



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Aislamiento y Caracterización de las Células Madre de  
la Membrana Amniótica. Una nueva fuente para  
Terapia Celular e Inmuno-modulación**

**D<sup>a</sup>. CARMEN L. GARCÍA DE INSAUSTI**

2012

---

***A "ABU"***

---

## ***AGRADECIMIENTOS***

---

No estaba previsto que a estas alturas de mi vida realizara una tesis doctoral. Sucesos inesperados, circunstancias favorables y un grupo de personas extraordinarias se conjugaron para que ello fuera realidad.

A esas personas quiero expresar mi más profundo agradecimiento.

**Al Dr. Joaquín García-Estañ López**, Decano de la Facultad de Medicina, quien tuvo a bien aceptar mi solicitud de venir a esta ciudad y orientarla hacia el Servicio de Hematología del Hospital Virgen de la Arrixaca.

**Al Dr. Alfonso Morales Lázaro**, Jefe del Servicio de Hematología, extraordinaria persona, quien generosamente aceptó mi incorporación en el Servicio a su cargo.

**Al Dr. José María Moraleda Jiménez**, Director del Grupo de Terapia Celular del Hospital Virgen de la Arrixaca, gran profesional, generador de estímulos permanentes y motor incansable de innumerables acciones, quien me proporcionó un espacio dentro el grupo y me ha ofrecido un apoyo inestimable.

**A la Dra. María Juliana Majado.....Maruja**, quien fue la primera en hablarme de la membrana amniótica como fuente de trabajo y de la posibilidad de realizarlo en el Laboratorio de Criobiología. A ella y a mis queridas amigas: **Vicky, Pili y Patricia** quienes me han brindado un nicho familiar haciendo más llevadera la distancia de los míos.

**Al Dr. Miguel Blánquer Blánquer.....Miguel**, mi interlocutor y compañero permanente, víctima de mis largas peroratas y divagaciones pseudo-filosóficas.

**A todos los compañeros del Servicio de Hematología**, quienes con su aceptación han contribuido a que mi estancia no haya sido fugaz.

**Al Dr. Francisco José Nicolás.....Franjo**...y a todo el equipo de la Unidad de Investigación, Oncología Molecular y TGF $\beta$ : **Toñi, Eva, Annia, Conce**, quienes me han fortalecido con su cariño y amistad.

**Al Dr. Carlos Detorre Minguela** quien generosamente me ofreció su apoyo en los estudios de biología molecular y de quien puedo decir que he aprendido un montón. Igualmente a **Isabel y Leticia** por su mano amiga en momentos de necesidad.

**A los Dres. Joaquín Sola Pérez y José Luis Abel Cortés**, Director y Adjunto del Servicio de Anatomía Patológica y a las chicas del Laboratorio de Inmuno-citoquímica: **Isabel, Carmen, Rosa y Tania**, con cuyo apoyo he contado permanentemente.

**A la Lic. Guadalupe Ruiz Merino** por su ayuda en el análisis estadístico.

**A todo el personal del Servicio de Ginecología** por su colaboración y permanente buena disposición en la obtención de las placentas.

**A Paqui y Virginia**, trabajadoras infatigables, efectivas por demás en todos los asuntos administrativos.

**A Javi**, un chico de corazón generoso y amable siempre dispuesto a ayudar.

**A Guille y Laura** por sus maravillosos aportes en la recta final.

**A Esther**, quien supo sacar algo de tiempo para atender mis solicitudes.

**A todos los compañeros y amigos del Grupo de Terapia Celular**, especialmente a mis queridos amigos del CEIB: **Xavy, Loli, Mercedes y María Teresa**, por quienes siento un gran aprecio, pequeña retribución ante todo el cariño que me han demostrado, y ante lo mucho que me han acompañado y me han ayudado en el trabajo diario del laboratorio.

**A la Fundación Séneca, la Fundación para la Investigación Sanitaria de la Región de Murcia y la Fundación Española para la Lucha contra la Leucemia** por el apoyo económico para la realización de este estudio.

Finalmente a **MI FAMILIA**, causa primera y última de todo cuanto hago.

## ***ÍNDICE***

---

<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>2</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>16</b>
<b>1. CONCEPTOS BÁSICOS SOBRE LAS CÉLULAS MADRE</b>	
1.1. Origen del término “stem cell “(célula madre)	17
1.2. Definición	17
1.3. Tipos de células Madre	20
1.3.1. Clasificación por su potencialidad	
1.3.1.1. Células Madre Totipotentes	21
1.3.1.2. Células Madre Pluripotentes	21
1.3.1.3. Células Madre Multipotentes	21
1.3.1.4. Células Madre Oligopotentes	21
1.3.1.5. Células Madre Unipotentes	21
1.3.2. Clasificación por su origen	
1.3.2.1. Células Madre Embrionarias	22
1.3.2.2. Células Madre Fetales	28
1.3.2.3. Células Madre Adultas	29
1.3.2.4. Células Madre iPSC	35
<b>2. CÉLULAS MADRE DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA</b>	
2.1. La Membrana Amniótica (MA) o Amnios	36
2.2. Origen de la MA	40
2.3. Células Epiteliales Amnióticas (hAEC)	44
2.4. Células Mesenquimales Estromales de la MA (hAMSC)	55
2.5. Otras características de la MA	
2.5.1. Propiedades Inmunológicas	63
2.5.2. Propiedades Biomecánicas	66
2.5.3. Propiedades Anti-inflamatorias y Anti-angiogénicas	
2.5.4. Propiedades Anti-microbianas	70
2.5.5. Propiedades Promovedoras de la Epitelización	71
2.5.6. Propiedades Inhibitorias de la Fibrosis	72
2.5.7. Ausencia de Tumorigenicidad	73
2.5.8. Pocos problemas éticos	74
<b>3. USOS DE LAS CÉLULAS y LA MA EN ENSAYOS PRE-CLÍNICOS DE TERAPIA CELULAR E INGENIERÍA TISULAR</b>	
3.1 Usos de las hAEC y de las hAMSC	
3.1.1 Regeneración tisular	75

3.1.2	<i>Inmuno-moduladores</i>	85
3.2	<i>Usos de la MA como “scaffold”o sustrato</i>	86
<b>4.</b>	<b>USOS DE LAS CÉLULAS y LA MA EN MEDICINA CLÍNICA</b>	
4.1	<i>Usos de las hAEC y de las hAMSC</i>	90
4.2	<i>Usos de la MA en humanos</i>	91
4.2.1	<i>Apósito biológico</i>	92
4.2.2	<i>Sustrato-injerto</i>	93
4.2.3	<i>Sustrato para la expansión de células ex vivo</i>	93
4.2.4	<i>Otros fines</i>	94
<b>OBJETIVOS</b>		<b>97</b>
1.	<i>OBJETIVOS GENERALES</i>	
2.	<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>		<b>99</b>
1.	<b>OBTENCIÓN DE LA PLACENTA</b>	<b>100</b>
2.	<b>OBTENCIÓN DE LA MA</b>	<b>101</b>
3.	<b>PROCESAMIENTO DE LA MA</b>	<b>102</b>
4.	<b>ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LA MA</b>	<b>104</b>
5.	<b>AISLAMIENTO CELULAR</b>	<b>105</b>
5.1	<i>Células Epiteliales (hAEC)</i>	
5.2	<i>Células del Mesodermo Amniótico (hAMSC)</i>	
6.	<b>RECUENTO Y VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS AISLADAS</b>	<b>108</b>
7.	<b>CULTIVOS PRIMARIOS</b>	<b>110</b>
7.1	<i>hAEC</i>	
7.2	<i>hAMSC</i>	
8.	<b>SUBCULTIVOS. ENSAYOS DE EXPANSIÓN IN VITRO</b>	<b>113</b>
9.	<b>ENSAYOS DE PROLIFERACION CELULAR</b>	<b>113</b>
10.	<b>ENSAYOS CLONOGÉNICOS</b>	<b>115</b>
11.	<b>INVESTIGACIÓN DEL CICLO CELULAR</b>	<b>116</b>
12.	<b>CARACTERIZACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO</b>	<b>117</b>



<b>13. ANALISIS MOLECULAR</b>	<b>120</b>
<b>14. INMUNOCITOQUÍMICA</b>	<b>132</b>
<b>15. INMUNOFLUORESCENCIA</b>	<b>133</b>
<b>16. ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN IN VITRO.</b>	
<b>16.1 hAEC</b>	<b>136</b>
16.1.1 <i>Neuro-ectodérmica</i>	136
16.1.2 <i>Hepatocítica</i>	137
16.1.3 <i>Cardio-miocítica</i>	138
16.1.4 <i>Adipogénica</i>	138
16.1.5 <i>Osteogénica</i>	139
16.1.6 <i>Condrogénica</i>	141
<b>16.2 hAMSC</b>	
16.2.1 <i>Osteogénica</i>	143
16.2.2 <i>Adipogénica</i>	143
16.2.3 <i>Diferenciación Condrogénica</i>	144
<b>17. CRIOPRESERVACIÓN CELULAR</b>	<b>144</b>
<b>18. DESCONGELAMIENTO CELULAR</b>	<b>145</b>
<b>19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>145</b>
<b>RESULTADOS</b>	
<b>1. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LA MA</b>	<b>147</b>
1.1 <i>En fresco</i>	147
1.2 <i>En bloques de parafina</i>	147
1.3 <i>Con coloraciones inmuno-histoquímicas</i>	149
1.4 <i>Tras la tripsinización</i>	150
1.5 <i>Tras el tratamiento con colagenasa</i>	151
<b>2. CARACTERÍSTICAS DE LAS hAEC</b>	<b>151</b>
2.1 <i>Recuento y viabilidad</i>	151
2.2 <i>Cultivo Primario</i>	154
2.3 <i>Curvas de Proliferación Celular</i>	159
2.4 <i>Expansión in vitro</i>	160
2.5 <i>Clonogenicidad</i>	163
2.6 <i>Ciclo Celular</i>	165
2.7 <i>Marcadores Inmunofenotípicos</i>	166
2.7.1 <i>De membrana</i>	

2.7.2	<i>Intra-celulares</i>	
2.8	<i>Marcadores de Pluri-potencialidad</i>	169
2.9	<i>Perfil genético obtenido por qPCR array</i>	170
2.9	<i>Diferenciación In-vitro</i>	171
2.9.1	<i>Neuro-ectodérmica</i>	171
2.9.2	<i>Hepatocítica</i>	177
2.9.3	<i>Cardio-miocítica</i>	182
2.9.4	<i>Osteogénica</i>	184
2.9.5	<i>Adipogénica</i>	185
2.9.6	<i>Condrogénica</i>	186
<b>3.</b>	<b><i>CARACTERÍSTICAS DE LAS hAMSC.</i></b>	<b>187</b>
3.1	<i>Recuento, Viabilidad y Cultivo de las Células</i>	187
3.2	<i>Expansión in vitro</i>	190
3.3	<i>Curvas de Proliferación</i>	193
3.4	<i>Ciclo Celular</i>	195
3.5	<i>Clonogenicidad</i>	195
3.6	<i>Patrón Inmuno-fenotípico</i>	195
3.7	<i>Marcadores de pluripotencialidad</i>	198
3.8	<i>Diferenciación In vitro</i>	198
3.8.1	<i>Osteogénica</i>	198
3.8.2	<i>Adipogénica</i>	199
3.8.3	<i>Condrogénica</i>	200
	<b><i>DISCUSIÓN</i></b>	<b>202</b>
	<b><i>CONCLUSIONES</i></b>	<b>231</b>
	<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i></b>	<b>234</b>
	<b><i>APORTACIONES DE LA TESIS</i></b>	<b>255</b>
1.	<i>Generación de otros ensayos</i>	256
2.	<i>Publicaciones</i>	258
3.	<i>Presentaciones en Congresos</i>	258
	<b><i>ANEXOS</i></b>	<b>262</b>
1.	<i>PROTOCOLO DE ESTUDIO</i>	

## ***JUSTIFICACIÓN***

La intensa investigación llevada a cabo en las últimas décadas sobre la biología de las células madre ha proporcionado información valiosa sobre los procesos de desarrollo morfológicos y fisiológicos que rigen la formación tisular y orgánica, así como los procesos que garantizan las células que renuevan y mantienen los tejidos y órganos durante toda la vida bajo condiciones de homeostasis y que son capaces de regenerar los daños orgánicos causados por la injuria tisular (1-3). De igual forma se ha obtenido información sobre los programas moleculares intrínsecos y sobre los mecanismos de señalización intracelular, los factores de crecimiento y las citoquinas que regulan los procesos normales de auto-renovación y diferenciación de las células madre y sus progenitores, los cuales igualmente están implicados en los procesos de regeneración durante la injuria tisular (4, 5).

Todos estos conocimientos han generado grandes expectativas en la comunidad científica sobre la posible aplicación de las células madre como estrategia terapéutica celular y genética, al ofrecer la posibilidad de estimular su expansión y diferenciación *in vitro* e *in vivo* hacia una progenie funcional que pudiera utilizarse en el tratamiento de numerosas enfermedades crónicas y desordenes degenerativos que afectan a una gran parte de la población mundial y comprometen la vida de muchos individuos. De hecho, el trasplante de células madre tras su expansión y/o diferenciación *in vitro* bajo condiciones de cultivo bien definidas, o la estimulación *in vivo* de las células madre adultas endógenas a través de factores de crecimiento específicos, ha surgido como una estrategia terapéutica novedosa de medicina regenerativa (1-8). En este sentido ha

resultado particularmente prometedora la capacidad de las células madre adultas para estimular de manera paracrina el potencial regenerativo de las células madre residentes en el tejido dañado y modular positivamente las señales del microambiente (7, 8). Pero además de estas aproximaciones terapéuticas basadas en la alta plasticidad, en la capacidad de migración de las células y en la capacidad de respuesta de las células madre adultas endógenas a factores de crecimiento específicos, también se han investigado otras estrategias basadas en la manipulación genética de las células madre y sus progenitores antes del trasplante para el tratamiento de enfermedades genéticas incurables, o en la reprogramación genética de células somáticas maduras para la obtención de células madre pluri-potenciales con características similares a las células madre embrionarias (9).

El aislamiento de células madre con capacidad de auto-renovación y potencial de diferenciación se ha conseguido a partir de tejidos embrionarios, fetales y de prácticamente todos los tejidos y órganos adultos, como la médula ósea (MO), el corazón, el cerebro, el tejido adiposo, el músculo, la piel, los ojos, los riñones, los pulmones, el hígado, el tracto gastrointestinal, el páncreas, las mamas, los ovarios, la próstata, los testículos, la sangre periférica, la sangre de cordón umbilical, la placenta, etc. (1-7). Teóricamente las células madre aisladas de cualquiera de estos tejidos podría ser una buena fuente de células para la medicina regenerativa, sin embargo, entre ellas existe variabilidad biológica y conviene aclarar las ventajas e inconvenientes asociados a su potencial aplicación clínica.

Las células madre embrionarias presentan la mayor capacidad de diferenciación hacia múltiples líneas celulares de origen ectodérmico, mesodérmico y endodérmico, por lo que en teoría constituyen una fuente óptima para obtener un gran número de células utilizables en medicina regenerativa. Sin embargo, los problemas técnicos y éticos relacionados con la obtención y manipulación de los embriones humanos, así como la capacidad de dichas células para inducir teratomas y terato-carcinomas tras su implante en los receptores, han generado grandes controversias sobre su eventual utilización (10-12).

Las células madre adultas pueden obtenerse prácticamente de cualquier tejido e incluso del propio paciente y por tanto ser inmunológicamente compatibles. Además, su disponibilidad es casi ilimitada, pero tienen el inconveniente de que su aislamiento y crecimiento en los cultivos es difícil y lento, y ello dificulta la obtención de las elevadas concentraciones celulares requeridas para los trasplantes (13, 14).

Recientemente, la placenta y más específicamente, la Membrana Amniótica (MA) ha despertado gran interés en la comunidad científica como una fuente alternativa de células madre. En ella se ha demostrado que existen dos poblaciones de células madre, una presente en el epitelio: las hAEC (por sus siglas en inglés: *human Amniotic Epithelial cells*) con características muy parecidas a las de las células embrionarias ya que al igual que ellas expresan marcadores antigénicos embrionarios, factores de transcripción propios de pluripotencialidad y evidencian diferenciación pluripotencial hacia células de las tres capas germinales bajo condiciones de cultivo adecuadas. Otra, las células mesenquimales obtenidas del estroma mesodérmico, denominadas hAMSC

por sus siglas en inglés (*human Amniotic Mesenchymal Stem or Stromal cells*), las cuales básicamente son células multipotenciales, aunque algunos investigadores también han demostrado una capacidad de diferenciación más allá de la línea mesodérmica (15-18).

Estas células, de muy fácil obtención, en cantidades abundantes, han resultado muy atractivas para la investigación porque poseen un potencial proliferativo aparentemente mayor que el de las células de la MO y porque evidencian fácilmente su potencial de diferenciación *in vitro* cuando se utilizan los medios de cultivo adecuados. Además cuando se utilizan *in vivo* han demostrado baja inmunogenicidad y nula tumorigenicidad, dos ventajas adicionales muy importantes para los ensayos de terapia celular y regeneración tisular. Ya se han realizado ensayos preliminares en modelos animales que fundamentan la posible aplicación de estas células en la terapia celular. Pero todavía hacen falta estudios adicionales para conocer en profundidad las características biológicas de estas células y poder utilizarlas con éxito en la terapia celular (19).

Todo ello ha representado un estímulo para nuestro grupo de investigación, un grupo con amplia experiencia en el manejo y trasplante de células progenitoras hematopoyéticas y en la obtención de células mesenquimales de diferentes fuentes para uso en ensayos pre-clínicos. Igualmente, con experiencia en la obtención de MA a partir de gestantes sanas atendidas en el Servicio de Ginecología, y en el procesamiento y criopreservación de dichas membranas para su utilización por el Servicio de Oftalmología en el tratamiento de diferentes patologías oculares.

Esta experiencia, unida a la motivación por investigar en un campo donde la MA puede representar una fuente de células con potencialidad para la medicina traslacional, nos llevó a iniciar a mediados de 2008 una línea de investigación sobre las células madre de la MA (epiteliales y mesenquimales), que he tenido la oportunidad de liderar, y que es el fundamento de esta tesis doctoral. El punto de partida de este trabajo ha sido el aislamiento, caracterización, evaluación de la viabilidad, capacidad de expansión y determinación de la potencialidad de diferenciación *in vitro* de estas células. Todo ello con la finalidad de disponer de un conocimiento básico que nos permitiera iniciar estudios de diferenciación y funcionalidad *in vivo* y de reparación tisular en modelos animales de diversas patologías como la hemofilia, la enfermedad injerto contra huésped y la miocardiopatía dilatada.

Adicionalmente, pensamos que la posibilidad de disponer de hAEC y hAMSC criopreservadas podría conducir a la creación de un banco de células madres amnióticas, las cuales pudieran ser de gran utilidad en el tratamiento de diversas enfermedades cardíacas, neurológicas, hepáticas, vasculares, etc., si, como se espera, su uso se expande en la medida que se vayan perfeccionando las tecnologías apropiadas para obtener la diferenciación de dichas células hacia líneas celulares específicas. Hasta ahora los diversos estudios pre-clínicos realizados en modelos animales han aportado resultados prometedores.



## ***ABREVIATURAS***

<b>ABCG2/BCRP</b>	<i>ATP binding cassette reporter G2</i> : Transportador G2 de unión a ATP
<b>ACTA2</b>	<i>Alpha-actin 2</i> : Alfa Actina 2
<b>ADN</b>	Acido Desoxiribonucléico
<b>ALB</b>	Albúmina
<b>AMY2B</b>	<i>amylase alpha2B</i> : Amilasa alfa 2B
<b>ANP</b>	<i>Atrial Natruretic peptide</i> : Péptido naturético atrial
<b>ATRA</b>	<i>All transretinoic acid</i> : Ácido all Trans Retinóico
<b><math>\alpha</math>-FP</b>	Alfa fetoproteína
<b><math>\alpha</math>-MHC</b>	<i>Alpha myosin heavy chain</i> : Cadena pesada de miosina $\alpha$
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	<i>Alpha smooth muscle actin</i> : actina de músculo liso
<b>A1AT</b>	<i>Alpha 1 Anti trpsin</i> : Alfa 1 anti-tripsina
<b>A2B5</b>	Anticuerpo que reconoce antígeno de oligodendrocitos y astrocitos
<b>BDNF</b>	<i>Brain derived neurotrophic factor</i> : Factor neurotrófico derivado del cerebro
<b>b-FGF</b>	<i>Basic fibroblastic growth factor</i> : Factor de crecimiento fibroblástico básico
<b>BMP</b>	<i>Bone morphogenetic protein</i> : Proteína morfogenética ósea
<b>bp</b>	<i>Base pairs</i> : Pares de bases
<b>CACNA1C</b>	<i>Calcium channel, voltage-dependant, L type, alpha 1C subunit</i> : Canal de calcio dependiente de voltaje tipo L subunidad alfa 1C
<b>C/EBP<math>\alpha</math></b>	<i>CAAT enhancer binding protein-alpha</i> : Proteína alfa de unión al enhancer CAAT

<b>CCR4</b>	<i>Chemokine receptor type 4</i> : Receptor de quimoquina tipo 4
<b>CHK2</b>	<i>Checkpoint of the cell cycle</i> : Punto de control de ciclo celular
<b>CK</b>	<i>Cytokeratine</i> : Citokeratina
<b>c-met</b>	<i>MET or MNNG HOS Transforming gene</i> : codifica al Receptor del factor de crecimiento de hepatocito
<b>CNP</b>	<i>Cyclic nucleotide phosphodiesterase</i> : Fosfodieterasa nucleotídica cíclica
<b>COMP</b>	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i> : Proteína oligomérica de la matriz del cartílago
<b>CSC</b>	<i>Cardiac stem cells</i> : Células madre cardíacas
<b>cTnT</b>	<i>Cardiac troponin T</i> : Troponina cardíaca T
<b>cTn1</b>	<i>Cardiac troponin 1</i> : Troponina cardíaca I
<b>CYP</b>	<i>Cytochrome P</i> : Citocromo P
<b>DEXA</b>	Dexametasona
<b>DHA</b>	<i>Decosahexaenoico acid</i> : Ácido docosahexaenoico.
<b>DNMT3</b>	<i>DNA methyltransferase 3</i> : metil transferasa del ADN
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i> : Medio de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DOPAC</b>	<i>3,4-Dihydroxyphenylacetic acid</i> : Ácido 3,4 Dihidro fenil acético
<b>DPGF-BB</b>	<i>Derived Platelets Growth Factor-BB</i> : Factor de crecimiento derivado de plaquetas BB
<b>EB</b>	<i>Embryoid bodies</i> : Cuerpos embriodes
<b>EP</b>	Enfermedad de Parkinson

<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> : Ácido etilen-endiamino tetra acético
<b>EGF</b>	<i>Epidermal Growth Factor</i> : Factor de crecimiento epidermal
<b>EGF-R</b>	<i>Receptor Epidermal Growth Factor</i> : Receptor de EGF
<b>EPC</b>	<i>Endothelial Progenitor cell</i> : Células progenitoras endoteliales
<b>ESC</b>	<i>Embryonic stem cell</i> : Célula Madre Embrionaria
<b>FGF</b>	<i>Fibroblastic Growth Factor</i> : Factor de Crecimiento Fibroblástico
<b>FGF-R</b>	<i>Receptor Fibroblastic Growth Factor</i> : Receptor del FGF
<b>FITC</b>	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> : isotiocianato de Fluoresceina
<b>FOX3</b>	<i>Feminizing locus on X</i> : Locus feminizante en cromosoma X
<b>GAD</b>	<i>Glutamate decarboxylase</i> : Descarboxilasa del Ácido Glutámico
<b>GATA-4</b>	<i>GATA binding protein-4</i> : Proteína 4 de unión al GATA
<b>GFA1</b>	<i>Glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase</i> : Aminodo transferasa de Glutamina fructosa-6-fosfato.
<b>GFAP</b>	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> : Proteína ácida Glial Fibrilar
<b>GLUT 2</b>	<i>Glucose transporter member 2</i> : Transportador 2 de Glucosa
<b>GTPases</b>	<i>Guanosine triphosphatases</i> : Trifosfato de Guanosina
<b>G6Pase</b>	<i>Glucose 6 phosphatase</i> : Glucosa 6 fosfatasa
<b>GS</b>	<i>Glutamine syntetase</i> : Glutamina sintetasa
<b>hAEC</b>	<i>Human amniotic epithelial cell</i> : Células epiteliales del amnios humano
<b>hESC</b>	<i>Human embryonic stem cell</i> : Células madre embrionarias humanas
<b>HGF</b>	<i>Hepatic growth factor</i> : Factor de crecimiento hepático

<b>HLA</b>	<i>Human Leucocyte Antigen</i> : Antígeno Leucocitario humano
<b>HVA</b>	<i>Homovanilic acid</i> : Ácido homovanílico.
<b>HNF</b>	<i>Hepatocyte Nuclear Factor</i> : Factor nuclear hepatocítico
<b>HSC</b>	<i>Hematopoietic Stem cell</i> : Células madre hematopoyéticas
<b>iPSC</b>	<i>Induced Pluripotent Stem Cell</i> : Células madre pluripotentes inducidas
<b>IDO</b>	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i> : indolamina 2,3 dioxygenasa
<b>IDSC</b>	Inmunodeficiencia Severa Combinada
<b>IL</b>	<i>Interleukin</i> : Interleuquina
<b>IP</b>	Ioduro de Propidio
<b>ITS</b>	<i>insulin–transferrin–selenita</i> : Insulina-transferrina-selenita
<b>JAK</b>	<i>Janus kinase</i> : Kinasa Janus
<b>KCND3</b>	<i>Potassium voltage gated channel, Shal-related subfamily, member 3</i> : Canal de potasio sensible a cambios de voltaje de la subfamilia relacionada a Shal, miembro 3
<b>KGF</b>	<i>Keratynocytes growt factor</i> : Factor de crecimiento de keratinocitos
<b>KIP1</b>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i> : Inhibidor de ciclina dependiente de kinasa
<b>LIF</b>	<i>Leukemia inhibitor factor</i> : Factor inhibidor de leucemia
<b>LDLR</b>	<i>Low density lipoprotein receptor</i> : Receptor de lipoproteína de baja densidad
<b>MA</b>	Membrana Amniótica
<b>MAPC</b>	<i>Multipotential adult progenitor cells</i> : Células progenitoras adultas multipotenciales
<b>MAP</b>	<i>Mitogen-activated protein kinasa</i> : Kinasas de proteínas activadas por mitógenos

<b>MAP2</b>	<i>Microtubule associated proteina</i> : Proteína asociada a microtúbulos
<b>MBP</b>	<i>Myelin basic protein</i> : Proteína básica de mielina
<b>mESC</b>	<i>Mouse embryonic stem cell</i> : Células madre embrionarias de ratón
<b>MEFs:</b>	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i> : Fibroblastos embrionarios de ratón
<b>MHC</b>	<i>Major histocompatibility complex</i> : Complejo Mayor Histocompatibilidad
<b>MIAMI</b>	<i>Marrow isolated adults multilineage inducible cells</i> : Células aisladas de la MO adulta inducibles a múltiples líneas
<b>MIF</b>	<i>Macrophage migrating inhibiting factor</i> : Factor inhibidor de la migración de macrófagos.
<b>MLC-2A</b>	<i>Myosin Light Chain 2 Atrial</i> : Cadenas ligeras de miosina 2 Atrio
<b>MLC-2V</b>	<i>Myosin Light Chain 2 Ventricular</i> : Cadenas ligeras de miosina 2 del ventrículo
<b>MO</b>	Médula ósea
<b>MSC</b>	<i>Mesenchymal Stem Cell</i> : Células Madre Mesenquimales
<b>MTT</b>	<i>(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> : Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<b>MYL7</b>	<i>Myosin light chain 7</i> : cadena liviana de miosina 7
<b>MyoD1</b>	<i>Myogenic differentiation 1</i> : Diferenciación miogénica 1
<b>Myc</b>	<i>Myelocytomatosis viral oncogene homolog protein</i> : Proteína homóloga al encogen viral de la mielocitomatosis.
<b>NCAM</b>	<i>Neural cell-adhesion molecule</i> : Moléculas de adhesión celular neural
<b>NES</b>	Nestina
<b>NeuN</b>	<i>Neuron-specific nuclear protein</i> : Proteína Nuclear específica de Neurona

<b>NF-M:</b>	<i>Neurofilament medium polypeptide</i> : Polipéptidos de neurofilamentos medios
<b>NKx 2.5</b>	<i>Transcription factor related to locus 2</i> : Factor de Transcripción relacionada al locus 2
<b>Nkx 2.2</b>	<i>Protein Nk-2 homologous B</i> : Proteína Nk-2 Homologo B
<b>NSE</b>	<i>Neuron-specific enolase</i> : Enolasa específica de neuronas
<b>NT-3</b>	<i>Neurotrophin-3</i> : Neurotrofina 3
<b>OCT-4</b>	<i>Octamer binding transcription factor-4</i> : Factor de Transcripción de unión a octámero
<b>OSM</b>	<i>Oncostatin M</i> : Oncostatina M
<b>OTC</b>	<i>Ornithine transcarbamylase</i> : Ornitina-transcarbamilasa
<b>PAX-6</b>	<i>Paired box homeotic gene 6</i>
<b>PCR</b>	<i>Polimerase chain reaction</i> : Reacción en cadena de la Polimerasa
<b>PECAM</b>	<i>Platelets endotelial cell adhesión molecule – 1</i> : Molécula 1 de adhesión célula endotelial-plaqueta
<b>Pdx-1</b>	<i>Pancreas duodenum homeobox-1</i>
<b>PEPCK</b>	<i>Phosphoenolpyruvate Carboxykinase</i> : Fosfo-enol-piruvato carboxiquinasa
<b>PKC</b>	<i>Protein kinase C</i> : kinasa de proteína C
<b>PTEN</b>	<i>Phosphatase and tensin homolog protein</i> : Fosfatasa y proteína homóloga a tensina
<b>p53</b>	Proteína p53
<b>RA</b>	<i>Retinoic acid</i> : Acido Retinóico
<b>REX-1</b>	<i>Rex-1 (Zfp-42) gene</i> :
<b>SSEA</b>	<i>Stage specific embryonic antigens</i> : Antígenos embrionarios específicos de estadio

<b>SLPI:</b>	<i>Secretory leukocyte proteinase inhibitor:</i> inhibidor de proteasa secretada del leucocito
<b>SKPs:</b>	<i>Skin progenitor cells:</i> Células Progenitoras derivadas de la piel
<b>SOX2</b>	<i>Sex determining region Y-box 2,</i>
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TAT</b>	<i>Tyrosine aminotransferase:</i> Tirosina aminotransferasa,
<b>EMT</b>	<i>Epithelial mesenchymal transition:</i> Transición epitelio-mesénquima
<b>TERF1</b>	<i>Telomeric repeat binding factor:</i> Factor de unión a repeticiones teloméricas
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math>:</i> Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>TIMP</b>	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases:</i> Inhibidores tisulares de metalo-proteinasas
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor:</i> Factor de necrosis tumoral
<b>TNNT</b>	<i>Troponin T:</i> Troponina T
<b>TRA1-60:</b>	<i>Tumor reject antigen 1-60:</i> Antígeno de rechazo de tumor 1-60
<b>TRA1-81:</b>	<i>Tumor reject antigen 1-81:</i> Antígeno de rechazo de tumor 1-81
<b>TRAIL</b>	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand:</i> Ligando inductor de apoptosis relacionada al TNF
<b>TTR</b>	<i>Transthyretin:</i> Transtiretina
<b>USSCs:</b>	<i>Unrestricted somatic stem cells:</i> Células madre somáticas no restringidas
<b>UTF1;</b>	<i>Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1:</i> Factor de transcripción de células embrionarias indiferenciadas.
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor:</i> Factor de crecimiento endothelial vascular



<b>VE-cadherin</b>	<i>Vascular endothelial-cadherin</i> : Molécula de adhesión endotelio vascular-caderina
<b>WAF1</b>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i> : Inhibidor Ciclina dependiente de kinasa

## ***INTRODUCCIÓN***

## 1. CONCEPTOS BÁSICOS SOBRE LAS CÉLULAS MADRE.

### 1.1. Origen del término “stem cell” (Célula Madre):

Según Ramalho M. y Willenbring H. (20) el término “*stem cell*” fue introducido en la literatura científica en 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, e igualmente para definir el huevo fertilizado que daba origen a todas las células del organismo. Según estos investigadores, el mismo término fue utilizado en 1892 por Theodor Boveri para denominar un estadio intermedio entre el huevo fertilizado y las células germinales comprometidas, y por Valentín Häecker para definir una gran célula precursora que por división asimétrica originaba células mesodérmicas y células germinales. Cuatro años más tarde, el término fue popularizado por Edmund B. Wilson quien basado en los trabajos de Häecker y Boveri lo introdujo en la literatura americana con el mismo sentido de célula precursora de línea germinal, por lo que muchos creen que el término fue acuñado por él.

Según la citada fuente (20), más o menos para la misma época, con motivo de las investigaciones sobre el desarrollo y regeneración del sistema hematopoyético, el término *stem cell* conjuntamente con otros, fue propuesto por los 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. Así, según los citados

investigadores, Pappenheim utilizó el término *stem cell* en 1896 para describir el precursor celular capaz de dar origen a los glóbulos rojos y a los glóbulos blancos. Para esa época el término no tuvo gran difusión, pues persistía el debate acerca de la existencia o no de una célula madre hematopoyética común. Este debate se mantuvo durante varias décadas hasta que los trabajos de James Till, Ernest McCulloch, Andy Becker y otros en los años 60 proporcionaron las evidencias a favor de un precursor común (21, 22). La demostración de la existencia de las células madre hematopoyéticas ubicó a estas células en la categoría de prototipo de células madre por su capacidad de proliferar (auto-renovarse) y de dar origen a células especializadas (diferenciarse). Desde entonces este es el sentido en que se ha utilizado el término.

### **1.2. Definición:**

Las “*stem cells*”, células madre o células troncales se definen genéricamente como células indiferenciadas con capacidad de auto-renovación y de diferenciación hacia células progenitoras o precursoras de una o varios tipos celulares específicos (23-25).

A pesar de la amplia difusión de esta definición durante más de 40 años, sus criterios no están libres de controversias. Algunos investigadores consideran que es una definición de exigencias mínimas que no permite distinguir claramente las células madre de otras células que se dividen, por lo que sugieren añadirle criterios más estrictos, como la capacidad de auto-renovación durante toda la vida de un organismo y la contribución sustancial a un tejido. Otros opinan que la aceptación de una definición

más estricta dejaría fuera a la mayoría de las actualmente denominadas células madre, las cuales pasarían a llamarse células progenitoras (24), como ejemplo citan las células madre de la cresta neural que representan una población transitoria; las células del blastocisto, que no exhiben una auto-renovación prolongada a lo largo de la vida del organismo, y las células madre de los tejidos sólidos cuya contribución al órgano puede estar limitada a una región particular (24).

Cualesquiera sean los criterios exigidos, la definición básica tiene implícito el modelo jerárquico que plantea que usualmente entre la célula madre y su progenie completamente diferenciada hay una población intermedia de progenitores comprometidos con capacidad proliferativa limitada y potencial de diferenciación restringido. Estos progenitores comprometidos son seguidos por una progenie más diferenciada que gradualmente va perdiendo su potencial de proliferación mientras va madurando y adquiriendo funciones específicas. La función de esas poblaciones intermedias y transitorias es aumentar el número de células diferenciadas producidas por cada división de una célula madre, lo que significa que aunque una célula madre tenga una alta capacidad de auto-renovación, puede realmente dividirse con poca frecuencia (23, 24).

Otros investigadores (26, 27), no aceptan los criterios de auto-renovación y diferenciación como las características definitorias básicas de las células madre y tampoco aceptan la organización jerárquica de los sistemas basados en células madre, los cuales se han derivado fundamentalmente de la estructura del sistema hematopoyético. Consideran que las propiedades esenciales de la célula madre son la

plasticidad y la trans-diferenciación, entendiendo por plasticidad la habilidad de las células madre de cruzar la barrera de tejido y dar origen a otras células de la misma capa germinal y, por trans-diferenciación, la capacidad de dar origen a células provenientes de otra capa germinal embrionaria. Esta definición va pareja con la noción de “estado de célula madre” que asume que la célula madre no es una entidad, sino una fase dentro del ciclo de vida de la célula. La célula madre puede estar en un estado proliferativo, de diferenciación, o en fase de alta plasticidad para responder a claves ambientales que alteran sus características e imitar las propiedades y respuestas de una célula madre de cualquier tejido en particular. Cualquier célula tiene el potencial para entrar en el estado de célula madre (26, 27).

Aunque la controversia no está resuelta, la mayoría de los investigadores parece decantarse por la definición de criterios mínimos y aceptar el sistema de organización jerárquico. Células que satisfacen los criterios mínimos de definición han sido virtualmente identificadas en todos los tejidos y en la mayoría de los estadios de desarrollo (24).

### **1.3 Tipos de células Madre:**

Durante el desarrollo humano, desde la embriogénesis hasta el estado adulto, se originan células madre que por convención se ubican en diferentes categorías de acuerdo a su capacidad para diferenciarse en otros tipos de células (potencialidad) y de acuerdo al estado de desarrollo del tejido del cual se originan (origen).

### 1.3.1 Clasificación por su potencialidad (28)

**1.3.1.1 Células Madre Totipotentes:** son aquellas células que tienen el potencial genético para formar todos los tipos celulares de un ser completo, así como los tejidos extra-embrionarios (placenta y anexos placentarios). En los humanos, el ejemplo típico es el cigoto o huevo y las células resultantes de las primeras divisiones embrionarias, hasta un estadio de división de ocho células.

**1.3.1.2 Células Madre Pluripotentes:** son aquellas que tienen el potencial para dar origen a las células de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo), incluyendo a las células germinales, pero no el potencial necesario para todos los tejidos extra-embrionarios. El ejemplo representativo es la masa de células internas del blastocisto, que es una estructura embrionaria que se forma 5 a 7 días después de la fecundación, antes de la implantación en el endometrio.

**1.3.1.3 Células Madre Multipotentes:** son aquellas que tienen el potencial genético para formar células restringidas en su origen a una capa embrionaria particular (ectodermo, mesodermo o endodermo). Se definen como células específicas de línea y usualmente se denominan de acuerdo al tejido de origen, ejemplo: células hematopoyéticas, endoteliales, hepáticas, mesenquimales de MO, de grasa, etc.

**1.3.1.4 Células Madre Oligopotentes:** son células capaces de originar dos o más líneas dentro de un tejido. Ejemplo, las células madre neurales que pueden dar origen a un subconjunto de neuronas en el cerebro.

**1.3.1.5 Células Madre Unipotentes:** son células que dan origen a una sola línea celular. Ejemplo, las células madre espermatozógenas.

Según la noción prevalente, el cigoto totipotente da origen a células madre embrionarias pluripotentes y éstas a su vez producen células madre específicas de tejido que primero son multipotentes y eventualmente oligo-potentes o monopotentes. Esta noción implica una disminución en la potencia de las células madre a medida que se progresa en el desarrollo y maduración. No obstante, en los últimos años se han propuesto modelos alternativos basados en la existencia de células madre pluripotenciales en tejidos adultos a lo largo de toda la vida del individuo, como las MAPC: *Multipotential adults progenitor cells* (Células Progenitoras Adultas Multipotenciales) obtenidas de cultivos prolongados de células mononucleares de MO, así como de músculo y cerebro; las SKPs: *Skin Progenitor Cells* (Células Progenitoras derivadas de la piel); las USSCs: *Unrestricted Somatic Stem cells* obtenidas de sangre de cordón umbilical entre las 34 y 42 semanas de gestación; las MIAMI: *Marrow isolated adults multilineage inducible cells* (Células aisladas de la MO adulta inducibles a múltiples líneas) obtenidas de la MO, etc. Se ha considerado que estas células con la potencialidad para diferenciarse en células maduras que podrían ser irrelevantes para el tejido en el cual existen, podrían representar depósitos de reservas que se activarían y migrarían para satisfacer necesidades en otras partes del cuerpo (26, 29) .

### 1.3.2 Clasificación por su origen:

**1.3.2.1 Células Madre Embrionarias:** conocidas por sus siglas en inglés ESC: *Embryonic Stem Cells*, son células con capacidad de auto-renovación esencialmente ilimitada y pluri-potencialidad para generar derivados de las tres capas germinales que



dan origen a todos los tipos de células adultas del organismo (10, 11). Se conocen desde 1981 cuando dos grupos simultánea e independientemente lograron su derivación a partir de embriones de ratón (mESC: *mouse Embryonic Stem Cell*) (30, 31). Más tarde, en 1998 Thomson y col. publicaron la primera derivación en humanos (hESC: *human Embryonic Stem Cell*) (10). Actualmente se sabe que ambos tipos de células difieren ampliamente en muchos aspectos biológicos y que no es posible una extrapolación de resultados entre ellas (32).

Las hESC se obtienen a partir de embriones humanos frescos o congelados producidos por fertilización *in vitro* para el tratamiento de parejas infértiles, que exceden las necesidades de los pacientes y que son donados tras un consentimiento informado y aprobación por los comités de ética. Estos embriones usualmente se cultivan hasta el estado de blastocisto, estructura que bajo circunstancias de desarrollo embriológico normal ocurre entre los 5 y 7 días de la fertilización y que está formada por una masa de células internas, una cavidad blastocística y una pared externa de células trofoblásticas (10, 11).

Las hESC se derivan a partir de la masa de células internas del blastocisto aislada mecánicamente o por inmuno-cirugía con antisueros; a partir de embriones humanos en estado de mórula, o a partir de blastocistos intactos tras quitarles con solución ácida o por digestión enzimática, la envoltura lipoprotéica conocida como zona pelúcida, (10, 12). Según diferentes investigadores, cualquiera de los tres métodos produce igual eficacia en la derivación de las hESC cuando el crecimiento se hace sobre fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs: *Mouse embryonic fibroblasts*) (11, 12).

Las células de la masa de células internas de embriones humanos co-cultivadas con fibroblastos embrionarios mitóticamente inactivos de ratón dan origen a colonias de hESC, que son colonias típicas de células indiferenciadas, redondeadas, muy apretadas, con un nucléolo prominente y una relación núcleo-citoplasma muy alta, que necesitan ser sub-cultivadas semanalmente o antes, en grupos de 10 células aproximadamente, y que pueden mantener una capacidad de expansión ilimitada (10-12).

Además de los fibroblastos embrionarios de ratones, como soporte nutricional ("*feeder layer*") de estas colonias, también se han utilizado células procedentes de líneas humanas como fibroblastos embrionarios, células del endometrio, fibroblastos de la piel, células de la MO, hESC diferenciadas, u otros tipos de células humanas disponibles comercialmente (10, 12). Incluso, se ha logrado la derivación en condiciones libres de células nutricias empleando lisados de fibroblastos embrionarios murinos (33).

