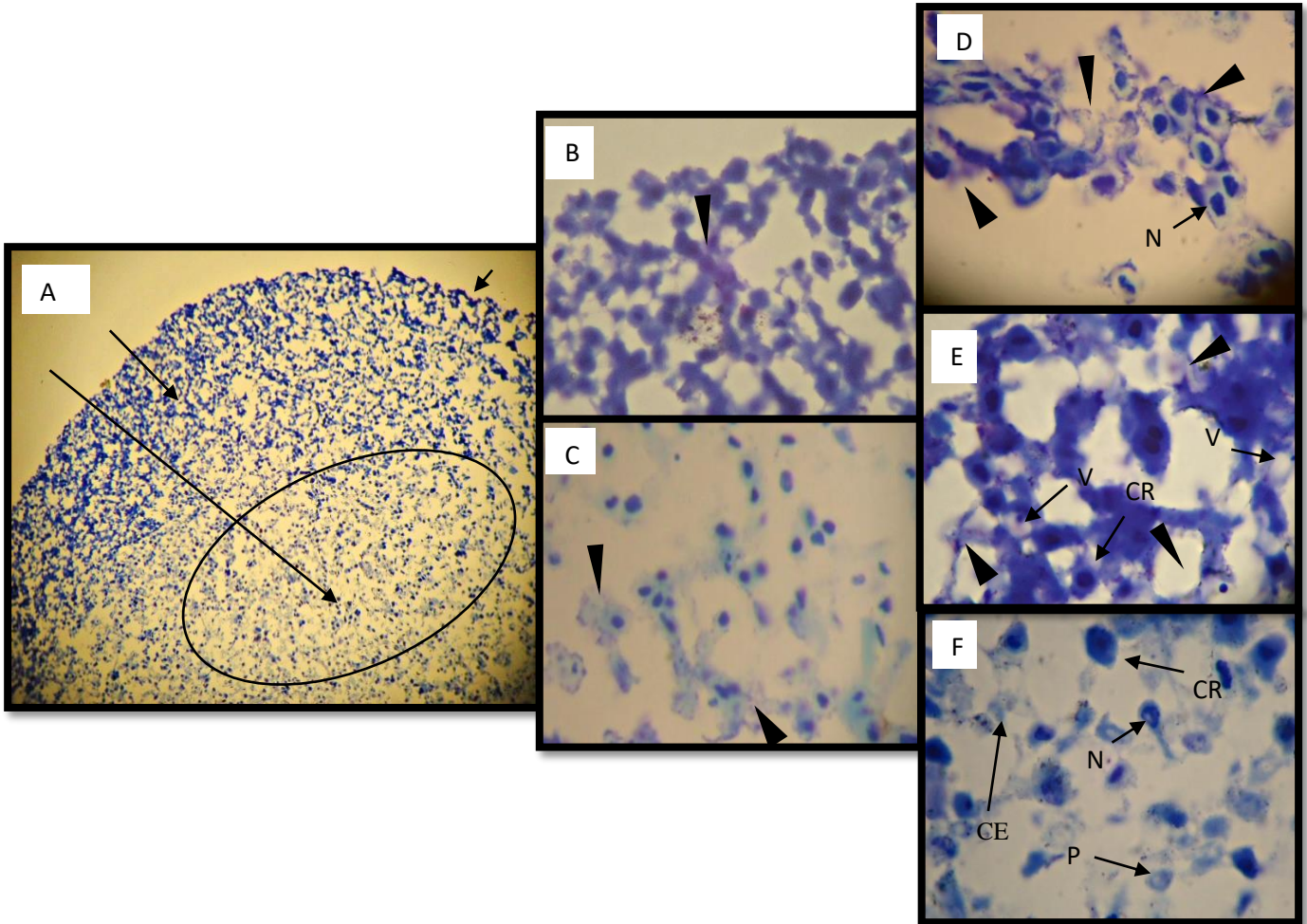


Figura 14. Corte transversal de un Cultivo en micromasas de CEAhS mantenidas en medio de inducción condrogénico. Coloración azul de Toluidina. A). Panorámica donde se observan tres regiones diferentes según la intensidad de coloración; 1) Periférica, 2) Intermedia 3) Central. 100X. B) Regiones periférica e intermedia donde se observa una intensa coloración violeta (►) 400X. C. Región central allí se observa una coloración azul en las células, sin embargo también se puede observar una coloración violeta en la periferia de las células señalado con (►). 400X. A mayor aumento, tanto en la región periférica (D) como en la intermedia (E) se puede apreciar que las células en estas regiones presentan una morfología redondeada, con núcleos ovalados y esféricos y con vacuolas en el citoplasma (V). 1000X. Mientras que en la región central (F) se puede observar células con morfología redondeada (CR) y células con un citoplasma un poco extendido (CE) con un núcleo (N) central y esférico y en algunos casos núcleos picnóticos (P) 1000X.

- **Coloración Von Kossa**

La tinción Von Kossa se utilizó para evidenciar la presencia de depósitos de calcio o sales de calcio, en esta tinción, la plata se deposita en los complejos cálcicos en forma de grupos fosfatos o carbonatos, tiñéndose de negro.

En la fig. 15 se muestran las micrografías correspondientes al control, sin inducción, allí podemos percibir que las células se colorean, mas no se observan depósitos de calcio. En Figura 15C se puede observar que estas células presenta cambios morfológicos ya que, algunas presentan una forma redondeadas mientras que otras presentan un citoplasma irregular con prolongaciones citoplasmáticas; el núcleo es esférico y está ubicado en el área central de las células; en algunas se pueden apreciar vacuolas en el citoplasma.

Al observar las cultivos mantenidos en medio osteogénico (Figura 16A) notamos la presencia de depósitos de calcio teñidos de color negro y ubicados principalmente entre los límites de las células, lo cual nos permite sugerir que está ocurriendo la mineralización de la matriz extracelular. Es importante mencionar que estos depósitos se observaron en toda la superficie de la micromasa.

En la figura 16C podemos distinguir dos morfologías diferentes, células con forma redondeada y células alargadas, mediante esta coloración no se pueden distinguir las estructuras presentes en las células (núcleo, nucléolo, vacuolas) como en las células mantenidas en los medios controles.

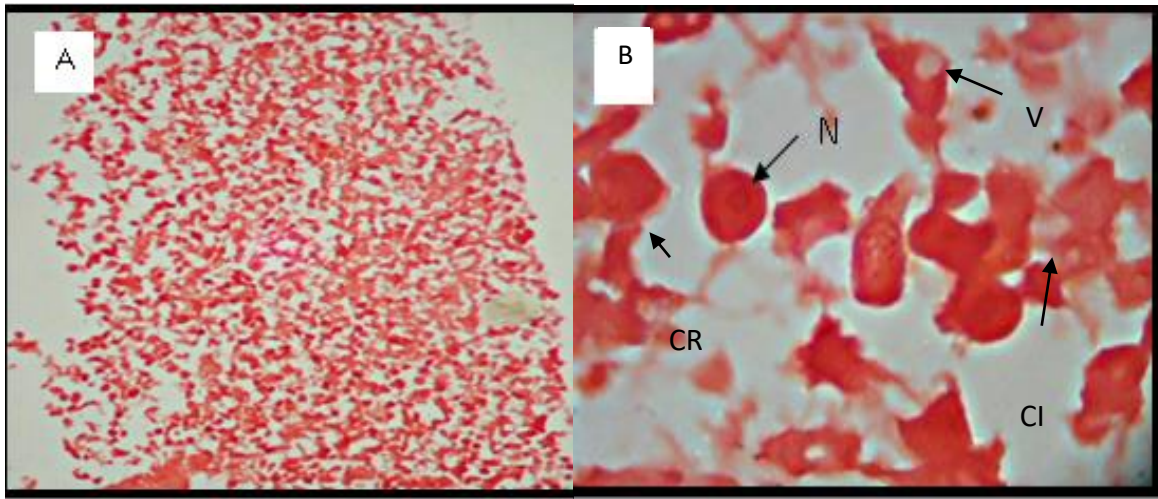


Figura 15. Corte transversal del cultivo en micromasas de Células epiteliales de la membrana amniótica humana en medio control. Coloración Von Kossa. A). Panorámica donde se observa una tonalidad roja homogénea en toda la superficie del corte evidenciándose una reacción negativa con el colorante indicándonos que no hay presencia de depósitos de calcio. 100X. B) Aquí se observa que las células presentan una morfología variada, con células redondeadas (CR), con núcleo (N) esférico central, con presencia de vacuolas (V) y células con citoplasma irregular que forman una especie de red (CI). En esta condición no se evidenciaron depósitos de calcio 1000X.

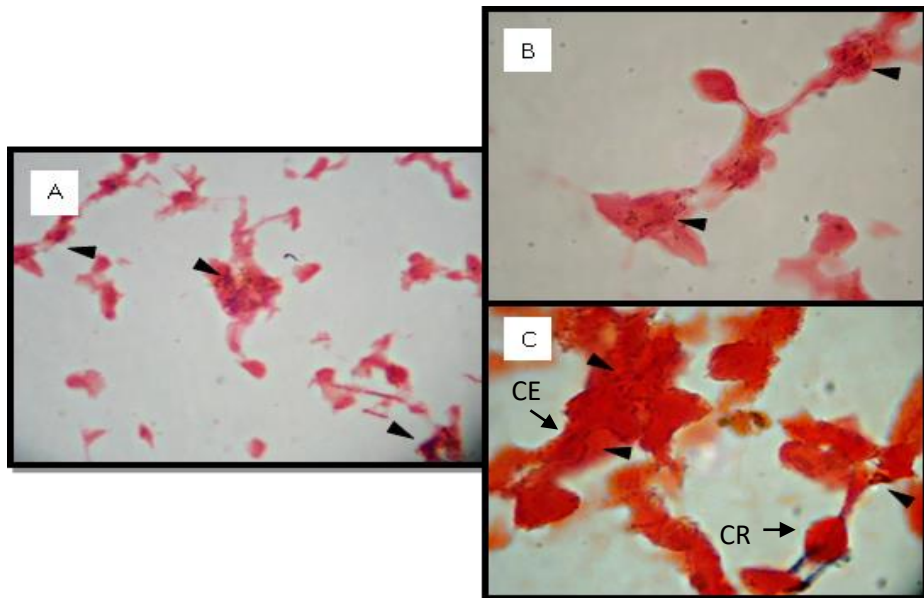


Figura 16. Corte transversal del cultivo en micromasas de Células epiteliales de la membrana amniótica humana mantenidas en medio osteogénico. Coloración Von Kossa. A y B). Panorámica de las micromasas donde se observan células de color rojo intenso y mineralización de la matriz. 100X y 400X. C) Aquí se puede observar células con morfología alargada e irregular (CE) y células redondeadas (CR), Así mismo se observan depósitos de calcio entre las células teñidos de negro (►) 1000X.

- **Evaluación inmunohistoquímica**

Como se mencionó previamente, para caracterizar la inducción hacia los linajes osteocondrogénicos se realizó una inmunotinción con los anticuerpos anti-colágeno tipo II para la inducción condrogénica y anti-fosfatasa alcalina para la inducción osteogénica.

En la figura 17 se muestra el cultivo control donde, no se observó reacción con el anticuerpo.