Algunos investigadores consideran que las hESC son esencialmente generadas en los sistemas de cultivos, y que la propiedad de auto-renovación indefinida es una propiedad adquirida en dichos medios. Afirman que ninguna célula pluripotencial muestra periodos de auto-renovación tan largos *in vivo*, y que es probable que las hESC al entrar en contacto con señales extrínsecas a las que pudieran no haber sido expuestas nunca *in vivo*, se adaptan a estas condiciones y adquieren una función nueva que les permite proliferar indefinidamente en estado indiferenciado (34). Otros señalan que dado que estos cambios *in vitro* parecen inevitables, lo importante es conocer con qué tipo de células del embrión *in vivo* están relacionadas, plantean que el equivalente

más cercano a la hESC es una célula germinal primordial (35). La mayoría acepta que las hESC se originan del epiblasto, derivado a su vez de la masa de células internas del blastocisto y que se mantienen como un tipo de célula inmortal y pluripotencial bajo condiciones estrictas de laboratorio en presencia de productos secretados por las células somáticas embrionarias o adultas (11).

Las hESC expresan marcadores de superficie comunes a las células pluripotenciales e indiferenciadas, tales como antígenos embrionarios 3 y 4 específicos de estadio (SSEA: *Stage Specific Embryonic antigens 3 and 4*), antígenos de rechazo a tumor (TRA1-60: *Tumor Reject Antigen 1-60* y TRA1-81), CD9 (Proteína miembro de la superfamilia transmembrana 4), CD24 (P-selectin), Thy-1 (CD90), GFA1 (*glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase*), antígenos de histocompatibilidad clase 1 (MHC-1), fosfatasa alcalina, así como factores de transcripción de importancia reconocida en la pluripotencialidad Oct-4, Nanog, Sox-2, Fox-3, Rex-1, Utf-1; modificadores del ADN: TERF1 (*Telomeric repeat binding factor*: Factor de unión a repeticiones teloméricas); CHK2 (*checkpoint of the cell cycle*: punto de control del ciclo celular); DNMT3 (*DNA methyltransferase 3*: metil transferasa del ADN) (10-12, 36).

Cuando las colonias de las hESC se cultivan *in vitro* por tiempos prolongados en ausencia de células nutricias secretoras, se diferencian espontáneamente produciendo un amplio rango de tipos celulares en diferenciación que incluyen células neuroectodérmicas, mesodérmicas y endodérmicas (10-12), las cuales si se re-introducen en embriones en estadios precoces se integran a él y dan lugar a células de la mayoría de los tejidos y órganos, incluyendo la línea germinal.

Cuando las hESC se cultivan en suspensión, en sistemas que no favorecen la unión ni la adhesión a los frascos de cultivo, se forman unas estructuras denominadas Cuerpos Embriones (EB), que son esferas que contienen diferentes tipos de células progenitoras más diferenciadas (11, 12), que pueden disgregarse por técnicas enzimáticas y subcultivarse, lográndose el aislamiento y diferenciación de cada tipo en particular.

La evaluación de la pluripotencialidad de las líneas de hESC se investiga *in vivo* por su capacidad de inducir la formación de teratomas en ratones inmunocomprometidos, e *in vitro* por la habilidad para la formación de EB (35). A pesar de ser una prueba meramente cualitativa, la formación de teratomas se considera el estándar de oro, pues aún no conoce completamente el estado transcripcional y epigenético responsable de la pluripotencialidad y auto-renovación de las ESC (11, 34).

Las líneas de hESC se obtienen por la selección y expansión de colonias individuales de morfología uniforme e indiferenciada, no obstante, hasta ahora no se ha derivado ninguna línea por la expansión clonal de una sola célula (10-12, 36). Todas las líneas de ESC expresan altos niveles de actividad de la telomerasa durante largos períodos en los cultivos, esta enzima añade secuencias repetidas de ADN a los telómeros.

El aumento de la diferenciación de las hESC hacia cualquier línea en particular puede obtenerse por diferentes vías, entre ellas: activación de factores de transcripción endógenos, transfección con factores de transcripción, exposición a factores de

crecimientos seleccionados ó co-cultivo con tipos de células capaces de inducción de linaje (11, 34, 36).

Para la propagación y mantenimiento a largo plazo de las líneas de hESC y para reducir su diferenciación espontánea se han utilizado sistemas de cultivos libres de suero y de células nutricias que contienen sustitutos del suero, factor de crecimiento fibroblástico básico (b-FGF), factor de crecimiento transformador beta (TGF- $\beta$ ), factor inhibidor de leucemia (LIF), fibronectina de la matriz extracelular, etc., ello ha permitido plantear que las vías de señalización para la auto-renovación probablemente involucren a estos factores,, y según información reciente, a la vía de señalización de la familia Wnt (9, 36). La desventaja de mantener las colonias de hESC por largo tiempo en cultivo es que pueden desarrollar inestabilidad cromosómica (11, 36, 37).

En teoría la progenie derivada de las hESC podría constituir una fuente fácilmente disponible para obtener un gran número de células eventualmente utilizables en medicina regenerativa, sin embargo, el mayor obstáculo para el éxito y seguridad en el uso clínico de estas células es la posibilidad de rechazo inmune y la formación de teratomas o terato-carcinomas *in vivo* en los receptores, debido a la presencia de células hESC pluripotenciales e indiferenciadas residuales en los trasplantes (1, 10, 11).

Hasta ahora en todo el mundo se han desarrollado muchas líneas de hESC, no solo con el propósito de desarrollar los métodos para la producción de un número adecuado de células diferenciadas para su eventual utilización en medicina regenerativa, sino también para cubrir el amplio espectro de antígenos de trasplantes.

Las líneas de hESC se han considerado muy importantes para el estudio del desarrollo embrionario temprano, así como para la terapia génica y para la investigación de nuevas drogas y evaluación de sus efectos tóxicos, puesto que cada línea representa un complemento genético humano único (36, 37)

#### **1.3.2.2 Células Madre Fetales:**

En la literatura reciente se incluyen en la categoría de células madre adultas, para diferenciarlas de las células embrionarias. Algunos utilizan el término de células madre fetales para referirse a las células madre adultas que se obtienen de los tejidos fetales antes del nacimiento (38). Otros las definen como células multipotenciales obtenidas de fetos abortadas antes de la semana 12 (39). Al parecer tienen un potencial de expansión y diferenciación mayor que el de las células adultas, pero menor que el de las células embrionarias, con la ventaja adicional de no formar teratomas *in vivo* (39).

Existen trabajos recientes que señalan la posibilidad de utilizar células madre fetales o sus progenitores en la regeneración de tejidos. De manera particular se ha señalado que el hígado fetal humano constituye una fuente alternativa de células madre hematopoyéticas (39). E igualmente, se ha señalado el empleo de células madre neurales obtenidas de cerebro humano fetal en el tratamiento de enfermedades neurológicas como la Enfermedad de Parkinson (EP) y la sección de la médula espinal (40).

Existen profundas controversias legales y éticas sobre la utilización de fetos abortados para la investigación de células madre. Estas controversias abarcan todo lo relacionado con la legalidad o no del aborto, la práctica de abortos, las presiones que se

pueden generar sobre las madres para lograr más abortos, las regulaciones que deben regir la colección de los fetos abortados, etc., etc. (41). Los defensores del uso de células madre fetales consideran que millones de fetos son abortados cada año y que esta situación probablemente siga igual independientemente de que se autorice o no la investigación con células fetales. Señalan que ya se han realizado múltiples ensayos en animales con resultados satisfactorios y que probablemente estos mismos resultados puedan lograrse en humanos. Los opositores, consideran que no es solo una desacralización de la vida humana, sino que puede representar un estímulo para la práctica de abortos, además de que los ensayos no han producido buenos resultados.

#### **1.3.2.3 Células Madre Adultas:**

La palabra “adultas” significa que las células se obtienen a partir de un organismo completamente desarrollado, puede ser un adulto, un niño, la placenta, un feto o un recién nacido. En la literatura se conocen también como Células Madre Somáticas.

Son células que tienen una capacidad proliferativa y un potencial de diferenciación menor que el de las células embrionarias. En general son células multipotenciales u oligopotenciales presentes en la mayoría de los tejidos y órganos de los mamíferos, donde cumplen funciones críticas proporcionando los tipos de células maduras que requieren dichos tejidos a lo largo de la vida, bajo condiciones homeostáticas y patológicas. Ejemplos de ellas son: las células hematopoyéticas de la MO, las células mesenquimales presentes en diversos tejidos, las células endoteliales, neurales, intestinales, pancreáticas, hepáticas, etc. Aunque no se dispone de una

información detallada para las células madre derivadas de todos los tejidos, las evidencias preliminares parecen indicar un patrón de desarrollo y organización similar (23, 24).

Se ha considerado que las células madre adultas, independientemente del tejido de origen y de su habilidad para la diferenciación, se enfrentan al mismo tipo de retos. Todas necesitan regular su ciclo celular para cumplir períodos de rápida división, mantener la auto-renovación, entrar en períodos de quiescencia o evitar la senescencia, y todas tienen que mantener la integridad genómica para evitar la acumulación de mutaciones genéticas y la transformación neoplásica. Se acepta que estas funciones son reguladas por mecanismos más o menos similares en todas las células madre (24).

Las células madre adultas generalmente se localizan junto con células de soporte en regiones específicas de cada tejido u órgano denominadas nichos, los cuales representan un microambiente tisular especializado donde las células madre establecen interacciones complejas y recíprocas con las células de soporte y con la matriz extracelular a través de la formación de uniones adherentes mediadas por caderinas, cateninas, integrinas, selectinas y sus ligandos, moléculas de adhesión, receptores para factores de crecimiento y quimioquinas, etc., así como a través de la secreción de diversos factores solubles y la participación de mecanismos de interacción celular no mediados por adhesión (Wnt/frizzled, Notch/Delta-Jagged) que contribuyen a la movilidad restringida de la célula madre y a la adopción de un estado quiescente o la adquisición de un estado activado dentro del nicho (6, 23, 42).



La estricta regulación del balance entre el estado quiescente y el estado de auto-renovación de la célula madre adulta se ha demostrado que está controlada por vías genéticas intrínsecas activadas por una red compleja de señales extrínsecas mediadas a través de moléculas de adhesión e interacciones moleculares. Estos factores pueden estimular o frenar la auto-renovación y/o la diferenciación de las células madre adultas bajo condiciones fisiológicas y patológicas. Las vías de señalización que se activan tras algunas uniones adherentes involucran a la familia Rho de pequeñas GTPasas (Guanosinas Trifosfatasa), incluyendo Rho, Rac y Cdc42. Las dos últimas pueden regular positivamente la adhesión celular, mientras que Rho tiene propiedades opuestas y participa en la proliferación celular, estimulando la progresión del ciclo celular a través de G1 y S. Estos pasos a su vez son regulados por diversos factores, como KIP1 (*cyclin-dependent kinase inhibitor: p27*), WAF1 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1: p21*), PTEN (*phosphatase and tensin homolog protein: fosfatasa y proteína a tensina*), p53 (proteína p53), Myc (*myelocytomatosis viral oncogene homolog protein: proteína homóloga al oncogen viral de la mielocitomatosis*), etc. (24, 42).

Según el modelo jerárquico de organización de los sistemas de células madre, la división simétrica de dichas células conduce a su expansión dentro de los nichos, mientras que la división asimétrica genera una célula madre y una célula progenitora hija comprometida, conocida como célula amplificadora rápidamente proliferativa. Estas células a su vez dan origen a células más diferenciadas y finalmente a células maduras con funciones específicas dentro del tejido/órgano del cual se originan (6, 23, 24, 42). Se asume que la misma estrategia de proliferación, auto-renovación y

diferenciación es utilizada por diferentes poblaciones de células madre y en este sentido, recientemente se han identificado una serie de factores de transcripción pertenecientes a la familia de los genes HOX (HOX B4, HOX B9, HOX b10), SOX, y CdX (CdX2, CdX4) que parecen regularse positivamente durante la auto-renovación y la proliferación, y negativamente durante la diferenciación celular (24).

A pesar de las similitudes señaladas, se acepta que las células madre no son idénticas y que sus respuestas dependen en parte del nicho ambiental y de factores como la inactivación del cromosoma X, patrones de metilación, genes heterocronios que regulan los tiempos de desarrollo, longitudes del telómero, etc., así como, de marcadores propios que predicen su habilidad para tener o no una tasa de recambio alta en condiciones fisiológicas o para diferenciarse hacia un tipo particular de célula (24, 43). Como ejemplo de estas particularidades haremos algunos señalamientos sobre las células madre mesenquimales (MSC: *Mesenchymal Stem Cell*).

Las MSC son células madre que carecen de marcadores específicos *in vivo* que permitan reconocer su localización anatómica y su distribución o la de sus progenitores (44). A pesar de la intensa investigación realizada no se conoce el nicho o los nichos de estas células. Inicialmente se aislaron de la MO, donde se supone que comparten un nicho común con las HSC, pero con diferencias en las señales extra-celulares y/o intercelulares requeridas para mantener sus respectivos programas de células madre. Posteriormente se han aislado de otros tejidos como trabéculas óseas, tejido adiposo, tejido sinovial, músculo esquelético, pulmones, pulpa dental, placenta, etc. Actualmente se acepta que virtualmente residen en todos los órganos y tejidos, y que existe un nicho

ubicuo, probablemente peri-vascular, pero las interacciones celulares, bioquímicas y moleculares de estas células con su(s) nicho(s) no se conocen (13, 25, 44, 45).

El estándar de oro utilizado para identificar a las MSC es la producción de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (UFC-F), las cuales se observan en los cultivos como células en forma de huso, adherentes, que proliferan formando colonias con capacidad de expansión y de diferenciación multipotencial hacia células de estirpe mesodérmica (ostecitos, adipocitos y condrocitos), y según diversas publicaciones también hacia células de estirpe ectodérmica y endodérmica (44, 45).

El potencial de auto-renovación absoluto de las MSC continúa siendo una pregunta abierta, debido en parte, a la diferencia en los métodos utilizados para obtener poblaciones de MSC y para evaluar su capacidad de proliferación. Diversas investigaciones han concluido que las MSC y los clones aislados son heterogéneos en relación a su capacidad de auto-renovación (44).

La heterogeneidad en su capacidad de auto-renovación y potencial de diferenciación se ha considerado como evidencia de que el pool de MSC obtenido de cualquier fuente podría estar integrado por sub-poblaciones con diferentes estadios de diferenciación, (como las HSC de la MO), y en cierta forma se ha tomado para fundamentar un sistema de organización jerárquico similar al de las HSC. Los mecanismos moleculares que controlan la diferenciación tampoco se conocen (44).

Como se ha señalado, las células madre adultas por definición son células multipotenciales, cuya potencialidad está limitada a células de un mismo tejido o a tipos celulares de una misma capa embrionaria. No obstante, bajo condiciones de cultivo

apropiadas, algunas de estas células tienen una capacidad de diferenciación mayor y son capaces de cruzar los límites de linaje y adoptar la expresión de perfiles fenotípicos y funcionales de tejidos procedentes de una misma capa germinal o de capas germinales diferentes. Este fenómeno, al que ya se ha hecho referencia, se denomina versatilidad, plasticidad o capacidad de trans-diferenciación (24-26). Ejemplos se tienen en las HSC y las MSC de diferentes orígenes (7, 15, 19, 46, 47).

De igual forma, se ha señalado que en algunos órganos pueden existir células madre adultas pluripotenciales con capacidad de diferenciarse en tejidos derivados de cualquiera de las capas embrionarias. El ejemplo más típico es el de las Células Progenitoras Adultas Multipotentes (MAPC), cuya potencialidad parece similar a la de las células embrionarias. Las MAPC se han aislado en cultivos prolongados (después de 20 a 40 duplicaciones de la población celular) tanto de MO humana como de rata y ratones y son capaces de proliferar *in vitro* más de 120 divisiones celulares sin aparente envejecimiento ya que mantienen niveles altos de telomerasa durante todo el tiempo de cultivo. Al igual que en las células madre embrionarias, en las MAPC se detectan los marcadores de superficie SSEA-3 y SSEA-4 y los factores de transcripción Oct-4, Nanog y Sox-1. *In vitro* las MAPC pueden inducirse hacia la diferenciación a tejidos derivados del mesodermo como hueso, cartílago, adipocitos, músculo esquelético, estroma hematopoyético o endotelio, e igualmente, hacia células derivados del endodermos como hepatocitos y del ectodermo como neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (48).

Fuera de la MO, se ha señalado la existencia de células madres adultas pluripotenciales en músculo, cerebro, sangre de cordón umbilical y en la membrana

amniótica (15-18, 49). De esta última trataremos en extenso en el apartado siguiente por ser el objeto de nuestra investigación.

Finalmente para concluir con los aspectos básicos de las células madre adultas, recientemente se han publicado técnicas que permiten la producción de células madre pluripotentes inducidas (iPSC: *induced pluripotent stem cell*) a partir de células somáticas completamente diferenciadas, las cuales al igual que las ESC pueden diferenciarse en todos los tipos de células adultas.

**1.3.2.4. Células Madre Pluripotentes Inducidas (iPSC):** Takahashi y Yamanaka a través de la sobre-expresión transitoria en fibroblastos totalmente diferenciados de diferentes combinaciones de 24 genes con influencia conocida en la pluripotencialidad de las ESC del ratón, identificaron cuatro factores de transcripción (Oct3/4, Sox2, Klf4, y c-Myc), conocidos como OSKM, cuya expresión fue suficiente para generar células pluripotentes a partir de células somáticas (9). A estas células las denominaron iPSC (*Induced pluripotent stem cells*: Células Madre Pluripotentes Inducidas). El fenómeno fue ampliamente reproducido por otros investigadores igualmente en sistemas murinos (50, 51) y un año más tarde por el mismo grupo en fibroblastos humanos (9).

Actualmente con estos y otros protocolos optimizados se han producido líneas de iPSC esencialmente indistinguibles de las ESC (52-54), y varios grupos están trabajando para generar iPSC a partir de diversas células, incluyendo de progenitores hematopoyéticos movilizados en sangre periférica y de sangre de cordón umbilical (55-57). De estos trabajos se ha hecho evidente que la edad, el origen y el tipo celular tienen un profundo impacto en la eficiencia de reprogramación, y que en algunas

circunstancias se requiere la expresión de un número menor de factores y/o reducir el tiempo del proceso total. Recientemente, el grupo de Juan Carlos Izpisua del Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona ha publicado la reprogramación de células madre CD133 de sangre del cordón umbilical hacia células pluripotenciales solo con dos factores de transcripción (Oct3/4, Sox2) (58).

Se considera que la tecnología de las células iPS ha creado un nuevo rumbo en el campo de la investigación de las células madre y ha generado una atmósfera de tranquilidad para muchos investigadores al no requerirse de los tejidos embrionarios para generar células pluripotenciales.

Las iPSC pueden representar una fuente ideal de células para las terapias regenerativas del futuro, pues a través de su tecnología es posible crear modelos de enfermedades humanas a partir de las células de un paciente particular, con lo que se pronostica una apertura hacia una forma de terapia personalizada basada en células. Están por resolverse los problemas relacionados con el posible potencial oncogénico de las iPSC debido a que las mutaciones somáticas acumuladas durante la vida de las células de la cual provienen pasan hacia las iPSC durante la reprogramación.

## **2. CÉLULAS MADRE DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA**

### **2.1 La Membrana Amniótica (MA) o Amnios:**

Es la capa más interna de la placenta, la cual es una estructura de origen feto-materno, de forma discoidea, que a término mide aproximadamente 15 a 20 cm. de diámetro, 2 a 3 cm de espesor y pesa 500 a 600 g. Tiene dos caras: una, de origen fetal,

orientada hacia la cavidad amniótica, llamada placa coriónica e integrada por el amnios y el corion, y otra, la placa basal, formada por las deciduas (basal y parietal) de origen materno (59, 60) (Figura 1).

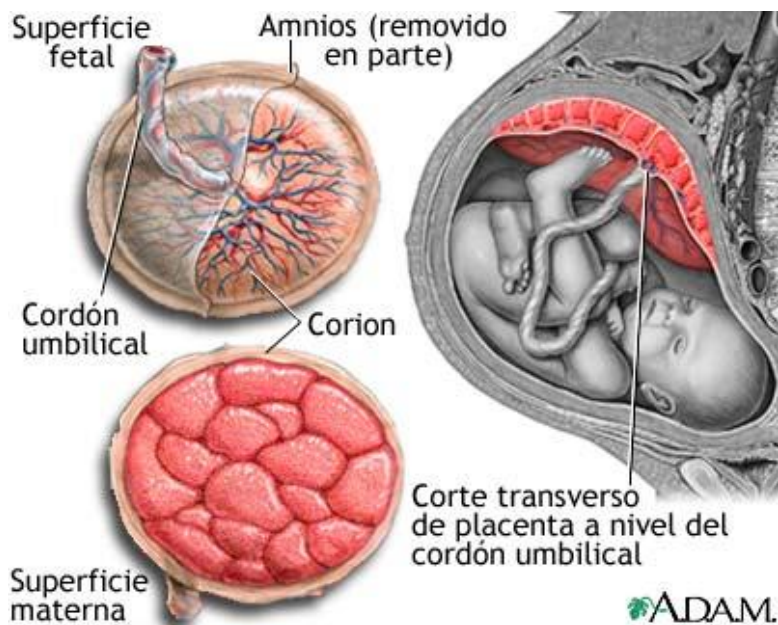


Figura 1. La placenta y sus caras fetal y materna.

Conjuntamente con el corion, la MA se extiende más allá de los márgenes del disco placentario para envolver al feto en la cavidad amniótica, brindarle protección durante su desarrollo y ofrecerle un ambiente de suspensión en el cual pueda crecer sin distorsión por presión de las estructuras que lo rodean. Ambas membranas facilitan el intercambio de gas y desechos y juegan un papel crítico como barrera de defensa contra infecciones, traumas y toxinas (59, 60).

La MA a término tiene una superficie de aproximadamente 700 a 1800 cm<sup>2</sup>, un peso de 15 a 35 g y un espesor que varía de 70 a 180 μm, según las gestantes y las diversas regiones del amnios. Es una membrana traslúcida compuesta por el epitelio

amniótico, la lámina basal, un estroma de tejido conectivo a-vascular denominado mesodermo amniótico en el que se distinguen dos partes, una a-celular y otra celular, y finalmente por una capa esponjosa que la separa del corion (59-62) (Figura 2).

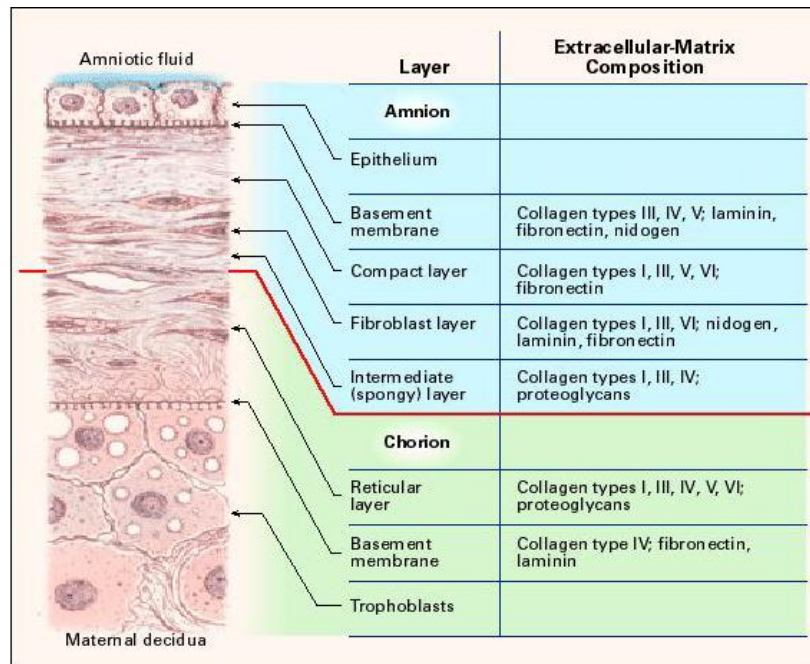


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de las membranas fetales a término. Tomado de Niknejad y col (2008).

El **epitelio amniótico** forma un tapizado simple, continuo, ininterrumpido, de células cilíndricas, cuboides o planas, en contacto con el líquido amniótico. Reposa sobre **una lámina basal** bien definida, compuesta de una malla de fibras de colágenos tipo III y IV, y glicoproteínas (lamininas, nidogen y fibronectina). Su cara interna guarda una relación compleja con las células epiteliales, dado que pequeños salientes romos y cortos del polo basal de dichas células se inter-digitan con procesos similares de la lámina basal. Su cara externa está conectada con el mesodermo amniótico, en cuya parte más proximal se distingue **una capa compacta, acelular**, relativamente densa,



probablemente la más fuerte de todas las capas amnióticas, compuesta de fibronectina, colágeno intersticial tipo I y III dispuestos en forma de haces paralelos, y colágeno tipo V y VI que forman conexiones filamentosas entre el colágeno intersticial y la membrana basal. Por fuera de ésta se encuentra **una capa dispersa de células estromales** de tipo fibroblastos y escasos macrófagos, embebidos en una malla de fibras reticulares. Más externamente, se encuentra una capa muy variable en espesor, que es **la capa intermedia o esponjosa** rica en elastina, proteoglicanos hidratados (especialmente perlecan), glicoproteínas que absorben agua, y fibras de colágeno predominantemente tipo III organizadas laxamente, que separa el amnios del corion (61, 62) (Figura 2). El amnios es uno de los pocos tejidos que carece de nervios, músculos y vasos linfáticos. Sus nutrientes son suplidos directamente por difusión desde el líquido amniótico y/o desde la decidua subyacente.

Se ha señalado que existen algunas diferencias en la estructura del amnios de acuerdo a su región: amnios placentario (ubicado sobre la placa coriónica), amnios libre (amnios de la membrana fetal extra-placentario) y amnios umbilical (que recubre la superficie del cordón umbilical) (60). Las células epiteliales del amnios placentario tienden a ser más cilíndricas que las del amnios libre y el estroma un poco más ancho. Estas diferencias, según algunos investigadores tienen implicaciones biológicas. En un estudio reciente (63) se ha demostrado que la síntesis de prostaglandinas, la liberación de citoquinas proinflamatorias y el perfil de expresión de genes, durante el trabajo de parto y fuera de él, fue diferente en el amnios placentario y el amnios libre. En base a

ello, los autores afirman que la estructura del amnios juega un papel importante no solo para mantener el embarazo, sino también para el inicio del parto (63).

La falta de homogeneidad en la estructura del amnios se ha señalado también como causa de la ruptura de las membranas observada en los embarazos a término. Esta ruptura se considera que ocurre de forma controlada en una zona de morfología alterada dentro del sitio del desgarro, donde la apoptosis de las células amnióticas y la inducción de una gelatinasa específica: metaloproteinasa (MMP-9) y de colagenasa conduce a la degradación del colágeno fibrilar y con ello a la ruptura de la MA, lo que generalmente desencadena las contracciones uterinas y el trabajo de parto (62). La ocurrencia anticipada de este fenómeno se tiene como causa de la entidad clínica denominada Ruptura Prematura de Membranas.

## **2.2 Origen de la MA:**

En los humanos el desarrollo de la placenta y sus membranas se inicia precozmente con la implantación del blastocisto a los 5 - 6 días de la fertilización. Para ese momento el blastocisto está formado por una masa de células internas (que posteriormente da origen a las tres capas germinales del embrión), una cavidad blastocística (que más tarde forma estructuras extra-embrionarias) y una pared externa de células trofoblásticas que al unirse al endometrio proliferan rápidamente y dan origen al citotrofoblasto (capa interna) y al sincitiotrofoblasto (externa) (Figura 3A). A medida que la implantación progresa (en la segunda semana de la fertilización), la masa de células interna se diferencia en dos capas de células: una, de células cilíndricas: el

epiblasto o ectodermo embrionario y otra de células cuboides: el hipoblasto o endodermo extra-embrionario (Figura 3B).

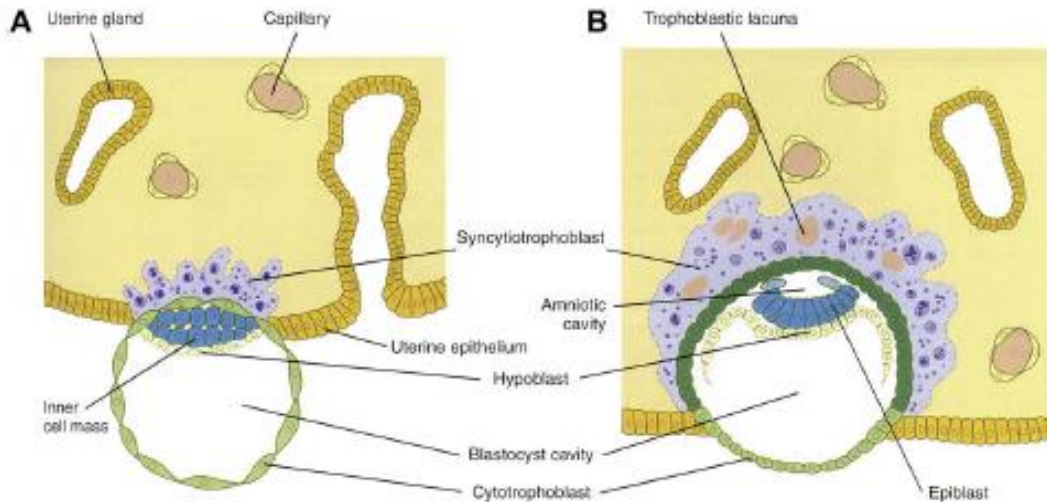


Figura 3. Origen del Amnios. Partes del blastocisto: Masa de células internas, Cavidad blastocística, Células Trofoblásticas (A). Capas de la Masa de Células internas: Epiblasto o ectodermo embrionario e Hipoblasto o endodermo extra- embrionario. Tomado de Ilancheran y col (2008).

Del epiblasto pluripotencial o ectodermo embrionario, aproximadamente el día 8 (mucho antes de la gastrulación), se origina el ectodermo amniótico o epitelio amniótico el cual es la primera estructura que se distingue del epiblasto inmediatamente después de la implantación. Para su formación, aproximadamente el día 7 u 8 tras la fertilización, las células del epiblasto comienzan a polarizarse y a re-ordenarse radialmente y aparece una pequeña cavidad, la cavidad pro-amniótica, en el punto donde las células del epiblasto convergen radialmente (Figura 4A). Las células del epiblasto aumentan numéricamente, adquieren una apariencia cuboide en el área donde están en contacto con las células del citotrofoblasto y cilíndrica en el área de contacto con el hipoblasto (endodermo extra-embrionario o endodermo primitivo). La cavidad aumenta, el número

de células del epiblasto se incrementa y se forma definitivamente la cavidad amniótica. Las células ectodérmicas que miran al citotrofoblasto constituyen el ectodermo amniótico o epitelio amniótico que rodea la cavidad amniótica, y el resto del ectodermo crece tangencialmente hacia el endodermo primitivo (Figura 4B).

En los humanos, el origen del mesodermo amniótico o extra-embrionario es objeto de controversias, pues se detecta en contacto con el ectodermo amniótico ya a los 10 a 12 días de la fertilización, y ello es incompatible con la gastrulación y la formación del mesodermo intra-embrionario que ocurre entre el día 15 y 16 tras la fertilización. Según plantea Dobrevá y col. en una revisión del tema (62), varios autores basados en estudios morfológicos y citológicos han señalado que el mesodermo amniótico tiene un origen extra-embrionario por delaminación del citotrofoblasto. Otros, basados en la identificación de una población de células localizadas en la proximidad del endodermo, señalan que proviene del hipoblasto o endodermo extra-embrionario primitivo y del "*primitive streak*": pequeño engrosamiento o mancha en el margen caudal del disco embrionario (Figura 4C Modelo A). Finalmente, los más recientes, consideran que el mesodermo amniótico, al igual que el mesodermo embrionario tienen su origen en el epiblasto, lo cual fundamentan con el hallazgo de células con trisomía en el epitelio amniótico y en el mesénquima de los tejidos fetales obtenidos de embarazos cuyas placentas presentan trisomía (Figura 4C Modelo B).

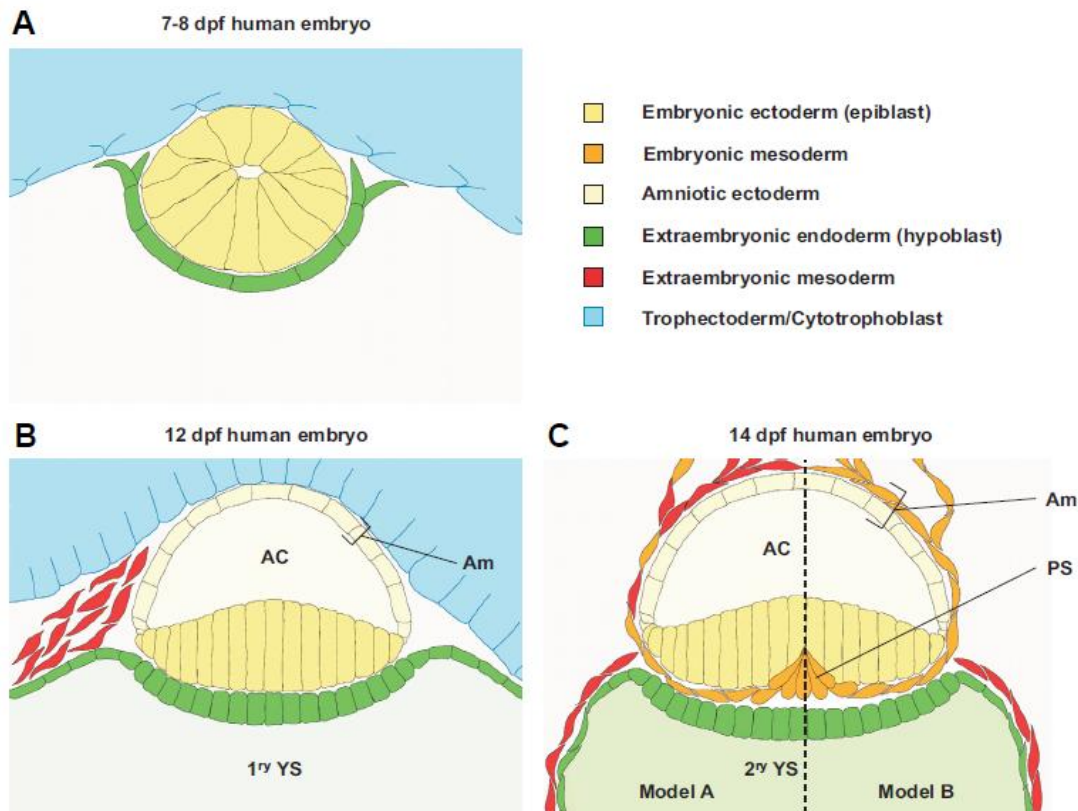


Figura 4. Representación esquemática de los estadios tempranos del desarrollo del amnios humano. (A) Corte transversal de un embrión humano 7-8 días tras la fertilización. (B) Corte transversal de un embrión humano 12 días tras la fertilización. (C) Corte trasversal de la región caudal del disco embrionario de un embrión humano a los 14 días tras la fertilización. AC: Amniotic cavity; Am: Amniotic membrane; YS: York sac; PS: Primitive streak.

Cualquiera sea su origen, el mesodermo extra-embrionario se organiza en un tejido conectivo que rodea a la cavidad amniótica, entre la segunda y tercera semana de la fertilización, dando origen al mesodermo amniótico y coriónico en cuyo lecho se encuentran las células estromales o mesenquimales (15, 62, 64) (Figura 2). Un origen común de las células epiteliales y las células mesenquimales a partir de las células pluripotenciales del epiblasto podría explicar las similitudes que, como veremos mas adelante, existen entre ellas.

A la tercera semana de la fertilización (días 15 a 17) ocurre la gastrulación, que es la fase en la cual el epiblasto se diferencia en las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo, que dan origen a todos los órganos y tejidos del embrión) y se desarrolla una forma definida con línea media y ejes corporales: cráneo-caudal, derecho-izquierdo y dorso-ventral (15, 59, 60, 62, 64)

### **2.3. Células epiteliales amnióticas:**

En la literatura reciente usualmente se les conoce por sus siglas en inglés: hAEC (*human Amniotic Epithelial Cells*) (19, 65).

Como se ha señalado previamente, las hAEC, son células predominante cuboides, que pueden hacerse cilíndricas en la zona que recubre el disco placentario, y aplanadas en diversas zonas del amnios. Su superficie apical o superficie interna, en contacto con el líquido amniótico, es ligeramente convexa con una serie de micro-vellosidades de la membrana celular a manera de borde en cepillo. La base o polo externo está en contacto íntimo con la membrana basal a través de una serie de inter-digitaciones que forman uniones de tipo hemi-desmosoma con múltiples filamentos. En sus contactos laterales las membranas de dos células adyacentes delimitan una serie de vacuolas irregulares, algunas de las cuales están conectadas por finos canales, otras confluyen entre sí. El núcleo normalmente es grande, único, irregular, usualmente fenestrado, con un nucléolo prominente. El citoplasma es abundante, denso y granular, y contiene numerosas vacuolas de diferente tamaño y contenido, además posee un extenso sistema de canales y canalículos que parecen comunicar directamente con el espacio

extracelular. Las mitocondrias son escasas y pequeñas. El aparato de Golgi puede ser abundante o escaso, por lo que algunos investigadores consideran que pueden existir dos tipos de células epiteliales. La ultra-estructura de las células del epitelio amniótico sugiere que cumplen una función secretora importante, así como funciones de transporte intra y transcelular (59-61, 64, 66).

Diferentes investigadores han realizado diversas evaluaciones de las propiedades de las hAEC aisladas de la MA. Entre ellos, Tamagawa y col. en 2004 quienes fueron los primeros en describir su característica de pluripotencialidad al crear quimeras xenogénicas *in vitro* de células aisladas del amnios humano (epiteliales y mesenquimales) con células embrionarias de ratón y demostrar la contribución de las células humanas a la formación de células de las tres capas germinales (endodermo, ectodermo y mesodermo) (49). Posteriormente otros investigadores han realizado estudios relacionados con la expresión de marcadores de pluripotencialidad, con la clonogenicidad, la formación o no de teratomas y la capacidad de diferenciación tanto *in vitro* como *in vivo*, y han concluido que el epitelio amniótico representa una fuente importante de células con características de células madre (16, 64, 65, 67, 68).

La literatura señala diferentes métodos para el aislamiento de las hAEC, algunos de ellos se presentan en la Tabla 1. Usualmente comienzan con la separación manual, por disección roma, de la MA del corion subyacente a través de la capa esponjosa o intermedia, y continúan con la exposición de los fragmentos de MA a soluciones de dispasa, hialuronidasa y/o tripsina/EDTA en diferentes concentraciones (0.25%, 0.125%,

0.05% etc.), en baños a 37°C, sin o con agitación (100 a 600 rpm), por diferentes períodos de tiempo (10, 30, 40 min.), una o varias veces (16, 64, 67-73).

**Tabla 1. Algunos métodos de aislamiento de las hAEC**

Autor	Digestión enzimática	Temp. y tiempo de digestión	Filtración	Velocidad y tiempo de Centrifugación	Medios de Cultivos
<b>Miki T. y col (67, 70)</b>	Tripsina/EDTA 0.05%	40 min 37°C X 3-4 veces	Filtro 100µm	1500 r.p.m / 10 min	DMEM SBF10% EGF
<b>Ilancheran S. y col (68)</b>	Dispasa 2.4U/ml Tripsina 0.25%	7 min 37°C 20 min 37°C Agitación	Filtro 100µm	230xg /10 min Lisis de GR	DMEM/F12 SBF 10%
<b>Whittle W. y col (71)</b>	Tripsina 0.25%	20 min 37°C agitación 30 min X 2 veces	—	250xg /10 min	DMEM SBF 10%
<b>Bilic G y col (69)</b>	Tripsina 0.25% Dispasa 1.2 U/ml Raspado de la superficie epitelial	3 min 37°C 60 min 37°C	Filtro 100µm	200xg /10 min	
<b>Wei JP. y col (72)</b>	Hialuronidasa 0.03% DNAasa 0.025% Tripsina 0.25%	(1º) 30 min 37°C 100rpm (2º)30 min 37º 400-600rpm	Gasa	? ?	DMEM SBF 10%
<b>Sakuragawa N. y col (73)</b>	Tripsina 0.25% Raspado de la capa esponjosa	20 min 37°C X 3 veces	?	?	RPMI 1640 SBF10%

La Dispasa es una metaloproteasa neutral obtenida del *Bacillus Polimixa* que favorece la disgregación celular actuando sobre la fibronectina, el colágeno IV y en menor extensión sobre el colágeno I. La hialuronidasa es una polisacaridasa natural existente en ciertos órganos y secretado por diversos microbios que modifica la permeabilidad del tejido conectivo mediante la hidrólisis del ácido hialurónico y del condroitin sulfato. La tripsina es una endopeptidasa serina que rompe las conexiones



polipeptídicas entre las células epiteliales sin dañar la membrana basal, actuando en los enlaces péptidos en que están implicados los aminoácidos básicos lisina y arginina siempre que no estén seguidos por prolina. Con estos métodos se han señalado aislamientos de más de 100 millones de células epiteliales por amnios (16, 64, 67, 68, 70) o de  $6.3 \pm 1.4 \times 10^6$  células por gramo de tejido húmedo (69).

Las hAEC recién aisladas, coloreadas con H-E, tienen una apariencia homogénea, son células medianas, redondeadas u ovals con abundante citoplasma, uno o dos núcleos centrales o excéntricos y uno o dos nucléolos (67, 71).

A pesar de su apariencia morfológica homogénea, la investigación de marcadores de membrana ha revelado que las hAEC expresan un fenotipo heterogéneo, con diferentes grados de expresión antigénica, lo que pareciera indicar la existencia de sub-poblaciones celulares, probablemente células progenitoras conjuntamente con células más diferenciadas. Las hAEC expresan de forma heterogénea marcadores de superficie asociados con células madre embrionarias (ESC), como los SSEA 3 y SSEA 4, que son epítopes carbohidratos de esfingolípidos, y los antígenos TRA 1-60 y 1-81 que son proteoglycanos con keratinas sulfatadas. Igualmente expresan otros antígenos como el cassette transportador G2 de unión a ATP (ABCG2/BCRP: *ATP binding cassette reporter G2*) que funciona como una bomba de eflujo (detectado también en algunas células madre hematopoyéticas, neurales y musculares), el CD9 (molécula de adhesión y migración), CD24 (ligando de P-selectina), CD29 (receptor para V-CAM, cadena  $\beta 1$  integrina), CD73 (ecto 5' nucleotidasa), CD90 (Thy-1), CD166 (molécula de adhesión), CD44 (receptor del ácido hialurónico), E-caderina (CD324), integrinas  $\alpha 6$ , c-met

(receptor del factor de crecimiento de hepatocito: HGF). No expresan SSEA-1, CD105 (endoglina), CD49e (integrina  $\alpha$ -5), CD45, CD13, CD14 (marcadores de células hematopoyéticas, excepto eritrocitos y plaquetas), CD34 (marcador de células madre hematopoyéticas y células endoteliales), ni CD133 (expresado en células madre hematopoyéticas, progenitores de células endoteliales, glioblastomas, etc.). Otros como el CD117 (c-kit) y el CCR4 (receptor de quimioquina C-C), pueden ser negativos o débilmente positivos en algunas células (16, 67, 68). También se ha demostrado que las hAEC carecen de los antígenos polimórficos HLA A-B-C (clase Ia) y HLA DR (clase II) y que expresan el antígeno leucocitario humano no clásico (HLA Ib), poco polimórfico (HLA-G) (73), hallazgos que pueden explicar el bajo poder inmunogénico de la MA y el poco riesgo de rechazo cuando se trasplanta (16, 66-68, 73-76). Tabla 2

**Tabla 2. Marcadores de superficie hAEC**

Antígenos	Resultados	Antígenos	Resultados
SSEA-1	-	CD73	±
SSEA-3	+	CD90	±
SSEA-4	+	CD105	-
TRA 1-60	+	CD49e	-
TRA 1-81	+	CD34	-
ABCG2	+	CD45	-
CD9	+	CD14	-
CD24	+	CD13	-
CD29	+	CD133	-
E-Cad	+	HLA A-B-C	-
Integrina $\alpha$ 6	+	HLA G	+
CD166	+	HLA DR	-
CD117	±		

Además de los antígenos de superficie, las hAEC expresan factores de transcripción específicos de células madre pluripotenciales, como Oct-4 (*octamer*

*binding transcription*), Sox-2 (*sex determining region Y-box 2*), Nanog y Rex-1, los cuales también se expresan en las ESC, en las células del epiblasto, en las células de carcinomas embrionarios y en células germinales embrionarias (16, 66, 67, 68). Se sabe que estos factores de transcripción juegan un papel crítico en mantener la pluripotencialidad de las células al parecer a través de una interacción cooperativa (52-57, 77).

A diferencia de las ESC, las hAEC no expresan actividad de telomerasa, una enzima formada por un complejo proteína-ácido ribonucleico con actividad de polimerasa que añade secuencias repetidas de ADN a los telómeros, produce su alargamiento y con ello la proliferación celular (78). La telomerasa es reprimida en las células somáticas maduras después del nacimiento, produciéndose un acortamiento del telómero tras cada división celular.

Las hAEC expresan citoqueratinas, que son filamentos intermedios tipo I y II de naturaleza proteica, ricas en queratina que se encuentran en el cito-esqueleto intracitoplasmático de las células epiteliales (16, 64, 67, 68). Según algunos investigadores, la mayoría de las hAEC también expresa vimentina, una proteína filamento intermedio tipo III, usualmente presente en las células estromales y en los precursores neuronales (15, 19, 65, 68, 73).

Adicionalmente, las hAEC expresan de forma constitutiva o en los cultivos basales, una serie de marcadores correspondientes a líneas celulares de diferentes capas germinales que parecen confirmar su estatus pluripotencial. Estos incluyen marcadores neurales como NES (*Nestina*), MAP2 (*Microtubule associated proteína: proteína asociada a microtúbulos*), NF-M (*Neurofilament medium polypeptide:*

polipeptidos de neurofilamentos medios), GFAP (*Glial Fibrillar Acidic Protein*: Proteína ácida glial fibrilar, marcador de neuroglías), CNP (*Cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase*: Fosfodiesterasa 3' nucleótido cíclico), NSE (*Neurone-specific enolase*: Enolasa específica de neuronas), A2B5 (Gangliósido de membrana expresado en precursores de oligodendrocitos), BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*: factor neurotrófico derivado del cerebro), NT-3 (*Neurotrophin-3*: neurotrofina-3), activina A (citoquina miembro de la superfamilia de TGF- $\beta$ ), nogina (un polipéptido secretado que juega un papel importante en la inducción neural por inhibición de las señales de TGF- $\beta$ ), acetil colina, norepinefina, dopamina (67, 68, 73, 79, 80, 81).

Igualmente las hAEC expresan marcadores específicos de endodermo como GATA-4 (*GATA binding protein 4*: Proteína 4 de unión a GATA), que es un marcador de endodermo definitivo (embrionario) y de endodermo visceral (extra-embrionario) con un papel primordial en la especificación micocárdica; HNF-3 $\beta$  (*Hepatocyte nuclear factor-3 $\beta$* : Factor nuclear hepatocítico 3 $\beta$ ) que igualmente es un marcador de endodermo definitivo, con un papel importante en el desarrollo y función de las células pancreáticas  $\beta$  (72), ALB (Albúmina),  $\alpha$ FP ( $\alpha$ -fetoproteína), GLUT 2 (*Glucose Transporter 2*: transportador de Glucosa), A1AT (*Alpha 1 Anti trypsin*: Alfa 1 anti-tripsina), GS (*Glutamine Synthetase*: Glutamina sintetasa), PEPCK (*Phosphoenolpyruvate carboxykinase*: fosfo-enol-piruvato carboxiquinasa), CYP2D6 y CYP3A4 (*Cytochromes 2D6 y 3A4*: Citocromos 2D6 y 3A4), CK18 (*Citokeratin 18*: Citoqueratina 18) (82, 83), todos característicos de células hepáticas.

Algunos investigadores también han referido la expresión de marcadores de línea mesodérmica detectados en las determinaciones basales que se han realizado antes de someter las células a ensayos de diferenciación celular. Estos marcadores incluyen: ANP (*Atrial Natruretic peptide*: Péptido natrurético atrial), genes que codifican para proteínas contráctiles como: MHC (*Myosin heavy chain*: miosina de cadena pesada), MLC (*Myosin light chain*: Miosina de cadena ligera), actina, troponina (cTn), y sus distintas isoformas ( $\alpha$ MHC,  $\beta$ MHC, MLC1a, MLC2a, MLC1v, MLC2v, cTn1, etc.), genes que codifican para los canales iónicos: CACNA1C (*Calcium chanel, voltaje-dependant, L type, alpha 1C subunit*: canal de calcio dependiente de voltaje tipo L sununidad alfa 1C, y KCND3 (*Potassium voltage gated channel, Shal-related subfamily, member 3*: Canal de potasio sensible a cambios de voltaje de la subfamilia relacionada a Shal, miembro 3), etc., todos ellos relacionados con linaje cardiomiocítico (67,68).

En cuanto a sus características en los cultivos, las hAEC a diferencia de las hESC no necesitan un segundo tipo de célula como capa nutricia (*feeder layer*) para su crecimiento. Las hAEC se adhieren al plástico y a frascos cubiertos con membrana basal u otros materiales, crecen y se cultivan adecuadamente en medios convencionales como RPMI-1640,  $\alpha$ MEM, DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco) con alta o baja concentración de glucosa, Ham'F-12/DMEM, suplementados con 5 a 10% de Suero Bovino Fetal (SBF), L-Glutamina, Penicilina 100 U/mL, Estreptomina 100 $\mu$ g/ml, en presencia o no de Factor de Crecimiento Epidermal (*Epidermal Growth Factor*: EGF), un factor que induce la proliferación celular de diferentes epitelios, keratinocinocitos y endotelios por la unión específica a su receptor (84) y cuyo efecto sobre las hAEC ha

sido demostrado por diferentes investigadores (16, 65, 67, 68, 85). En estos medios las hAEC proliferan, muestran algunos eventos mitóticos y forman una monocapa confluyente con un patrón típico de células epiteliales cuboides más o menos homogéneo. Desde esta siembra inicial usualmente es posible hacer 2 a 6 pases antes de que cese la proliferación (16, 65, 67, 68, 69).

Según algunos investigadores, bajo condiciones adecuadas de cultivo de alta densidad y largo término, las hAEC además de formar las monocapas de células adheridas, se agregan y forman cuerpos esferoides, que son esferas o “clusters” de células sobre la monocapa de células adyacentes, parecidos a los cuerpos embriodes (CE) descritos en los cultivos de hESC (16, 67). Estas estructuras esferoides al igual que los CE retienen sus características de células madre pluripotentes (expresión de Oct-4, Sox-2 y Nanog) en mayor proporción en la parte central de la estructura que en la periferia y mucho menos en las células de la monocapa que las rodean, las cuales son más diferenciadas.

Los cuerpos esferoides al igual que las hAEC, y a diferencia de las hESC, no forman teratomas cuando se inyectan en ratones con inmunodeficiencia severa combinada (16, 64, 67, 78). No se conocen claramente los mecanismos moleculares que previenen la formación de dichos tumores, pues al menos una fracción de las hAEC y de los cuerpos esferoides expresa los mismos marcadores que las hESC (Oct-4, Sox-2, c-Kit, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81). Probablemente la ausencia de actividad de la telomerasa, junto con algunas modificaciones epigenéticas y transcripcionales de genes anti-tumorales y genes que regulan el ciclo celular estén involucrados (77, 78).

Las hAEC pueden ser inducidas, bajo condiciones apropiadas de cultivo, en presencia de los inductores adecuados, a diferenciarse *in vitro*, hacia células derivadas de las tres capas germinales: ectodermo (neuronas, y células gliales), endodermo (hepatocitos, células pancreáticas) y mesodermo (osteocitos, adipocitos, cardiomiocitos, miocitos).

Los medios de cultivo empleados para tales diferenciaciones han sido variados, aunque en su mayoría han copiado su composición y dosis de factores inductores de diferenciación, de los utilizados en la diferenciación de las hESC, y a su vez han tomado en cuenta la información obtenida de estudios realizados durante el desarrollo embrionario y fetal (Tabla 3).

Los métodos utilizados para identificar los caracteres propios de las células diferenciadas han sido igualmente variados. Se han empleado aisladamente o en combinación métodos citoquímicos, inmuno-citoquímicos, inmunofluorescentes, ensayos funcionales, PCR, qPCR, etc. Todo ello sumado a la evaluación de las características morfológicas que adquieren las células cuando se diferencian.

Tabla 3. Medios de Cultivos para la diferenciación *in vitro* de las hAEC

Diferenciación	Descripción	Autores
Neurogénica	DMEM/Ham's F-12, 10% SBF, $5 \times 10^{-5}$ M ácido all-trans retinoico, 10 ng/ml FGF4, N-2, B-27 (10 ng/ml).	Ilancheran S. y col (68)
	(DMEM, 10% SBF, 10 ng/ml EGF)/5 días, luego siembra de células no adherentes en DMEM, 1% SBF, 1% insulina, transferrina, selenio (ITS), 2mM ácido ascórbico, 10 ng/ml bFGF/7días + 1 $\mu$ M ácido all-trans retinoico/21 días	Niknejad H. y col (86)
	DMEM, 10% SBF, 55 $\mu$ M 2-mercaptoetanol, 1 mM piruvato de sodio, $5 \times 10^{-5}$ M ácido all-trans retinoico, 10 ng/ml FGF-4.	Miki T. y col (67)
Hepática	DMEM, 10% SBF, 55 $\mu$ M 2-mercaptoetanol, 1 mM piruvato de sodio, 1mM aminoácidos no esenciales, 10 ng/ml EGF, Dexametasona $10^{-7}$ M, Activina, por 3 semanas. Placas cubiertas de colágeno I.	Miki T. y col (67, 87)
	DMEM, 10% SBF, 20 ng/ml HGF, 10 ng/ml FGF-2, 10 ng/ml de oncostastina M, 100 nM dexametasona, 10 U/ml de heparina sódica.	Takashima y col (83) Sakuragawa y col (82)
	DMEM/Ham's F-12, 10% SBF, 0.1 $\mu$ M insulina, $1 \times 10^{-7}$ M Dexametasona.	Ilancheran S. y col (68)
Pancreática	DMEM, 10% SBF, 55 $\mu$ M 2-mercaptoetanol, 1 mM piruvato de Sodio, 10 mM nicotinamida. Placas cubiertas de colágeno I.	Miki T. y col (67)
	DMEM + suplementos N <sub>2</sub> + 10mM nicotinamida	Wei y col (72)
	DMEM (o DMEM/Ham's F-12), N2, 10 mM nicotinamida.	Ilancheran S. y col (68)
Cardiomiocítica	DMEM, 10% SBF, 55 $\mu$ M 2-mercaptoetanol, 1 mM piruvato de sodio, 1 mM ácido ascórbico 2-fosfato.	Miki T. y col (67)
	DMEM/Ham's F-12, 10% SBF, 1 mM ácido ascórbico.	Ilancheran S. y col (68)
Miogénica	DMEM/Ham's F-12 (o DMEM alta glucosa), 10% SBF, 5% suero humano (o suero de caballo), 50 $\mu$ M de hidrocortisona (0.1 $\mu$ M dexametasona).	Portmann-Lanz y col (88) Ilancheran S. y col (68) Bilic G. y col (69)
Osteogénica	DMEM alta glucosa (o DMEM/Ham's F-12), 10% SBF, 10 $\mu$ M dexametasona, 10 nM 1- $\alpha$ 25-dehidroxivitamina D3, 50 $\mu$ g/ml ácido ascórbico, 10 mM $\beta$ -glicerofosfato.	Portmann-Lanz y col (88) Ilancheran S y col (68)
Adipogénica	DMEM alta glucosa (o DMEM/Ham's F-12), 10% SBF, 0.5 mM isobutilmetilxantina, 1 $\mu$ M dexametasona, 10 $\mu$ M insulín, 200 $\mu$ M indometacin.	Portmann-Lanz y col (88), Ilancheran S. y col (68)
Condrogénica	DMEM alta glucose, 1% SBF, 6.25 $\mu$ g/ml insulina, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1, 50 ng/ml ácido ascórbico fresco.	Portmann-Lanz y col (88)



Con los medios de cultivo adecuados, al cabo de 2 a 3 semanas, numerosos investigadores han podido evidenciar, a través de cualquiera de las técnicas señaladas, la diferenciación *in vitro* de las hAEC hacia células de las 3 capas germinales: ectodermo (neural) (67, 68, 86), mesodermo (cardiomiocitos, osteocitos, adipocitos, condrocitos) (67, 68, 88), endodermo (células pancreáticas y hepáticas) (67, 68, 72, 82, 83, 87, 89), evaluando fundamentalmente la expresión de aquellos marcadores que no se expresan en las células constitutivamente antes del cultivo, o en los cultivos basales, sino que hacen su aparición o aumentan su expresión en el curso del cultivo de diferenciación demostrando con ello que son marcadores propios de células más maduras.

#### **2.4. Células Mesenquimales Estromales de la M.A**

Estas células fueron definidas en el Primer Taller Internacional sobre Células Madre derivadas de la Placenta (*First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells*), celebrado en Italia en Marzo de 2007 con el término de *human Amniotic Mesenchymal Stromal Cells: hAMSC* (65).

Las células estromales de la MA son células redondeadas, ovals o con forma de huso, que se encuentran irregularmente distribuidas en el mesodermo amniótico embebidas entre fibras de reticulina. (59, 60, 61).

Se han publicado diferentes métodos para su aislamiento. La mayoría de ellos comienza por la separación mecánica de la MA del corion subyacente, seguida por la exposición de los fragmentos de MA a tripsina/EDTA para despegar las hAEC, y posterior tratamiento con colagenasa sola o en combinación con dispasa o DNasa para liberar las

células estromales de la capa mesodérmica (65). La colagenasa es una enzima de diversos orígenes celulares, una metaloproteinasa de matriz que rompe los enlaces peptídicos del colágeno en su conformación de triple hélice liberando fragmentos cortos. La DNasa se utiliza para eliminar el ADN procedente de las células rotas.

Los métodos de aislamiento recomendados varían en las concentraciones de las enzimas utilizadas, en el tiempo, temperatura y condiciones de exposición a dichas enzimas (Tabla 4) (90-93).

**Tabla 4. Diferentes Métodos de Aislamiento de hAMSC**

Autor	Aislamiento celular						
	Digestión enzimática	Tiempo Digestión	Temperatura digestión	Filtración	Velocidad Tiempo	Temp Centifug.	Siembra
Alviano F. y col. (90)	Tripsina/ EDTA 0,25% Tripsina/EDTA 0.25% DNasa I 10 U/ml Colagenasa IV 01%	15 min  15 min agitación	37°C	No Señalada (NS)	1500 rpm 10min	NS	DMEM SBF 20%
Soncini M y col. (91)	Dispasa 2.4 U/ml Reposo 10' a TA DNasa 20 µg/ml Colagenasa I 0.75 mg/ml	7m  3 hs	37°C  37°C	Filtro 100 µm	200 x g 10min	NS	¿?
Bilic G y col. (69)	Colagenasa A 2mg/ml	120 min	37°C	NS	NS	NS	Ham's F-12 DMEM
Bailo M y col (92)	Colagenasa 0.75 mg/ml	3 hs	37°C	NS	NS	NS	NS
Portmann y col (88)	Colagenasa II: 270 U/ml	1 - 1.5 hs	NS	Filtro 70 µm	NS	NS	αMEN SBF20%
Kim J y col (93)	Colagenasa A: 2mg/ml DNasa 0.05 mg/ml	2 hs	37°C / agitación	NS	500 x g	NS	DMEM SBF 10%

El aislamiento puede realizarse del mesodermo amniótico del primero, segundo y tercer trimestre (88, 94), pero la mayoría de los estudios publicados se ha realizado utilizando placentas a término (90, 91, 95). Según algunos autores es posible obtener de una MA a término desde  $1.7 \times 10^6$  células estromales/g de tejido (69, 72, 96) hasta  $24 \times 10^6$  células estromales por amnios completo (91).

Las células estromales se cultivan en en medios de cultivos convencionales, como el M199, Ham's F-12/DMEM, y especialmente el DMEM de alta o baja concentración de glucosa, suplementado con SBF al 10% o al 20%, L-Glutamina, Penicilina 100 U/mL, Estreptomicina 100µg/ml. Tras 1 a 2 semanas de cultivo en cualquiera de estos medios las células estromales dan origen a una población de células adherentes, de apariencia fibroblastoide, similar morfológicamente a las células mesenquimales obtenidas de la MO, grasa, pulpa dental, piel, ligamento periodontal, tejido sinovial, líquido amniótico, gelatina de Wharton, etc. (15, 17, 18, 64, 65, 88, 90-93). La obtención de células adherentes constituye el primer criterio definitorio por el cual estas células se consideran MSC, según los requisitos exigidos por la Sociedad Internacional para Terapia Celular (97, 98) y el Consenso del primer Taller de Trabajo sobre Células Madre derivadas de la Placenta realizado en Italia en 2008 (65).

Las células adherentes forman colonias clonales (UFC) fáciles de expandir *in vitro* a través de numerosos pases (90-94). Los subcultivos se realizan generalmente en los mismos medios de los cultivos primarios y con los mismos suplementos. La literatura señala que las células mesenquimales obtenidas de la MA pueden ser sometidas a un total 15 a 20 pases, sin evidenciar senescencia (90, 93). Según Portmann-Lanz y col. las

células mesenquimales obtenidas de gestaciones pre-término son más proliferativas y alcanzan la senescencia en pases más tardíos (88) que las obtenidas de MA a término. Alviano y col. señalan que la capacidad proliferativa de las células mesenquimales obtenidas de MA a término es superior a la capacidad proliferativa de las obtenidas de MO (90).

Desde el punto de vista de los marcadores celulares, determinados por estudios de citometría de flujo e inmunocitoquímicos, las células mesenquimales de la MA revelan el patrón de expresión de antígenos característicos exigido para su definición por el Comité de Células Madre de Tejidos y Mesenquimales de la Sociedad Internacional para Terapia Celular (97, 98). Más de 95% de las células expresan por citometría de flujo el CD105, o endoglina originalmente reconocido por el anticuerpo monoclonal SH2; el CD73 conocido como ecto 5' nucleotidasa y originalmente reconocido por los anticuerpos monoclonales SH3 y SH4, y el CD90 conocido también como Thy-1. Además expresan CD166 (ligando de CD6 o molécula de adhesión celular de leucocitos activados), CD44 (HCAM: molécula de adhesión a la matriz extracelular), CD29 (integrina  $\beta$ 1), CD13 (aminopeptidasa) y CD49d ( $\alpha$ 4 integrina). Son negativas o positivas en una proporción menor o igual a 2% para el CD45 (marcador pan-leucocitario), CD34 (marcador de progenitores hematopoyéticos primitivos y células endoteliales), CD14 o CD11b (expresados de forma prominente en monocitos y macrófagos), CD79 $\alpha$  o CD19 (marcadores de células B) y antígenos HLA clase II, los cuales no se expresan en las células a menos que sean estimuladas por INF- $\gamma$  (17-19, 90-94, 96) Tabla 5.

Tabla 5. Marcadores de superficie de las hAMSC

Antígenos Positivos $\geq 95\%$	Antígenos Negativos $\leq 2\%$
CD 105	CD 45
CD 73	CD 34
CD 90	CD 14 o CD 11b
	CD 79 $\alpha$ o CD 19
	HLA-DR

Las células mesenquimales de la MA bajo condiciones adecuadas de cultivos de diferenciación celular se diferencian *in vitro* hacia las tres líneas mesodérmicas básicas, a saber: osteogénica, adipogénica y condrogénica (88, 91-94, 96). In't Anker y col. fueron los primeros en demostrar en 2004 la capacidad de diferenciación osteogénica y adipogénica de estas células (94). Más tarde, Portmann-Lanz y col. demostraron su capacidad de diferenciación condrogénica, así como su capacidad de diferenciación miogénica y neurogénica (88). Desde entonces, diferentes investigadores han ratificado estas potencialidades sobre bases morfológicas, análisis bioquímicos y funcionales, expresión del RNAm y proteínas específicas de linaje, a través de diversos métodos (colorimétricos, inmunocitoquímicos, pCR, qPCR, western blot, etc.)

La composición de los medios de cultivo utilizados por algunos investigadores para la diferenciación de líneas mesodérmicas básicas se presenta en la Tabla 6. Estos medios son similares en la mayoría de sus componentes a los utilizados para la diferenciación de las hAEC.

**Tabla 6. Algunos medios utilizados para la diferenciación *in vitro* de las hAMSC hacia células de línea mesodérmica (adipocitos, osteocitos, condrocitos).**

Diferenciación	Descripción	Autores
Adipogénica	DMEM baja glucosa, 10% SBF, 0.5 mM isobutilmetilxantina (IBMX), 200µM indometacina, 10 <sup>-6</sup> M dexametasona, 10 µg/ml insulina  Medio de Diferenciación Adipogénica BulletKit Adipogenic (Cambrex) <sup>®</sup>	Alviano y col (90) Portmann-Lanz y col (88) Kim y col (93)  Soncini y col (91)
Oteogénica	DMEM baja glucosa, 10% SBF, 10 mM ð-glycerofosfato, 50–200µg/ml ácido ascórbico, 10 <sup>-8</sup> M dexametasona, 1,á 25-dihidroxitamina-D3.  Medio de Diferenciación Osteogénico NH Bulletkit (Cambrex) <sup>®</sup>	Alviano y col (90) Portmann-Lanz y col (88) Kim y col (93)  Soncini y col (91)
Condrogénica	DMEM, 10% SBF, 200ng/ml proteína morfogénica ósea 2 humana recombinante (rHuBMP-2)  DMEM alta glucose, 1% SBF, 6.25µg/ml insulina, 10 ng/ml TGF-ð1, 50 ng/ml de ácido ascórbico fresco.  DMEM, 6.25µg/ml insulina, 6.25µg/ml transferrina, 6.25 µg/ml ácido selenoso, 5.33 µg/ml ácido linolenico, 1.25 mg/ml ABS, 0.35 mM prolina, 1 mM piruvato de sodio, 10 <sup>-7</sup> M dexametasona, 0.1 mM L-ácido ascórbico -2-fosfato, suplementado con 10 ng/ml TGFð-3.  DMEM alta glucosa, 100 nM dexametasona, 50 µg/ml L- ácido ascórbico-2-fosfato, 1 mM piruvato de sodio, 40 µg/ml prolina, ITS (5 µg/ml insulina, 5µg/ml transferrina, 5ng/ml ácido selenoso), 5 ng/ml TGF-ð1.	Wei y col (99)  Portmann y col (88)  Alviano y col (90)  Soncini y col (91) Kim y col (93)

Basados en las características señaladas, y la demostración de que las células mesenquimales de la MA cumplen los criterios de definición exigidos por el Comité de Células Madre de Tejidos y Mesenquimales de la Sociedad Internacional para Terapia Celular (97, 98), en el Primer Taller Internacional sobre Células Madre derivadas de la

Placenta (*First Internacional Workshop on Placenta Derived Stem Cells*), celebrado en Italia en Marzo de 2007 (65), se acuñó por consenso el término de *human Amniotic Mesenchymal Stromal Cells hAMSC*) para definir estas células, en concordancia con la denominación dada a las Células Estromales Mesenquimales Multipotentes derivadas de la médula ósea (BM-MS: *Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells*) por la Sociedad Internacional para Terapia Celular (ISCT) (97, 98).

Además de estas características básicas, se ha señalado que las hAMSC expresan los antígenos embrionarios SSEA-3 y SSEA-4 (72, 90, 93, 96, 100), así como marcadores celulares de pluripotencialidad (Oct-4 y Rex-1) involucrados además en la capacidad de renovación y estado de indiferenciación de las células (90, 91, 93).

Adicionalmente, diversos estudios han demostrado que las hAMSC cuando se cultivan en los medios apropiados tienen una capacidad de diferenciación hacia otras líneas mesodérmicas (músculo esquelético, cardio-miocitos) (88, 100, 101), células endoteliales (90, 101), células ectodérmicas (tejido nervioso) (102,103) y células endodérmicas (hepatocitos, células pancreáticas) (72, 90, 104, 105). Los medios de cultivos recomendados por algunos investigadores para tales diferenciaciones *in vitro*, se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Medios para otras diferenciaciones *in vitro* de las hAMSC

Diferenciación	Descripción	Autores
Músculo esquelética	DMEM alta glucosa, 10% SBF, 5% suero de caballo, 50µM hidrocortisona, 0.1 µM dexametasona.	Portmann y col (88)
	DMEM, 5% SBF, 40 (Sigma) Molecularae Cellular and Developmental Biology-201%, ITSLA: Insulina, Tranferrina, ácido solenoso y ácido linoléico; Albúmina Bovina Sérica 100X, 10 <sup>-8</sup> M dexametasone, 10 <sup>-8</sup> M ácido ascórbico -2-fosfato, 10 ng/ml bFGF, 10 ng/ml VEGF, 10 ng/ml Factor de crecimiento -1 parecido a la insulina.	Alviano y col (90)
Cardiomiogénica	DMEM, 10% SBF, 10 ng/ml bFGF, 50 ng/ml activina A	Zhao y col (100)
	DMEM, 20% FBS + 2 mg/ml de Mezcla de esteres de hialuronanos con ácido butírico y ácido retinóico (HBR: <i>ester of hyaluronan with butyric and retinoic acid</i> ).	Ventura y col (101)
Angiogénica	DMEM, 2% SB, 50 ng/ml de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) 50 ng/ml. Evaluación de capilares en Matrigel.	Alviano y col (90)
	DMEM, 20% SBF + 2 mg/ml de Mezcla de esteres de hialuronanos con ácido butírico y ácido retinóico (HBR: <i>ester of hyaluronan with butyric and retinoic acid</i> ).	Ventura y col (101)
Neurogénica	DMEM alta glucosa, 10% SBF, 30µM ácido all-trans retinóico	Portman-Lanz y col (103)
	DMEM, 100µM hidroxianisol butilado, 10 µM forskolin, 2% DMSO, 5 U/ml heparin, 5 nM K252a, 25 mM KCl, 2 mM ácido valpróico, 1X suplemento N2, 10 ng/ml bFGF, 10 ng/ml, PDGF-BB.	Sakuragawa y col (102)
Pancreática	DMEM con suplemento N2 (Gibco), 10 mM nicotinamida	Wei y col (72)
Hepatogénica	α-MEM, 10% SBF, 20 ng/mL hHGF (factor de crecimiento hepatocítico humano), 10 ng/mL hFGF-2 (hactor de crecimiento fibroblástico humano 2), 10 ng/mL oncostatin M y 0.1 mmol/L dexametasona.	Tamagawa y col (104)

Todo ello se ha utilizado por algunos autores como argumento a favor de ubicar las hAMSC en la categoría de células pluripotenciales. Otros investigadores como Chan y col. consideran que aún persisten interrogantes en relación a la proporción de células que exhibe tal plasticidad y en cuanto a la maduración completa de la progenie (106).



Igualmente, las evidencias de reconstitución tisular y funcionalidad pluripotencial *in vivo* de estas células no se han comprobarse fehacientemente.

## **2.5. Otras características de la MA de importancia en la terapia celular y en ingeniería tisular:**

### **2.5.1 Propiedades inmunológicas:**

Desde hace varios años se ha señalado que las células de las membranas fetales son poco inmunogénicas y tienen propiedades inmunoregulatorias (74-76). Las pruebas clásicas que proporcionan soporte a estas afirmaciones provienen fundamentalmente de la tolerancia materno-fetal observada durante el embarazo, así como de evidencias clínicas y de ensayos pre-clínicos.

La MA se ha utilizado para tratamiento de heridas cutáneas, quemaduras, úlceras crónicas, en la reconstrucción de la superficie ocular para promover el desarrollo normal del epitelio corneal o conjuntival, sin evidencias de rechazo, a pesar de no utilizar inmuno-supresión. Igualmente, se ha trasplantado en voluntarios, sin observar dicha reacción (75). En estudios de xenotransplantes intra-peritoneal o intravenoso en neonatos de ratones inmuno-competentes, se ha demostrado que la MA humana y sus células sobreviven por largos períodos injertadas en varios órganos y tejidos produciendo micro quimerismo humano preferentemente en MO, pulmón y timo (75, 92). Las células MA no expresan o tienen muy baja expresión de los antígenos HLA clase Ia (HLA-A, HLA-B y HLA-C), no expresan antígenos HLA clase II (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR), y si expresan antígenos HLA clase Ib (HLA-E y HLA-G (16, 67, 68, 74-76).

La expresión de altos niveles de HLA-G (antígeno leucocitario humano no clásico), poco polimórfico en las células de la MA se ha considerado muy importante en la inmuno-tolerancia al feto, al comportarse como un péptido tolerogénico por su escaso polimorfismo. Pero además, se han planteado al menos cuatro mecanismos adicionales: a) unión del péptido HLA-G a receptores inhibitorios presentes en las células NK y en los macrófagos; b) unión a través de su péptido líder al HLA-E que a su vez inhibe las células NK vía sus receptores CD94/NKG2; c) inhibición de la proliferación de las células T CD4+ y d) inducción de apoptosis de las células T CD8+ (15, 74-76, 107).

Varios estudios han señalado que las hAEC no solo son pobres presentadoras de antígenos debido a su muy baja o nula expresión de antígenos clase II y de moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86), sino que además juegan un papel importante en modular las respuestas inmunes e inflamatorias. Las hAEC interactúan con diferentes células inmunes afectando el sistema inmune innato y adaptativo, y modulan varias funciones efectoras induciendo inmunosupresión y un entorno anti-inflamatorio en varios modelos de daño tisular (108, 109).

Estudios *in vitro* han demostrado que las células aisladas del amnios y del corion no desencadenan respuestas inmunes alogénicas o xenogénicas en cultivos mixtos de linfocitos y que suprimen activamente la proliferación de linfocitos T inducida por mitógenos o alo-antígenos, e inhiben la diferenciación de los monocitos, lo que a su vez resulta en una alteración de la capacidad alo-estimuladora de estas células (96, 109). Además las células derivadas de la MA ejercen efectos inmunomoduladores sobre las células presentadoras de antígenos como se ha demostrado por su capacidad para

bloquear la maduración de los monocitos hacia células dendríticas, prevenir la expresión del marcador de células dendríticas CD1a y reducir la expresión de HLA-DR, CD80 y CD83. Este bloqueo en la maduración de los monocitos igualmente resulta en una alteración de la capacidad alo-estimuladora de estas células sobre las células T alogénicas (109). Los efectos inmunomoduladores de las hAMSC en los ensayos de cultivo mixto de linfocitos se ha demostrado que ocurren por contacto celular directo e indirectamente por secreción de factores solubles inmunomoduladores, como la indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO: *indoleamine 2,3-dioxygenase*), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y la interleukina 10 (IL-10) (108, 109). El sobrenadante del cultivo de las hAEC y de las hAMSC reduce el número de neutrófilos, inhibe la migración de macrófagos e induce apoptosis de linfocitos T y B de ratones (108,109).

La comparación de la capacidad inmunomoduladora de las MSC derivadas de la MO, tejido adiposo, sangre de cordón umbilical y gelatina de Wharton evidenció propiedades inmunoregulatoras similares en todos los tipos de células, demostrando que esta es una capacidad estromal amplia no restringida al tejido de origen o al estado de desarrollo (96, 110-112).

En un estudio reciente, Magatti y col. han descrito la existencia de dos subpoblaciones de hAMSC, una con efectos inmunosupresores y otra con efectos estimulatorios sobre los linfocitos T (113). Está por aclararse cómo estas funciones opuestas pueden integrarse para contribuir a la tolerancia fetal.

### 2.5.2 Propiedades biomecánicas:

La MA es una de las membranas más resistentes de todos los tejidos humanos. Posee una serie de características biomecánicas que la hacen óptima para los ensayos de reconstrucción e ingeniería tisular, especialmente como soporte o “*scaffold*” de otras células o materiales. Estas propiedades incluyen permeabilidad, estabilidad, elasticidad, flexibilidad, plasticidad, resistencia a la tracción, etc., que dependen básicamente de la constitución de la matriz extracelular y de la membrana basal (61, 114).

Los principales constituyentes de la matriz extracelular son proteínas fibrilares: diferentes tipos de colágenos y elastinas, y proteínas no fibrilares como la fibronectina. El material en el cual las fibras están embebidas consta fundamentalmente de glicosaminoglicanos, hialuronanos, proteoglicanos y agregados de proteoglicanos (59-61). La capa compacta de la matriz estromal adyacente a la lámina basal forma el principal esqueleto fibroso de la membrana, en ella predomina el colágeno intersticial tipo I y III que forma conjuntos de haces paralelos que mantienen la integridad mecánica de la membrana, y el colágeno tipo V y VI que forma conexiones filamentosas entre el colágeno intersticial y la lámina basal epitelial. La capa esponjosa o intermedia contiene una malla no fibrilar de colágeno tipo III y abundante contenido de proteoglicanos y glicoproteínas, los cuales están involucrados en la unión de los factores de crecimiento y en la interacción con diferentes proteínas extracelulares y moléculas de adhesión (61, 114).

La membrana basal consta de moléculas especializadas de la matriz extracelular que a manera de capa subyace a las células epiteliales. Está constituida principalmente

por mallas de colágeno tipo IV y diferentes isoformas de laminina, que se conectan entre ellas por nidogen/entactina. Contiene además otros componentes como proteoglicanos ricos en heparán sulfato: agrin y perlecan (59-61, 114).

Los diferentes tipos de colágeno son producidos por las diferentes células. El colágeno tipo I y III es producido por las células mesenquimales, mientras que el colágeno tipo IV, la fibronectina, laminina y nidogen son producidos por las células epiteliales.

La estructura compleja de la membrana basal y de la matriz extracelular no solo le proporciona sus propiedades mecánicas, sino que además le confiere propiedades bioquímicas y la capacita para actuar en una variedad de procesos biológicos.

Estos procesos biológicos, desde el punto de vista que nos compete de la terapia celular e ingeniería tisular, se refieren fundamentalmente a las interacciones que se establecen entre los ligandos de las moléculas de la membrana basal y de la matriz extracelular por una parte y las integrinas o receptores de las células que sobre ella se cultivan. Uno de los principales componentes de la membrana basal que contribuye con la diferenciación celular, el mantenimiento del fenotipo celular y la promoción de la supervivencia del tejido, son las lamininas a través de sus ligandos.

Las lamininas tienen diferentes isoformas heterodiméricas compuestas por una cadena  $\alpha$ , una cadena  $\beta$  y una cadena  $\gamma$ , y a su vez por varios tipos de sub-unidades:  $\alpha$ 1-5,  $\beta$ 1-3 y  $\gamma$ 1-3 (61, 114). Los otros componentes de la matriz extracelular se unen a factores de crecimiento e interactúan entre sí, e igualmente ofrecen ligandos de adhesión para los receptores de la superficie celular o integrinas.

Las integrinas son receptores celulares trans-membrana con un dominio extracelular que se une a la matriz extracelular y un dominio intracelular que se une al citoesqueleto, a través de algunas proteínas de enlace como talina, filamina, paxilina o vinculina. El citoesqueleto a su vez interactúa con la membrana nuclear, la membrana de diferentes organelas y con diferentes enzimas. La interacción ligando/receptor conduce a cambios conformacionales en el receptor que activan vías de señalización intra-citoplasmática. La traducción de estas señales induce numerosos procesos celulares, incluyendo movilización y organización de los microfilamentos, migración, expresión de genes, crecimiento celular, diferenciación, proliferación y/o apoptosis. De esta forma las células detectan y responden a numerosos caracteres de la matriz extracelular incluyendo su composición, disponibilidad de los ligandos, propiedades mecánicas, organización espacial y topográfica del sustrato, etc. (114).

La matriz extracelular permite la difusión de nutrientes, metabolitos y hormonas, y sirve como un reservorio para factores de crecimiento y citokinas (61, 114). Los diferentes tipos de colágeno, además de la resistencia mecánica, se han implicado en la resistencia de la MA a factores proteolíticos, y los proteoglicanos en la función de barrera para restringir la permeabilidad del amnios (114).

Adicionalmente, la MA tiene la capacidad para sintetizar y liberar sustancias biológicamente activas, como citoquinas y moléculas de señalización como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF: *Tumor necrosis factor*), Interferon, TGF  $\alpha$ , TGF  $\beta$ , bFGF, EGF, HGF, kGF (*Keratynocyte growth factor*: Factor de crecimiento de keratinocitos), IL-4, IL-6, IL-8, inhibidores naturales de metalo-proteasas, defensinas  $\beta$ , Prostaglandinas, etc. (15,

65, 71, 108, 115-117). La producción de todos estos factores la capacita para cumplir otra serie de funciones biológicas igualmente importantes en la terapia celular, en la ingeniería tisular y en los diversos usos terapéuticos que se hacen de la MA.

### **2.5.3 Propiedades anti-inflamatorias y anti-angiogénicas:**

Se ha demostrado que tanto las hAES como las hAMSC producen proteínas anti-inflamatorias, como el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra: *IL-1 receptor antagonist*), inhibidores tisulares de metaloproteinasas 1, 2, 3, 4 (TIMP: *Tissue inhibitor of metalloproteinases*) e IL-10, la cual funciona como una citoquina anti-inflamatoria de amplio espectro que inhibe la producción de IL-1, del TNF $\alpha$  y la expresión de metaloproteasas de la matriz, y además promueve la producción de TIMP y otros factores anti-inflamatorios (116). Igualmente las células de la MA producen factores anti-angiogénicos como trombospondina 1 y endostatina (un potente factor antiangiogénico que inhibe la proliferación de las células endoteliales, la angiogénesis y el crecimiento de tumor). Además, la matriz estromal de la MA suprime la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y produce inhibidores de las metaloproteasas producidas por neutrófilos y macrófagos (116).

Las hAEC y las células estromales expresan ARNm del ligando Fas (CD95), un receptor de superficie celular que media apoptosis; del ligando que induce apoptosis relacionada al TNF (TRAIL: *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) y del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF: *Macrophage migration inhibiting factor*) (118). Se ha señalado que cuando las células inflamatorias entran en contacto con la MA sufren apoptosis.

El sobrenadante de los cultivos de hAEC inhibe la actividad quimiotáctica de los neutrófilos y de los macrófagos, reduce la proliferación de las células T y B tras la estimulación mitogénica e induce apoptosis de las células T y B (116, 118).

La MA atrapa células inflamatorias, evitando su llegada al área afectada, y con ello, los mediadores de la inflamación. Estudios experimentales han evidenciado que el estroma de la matriz extracelular juega un papel muy importante en la adhesión de células inflamatorias y linfocitos a través del ácido hialurónico, un glicosaminoglicano de elevado peso molecular que existe en grandes cantidades en el estroma de la MA y que actúa como un ligando para el CD44 expresado en las células inflamatorias (119).

#### **2.5.4 Propiedades antimicrobianas:**

Tanto la placenta como las membranas fetales producen antimicrobianos naturales, entre los cuales la familia de las defensinas y de las proteínas que contienen el dominio ácido whey (WAP) son muy importante (120).

Se ha demostrado que las hAEC tienen la capacidad de producir  $\beta$ -defensinas, especialmente  $\beta$ 3-defensinas, las cuales forman parte de un grupo de péptidos antimicrobianos expresados en las superficies mucosas por las células epiteliales y los leucocitos, como parte integral del sistema inmune innato (120). Las  $\beta$ 3-defensinas son pequeñas proteínas catiónicas que proporcionan al huésped protección anti bacteriana y antiviral.

Las MA expresa proteínas que contienen el dominio ácido whey (WAP). Esta familia incluye dos inhibidores de proteasas de bajo peso molecular, a saber, el inhibidor de proteasa secretada por el leucocito (*secretory leukocyte proteinase inhibitor*: SLPI)



que inhibe varias proteasas incluyendo elastasa y catepsina G de los neutrófilos; y la elafina, que regula solo la elastasa y proteinasa 3 de neutrófilos. Estas acciones, conjuntamente con sus propiedades anti-inflamatorias y antimicrobianas funcionan como componentes del sistema inmune innato para proteger las superficies epiteliales de los efectos dañinos de las proteasas liberadas por los leucocitos durante las infecciones e inflamaciones (121).

En la MA se ha encontrado cystatin E, un miembro de la superfamilia de las cistatinas humanas, inhibidor de proteinasas que posee propiedades antivirales (122).

Finalmente, algunos investigadores han demostrado efectos antimicrobianos *in vitro* del amnios y el corión contra un amplio rango de bacterias que incluye *Hemolytic streptococcus* grupo A, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas auruginosa* (123).

#### **2.5.5 Propiedades epitelizantes o promovedoras de la epitelización:**

La MA ha sido ampliamente utilizada en clínica por sus efectos re-epitalizantes, no obstante, los mecanismos involucrados no se conocen completamente.