En la figura 17C se pudo observar que las células tienen una morfología principalmente de tipo poligonal, con núcleo esférico granular y céntrico, y además se pueden apreciar algunas células con vacuolas. A diferencia de éste, en los cultivos mantenidos en medio condrogénico, si se observó reacción con el anticuerpo (Figura 18). En el corte se distinguen dos regiones diferentes según la respuesta al anticuerpo. La región periférica en la cual se observan zonas con un marcaje intenso y la región central donde se pudo apreciar una baja intensidad de marcaje (Figura 18A y 18B respectivamente), además se observa como las células se distribuyen en grupos por toda la superficie del corte. En la figura 18C se presenta un grupo celular con una reacción muy intensa lo cual indica la presencia de colágeno tipo II en esa zona, sin embargo, no se puede distinguir la morfología de las mismas.

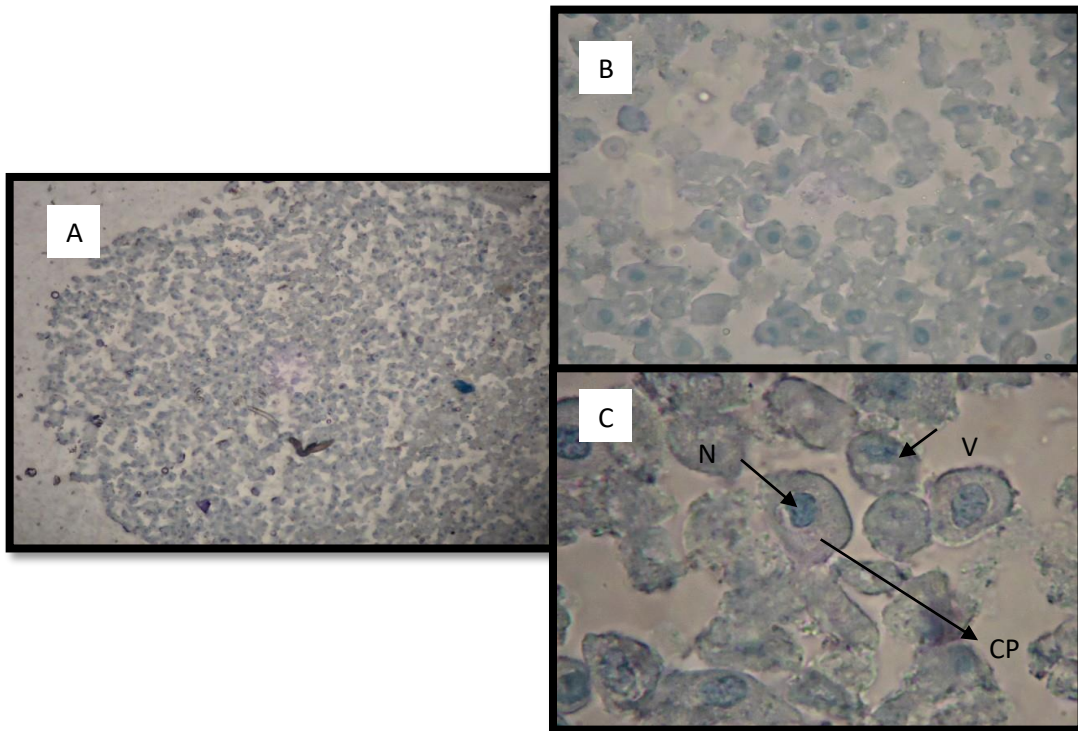


Figura 17. Corte transversal del cultivo en micromasas de Células epiteliales de la membrana amniótica humana en medio control. Inmunohistoquímica anti colágeno tipo II. A y B). Panorámica de las micromasas donde se observan células coloreadas de una tonalidad azul uniforme sin regionalización y sin reacción positiva al anticuerpo. 100X y 400X. C. Detalle de la coloración donde se aprecia la morfología de las células tipo poligonal con núcleo esférico granular en el centro de la célula, y algunas células presentan vacuolas. 1000X

En la inducción hacia el linaje osteogénico, en el control (Fig. 19), no se observó reacción con el anticuerpo. Allí se pueden observar las células distribuidas principalmente en la periferia de la micromasa. A mayor aumento vemos que las células mantienen su morfología poliédrica con un núcleo central. A diferencia del control, los cultivo mantenidos en medio osteogénico presentaron un marcaje positivo en toda la superficie del agregado (Figura 20A). Sin embargo se produjo una mayor intensidad de reacción en la región periférica de las micromasas.

En la figura 20C y 20D se pueden observar grupos celulares con morfología un tanto diferente; la fig. 20C las células forman cúmulos y son poligonales con núcleos centrales y con una forma irregular mientras que en la fig. 20 D, las células se ubican de manera lineal y tienen una forma poligonal-alargada con un núcleo central y un tanto aplanado semejante a los osteoblastos. En ambos casos, se observa un intenso marcaje con la fosfatasa alcalina en la matriz extracelular.

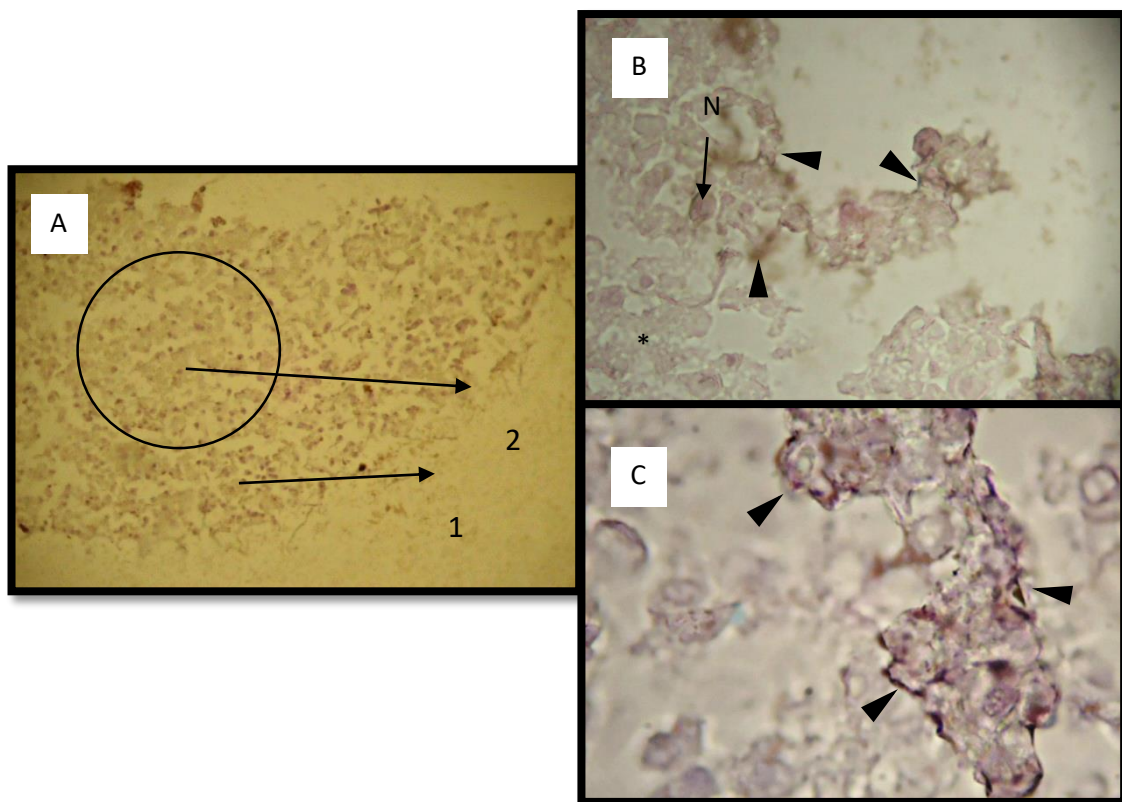


Figura 18. Corte transversal del cultivo en micromasa de Células epiteliales de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas mantenidas en medio condrogénico. Inmunohistoquímica anti colágeno tipo II. A. Panorámica de las micromasas en la que se distinguen dos regiones diferentes: 1) Periférica y 2) Central. 100X. B. En la región periférica se observan las células con gran intensidad de marcaje señaladas con la flecha (►) indicando la presencia de colágeno tipo II en esta área. En la región central la reacción fue menor (*). 400X. C. Detalle de un grupo celular teñido de color marrón en la periferia de las células señalando una expresión intensa en esa zona. 1000X.

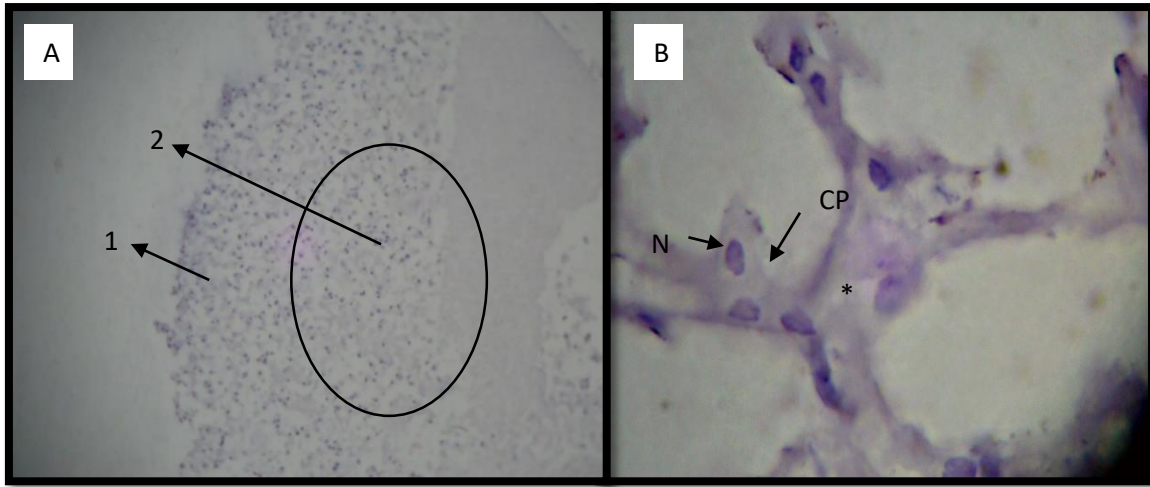


Figura 19. Corte transversal del cultivo en micromasa de Células epiteliales de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas mantenidas en medio control. Inmunohistoquímica Fosfatasa alcalina. A. Panorámica donde se distinguen dos regiones 1) Periférica donde se observan las células y 2) Central donde no se aprecian células. 100X. B. Detalle de un grupo de células con morfología poligonal con gran matriz citoplasmática (*), núcleos (N) ovalados granulares ubicados en el centro. 1000X