Se infiere que su estructura y organización, así como el mantenimiento de la integridad de la membrana basal y de la matriz estromal, juegan un papel importante por las diferentes interacciones que se establecen entre los diversos ligandos que ofrecen las moléculas de sus componentes (lamininas, fibronectinas, etc.) y los receptores celulares por una parte, y las respuestas que se generan tras la interacción ligando/receptor (61, 114, 124). Además, como ya hemos señalado, la MA expresa

diferentes factores de crecimiento (EGF, TGF $\alpha$ , KGF, HGF, bFGF y TGF $\beta$  1, 2 y 3), los cuales pueden estar involucrados (115).

Algunas evidencias experimentales sustentan que el efecto epitelizador de la MA podría deberse a que acelera la migración de los keratinocitos desde los bordes de la herida y favorece su diferenciación contribuyendo a la generación de un epitelio intacto (124, 125). En un estudio reciente realizado en nuestra Unidad de Terapia Celular, en el cual se utilizó MA para favorecer la re-epitelización de heridas extensas en dos pacientes, el análisis detallado de los bordes de las heridas tratadas con MA demostró altos niveles en la expresión c-Jun a nivel del epitelio en formación. Esta observación conjuntamente con el efecto estimulador ejercido por la MA en la expresión de c-Jun en células HaCat (una línea celular derivada de keratinocitos humanos) cultivadas *in vitro* en presencia de MA, sumado al conocimiento de que ratones con delección del gen *c-jun* tienen retardo en el cierre de heridas debido a falla de la migración de keratinocitos, nos hizo plantear que este mecanismo podría ser uno de los involucrados en el efecto re-epitelizador inducido por la MA, mediado probablemente a través de diferentes vías de señalización (ERK 1 y 2, SAP/JNK y p38) (126).

#### **2.5.6 Propiedades inhibitorias de la fibrosis:**

Aunque el mecanismo exacto de inhibición de la fibrosis no se conoce, existen algunas evidencias que señalan que la MA regula negativamente el TGF- $\beta$  e inhibe la expresión de los receptores tipo II en los fibroblastos con lo cual reduce el riesgo de fibrosis. Los estudios de Tseng y col. (127) han confirmado este planteamiento al observar en los fibroblastos del limbo y de las córneas humanas una regulación negativa

de los sistemas de señalización de TGF $\beta$  con expresión reducida de las isoformas TGF $\beta$ -1, TGF $\beta$ -2 y TGF $\beta$ -3 y del receptor II, y de la activación de los fibroblastos en miofibroblastos, evidenciada por la expresión reducida de  $\alpha$  actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA), fibronectina-EDA (*fibronectin extra type III domain A*), e integrina, marcadores bioquímicos de esta transformación morfológica.

También se le ha atribuido importancia a que la matriz estromal de la MA es rica en ácido hialurónico fetal, implicado en la curación sin cicatriz de las heridas quirúrgicas producidas en fetos intra-útero (128), además en la supresión de la señalización de TGF $\beta$ , la proliferación tisular y la diferenciación a miofibroblastos de células normales de la córnea y de fibroblastos del limbo (129).

#### **2.5.7 Ausencia de tumorigenicidad:**

Los estudios realizados con hEAC inyectadas en diferentes tejidos en ratones con inmunodeficiencia severa combinada observados durante más de 7 meses no evidenciaron formación de tumor, lo que si ocurrió con las líneas celulares de hepatoblastoma humano (Hep G2) a las dos o tres semanas de su administración (75). Tampoco hubo evidencias de tumorigenicidad en voluntarios humanos cuando se les implantaron células amnióticas para evaluar su inmunogenicidad, ni en pacientes con enfermedades de depósito lisosomal que recibieron hEAC en un intento de corregir dichas enfermedades (75, 129). Esto se ha atribuido a la no expresión de la telomerasa. Sin embargo, aún persisten algunas interrogantes sobre el posible papel de las MSC en el desarrollo de cáncer debido a su efecto inmunosupresor sobre las respuestas inmunes anti-cáncer (96, 109).

### **2.5.8 Pocos problemas éticos:**

Debido a que la MA se desecha después del alumbramiento y es fácil de obtener sin dañar a la madre o a su producto, los problemas éticos asociados con el uso de células embrionarias se superan. Se ha establecido que la placenta pertenece al bebé y que los padres ejercen el control sobre el uso de los tejidos placentarios y sus células en nombre del bebé, por lo tanto, cualquier utilización para propósitos de investigación y/o aplicación clínica requiere la obtención del consentimiento informado por parte de la madre y la aprobación previa por el Comité de Ética de cada institución.

En resumen, las propiedades que hemos señalado, unidas a la disponibilidad prácticamente ilimitada de MA a término y sus células, con mínimas barreras éticas y legales para su uso, han representado y siguen representando buenas razones para su utilización en ensayos pre-clínicos de terapia celular e ingeniería tisular.

## **3. USOS DE LAS CÉLULAS y LA MA EN ENSAYOS PRE-CLÍNICOS DE TERAPIA CELULAR E INGENIERÍA TISULAR**

Davis fue el primero en señalar en 1910, el uso de las membranas fetales en el trasplante de piel (130). Seguidamente se demostró su utilidad en el tratamiento de quemaduras, heridas de diferentes etiologías, úlceras cutáneas (131, 132), como tejido de apoyo para la reconstrucción quirúrgica de diversos órganos (lengua, boca, tímpano, mucosa nasal, vejiga, uretra, vagina, superficie articular, peritoneo, etc.), así como para diversas patologías oftalmológicas (133-136). Un siglo más tarde la MA continua aplicándose terapéuticamente en diversas condiciones clínicas, pero en los últimos años

el foco de las investigaciones científicas se ha orientado más hacia el estudio de las características de sus células como células madre y a su potencial utilización, así como hacia el estudio de la MA como “*scaffold*” o sustrato para el crecimiento de otras células.

### **3.1 Usos de las hAEC y hAMSC en modelos animales de enfermedades.**

Recientemente se han publicado diferentes ensayos pre-clínicos en modelos animales con diversas enfermedades, que han evidenciado la habilidad de estas células de injertarse en los tejidos del huésped y contribuir a su regeneración. Algunas de estas publicaciones las comentaremos a continuación.

#### **3.1.1. Para la regeneración tisular:**

##### **Enfermedades neurológicas:**

Kakishita y col. en 2000 (137) usando un modelo de Enfermedad de Parkinson (EP) en ratas, injertaron hAEC transfectadas con el marcador LacZ del gen de  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) en el striatum denervado de dopamina y demostraron que las células fueron capaces de sobrevivir, produciendo una mejoría parcial durante dos semanas, tras la cirugía. En una extensión del estudio realizado en 2003 (138) los mismos investigadores demostraron que las hAEC fueron capaces de sintetizar y secretar catecolaminas y factores neurotróficos difusibles, tales como el BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*: Factor neurotrófico derivado del cerebro) y NT-3 (*Neurotrophin-3*: Neurotrofina 3) que mejoraron la función y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas.

Sankar y Muthusamy en 2003 (139), evaluaron la utilidad potencial de las hAEC en el tratamiento del daño de la médula espinal, una condición en la que la alteración secundaria mediada por la inflamación, más que la fuerza física primaria, ha sido implicada en las alteraciones observadas. Para ello, utilizando monos no inmunosuprimidos con un modelo de contusión de la médula espinal, trasplantaron hAEC marcadas con colorantes dentro del área lesionada y demostraron que dichas células fueron capaces de sobrevivir durante más de 120 días, sin evidencias de inflamación o rechazo, y que las pruebas de locomoción en los animales tratados mejoraron hasta una puntuación de 19, (2 puntos menos que los animales normales). La ausencia de formación de cicatriz glial y de infiltración de tejido conectivo (reacción inmune) les sugirió que las hAEC trasplantadas ofrecían un ambiente favorable en el cual sobrevivieron las neuronas con sección del axón y crecieron los axones seccionados.

En 2006 Wu ZY y col. (140) obtuvieron resultados similares en ratas con sección de la médula espinal. Las hAEC marcadas con Hoechst 33342 sobrevivieron por un tiempo de 8 semanas y se integraron sin reacción inmune en el cordón espinal del huésped.

En 2008, Kong y col. (141) ratificaron el efecto neuroprotector y neurogénico de las hAEC al trasplantarlas en el striatum de ratones con EP y observar una mejoría en la conducta de los ratones en relación a los controles.

Ese mismo año Liu y col. (142) tras el trasplante de hAEC en el cerebro de ratas con obstrucción de la arteria cerebral media, demostraron que las hAEC sobrevivieron y

migraron al área isquémica expresando marcadores neuronales, lo que se acompañó de una mejoría significativa de la disfunción conductual y de una reducción en el volumen del área infartada en los animales tratados con células en relación a los controles.

En 2009 Yu SJ y col. (143) realizaron una revisión acerca del uso de la MA como fuente de células para la terapia celular en ictus, otra alteración neurológica severa en la que la inflamación es el contribuyente principal de la cascada de muerte celular que sigue al episodio inicial de ictus y en la que las células trasplantadas podrían controlar los efectos dañinos de la inflamación y evitar la progresión del ictus. Concluyeron en base a los artículos revisados que en modelos animales de ictus, las hAEC ejercieron un efecto neuroprotector en las fases agudas de la injuria y facilitaron la neuroregeneración en las fases tardías. Señalaron, que a pesar del efecto dañino de la inflamación, el factor 1 que se libera del estroma durante la misma, sirve para guiar a las células trasplantadas hacia el tejido isquémico, y que por ello resulta efectiva la administración por vía periférica de las hAEC en la fase aguda del ictus (143).

En 2009 Yang XX y col. (32) trasplantaron hAEC en el ventrículo lateral de ratas con un modelo de EP inducido por micro inyección estereotáctica de 6 hydroxydopamine (6-OHDA) en el striatum, y evaluaron la supervivencia y diferenciación de las hAEC, así como los efectos producidos por el injerto. Observaron que la rotación asimétrica inducida por apomorfina en las ratas con EP disminuyó significativamente a las 2 semanas del trasplante en el grupo tratado; que las células injertadas expresaron nestina y vimentina a las 5 semanas del trasplante; que las células tiroxina hidroxilasa positivas aumentaron significativamente en la sustancia nigra del grupo tratado en

relación al grupo no tratado, y que la Dopamina, los niveles de DOPAC (3,4-*Dihydroxyphenylacetic acid*: Ácido 3,4 Dihidroxi fenil acético) y los niveles de ácido homovanílico (HVA: *Homovanilic acid*) en el striatum del grupo tratado aumentaron significativamente en relación al grupo no tratado.

Los estudios presentados muestran evidencias de que las células derivadas de la MA confieren un efecto beneficioso evidenciado por mejoría funcional en modelos animales con isquemia cerebral, EP y daño de la médula espinal, y que ello probablemente es debido a un efecto neuroprotector mediado a través de factores tróficos directos sobre las células del huésped, disminución de la muerte celular por apoptosis, estimulación de la angiogénesis, neurogénesis, sinaptogénesis, oligodendrogénesis, etc. Ninguno de ellos muestra pruebas contundentes de diferenciación *in vivo* de las hAEC en células neurales.

#### **Enfermedades hepáticas:**

Sakuragawa y col. en 2000 (82) en un estudio con hAEC transducidas con el gen de la  $\beta$  gal, trasplantadas en el hígado de ratones con inmunodeficiencia severa combinada (IDSC), observaron integración hepática de las células trasplantadas y positividad para  $\alpha$ -fetoproteína y albúmina en la semana 1 y 2 tras la inyección, con lo cual plantearon que las hAEC podrían ser útiles como portadores de genes para pacientes con enfermedades hepáticas congénitas.

Takahashi S. y col. en 2001 (145) lograron la expresión de un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR: *Low density lipoprotein receptor*) en las hAEC a través de la recombinación con adenovirus y trasplantaron dichas células genéticamente



modificadas en el hígado de conejos con un modelo de hipercolesterolemia familiar. Observaron en cada uno de los conejos una disminución importante en el colesterol sérico, así como migración de las células desde los sinusoides hacia el parénquima hepático, con expresión de los receptores durante 20 días tras el trasplante, después de lo cual las células desaparecieron. Atribuyeron la temporalidad de la respuesta al rechazo del xeno-injerto y a la función transitoria del vector adenovirus.

Takahashi N. y col. en 2002 (146) trasplantaron hAEC transfectadas con el adenovirus AdlacZ en el hígado de ratas fetales por manipulación uterina y evidenciaron que las células transplantadas formaron una masa celular que tuvo una supervivencia mayor de 14 días tras el nacimiento de los fetos. Plantearon que el uso de las hAEC como transportador de genes podría resultar en la expresión a largo plazo de genes exógenos.

Takashima S. y col. en 2004 (83) trasplantaron piezas de amnios en la cavidad peritoneal de ratones con IDSC y evaluaron la supervivencia del tejido y la secreción de albúmina. Detectaron que el amnios tuvo una duración de 2 semanas con habilidad metabolizante medida por MTT y que tanto en el suero como en el líquido peritoneal se observó producción de albúmina humana durante 7 días tras el trasplante. Los autores plantearon que aún cuando el trasplante de amnios o de las hAEC podía ser una estrategia terapéutica novedosa para enfermedades hepáticas, uno de los problemas a ser resuelto es la corta supervivencia del tejido trasplantado.

En 2005 y posteriormente en 2009 el grupo de Miki y col. (67, 87) presentó evidencias adicionales de que las hAEC son capaces de realizar funciones hepáticas, al

detectar en el suero de los ratones con IDSC trasplantados con hAEC,  $\alpha$ 1-anti-tripsina humana.

En 2010 Manuelpillai y col. (147) en un modelo de fibrosis hepática en ratones inducida por la administración de tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ), trasplantaron hAEC. A las dos semanas observaron las hAEC en el hígado de los ratones, sin evidencias de rechazo, e igualmente detectaron albúmina humana en el suero de dichos ratones. Además, evidenciaron disminución en el grado de apoptosis de los hepatocitos y, reducción de la inflamación y la fibrosis en comparación con los controles.

Aunque los datos *in vivo* que se han generado hasta ahora son prometedores, todavía, hasta donde sabemos, no hay publicaciones sobre la caracterización de la expresión de genes hepáticos a largo plazo en los receptores de trasplantes de hAEC, o sobre la recuperación sostenida de animales con defectos agudos o crónicos de la función hepática.

#### **Enfermedades cardíacas:**

Zhao y col. en 2005 (100) demostraron que las hAMSC xeno-trasplantadas en el miocardio infartado de ratas tuvieron una supervivencia de al menos 2 meses y se diferenciaron en células parecidas a cardiomiocitos, probablemente por el efecto de algunos factores endógenos. En el ensayo de diferenciación cardiomiocítica realizado por los citados autores, el co-cultivo con explantes del corazón de ratas neonatales confirmó que un pequeño número de hAMSC marcado con el colorante fluorescente PKH67 fue capaz de integrarse y diferenciarse en células parecidas a cardiomiocitos. Consistente con este hallazgo, las hAMSC marcadas con el colorante fluorescente PKH67 e inyectadas en

el miocardio infartado de las ratas, fueron detectadas en cortes congelados realizados a las 4 y 8 semanas. Además, las hAMSC trasplantadas resultaron positivas para el péptido natriurético (ANP) y para la cadena pesada  $\beta$  de miosina ( $\beta$ -MHC). Aunque, a diferencia de lo observado en los cardiomiocitos derivados de ESC y de las MSC de la MO (148, 149), en éstos las propiedades funcionales electro-fisiológicas no se demostraron, los autores consideran que los datos obtenidos son suficientes para sustentar la capacidad potencial de estas células y sus probables usos en clínica.

Ventura y col. en 2007 (101) demostraron mejoría de la función cardíaca durante 4 semanas tras la inyección intra-miocárdica de células derivadas de la MA en corazones de ratas infartadas.

Cargnoni y col. en 2009 (150) demostraron que el uso de fragmentos de MA aplicada sobre el ventrículo izquierdo isquémico de ratas a las que se les había practicado ligadura de la arteria coronaria descendente anterior, produjo mejoría de la función cardíaca y reducción de la zona de infarto evaluada por ecocardiografía, parámetros cardíacos funcionales y morfológicos. La mejoría fue aparente a los 7 días de la aplicación y persistió por al menos 3 meses. Los autores no observaron injerto de las células de la MA en el tejido cardíaco del huésped, con lo cual plantearon la hipótesis, también sugerida por otros, de que el efecto beneficioso es debido a la secreción paracrina por las células de la MA de factores solubles cardio-protectores que promueven la regeneración del tejido del huésped.

**Enfermedades pancreáticas:**

En 2003 Wei y col. (72) cultivaron hAEC por 2 a 4 semanas en presencia de nicotinamida para inducir diferenciación pancreática. El trasplante subsecuente de las hAEC productoras de insulina corrigió la hiperglucemia de ratones con diabetes inducida por estreptozotocina durante varias semanas tras el trasplante. Además al analizar la distribución de las células humanas y de la secreción de insulina utilizando anti  $\beta_2$  microglobulina y anti insulina humanas con técnicas de inmunohistoquímica demostraron localización en los sitios anatómicos de producción de insulina (hígado y páncreas) del ratón. El proceso fue reversible en 20% de los ratones lo cual se atribuyó en parte a la vida media del cluster celular implantado.

**Enfermedades pulmonares:**

Cargnoni y col. en 2009 (151) estudiaron los efectos de hAEC y hAMSC y de las derivadas de MA de ratón en un modelo de fibrosis pulmonar inducida en ratones por instilación intratraqueal de Bleomicina. Las células de la MA fueron infundidas 15 min después de la Bleomicina vía intratraqueal o intraperitoneal en los casos xenogénicos, e intravenosa en los casos alogénicos. Las células trasplantadas se detectaron a los 3, 7, 9 y 14 días del trasplante y concomitantemente se observó una clara disminución en la infiltración por neutrófilos y una reducción importante en la severidad de la fibrosis pulmonar en los ratones tratados con células de MA independientemente de la fuente (xenogénica o alogénica), o de la vía de administración. Los autores plantean que la reducción de la infiltración por neutrófilos podría ser mediada vía secreción de factores solubles anti-inflamatorios liberados por las células.

En 2010, Moodley y col. (152) demostraron que la administración intravenosa de hAEC en un modelo de daño pulmonar producido en ratones con IDSC condujo al injerto precoz de las células y a la producción de proteínas surfactantes A, B, C y D.

#### **Enfermedades del cartílago:**

Wei y col. en 2009 (99) demostraron que las hAMSC colocadas en cámaras de difusión con inductores condrogénicos (proteína morfogénica recombinante humana: rHuBMP-2) y trasplantadas en tejidos no cartilagosos (espacio sub-facial del músculo abdominal) de ratones, o implantadas en defectos cartilagosos generados sobre los cóndilos femorales mediales de ratas inmunodeficientes de 8 semanas de edad, experimentaron cambios morfológicos con depósito de colágeno tipo II en el citoplasma y en la matriz pericelular.

#### **Enfermedades auditivas:**

En 2004 Yuge y col. (153) estudiaron la posibilidad de usar hAEC para el tratamiento de la pérdida de la audición. Las hAEC cultivadas *in vitro* expresaron Conexina 26 (Cx26) en la membrana celular y en el núcleo, y ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en la membrana celular y en el citoplasma, los cuales normalmente son expresados en los fibrocitos cocleares, encargados de mantener la homeostasis local de los iones que a su vez es sumamente importante para la audición. Utilizando una técnica de transferencia de colorante amarillo Lucifer para evaluar la comunicación intercelular a través de las uniones gap, evidenciaron la capacidad de comunicación entre célula y célula en las hAEC cultivadas. Las hAEC trasplantadas *in vivo* en la cóclea de cobayos se localizaron predominantemente en la región supra-limbal, región supra-espinal en la *scala vestibuli* y

en la región subcentral del ligamento espiral en la *scala timpani* que es una de las cavidades del laberinto coclear. Dichas células pudieron sobrevivir por al menos 3 semanas. Las hAEC actuaron como células parecidas a fibrocitos funcionales, aunque no está claro, si las características de las células trasplantadas fueron el resultado de transdiferenciación o fusión celular. Los hallazgos sugieren que el trasplante de hAEC podría ser una estrategia terapéutica para diferentes enfermedades del oído interno.

#### **Enfermedades del músculo esquelético:**

En 2007 (154), Xing y col. inyectaron células amnióticas multipotentes humanas (AMP: *Amniotic multipotent cells*) obtenidas comercialmente, en la pared abdominal de la rata (sitio de mayor carga) previo a la laparotomía, con el objeto de incrementar la recuperación de la fuerza en los músculos de la pared abdominal y disminuir la incidencia de hernias incisionales. Tras la laparotomía, midieron las propiedades mecánicas de la herida y la incidencia y severidad del fracaso en la cicatrización durante 28 días. Observaron que las células fueron viables durante al menos 28 días y no migraron a otros sitios, que la fuerza pérdida por la laparotomía mejoró a los 7 días del post-operatorio tras la terapia con las células AMP y que dicha terapia mejoró la cicatrización y, redujo la incidencia y el tamaño de hernias incisionales. Según los autores todo fue debido a la diferenciación de las AMP hacia células parecidas a fibroblastos, o a la producción de citoquinas: TGF- $\beta$ 2, bFGF, and GM-CSF.

#### **Enfermedades vasculares**

En 2009 Prather y col. (155), investigaron el uso de células estromales derivadas de la placenta humana, expandidas en 3D, denominadas PLX-PAD, en el tratamiento de

la isquemia crítica de extremidades inducida en ratones. Las células se inyectaron vía intramuscular 5 horas tras la producción de la isquemia y observaron que durante 21 a 28 días el flujo sanguíneo en la extremidad isquémica fue significativamente mayor y la tasa de necrosis celular significativamente menor en los ratones tratados que en los no tratados. Los análisis inmunohistoquímicos revelaron un aumento significativo en el número de nuevos capilares en la extremidad de los animales tratados, así como niveles disminuidos de nitrotirosina, un indicador de stress oxidativo, y de VCAM-1, un indicador de inflamación endotelial. Todo ello, sin ningún efecto adverso. Basados en estos resultados, PLX-PAD está siendo evaluado en un ensayo clínico en isquemia crítica de extremidades en Estados Unidos y en la unión Europea (Ver pag. 91).

### **3.1.2 Uso de las células de la MA como inmunomoduladoras *in vivo* en modelos animales:**

Ya se ha dicho que las MSC aisladas de la placenta y de otros tejidos expandidas *in vitro* tienen un efecto inmunosupresor directo *in vitro* sobre la proliferación de los linfocitos T de la sangre periférica de adultos y de cordón umbilical; que dichas células no inducen proliferación linfocítica alogénica en sangre periférica y que inhiben las reacciones de cultivo mixto de linfocitos. Por estas razones, la terapia con MSC se ha propuesto para el tratamiento de diversas alteraciones inflamatorias crónicas e inmunes (esclerosis múltiple, enfermedad intestinal inflamatoria, artritis, enfermedad injerto contra huésped y en isquemia (enfermedad arterial coronaria y periférica) (19, 144, 156), donde los efectos inmunomoduladores de las MSC, independientemente de su fuente,

frenan la respuesta inflamatoria y permiten la remodelación tisular con menor carga de fibroblastos y por ende menor cicatriz (19, 156). Actualmente se realiza un ensayo clínico fase III en pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria utilizando MSC de MO y de tejido adiposo (157), pero, hasta donde sabemos, no hay ensayos en esta enfermedad con el empleo de hAMSC.

Recientemente dos estudios han propuesto el co-trasplante de células madre hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical conjuntamente con hAMSC obtenidas de la placenta en ratones NOD/SCID para beneficiar el injerto de la sangre de cordón y mejorar la migración de las células CD34 hacia la MO (158, 159).

### **3.2 Uso de la MA como “*scaffold*” o sustrato en ensayos animales de ingeniería tisular:**

En los últimos años se han realizado diversos ensayos experimentales en animales a fin de evaluar la utilización de la MA en ingeniería tisular. En algunos de estos estudios la MA se ha utilizado con su estructura íntegra, sin eliminarle el epitelio, (MA íntacta), en otros, como MA a la cual se le ha retirado el epitelio, (MA desnuda) (160, 161), y en cualquiera de los casos, como MA fresca o MA preservada.

Existen numerosos métodos publicados en la literatura tanto para la eliminación del epitelio como para la preservación en diferentes condiciones, estos incluyen: MA en depósito hipotérmico (4°C), MA congelada-seca, MA gamma-esterilizada, MA criopreservada con soluciones crioprotectoras que contienen glicerol o DMSO y que son almacenadas a -80 °C en congeladores mecánicos o en tanques de nitrógeno líquido a -196°C etc. (160-166). La revisión de estos métodos está fuera de los objetivos de esta



presentación. Solo comentaremos algunos de los estudios en los cuales la MA se ha usado en modelos animales como sustrato para el crecimiento y diferenciación de otras células:

En 1988 Danielsen y col. (167) demostraron que tras realizar la separación entre el septo y el hipocampo en ratas y colocar una tira fina de MA con un extremo situado en el septo axotomizado y el otro en el hipocampo denervado, tres meses tras la cirugía se pudo apreciar el crecimiento de fibras nerviosas sobre el lado laminina-positivo de la MA, pero no en el lado laminina-negativo, concluyendo que la MA puede ser un agente adyuvante importante en los estudios sobre la reparación del Sistema Nervioso Central.

En 1995 Kim y Tseng (168) en un modelo en conejos demostraron que un 40% de las córneas con insuficiencia límbica severa podía ser reconstituido re-emplazando la superficie conjuntival por MA humana preservada. Estos trabajos representaron un gran estímulo para el uso de la MA en oftalmología clínica.

Koizumi y col. en 2000 (169) cultivaron células epiteliales de la cornea y el limbo de conejos sobre discos de MA desnuda, trasplantaron subsecuentemente el disco de MA sobre el cual se habían cultivado las células epiteliales y obtuvieron éxito en la re-epitelización de las córneas de los conejos.

Mohamed y col. en 2000 y Mligiliche y col. en 2002 (170, 171) señalaron que la matriz extracelular de la MA humana es un soporte bio-degradable, con características mecánicas y bioquímicas favorables para la regeneración de nervios periféricos.

Miyamoto y col. (172), y Ueno y col. (173) en 2004 y 2006 respectivamente demostraron que la MA denudada puede ser utilizada como una capa nutricia para algunas células madre.

Schroeder y col. en 2007 (174) con el objeto de investigar los mecanismos neurotróficos potenciales de la MA en el tratamiento de úlceras corneales neurotróficas, evaluaron el efecto que sobre el crecimiento neurítico de cultivos celulares neuronales tuvieron la membrana basal y el estroma de MA denudadas en comparación con el efecto de MA intactas. Demostraron que las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal de pollos fueron capaces de sobrevivir y crecer en los cultivos sobre MA humana, en ausencia de factores neurotróficos y que estos efectos podrían ser atribuidos al menos en parte a la capa epitelial. Además, que la membrana basal y la superficie estromal favorecieron la formación de una malla neurítica extensa, mientras que la superficie epitelial no. Estos hallazgos les permitieron concluir que la MA tiene efectos promotores del crecimiento neurítico dependientes del área y que ello puede influir la evolución clínica del trasplante de MA en las úlceras neurotróficas.

Jin y col. en 2007 (175) y Boo L y col. en 2009 (176) señalaron que la MA denudada o la MA intacta preservada en glicerol podía utilizarse como matriz de soporte para los condrocitos en la regeneración de cartílagos de conejo.

Portmann-Lanz y col. en 2007 (177), utilizando células hAEC y HAMSC sembradas sobre un soporte de MA celular plantearon la posibilidad de utilizar esta técnica en la reparación de la ruptura prematura de las membranas fetales.

Tsai SH y col. en 2007 (178) cultivaron células endoteliales (CE) arteriales de cerdo sobre fragmentos de MA como matriz de soporte con el objeto de evaluar su crecimiento y la expresión de varios caracteres moleculares y celulares relacionados con la función endotelial. Observaron que la MA promovió la proliferación y la formación de uniones con el endotelio co-cultivado. Las células endoteliales expresaron su morfología normal y el Factor Von Willenbrand, además aumentaron su expresión de la molécula de adhesión célula endotelial-plaqueta-1 (PECAM-1: *Platelets endotelial cell adhesión molecule-1*) y la molécula de adhesión vasculo endotelio-caderina (VE-cadherin: *Vascular endothelial-cadherin*) en las uniones intercelulares, así como la expresión de  $\alpha$ 1 integrinas. Mientras que la expresión de moléculas adhesivas endoteliales (CAMs) pro-inflamatorias fue deprimida, lo cual se correlacionó con la disminución de adhesión de leucocitos al endotelio, aún en presencia de lipopolisacáridos. Estos resultados les permitieron plantear la aplicación potencial de la MA como una matriz anti-inflamatoria que sustenta el crecimiento endotelial y la morfogénesis en el proceso de ingeniería tisular-vascular.

Finalmente mencionamos un artículo publicado en 2010 en el cual la MA fue modificada con varias concentraciones de 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)/N-hydroxysuccinimide (NHS) para aumentar sus propiedades biomecánicas y disminuir la biodegradación. Según los autores la MA tratada con estas sustancias permitió la proliferación de las células epiteliales del limbo y preservó los progenitores *in vitro* e *in vivo* (179).

Existen otras publicaciones sobre el uso de la MA como *scaffold* a nivel experimental, pero la revisión completa del tema se escapa de los objetivos de esta presentación.

#### **4. USOS DE LAS CÉLULAS y LA MA EN MEDICINA CLÍNICA:**

##### **4.1 Usos de la hAEC y hAMSC en humanos:**

Hasta donde sabemos, no existen publicaciones relacionadas con el uso de las células madre de la MA en ensayos clínicos. Existe un artículo publicado en 2009 en el que se describe la utilización de MSC obtenidas de placentas humanas (sin cordón umbilical ni membranas fetales) en clínica (180). En este artículo se señala la utilización de MSC a la dosis de  $1 \times 10^6 / \text{Kg IV}$  (total  $120 \times 10^6$ ), 5 horas antes de un trasplante de doble de cordón en un paciente de 20 años con Leucemia Aguda Mieloblástica en segunda remisión completa. Las MSC de la placenta y las células del cordón procedían de donantes no relacionados. La infusión de las células se realizó en una suspensión de 30 ml en un tiempo de 7 min a través de un filtro de  $200 \mu\text{m}$ , sin complicaciones agudas aparentes. A los 14 días del trasplante el paciente presentó enfermedad injerto contra huésped aguda; a los 45, reactivación de CMV; a los 52, bacteriemia por estafilococo; a los 60, insuficiencia respiratoria y muerte por dicha causa a los 68 días. Los autores consideran que ninguna de estas complicaciones tras el trasplante estuvo relacionada con la infusión de MSC de la placenta, que el procedimiento fue seguro, y que el paciente representa el primer caso de un programa de ensayos clínicos con MSC derivadas de placentas humanas.

En la lista de ensayos clínicos actualmente registrados en [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) aparecen tres estudios que igualmente mencionan el empleo de células de la placenta:

1. UC-MSCs/Placenta-MSCs: Safety and Efficacy Study of Umbilical Cord/Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells to Treat Severe Aplastic Anemia. Sponsor: Shandong University. China. NCT01182662. Activo. En fase de reclutamiento de pacientes.  
El objetivo de este estudio es evaluar la seguridad y eficacia de las MSC derivadas del Cordón umbilical /placenta humana a la dosis de  $1 \times 10^6$  MSC/Kg en pacientes con Anemia aplásica Severa.
2. UC-MSCs/Placenta-MSCs: Safety and efficacy study of umbilical cord/placenta-derived mesenchymal stem cells to treat myelodysplastic syndromes. Sponsor: Shandong University. China. NCT01129739. Activo. En fase de reclutamiento de pacientes.  
El objetivo de este estudio es evaluar la seguridad y eficacia de las MSC derivadas del Cordón umbilical /placenta humana a la dosis de  $1 \times 10^6$  MSC/Kg en pacientes con Síndromes Mielodisplásicos tipo Anemia Refractaria (AR) y Anemia refractaria con anillos Sideroblásticos (ARAS).
3. Placenta – MSCs: Safety of intramuscular injection of Allogeneic PLX-PAD cells for the treatment of critical limb ischemia (CLI). Sponsor: Pluristem Ltd. NCT00919958. Activo. Todavía no está reclutando paciente.  
El propósito de este estudio es determinar la seguridad de una dosis única IM de PLX-PAD para el tratamiento de pacientes con isquemia crítica de extremidades (CLI).  
PLX-PAD son células estromales “mesenchymal-like” derivadas de deciduas obtenidas de placentas humanas a término, expandidas en un Bioreactor 3D propiedad de la Compañía PluriXTM. Según la compañía son células privilegiadas desde el punto de vista inmunológico, con propiedades immuno-moduladoras.

#### 4.2 Usos de la MA en humanos:

Como ya se ha señalado el uso de la MA en medicina tiene prácticamente un siglo de historia. Davis fue el primero en utilizarla en 1910 en el trasplante de piel. A partir de allí se han hecho diversas utilidades en quemaduras, úlceras cutáneas, en la reconstrucción quirúrgica de órganos (boca, lengua, mucosa nasal, tímpano, vejiga, uretra, vagina, tendones, etc.), como sustituto del peritoneo en procedimientos exenterativos y

reconstructivos pélvicos, en la prevención de sinequias o adherencias en cirugía pélvica y abdominal, como recubrimiento biológico de onfaloceles, etc. (130-133). En Oftalmología su empleo fue señalado por primera vez en 1940 por De Rötth quien utilizó las membranas fetales frescas (amnios y corion) en la superficie ocular como un apósito biológico para el manejo de defectos conjuntivales (181). Más tarde Sorby y col. emplearon la MA preservada, como recubrimiento temporal en el tratamiento de lesiones oculares cáusticas agudas (182). Con esta técnica lograron resultados favorables, sin embargo, por razones poco claras su uso fue abandonado o no fue publicado durante aproximadamente cinco décadas. En 1995 con los ensayos de reconstrucción con MA de las corneas de conejos con defectos límbicos, realizados por Kim y Tseng (168) renace un interés generalizado por el uso de la MA en oftalmología y aparecen numerosos trabajos publicados sobre su eficacia en distintas patologías de la superficie ocular. Desde entonces es un recurso ampliamente utilizado en oftalmología (134-137) y en menor grado en el tratamiento de heridas cutáneas, quemaduras, úlceras crónicas de miembros inferiores (126, 183-186) y en otros procedimientos quirúrgicos y no quirúrgicos (187-197). En cualquiera de estas aplicaciones los criterios que han guiado su utilización pueden agruparse en varias categorías:

#### **4.2.1 Como apósito biológico o recubrimiento:**

Cuando se utiliza como apósito biológico o recubrimiento para cubrir quemaduras extensas, áreas inflamadas, expuestas por daño o por cirugía, la MA actúa evitando la pérdida de líquidos, electrolitos y proteínas; protegiendo las superficies cruentas de posibles insultos externos y aportando sustancias biológicas que reducen la inflamación,

previenen o ayudan a controlar la infección y favorecen la regeneración epitelial bajo el implante. Además, la MA tiene un efecto favorable sobre los niveles de dolor atribuido a un papel protector sobre las fibras nerviosas terminales (133).

Al adherirse a la superficie de la herida, la MA evita la formación de seromas, e igualmente en las heridas quirúrgicas las propiedades hemostáticas de las fibras de colágeno de la membrana basal amniótica contribuyen a evitar la formación de hematomas (124, 128, 133, 183). Además su alto contenido en ácido hialurónico hace que sirva para proporcionar un ambiente no inflamatorio y no cicatrizante (128).

#### **4.2.2. Como sustrato-injerto:**

Cuando la MA se utiliza como injerto rellena un defecto tisular, reemplazando la matriz estromal ausente y proporcionando una membrana basal para que la epitelización se produzca sobre ella. La placa basal de la MA facilita la migración de las células epiteliales, refuerza las adhesiones de las células epiteliales basales, promueve la diferenciación epitelial y previene la apoptosis. La presencia de diferentes formas de lamininas características de la placa basal de la MA es lo que permite la rápida adhesión y proliferación celular sobre ella (184-186).

#### **4.2.3 Como sustrato para la expansión de células *ex vivo*:**

Con este fin se ha utilizado fundamentalmente para el cultivo *ex vivo* de las células madre epiteliales del limbo y su posterior trasplante; como sistema de soporte para condrocitos humanos autólogos utilizados para la reparación *in vitro* de cartílago articular humano, y como soporte para melanocitos utilizados en el trasplante de pacientes con vitiligo (193-195). En el primer caso el proceso ha implicado la

transferencia de células epiteliales límbicas humanas autólogas o alogénicas cultivadas sobre MA humana en pacientes con daños severos y cicatrices ocasionados por defectos de las células madre epiteliales del limbo. Las células trasplantadas han regenerado la superficie ocular a través de la restauración de un epitelio corneal intacto (193). En el segundo caso, condrocitos aislados de cartílago articular humano se han cultivado sobre el lado coriónico de la membrana basal de la MA denudada y conjuntamente con esta se han utilizado para la reparación *in vitro* de cartílagos humanos con osteoartritis. Los resultados han evidenciado la formación de un tejido nuevo con expresión de colágeno tipo II, muy bien integrado al cartílago con osteoartritis (194). En el último caso, melanocitos obtenidos de biopsias cutáneas de las zonas pigmentadas de pacientes con vitíligo estable se han cultivado durante 10 a 14 días en los medios adecuados, se han transferido a MA denudada, y se han transplantado en las lesiones acrómicas de dichos pacientes. Los resultados han evidenciado repigmentación de aproximadamente 90 a 95% del área de las lesiones tratadas (195).

#### **4.2.4. Con otros fines:**

En la reconstrucción quirúrgica de diversos tejidos y órganos como vagina (187-189), vejiga, uretra (190, 191), cavidad oral y laringe (192). En el re-emplazo de la mucosa nasal en pacientes con Telangiectasia hereditaria familiar hemorrágica, en timpanoplastias, vestibulopatías (192). En otras diversas condiciones quirúrgicas y como implante subcutáneo en niños con enfermedades de depósito avanzadas para proporcionar una fuente celular no inmunogénica de enzimas lisosomales exógenas (196, 197).



En conclusión, el uso de la MA como tejido ha tenido una historia de varias décadas, pero ha sido desde la última década cuando ha surgido como una promesa para la obtención de células madre y para el desarrollo de terapias basadas en ellas.

## ***OBJETIVOS***

## 1. OBJETIVO GENERAL

Realizar el aislamiento y caracterización de las células epiteliales y mesenquimales de la MA y evaluar sus propiedades de células madre a través de la expresión de marcadores de membrana, factores de transcripción, estudios clonogénicos, capacidad de expansión *in vitro* y potencial de diferenciación *in vitro*.

## 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar las hAEC y las hAMSC de la MA
- Evaluar la viabilidad de las hAEC y de las hAMSC obtenidas de la MA.
- Realizar cultivos primarios y secundarios de las hAEC y de las hAMSC obtenidas de la MA para medir su capacidad de expansión *in vitro*.
- Determinar el perfil inmunofenotípico de las hAEC y de las hAMSC obtenidas de la MA.
- Evaluar la capacidad de diferenciación *in vitro* de las hAEC hacia células de las tres capas germinales: ectodermo (células neurales), endodermo (células hepatocíticas) y mesodermo (células cardíacas, adipocíticas, osteocíticas y condrocíticas)
- Evaluar la capacidad de diferenciación *in vitro* de las hAMSC hacia células del mesodermo (adipocíticas, osteocíticas y condrocíticas).
- Comparar los resultados obtenidos con los publicados en la literatura

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

Para la realización de esta tesis se siguió una metodología de manipulación, procesamiento y estudio de la MA protocolizada, sistemática, práctica y de fácil seguimiento, desarrollada por mi persona, de acuerdo con las indicaciones de la literatura y con los resultados de la experiencia obtenida durante la realización de ensayos pilotos. Este protocolo de estudio que funcionó además como hoja de recogida de datos se denomina MEMBRANA AMNIÓTICA. PROTOCOLO DE AISLAMIENTO Y CULTIVO CELULAR. RECOGIDA DE DATOS. En él se presentan paso a paso cada una de las etapas a cumplir y los ensayos a realizar desde la obtención de la placenta hasta los estudios de diferenciación *in vitro*. ANEXO 1.

### **1. OBTENCIÓN DE LA PLACENTA:**

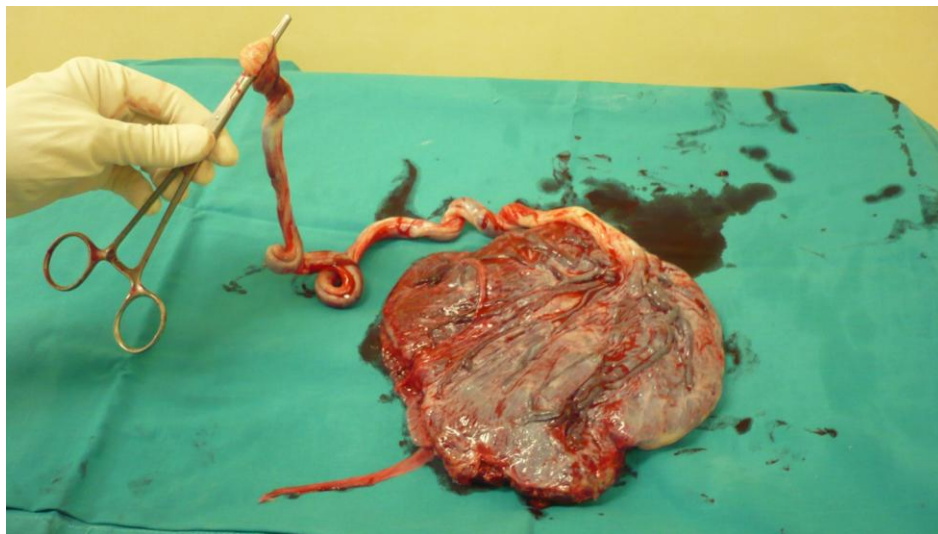
Las placentas se obtuvieron a partir de 20 madres sanas con edades comprendidas entre los 24 y los 44 años (media 34,6 años), con embarazos no complicados y tiempos de gestación entre las 37 sem + 3 días y las 40 sem + 4 días (promedio 39 sem + 3 días), a quienes el Servicio de Ginecología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca les realizó cesáreas electivas por diferentes causas obstétricas (cesárea anterior, presentación podálica, desproporción céfalo-pélvica, etc.), todas sin complicaciones, obteniéndose 21 bebés (10 masculinos y 11 femeninos) (Tabla 8).

**Tabla 8. Datos de la muestra estudiada**

Edad de la madre	Edad gestacional	Género del bebé
34 a	39 S + 5 d	Masc
36 a	39 S + 3 d	Fem
30 a	39 S + 3 d	Masc
30 a	39 S + 4 d	Fem
34 a	39 S + 5 d	Masc
42 a	39 S + 1 d	Masc
39 a	38 S + 5 d	Masc
30 a	39 S + 1 d	Fem
27 a	40 S + 1 d	Fem
40 a	39 S + 1 d	Fem
31 a	40 S + 0 d	Masc
24 a	37 S + 3 d	Masc
27 a	40 S + 4 d	Fem
37 a	39 S + 5 d	Masc
38 a	39 S + 3 d	Fem
44 a	37 S + 5 d	Masc
36 a	39 S + 1 d	Masc
35 a	39 S + 5 d	Fem
37 a	39 S + 2 d	Fem
42 a	37 S + 4 d	Fem

Siguiendo la legislación vigente en la utilización de muestras humanas para la investigación, todas las placentas se obtuvieron tras la firma del Consentimiento Informado por parte de las donantes y previa autorización del estudio por el Comité de Bioética del Hospital Virgen de la Arrixaca.

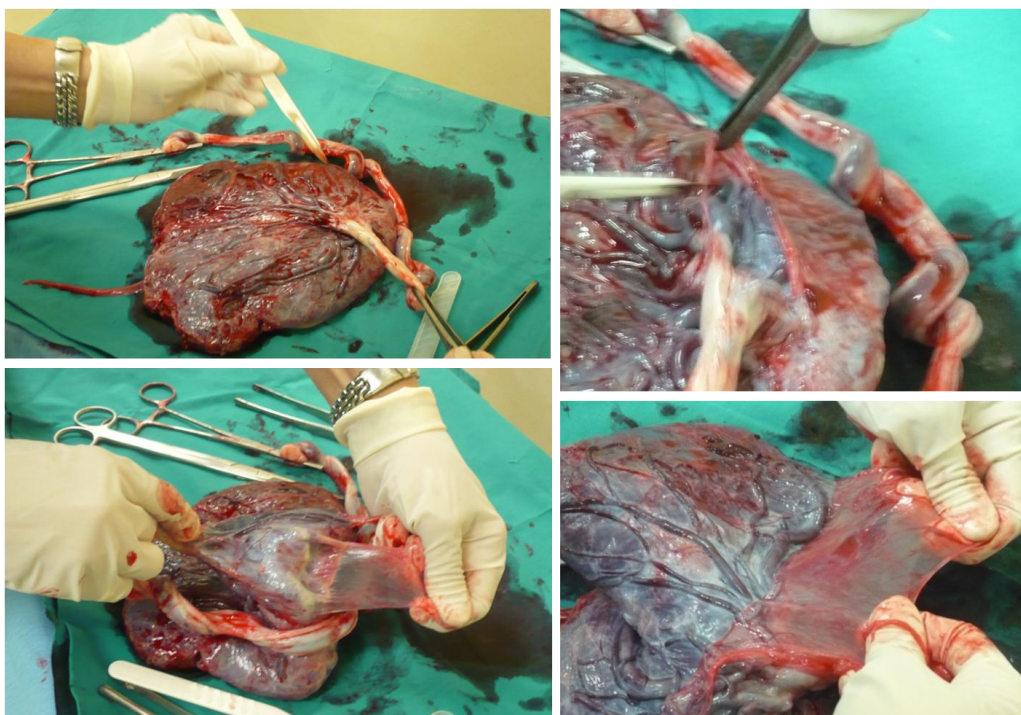
En todos los casos, tras la extracción de la placenta y su revisión por parte del cirujano, ésta fue colocada sobre una mesa cubierta con un paño estéril (Figura 5), e inmediatamente, siguiendo una técnica aséptica, se procedió dentro del mismo quirófano a la separación de la MA del resto de las estructuras placentarias



*Figura 5. Imagen de la placenta recién obtenida tras la cesárea electiva*

## **2. OBTENCIÓN DE LA M.A:**

La placenta se colocó sobre la mesa con la superficie materna o área de los cotiledones hacia abajo en contacto con el paño estéril y la superficie lisa o área del cordón umbilical hacia arriba, de tal forma que la MA quedó como la parte más superficial de la placenta. Seguidamente se realizó una incisión circular cerca de la inserción del cordón, prácticamente alrededor de su base, muy superficial para que no atravesara el tejido placentario. A partir de este corte se inició la separación de la MA del corion subyacente por disección mecánica (roma) ayudada con pinzas sin dientes, en dirección hacia los bordes del disco placentario y de las membranas libres (Figura 6).



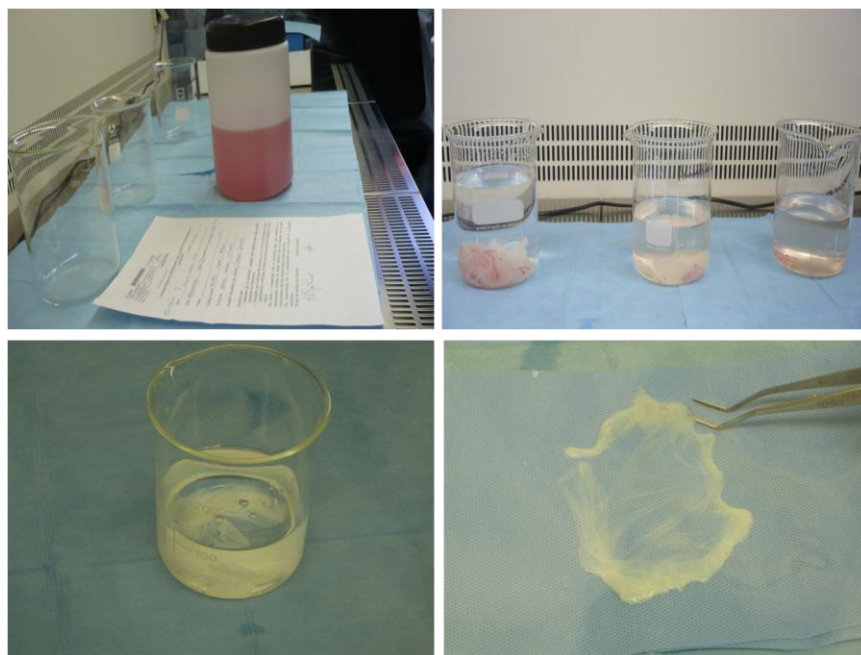
*Figura 6. Separación de la MA del corión subyacente*

Una vez separada la MA, se colocó en un frasco estéril con tapa que contenía 1000 ml de solución salina fisiológica (SSF) suplementado con Cotrimaxol (50 $\mu$ g/ml; Soltrim<sup>®</sup>, Almirall-Prodefarma S.A, Barcelona, Spain), Tobramicina (50 $\mu$ g/ml; Tobramicina Normon<sup>®</sup>, Laboratorios Normon S.A, Madrid, Spain), Vancomicina (50 $\mu$ g/ml; Vancomicina Hospira<sup>®</sup>, Laboratorios Hospira S.L., Madrid, Spain) y Anfotericina B (50 $\mu$ g/ml; Fungizona<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb S.L., Madrid, Spain). Desde el quirófano la MA se trasladó inmediatamente al laboratorio y el resto de la placenta se dejó en el área quirúrgica para su posterior desecho.



### 3. PROCESAMIENTO DE LA MA:

Una vez en el laboratorio, la manipulación de la MA se realizó en condiciones de esterilidad en Cabina de Flujo Laminar tipo II con filtros HEPA. La MA se sometió a lavados sucesivos (3 a 4), sumergiéndola en vasos de precipitados que contenían cada uno 200 ml de Dulbecco's Buffer Fosfato Salino (DPBS) sin calcio ni magnesio, pH 7.5 (Gibco® Invitrogen™) para quitar la sangre, y cambiándola cada vez a un vaso de precipitado limpio, tal como se señala en la Figura 7. Este paso se considera crucial para la posterior actuación de la tripsina pues de no eliminarse los coágulos de sangre, disminuye su eficiencia.



*Figura 7. Procesamiento de la MA en la Cabina de Flujo Laminar*

Al terminar los lavados, la MA se dividió en tres partes: Una pequeña se utilizó para la realización del estudio histológico en fresco y en bloques de parafina en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de la Arrixaca, otra se envió a

la Unidad de Investigación de Oncología Molecular y TGF $\beta$  para estudios moleculares relacionados con el papel de la MA en la cicatrización de las heridas, y la tercera, de mayor tamaño, se utilizó para el aislamiento celular. En 12 oportunidades la MA se utilizó en su totalidad para el aislamiento celular, por lo que en ellas pudo estimarse el número total de células epiteliales y células mesenquimales aisladas del tejido completo.

#### **4. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LA MA**

**4.1 En fresco:** Se colocó un pequeño fragmento de MA extendido sobre lámina porta-objeto, se dejó secar y se tiñó con la coloración de May-Grünwald Giemsa, para ello se fijó con metanol durante 5 min, se retiró el exceso del fijador y se cubrió la extensión con May Grünwald durante 5 min, se lavó con solución tampón (Fosfato disódico: 9,52 g; Fosfato monosódico: 1,82 g; agua destilada: 1000 ml). Se dejó una pequeña cantidad de tampón sobre el portaobjeto, se añadió colorante Giemsa y se dejó actuar por 5 min, se lavó nuevamente con tampón y se dejó secar.

**4.2 En bloques de parafina:** Los fragmentos de MA se colocaron en formol tamponado para su fijación y se llevaron al Departamento de Anatomía Patológica, allí fueron incluidos en parafina, cortados en secciones de 5 micras de espesor, posteriormente desparafinados, coloreados con Hematoxilina-Eosina y observados al Microscopio de Luz.

En paralelo con las tinciones de Hematoxilina-Eosina se realizó en cortes de MA incluidos en parafina, la determinación inmunohisto-histoquímica de citokeratina y vimentina por métodos automatizados. Para ello se utilizó el anticuerpo anti-citokeratina

humana, clone AE1/AE3, obtenido por inmunización de ratones y el anticuerpo anti-vimentina clone V9, también obtenido en ratones (DAKO), ambos preparados para su utilización con “Autostainer Link Instruments” y para ser contra-teñidas con hematoxilina. El clone AE1/AE3 es un cóctel de dos anticuerpos monoclonales que identifican la mayoría de las citokeratinas humanas, las cuales son un grupo de proteínas que forma el citoesqueleto de las células epiteliales. El Clon V9 anti-vimentina, es un anticuerpo monoclonal utilizado para la identificación de células de origen mesenquimal. La vimentina pertenece a la clase III de las 5 clases de filamentos intermedios que forman parte del citoesqueleto de las células de vertebrados. Tiene alto grado de especificidad para células de origen mesenquimal. Se decidió realizar estas dos determinaciones debido a que en la literatura existen controversias acerca de la co-expresión de citokeratina y vimentina en las células epiteliales de la MA.

## **5. AISLAMIENTO CELULAR:**

### **5.1 Células Epiteliales (hAEC)**

Para el aislamiento de las hAEC se siguió el Protocolo de Miki y col. (70) con algunas modificaciones. La MA se cortó en fragmentos de aproximadamente 3 cm que se colocaron en un tubo de 50 ml (BD Falcon™), se midió el volumen ocupado por dicha membrana, el cual, cuando se procesó la membrana completa, fue de 30 a 35 ml. Al tubo se le añadió un volumen de 10 ml de 0,05% de tripsina/EDTA preparada a partir de una solución de 0.25% de tripsina con 0.53 mM de EDTA 4Na (Sigma Aldrich Company) en DPBS (pH 7.5) y se agitó durante 30 segundos. Seguidamente, los fragmentos de MA se

transfirieron con pinzas a dos tubos limpios de 50 ml, ocupando un volumen aproximado de 15 ml en cada tubo. A cada tubo se le añadió un volumen de tripsina/EDTA fresca al 0.05%, y se le incubó a 37°C durante 10 minutos en un baño con agitación (100 rpm) con el objeto de eliminar cualquier resto de sangre o de células contaminantes. De nuevo los fragmentos de MA se transfirieron con pinzas a dos tubos limpios de 50 ml y se descartó la tripsina. Esta vez a cada uno de los tubos se les añadió 25 ml de la solución de tripsina/EDTA al 0.05% fresca y se prolongó a 40 minutos la incubación a 37°C en baño con agitación. Al cabo de este tiempo tras agitar suavemente los fragmentos con ayuda de las pinzas y trasladarlos a otros tubos limpios de 50 ml, se colectó el producto de la digestión de la tripsina de ambos tubos en un vaso de precipitados de 200 ml y para neutralizar los efectos de la tripsina se añadió dos volúmenes de medio de cultivo DMEM de alta glucosa (*Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose*) (Gibco®, Invitrogen™, Parsely, UK) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%, (BioWittaker, Lonza, Verviers, Belgium ), 5 ml 200 mM de L- glutamina (BioWittaker, Lonza, Verviers, Belgium), 5 ml de solución de antibióticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml estreptomicina) (BioWittaker, Lonza, Verviers, Belgium), (que en lo sucesivo denominaremos DMEM estándar o medio basal), a 4°C, manteniéndose el producto a esta temperatura durante todo el proceso. La membrana se expuso nuevamente a la solución de tripsina/EDTA al 0.05% en las mismas proporciones y se incubó en iguales condiciones. El procedimiento se repitió tres veces, colectando siempre el producto de la digestión con tripsina y neutralizándola con el doble del volumen de DMEM estándar a 4°C. Al final, el producto de varias digestiones se mezcló, se filtró a través de un filtro de células de 100 µm para

retirar el tejido no digerido y se centrifugó durante 5 minutos a 500 x g, a 4°C. El sobrenadante se decantó y el botón celular se suspendió en 20 a 30 ml del medio de cultivo señalado. Tras las tripsinizaciones, los fragmentos de MA se conservaron para el aislamiento de las hAMSC. De estos fragmentos se tomaron dos pequeñas muestras, una para la observación en fresco al microscopio de luz y otra para la fijación en formol, inclusión en bloques de parafina y realización de cortes en el Departamento de Anatomía Patológica. Ambos estudios se realizaron con la finalidad de evaluar la acción de la tripsina sobre el epitelio y la persistencia o no de células epiteliales residuales.

**5.2 Células del Mesodermo Amniótico:** Para el aislamiento de las células del mesodermo amniótico se siguió el Protocolo de Alviano y col. (90) con algunas modificaciones.

Una vez separadas las hAEC de la MA por el método de digestión con tripsina y confirmada la ausencia de células epiteliales por evaluación microscópica, la MA se cortó en trozos más pequeños y se sometió a una nueva digestión con una solución de 0.05 mg/mL de DNase I (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany) y 2mg/ml de colagenasa I (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany) en DPBS, los fragmentos se pipetearon vigorosamente hacia arriba y hacia abajo, evitando burbujas, y se incubaron a 37°C en baño con agitación (300 rpm) durante 90 minutos. Seguidamente se neutralizó la colagenasa con suero bovino fetal al 10% a 4°C y la mezcla se filtró a través de una malla de 100 µm, retirando un pequeño fragmento de los retenidos en el filtro para estudio histológico. El filtrado se centrifugó a 500 x g durante 5 min a 4°C, se

decantó el sobrenadante, el botón celular se lavó dos veces con DPBS frío y finalmente se re-suspendió en DMEM estándar.

## 6. RECUENTO Y VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS AISLADAS:

Para la realización del recuento celular y la viabilidad se utilizó un hemocitómetro (Cámara de Neubauer) y el método de exclusión de colorantes vitales con azul de tripán o tripano al 0.2%.

**La Cámara de Neubauer** es una placa de vidrio óptico especial, de precisión, utilizado para el conteo de células o de otras partículas en suspensión, que se usa en el microscopio de campo claro o en el de contrate de fase. Consiste en un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con un diamante una cuadrícula de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. El área sombreada y marcada L (Figura 8) corresponde a  $1 \text{ mm}^2$ . La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada por 0.1 milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de  $0.1 \text{ mm}^3$ , es decir  $0.1 \mu\text{L}$  (Figura 8).

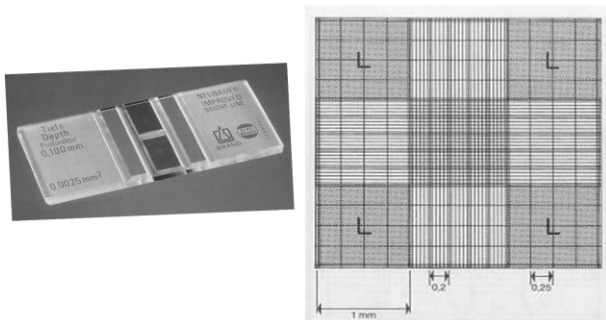


Figura 8. Cámara de Neubauer

**El azul de tripán o tripano** es un colorante azoico que se utiliza en las tinciones histológicas para ensayos de viabilidad. Las células vivas con su membrana celular intacta no son coloreadas debido a que las células son muy selectivas a los compuestos que dejan pasar a través de su membrana. Las células muertas por el contrario se tiñen de un color azul claro al microscopio de luz. Se llama método de exclusión porque las células vivas son excluidas de la tinción.

Para realizar el recuento celular se tomó una muestra de 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular en un tubo tipo Eppendorf y se mezcló con un volumen equivalente (100  $\mu\text{L}$ ) de azul de tripán durante 2 a 3 minutos (máximo 5) a temperatura ambiente (TA), seguidamente se tomó una muestra de 10 a 15  $\mu\text{L}$  de la mezcla y se colocó en la cámara de Neubauer, procediéndose al recuento de las células en los cuatro cuadrantes, utilizando un microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse Ti-S™). El número total de células se obtuvo de la fórmula:  **$N=n \times FD \times 10^4 \times V$**

N= N° de células totales

n = media de los cuatro cuadrantes

FD= factor de dilución (2)

$10^4$ = cálculo en ml, dado que el volumen de muestra es de 0.1  $\mu\text{L}$

V= volumen de la suspensión celular.

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

**Viabilidad=  $[n^\circ \text{ células vivas} / (n^\circ \text{ células vivas} + n^\circ \text{ células muertas}) \times 100$**

Una vez estimado el número y la viabilidad de las células obtenidas, se continuó con el protocolo de estudio de las células epiteliales que incluye: observación al microscopio de luz de extendidos de células recién aisladas teñidos con Hematoxilina-Eosina, evaluación del ciclo celular, estudio fenotípico de antígenos de membrana e intracelulares, determinación de marcadores de pluripotencialidad, cultivo primario (investigación de formación o no de cuerpos esferoides), ensayos de expansión *in vitro*, ensayos de proliferación celular, estudios clonogénicos y ensayos de diferenciación *in vitro*.

Para el caso de las células estromales, una vez estimado el número y la viabilidad de las células aisladas, se procedió a la siembra en frascos de cultivo para la obtención de las células adherentes.

## **7. CULTIVOS PRIMARIOS:**

### **7.1 Células epiteliales:**

Las células se sembraron por cuadruplicado a una densidad de  $1.0 \times 10^5$  células /cm<sup>2</sup> en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (F 75) (Nunc, NY, USA) en dos tipos de medios: dos frascos contenían DMEM estándar, y dos contenían los mismos suplementos más 10 ng/ml de Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) (Sigma-Aldrich), a fin de evaluar el efecto de este factor sobre la proliferación celular. Todos los frascos se incubaron en estufa a 37°C en atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5%, y se evaluaron cada 24 horas al microscopio de contraste de fase para determinar el estado de las células, su adherencia a los frascos, formación de mono-capa, formación de cuerpos esferoides, etc. Al tercer



día se realizó el primer cambio del medio de cultivo, se retiraron las células no adherentes, se contaron y se les determinó la viabilidad. Para investigar si estas células se adherían al sembrarlas nuevamente, se colectaron 12 muestras: 6 obtenidas de frascos que ya mostraran confluencia al momento de retirarlas y 6 obtenidas de frascos que no mostraban confluencia. Se volvieron a sembrar en frascos con medio fresco suplementado o no con EGF según el frasco de origen de dónde se hubiesen colectado, y se continuó el proceso del cultivo primario, con cambio del medio de cultivo cada tres días. Cuando la monocapa de células alcanzó una confluencia mayor de 80%, se procedió a despegar las células de dos de los frascos (uno con EGF y el otro sin) para la realización de sub-cultivos. En los otros dos frascos se continuó el cambio de medio durante dos a tres semanas sin despegar las células, para evaluar microscópicamente la formación o no de cuerpos esferoides, los cuales son acúmulos de células madre formados sobre el mosaico de células epiteliales. Para despegar las células se retiró todo el medio de cultivo, se lavaron dos veces con 6 ml de DPBS frío para eliminar los restos del medio de cultivo y de células no adheridas, se trataron con 5 ml de solución de tripsina/EDTA al 0,05%, y se incubaron a 37°C en atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5% durante 3 a 5 minutos. Para evaluar el grado de disociación celular producido por la tripsina, se observaron bajo el microscopio de contraste de fase y de ser necesario, para ayudar a dicha disociación, se prolongó el tiempo de incubación durante 2 a 5 minutos y al frasco de cultivo se le dieron golpes suaves con las palmas en el fondo y en los lados. Una vez despegadas todas las células, la tripsina se neutralizó con la misma cantidad de DMEM estándar frío; la mezcla se colectó en un tubo de centrifuga y se centrifugó a 500 x g

durante 5 minutos a 4°C; el sobrenadante se descartó y el botón celular se re-suspendió en 2 a 5 ml de DMEM estándar; las células se contaron en Cámara de Neubauer, se estimó la viabilidad por la prueba de exclusión del azul de tripán y se calculó el rendimiento celular a partir de la relación porcentual entre el número de células obtenidas y el número de células sembradas menos el número de células no adherentes.

### **7.2 Células aisladas del Mesodermo Amniótico:**

Las células se sembraron por duplicado a una densidad de  $1.0 \times 10^5 / \text{cm}^2$  en frascos de 25  $\text{cm}^2$  (F 25) (Nunc, NY, USA) en DMEM suplementado con 20% de SBF, 5 ml 200 mM de L- glutamina, 5 ml de solución de antibióticos (100 U/ml de penicilina G, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  estreptomycin). Se incubaron en estufa a 37°C en atmósfera humidificada de  $\text{CO}_2$  al 5%. El medio de cultivo se cambió una vez a la semana hasta que se observó la aparición de células adherentes fibroblastoides y seguidamente dos veces por semana, utilizando DMEM estándar. Cuando el cultivo celular alcanzó una confluencia de 80 a 90%, las células se despegaron con solución de tripsina/EDTA al 0,05%, siguiendo el mismo procedimiento descrito para las células epiteliales. El botón celular se re-suspendió en 2 a 5 ml de medio de cultivo estándar, las células se contaron en Cámara de Neubauer y se determinó la viabilidad. Estas células se consideraron solo células adherentes, y tal como se procede en el estudio de las MSC obtenidas de MO, se subcultivaron dos veces para asegurar una población de células mesenquimales homogénea. A partir de esta población homogénea de MSC (hAMSC en P0) se realizaron todos los estudios subsecuentes, a saber, los ensayos de expansión y proliferación celular, la evaluación del ciclo celular, los estudios clonogénicos, la investigación de

marcadores de membrana y de pluripotencialidad, y los ensayos de diferenciación celular *in vitro*.

## 8. SUB-CULTIVOS. ENSAYOS DE EXPANSIÓN CELULAR

Para evaluar la capacidad de expansión de las células *in vitro* se realizaron subcultivos. Las hAEC en P0 se sembraron por cuadruplicado a una densidad de  $1.0 \times 10^4$  cél/cm<sup>2</sup> en F 75, dos con DMEM estándar y dos con DMEM suplementado con 10 ng/ml de EGF; y las hAMSC, igualmente en P0, se sembraron por duplicado a una densidad de  $1.0 \times 10^3$ /cm<sup>2</sup> en F 75, en DMEM estándar. Todos se incubaron a 37°C en atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5% y cada tres días se les renovó el medio correspondiente. Cuando las células alcanzaron una confluencia mayor de 80%, se retiró el medio y se despegaron las células siguiendo la técnica descrita en el cultivo primario. Se realizó recuento celular por duplicado en la Cámara de Neubauer y se estimó la viabilidad, seguidamente se realizaron nuevas siembras en F75, a la densidad y en los medios correspondientes para cada tipo de células. El proceso se repitió de igual forma a través de pases sucesivos hasta obtener evidencias claras del comportamiento celular en relación a su capacidad de expansión.

## 9. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR:

Para las hAEC la proliferación celular se estimó por el Método MTT y por el método EZ4U (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien), en células recién extraídas cultivadas en DMEM estándar y en DMEM suplementado con EGF.

La cuantificación de la proliferación por el método del MTT se basa en la medición de la absorbancia producida tras la reducción de la sal de tetrazolium 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolium, un compuesto de color amarillo, hidrofílico, por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, que da lugar a un compuesto hidrofóbico de color azul que es el formazán. La conversión solo se realiza en células vivas y la cantidad de formazán producido es proporcional al número de células vivas. Tras la captación del MTT, las células se rompen y el formazan se solubiliza con DMSO. Para la realización del ensayo, las células se sembraron por cuadruplicado a una densidad de  $3.0 \times 10^3$ /pocillo en una placa de 96 pocillos en DMEM estándar y en DMEM con EGF. El medio se cambió cada tercer día y la tasa de proliferación celular se midió cada cuarto día desde el día 1 hasta el día 21. Para la investigación se añadió 150  $\mu$ L de MTT (0,5mg/ml) a cada pocillo y se incubaron las células a 37°C durante 4 horas. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 150  $\mu$ L de DMSO a cada pocillo. Seguidamente se midió la absorbancia en un lector de ELISA a una longitud de onda de 492nm.

La cuantificación por el método EZ4U se basa en el mismo principio del MTT, pero en este caso se trabaja con una sal de tetrazolium soluble en agua y el producto formazan también es soluble en agua. Para su realización las células se sembraron por cuadruplicado a la misma densidad y en el mismo tipo de placas que lo descrito para el MTT, utilizando igualmente siembras en DMEM estándar y en DMEM suplementado con EGF. El medio se cambió cada tercer día y la tasa de proliferación celular se midió cada cuarto día desde el día 1 hasta el día 21. Para la investigación se añadieron 20  $\mu$ l de la solución colorante a 200 $\mu$ l de la muestra, se incubaron las células durante 4 horas a 37°C

hasta obtener un incremento significativo en la intensidad de color. Se retiró la placa de la incubadora y se agitó suavemente antes de la lectura de la densidad óptica. La absorbancia se midió en un lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm a 492 nm con 620 nm como referencia.

Para las hAMSC la estimación de la proliferación celular se realizó por el MTT y por un método de recuento celular en cámara de Neubauer cada 4 días hasta el día 21.

La cuantificación por MTT se realizó siguiendo la técnica descrita para las hAEC, con la diferencia de que las hAMSC en P0 se sembraron solo en DMEM estándar.

Para la medición de la proliferación celular por el método de recuento celular, las hAMSC se sembraron por duplicado a una densidad de  $1.0 \times 10^3 / \text{cm}^2$  en 12 frascos de  $25 \text{ cm}^2$  para cuantificar el número de células mesenquimales los días 4, 7, 11, 14, 17 y 21. La siembra se realizó en DMEM estándar y se incubaron bajo las mismas condiciones ya descritas, con cambios de medios cada tercer día. El día 4 se despegaron las células de dos frascos, independientemente de su grado de confluencia, con solución de tripsina/EDTA al 0,05% a  $37^\circ\text{C}$  durante 3 a 5 minutos, se realizó el recuento celular en hemocitómetro y se anotaron los valores. El día 7 se repitió el procedimiento y así sucesivamente los días 11, 14, 17 y 21.

Con los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos se realizaron curvas de crecimiento.

#### **10. ENSAYOS CLONOGÉNICOS:**

La clonogenicidad se define como la habilidad de una célula única de producir una colonia cuando se siembra a densidades muy bajas. Con el objeto de evaluar las

propiedades de auto-renovación de las hAEC y de las hAMSC a través de la clonogenicidad, las hAEC del P0 se sembraron por duplicado a tres densidades diferentes:  $1.0 \times 10^1$  céls/cm<sup>2</sup>,  $1.0 \times 10^2$  céls/cm<sup>2</sup> y  $1.0 \times 10^3$  céls/cm<sup>2</sup> en placas de Petri de 60 mm (28 cm<sup>2</sup>) en DMEM estándar y en DMEM suplementado con 10 ng/ml de EGF; y las hAMSC se sembraron por duplicado en DMEM estándar a una densidad única de  $1.0 \times 10^2$  céls/cm<sup>2</sup>, siguiendo la técnica recomendada para los estudios de clonogenicidad de las MSC de otras fuentes (198). Los cultivos de ambos tipos de células se mantuvieron por 14 días con re-emplazo del medio cada tres días. Al cabo de ese tiempo se retiró el medio de cultivo, las placas se lavaron dos veces con DPBS y se fijaron con metanol durante 5 min a TA. Se eliminó el metanol y una vez que las placas se secaron, se tiñeron con May-Grünwald Giemsa según la técnica estándar para su visualización al microscopio. Siguiendo las recomendaciones de Chan y col. (198) se consideró como colonia cualquier cúmulo (*cluster*) con más de 50 células y se calculó el porcentaje de eficiencia clonogénica de acuerdo a la fórmula: % de eficiencia clonogénica = (Nº de colonias totales / Nº total de células sembradas) X 100 células sembradas.

## 11. INVESTIGACIÓN DEL CICLO CELULAR:

Se realizó mediante la tinción del ADN con yoduro de propidio. El yoduro de propidio proporciona información sobre el contenido de ADN, permitiendo distinguir y cuantificar, mediante la utilización de un citómetro de flujo, la distribución de las células a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular (proporción de células en fase G0/G1, S, G2/M, células apoptóticas y poliploides). En las hAEC se investigó en células recién

aisladas y en células del P0 cultivadas en DMEM con y sin EGF. En las hAMSC se investigó en células en P0 y en P4. Para ello se preparó una suspensión de  $0.5 \times 10^6$  células en 200  $\mu\text{L}$  de PBS, se le añadió 1ml de etanol frío al 70% y se dejó actuar durante 30 min. Tras lavar dos veces con DPBS y centrifugar 2 min a 1000 rpm, el pellet se trató con 100 $\mu\text{l}$  de ARNasa (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) para asegurar solo la tinción del ADN, seguidamente se añadieron 400 $\mu\text{l}$  de yoduro de propidio (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), se mezcló y se dejó actuar durante 10-15 min. Finalmente las muestra se analizaron en un citómetro de flujo con láser de Argón de 488nm (FacSort Beckton & Dickinson).

## 12. CARACTERIZACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO:

La investigación de marcadores fenotípicos de membrana se realizó por citometría de flujo (*Fluorescence-activated cell sorting or FACS*). El principio básico de la investigación radica en que los anticuerpos marcados con fluorocromos se unen específicamente a los diferentes epítopes, los fluorocromos se excitan por rayos láser y se detecta la fluorescencia emitida. El funcionamiento del citómetro se basa en tres componentes básicos: fluído, óptico y electrónico. El componente fluído permite que la muestra entre al sistema como una simple suspensión celular e intercepte el rayo láser (componente óptico) que excita el fluorocromo que está acoplado a un anticuerpo específico unido a un epítipo celular. El componente óptico genera una luz focalizada y colecta las señales luminosas desviadas por las células. Como la muestra intercepta el rayo láser, los electrones de los fluorocromos son excitados a un estado de energía mayor. Cuando los electrones caen a su nivel de energía de comienzo, la energía se libera

como un fotón con un espectro de emisión específica único para diferentes fluorocromos, lo que permite realizar el análisis en paralelo de una muestra con varios anticuerpos conjugados con diferentes fluorocromos. El sistema electrónico convierte las señales ópticas a señales electrónicas proporcionales y las pasa a forma digital para análisis computarizado.

La investigación de los epítopes de membrana de las hAEC se realizó en células recién aisladas, en células en P0 y en células no adherentes, utilizando los anticuerpos SSEA1, SSEA3, SSEA4, TRA 1-60, 1-81 (Chemicon International) y HLA DR (BD Biosciences, San José California USA) en la cantidad señalada en la Tabla 9, más un total de  $1.5 \times 10^5$  hAEC en 100  $\mu$ L de DPBS por tubo. Como controles negativos para cada anticuerpo se utilizaron inmunoglobulinas isotópicas. Los tubos se incubaron a TA durante 30 min en oscuridad, las células se lavaron con 2 ml de DPBS, se centrifugaron por 5 min a 500 x g, el sobrenadante se eliminó con pipeta Pasteur, el botón celular se re-suspendió en 100 $\mu$ L de DPBS. Seguidamente las muestras se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados al fluorocromos (5 $\mu$ L) y se mantuvieron en oscuridad por 15 minutos. Se lavaron dos veces con 1 ml de DPBS y se centrifugaron por 5 minutos a 500 x g. El botón celular se re-suspendió, las células se fijaron con 2 ml de para-formaldehído al 1% en DPBS y se incubaron durante 10 min a TA. Se centrifugaron durante 5 min a 500 x g, se retiró el para-formaldehído y de nuevo se lavaron con DPBS. Finalmente, las células se re-suspendieron en 200  $\mu$ L de DPBS para su lectura inmediata o al día siguiente en un FACScalibur (*fluorescence activated cell sorting*) (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA). Se utilizó el software "Cell Quest" (Becton Dickinson Biosciences) para la



adquisición de 10.000 células y el análisis de los datos se realizó utilizando el programa *PAINT-A-GATE* (Becton Dickinson Biosciences).

**Tabla 9. Anticuerpos usados para la evaluación de antígenos de superficie de las hAEC**

Epítotope	Fuente	Volumen	Secundario/Fluorocromo	Chemicon® International, Inc
TRA-1 60	Mouse IgM	5µL/1.5x10 <sup>5</sup> cél en 100 µL	Anti Mouse FITC	No. MAB4360-20
TRA-1 81	Mouse IgM	2.5µL/1.5x10 <sup>5</sup> cél en 100 µL	Anti Mouse FITC	No. MAB4381-20
SSEA 1	Mouse IgM	5µL/1.5x10 <sup>5</sup> cél en 100 µL	Anti Mouse FITC	No. MAB4301-20
SSEA 3	Rat IgM	5µL/1.5x10 <sup>5</sup> cél en 100 µL	Anti Rat FITC	No. MAB4303-20
SSEA 4	Mouse IgG3	5µL/1.5x10 <sup>5</sup> cél en 100 µL	Anti Mouse FITC	No. MAB4304-20
HLA DR	Mouse IgG2	5µL/1.5x10 <sup>5</sup> cél en 100 µL	Anti Mouse FITC	BD Biociences. California USA

Los antígenos de superficie de las hAMSC se evaluaron por citometría de flujo en células en P0 utilizando el panel de anticuerpos monoclonales recomendado por el *Committee of the International Society for Cellular Therapy* (99) señalado en la Tabla 10. En cada tubo se colocó una suspensión de 1.5 x10<sup>5</sup> cél en 100µL más 20µL del anticuerpo conjugado con el fluorocromo correspondiente: *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) para los anticuerpos CD105, CD14 y CD45; *phycoerythrin* (PE) para los anticuerpos CD73, CD90 y CD19; *phycoerythrin cyanide 5* (PerCPCy5.5) para el CD34, todos de Becton Dickinson Biosciences (San José, CA, USA). Los tubos se incubaron durante 15 min a TA en oscuridad y seguidamente las células se fijaron con para-formaldehído al 1% en PBS durante 10 min. Se centrifugaron a 500 x g durante 5 min, se les retiró el formaldehído, se lavaron con DPBS y finalmente se re-suspendieron en 200µL de DPBS para su lectura

inmediata o al día siguiente en un Citómetro de Flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San José, CA, USA). Se colectaron 10.000 eventos/tubo. Los datos se analizaron con un *Cell Quest Software* (Becton Dickinson, San José, CA, USA).

**Tabla 10. Anticuerpos utilizados para el análisis por citometría de flujo de las hAMSC**

Anticuerpo	Volumen	Concentración/ 100µL	Fluorocromo	Suplidor	Clon
CD105	20µL	1.5x10 <sup>5</sup> céls	FITC	BD Pharmigen™	266
CD73	20µL	1.5x10 <sup>5</sup> cél	PE	BD Pharmigen™	AD2
CD90	20µL	1.5x10 <sup>5</sup> cels	PE	BD Pharmigen™	5E10
CD34	20µL	1.5x10 <sup>5</sup> cels	PerCP-Cy5.5	BD Pharmigen™	581
CD45	20µL	1.5x10 <sup>5</sup> cels	FITC	BD Pharmigen™	HE30
CD14	20µL	1.5x10 <sup>5</sup> cels	FITC	BD Pharmigen™	M5E2
CD19	20µL	1.5x10 <sup>5</sup> cels	PE	BioLegend™	HIB19
HLADR	20µL	1.5x10 <sup>5</sup> cels	FITC	BD Pharmigen™	G46-6

### 13. ANALISIS MOLECULAR.

La evaluación de la expresión de los genes se realizó por: A) PCR cualitativa (*Polymerase Chain Reaction*: Reacción en cadena de la polimerasa) para la investigación de los marcadores asociados a pluripotencialidad (Oct-4, Sox-2) en las hAEC (P0 y P3), y para la investigación de algunos genes asociados a diferenciación neuro-ectodérmica, hepatocítica y cardiomiocítica en los ensayos de diferenciación *in vitro* de las hAEC. B) PCR cuantitativa (qPCR: *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*) para la comparación cuantitativa de la expresión de los genes de pluripotencialidad en las hAEC

en P0 y P3, y en las hAMSC en los mismos pases. C) PCR arrays (*RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Arrays de Qiagen<sup>®</sup>*) para explorar los cambios en el nivel de expresión de un conjunto amplio de genes antes y después de cultivar las células en los medios de diferenciación neuro-ectodérmico, hepatocítico y cardiomiocítico.

Para el análisis de los marcadores de pluripotencialidad, las hAEC se sembraron a una densidad  $1.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$  en DMEM suplementado con EGF y las hAMSC a una densidad de  $1.0 \times 10^3 / \text{cm}^2$  en DMEM estándar, en placas de 5 cm de diámetro y se cultivaron hasta alcanzar una confluencia de 90 a 100%.

Para la investigación de los marcadores de diferenciación pre-seleccionados y del perfil genético de las células antes y después de los ensayos de diferenciación, las hAECs en P0 se sembraron a la densidad y en las placas señaladas, en medio de cultivo estándar suplementado con EGF y en los medios de cultivos recomendados para cada diferenciación.

En todos los casos se realizó la extracción del ARN total de las células en estudio y la retrotranscripción del ARN mensajero (ARNm) en ADN complementario (ADNc), debido a su fácil degradación por las RNasas omnipresentes.

**Extracción del ARN total:** Se utilizó el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) y se siguieron las instrucciones de los fabricantes. Brevemente, se aspiró completamente el medio de cultivo de las placas, se lavaron dos veces con PBS y se lisaron las células añadiendo 350  $\mu\text{L}$  de Buffer RLT (mezclado al momento de utilizar con mercaptoetanol en una proporción de 1 en 100). Una vez añadido el buffer se recogió el lisado en un microtubo estéril. Se homogeneizó pasándolo 5 a 10 veces por una jeringa

libre de RNasa con aguja de 20 gauge (0.9 mm de diámetro), se le añadió la misma cantidad de etanol al 70% y se mezcló cuidadosamente con la pipeta, sin centrifugar. La muestra se transfirió (700  $\mu$ L máximo) a una columna del kit de extracción del RNeasy acoplada a un tubo de colección de 2 ml, se tapó cuidadosamente, se centrifugó 1 min a 8000 x g en una microcentrifuga Galxy 16D VWR™ y se descartó el filtrado. Si el volumen de la muestra era mayor de 700  $\mu$ L, las alíquotas sucesivas se centrifugaron en la misma columna. El líquido filtrado se descartó y se añadió 700  $\mu$ L de buffer RW1 para lavar la columna, de nuevo se centrifugó a 8000 x g durante 1 min. Se descartó el líquido filtrado y se lavó la columna dos veces con 500  $\mu$ L de buffer RPE preparado 4:1 (4 partes de etanol más 1 de RPE), la primera vez se centrifugó durante 30 seg a 8000 x g y la segunda durante 2 minutos. Se realizó una centrifugación adicional durante 2 min a la misma velocidad para eliminar todos los restos de buffer y secar la sílica-gel del RNeasy. Para eluir el ARN de la columna se colocó en un tubo de colección nuevo de 1,5 ml (incluido en el kit), se añadió 20  $\mu$ L de agua libre de RNasa directamente sobre la membrana, se incubó durante 1 min y se centrifugó durante 1 min a 8000 x g. Tras la extracción del ARN se determinó su cantidad y calidad en un espectrofotómetro Eppendorf Bio Photometer plus™ a dos longitudes de onda: 260 y 280 nm. Con la absorbancia a 260 nm se obtuvo el valor de la concentración del ácido nucleico, y con el cociente entre la absorbancia a 260 nm y a 280 nm se obtuvo la pureza (valor óptimo: 1.8 a 2.0).

Tras la obtención y medición del ARN, y antes de proceder a la retrotranscripción en ADNc, para eliminar posibles restos de ADN genómico, la muestra se trató con DNasa

utilizando el RNase-Free DNase Set de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, cada muestra de 15  $\mu\text{L}$  de ARN se ajustó a un volumen de 87.5  $\mu\text{L}$  con agua libre de RNasa, se completó a 100  $\mu\text{L}$  con 10  $\mu\text{L}$  de buffer RDD más 2.5  $\mu\text{L}$  de DNasa y se incubó durante 1 hora a TA. Para eliminar la DNasa a cada muestra de 100  $\mu\text{L}$  del ARN tratado, se le añadió 350  $\mu\text{L}$  de buffer RLT, se mezcló bien y posteriormente se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de etanol, mezclando con la pipeta. El total de 700  $\mu\text{L}$  se transfirió a una columna del *RNeasy kit* acoplada a un tubo de colección de 2 ml, se tapó cuidadosamente, se centrifugó 1 min a 8000 x g y se descartó el filtrado. La columna se lavó dos veces con 500  $\mu\text{L}$  de buffer RPE, la primera vez durante 30 seg a 8000 x g y la segunda durante 2 min a la misma velocidad. Se realizó una centrifugación adicional de 2 min para secar bien la membrana y eliminar los restos de etanol. A partir de aquí se procedió siguiendo los pasos de elución con agua libre de RNasa, centrifugación y medición de la concentración y la pureza del ARN en el espectrofotómetro, señalados en el párrafo anterior. El ARN purificado se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la retrotranscripción en ADNc o se procesó inmediatamente.