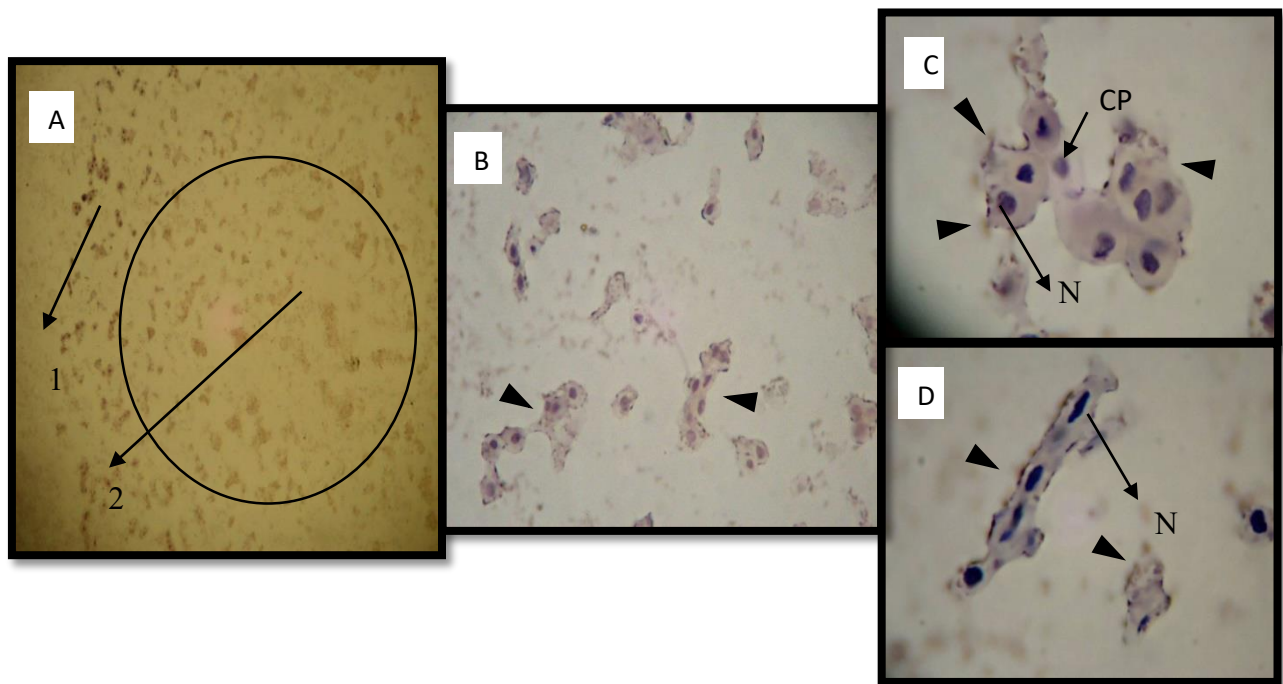


Figura 20. Corte transversal del cultivo en micromasa de Células epiteliales de la membrana amniótica humana inducidas en micromasas mantenidas en medio osteogénico. Inmunohistoquímica Fosfatasa alcalina. A y B). Panorámica de las micromasas en la que se aprecian dos regiones diferentes: 1) Periférica y 2) Central. La región periférica presenta un marcaje intenso de color marrón y un marcaje de menor intensidad en el área central. 100X y 400X. C. Detalle de un grupo de células con morfología poligonal (CP), núcleos (N) esféricos granulares ubicados en el centro. Se distinguen células con marcaje positivo señalado por la flecha (►). 1000X D. Detalle de un grupo de células con morfología poligonal-alargado donde se puede observar núcleos ovalados céntricos y el marcaje intensamente positivo en el área periférica de las células. 1000X.

Para finalizar, y a manera de resumen, en la tabla 5 nos muestra los niveles de expresión de los distintos componentes identificados mediante los ensayos histoquímicos e inmunohistoquímicos en los sistemas tridimensionales (micromasas). En esta se puede apreciar que existe variación en la expresión, dependiendo del ensayo, entre las diferentes regiones que se observaron en las micromasas. Este nivel de expresión es una medida cualitativa la cual se expresó con cruces (+).

Tabla 5. Niveles de expresión de los diferentes componentes identificados mediante histoquímica e inmunohistoquímica.

Condición	Control		Condrogénico			Osteogénico	
	Periferia	Central	Periferia	Intermedia	Central	Periferia	Central
Regionalización Micromasa							
GAG carboxilados	-	-	+++	++	+	ND	ND
Proteoglicanos ácidos sulfatados	-	-	+++	+++	++	ND	ND
Carbonatos, fosfatos y oxalatos (Von Kossa)	-	-	ND	ND	ND	++	++
Colágeno tipo II	-	-	+++	++	+	ND	ND
Fosfatasa alcalina	-	-	ND	ND	ND	+++	++

Nivel de expresión: intensa (+++), moderada (++), bajo (+), ausente (-), no determinado (ND).

6. DISCUSIÓN

Hoy en día, el potencial de aplicación de las células madre incluye la reparación de defectos óseos y de cartílago en fracturas traumáticas, osteoartritis o artritis reumatoide. Estas condiciones han venido incrementado en toda la población indicando que existen necesidades médicas, sociales y económicas para el desarrollo de nuevas tecnologías en la ingeniería de tejidos y la medicina ortopédica. Los tratamientos para estas enfermedades son procedimientos quirúrgicos efectivos pero extremadamente invasivos trasplantes de condrocitos autógeno o alógeno (Brittberg y col, 1994; Moritoh y col, 2003), inserción de matrices artificiales y la administración de factores de crecimiento (Ross y Pawlina, 2015). Por lo que, en los últimos años se ha intensificado la búsqueda de nuevas fuentes de células madre con potencial terapéutico para el tratamiento de las mismas. Entre estas nuevas fuentes se ha prestado mucha atención a los diversos tipos de células que se pueden aislar de la placenta, que ahora se reconoce como una fuente rica y abundante de células madre pluripotentes y multipotentes. El tejido gestacional ofrece ventajas considerables sobre otras fuentes de células madre: un potencial ilimitado, fácil acceso a dichos tejidos, mínimas barreras éticas y legales asociadas con su uso, se pueden obtener sin la necesidad de un procedimiento invasivo y, lo que es más importante, no son tumorigénicas y tienen propiedades inmunomoduladoras (Antoniadou y David, 2015; Matikainem y Laine, 2005; Maymó y col, 2018)

En este trabajo nos planteamos estudiar el aislamiento y establecimiento de las células epiteliales de la membrana amniótica y evaluar su capacidad de proliferación, características

morfológicas y el potencial de diferenciación hacia los linajes condrogénicos y osteogénicos bajo dos sistemas de cultivo “*in vitro*”.

Para el aislamiento de las CEAs se realizó una digestión enzimática con la enzima Dispasa II y una remoción mecánica. Esta es una proteasa neutra muy utilizada en procesos de denudación de la membrana amniótica debido a su bajo grado de toxicidad y a su alta especificidad por la fibronectina y el colágeno IV, lo que la hace particularmente adecuada para separar adherencias epitelio-mesenquimáticas, tal como la de la membrana amniótica (Hopkinson y col, 2008).

Con esta metodología se logró obtener una remoción completa de la capa epitelial, lo cual fue evidenciado mediante técnicas histológicas (resultados no mostrados) y un rendimiento celular promedio de 41.52×10^6 células por membrana amniótica procesada, con una viabilidad aproximada del 80.88%. Lo cual indica una mejora en el rendimiento, al comparar con resultados previos de nuestro laboratorio donde con una metodología semejante, se obtuvo en principio un promedio de 6×10^6 células por amnios (Navarro, 2013) y posteriormente 16×10^6 células por amnios (Nieves 2018). Además, estos resultados coinciden con los reportados por varios investigadores los cuales, han obtenido entre 10 y 60 millones de células por membrana amniótica procesada con viabilidades mayores al 70% (Bilic y col, 2008; Ilancheran y col, 2009). Sin embargo, otros autores han reportado un rendimiento mayor, entre 80-300 millones de células por amnios con viabilidades mayores al 80% (Miki y col, 2005; Lange-Consiglio y col, 2011, García, 2012; Motedayyen y col, 2017; Gottipamula y Sridhar, 2018; Muttini y col, 2018), con metodologías de aislamiento que combinan tripsinización, tratamiento con dispasa y remoción mecánica de las células.

Cuando revisamos la tabla 4 se observó una variabilidad en el rendimiento y viabilidad de cada membrana procesada. Esto es, que a medida que se fueron realizando más procesamientos, la cantidad de células epiteliales obtenidas fue aumentando. Siendo el mayor rendimiento celular alcanzado en las muestras 2 y 3, sin embargo, en éstas la viabilidad celular fue menor al promedio; lo cual podría explicarse por el hecho de que durante los primeros tres procesamientos, la membrana amniótica fue sometida a largos periodos de incubación con la enzima Dispasa II (mayores de 16 horas). Esto coincide con lo propuesto por varios autores quienes señalan que al aumentar el período de digestión, aumenta el rendimiento celular, no obstante reduce la viabilidad celular y también la pureza celular debido a la contaminación con las células mesenquimales subyacentes. (Hennerbichler y col, 2007; Tabatabaei y col, 2013). Otra explicación de esta variabilidad tanto en la cantidad de células como en la viabilidad, es que esto puede deberse también, a las características particulares de cada placenta; entre las cuales podemos mencionar el tamaño y calidad de la placenta, el tiempo de gestación, la edad de la madre y otros factores como las condiciones de transporte, hielo insuficiente o sangre residual tal como lo propone Motedayyen, (2017).

Un factor crítico que influye en el establecimiento y la proliferación del cultivo primario de las CEAhS es la densidad celular. En este sentido, la densidad utilizada en este trabajo, fue entre $(3- 3.5) \times 10^6$ células por frasco de cultivo, con la cual se obtuvo una buena proliferación celular. Miki y col, (2005) y Díaz-Prado y col, (2010) exponen que este tipo celular no prolifera bien a bajas densidades ya que acelera el proceso de senescencia y muerte celular. Así mismo, Bilic y col, (2008) señalan que la cantidad de siembra mínima requerida para la proliferación celular de los cultivos primarios y su amplificación es de 1.75×10^5 células/mL, mientras que Navarro, (2013) y Nieves, (2018) observaron que la mejor densidad de siembra

fue de 5×10^6 cel/mL. Estas altas densidades garantizan la activación de genes ligados a la proliferación y mecanismos moleculares complejos que involucran integrinas, receptores del EGF y la interacción célula – célula (Miki y col, 2005 y Freshney, 2010). Adicionalmente se ha reportado que para que las células tipo epiteliales se adapten, proliferen y se diferencien de manera “*in vitro*” requieren la presencia de determinadas sustancias que favorezcan estos procesos, tales como un sustrato de cultivo semisólido de colágeno o gelatina, los cuales simulan la condiciones intercelulares que se expresan en el tejido nativo.

En esta investigación las condiciones “*in vitro*” proporcionadas a las CEAhS fueron favorables para el establecimiento y mantenimiento de los cultivos, ya que se pudo observar células con morfología poligonal característica de este tipo celular, proliferando y formando colonias similar a lo reportado por varios trabajos establecidos a partir de células epiteliales provenientes de la membrana amniótica de humanos (Miki, 2005; Bilic y col, 2008; Díaz-Prado y col, 2010; Gottipamula y Sridhar, 2018), ratones (Nakajima y col, 2001; Marcus y col, 2008), Caballos (Lange-Consiglio y col, 2011) y felinos (Rutigliano, 2013). Aun cuando en los cultivos primarios se apreció una gran proporción de células con morfología poligonal, es importante señalar que desde las etapas iniciales se pudo observar una heterogeneidad celular, caracterizada por la presencia de células con morfología fusiforme tipo fibroblasto y células con amplio volumen citoplasmático semejante a lo obtenido por Navarro (2013) y Nieves, (2018) . Esta heterogeneidad ha sido estudiada por Parolini y col, (2008) quienes sugieren que podría tratarse de subpoblaciones celulares que expresan diferentes marcadores de superficie. Bilic y col, (2008); Díaz-Prado y col (2011) y Gramignoli, (2016) sugirieron que esta heterogeneidad resulta de la liberación de células mesenquimales a través de la acción enzimática y mecánica en el proceso de aislamiento y que los distintos tipos celulares

encontrados conservan las características histológicas de la membrana amniótica y una estrecha relación entre un tipo celular con otro. Adicional a esto, Mathieu y col, (2012) señalan que estas diferencias morfológicas pueden deberse a una respuesta al microambiente circundante, produciendo cambios en la organización del esqueleto por la elasticidad y motilidad celular, mientras que Centurione, (2018) indica que dependen de las diferentes áreas de la MA de las cuales han sido aisladas. Explicando que las células aisladas situadas cerca al cordón umbilical muestran más diferencias morfológicas en comparación a las otras, ya que en ellas los núcleos se encontraban posicionados excéntricamente, y ocasionalmente se encontraban células en gemación o desprendiéndose.