**Retrotranscripción del ARNm en ADNc:** Se procesó 1 $\mu\text{g}$  de ARN de cada muestra en ADNc, utilizando el *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (BioRad) para los ensayos de PCR y qPCR. En el caso del ensayo de PCR arrays se procesaron 820 ng de ARN mediante el *RT<sup>2</sup>First Strand Kit* (Qiagen). Debido a su similitud se describirá solo el procedimiento con el *RT<sup>2</sup>First Strand Kit*. Como primer paso se añadió 2 $\mu\text{L}$  de GE (DNasa) a 820 ng de ARN en un volumen final de 13  $\mu\text{L}$ , se incubó a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 5 min e inmediatamente los tubos se mantuvieron en hielo al menos durante 1 min. Seguidamente se siguió el

protocolo descrito, para ello a 13  $\mu\text{L}$  de la muestra de ARN tratado con GE se le añadió 7 $\mu\text{L}$  de la mezcla de retro-transcripción (master mix) previamente preparada con 4 $\mu\text{L}$  de buffer BC3, 2 $\mu\text{L}$  de transcriptasa reversa RE3 y 1 $\mu\text{L}$  de control P2. Todos los componentes se mezclaron suavemente con la pipeta, se incubaron a 42°C durante 15 minutos y se calentaron a 96°C durante 5 min. Una vez obtenido el ADNc, a cada tubo se le añadió 91 $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasa, se mezclaron suavemente con pipeta y se mantuvieron en hielo o se almacenaron a -20°C hasta su uso en las reacciones de amplificación:

**13.1 Técnica de PCR cualitativa:** Se basa en la actividad de una polimerasa termoresistente, capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente en presencia de nucleótidos, del tampón de reacción adecuado y de los cebadores, cuya secuencia corresponde a las regiones que flanquean el trozo de ADN que nos interesa (gen diana).

Para su realización en cada tubo se mezclaron los siguientes componentes de la reacción: 5  $\mu\text{L}$  de buffer 5x, 2.5 $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25mM, 2 $\mu\text{L}$  de los 4 desoxirribonucleósidos-trifosfato: dNTPs 2.5mM, 2 $\mu\text{L}$  de los cebadores (*primer: (Forward y Reverse) (F+R)*) y 0.5 $\mu\text{L}$  de la enzima Taq-polimerasa (*Thermus aquaticus: Promega, Madison, USA*) más 1 $\mu\text{L}$  de ADNc (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). La mezcla se completó con agua hasta un volumen total de 25 $\mu\text{L}$  y se colocó en un Termociclador (*SensoQuest de Labcycler*) programado a 94°C por 4 min para la separación del ADN en sus dos cadenas (Desnaturalización), seguido por 35 a 40 ciclos (dependiendo del cebador) de 94°C por 1 min, 57 a 62°C por 1 min para la unión específica de los cebadores al ADN (Hibridación), 72°C por 1 min para que la taq

polimerasa realice las copias de la secuencia elegida, más una extensión final a 72°C durante 10 min.

La secuencia de los cebadores utilizados para la investigación de los genes de pluripotencialidad y diferenciación, seleccionada de acuerdo a lo publicado por otros investigadores (67, 82, 83), el tamaño de los productos, las temperaturas de anillamiento y el número de ciclos utilizados en todas las investigaciones se detallan en la Tabla 11.

**Tabla 11. Características de los cebadores utilizados en PCR para evaluar genes de pluripotencialidad y específicos de línea celular.**

Genes	Línea celular	Cebadores	Características
Pluripotencialidad		Sox 2	264 bp temperatura de templado 57°C, 33 ciclos. F- GCCGAGTGGAACTTTTGTC - R -GTCATGTGCGCGTAACTGT -
		Oct-4	151 bp temperatura de templado 57 °C, 40 ciclos F- GAGGAGTCCCAGGACATGAA - R -GTGGTCTGGCTGAACACCTT-
		TERT	185 bp temperatura de templado 58°C, 40 ciclos. F- AGAGTGTCTGGAGCAAGTTGC- R- CGTAGTCCATGTTACAATCG-
Diferenciación	Neuro-ectodérmica	NF-M	430 bp, temperatura de templado 57°C, 40 ciclos F- GAGCGCAAAGACTACCTGAAG A- R- CAGCGATTTCTATATCCCAGAGCC -
		MBP	379 bp, temperatura de templado, 57 °C, 40 ciclos F- TTAGCTGAATTCGCGTGTGG - R- GAGGAAGTGAATGAGCCGGTTA-
	Hepatocítica	ALB	396 bp temperatura de templado 57°C, 35 ciclos F--CATCAACCTCTGGTCTGACC- R-CAGCAGTCAGCCATTTACC-
		HNF- 4	256 bp temperature de templado 59°C, 35ciclos. F-ACCTGATGCAGGAACATATGG- R-AACTTCCTGCTTGGTGATGG-
	Cardio-miocítica	MLC-2A	381 pb, temperatura de templado 57°C, 40 ciclos F- ACAGAGTTTATTGAGGTGCC- ' R- AAG GTGAAGTGTCCAGAGG- '
		MLC-2V	382 pb, temperatura de templado 56°C, 40 ciclos F- TATTGGAACATGGCCTCTGGAT - ' R- GGTGCTGAAGGCTGATTACGT T- '
Control interno		β Actina	252 pb, temperatura de templado: 58°C, 35 ciclos F- CGGGACCTGACTGACTAC - ' R- GAAGGAAGGCTGGAAGAG - '

Se incluyó la investigación del gen de la telomerasa (*hTERT*) dado el interés que representa para la posible aplicación de las hAEC en ensayos clínicos, el saber si expresan o no dicho gen y si tienen riesgo de ser tumorigénicas. Como control positivo se utilizaron células de la línea HeLa y K562, ambas líneas celulares inmortales que sobre-expresan telomerasa (la primera originada de carcinoma de cuello uterino y la segunda de células leucémicas). Como control interno se utilizó el gen de la  $\beta$  actina. Como control negativo de la PCR se utilizaron reacciones sin la enzima.

Para evidenciar el producto genético amplificado al final de la reacción se realizó electroforesis en gel de agarosa. Para la separación de los fragmentos amplificados se mezclaron 25  $\mu$ L de la reacción de PCR con 6 volúmenes de la solución de carga de ADN (*Loading Dye Solution*) (Fermentas GMBH, St.Leon-Rot) y se aplicaron en un gel de agarosa al 1,5% (Pronadisa Laboratorios Conda). La agarosa se disolvió en 1 volumen de TAE – Buffer y se le añadió *RedSafe* (Intron Biotechnology). Las bandas de los productos de la PCR se visualizaron, se fotografiaron y se evaluaron con el *Gen Snap Software* (G.BOX Syngene). El tamaño se determinó por un marcador con fragmentos de ADN de tamaño conocido que se separó en el gel junto con los productos de la PCR.

**13.2. Técnica de q-PCR:** Se utilizó para la evaluación cuantitativa de la expresión de los genes de pluripotencialidad en muestras de hAEC en P0, P3 y P4, y en muestras de hAMSC en P0. La RT-PCR permite realizar las fases de amplificación y análisis simultáneamente gracias a la incorporación de técnicas de fluorescencia, ya sea un reactivo que emite fluorescencia al intercalarse en la doble cadena de ADN (SybrGreen), u oligonucleótidos específicos (sondas complementarias) que llevan unidos los



fluorocromos; y un sistema informático. El termociclador, mediante un sistema óptico acoplado, realiza una lectura continua de la emisión de fluorescencia en cada uno de los ciclos de la reacción de PCR, lo que proporciona una información en tiempo real del proceso. La intensidad de la fluorescencia emitida depende de la cantidad de producto amplificado en la PCR. El punto final cuantitativo para la q-PCR es el ciclo *threshold* ( $C_T$ ) o ciclo umbral, el cual define el punto del ciclo de la PCR en que la señal de fluorescencia de una muestra sobrepasa el umbral basal previamente definido. El valor numérico del  $C_T$ , (inversamente relacionado a la cantidad de amplicón en la reacción), se utiliza para documentar la expresión cuantitativa del gen en estudio en relación a un gen de referencia según el método de  $C_T$  comparativo  $\Delta\Delta C_T$ . La ecuación utilizada para comparar la expresión de un gen en dos muestras es:  $\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ ,  $[(C_T \text{ del gen de interés} - C_T \text{ del gen de referencia}) \text{ muestra A}] - [(C_T \text{ del gen de interés} - C_T \text{ del gen de referencia}) \text{ muestra B}]$ .

Para la realización de la q-PCR se utilizó el “SYBR premix ex Taq kit” (Takara) y se siguieron las instrucciones de los fabricantes. Los genes fueron amplificados usando el QuantiTect Primer Assay ([www.qiagen.com/GeneGlobe](http://www.qiagen.com/GeneGlobe)). Las parejas de cebadores seleccionados para la amplificación de los genes fueron: **sox-2** *assay name* Hs\_SOX2\_1\_SG cat. No.: QT00237601; **Nanog** *assay name* Hs\_NANOG\_2\_SG cat. No.: QT01844808; **Oct-4** *assay name* Hs\_pou5f1\_1\_SG cat. No.: QT00210840. En todas las muestras estudiadas, la expresión del gen en evaluación se relacionó a la expresión del gen de la *Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa: GAPDH* (gen de referencia). Para la amplificación del *GAPDH* se utilizaron los cebadores: ACCACAGTCCATGCCATCAC **GAPDH-F**; TCCACCACCCTGTTGCTGTA **GAPDH-R**.

**13.3 Técnica RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Arrays:** Es una técnica que combina las ventajas de la q-PCR con la capacidad de los arrays para detectar la expresión de varios genes simultáneamente en una misma muestra. Se utilizó para investigar los genes de las hAEC antes y después del cultivo en medios de diferenciación y evaluar los posibles cambios inducidos en sus niveles de expresión por los medios inductores de diferenciación. Para ello se seleccionó el modelo de placa PAHS-508 (*Human Cell Lineage Identification PCR arrays*) de 96 pocillos, que contiene 84 cebadores para la amplificación de genes propios de células en diferentes estadios de diferenciación (células pluripotenciales, células de las tres capas germinales, células progenitoras y células diferenciadas), 5 genes de referencia que permiten normalizar los resultados, 1 control que detecta la posible contaminación de ADN genómico, 3 controles de la transcripción reversa que prueban la eficiencia de la reacción de retrotranscripción realizada con *el RT2 First Strand Kit* (requisito básico en la utilización de la placa), y 3 controles positivos de la PCR que consisten en una secuencia artificial de ADN. Figura 9

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	HK1	HK2	HK3	HK4	HK5	GDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Figura 9. Placas de RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Arrays. Pocillos A1 a G12 contienen cebadores para la investigación por RT-PCR de diferentes genes. Pocillos HK1 a HK5 contienen un panel de genes de referencia. Pocillo H6 (GDC) contiene un control para el ADN Genómico. Pocillos H7 a H9 (RTC) contienen controles de la retro-transcripción. Pocillos H10 a H12 (PPC) contienen controles positivos de la PCR.

La posición que ocupa cada gen, el símbolo que lo identifica y el tipo de células que caracterizan de acuerdo a su estado de diferenciación se presentan en la Tabla 12.

**Tabla 12. Identificación de los genes de la placa PAHS-508A (*Human Cell Lineage Identification PCR Array*)**

Posición	Símbolo	Descripción	Tipo de célula
A01	ALB	<i>Albumin</i>	Diferenciada endodermo hepatocito
A02	APOH	<i>Apolipoprotein H (Beta -2- glycoprotein 1)</i>	Progenitora endodermo hepática
A03	AQP1	<i>Aquaporin I</i>	Diferenciada endodermo túb. proximal
A04	BMP4	<i>Bone morphogenic protein 4</i>	Capa germinal mesodermo
A05	CCR5	<i>Chemokine C-C motif receptor 5</i>	Diferenciada mesodermo macrófago
A06	CD34	<i>CD34 molecule</i>	Capa Germinal y Progenitor mesodermo
A07	CD3E	<i>CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)</i>	Progenitor mesodermo cél T temprana
A08	CD79A	<i>CD79a molecule ig associate alpha</i>	Progenitor mesodermo cél B temprana
A09	CHAT	<i>Choline O-acetyltransferase</i>	Diferenciada ectodermo neu. colinérgica
A10	COL10A1	<i>Collagen Type X, alpha 1</i>	Diferenciada mesodermo condrocito
A11	COMP	<i>Catilage oligomeric matrix protein</i>	Diferenciada mesodermo condrocito
A12	CPA1	<i>Carboxypeptidase A1(pancreatic)</i>	Diferenciada endodermo cél exocrina
B01	CTSK	<i>Cathepsin K</i>	Diferenciada mesodermo osteoclastos
B02	DCN	<i>Decorin</i>	Capa germinal mesodermo
B03	DCX	<i>Doublecortin</i>	Progenitor ectodermo neur. inmaduras
B04	DNMT3B	<i>DNA (cytosine-5) methyltransferase 3 beta</i>	Pluripotencial
B05	DPP4	<i>Dipeptidyl peptidase 4</i>	Progenitor endodermo hepático
B06	ENO1	<i>Enolase 1 (alpha)</i>	Progenitor ectodermo limbal
B07	FABP7	<i>Fatty acid protein 7 brain</i>	Progenitor ectodermo neuronal
B08	FGF5	<i>Fibroblastic growth factor 5</i>	Capa germinal ectodermo
B09	FOXA1	<i>Forkhead box A1</i>	Capa germinal endodermo
B10	FOXD3	<i>Forkhead box D3</i>	Capa germinal ectodermo
B11	FOXP1	<i>Forkhead box G1</i>	Progenitor ectodermo neurona motora
B12	G6PC	<i>Glucose- 6- phosphatase catalitic subunit</i>	Diferenciada endodermo hepatocito
C01	GAD1	<i>Glutamate decarboxylase 1, (brain kDa)</i>	Diferenciada ectodermo neuronas GABA
C02	GAD2	<i>Glutamate decarboxylase 2, (pancreatic islets and brain 65kDa)</i>	Progenitor ect. neurona GABA inmadura
C03	GALC	<i>Galactosylceramidase</i>	Diferenciada ectodermo astrocito
C04	GATA1	<i>GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)</i>	Capa germinal endodermo
C05	GATA2	<i>GATA binding protein 2</i>	Capa germinal mesodermo
C06	GATA6	<i>GATA binding protein 6</i>	Capa germinal endodermo
C07	GBX2	<i>Gastrulation brain homebox 2</i>	Capa germinal neuroectodermo
C08	GDF3	<i>Growth differentiation factor 3</i>	Pluripotencial
C09	GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>	Diferenciada ectodermo astrocito
C10	HAND1	<i>Heart and neural crest derivatives expressed 1</i>	Capa germinal mesodermo
C11	HAND2	<i>Heart and neural crest derivatives expressed 2</i>	Progenitor mesodermo cardiomiocitos
C12	HES5	<i>Hairy and enhancer of split 5 (Drosophila)</i>	Progenitor ectodermo neuronal
D01	HNF4A	<i>Hepatocyte Nuclear factor 4, alpha</i>	Capa germinal endodermo
D02	IBSP	<i>Integrin-binding sialoprotein</i>	Diferenciada mesodermo osteoblasto

D03	IGF2	<i>Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)</i>	Capa germinal mesodermo
D04	INS	<i>Insulin</i>	Diferenciada endodermo células beta
D05	ITGB4	<i>Integrin beta 4</i>	Diferenciada endodermo colangiocito
D06	KRT10	<i>Keratin 10</i>	Diferenciada ectodermo keratinocito
D07	KRT14	<i>Keratin 14</i>	Diferenciada ectodermo keratinocito
D08	KRT19	<i>Keratin 19</i>	Progenitor endodermo islote pancreático
D09	LEFTY1	<i>Left-right determination factor 1</i>	Pluripotencial
D10	MAP3K12	<i>Mitogen-activated protein kinase 12</i>	Progenitor endodermo hepático
D11	MIOX	<i>Myo-inositol oxygenase</i>	Diferenciada endodermo túb. Proximal
D12	MIXL1	<i>Mix paired-like homeobox</i>	Capa germinal mesodermo
E01	MSLN	<i>Mesothelin</i>	Progenitor ectodermo limbal
E02	MYH1	<i>Myosin heavy chain 1, skeletal muscle adult</i>	Diferenciada mesodermo mús. Esquelético
E03	MYH11	<i>Myosin heavy chain 11, smooth muscle</i>	Diferenciada mesodermo músculo liso
E04	MYH7	<i>Myosin heavy chain 7, cardiac muscle, beta</i>	Diferenciada mesodermo cardiomiocito
E05	MYL3	<i>Myosin light chain 3 alkali, ventricular, skeletal, slow</i>	Diferenciada mesodermo cardiomiocito
E06	NANOG	<i>Nanog homeobox</i>	Pluripotencial
E07	NEUROD1	<i>Neurogenic differentiation 1</i>	Diferenciada ectodermo neur. madura
E08	NEUROG2	<i>Neurogenina 2</i>	Capa germinal neuroectodermo
E09	NKX2-2	<i>NK2 homeobox 2</i>	Progenitor ectodermo oligodendrocito
E10	NPPA	<i>Natriuretic peptide A</i>	Diferenciada mesodermo cardiomiocito
E11	OLIG2	<i>Natruetic peptide A</i>	Progenitor ectodermo neurona motora
E12	OTX2	<i>Oligodendrocyte lineage transcription factor2 Orthodenticle homeobox2</i>	Capa germinal ectodermo
F01	PDGFRA	<i>Platele derived growth factor receptor, alpha polypeptide</i>	Capa germinal mesodermo
F02	PODXL	<i>Podocalyxin-like</i>	Pluripotencial
F03	POU4F2	<i>POU class homeobox 2</i>	Diferenciada ectodermo gangliones
F04	POU5F1	<i>POU class homeobox 1</i>	Pluripotencial
F05	PROM1	<i>Prominina</i>	Progenitor ectodermo neuronal
F06	PTCRA	<i>Pre T cell antigen receptor alpha</i>	Progenitor mesodermo cél T tempranas
F07	RCVRN	<i>Recoverin</i>	Diferenciada ectodermo cél fotoreceptor
F08	RUNX1	<i>Runt related transcription factor 1</i>	Capa germinal mesodermo
F09	RYR2	<i>Ryanodine receptor 2 (cardiac)</i>	Diferenciada mesodermo cardiomiocito
F10	SFTPB	<i>Surfactant protein B</i>	Diferenciada endodermo cél pulmonar
F11	SFTPD	<i>Surfactant protein D</i>	Diferenciada endodermo cél pulmonar
F12	SLC17A6	<i>Solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter) member 6</i>	Diferenciada ect. Neur. glutamatérgica
G01	SLC17A7	<i>Solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter) member 7</i>	Diferenciada ect. Neur. Glutamatérgica
G02	SLC2A2	<i>Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) member 2</i>	Diferenciada endodermo células beta
G03	SLC32A1	<i>Solute carrier family 32 (GABA vesicular transporter) member 1</i>	Progenitor ect. Neur. GABA inmaduras
G04	SMTN	<i>Smoothelin</i>	Diferenciado mesodermo músculo liso
G05	SOX17	<i>SRY (sex determining region Y) box 17</i>	Capa germinal endodermo
G06	SOX2	<i>SRY (sex determining region Y) box 2</i>	Progenitor ectodermo neuronal
G07	SOX7	<i>SRY (sex determining region Y) box 7</i>	Capa germinal endodermo
G08	T	<i>T, brachyury homolog (mouse)</i>	Capa germinal mesodermo
G09	TAT	<i>Tyrosine aminotransferase</i>	Diferenciada endodermo hepatocito
G10	TYR	<i>Tyrosinase</i>	Diferenciada ectodermo melanocito
G11	ZFP42	<i>Zinc finger protein 42 homolog (mouse)</i>	Pluripotencial

G12	ZIC1	<i>Zic family member 1</i>	Capa germinal ectodermo
H01	B2M	<i>B2 microglobulin</i>	Gen de referencia
H02	HPRT1	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>	Gen de referencia
H03	RPL13A	<i>Ribosomal Protein L1 3a</i>	Gen de referencia
H04	GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Gen de referencia
H05	ACTB	<i>Actin beta</i>	Gen de referencia
H06	HGDC	<i>Human Genomic DNA Contamination</i>	Control para detección ADN genómico
H07	RTC	<i>Reverse Transcription Control</i>	Cotrol de la retrotranscripción
H08	RTC	<i>Reverse Transcription Control</i>	Control de la retrotranscripción
H09	RTC	<i>Reverse Transcription Control</i>	Control de la retrotranscripción
H10	PPC	<i>Positive PCR Control</i>	Control de PCR
H11	PPC	<i>Positive PCR Control</i>	Control de PCR
H12	PPC	<i>Positive PCR Control</i>	Control de PCR

En primer lugar se analizó la expresión de los citados genes en hAEC cultivadas en medio estándar. Posteriormente se evaluaron evaluamos los cambios en el nivel de expresión en estas células como consecuencia del cultivo en medios inductores de diferenciación. Para ello se mezclaron los componentes de la PCR en un tubo de 15 ml, en total 2700 $\mu$ L (1350 $\mu$ L RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix, 102  $\mu$ L de cada muestra de ADNc en estudio, 1248  $\mu$ L de agua libre de RNasa). La RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix contiene la polimerasa, buffer, la mezcla dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y el fluorocromo SYBR Green. Utilizando una pipeta automática se dispensó en cada pocillo de la placa de RT-PCR Array 25  $\mu$ L de la mezcla y cuidadosamente se taparon todos los pocillos con las tapas específicas para ese fin. Cada placa se centrifugó a 1000 g durante 1 min a TA para eliminar posibles burbujas. El programa utilizado en el termociclador (MyiQ™) fue el siguiente: 1 ciclo durante 10 min a 95°C para la activación de la polimerasa y 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C. Para determinar el *threshold cycle* ( $C_T$ ) para cada pocillo se estableció la misma línea basal (*threshold value*) para toda la placa y experimentos realizados. Este valor se define manualmente por encima de la señal de ruido de la fluorescencia en el ciclo en que es visible la primera amplificación (entre los ciclos 10 y 15). Los valores  $C_T$  de todos los

pocillos se visualizaron en el *Bio-Rad IQ5 Optical system software* y se exportaron a un fichero *Excel*<sup>®</sup> para introducir los datos en la aplicación de la web: *SABiosciences PCR Array Data Analysis*. La expresión relativa de los genes se determinó a través del método de comparativo de  $C_T$  (Fold change =  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ). Antes de establecer la comparación de la expresión de los genes entre los diferentes tipos de células se evaluó la reproducibilidad de las PCR utilizando los  $C_T$  de los controles positivos, e igualmente se evaluó la estabilidad de los genes de referencia durante la diferenciación utilizando el programa *geNorm VBA applet for Microsoft Excel (Visual Basic Application)*. Este programa informático determina los genes de referencia más estables de un conjunto dado. *geNorm* automáticamente calcula la medida de estabilidad de un gen (M) para todos los genes de referencia en un conjunto de muestras. M se define como la variación promedio por pareja entre un gen de referencia particular y los otros genes de referencia evaluados. Los genes con el valor más bajo de M tienen la expresión más estable. El programa permite la eliminación de los genes de referencia con la peor calificación y recalcular los nuevos valores de M para los genes restantes. La normalización de los genes de control minimiza el riesgo de que las variaciones en los niveles de expresión de los genes estudiados dependan de cambios en la expresión de dichos genes. En cada estudio de expresión diferencial se emplearon aquellos genes de referencia que resultaron más estables tras el análisis mediante *geNorm*.

#### **14. INMUNOCITOQUÍMICA:**

Se utilizó para la investigación de citokeratina y vimentina en las hAEC en P0. La fijación de las células y la preparación de los extendidos se realizaron de forma

automatizada utilizando un BD PreStain™ Slide Processor de la compañía Tripath Imaging Inc. en la Sección de Citopatología del Departamento de Anatomía Patológica. Las tinciones inmunocitoquímicas igualmente se realizaron por métodos automatizados en el Laboratorio de Inmunocitoquímica del mencionado Departamento, utilizando *los FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin Clone AE1/AE3* y *FLEX Monoclonal Mouse Antii- Vimentin, clore V-9, (Dako)*, ambos destinados para su utilización con *Dako Autostainer Link instruments* de EnVision™ Flex. La utilidad de estos anticuerpos ya ha sido descrita al tratar sobre la inmunohistoquímica de los fragmentos de MA en bloques de parafina (pag. 104).

#### **15. INMUNOFLUORESCENCIA:**

Se utilizó como complemento de la inmunocitoquímica para la investigación de citokeratina y Vimentina en las hAEC en P0, y para la investigación a nivel protéico de los marcadores celulares definidos como específicos de línea en los ensayos de diferenciación.

Para la determinación de la citokeratina y vimentina las hAEC en P0 se cultivaron en DMEM con EGF 10ng/ml, y para los ensayos de diferenciación celular *in vitro* se cultivaron en los diferentes medios inductores de diferenciación. Para ambos ensayos las células se sembraron a una densidad  $1.0 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, por cuadruplicado sobre cristales de 12mm de diámetro y 0 mm de espesor (Thermo Scientific) colocadas en placas de cultivo de 5cm de diámetro. Cada tres días se renovó el medio de cultivo hasta observarse una confluencia de 60 a 70% aproximadamente, momento en el cual se

procedió a investigar los marcadores celulares deseados. Las células se lavaron dos veces con DPBS, se fijaron con para-formaldehído al 4% en DPBS durante 10 min a TA, se lavaron nuevamente con DPBS, se permeabilizaron con Tritón 0,3% X-100 en DPBS durante 30 min y se bloquearon durante 45 minutos a TA con solución de bloqueo preparada con 0.3% de albúmina bovina sérica, 10% de suero bovino fetal, 5% de leche en DPBS y 0.1% Triton X-100 en DPBS, para evitar la unión no específica de los anticuerpos. Seguidamente se aplicaron sobre las células los anticuerpos primarios diluídos en la solución de bloqueo sin leche, a las diluciones señaladas en la Tabla 13.

**Tabla 13. Anticuerpos utilizados para los ensayos de inmuno-fluorescencia.**

Diferenciación	Anticuerpos primarios	Dilución	Ac. Sec /Conjugados	Suplidor
	Human anti CTK AE1/AE3, Mouse	No	Cobayo anti mouse IgG-FITC	Dako
	Human anti Vimentina Clone V9 Mouse	No	Cobayo anti mouse IgG- PE	Dako
Neuro-Ectoder.	Human Monoclonal anti NES, Mouse IgG <sub>1</sub>	1/200	Cobayo anti mouse IgG-FITC	Milipore
	Human Mon. Anti B-tubulina III, Mouse IgG	1/100	Goat anti mouse IgG-FITC	Sigma
	Human Monocl anti- GFAP, Rat IgG <sub>1</sub>	1/400	Goat anti rat IgG- FITC	Milipore
Hepatocítica	Human Monocl. anti ALB, (Clone 188835) Mouse IgG 2a	1/100	Goat anti mouse IgG-FITC	R&D Systems
	Human alpha-Fetoprotein MAb (Clone 189506), Mouse IgG1	No	Goat anti mouse IgG-FITC	R&D Systems
	Human Monocl anti Cytokeratin 8/18 Mouse Clon PAD: Zym5.2 (UCD/PR.10-11)	1/200	Goat anti mouse IgG-FITC	Invitrogen
Cardiomiiocítica	Human Monocl. Anti $\alpha$ actinina (Clone A7811) Mouse IgG <sub>1</sub>	1/100	Goat anti mouse IgG-FITC	Sigma-Aldrich
Condrocítica	Human Monocl. anti Colágeno, Clone 6B3 Mouse II IgG <sub>1</sub>	1/200	Goat anti mouse IgG-FITC	Milipore

Como controles se utilizaron los isotipos de las IgG correspondientes a las mismas diluciones de los anticuerpos primarios. Las células se incubaron en cámara



húmeda durante toda la noche a TA. Tras 3 a 4 lavados sucesivos con 0.1% de Tritón X-100 en DPBS durante 10 minutos, se aplicó el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo deseado, a una dilución de 1:400 en la solución de bloqueo sin leche (Tabla 13). Al anticuerpo secundario se le añadió 5µl de Hoechst (Bisbenzimidide H33258 (Hoechst 33258) (Fluka, Biochemika) diluido 1/1000 en DPBS para la coloración del núcleo. Las células se incubaron durante 1 hora a TA en oscuridad, se lavaron nuevamente 3 a 4 veces en 0.1% de Tritón X-100 en DPBS y finalmente en agua destilada. Los cristales se escurrieron en una servilleta y se montaron en mowiol sobre porta-objetos para su evaluación al Microscopio de Fluorescencia (Nikon Eclipse 90 i), equipado con Cámara digital (ProgRes® MF Jenoptik). Durante la observación al microscopio se estimó el porcentaje de células fluorescentes en varios campos visuales elegidos al azar (más o menos 6 por cristal). Se tomaron fotos representativas de varios experimentos independientes.

La técnica de inmunofluorescencia también se realizó sobre cortes de bloques de parafina que contenían los cultivos en micro-masa realizados para la diferenciación condrogénica de las hAEC y de las HAMSC. Debido a que la técnica fue discretamente diferente a la que se acaba de exponer, se hará una descripción detallada de ella al plantear la diferenciación condrogénica de ambas células.

## 16. ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN *IN VITRO*:

**16.1 hAEC:** Se investigó la capacidad de diferenciación *in vitro* de las hAEC hacia células de las tres capas germinales: ectodermo (células neurales), endodermo (células hepáticas) y mesodermo (células cardíacas, adipocíticas, osteocíticas y condrocíticas)

Para los ensayos de diferenciación neuro-ectodérmica, hepatocítica y cardiomiocítica se utilizaron células en P0 sembradas por duplicado a una densidad de  $1.0 \times 10^4/\text{cm}^2$  en placas de 5 cm, y por cuadruplicado sobre cristales de 12 mm cubiertos con Poly-D lisina colocados en placas de 5cm de diámetro, en medios de cultivos suplementados de forma diferente de acuerdo a la diferenciación investigada. El cultivo se mantuvo 3 a 4 semanas, con cambios cada tres días. Como controles negativos se utilizaron células cultivadas en medio de cultivo estándar. La investigación se realizó por métodos moleculares y por inmunofluorescencia. Debido a lo costoso del procedimiento, la investigación por qPCR array utilizando la placa PAHS-508A de Qiagen se realizó solo en tres muestras para cada tipo de diferenciación.

**16.1.1 Diferenciación neuro-ectodérmica:** Se usó como medio de diferenciación el utilizado por Ilancheran y col. (68) compuesto de DMEM/Ham's F-12, 10% SBF,  $5 \times 10^{-5}$  M ácido all-trans retinoico, 10 ng/ml FGF-4, N-2 y B-27.

Para la investigación de genes relacionados con linaje neural a las 2 a 3 semanas de cultivo se extrajo el ARN total, se retrotranscribió en ADNc y se realizó la PCR según la técnica descrita (pag. 124). Se investigó la expresión NFM (*Neurofilament medium polypeptide*) y MBP (*Myelin basic protein*), utilizando los cebadores señalados en la Tabla 11. Además en tres muestras se investigó por qPCR array los posibles cambios

inducidos en el nivel de expresión de genes de las células por el cultivo en medio de diferenciación neural, utilizando la placa PAHS-508A de Qiagen (Figura 9) y la técnica ya descrita (Pag. 128).

Para la inmunofluorescencia se utilizaron anticuerpos IgG anti NES que reconocen un filamento protéico intermedio expresado en los progenitores neurales, IgG anti Beta Tubulina III que reconocen elementos de microtúbulos expresados en neuronas, e IgG anti GFAP que reconocen la proteína ácida fibrilar glial, marcador de células gliales (astroglial). Se siguieron todos los pasos descritos para la realización de la técnica (pag. 133).

**16.1.2 Diferenciación hepatocítica:** Se utilizó como inductor el medio utilizado por Takashima y col (83) compuesto por DMEM, 10% SBF, 20 ng/ml HGF, 10 ng/ml FGF-2, 10 ng/ml de oncostastina M, 100 nM dexametasona, 10 U/ml de heparina sódica.

El analisis molecular se realizó por PCR investigando la expresión de RNAm para ALB y el HNF-4 $\alpha$  utilizando los cebadores señalados en la Tabla 11. El HNF-4 $\alpha$  codifica la expresión de un factor de transcripción que controla la expresión de varios genes endodérmicos/hepáticos, además participa en el desarrollo del hígado, riñones e intestino. Igualmente en tres muestras se investigaron por qPCR array los posibles cambios inducidos en el nivel de expresión de los genes por el cultivo en medio de diferenciación hepática en relación a las células cultivadas en medio estándar. Se utilizó la placa PAHS-508A de Qiagen (Figura 9) y la técnica ya descrita (pag. 128)

Para el análisis por inmunofluorescencia se investigó la presencia de ALB, alfa-fetoproteína y CK 8/18, los dos primeros considerados marcadores clásicos de

diferenciación hepática y el tercero considerado de valor en dicha diferenciación debido a que se expresa fundamentalmente en colon, placenta, hígado y muy poco en exocervix. Se utilizó la técnica previamente descrita y se utilizaron los anticuerpos primarios y secundarios conjugados con fluorocromos señalados en la Tabla 13.

**16.1.3 Diferenciación cardiomiocítica:** Se utilizó como medio de diferenciación el utilizado por Miki y col. (67), el cual consiste en DMEM suplementado con 10% de SBF, 55  $\mu$  M 2-mercaptoetanol, 1 mM piruvato de sodio y 1 mM ácido ascórbico 2-fosfato.

El análisis molecular se realizó por PCR investigando la expresión de RNAm para las cadenas ligeras de miosina atriales y ventriculares (MLC-2A y de MLC-2V), ambos marcadores de cardiomiocitos tempranos, utilizando los cebadores señalados en la Tabla 11. En tres muestras se investigó además los posibles cambios inducidos en el nivel de expresión de los genes por el cultivo en medio de diferenciación cardiaca, para ello se utilizó la técnica de qPCR array descrita en la pag 128 y se utilizó la placa PAHS-508A de Qiagen (Figura 9).

El análisis por inmunofluorescencia se realizó a través de la investigación de antígenos asociados a la  $\alpha$  actinina. La  $\alpha$ -actinina es una proteína del aparato contráctil del músculo que en las células cardiacas está localizada en el disco Z y en los cuerpos densos, donde ayuda a anclar los filamentos de actina miofibrilar. Los anticuerpos primarios utilizados y sus diluciones se presentan en la Tabla 13.

**16.1.4 Diferenciación adipogénica:** se investigó utilizando el medio de cultivo NH AdipoDiff de Miltenyi Biotec MACS® Media (Bergisch Gladbach, Germany), estandarizado para la diferenciación adipogénica *in vitro* de las MSC de la MO. Siguiendo

las instrucciones (con algunas modificaciones), las hAEC se sembraron por duplicado en DMEM estándar en placas de 35 mm y se incubaron en estufa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Cada 3 días se realizó el cambio de medio utilizando DMEM estándar hasta que las células alcanzaron 70 a 80% de confluencia. A partir de aquí el cultivo se continuó con NH AdipoDiff pre-calentado a 37°C con cambio cada tercer día durante 4 semanas. Como control las células se cultivaron en DMEM estándar con 10% de SBF. A las 4 semanas se realizó la investigación de los adipocitos por la técnica de coloración con el Oil Red O. Se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron dos veces con DPBS y se fijaron con metanol durante 5 min a TA. Se retiró el metanol, las células se lavaron dos veces con agua des-ionizada, se añadió 2 ml del colorante Oil Red O (Sigma Aldrich) a cada placa y se colocaron en agitación suave a TA durante 20 minutos. Seguidamente se aspiró el colorante, las placas se lavaron 2 veces con agua des-ionizada, y se procedió a la evaluación en microscopio de contraste de fase, manteniendo en la placa un poco de agua para evitar la deshidratación. De existir diferenciación adipogénica se observaron vacuolas citoplasmáticas cargadas de grasas neutras coloreadas de rojo-naranja con el Oil Red O.

**16.1.5 Diferenciación osteogénica** se investigó utilizando el medio de cultivo NH OsteoDiff de Miltenyi Biotec MACS® Media (Bergisch Gladbach, Germany) estandarizado para la diferenciación osteogénica *in vitro* de las MSC de la MO. Siguiendo las instrucciones, las hAEC se sembraron por cuadruplicado en DMEM estándar en placas de cultivo de 35 mm y se incubaron en estufa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. A los 3 días se realizó el cambio de medio por el NH OsteoDiff pre-calentado a 37°C y se

continuó cada tres días durante 4 semanas. Como control se cultivaron las células en DMEM estándar con 10% de SBF. A las 4 semanas se seleccionaron dos placas para la evaluación de la diferenciación osteogénica a través de la investigación de la actividad de fosfatasa alcalina mediante el sustrato FAST BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/ nitro blue tetrazolium (Sigma Aldrich), y dos placas para la investigación de los depósitos de calcio utilizando el colorante Alizarin Red (Sigma Aldrich).

Para la detección colorimétrica de la actividad de fosfatasa alcalina, se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron dos veces con DPBS, se fijaron con metanol a -20°C y se incubaron a dicha temperatura durante 5 minutos. Se retiró el metanol, se lavaron las células dos veces con agua des-ionizada, se añadieron 2 ml del sustrato FAST BCIP/NBT a cada placa y se colocaron en agitación lenta durante 10 min a TA. Se retiró el sustrato, se lavaron con agua des-ionizada, e inmediatamente se observaron al microscopio, manteniendo un poco de agua para evitar la desecación. De existir fosfatasa alcalina, ésta procesa el sustrato y las células se tiñen de color púrpura oscuro.

Para la coloración con el Alizarin Red se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron dos veces con DPBS, se fijaron con metanol a -20°C y se incubaron a dicha temperatura durante 5 minutos. Se retiró el metanol, las células se lavaron dos veces con agua des-ionizada y se les añadió 1 ml de solución de Alizarin Red. Se incubaron durante 30 min a TA, se lavaron dos veces con agua des-ionizada y se visualizaron al microscopio de contraste de fase, conservando una pequeña cantidad de agua para evitar la deshidratación de la preparación. De existir diferenciación osteoblástica, los depósitos de calcio se colorean de rojo naranja con el Alizarin Red.

**16.1.6 Diferenciación condrogénica** La diferenciación se investigó en cultivos de micro-masa utilizando el medio de inducción NH ChondroDiff de Miltenyi Biotec MACS® Media (Bergisch Gladbach, Germany), estandarizado para la diferenciación condrogénica *in vitro* de las MSC de la MO. Para el cultivo de micro-masa, siguiendo las instrucciones, las hAEC se prepararon a una concentración final de  $2.5 \times 10^5$  células/mL de medio estándar, se re-suspendieron y se colocaron en tubos cónicos de polipropileno de 15 ml. Los tubos se centrifugaron a  $150 \times g$  durante 5 min a TA, se les retiró el DMEM y las células se re-suspendieron en 1 ml del medio NH ChondroDiff pre-calentado a  $37^\circ\text{C}$ , de nuevo se centrifugaron a la misma velocidad, tiempo y temperatura, tras lo cual se incubaron en posición vertical con las tapas sin ajustar (para permitir la circulación del aire) en estufa a  $37^\circ\text{C}$ , en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% y humedad de 95%. El medio se renovó cada tercer día, teniendo cuidado de no aspirar el pellet celular y manteniendo siempre las tapas flojas. Como control se cultivaron las células en DMEM estándar con 10% de SBF. A los 24 días se procedió a la preparación de la muestra para la investigación de la diferenciación condrogénica a través de la detección de colágeno II por inmunofluorescencia y la coloración de los proteoglicanos por citoquímica. Se eliminó completamente el NH ChondroDiff, se lavó el pellet celular con DPBS y se fijó en formalina al 4% en DPBS durante toda la noche. Al día siguiente los pequeños nódulos se colocaron en un cassette sobre una almohadilla y se incluyeron en parafina. Se cortaron con micrótomo a 5 micras, se colocaron sobre porta-objetos y se secaron en estufa a  $37^\circ\text{C}$ . Para desparafinar se colocaron en estufa a  $62^\circ\text{C}$  durante 1 hora, seguidos por 3 pases sucesivos en xilol (QP) (de 10 min cada uno), en concentraciones

decrecientes de etanol 100% (dos veces por 5 min) y 70% (dos veces 5 min), y finalmente en agua destilada (1 vez por 5 min). El proceso concluyó con el secado de los portas en estufa a 37°C.

Para la investigación de colágeno II por inmunofluorescencia, se realizó previamente la recuperación antigénica. Los porta-objetos se colocaron en una cubeta de tinción con 200 ml de SSC 1x y ésta a su vez en baño de maría en una olla de presión con el agua en ebullición y la tapa cerrada durante 5 minutos. Seguidamente la muestra se lavó durante 5 min en agua destilada. Para el marcaje del colágeno se delimitó la zona de la muestra con el lápiz de marcaje en vidrio (“dakopen”), se permeabilizó con triton X 100 al 0.3% en PBS (PBST) 400 µL/ porta durante 15 min en oscuridad en cámara húmeda a TA. Se eliminó el exceso y se aplicó solución de bloqueo (sol Triton al 0.3% mas suero ternera fetal al 5%) por 60 min a TA en cámara húmeda. Se lavó con DPBS durante 5 min en oscuridad a TA en cámara húmeda. Se dejó secar y sobre la muestra se colocaron 200µL de una dilución 1/50 del anticuerpo primario (anti-colágeno II) preparada con solución de bloqueo sin suero de ternera. Se cubrió con cubre objeto y se incubó en cámara húmeda a TA durante toda la noche. Al día siguiente se retiraron los cubres y se lavó la preparación con DPBS durante 3 a 5 min. Sobre cada muestra se colocaron 200µL de una dilución 1/50 del anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo FITC, y se incubó a TA en cámara húmeda, en oscuridad durante 90 min. Se preparó un blanco con PBST 0.3% más el anticuerpo secundario. Se lavó 2 veces con DPBS durante 5 min. Se dejó secar en oscuridad y se añadió a cada porta 200µL de Hoechst, se incubó en cámara húmeda a TA, en oscuridad durante 30 min, se lavaron los portas con PBS durante 5 min,



se dejaron secar en oscuridad y se montaron en mowiol para su visualización al microscopio de fluorescencia.

Para la investigación de los proteoglicanos por citoquímica con la tinción del azul de alciano, los porta-objetos se fijaron con etanol al 95% y se colorearon con una solución de azul alciano al 1% en ácido acético glacial al 3 %.

### **16.2 hAMSC:**

La inducción de la diferenciación *in vitro* de las de las hAMSC se realizó hacia las tres líneas mesodérmicas clásicas (osteogénicas, adipogénicas y condrogénicas), utilizando células en P0 y los medios de cultivo estandarizados para el uso de MSC de la MO de Miltenyi Biotec MMACS® Media, que igualmente utilizamos para la diferenciación *in vitro* de las células epiteliales.

**16.2.1 Diferenciación osteogénica:** Las células en P0 se sembraron por duplicado a una densidad de  $1.0 \times 10^3/\text{cm}^2$  en DMEM estándar en placas de cultivo de 35 mm y se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Al tercer día el medio se cambió por NH OsteoDiff pre-calentado a 37°C y así cada tercer día durante 3 semanas. Como control se cultivaron las células en DMEM estándar con 10% de SBF. Tras 3 semanas de cultivo se realizó la evaluación de la diferenciación osteogénica a través de la investigación de los depósitos de calcio utilizando la coloración de Alizarin red, siguiendo la técnica ya descrita.