Por otro lado, diferentes investigadores han señalado la importancia del factor de crecimiento epidermal (EGF) en los medios de cultivo para el establecimiento de las células epiteliales ya que, este es esencial para la proliferación y progresión del ciclo celular así como para la expresión de genes pluripotenciales, epiteliales y neuronales. (Miki, 2005; García, 2012 y Gottipamula, 2017). En esta investigación los cultivos de CEAhS se mantuvieron en ausencia de EGF, obteniéndose un 80% de confluencia entre los 7 y 14 días de cultivo, a diferencia de lo reportado por Fatimah y col, (2012) quienes observaron que en ausencia de EGF el crecimiento de las CEAhS se detuvo con solo 50 a 60% de confluencia después de 7 días de cultivo. En presencia de EGF Miki, (2005) y Navarro (2013) obtuvieron la confluencia del cultivo entre los 5 y 7 días. No obstante y aun cuando empleó el factor EGF, Nieves (2018) observó la confluencia de los cultivos entre los 12 y 14 días de cultivo. Todo esto nos indica que pese a que se ha señalado la importancia de suplementar los medios de cultivo con el factor de crecimiento epidermal, no es esencial en el mantenimiento del cultivo de estas

células, y esto puede ser debido a que las propias células lo están produciendo de manera autocrina.

En referencia a los subcultivos, las CEAhS mantenidas hasta el primer pasaje conservaron las mismas características de los cultivos primarios, es decir, subpoblaciones diferenciadas y una marcada proliferación celular sin rasgos aparentes de senescencia similar a los reportados por Bilic y col, (2008) y Gotipamula y Sridhar (2018) los cuales indican que la morfología y el fenotipo inicial es retenido hasta el sexto pasaje.

Actualmente, existen muy pocas publicaciones que describan la cinética de crecimiento de las células epiteliales amnióticas. En esta investigación se realizó una curva de crecimiento de las CEAhS, donde se observó un patrón de crecimiento típico de células mantenidas “*in vitro*” con una fase de latencia inicial, una fase de crecimiento exponencial la cual comenzaba a partir del cuarto día de cultivo y una fase de saturación; estos resultados concuerdan con los ensayos reportados por Lange-consiglio y col, (2011) quienes obtuvieron el comienzo de la fase de crecimiento de las CEAhS entre los 4 y 6 días de cultivo y con los reportados para las células mesenquimales amnióticas (López, 2014) sugiriendo que bajo ciertas condiciones “*in vitro*” las características biológicas tanto de las células epiteliales como las mesenquimales son similares en cuanto a su crecimiento.

Además de la caracterización por microscopia de contraste de fases descrita previamente, se evaluó las características tintoriales de las CEAhS y se evidenciaron los componentes ácidos y básicos de las estructuras celulares y se corroboró la presencia de los tres fenotipos celulares. Así mismo, se observó la predominancia de las células con morfología poligonal en comparación a las otras subpoblaciones celulares similar a lo reportado por otros autores,

en la membrana amniótica humana y de felinos (Miki y col 2005; Ilancheran y col, 2009; Gottipamula, 2017, Rutigliano y col, 2013).

La coloración basófila presente tanto en las células poligonales como en el área perinuclear en las células con amplio volumen citoplasmático y en todo el citoplasma de las células con morfología tipo fibroblasto podría estar indicando el aumento en la cantidad de retículo endoplasmático rugoso que se asocia con la síntesis proteica según lo reportado en Ross y Pawlina, (2015), además estudios previos señalaron una gran cantidad de organelos en las CEAhS como retículo endoplasmático desarrollado, aparato de Golgi definido, mitocondrias y vesículas picnóticas corroborando lo señalado anteriormente (Marrenco y Del Vecchyo, 2006 citado en Navarro, 2013).

Además de la caracterización histoquímica, en este estudio se realizó una caracterización inmunocitoquímica, en la cual se empleó el anticuerpo en contra de pancitoqueratina, sin embargo no se produjo una reacción positiva, lo cual posiblemente se debió a problemas con el anticuerpo primario, ya que en un estudio previo (Navarro, 2013) se demostró una alta expresión de esta proteína después de varios días de cultivo confirmando así, la naturaleza epitelial de este tipo de células y la mínima presencia de contaminación con otro tipo celular, tal como reportan distintos investigadores (Ochsenbein, 2003 Miki y col, 2005; Wang, 2012; Koike y col, 2014; Gottipamula, 2017).

Con el fin de analizar la potencialidad hacia los linajes óseo-condrogénicos de las CEAhS se ensayó la acción de varios factores de inducción usando dos estrategias de cultivo diferentes, los cultivos en monocapa y micromasa. En los cultivos en monocapa las células crecen adheridas sobre un soporte sólido (plástico o vidrio) como pre-requisito para la proliferación celular. Este sistema de cultivo tiene ventaja en cuanto a su cuantificación y caracterización, pero carecen de la presencia de las interacciones célula-célula y célula-matriz que ofrecen

otros tipos de cultivo (Freshney, 2010) mientras que los sistemas tridimensionales en micromasa, simulan un microambiente análogo al que se encuentra en condiciones “*in vivo*” promoviendo las interacciones célula-célula y célula-matriz. Este se caracteriza por mantener un cultivo estable y libre de biomateriales y se ha vuelto el más frecuente en los estudios para la rediferenciación de condrocitos así como para los estudios “*in vitro*” de diferenciación de las células de la membrana amniótica. (Miki y col, 2005; Bilic y col, 2008; Watts y col, 2013; Borghesi y col, 2017, Muiños y col, 2017).

En la inducción hacia el linaje condrogénico de las CEAhS en el cultivo en monocapa, en presencia de factores inductores, se produjeron algunos cambios morfológicos con respecto al cultivo control, entre los cuales podemos mencionar la forma redondeada de algunas células, la presencia de vacuolas y la posición del núcleo el cual es excéntrico, estos resultados son semejantes a los reportados en el laboratorio previamente, en CEAhS inducidas al linaje condrogénico por Nieves (2018) y a las observadas por López (2014) al inducir hacia el linaje condrogénico de las células mesenquimales de la membrana amniótica.

Así mismo, estas características son similares a las de los condrocitos maduros cultivados “*in vitro*” reportados por Aulthouse y col, (1989); Pineda, (2001); Borghesi y col, (2017).

Además, en el cultivo de CEAhS en monocapa se pudo evidenciar la formación de algunos agregados celulares en los cuales se demostró la producción de glucosaminoglicanos sulfatados y carboxilados principales componentes de la matriz extracelular del cartílago mediante histoquímica; esta formación de agregados celulares en el cultivo en monocapa también fue reportado en la inducción de las células epiteliales membrana amniótica de caballo por Lange-Consiglio y col, (2011) y en la inducción condrogénica de células mesenquimales derivadas del tejido adiposo de ratón Sandoval, (2012). La formación de

estos agregados semeja el inicio de la formación del cartílago “*in vivo*”. Pues como se sabe, durante el desarrollo embrionario del cartílago, las células mesenquimales se someten a un proceso complejo que consiste en la condensación celular, proliferación y diferenciación y para que esto ocurra es necesario las interacciones célula-célula, célula-matriz extracelular altamente organizadas, estímulos de activación mecánica y factores de crecimiento y de transcripción como SOX-9 para que se lleve a cabo la diferenciación celular hacia el cartílago (Wang y col, 2009).

Al comparar estos resultados con los controles, se demostró que las condiciones brindadas para los cultivos control no son suficientes para inducir la diferenciación hacia los linajes de interés, indicando la necesidad de factores de diferenciación que generen cambios en la expresión génica de las células promoviendo la inducción hacia un fenotipo particular. (Jaiswal y col, 1997; Zuk y col, 2002; Pineda y Londoño, 2009).

Además de realizar la inducción de las CEAhs hacia el linaje condrogénico en el sistema en monocapa, se realizó la inducción hacia el linaje osteogénico, la cual fue evaluada mediante la coloración Von Kossa que nos permite detectar los depósitos de calcio (Wang, 2014). Al observar los resultados de la diferenciación de las células epiteliales amnióticas con el medio osteo inductor, se observaron algunos cambios morfológicos. Las células presentaron una forma poligonal un tanto irregular y aun cuando no se evaluó cuantitativamente, se pudo evidenciar un mayor tamaño en comparación con las CEAhs de los cultivos control. El núcleo de las células inducidas tenía una forma redondeada y estaban ubicados a nivel basal, además se observó un único nucléolo prominente, a diferencia de lo observado en las células del control. Con base a estos rasgos se sugiere que las células tienen característica de osteoblastos. Varios investigadores han señalado que los cultivos de monocapa de los

osteoblastos humanos sembrados a baja densidad muestran una morfología plana y fibroblástica (Lian y Stein, 1992, López, 2014) pero que durante la activación y la diferenciación de los pre-osteoblastos a los osteoblastos maduros se forman cambios morfológicos celulares evidentes como una morfología cuboidal o poligonal (Aubin y Liu, 1996) semejante a lo observado en este trabajo.

Los osteoblastos son las células encargadas de sintetizar y secretar fibras de colágeno y otros componentes orgánicos necesarios para formar la matriz del tejido óseo, además de iniciar el proceso de calcificación (Fernández y col, 2006). En relación a esto, se observó en los cultivos inducidos, la presencia de depósitos de calcio en la MEC, lo cual indica que la matriz extracelular esta mineralizada, siendo esto, considerado el marcador fenotípico terminal de la vía de diferenciación (Jaiswal y col, 1997). Esos depósitos de calcio observados en la inducción osteogénica pueden ser resultado a la acción del β -Glicerolfosfato incluido al medio de cultivo osteogénico, ya que es un fosfato orgánico que debido a su capacidad de estimulación de la calcificación de las células “*in vitro*”, induce la formación de calcio y por ser un sustrato de la fosfatasa alcalina ósea, produce un incremento de fosfatos inorgánicos en el medio los cuales serán luego convertidos en cristales de hidroxiapatita que producen la mineralización (Hamade y col, 2003).

Diversos autores señalan que a partir de tres semanas se produce un incremento en la expresión de genes relacionados con osteoblastos y deposición de calcio. (Miki, 2005; Ilancheran y col, 2007, 2012; Lange-Consiglio y col, 2011; Di Germanio, 2016). En relación a la deposición de calcio en nuestros resultados, podemos decir que después de tres semanas fueron observados estos depósitos en los cultivos inducidos.

Es importante mencionar que según Díaz - Prado y col, (2010) los cultivos “*in vitro*” de las CEAhS a medida que aumentan los pasajes reducen significativamente el potencial

osteogénico. Por lo cual en nuestra investigación se emplearon células del primer pasaje, observando entonces que las mismas muestran un buen potencial osteogénico como lo evidencian los resultados.

A diferencia de los cultivos en monocapa el modelo de cultivo en micromasa se ha aplicado durante varios años para mejorar la condrogénesis “*in vitro*” de condrocitos primarios o células progenitoras de hueso derivadas de médula ósea, de las células mesenquimales del estroma de la MAH, de fluidos amnióticos y de células epiteliales de la membrana amniótica (Johnstone y col, 1998; Murdoch y col, 2007; Alviano y col, 2007; Ullah y col, 2010; López, 2014; Muiños, 2017; Zuliani y col, 2018; Díaz-prado, 2010).

En este estudio se logró una mayor diferenciación hacia ambos linajes empleando el sistema en micromasas, lo cual fue demostrado por la marcada presencia de proteoglucanos, GAGs y colágeno tipo II en la inducción condrogénica y depósitos de calcio, y fosfatasa alcalina en la inducción osteogénica; evidenciados mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas además, y al igual que en la inducción en el modelo en monocapa se pudo observar variaciones a nivel morfológico, los cuales fueron más marcados. Es importante señalar que al evaluar histológicamente las micromasas en la inducción condrogénica se observó diferentes patrones de regionalización de la expresión de los distintos componentes determinados. Observándose una mayor producción de componentes de matriz cartilaginosa como los GAGs carboxilados y los proteoglicanos y colágeno tipo II en la periferia del agregado celular, mientras que a medida que nos acercamos a la parte central de la micromasa se observó una disminución en la producción de los mismos. Esta distribución de los diferentes componentes de la matriz cartilaginosa en los cultivos en micromasas inducidos, nos indica que el proceso de diferenciación celular se produjo más

fácilmente en el exterior de las micromasas que en la región central, tal vez debido a la mayor interacción de las células con los componentes inductores presentes en el medio y que es probable que el suministro de nutrientes no fuera uniforme dentro de las micromasas, ya que en esta región central se pudieron apreciar algunos núcleos picnoticos. Tare y col, (2005), Estes y col, (2010) y Murdoch y col, (2007) plantearon que las micromasas crecen como una esfera con un aumento continuo en el área de la superficie por lo que es probable que las fuerzas de tracción creadas en la superficie se hayan transmitido a las células y hayan causado una respuesta que provocara un aumento en la producción de colágeno de tipo II y su alineación en la zona periférica de las micromasas (Ullah y col, 2010) lo que podría explicar lo observado en el presente trabajo.

A pesar de la poca diferenciación en la región central de las micromasas, podríamos decir que la estrategia de cultivos tridimensionales generan un entorno análogo al del cartílago nativo simulando la condensación temprana de células madre mesenquimales durante la embriogénesis antes del inicio de la condrogénesis y la producción de la matriz extracelular por los condrocitos, mejorando significativamente la expresión del colágeno tipo II y del factor condrogénico principal SOX9 (Hoogewerf y col, 1997; Kuschert y col, 1999 y Battistelli y col, 2005). Se sabe que un microambiente tridimensional o hipóxico, permite el mantenimiento del fenotipo de condrocitos y la promoción de la síntesis de MEC. Además, se ha demostrado que, cuando los condrocitos se cultivan en el sistema de micromasa en condiciones hipóxicas, la expresión de agregan se mejora en comparación con la del sistema de cultivo de monocapa (Ito y col, 2015). Según esto y según nuestros resultados podríamos decir que este sistema también promueve la síntesis de la MEC cartilaginosa en las células epiteliales inducidas hacia el linaje condrogénico.

Al evaluar la diferenciación osteogénica en las micromasas se determinó la presencia de depósitos de calcio en toda la superficie de esta, indicando la mineralización de la matriz extracelular, asimismo, se observaron cambios a nivel morfológico pudiendo observar dentro de las micromasas células con forma redondeada o poligonal además de células con una morfología alargadas e irregular. Igualmente, se determinó la expresión de la fosfatasa alcalina, observándose que hay una mayor expresión en las zonas periféricas de la micromasa. La fosfatasa alcalina es una enzima localizada en las vesículas de la matriz extracelular, inicia la mineralización en la superficie de estas vesículas y es utilizada como uno de los principales marcadores bioquímicos para demostrar la actividad osteoblastica de las células, esta hidroliza fosfatos orgánicos para liberar fosfatos inorgánicos al sitio de mineralización de dichas células. (Hamade y col, 2003). Estudios con células de la MAH señalan expresión en la actividad de fosfatasa alcalina y características morfológicas similares a las de osteoblastos humanos (Docheva y col, 2008). Lian y Stein, (1992) y Aubin y Liu, (1996) expresaron que los osteoblastos tempranos muestran una alta actividad de FA, mientras que posteriormente los osteoblastos más maduros, así como los osteocitos, se caracterizan por una actividad de FA nula o débil. Al igual que Jahn y col, (2010) hemos encontrado una alta actividad de la fosfatasa alcalina (FA) en la capa superficial de las micromasas pero a diferencia de estos autores quienes encontraron que la actividad de esta enzima fue negativa, observamos las células más centrales una menor actividad fosfatasa alcalina, esto sugiere que las células en la población central se encontraban en una etapa posterior de diferenciación osteoblasto/osteocito temprano, mientras que los osteoblastos de superficie se caracterizaron por poseer un fenotipo mucho más temprano,

Lian y Stein, (1992) indicaron que la diferenciación de osteoblastos pasa por 3 fases: proliferación, maduración de la matriz y mineralización de la matriz. Al observar las células inducidas a este linaje se sugiere que las células pasaron por estas tres etapas celulares ya que las mismas experimentaron cambios morfológicos, una alta expresión de la actividad de la fosfatasa alcalina y la maduración de la MEC por medio de la presencia de depósitos de calcio.

En general al comparar los dos sistemas de cultivo pudimos observar que la utilización de un sistema tridimensional induce una mayor diferenciación de las células epiteliales de la membrana amniótica hacia los linajes osteogénico y condrogénico lo cual puede ser debido a la alta densidad celular, la baja tensión de oxígeno y la interacción célula-célula, siendo análogo a lo que ocurre en el cultivo de cartílago hialino (Kanichai y col, 2008; Takagi y col, 2007).

7. CONCLUSIONES

- La combinación del tratamiento enzimático y mecánico permitió el aislamiento de una mayor cantidad de las células epiteliales y la viabilidad de las mismas se pudo mejorar al disminuir el tiempo de la digestión enzimática.
- El suministro del factor de crecimiento epidermal (EGF) a los cultivos de las CEAhs, no es indispensable para el establecimiento y mantenimiento de estas células como se ha señalado, ya que aun cuando no se les suministró, los cultivos mostraron una cinética de crecimiento típica de los cultivos in vitro, y alcanzaron la confluencia un rango de tiempo entre 7 y 14 días semejante a lo reportado por otros autores.
- La heterogeneidad presente en los cultivos primarios y subcultivos de las células epiteliales amnióticas humanas nos sugiere la existencia de subpoblaciones celulares con características del tejido de origen.
- Las células epiteliales de la membrana amniótica presentan un alto potencial osteocondrogénico ya que se logró inducirlas hacia estos linajes tanto en el sistema en monocapa como en el sistema en micromasas, siendo este último el más adecuado ya que en este se observó una mayor diferenciación evidenciado por la producción de distintos componentes de la matriz extracelular típico de estos linajes.
- En vista de la potencialidad osteo-condrogénica que tienen las CEAhs y ya que estas son de origen ectodérmico, se sugiere que estas células podrían considerarse como pluripotentes

8. RECOMENDACIONES

- Ampliar los ensayos de caracterización celular incluyendo microscopia de fluorescencia y determinaciones inmunocitoquímicas con mayor número de marcadores específicos de superficie expresados por las células epiteliales, evaluándolas por medio de citometría de flujo entre otras técnicas.
- Realizar la inducción de los cultivos en monocapa por un periodo mayor de 17-21 días de cultivo.
- Ampliar los ensayos de evaluación de la diferenciación celular hacia los linajes osteogénico y condrogénico con otros factores solubles inductores reportados, tales como el BMP y TGF- β y ASP. Además usando otros métodos de diferenciación “*in vitro*” como co-cultivo y matrices tridimensionales de colágeno o gelatina.
- Evaluar el potencial de estas células hacia linajes de origen endodérmico

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alviano, F., Fossati, V., Marchionni, C., Arpinati, M., Bonsi, L., Franchina, M., Lanzoni, G., Cantoni, S. Y colaboradores. 2007. Term amniotic membrane is a high through put source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells. *In vitro. BMC. Dev. Biol.* **7**:11.
- An, C., Cheng, Y., Yuan, Q., Li, J. 2010. IGF-1 and BMP-2 induces differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes-like cells. *Ann Biomed Eng.* **38**: 1647-1654.
- Antoniadou E., David, AL. 2015. Placental stem cells. *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynecol.* **31**:13-2.
- Aquino, C., Santa, F. 2008. Citoqueratinas en dermatología. *Rev. Mex.* **52(6)**: 254 – 256.
- Araos., C. 2009. Cultivo de células madre mesenquimales del cordón umbilical humano. Potencialidad ósteo-condrogénica “*in vitro*”. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

- Aubin, J.E., Liu, H. Bone stem cell. 1998. *J. Cell. Biochem suppl.*30-31:73-82
- Aulthouse, AL., Beck, M., Griffey, E., Sanford, J., Arden, K., Machado, MA., Horton, WA. 1989. Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol.* 25(7):659-68.
- Bailo, M., Soncini, M., Vertua, E., Signoroni, PB., Sanzone, S., Lombardi, G., y col. 2004. Engraftment potential of human amnion y chorion cells derived from term placenta. *Transplantation*; **78**:1439e48.
- Baksh, D., Yao, R., Tuan, R.S. 2007. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells.* **25**: 1384-1392.
- Bancroft, J., Gamble, M. 2008. Theory and practice of histological techniques. Elsevier Health Sciences. Sexta Edicion, Philadelphia, Pennsylvania, E.U.A.
- Battistelli M, Borzì RM, Olivotto E, Vitellozzi R, Burattini S, Facchini A, Falcieri E. 2005. Cell and matrix morpho-functional analysis in chondrocyte micromasses. *Microsc Res Tech.* 67(6):286-95.

- Becerra, J. 2006. Terapia Celular e Ingeniería Tisular para la regeneración esquelética. *Acta Científica y Tecnológica*.(10)30-38
- Benirschke, K., Kaufman, P. 2000. Pathology of the human placenta. Editorial Springer, cuarta edición. New York, United States Of America.
- Beyer, N., Da Silva, L. 2006. Mesenchymal Stem Cells: Isolation *in Vitro* Expansion and Characterization. *Handb. Exp. Pharmacol.* **174**: 249-282.
- Bi, W., Deng, JM., Zhang, Z., Behringer, R., de Crombrugge B. 1999. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet.* 22(1):85-9.
- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., Gehron, P. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications. *Stem Cells.* **19**:180-192.
- Bilic, G., Zeisberger, S., Mallik, A., Zimmermann, R., Zisch, A. 2008. Comparative Characterization of Cultured Human Term Amnion Epithelial y Mesenchymal Stromal cells for Application in Cell Therapy. *Cell Transplantation.* **17**:955- 968
- Blaney, E.N., Van der Kraan, P.M., y Van den Berg, W.B. 2007. TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* (15) 597.