**16.2.2 Diferenciación adipogénica:** las hAMSC en P0 se sembraron por cuadruplicado a una densidad de  $1.0 \times 10^3/\text{cm}^2$  en DMEM estándar en placas de cultivo de

35 mm y se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. El DMEM estándar se cambió cada 3 días hasta que las células alcanzaron 70-80% de confluencia, momento en el cual se continuó el cultivo con NH AdipoDiff pre-calentado a 37°C cada 3 días durante 3 semanas. Como control se cultivaron las células solo en DMEM estándar. Al cabo de 3 semanas se realizó la evaluación de la diferenciación adipogénica a través de la coloración con Oil Red O, siguiendo la técnica ya descrita.

**16.2.3 Diferenciación condrogénica:** Se utilizaron hAMSC en P0 y se procedió exactamente igual que para la diferenciación condrogénica de las hAEC realizando cultivos de micro-masa en el medio Chondrodiff durante 4 semanas con cambios cada 3 días, e investigando la presencia de proteoglicanos y de colágeno II por la coloración de Azul de alciano y por inmunofluorescencia respectivamente.

## **17. CRIOPRESERVACIÓN CELULAR:**

De existir una excedencia de hAEC o hAMSC en cualquiera de las fases del estudio, las células se criopreservaron en una solución de medio de cultivo estándar con DMSO al 10%. La concentración de la suspensión celular fue de  $1.0 \times 10^6$  células/ml y la proporción de suspensión celular/medio de criopreservación fue de 1:1. En cada vial, ubicado en un baño con hielo picado, se colocó 1ml de la suspensión celular y se añadió 1ml de la solución criopreservadora gota a gota, mezclándola continuamente. Los viales se colocaron en un recipiente que contenía isopropanol y rápidamente se trasladaron a un congelador de -80°C. Al lograrse el congelamiento se almacenaron en cajas de depósito y debido a la imposibilidad de ubicarlos en N<sub>2</sub> líquido, se mantuvieron a -80°C.

### **18. DESCONGELAMIENTO CELULAR:**

En nuestro protocolo no se utilizaron células criopreservadas - descongeladas. No obstante consideramos oportuno describir la técnica de descongelamiento celular utilizada en el laboratorio.

Para el descongelamiento las alícuotas celulares se retiran del congelador mecánico, se sumergen en un baño a 37°C y una vez descongeladas se colocan sobre hielo picado y se trasladan rápidamente a la cabina de flujo laminar donde se resuspenden en medio de cultivo estándar. Se centrifugan a 500 x g durante 5 min y el pellet se resuspende en 2 ml de medio de cultivo estándar. Se realiza recuento celular y evaluación de la viabilidad por el método de exclusión de azul de tripán.

### **19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los resultados se expresaron como la Media  $\pm$  el Error Standard de la media (SEM) y a través de la descripción y análisis de las variables cualitativas.

Para el análisis estadístico se utilizó el SPSS versión 15.0 soft ware (SPSS predictive Analytics, Chicago, Il, USA). Se consideró como valor de corte para la significancia estadística una  $p < 0.05$ .

## ***RESULTADOS***

## 1. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LA MA:

**1.1 En Fresco:** La evaluación al microscopio de luz de los fragmentos de MA teñidos en fresco con May-Grunwald Giemsa vistos *en face* evidenció en todas las preparaciones a las células epiteliales de la MA de forma poligonal, adheridas unas a otras, constituyendo una especie de mosaico o *puzzle* ordenado de manera irregular (Figura 10).

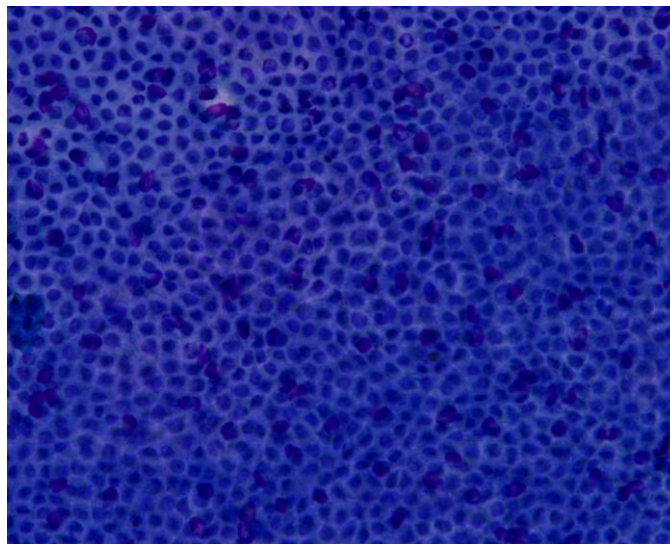


Figura 10. Aspecto al microscopio de luz de un fragmento de MA fresco teñido con May-Grünwald-Giemsa (10X).

**1.2 En cortes de parafina teñidos con Hematoxilina-Eosina:** se observó la estructura bien conocida del amnios: un epitelio formado por células cuboides, con estrechos contactos laterales, cuyos ápices, polos o superficie internas presentan una forma ligeramente convexa y algunas microvellosidades a manera de borde en cepillo en contacto con el líquido amniótico, y cuyas bases o superficies externas están en íntimo contacto con la membrana basal. Los núcleos son únicos, grandes e irregulares, y

están localizados en la parte central de la célula o ligeramente excéntricos. El citoplasma es abundante, con algunas vacuolas perinucleares de diferentes tamaños. Por fuera de la membrana basal, la cual se ve muy bien demarcada, se observa el mesodermo amniótico donde se encuentra una escasa cantidad de células estromales, redondeadas o alargadas, más pequeñas que las células epiteliales, pero igualmente con un núcleo prominente y algunas vacuolas perinucleares. Por fuera del mesodermo amniótico se encuentra la capa intermedia o esponjosa, de apariencia laxa, que es la que permite separar con facilidad la MA del corion subyacente (Figura 11).

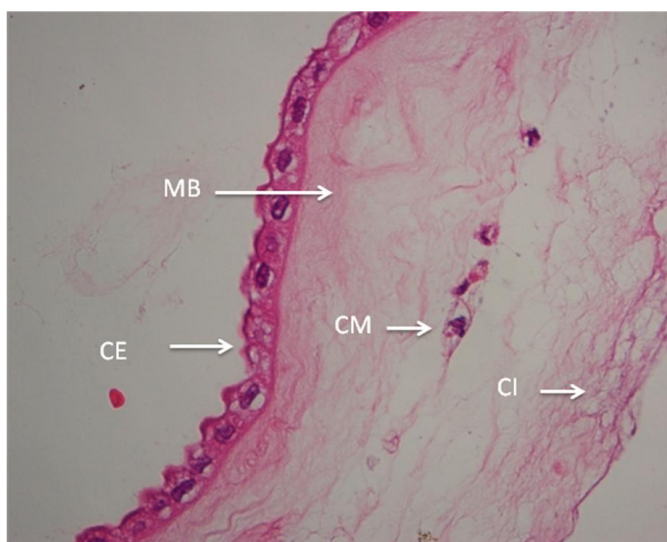
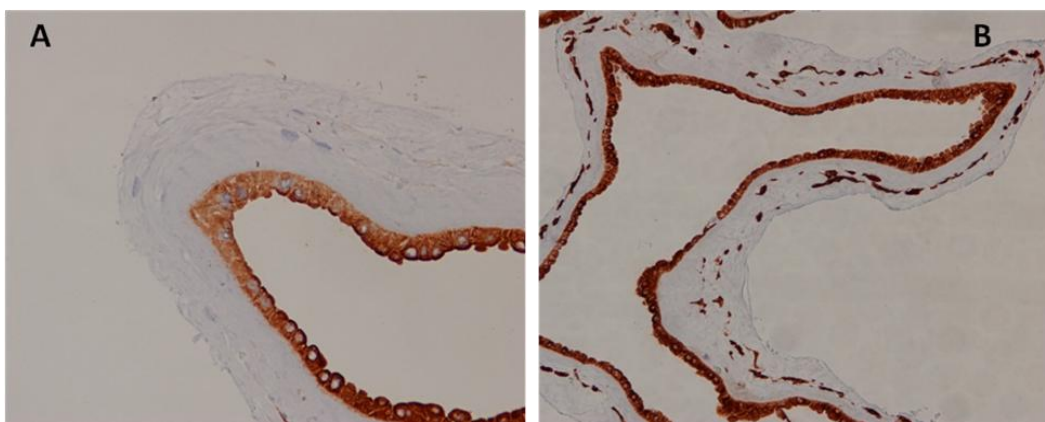


Figura 11. Aspecto de un corte de la MA en bloque de parafina teñida con Hematoxilina-Eosina (40X). CE: Células epiteliales, MB: Membrana basal; CM: Células Mesenquimales; CI: Capa intermedia o esponjosa.

La evaluación microscópica como parte del protocolo de estudio se consideró útil para verificar que en todos los casos la separación de la M.A del corion subyacente fue completa y que en nuestros ensayos solo se utilizó MA.

**1.3 Con coloraciones inmuno-histoquímicas:** En paralelo con las tinciones de Hematoxilina-Eosina se realizaron coloraciones inmuno-histoquímicas para citoqueratina y vimentina en fragmentos de MA (Figure 12A y B). Practicamente en 100% de las células epiteliales se observó positividad para la citoqueratina (Figura 12A) y para la vimentina (Figura 12B). Las células del mesodermo amniótico resultaron positivas solo para la vimentina (Figura 12B).



*Figura 12. Coloración inmuno-histoquímica de la MA (A) Citoqueratina positiva a nivel de las células epiteliales con un patrón de coloración citoplasmática muy intensa, y negativa a nivel de las células estromales. (B) Vimentina positiva tanto en las células epiteliales como en las células estromales.*

La positividad de las células epiteliales para la citoqueratina fue un resultado esperado dada su naturaleza epitelial. Se sabe que las citoqueratinas son filamentos intermedios de naturaleza proteica, ricos en queratina que se encuentran en el citoesqueleto de las células epiteliales, formando una malla que se extiende desde la superficie del núcleo hasta la membrana celular.

La positividad para la vimentina de las células epiteliales fue un resultado menos esperado, pues se acepta que la vimentina es un filamento intermedio que se expresa normalmente en células mesenquimales (como de hecho ocurrió), fibroblastos o miocitos,

y en células del endotelio vascular. Algunos autores han señalado que muchas células epiteliales expresan transitoriamente vimentina en respuesta a varios estímulos, incluyendo pequeños traumas mecánicos (199). Quizás el trauma al que es sometida la MA durante su manipulación y procesamiento pudiera explicar este fenotipo híbrido. No obstante, publicaciones recientes también señalan que la vimentina puede ser un marcador de células madre o progenitoras, especialmente de células madre neurales (16, 200) y que su presencia en las células epiteliales del amnios puede ser un signo más de su multipotencialidad (64, 65, 104).

**1.4 Tras el tratamiento con tripsina:** La observación al microscopio de luz de los fragmentos de MA fresca y/o incluidos en parafina tras el tratamiento con tripsina/EDTA al 0.05%, con el objeto de verificar la efectividad del protocolo, permitió comprobar el despegamiento prácticamente completo de todas las células epiteliales, con integridad del resto de la membrana. La tripsina rompe las conexiones proteicas entre las células epiteliales sin alterar la membrana basal ni la matriz extracelular. Figura 13 A y B.

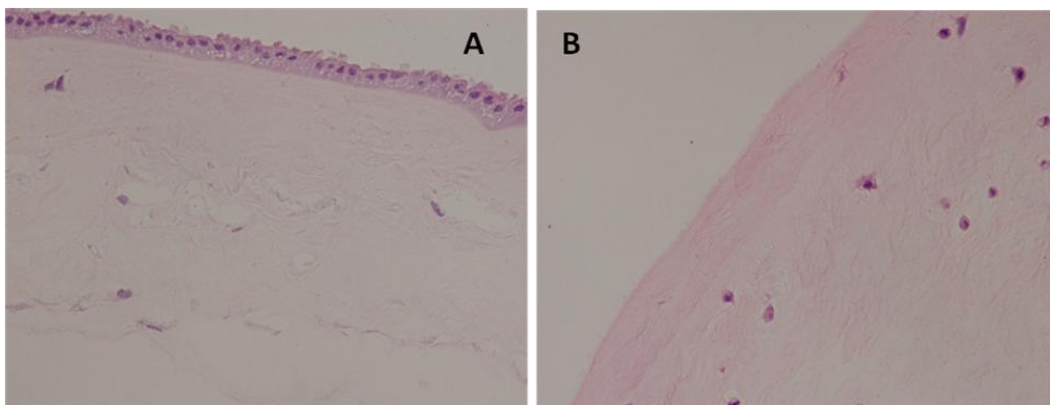
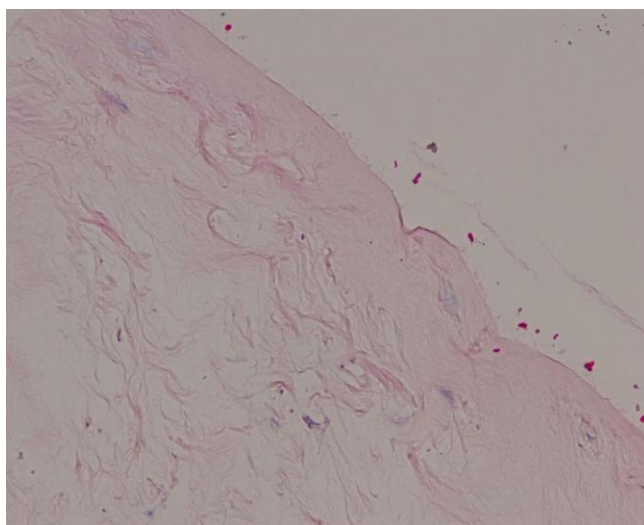


Figura 13. Corte de Membrana Amniótica incluido en parafina, teñida con H-E. (A) Pre-Tripsina. (B) Post-tripsina. (Aumento 20X).



**1.5 Tras el tratamiento con colagenasa:** Igualmente la observación al microscopio de luz de los cortes de MA incluidos en parafina tras el tratamiento con colagenasa evidenció la ausencia prácticamente completa de células en el mesodermo amniótico, y una matriz extracelular de apariencia tenue, evanescente con fibras de colágeno desorganizadas. No se observaron células epiteliales integradas al epitelio, solo unas pocas libres en el espacio extra-membrana (Figura 15).



*Figura 14. Estructura de la MA tras el tratamiento con solución de colagenasa tipo I.*

## **2. CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS AISLADAS DEL EPITELIO (hAEC)**

### **2.1 Recuento y viabilidad celular**

Los botones celulares o “pellet” obtenidos tras la tercera tripsinización se observaron como una masa blanca, densa, de aproximadamente de 3 a 6 mm de altura desde el fondo de un tubo cónico de polipropileno de 15 ml, que permitió estimar con alguna aproximación el número de células aisladas, además evaluar el grado de contaminación o no de las células epiteliales con glóbulos rojos. En caso de contaminación, si las células iban a ser utilizadas para la extracción de ARN, se sometían

previamente al tratamiento con buffer de lisis de eritrocitos durante dos minutos y luego se centrifugaban para obtener un producto puro (Figura 15).

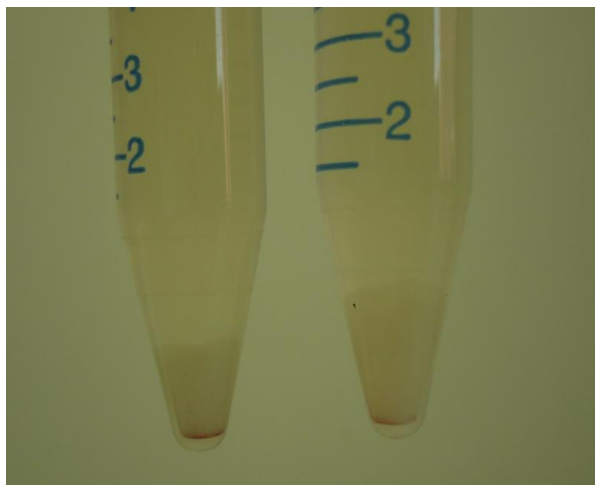


Figura 15. Pellet o botón celular obtenido tras la tercera tripsinización

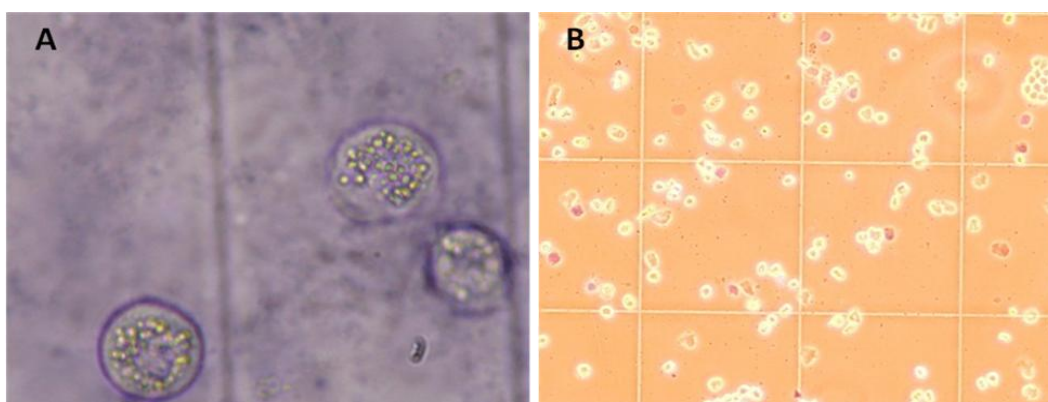
El recuento de células obtenidas de las 12 MA procesadas completas y la viabilidad celular estimada en todas las membranas procesadas parcial o totalmente (n=20) se presentan en la Tabla 14. Ambas determinaciones se realizaron en cámara de Neubauer por la técnica de exclusión del azul de Tripán, ampliamente utilizada en investigación y aún en clínica por tener un rango de reproductibilidad aceptable.

**Tabla 14. Recuento y viabilidad de las hAEC**

M.A (n 12)	Promedio	Rango
Volumen M.A	30 ml	24 ml a 41 ml
Exposición Trip/EDTA	3 veces	-
Nº Cél obtenidas	$123 \pm 12 \times 10^6$ hAEC	$110-135 \times 10^6$ hAEC
Viabilidad MA (n=20)	86%	79% a 94%

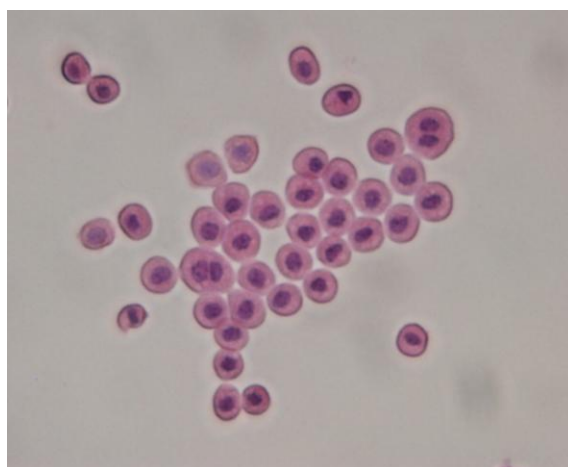
La literatura señala que la viabilidad de las células es inversamente proporcional a la concentración de tripsina utilizada, al período de incubación del tejido en la solución de tripsina y al tiempo transcurrido entre la extracción y el procesamiento de la MA. Es menos cuando cualquiera de estos factores es mayor o más prolongado (163). Las concentraciones recomendadas de tripsina-EDTA varían entre 0.02 y 0.25% durante 10 min a 2 horas (163). Basados en nuestros estudios pilotos adoptamos la concentración de 0.05% y 40 min de digestión (3 veces) como las mejores condiciones para el aislamiento celular, procediendo siempre en un tiempo no mayor a 1 hora tras la cesárea.

La apariencia de las células epiteliales recién despegadas del epitelio durante la realización del recuento en la cámara de Neubauer (A) y durante la estimación de la viabilidad (B) se presenta en la Figura 16A y B. En ambos casos, las células se observan de tamaño mediano, redondas con un citoplasma lleno de vacuolas o gránulos, difíciles de caracterizar en este tipo de preparación. En la Figura 16B se aprecia claramente el tinte violeta-azulado de las células muertas y el color claro “refringente” de las células vivas.



*Figura 16. Células epiteliales recién aisladas observadas en la Cámara de Neubauer. 40X (A) durante el recuento; (B) durante la estimación de la viabilidad: aspecto refringente de las células vivas y color azulado sin refringencia de las células muertas.10X*

En la tinción con Hematoxilina-Eosina las células se observaron en grupos o aisladas, de apariencia homogénea, medianas, con membrana citoplasmática bien definida, bordes regulares, citoplasma abundante, núcleo prominente, central o ligeramente excéntrico, único o doble, con uno o más nucléolos y relación núcleo citoplasma baja (Figura 17).



*Figura 17. Células epiteliales recién aisladas de la MA teñidas con H-E. 40X*

## **2.2 Cultivo Primario de las hAEC:**

El cultivo primario de las hAEC se realizó a la densidad de  $1.0 \times 10^5 / \text{cm}^2$ , considerada por varios investigadores como la mínima densidad requerida para que ocurra proliferación (67, 69, 81). Se sembraron en DMEM sin y con EGF para evaluar su efecto en la proliferación celular, descrito como favorable por diferentes investigadores (16, 65, 67, 68, 80).

Todas las muestras de hAEC (20/20) cultivadas en DMEM con 10 ng/ml de EGF, mostraron adherencia al plástico y formación de una monocapa confluyente con un patrón típico de células epiteliales en mosaico en un promedio de 4.4 días (rango: 2 a 6

días). Las muestras cultivadas en DMEM sin EGF evidenciaron un comportamiento variado: 5/20 mostraron adherencia rápida al plástico y formación de una monocapa confluyente, similar a la descrita para las cultivadas en DMEM con EGF, en un tiempo promedio más corto: 3.2 días, (rango 2 a 4 días); 13/20 mostraron adherencia a los frascos de cultivo y formación de acúmulos celulares que adquirieron confluencia en 8.6 días (rango 6 a 11 días); 2/20 no mostraron adherencia o fue tan escasa que comprometió la progresión del cultivo celular. Figura 18A, B, C, D.

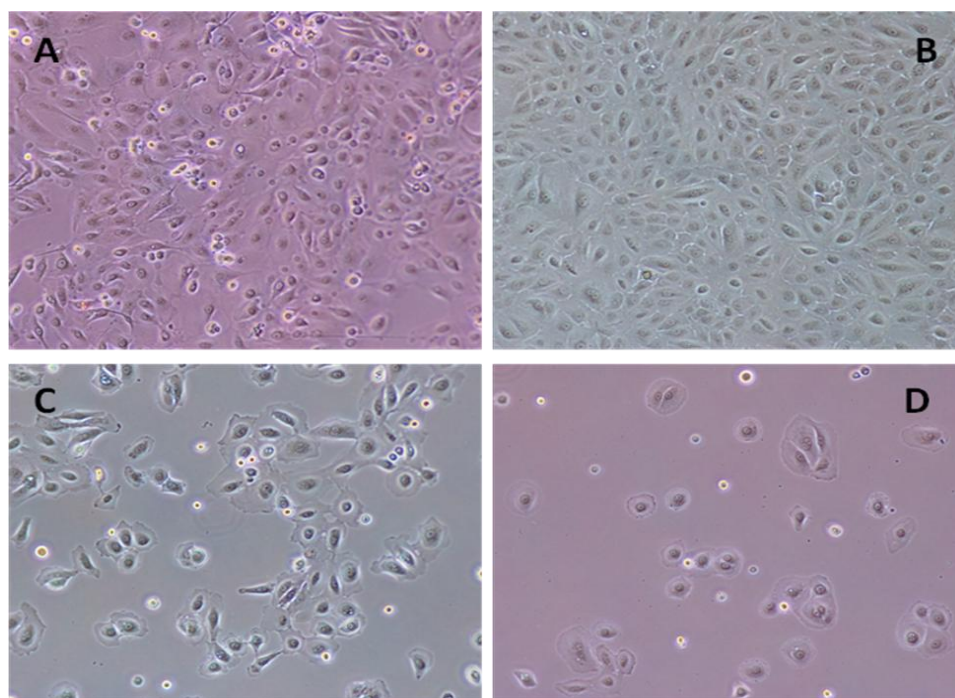


Figura 18. Cultivo primario de las hAEC. (A) Células confluentes a las 4.4 días en DMEM con EGF. Patrón típico de células epiteliales en mosaico, redondeadas, con abundante citoplasma y núcleo voluminoso. (B) Células confluentes a los 3.2 días en DMEM sin EGF, patrón de crecimiento similar a A. (C) Acúmulos celulares observados a los 8.6 días en DMEM sin EGF. (D) Células aisladas en DMEM sin EGF.

En todas las muestras se observó una población de células no adherentes, suspendidas en el medio de cultivo al momento de realizar el primer cambio de medio, cuyo valor promedio en los cultivos con EGF fue  $1900.3 \pm 102.7 \times 10^3$  (rango:  $1288 \times 10^3$ -

2989x10<sup>3</sup>) y 1963±52.2x10<sup>3</sup> (rango: 1389±10<sup>3</sup>-2236x10<sup>3</sup>) en los cultivos sin EGF (17 a 39% de las células sembradas). La viabilidad promedio de estas células fue 68% para el primer grupo y 52% para el segundo. Tabla 15

Tabla 15. Cultivos Primarios de hAEC.

DMEM con EGF							DMEM sin EGF						
Nº	Adh	Cél No Adh x10 <sup>3</sup>	Tiempo Confl. días	Cél Obt X 10 <sup>3</sup>	Rend. %	Viab %	Nº	Adh	Cél No Adh x10 <sup>3</sup>	Tiempo Confl. días	Cél Obt X 10 <sup>3</sup>	Rend %	Viab %
1	Si	1428	6	6830	112	93	1	Si	1986	8	2960	54	86
2	Si	1780	3	6440	113	91	2	Si	1848	10	3250	58	82
3	Si	1642	4	5240	89	95	3	NO	-	-	-	-	-
4	Si	2010	5	5100	92	91	4	Si	1389	9	3310	54	81
5	Si	1390	5	4700	78	92	5	NO	-	-	-	-	-
6	Si	1656	6	4780	82	89	6	Si	1931	10	2655	48	71
7	Si	1288	5	5810	94	92	7	Si	2236	10	2440	46	75
8	Si	2120	5	6290	117	90	8	Si	1746	11	3380	59	86
9	Si	2989	4	6470	143	91	9	Si R	2062	2	6650	122	91
10	Si	2680	3	9460	196	89	10	Si R	2148	3	7049	132	90
11	Si	2352	6	6040	117	87	11	Si	1894	6	2870	62	80
12	Si	1946	3	6000	108	93	12	Si	2046	9	3100	57	74
13	Si	1874	5	5560	99	87	13	Si	1868	8	3023	54	87
14	Si	1322	5	5380	87	89	14	Si	2036	7	2976	54	86
15	Si	1575	3	6723	113	90	15	Si	2065	9	3150	58	84
16	Si	1738	2	9250	161	94	16	Si R	2474	3	6990	139	89
17	Si	2028	3	6431	118	91	17	Si	1855	8	3686	65	84
18	Si	1645	4	6590	113	86	18	Si R	1982	4	7118	129	92
19	Si	2528	3	8326	167	92	19	Si	1846	8	2990	53	78
20	Si	2015	5	7048	128	89	20	Si R	1922	4	6945	125	88
Media		1900.3 ±102.7	4.4	6423.4 ±294.1	116.3 ±6.7	90.5 ±053	Media		1963.0 ±52.2	7.1	4157.8 ±426.1	76.05 ±8.1	83.5 ±1.4

Adh: adherencia; Cél No adh: Células no adherentes; Confl: Confluencia; Cél. Obt: Células obtenidas; Ren: Rendimiento; Viab: Viabilidad; R: Rápida

El promedio de células obtenidas en las muestras cultivadas en DMEM con EGF fue  $6423.4 \pm 294.1 \times 10^3$  células y en las muestras cultivadas en DMEM sin EGF fue  $4157.8 \pm 426.1 \times 10^3$  células, lo que representa una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

El rendimiento celular, medido como la relación porcentual entre la cantidad de células obtenidas y la cantidad de células sembradas menos las células no adherentes, fue más elevado en las muestras cultivadas con EGF que en las cultivadas sin EGF, con una diferencia significativa ( $116.3 \pm 6.7\%$  Vs  $76.5 \pm 8.1\%$ ) ( $p < 0.05$ ).

Hubo cinco muestras de hAEC sembradas en DMEM sin EGF (muestras 9, 10, 16, 18, 20) que mostraron una confluencia muy rápida (2 a 4 días), con un rendimiento celular elevado (entre 122 y 139%), lo que hizo plantear que su proliferación era independiente del EGF exógeno y que otros factores podrían estar involucrados.

La viabilidad celular fue más elevada en las células cultivadas con EGF que en las cultivadas sin EGF, con una diferencia significativa entre ambos grupos ( $p < 0.05$ ).

En relación a la población de células no adherentes a la que hemos hecho referencia, debido a que muchas de ellas eran células viables, volvimos a sembrar 12 muestras de estas células, seleccionando 6 de frascos que al tercer día mostraban confluencia (3 de medios con EGF y 3 de medios sin EGF) y 6 que al tercer día no mostraban confluencia (3 de medios con EGF y 3 de medios sin EGF). El cambio de cultivo lo continuamos con el mismo tipo de medio de donde provenían las células. La

identificación de las muestras y los resultados de las siembras los resumimos en la Tabla 16.

**Tabla 16. Cultivo Primario de hAEC No adherentes.**

Cél. No Adh. obtenidas de muestras con confluencia rápida				Cél. No Adh. obtenidas de muestras con confluencia lenta		
Nº	EGF	Confluencia Secundaria	Confluencia Terciaria	Nº	EGF	Confluencia Secundaria
12	Si	Si	No	11	Si	No
17	Si	Si	No	13	Si	No
19	Si	Si	No	14	Si	No
9	No	Si	Si	12	No	No
10	No	Si	No	15	No	No
16	No	Si	Si	19	No	No

Observamos que todas las muestras de células no adherentes obtenidas de cultivos que habían mostrado una confluencia inicial rápida, se adherían a los frascos y desarrollaban cultivos confluentes rápidamente con la misma apariencia del cultivo primario del cual procedían, siendo posible además obtener una nueva confluencia con las células no adherentes procedentes de las muestras 9 y 16; y que las células no adherentes obtenidas de muestras con confluencia inicial lenta, no se adherían y por ende no desarrollaban confluencia. Las células de la muestra Nº 12 mostraron dependencia del factor (confluencia en dos oportunidades solo en presencia de éste). Las células de las muestras Nº 9 y 16 mostraron confluencia en tres oportunidades en medios no suplementados con EGF. Este ensayo nos permitió evidenciar la independencia de la adición exógena que muestran algunas hAEC para su proliferación, probablemente porque tienen una producción autocrina elevada de ese factor o de otros factores involucrados.



A pesar de que la densidad de siembra inicial fue igual a la utilizada por Miky y col (67), y que al igual que ellos, prolongamos la observación de los frascos de cultivos primarios durante tres semanas, en ninguno de ellos observamos la formación de cuerpos esferoides, estructuras que como ya hemos señalado son acúmulos de células madres formados sobre el mosaico de células epiteliales adheridas al frasco de cultivo. A nuestro juicio, la no formación de estos acúmulos puede ser expresión de la poca capacidad de auto-renovación que mostraron las hAEC en el medio de cultivo utilizado.

### 2.3 Curvas de proliferación de las hAEC en P0 en presencia y ausencia de EGF:

La capacidad de proliferación de las hAEC se evaluó por el método MTT (Figura 19A) y el método EZU4 (Figura 19B), en placas de 96 pocillos con siembras celulares de  $3.0 \times 10^3$ /pocillo y lecturas los días 4, 7, 11, 14, 17 y 21. La curva de crecimiento obtenida con el MTT evidenció que para cada día correspondiente de observación, la proliferación fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en las células cultivadas en DMEM con EGF que en el cultivo sin factor. El Método EZU4 pareció ser más sensible que el MTT para detectar la actividad metabólica de las células cultivadas sin EGF, y por ello, para cada día de observación (especialmente antes del día 14) la diferencia entre ambas curvas fue menor.

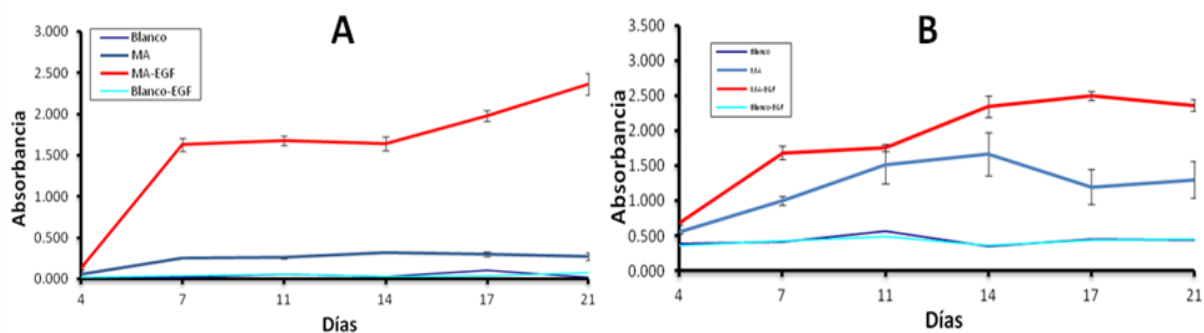


Figura 19. Curvas de proliferación celular de las hAEC, determinadas por: A) Método MTT y B) Método EZU4. Resultados expresados como valores medios  $\pm$  ESM.

#### 2.4 Capacidad de expansión de las hAEC sembradas en DMEM con o sin EGF:

Las células obtenidas de los cultivos primarios se sub-cultivaron siguiendo el mismo protocolo independientemente de que en los cultivos primarios hubiesen mostrado una confluencia precoz o tardía. Se sembraron por duplicado a una densidad de  $1.0 \times 10^4$  células /cm<sup>2</sup> en F 75. Para conocer y comparar el número de células obtenidas en cada pase tras el cultivo con o sin EGF en un período de tiempo similar, las células de los dos frascos se despegaron en el momento en que uno de ellos alcanzaba confluencia. Esto siempre ocurrió en las células cultivadas con EGF, que en promedio alcanzaron 90% de confluencia cuando las cultivadas sin EGF mostraban 50-60%. Cuando el número de células obtenido fue inferior a la cantidad de  $1 \times 10^4$  células /cm<sup>2</sup> necesaria para continuar con el pase siguiente, se suspendió el proceso de subcultivos.

En la Tabla 17 puede observarse que bajo las condiciones de cultivo utilizadas, para el momento en que las células cultivadas con EGF alcanzaron confluencia, el número de células despegadas de estos frascos fue significativamente mayor que el obtenido de los frascos cultivados sin EGF, lo cual fue más notorio en el primer pase. En los pases siguientes el número de células en presencia de EGF siguió siendo mayor, pero la diferencia fue menos importante. Para los dos grupos la proliferación fue escasa y fue disminuyendo con cada pase. Además, a medida que se avanzó en los pases, el tiempo promedio para alcanzar confluencia fue más prolongado.

Estos resultados aunados a la no observación de cuerpos esferoides en los cultivos primarios son una ratificación de la poca capacidad de autorenovación y proliferación que mostraron las hAEC en el medio de cultivo utilizado.

Tabla 17. Expansión *in vitro* de las hAEC en DMEM con EGF y sin EGF

Nº	P1 Cel obt x10 <sup>3</sup>			P2 Cel obt x10 <sup>3</sup>			P3 Cel obt x10 <sup>3</sup>			P4 Cel obt x10 <sup>3</sup>		
	MA	Días	EGF	Ø EGF	Días	EGF	Ø EGF	Días	EGF	Ø EGF	Días	EGF
1	10	3250	1390	13	1540	1110	16	1010	960	18	970	704
2	14	3140	1012	12	1620	890	13	1465	710	16	1160	680
3	10	3670	-	13	1500	-	13	1087	-	16	930	-
4	11	3330	1010	12	1650	928	15	1112	716	15	1000	712
5	14	4040	-	13	2130	-	14	1500	-	14	1115	-
6	11	2385	1032	14	1940	1270	14	1260	800	17	968	626
7	10	2300	1064	12	1930	956	13	1390	975	15	845	734
8	12	2470	1196	15	1870	1140	14	1473	1000	18	1080	580
9	10	1950	1104	11	1418	990	17	1184	820	17	924	699
10	10	2010	1510	13	1430	1420	14	1136	1036	18	849	528
11	12	2240	1050	15	1500	1172	14	1045	998	18	820	674
12	11	2130	1008	13	1580	1014	15	1210	892	16	1026	622
13	11	2090	1090	13	1440	1000	14	1060	854	17	914	678
14	10	2150	1218	12	1547	980	13	1128	702	15	880	563
15	10	1880	1310	12	1630	1008	14	1006	987	16	855	594
16	11	1926	878	14	1580	824	17	1410	613	16	1100	500
17	10	1760	1066	12	1510	957	15	1030	788	17	852	636
18	10	1870	938	13	1475	816	14	1422	904	16	980	661
19	11	2730	1160	14	1515	900	16	1288	816	18	918	794
20	12	2320	800	15	1760	786	15	1400	674	17	1026	604
Medi.	11.0	2490.5 ±154.87	1119.7 ±39.57	13.0	1621.3 ±45.85	1022.0 ±38.29	14.5	1221.8 ±39.84	857.1 ±30.52	16.5	957.1 ±32.23	646.1 ±18.55
		p < 0.05			p < 0.05			p < 0.05			p < 0.05	

Células sembradas  $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ . Frascos de  $75 \text{cm}^2$

En la mayoría de los subcultivos a partir del segundo/tercer pase se observó en las células cultivadas en ambas condiciones un cambio evolutivo en su morfología: las células comenzaron a aumentar de tamaño y su forma redondeada regular comenzó a hacerse irregular, adquiriendo una apariencia fibroblastoide, parecida a las de las células mesenquimales en cultivo (Figura 20).

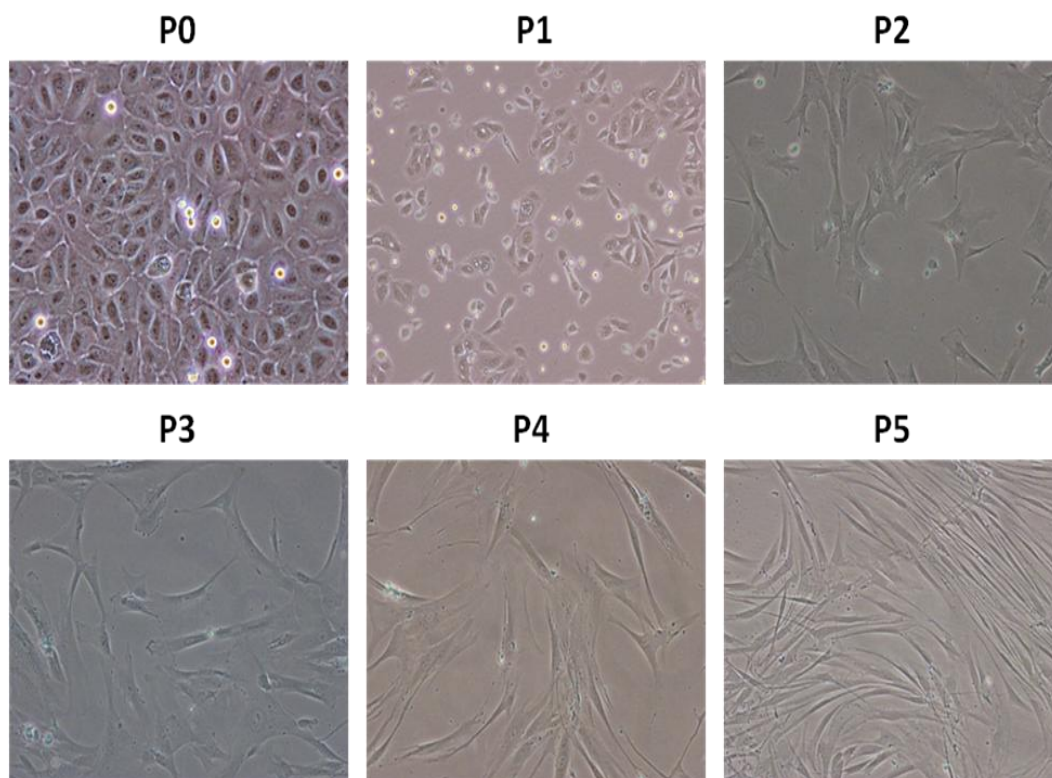


Figura 20. Apariencia de las hAEC en cultivo desde el Pase 0 (P0) hasta el Pase 5 (P5).

En el cuarto/quinto pase, los dos tipos de células eran indistinguibles por morfología. Este cambio nos pareció que correspondía a lo que se ha descrito en la literatura como Transición Epitelio-Mesénquima (EMT), el cual es un proceso celular observado *in vivo* e *in vitro*, en el que las células epiteliales pierden sus propiedades epiteliales, esto es, su organización polarizada, las uniones célula-célula, sufren cambios en el citoesqueleto y en la forma celular, adquieren características mesenquimales y se vuelven migratorias e invasivas (202, 203). Para aclarar si el mencionado proceso era lo que estaba ocurriendo con las células epiteliales de la MA durante los sub-cultivos, realizamos un protocolo de investigación, que incluyó la evaluación de marcadores epiteliales y mesenquimales en la superficie celular, así como la evaluación de la

reorganización de las proteínas del citoesqueleto, los filamentos intermedios y los factores de transcripción relacionados con el proceso de EMT. Los resultados confirmaron el planteamiento de EMT y actualmente están siendo revisados para su publicación en la revista *Cell Transplantation*.

**2.5 Clonogenicidad:** La capacidad clonogénica de las células epiteliales en P0 se investigó a través del cultivo durante 14 días de células sembradas a baja densidad: ( $1.0 \times 10^1 / \text{cm}^2$ ;  $1.0 \times 10^2 / \text{cm}^2$  y  $1.0 \times 10^3 / \text{cm}^2$ ) en DMEM con y sin EGF.

**2.5.1** En los cultivos sembrados a una densidad de  $1.0 \times 10^1$  células / $\text{cm}^2$  en cualquiera de los dos medios no se observó crecimiento celular en 14 de los 20 ensayos realizados. En los 6 ensayos restantes, la coloración con May-Grünwald Giemsa evidenció algunas células aisladas (Figura 21).