- Bonewald, L., Rosser, H., Dallas, S. L. Dallas, Camacho, N., Boskey, B. 2003. Von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcif Tissue Int.* **72**:537–547
- 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.
- Borisov N, Aksamitiene E, Kiyatkin A, Legewie S, Berkhout J, Maiwald T, Kaimachnikov NP, Timmer J, Hoek JB, Kholodenko BN. 2009. Systems-level interactions between insulin-EGF networks amplify mitogenic signaling. *Mol Syst Biol.* **5**:256
- Breen EC., Ignatz RA., McCabe L., Stein JL., Stein, G.S., Lian, J.B.1994.TGF beta alters growth and differentiation related gene expression in proliferating osteoblasts in vitro, preventing development of the mature bone phenotype. *J Cell Physiology.* **160**:323–335
- Brittberg, M., Lindahi, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isarsson, O y Perterson, L. 1994. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *J. Med.* **331**: 889-895.

- Burkitt HG, Young B, Heath JW. 1996. Wheater Histología Funcional. 4ª Ed. Churchill Communications Europe España, España. pp 334-65.
- Buschmann, M.D., Gluzband, Y.A., Grodzinsky, A.J., Kimura, J.H., y Hunziker, E.B. 1992. Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. *J Orthop Res.*(10) 745.
- Campos, Z., Gris, D. 2002. Aplicaciones de la membrana amniótica en patología ocular. *Annals.D`Oftamologia.*10 (3): 128 – 141.
- Causa, J., Vila, E. 2014. Factor de crecimiento epidérmico (egf): innovación y seguridad. *Med Clin (Barc).* 145(7):305-12.
- Centurione,L., Passaretta, F., Centurione, A., De Munari, S., Vertua, E., Silini,A., Liberati, F., Parolini,O., Di Pietro, R. 2018. Mapping of the human placenta: experimental evidence of amniotic epithelial cell heterogeneity. *Cell Transplantation.* 27(1) 12–22

- Cheng, S. Yang, J., Rifas, L., Zhang, F., Avioli, L. 1994. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexametasone. *Endocrinology*. **134**:277-286
- Choi, JJ., Yoo, SA., Park, SJ., Kang, YJ., Kim, WU., Oh, IH., Cho, CS. 2008. Mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-10 attenuate collagen-induced arthritis in mice. *Clin Exp Immunol*. 153(2):269-76.
- Danisovic, L., Varga, I. y Polák, S. 2012. Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Tissue and cell* **44**: 69–73.
- Davies, J., Hosseini, M. 2000. Histodinamics of endosseous wound healing. Davies JEed. Bone Engineering. Toronto.
- De Coppi, P., Bartsch, G., Siddiqui, M., Xu, T., Santos, C., Perin, L. y col. 2007. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for Therapy. *Nat. Biotechnol*. **25**: 100-106
- Dell'aquila, M and Gaffney, E. 1982. Growth of normal human amnion epithelial cells in serum-free médium. *Exp Cell Res*. **137**: 441-446.

- Díaz-Prado S., Muiños-López, E., Hermida-Gómez, T., Rendal-Vázquez, ME, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, Blanco FJ. 2010. Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J Cell Biochem.* **1;111(4):**846-57
- Díaz-Prado S, Muinos-Lopez E, Hermida-Gomez T, Cicione C, Rendal- Vazquez ME, Fuentes-Boquete I, Toro FJ de, Blanco FJ. 2011. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. *Differentiation.* **81:**162–171.
- 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, y senescence. *Oncotarget.* **7(26):** 39051-39064.
- Dobрева, M., Pereira, P., Deprest, J., Zwijsen, A. 2010. On the origin of amniotic stem cells: of mice y men. *Int. J. Dev. Biol.* **54:** 761-777.
- Docheva, D., Padula, D., Popov, C., Mutschler, W., Clausen-Schaumann, H., Schieker, M. 2008. Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy. *J Cell Mol Med.* **12(2):**537-52.

- Druchmaus, P., C. Freudenstein, J.-C. Wanson, L. Lanrem, T. W. Keenan, J. Stadler, R. Laloup, y W. W. Franke. 1978. Structure y biochemical composition of desmosomes and isolated from calf muzzle epidermis. *J. Cell BioL***79**:427-443.
- Dua, H., Gomes, J., King, A., Maharajan, V. 2004. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv. Ophthalmol.* **49**:51–77.
- Engler, AJ., Sen S., Sweeney, HL., Discher, DE. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.***126**: 677-689
- Eriksson, J., Dechat, T., Grin, B., Helfy, B., Mendez, M., Pallari, H., Goldman, R. 2009. Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest.***119**: 1763-1771.
- Estes BT, Diekman BO, Gimble JM, Guilak F. 2010. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nature Protoc.* **5**:1294-1311.
- Estrada, C., Paz, A., López, L. 2006. Ingeniería de tejido óseo:consideraciones básicas.*Eia, issn.* **5**:93-100.

- Fatimah, S., Tan, GC., Chua, KH., Tan, AE., Hayati, AR. 2012. Effects of epidermal growth factor on the proliferation and cell cycle regulation of cultured human amnion epithelial cells. *J Biosci Bioeng.* **114(2):**220-7
- Franceschi, R., Iyer, B., Cui, Y. 1994. Effects of ascorbic acid on matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cell. *J. Bone Miner. Res.* **9:**843-854
- Franke, W. W., E. Sclimid, S. Winter, M. Osboru, y K. Weber. 1979. Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates. *Exp. Cell Res.* **123:**252.
- Freshney, I. 2010. Culture of animal cells. A manual of basic technique. Editorial Wiley-liss, quinta edición. Toronto, Canadá.
- Fuentes, M. 2008. optimización del sistema de cultivo y caracterización de células madre mesenquimales obtenidas a partir de médula ósea humana. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

- Ganatra, M. 2003. Amniotic membrane in surgery. *J. Pak. Med. Assoc.* **53**: 29 – 32.
- Gao, L., McBeath, R., Chen, CS. 2010. Stem cell shape regulates a chondrogenic versus myogenic fate through Rac1 y N-cadherin. *Stem Cells.* 28(3):564–72.
- García, C. 2012. Aislamiento y caracterización de las células madre de la membrana amniótica. Una nueva fuente para la terapia celular e inmunomodulación. Tesis doctoral. Universidad de Murcia, España.
- García, J., Pico, P., Rojas, E. 2006. Temario. Técnico especialista en anatomía patológica. Editorial MAD, Volumen 2. País Vasco, España.
- Gartner, L., Hiatt, J. 1997. Libro de histología texto atlas. Primera edición. México. **P.P:** 114-120
- Geneser, F.2001. Histología. 3ª edición, Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
- Gholizadeh-Ghaleh, S., Pashaei-Asl,F., Fardiyazar, Z., Pashaiasl, M.2016. Isolation, characterization, cryopreservation of human amniotic stem cells and differentiation to osteogenic and adipogenic cells. *Plos one* 11(7): e0158281

- Ghosh K, Selokar NL, Gahlawat SK, Kumar D, Kumar P, Yadav PS. 2016. Amnion epithelial cells of buffalo (*Bubalus bubalis*) term placenta expressed embryonic stem cells markers y differentiated into cells of neurogenic lineage in vitro. *Anim Biotechnol.* 27(1):38–43.
- Gicquel J., Dua, HS., Brodie, A., Mohammed, I., Suleman, H., Lazutina, E., James, DK., Hopkinson, A.2009. Epidermal growth factor variations in amniotic membrane used for ex vivo tissue constructs. *Tissue Eng Part A.* 15(8):1919-1927.
- Gomes, J., Romano, A., Santos, M., Dua, H. 2005. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 16:233–240.
- Gómez, R. 2009. Human amniotic epithelial cells: isolation y characterization. Editorial Vvb Laufer Weiler, primera edición, Giessen, Alemania.
- Gonzalez, M. 2012. “Análisis de expresión génica del proceso condrogénico en células madre mesenquimales transducidas con vectores adenovirales con los factores IGF1 y FGF2. Trabajo especial de grado. Universidad autónoma de nuevo león.
- Gramignoli, R., Srinivasan, RC., Kannisto, K., Strom, SC. 2016. Isolation of human amnion epithelial cells according to current good manufacturing procedures. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* 37:1E.10.1-1E.10.13.

- Gronthos, S., Zannettino, A., Graves, S., Ohta, S., Simmons, Pj. 1999. Differential cell surface expression of the STRO-1 y alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone Miner Res.* **14(1)**:47-56.
- Gottipamula, S y Sridhar N. 2018. Large-scale Isolation, Expansion and Characterization of Human Amniotic Epithelial Cells. *Int J Stem Cells.***11(1)**: 87–95
- Guilak, F., Fermor, B., Gimble, M. 2003. Oxygen key switch transforming adult stem cells from fat into cartilage. *Clin. Orthop.* **412**: 196-212.
- Hamade, E., Azzar, G., Radisson, J., Buchet, R., Roux, B. 2003. Chick Embryo Anchored Alkaline Phosphatase and Mineralization Process *in Vitro.* *Eur. J. Biochem.* **270**: 2082-2090.
- Hao, Y., Ma, D., Hwang, D., Kim, W. y Zhang, F. 2000. Identification of antiangiogenic y antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* **19**: 348-352.
- Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F., Kageyama, R. 2004. Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the

nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development*. 131(22):5539-50.

- Hauschka PV1, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. 1989. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev*. **69(3)**:990-1047.
- Hennerbichler, S., Reichl, B., Pleiner, D., Gabriel, C., Eibl, J., Redl, H.2007. The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. *Cell Tissue Bank*. 8(1):1-8.
- Hering, T.M. 1999. Regulation of chondrocyte gene expression. *Frontiers in Bioscience*.**4**: 743-761.
- Ho, A., Wagner, W., Franke, W. 2008. Heterogeneity of Mesenchymal Stromal Cell Preparations. *Cytotherapy*. **14**: 320-330.
- Hoogewerf, AJ., Kuschert, GS., Proudfoot, AE., Borlat, F., Clark-Lewis, I, Power, CA., Wells, TN. 1997. Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry*. 4;36(**44**):13570-8

- Hopkinson A, Shanmuganathan VA, Gray T, Yeung AM, Lowe J, James DK, Dua HS. 2008. Optimization of Amniotic Membrane (AM) Denuding for Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods*,**14**:371-81.
- Ilancheran, S., Michalska, A., Peh, G., Wallace, E., Pera, M., Manuelpillai, U. 2007. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol. Reprod.***77**: 577 - 588.
- Ilancheran, S., Moodley, Y., Manuelpillai, U. 2009. Human Fetal membranes: A source of stem cells for tissue regeneration and repair. *Placenta*. **30**: 2-10.
- Insausti, C., Blanquer, M., Majado, M., Insausti, A., Moraleda, J. 2011. Utilidad terapéutica potencial de las células madre de la membrana amniótica. *Rev. Menatol. Mex.* **12(4)**: 276 – 286.
- Ito, A., Nagai, M., Tajino, J., Yamaguchi, S., Iijima, H., Zhang, X., Aoyama, T., Kuroki, H. 2015. Culture temperature affects human chondrocyte messenger RNA expression in monolayer and pellet culture systems. *Plos One*.**26**;10**(5)**:e0128082

- Jacques, C., Aquino, AM., Ramos, M., Silva, M. 2005. Cytokeratins and dermatology. *Skinmed*.**4**:354-60
- Jahn, K., Richards, R., Archer, C.W., Stoddart, M. 2010. Pellet culture model for human primary osteoblast. *Eur Cell Mater*. **20**: 149-161.
- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. *J. Cell Biochem***64**: 295-312.
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI y colaboradores. 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. **238**:265–272.
- Kafienah, W., Mistry, S., Dickinson, S., Sims, T., Learmonth, I y Hollander, A. 2007. Three-dimensional cartilage tissue engineering using adult stem cells from osteoarthritis patients. *Arthritis & Rheumatism*. *56(1)*:177-187
- Kanichai, M., Ferguson, D., Prendergast, PJ., Campbell, VA. 2008. Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: a role for AKT and hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha. *J Cell Physiol*. **216(3)**:708-15.

- Kaviani A, TE Perry, A Dzakovic, RW Jennings, MM Ziegler, DO Fauza. 2001. The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. *J Pediatr Surg.* **36**:1662
- Kim, H., Blanco, F. 2007. Cell death y apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets.* **8(2)**:333-45.
- Kirschstein, R., Skirboll, L. 2001. Stem cells: Scientific Progress and future research directions.
- Koike C, Zhou K, Takeda Y, Fathy M, Okabe M, Yoshilda T, y colaboradores. 2014. Characterization of amniotic stem cells. *Cell Reprogram.* **16**:299–305.
- Koolman, J., Röhm, K. 2005. Color Atlas of Biochemistry. Editorial Thieme, Segunda Edición. Augsburg, Alemania.
- Kuschert, GS., Coulin, F., Power, CA, Proudfoot, AE, Hubbard, RE, Hoogewerf, AJ, Wells, TN. 1999. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry.* **38(39)**:12959-68.

- Lange- Consiglio, A., Corradetti, B., Bizzaro, D., Magatti, M., Ressel, L., Tassan, S., Parolini, O. y colaboradores. 2011. Characterization y potential applications of progenitor- like cells isolated from horse amniotic membrane. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **6**: 622- 635.
- Lian, J.B., Stein, G.S., 1995. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *The Iowa Orthopaedic Journal* **15**, 118–140.
- Lin, RZ., Chang, HY. 2008. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol .J.* 1172-84.
- 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.
- 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.

- Lynch, M., Mellor, L., Stanley, R., y colaboradores. 1977. Métodos de laboratorio. Nueva Editorial Interamericana. Segunda edición. México.
- Ma, .Q, Liao, J., Cai, X. 2018. Different sources of stem cells and their application in cartilage tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther.* **13(7):**568-575.
- Mahmoudifar, N., Doran, P. 2012. Chondrogenesis and cartilage tissue engineering: the longer road to technology development. *Trends Biotechnol.* **30:** 166 – 176.
- Marcus AJ, Woodbury, D. 2008. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. *J Cell Mol Med.* **12:**730–742.
- Marenco, A., Vechyo, C. 2006. Cobertura temporal con membrana amniótica radio – esterilizada. *Cirugía Plástica.* **16(3):** 121 – 125.
- 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
- 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.

- Márquez M. L., Hernández A., Scioscia D., Merentes Elizabeth. 2012. Cultivo de células de cartílago nasal humano. *Gac Med Caracas*. **120(1)** : 48-54
- Mathieu, P y Lobo, E. 2012. Cytoskeletal and Focal Adhesion Influences on Mesenchymal Stem Cell Shape, Mechanical Properties, and Differentiation Down Osteogenic, Adipogenic, and Chondrogenic Pathways. *Tissue Eng Part B Rev*. **18(6)**:436-44.
- Matikainen, T., Laine, J. 2005. Placenta--an alternative source of stem cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. **207(2)**:544-9.
- Mattioli M, Gloria A, Turriani M, Mauro A, Curini V, Russo V, Tete S, Marchisio M, Pierdomenico L, Berardinelli P, Colosimo A, Muttini A, Valbonetti L, Barboni B: 2012. Stemness characteristics and osteogenic potential of sheep amniotic epithelial cells. *Cell Biol Int*.**36**:7–19
- Mauck, R y Tuan, R. 2009. Microenvironmental determinants of stem cell fate. *Fundamental of tissue engineering and regenerative medicine*. 647-663

- Maymó, J., Riedel, R., Pérez, A., Magatti, M., Maskin, B., Dueñas, J., Parolini, O., Sánchez, V., Varone, C. 2018. Proliferation and survival of human amniotic epithelial cells during their hepatic differentiation. *Plos one* 13(1): e0191489.
- McBeath, R., Pirone, D., Nelson, C., Bhadriraju, K., Chen, C. 2004. Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. *Developmental Cell.*(6) 483–495.
- Meyer, M., Merentes, E., Márquez, M. 2011. Aislamiento, Establecimiento y Caracterización del Cultivo de Células Madre Mesenquimales de la Membrana Amniótica. Congreso Estudiantil de Investigación y Desarrollo Científico. Caracas, Venezuela.
- Meyer, M. 2012. Establecimiento del cultivo de células madre mesenquimales de la membrana amniótica. Caracterización y diferenciación in vitro. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Miha, C., Miha, D., Costin, N., Ciucă, D., Şuşman, S., Ciorţea, R. 2008. Isolation and characterization of stem cells from the placenta and the umbilical cord. *Rom. J. Morphol. Embryo.* 49(4): 441 – 446.

- Miki, T., Lehmann, T., Cai, H., Stolz, D.B., Strom, S.C. 2005. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. **23**: 1549–1559.
- Miki, T., Strom SC. 2006. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Rev.* 2 (2):133-42.
- Miki T, Mitamura K, Ross MA, Stolz DB. 2007. Strom SC: Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J. Reprod. Immunol.* 75(2):91–96.
- Montuenga, L., Esteban, F., Calvo, A. 2009. *Histología y Biología Celular*. Editorial Elsevier Masson, Primera Edición. Barcelona, España
- Moore, R., Mansour, J., Redline, R., Mercer, B., Moore, J. 2006. The physiology of fetal membrane rupture: insight gained from the determination of physical properties. *Placenta*. **27**:1037-1051.
- Moritoh Y, Yamato E, Yasui Y, Miyazaki S, Miyazaki J. 2003. Analysis of insulin-producing cells during in vitro differentiation from feeder-free embryonic stem cells. *Diabetes*.**52**:1163–1168.

- Motedayyen,H., Esmaeil,N., Tajik,N., Khadem, F., Ghotloo,F., Khani,B., y Rezaei, A. 2017. Method and key points for isolation of human amniotic epithelial cells with high yield, viability and purity. *BMC Res Notes*.**10**:552.
- 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.
- Muiños-López, E., Hermida-Gómez, T., Fuentes-Boquete, I., Toro, G., Blanco, F., Díaz-Prado, S. 2017. Human Amniotic Mesenchymal Stromal Cells as favourable source for cartilage repair. *Tissue Engineering*. (**10**):4066.
- Muraglia, A., Corsi, A., Riminucci, M., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Bianco, P. Quarto, R. 2003. Formation of a chondro-osseous rudiment in micromass cultures of human bone-marrow stromal cells. *J.Cell. Sci*.**116**: 2949-2955.
- Murdoch,A., Grady, L., Ablett,A., Katopodi,L., Meadows, R., Hardingham, T. 2007. Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Stem Cells in Transwell Cultures: Generation of Scaffold-Free Cartilage. *Stem Cells*. **25**:2786–2796

- Muttini, A., Barboni, B., Valbonett., Russo, V., Maffulli, N. 2018. Amniotic Epithelial Stem Cells: Salient Features and Possible Therapeutic Role. *Sports Med Arthrosc Rev.* **26(2):**70-74.
- Nagy, A., Gócza, E., Merentes, E., Prideaux, V., Iványi, E., Markkula, M., Rossant, J. 1990. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development.* **110:** 815 – 821
- Navarro E. 2013. Membrana amniótica humana como fuente de células epiteliales y como biosustrato. Trabajo especial de grado de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Nakajima T, Enosawa S, Mitani T, Li XK, Suzuki S, Amemiya H, y colaboradores. Cytological examination of rat amniotic epithelial cells and cell transplantation to the liver. *Cell Transplant.* 2001;**(10):** 423–427.
- Nieves, D. 2018. Potencial condrogénico de las células epiteliales provenientes de la membrana amniótica humana. Trabajo especial de grado de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

- Niknejad, H., Peirovi, H., Jorjani, M. y col. 2008. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur. Cell Mater* **29**:88–99.
- Nogami, M., Tsuno, H., Koike C, y colaboradores. 2012. Isolation and characterization of human amniotic mesenchymal stem cells and their chondrogenic differentiation. *Transplantation*. 93(**12**):1221-1228.
- Oakes, B. 2004. Orthopaedic tissue engineering: from laboratory to the clinic. *Med J*. **180**:35-S38
- Ochsenbein, N., Bilic G, Hall H, Huch R, Zimmermann R. 2003. Inducing proliferation of human amnion epithelial and mesenchymal cells for prospective engineering of membrane repair. *J Perinat Med*. 31(**4**):287-94.
- Okita, j., Sagawa, L., Casey, M., and Snyder, J. 1983. A comparison of human amnion tissue and amnion cells in primary culture by morphological and biochemical criteria. *In vitro*. (**19**)2.
- Oldberg, A., Franzen, A., and Heingard, D. 1986. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) CDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 88:8819-8823.

- Osbourne, B., Golbsy, R., Kindt, T. 2007. *Inmunología de Kuby*. McGraw-Hill Interamericana. Sexta edición. USA.
- Parolini, O., Soncini, M., Signoroni, PB., Bailo, M., Zatti, D., Gregori, A., Lombardi, G., y col. 2006. Use of highly sensitive mitochondrial probes to detect microchimerism in xenotransplantation models. *Xenotransplantation*. 13(1):80-5.
- Parolini, O., Alviano, F., Bagnara, GP., Bilic, G., Buhring, HJ., Evangelista, M., y col. 2008. Concise review: isolation y characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. *Stem Cells* 26:300e11.
- 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, y regulatory aspects at the round table. *Stem Cells Dev*. 19(2): 143 – 155.
- Parolini, O., Soncini, M. 2011. *Regenerative medicine using pregnancy-specific biological substances*. Editorial Springer. London, Inglaterra.

- Pekka, L., Ismo, V., Veli-pekka, L., Tapio, V., Svante, S. Expression y Distribution of Vimentin y Keratin Filaments in Heterokaryons of Human Fibroblasts y Amnion Epithelial Cells. *The Journal of Cell Biology* 1982: **(94)** 308-315
- Perera, J., Jaiswal, P.,y Khan, W. 2012. The Potential Therapeutic Use of Stem Cells in Cartilage Repair. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 7, 149-156 149
- Pérez, J., Garza, I., Ortiz, R. 2007. Células madre. *Medicina Universitaria*. 9**(36)**:130-40.
- Pineda, C. 2001. Caracterizacion morfológica y bioquímica de condrocitos *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Pineda, C., Londoño, C. 2009. Obtención de Células Madre del Tejido Adiposo y su Potencial de Diferenciación Osteogénico. *Rev. Ing. Bioméd.* **3**: 58-65
- Pittenger, M., Mackay, A., Beck, S., Jaiswal, R., Douglas, R., Mosca, D., Moorman, M y colaboradores. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. **284**:143-147.

- Portmann-Lanz, C., Schoeberlein, A., Huber, A., y colaboradores. 2006. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- y perinatal neuroregeneration. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **194**: 664– 673.
- 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.
- 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.
- Ramalho-Santos, M., Willenbring, H. 2007. On the origin of the term stem cell. *Cell stem cell.* **1**:35-38
- Riboh, J., Saltzman, B., Yanke, A and Cole, B. and Brian J. Cole. 2016. Human amniotic membranederived products in sports medicine: basic science, early results, and potential clinical applications. *The American Journal of Sports Medicine.* **(20)**10.
- Rippon HJ, Bishop AE. 2004. Embryonic stem cells. *Cell Prolif.* **37(1)**:23-34.

- Rodríguez, M. 2005. Establecimiento del Cultivo de Células del Estroma de Tejido Adiposo de Rata y su Potencialidad Ósteo-Condrogénica “*in Vitro*”. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela
- Ross, M., Pawlina, W. 2015. Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular. Editorial Panamericana. Quinta edición. Argentina, Buenos Aires.
- Ruiz, S., Chen, C. 2008. Emergence of patterned stem cell differentiation within multicellular structures. *Stem Cells*.**26**:2921–2927.
- 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.
- Sabella, N. 1913. Use of fetal membranes in skin grafting. *Med Rec NY* **83**, 478
- Sakuragawa, N., Thangavel, R., Mizuguchi, M., Hirasawa, M., Kamo, I. 1996. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. *Neurosci. Lett.* **209**:9-12.

- 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.
- Sayed, N., Liu, C., Wu, JC .2016. Translation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells: From Clinical Trial in a Dish to Precision Medicine. *J Am Coll Cardiol.*10;67(18):2161-2176
- Stadler, G., Hennerbichler, S., Lindenmair, A., Peterbauer, A., Hofer, K., Van-Griensven M, Gabriel, C., Redl, H., Wolbank, S.2008. Phenotypic shift of human amniotic epithelial cells in culture is associated with reduced osteogenic differentiation in vitro. *Cytotherapy.* 10(7):743-52.
- Somoza, R., Welter, F., Correa, D.y Caplan, A.2014. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Challenges and Unfulfilled Expectations. *Tissue engineering.* 270:2082-90.
- Tabatabaei, M., Mosaffa N, Nikoo S, Bozorgmehr M, Ghods R, Kazemnejad S, Rezania S, Keshavarzi B, Arefi S, Ramezani-Tehrani F, Mirzadegan E, Zarnani AH.

2013. Isolation and partial characterization of human amniotic epithelial cells: the effect of trypsin. *Avicenna J Med Biotechnol.* **6(1):**10-20.
- Takagi M, Umetsu Y, Fujiwara, M., Wakitani, S. 2007. High inoculation cell density could accelerate the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to chondrocyte cells. *J Biosci Bioeng.* **103(1):**98-100
 - 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.
 - 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.
 - Tamagawa, T., Ishiwata, I., Saito, S. 2004. Establishment y characterization of a pluripotent stem cell line derived from human amniotic membranes y initiation of germ layers *in vitro.* *Hum. Cell.* **17:** 125 - 130.
 - Tang, Y., Wang, B. 2015. Gene- and stem cell-based therapeutics for cartilage regeneration and repair. *Stem Cell Research and Therapy.* **6:78**

- Tare, RS., Howard, D., Pound, JC., Roach, HI., Oreffo, RO. 2005. Tissue engineering strategies for cartilage generation--micromass and three dimensional cultures using human chondrocytes and a continuous cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* **333(2):**609-21.
- Terada, S., Matsuura, K., Enosawa, S., Miki, M., Hoshika, A., Suzuki, S., Sakuragawa, N. 2000. Inducing proliferation of human amniotic epithelial (HAE) cells for cell therapy. *Cell Transplant.* **9:** 701 – 704.
- Thorpe, SD., Buckley, CT., Vinardell, T., O'Brien, FJ., Campbell, VA., Kelly, DJ.2010. The response of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to compression following TGF-beta3 induced chondrogenic differentiation. *Ann Biomed Eng.* **38(9):**2896-909.
- Toda, A., Okabe, M., Yoshida, T., Nikaido, T. 2007. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J. Pharmacol. Sci.* **105:** 215 – 228.
- Topoluk, N., Hawkins, R., Tokish, J and Mercuri, J. 2017. Amniotic mesenchymal stromal cells exhibit preferential osteogenic and chondrogenic differentiation and

enhanced matrix production compared with adipose mesenchymal stromal cells. *The American Journal of Sports Medicine*. 45(11):2637-2646

- Ullah, M., Hamouda, H., Stich, S., Sittinger, M y Ringe, J. 2010. A Reliable Protocol for the Isolation of Viable, Chondrogenically Differentiated Human Mesenchymal Stem Cells from High-Density Pellet Cultures. *Biores Open Access*. 1(6):297-305
- Urbaneja, M., Gugig, M., Bello, R. 1975. Cultivo de tejidos animales. Trabajo de Laboratorio. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela
- Wang, G., Zhao, F., Yang, Di., Wang, J., Qiu, J Y Pang, X. 2018. Human amniotic epithelial cells regulate osteoblast differentiation through the secretion of TGFβ1 and microRNA-34a-5p. *International journal of molecular medicine* 41: 791-799,
- Wang, M., Yang, T., Tang, D., Luo, F., Liang, W., Guo, Sh., Xu, J. 2009. The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells *in vitro*. *Immunology*. 126: 220 - 232.
- Wang Q, Wu W, Han X, Zheng A, Lei S, Wu J, Chen H, He C, Luo F, Liu X. 2014. Osteogenic differentiation of amniotic epithelial cells: synergism of pulsed electromagnetic field y biochemical stimuli. *BMC Musculoskelet Disord*. 15:271.

- Watts, A., Ackerman-Yost, J and Nixon, A.2013. A Comparison of Three-Dimensional Culture Systems to Evaluate In Vitro Chondrogenesis of Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part A*.19(19-20):2275-83
- Watt, F.M., Jordan, P.W., and O'Neill, C.H. 1988. Cell shape controls terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 5576–5580.
- Weissman, I., Yerson, D. y Gage, F. 2001. Stem y progenitor cells: origins, phenotypes, linages commitments, y transdifferentiation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.***17**:387-403.
- Whitaik D., Hurtig, M., Kandel, R y Stanford,W. 2011. Membrane Culture of Bone Marrow Stromal Cells Yields Better Tissue Than Pellet Culture for Engineering Cartilage-Bone Substitute Biphasic Constructs in a Two-Step Process. *Tissue engineering*: 17(9) 939-48
- Whittle, W., Gibb, W., Challis, J. 2000. The characterization of human amnion epithelial y mesenchymal cells: the cellular expression, activity y glucocorticoid regulation of prostaglyin output. *Placenta*. **21**: 394 - 401.

- Wolbank S, Peterbauer A, Fahrner, M., Hennerbichler, S., Griensven, M., Stadler, G., Redl, H., Gabriel, C .2007. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng.* **13**:1173–1183.
- Xiao, G., Cui, Y., Ducy, P., Karsenty, G., Franceschi, R. 1997. Ascorbic Acid – Dependent Activation of the Osteocalcin Promoter in mc3t3-e1 Preosteoblasts: Requirement for Collagen Matrix Synthesis and the Presence of an Intact ose2 Sequence. *Mol. Endocrinol.* **11**: 1103-1113.
- Zhang,K., Cai,k., Li,Y., Shu,Y., Pan,L.,Wan,F.,Li,H., Huang,X.,He,C.,y colaboradores. 2011. Utilization of Human Amniotic Mesenchymal Cells as Feeder Layers to Sustain Propagation of Human Embryonic Stem Cells in the Undifferentiated State. *Cellular reprogramming.* **13(4)**:281-8
- Zheng, Y., Gao, Z., Xie, C., Zhu, H., Peng, L., Chen, J. y Chong, Y. 2008. Characterization y hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid y human bone marrow: a comparative study. *Cell biol int* **32**: 1439-1448.

- Zuk, P., Zhu, M., Ashjian, D y colaboradores. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 13(12):4279-95
- 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 chondrocytes. *Clinics*. 73:e268

Consultas en línea:

- Bernard, A. 2014. Biología de las células madre. Artículo digital, extraído de [http://www.amgen.es/doc3.php?op=biotecnologia9&ap=b9_celulasmadre]
Revisado el 22/04/2018.
- Cardona, M. E, Hurtado A, A. Parada S, M. T. 2006. Tejido cartilaginoso consultado en línea [<http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/ova/mod/resource/view.php?inpopup=true&id=451>]
- Fernández, I., Hernández-Gil, M., Alobera G., Pingarrón, M., Jerez, L. 2006. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1698-69462006000100011]
- Freed y col. 1999. Artículo digital, extraído de [http://www.felipeisidro.com/curso_direccion_programas_fitness/anatomía_y_fisiología/4_cartilaginoso.pdf]. Consultado 8 de junio del 2018.

- Zamudio, T. 2008. Regulación jurisdiccional de las biotecnologías.3.2.Células madre embrionarias y de adultos. [<http://www.biotech.bioteca.org/clase2-17.htm>]. Consultada: 29 de septiembre del 2018.



CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

Yo, _____

C.I. _____ Nacionalidad _____ Estado _____

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

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

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

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

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

DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO:

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

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

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

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR:

Luego de haber explicado detalladamente al voluntario la naturaleza del protocolo mencionado. Certifico mediante la presente que, a mi leal saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza de la participación en este estudio. Ningún problema de índole médica, de idioma o de instrucción han impedido al sujeto tener una clara comprensión de su compromiso con este proyecto.

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

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

Descripción y Obligaciones del Estudio

Las placentas serán obtenidas de la Unidad de Partos de La Clínica. Si Ud. da su consentimiento, su participación consistirá en donar su placenta de manera voluntaria, la cual se extraerá mediante el proceso de cesárea, bajo las condiciones de rutina que se usan en la clínica.

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

Criterios de selección:

- Madre sana, mayor de edad (dieciocho años), en pleno uso de sus facultades mentales.
- Embarazo sano y controlado por un período no menor a seis meses.

- Feto sano, sin patología placentaria.
- Parto por cesárea programada sin ruptura de bolsa.
- Madre y feto libres de infecciones transmisibles (virales, bacterianos y otros microorganismos).
- Consentimiento materno, médico y de un testigo.
- Serología del primer trimestre del embarazo negativa o test de amplificación de ácidos nucleicos negativos.
- Placenta sin restos de meconio.

Criterios de exclusión:

- Infección materna crónica o aguda.
- Infección fetal crónica o aguda.
- Infección o inflamación de las membranas fetales.
- Gestación inferior a 34 semanas.

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

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

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

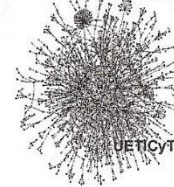
Confidencialidad y Anonimato

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

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

Otras Disposiciones

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



Caracas 8 Noviembre 2011.

PROFESORA
LORENA MARQUEZ (Investigador Principal)

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

De nuestra mayor consideración,

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

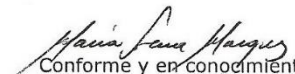
Dejamos constancia que los Miembros del Comité de Ética que han participado en la evaluación del proyecto señalado no están involucrados, ni en modo alguno tienen conflictos de intereses, en la realización del mismo.

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


Izaskun Petralanda
Por el Comité de Ética


Pío Arias
Coordinador de Investigación




Conforme y en conocimiento:
Lorena Marquez