Figura 21. hAEC cultivadas a una densidad de  $1 \times 10^1$  células / $\text{cm}^2$  coloreadas con May-Grünwald Giemsa, aisladas, sin evidencias de formación de colonias.

**2.5.2** En 6 de los 20 ensayos realizados (30%) con siembra a una densidad de  $1.0 \times 10^2 / \text{cm}^2$  se observaron algunos grupos celulares y células en aparente división en los cultivos suplementados con EGF, ninguno alcanzó el criterio de más de 50 células para

ser considerado una colonia. En los cultivos sin suplemento de EGF se observaron algunas células aisladas y en aparente división (Figura 22).

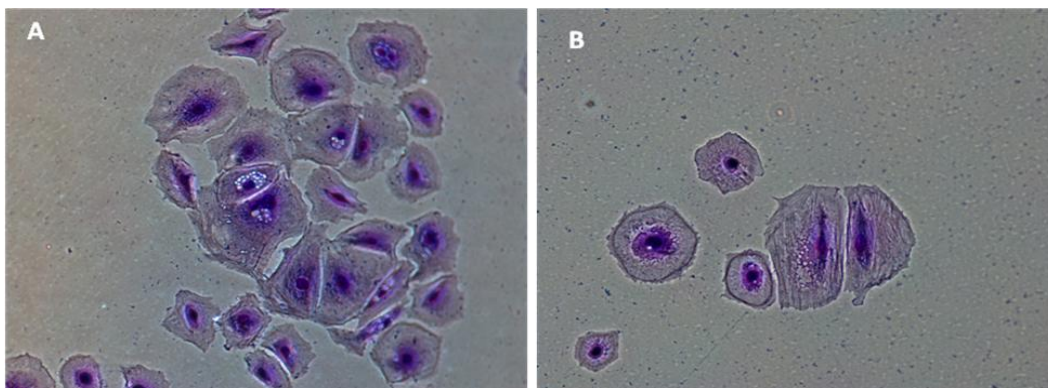


Figura 22. hAEC cultivadas a una densidad de  $1 \times 10^2$  células /cm<sup>2</sup> coloreadas con May-Grünwald Giemsa, (A) en presencia de EGF algunas formaron acúmulos celulares de menos de 50 células, (B) en ausencia de EGF se observaron algunas células aisladas y en división.

**2.5.3** En 11 de los 20 ensayos realizados (55%) con siembra a una densidad de  $1.0 \times 10^3$ /cm<sup>2</sup> en presencia de EGF se observó la formación de colonias, generalmente de mayor tamaño (con más de 50 células). Sólo 8 de las 20 (40%) cultivadas a esta densidad en ausencia de EGF alcanzaron el criterio de más de 50 células por colonias. En ambos grupos se observó gran heterogeneidad (Figura 23).

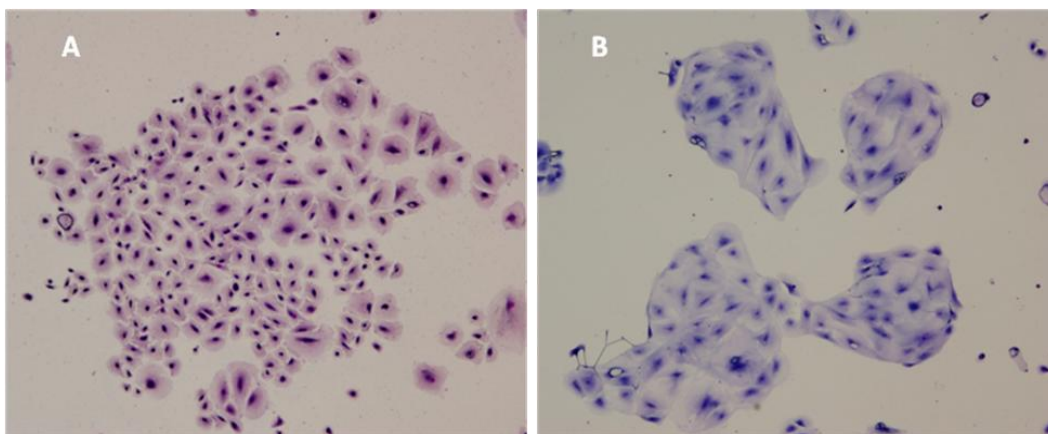


Figura 23. hAEC cultivadas a una densidad de  $1 \times 10^3$  células /cm<sup>2</sup> coloreadas con May-Grünwald Giemsa, (A) en presencia de EGF formaron grandes colonias de mas de 50 células, (B) en ausencia de EGF las colonias fueron de menor tamaño.

Dado los resultados obtenidos, la eficiencia clonogénica se calculó sólo para las células sembradas a una densidad de  $1.0 \times 10^3 / \text{cm}^2$  en presencia o ausencia de EGF. Tabla 18. La eficiencia clonogénica, aunque baja, fue significativamente mayor en presencia de EGF ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 18. Eficiencia clonogénica de las hAEC tras 14 días en DMEM con EGF y sin EGF**

Nº/MA	DMEM + EGF		DMEM sin EGF	
	Total UFC-F >50 cels.	Total CFU-F/Cels semb X100	Total UFC-F >50 cels.	Total CFU-F/Cels semb X100
1	88	0.31	64	0.22
3	82	0.29	NO	-
5	97	0.34	NO	-
7	78	0.27	54	0.19
9	122	0.43	102	0.36
10	108	0.38	90	0.32
11	65	0.23	58	0.20
12	88	0.31	NO	-
16	128	0.45	118	0.42
19	112	0.40	94	0.33
20	105	0.37	86	0.30
Media	97.5 ±5.85	0.34 ±0.020	60.5 ±13.04	0.21±0.046
	$P=0.02$	$P=0.02$		

## 2.6 Evaluación del Ciclo Celular de las hAEC recién aisladas y en P0 (cultivadas con o sin EGF).

Cuando se evaluó el ciclo celular de las células recién aisladas del epitelio amniótico se pudo comprobar a través del histograma (Figura 24A), que prácticamente todas (94.5%) las hAEC están quiescentes (G0/G1), probablemente porque *in vivo* residen dentro de un tejido que permanece prácticamente del mismo tamaño durante las últimas semanas del embarazo. Al ser transferidas al medio de cultivo salen del estado de quiescencia y

comienzan a dividirse (G2/M) (Figura 24B y C), aunque como ya hemos comentado con una tasa de proliferación baja. Cuando el medio de cultivo está libre de EGF, la proliferación celular parece ser discretamente menor (G2/M: 19.3%) (Figura 24B) que cuando contiene EGF (G2/M: 24.8%) (Figura 24C). El histograma de las células que mostraron confluencia precoz en ausencia de EGF fue similar al de la figura 24C).

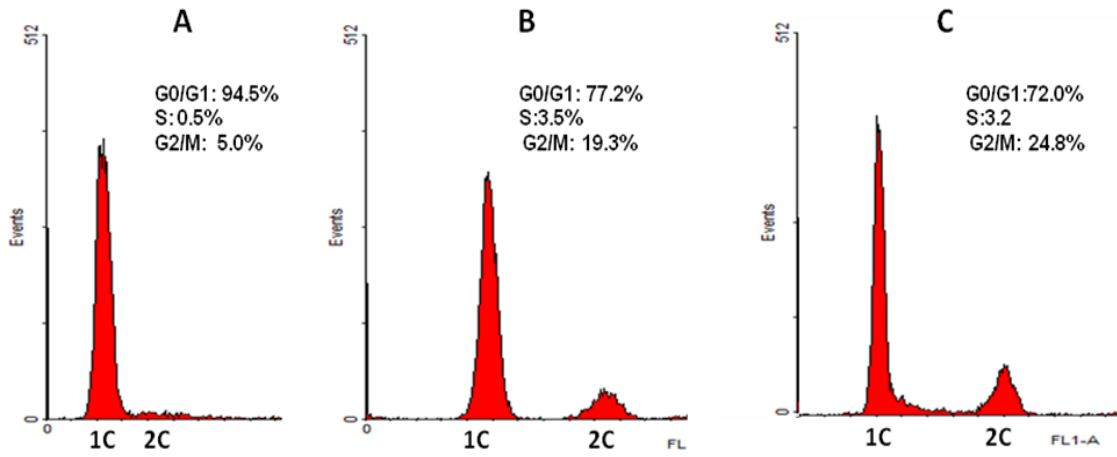


Figura 24. Los histogramas demuestran hAEC en las fases G0/G1 (1C) y fases G2/M (2C) del ciclo celular. (A) Muestra el ciclo celular de células recién aisladas donde predomina el estado de quiescencia, (B) Muestra el ciclo celular de células que han salido de la fase de quiescencia en ausencia de EGF y (C) Muestra el ciclo celular de células que han salido de la fase de quiescencia en presencia de EGF.

## 2.7 Marcadores Inmuno-fenotípicos:

**2.1.1 Marcadores de Membrana:** La investigación se realizó por citometría de flujo en células recién aisladas, células en P0 y en células no adherentes del sobrenadante. En todos los grupos la investigación demostró que las hEAC expresan antígenos presentes en las células embrionarias y no expresan antígenos HLA DR. (Figura 25).



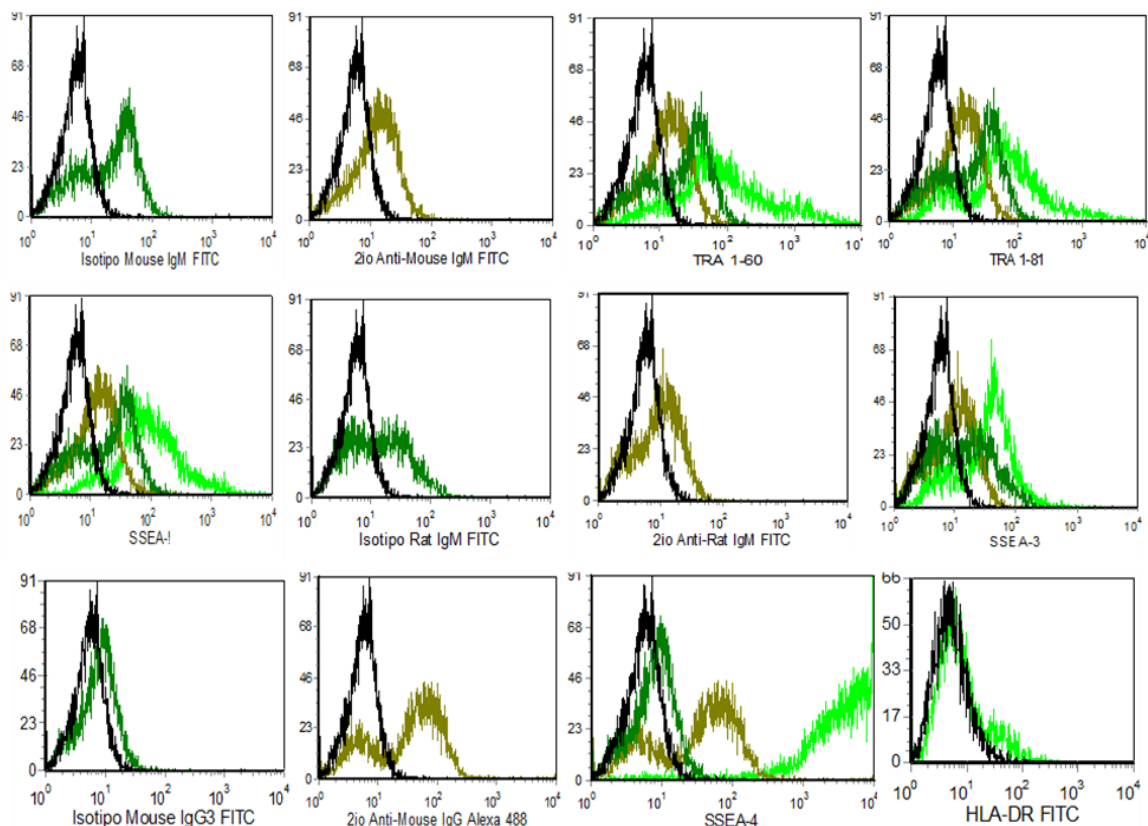


Figura. 25 Histograma de la expresión de los diferentes marcadores antigénicos de membrana de las hAEC

Fue notoria en todas las determinaciones la expresión del SSEA-1. Este es un antígeno carbohidrato, derivado fucosilado de tipo 2 polilactosamina que según se ha señalado se expresa durante la diferenciación de las hESC, en el momento en que se regula negativamente la expresión de SSEA-3 y de SSEA-4 (204). No tenemos explicación para la positividad del SSE A-1 en todas las muestras, pero, si lo que ocurre en las hESC es aplicable también a las hAEC, probablemente en nuestras muestras estamos detectando algunas células con grados de diferenciación variados.

En la Tabla 19 se representan los promedios de los valores obtenidos en los diferentes grupos de células: 10 realizados en células recién aisladas, 10 realizados en células en P0, y 4 en realizadas en células no adherentes.

Tabla 19. Cuantificación de antígenos de membrana hAEC

hAEC	TRA 1-60	TRA 1-81	SSEA-1	SSEA-3	SSEA-4
Recién Aisladas	29.87%	15.55%	15.46%	17.15%	97.39%
Pase 0	23.85%	21.65%	14.97%	13.57%	96.34%
Células no adherentes	14.0%	13.44%	13.19%	14.40%	89.68%

**2.7.2 Marcadores Intracelulares:** La citoqueratina resultó fuertemente positiva tanto por inmunocitoquímica como por inmunofluorescencia en las hAEC recién aisladas y de P0. Mientras que la vimentina se observó discretamente más débil en las células recién aisladas que en las células en P0. (Figuras 26 y 27).

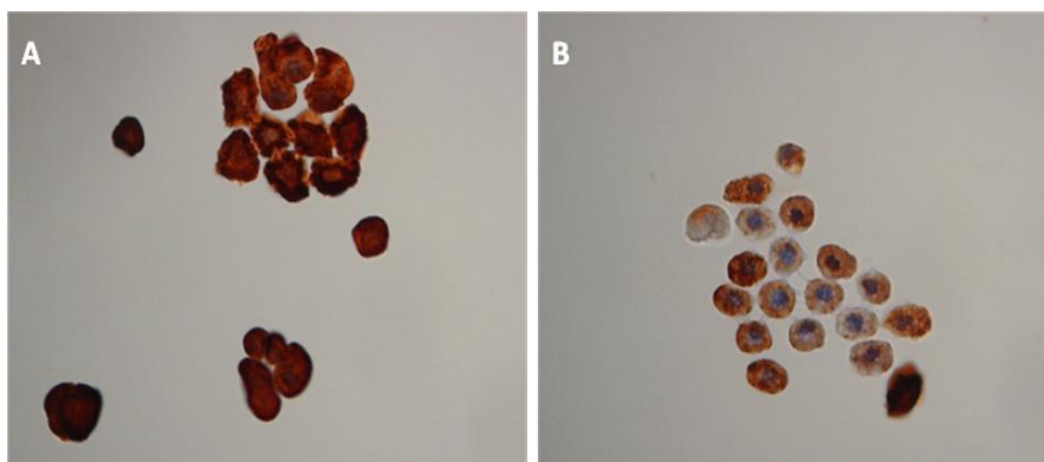


Figura 26. Coloración inmunocitoquímica de hAEC recién separadas del epitelio (A) citoqueratina positiva, (B) vimentina positiva.

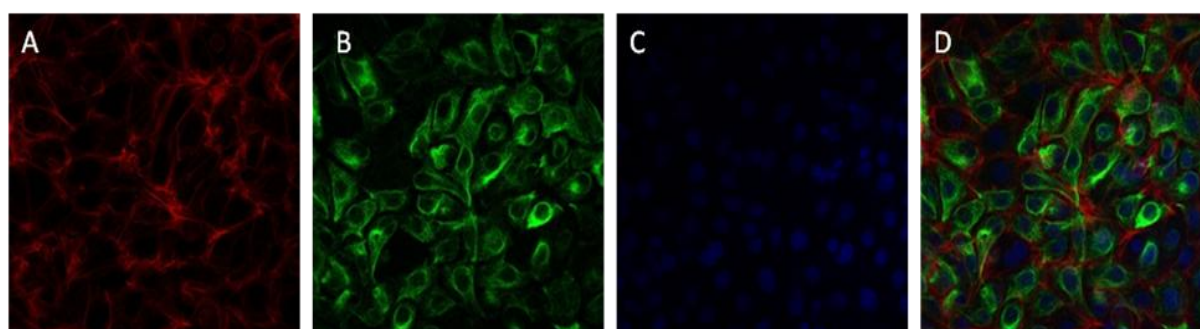


Figura. 27. Expresión por inmunofluorescencia de (A) Citoqueratina, (B) Vimentina, (C) Hoechst, y (D) Citoqueratina/Vimentina/Hoechst en hAEC en P0.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos al realizar el análisis en fragmentos de MA, donde también se evidenció una doble positividad para citoqueratina/vimentina. Como la vimentina se considera un marcador de células mesenquimales, algunos intentan explicar su expresión por el estímulo y trauma mecánico al que es sometida la membrana y sus células durante el procesamiento (199). Otros consideran que su expresión se debe al carácter multipotencial de las células epiteliales (64, 65, 102). Otros señalan que es un rasgo adquirido durante el cultivo, que evidencia des-diferenciación de las hAEC por influencias de los medios y/o ambientales (16), o que es expresión del proceso de Transición Epitelio-Mesénquima al que ya hemos hecho referencia (69, 88, 102, 201).

**2.8. Marcadores de pluri-potencialidad:** Las hAEC expresan marcadores de pluri-potencialidad. Esto pudimos evidenciarlo a través de los ensayos de PCR que revelaron la expresión de Oct-4 y Sox-2 en hAEC en P0 y en P3 (Figura 28 A). La expresión de hTERT resultó negativa en las hAEC, y positiva en las líneas HeLa y K562 como era de esperarse dado que ambas son líneas celulares inmortalizadas. El análisis por qPCR de los genes de pluripotencialidad Nanog, Oct-4 y Sox-2 permitió evaluar de forma relativa los cambios en la expresión de estos genes en las células en P3 en relación a las células en P0, (Figura 29A), confirmando lo que se ha señalado de que estos genes se regulan negativamente en la medida de que se realizan cultivos sucesivos, probablemente porque ocurre diferenciación celular. La Figura 29B expresa el número de veces que desciende la expresión de los genes.

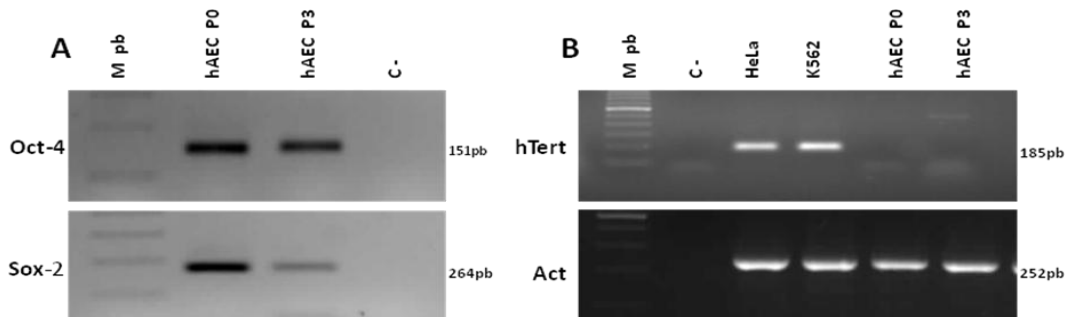


Figura 28. Expresión de marcadores de pluripotencialidad en las hAEC de P0 y P3. (A) Oct-4 y Sox-2. (B) Expresión de hTERT en dos líneas celulares malignas: HeLa y K562 y ausencia de expresión en dos poblaciones de hAEC P0 y P3. Expresión del gen de la  $\beta$ -actina utilizado como control interno.

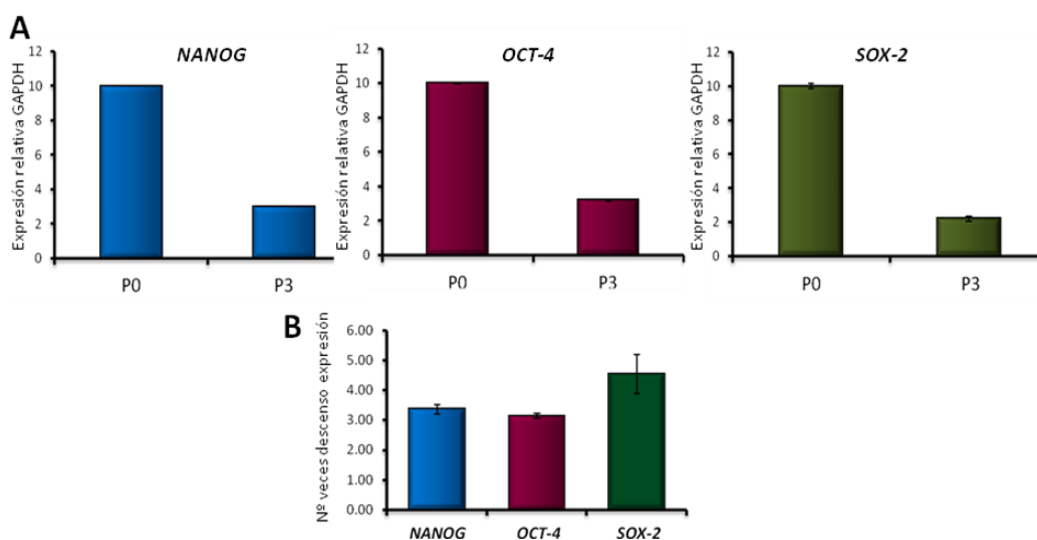


Figura 29. (A) Expresión relativa de los genes de pluripotencialidad: Nanog, Oct y Sox 2 en hAEC en P0 y P3 por q-PCR. (B) Nº de veces que desciende la expresión entre P0 y P3.

**2.9 Perfil genético obtenido mediante qPCR array:** el estudio realizado en tres muestras de hAEC en P0 cultivadas en DMEM con EGF, consideradas muestras control (C), evidenció una expresión relativamente abundante de 25 genes, comparada a la expresión de los genes de referencia. Tabla 20. Entre estos genes se encuentran 4 genes de pluripotencialidad y 6 de capas germinales, lo que en principio se suma a los caracteres previamente mencionados para ratificar el estatus de pluripotencialidad atribuido a estas células.

Tabla 20. Perfil genético de las hAEC antes de la inducción de diferenciación

Posición	Símbolo	Descripción	C <sub>T</sub> Media	Marcador
A03	AQP1	<i>Aquaporin 1</i>	30.31	
A11	COMP	<i>Catilage oligomeric matrix protein</i>	29.62	
B01	CTSK	<i>Cathepsin K</i>	29.94	
B02	DCN	<i>Decorin</i>	22.05	Capa germial mesodermo
B04	DNMT3B	<i>DNA methyltransferase 3 beta</i>	28.18	Pluripotencial
B05	DPP4	<i>Dipeptidyl peptidase 4</i>	25.65	
B06	ENO1	<i>Enolase 1 (alpha)</i>	23.38	
C01	GAD1	<i>Glutamate decarboxylase 1, brain</i>	29.96	
C03	GALC	<i>Galactosylceramidase</i>	25.95	
C06	GATA6	<i>GATA binding protein 6</i>	30.40	Capa germinal endodermo
C10	HAND1	<i>Heart and neural crest derivatives expres 1</i>	22.14	Capa germinal mesodermo
C11	HAND2	<i>Heart and neural crest derivatives expres 2</i>	26.13	
D03	IGF2	<i>Insulin-like growth factor 2( somatomedin)</i>	24.55	Capa germinal mesodermo
D04	INS	<i>Insulin</i>	30.60	
D05	ITGB4	<i>Integrin beta 4</i>	25.24	
D07	KRT14	<i>Keratin 14</i>	22.69	
D08	KRT19	<i>Keratin 19</i>	19.22	
D10	MAP3K12	<i>Mitogen-activated protein (3)kinase 12</i>	29.48	
E01	MSLN	<i>Mesothelin</i>	25.94	
F01	PDGFRA	<i>Platele derived growth factor receptor</i>	30.85	Capa germinal mesodermo
F02	PODXL	<i>Podocalyxin-like</i>	22.96	Pluripotencial
F04	POU5F1	<i>POU class homeobox 1</i>	28.83	Pluripotencial
F08	RUNX1	<i>Runt related transcription factor 1</i>	23.79	Capa germinal mesodermo
G04	SMTN	<i>Smoothelin</i>	26.57	
G11	ZFP42	<i>Zinc finger protein 42 homolog (mouse)</i>	26.33	Pluripotencial
H01	B2M	<i>B2 microglobulin</i>	19.28	Gen de referencia
H02	HPRT1	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>	24.18	Gen de referencia
H03	RPL13A	<i>Ribosomal Protein L1 3a</i>	20.10	Gen de referencia
H04	GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	16.85	Gen de referencia
H05	ACTB	<i>Actin beta</i>	17.73	Gen de referencia

## 2.10. Diferenciación *in vitro*:

**2.10.1 Diferenciación neuro-ectodérmica:** Las hAEC cultivadas en medio de diferenciación neural mostraron rasgos de diferenciación hacia esta línea celular. Inicialmente, en la primera semana de cultivo se observó disminución en el número de células y en la proliferación celular. A finales de la segunda semana comenzó a

observarse una morfología celular heterogénea: algunas células redondeadas con cuerpo celular y núcleo voluminoso con prolongaciones bipolares y multipolares cortas o algo puntiagudas, y otras con prolongaciones citoplasmáticas únicas, largas y delgadas que recordaban la apariencia del células del tejido nervioso (Figura 30). Ninguno de estos cambios se observó en las células cultivadas en medio basal.

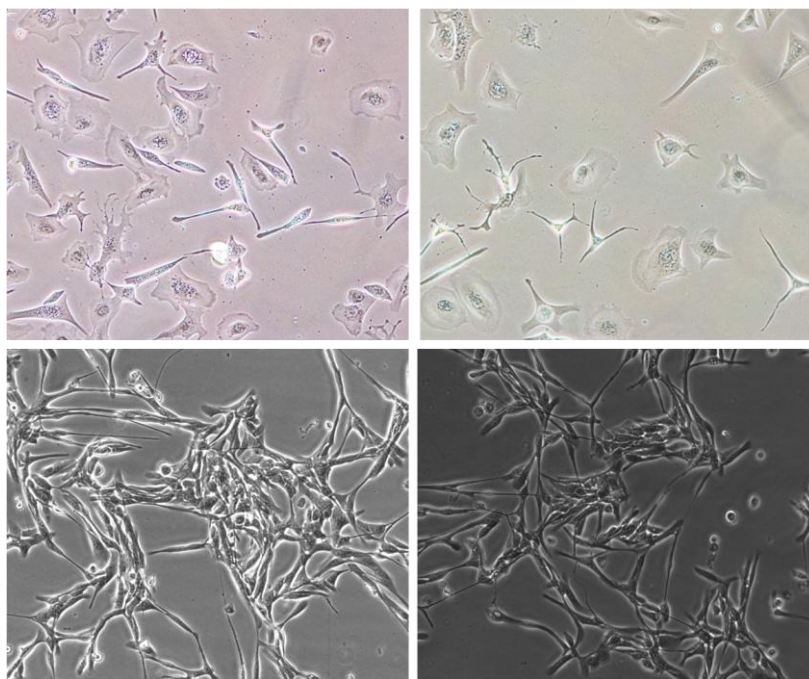


Figura 30. Apariencia morfológica en microscopio de contraste de fase de las hAEC a las dos semanas de cultivo en un medio de diferenciación neural.

El análisis molecular por PCR de los genes *NF-M* que expresa un polipeptido medio de neurofilamentos (*Neurofilament medium polypeptide*) y *MPB* que expresa una proteína básica de mielina (*Myelin basic protein*) evidenció la expresión de RNAm para dichos genes tanto en células cultivadas en medio basal (muestra N° 20) como en las células cultivadas en el medio de diferenciación (muestras N° 5, 16 y 17). (Figura 31)

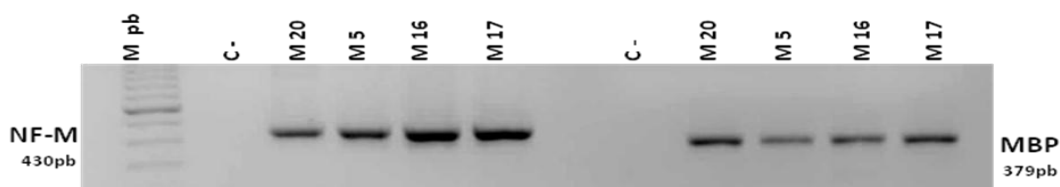


Figura 31. Expresión de RNAm para genes específicos neurales (NF-M y MBP) examinados por PCR en las hAEC cultivadas en DMEM estándar (muestra 20) y en células cultivadas en el medio de diferenciación (muestras 5, 16 y 17).

La evaluación del nivel de expresión de genes por PCR arrays en las células cultivadas en medio de diferenciación neural en comparación con el nivel de las células control con el objeto de tener una visión más amplia del conjunto de genes que pueden modificar su expresión por la diferenciación, evidenció una regulación positiva de los genes *COMP*, *CTSK*, *GAD1*, *KRT19*, *MIOX* y *SFTPD*, particularmente llamativa para los genes *CTSK*, *GAD1* y *MIOX* que aumentaron su expresión entre 10 y 12 veces. Igualmente se evidenció una disminución, en comparación con las células control en la expresión de los genes *AQP1*, *DCN*, *DPP4*, *FGF5*, *HAND1*, *INS*, *PODXL*, siendo la disminución más acentuada para *DCN* (aproximadamente 55 veces). Figura 32.

De los genes regulados positivamente *GAD1* que codifica una de las formas de la enzima decarboxilasa de ácido glutámico participa en la diferenciación neuro-ectodérmica (neuronas GABA), el resto se ha implicado en la diferenciación de endodermo y mesodermo (Ver Tabla 12). Aunque, ello no excluye su participación.

De los genes regulados negativamente, uno es un gen de pluripotencialidad (*PODXL*) y tres son genes de capa germinal (*DCN*, *FGF5* y *HAND*). Esto en principio podría considerarse evidencia de diferenciación pues está de acuerdo con el conocimiento de que

en la medida que las células se diferencian, disminuye la expresión de los genes de pluri y multipotencialidad.

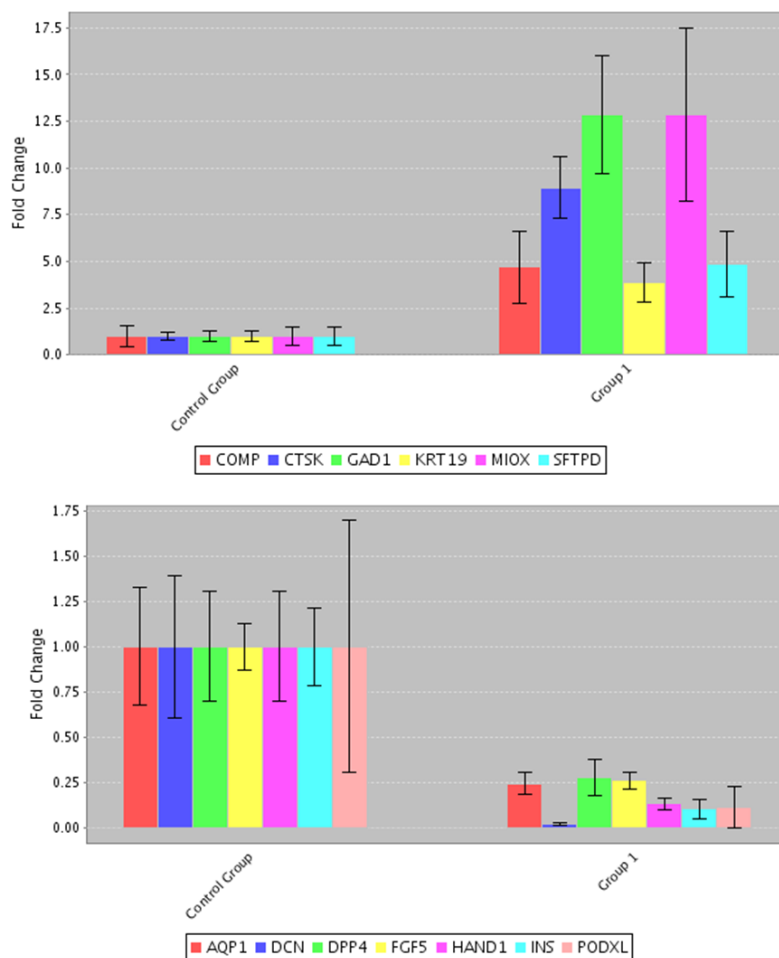


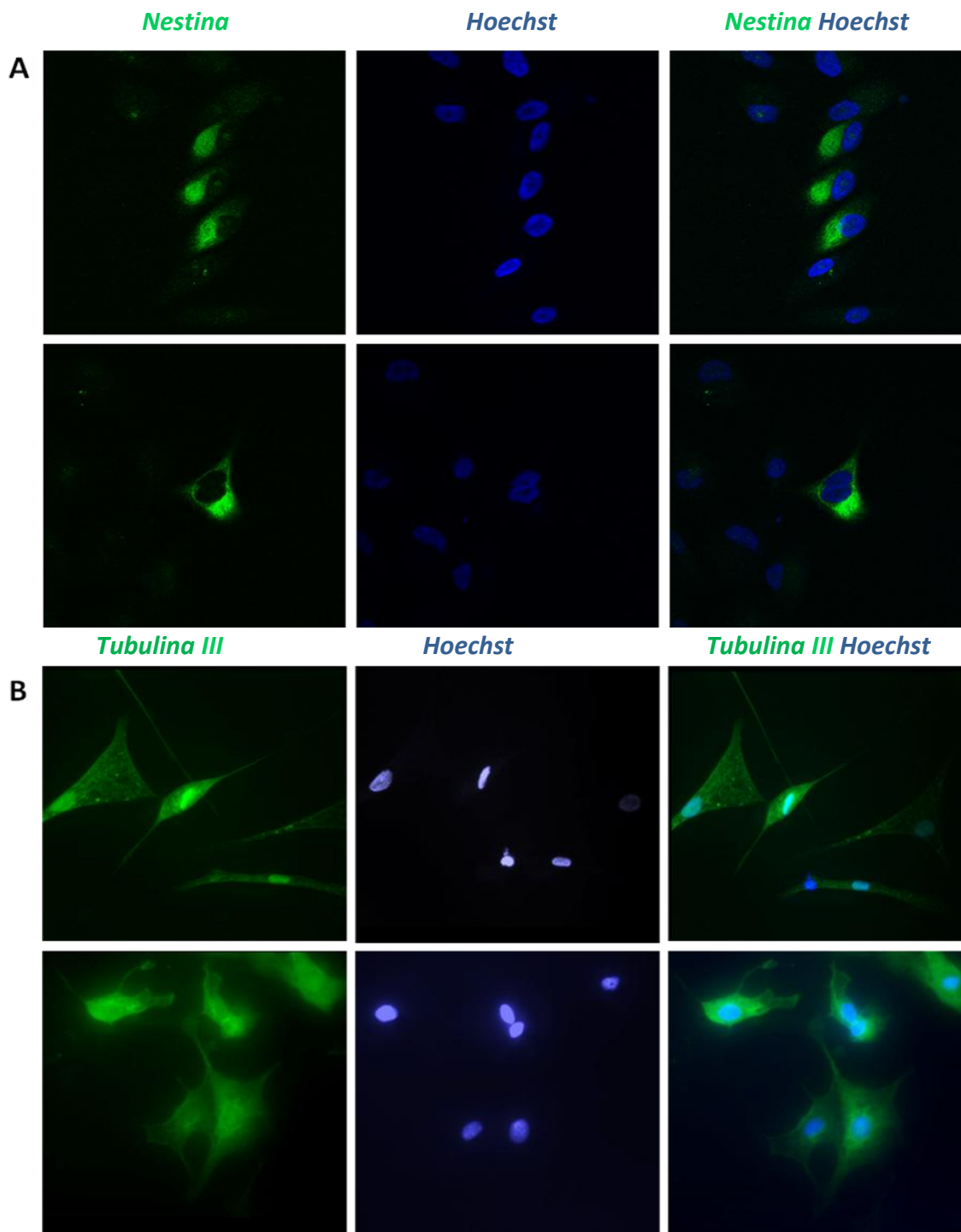
Figura 32. Muestra los cambios en la expresión de genes observados en las células cultivadas en medio neural en relación a las células control.

En las células cultivadas en el medio neural en relación a las células cultivadas en medio estándar, también se observaron cambios en los genes de referencia *HPRT1*, *RPL13A*, *GAPDH*, lo que hizo que tras el estudio de estabilidad solo se mantuvieran como genes de referencia *B2M* y *ACTB*.

Finalmente la evaluación de la diferenciación neural a nivel protéico por inmunofluorescencia evidenció, a las 3 semanas del cultivo, inmunoreactividad evidente



para NES y tubulina III (ambos marcadores neuronales) en el 50% de las células, las cuales mostraron grandes cuerpos centrales o triangulares, con núcleos prominentes y prolongaciones citoplásmicas de diversas longitudes. (Figura 33A y B).



La proteína ácida glial fibrilar (GFAP), un marcador de células astrocíticas, se detectó en la mayoría de las células (97.3%) con prolongaciones citoplásmicas muy largas (Figura 33C).

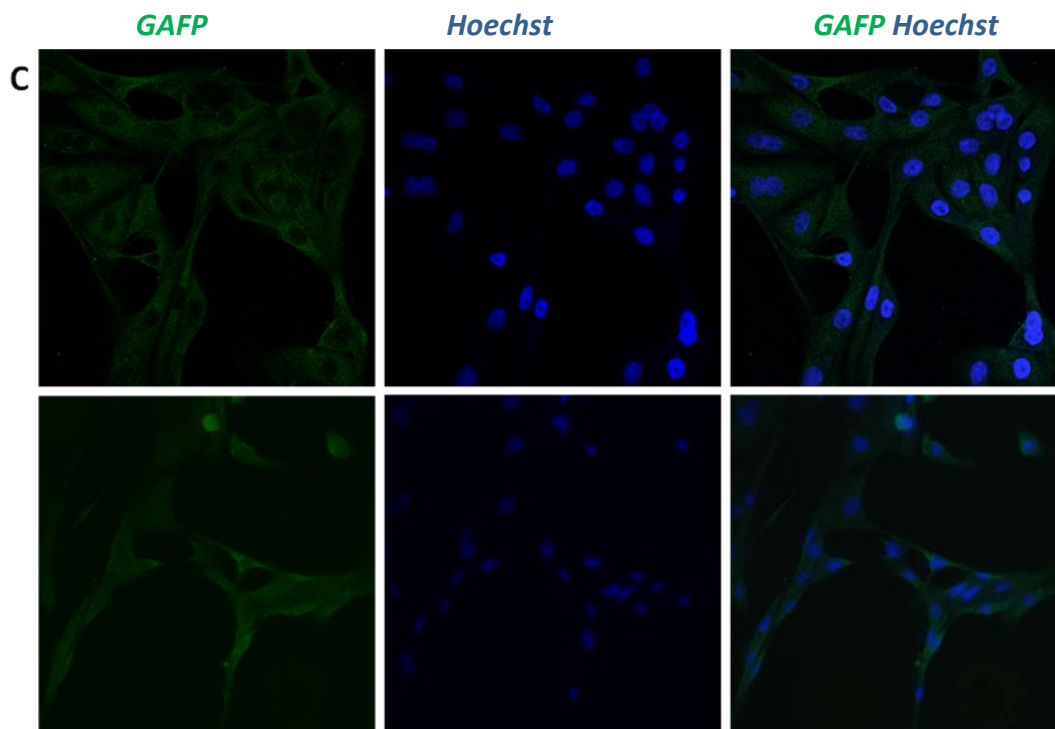


Figura 33. Diferenciación Neural *in vitro* de las hAEC evidenciada por inmunotinción (A) Nestina, (B) Tubulina III, (C) Proteína Ácida Fibrilar Glial.

Ninguna de las inmunotinciones resultó positiva en las células cultivadas en medio basal, siendo el resultado típico el que se representa en la Figura 34.

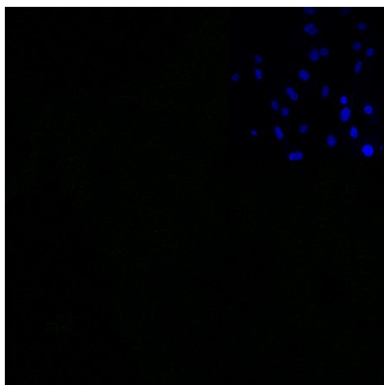
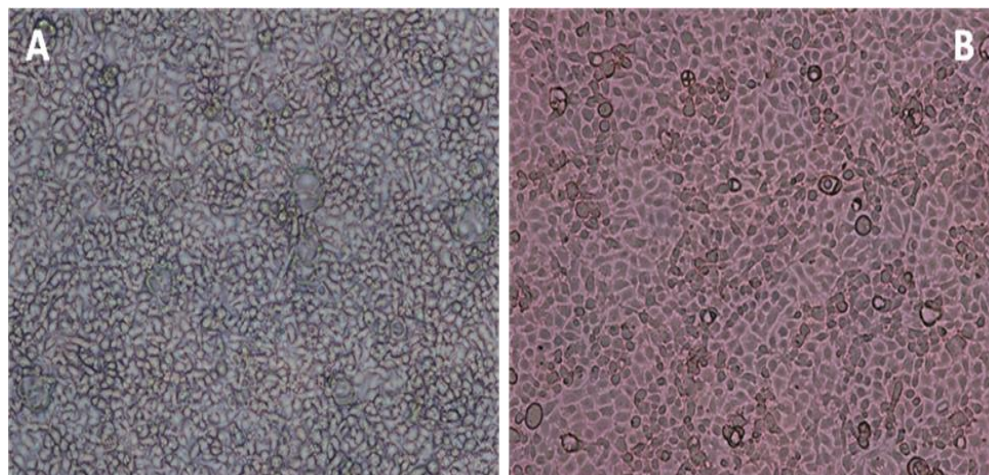


Figura 34. Representa la imagen de un estudio negativo por inmunofluorescencia.

A pesar de que no se dispone de una correlación entre los marcadores que se estudiaron a nivel molecular y los estudiados a nivel proteico, el conjunto de resultados indica que bajo estas condiciones de cultivo las hAEC expresan marcadores de neuronas y de células gliales y ello sugiere la diferenciación hacia esa estirpe tisular.

**2.10.2 Diferenciación hepatocítica:** Al igual que para la diferenciación neural, investigamos esta diferenciación por estudios moleculares y proteicos, y realizamos observación directa de los cultivos celulares al microscopio de contraste de fase. A través de esta observación pudimos detectar, alrededor de la 3ª semana de cultivo, unas células grandes poligonales, con núcleo central o bilobulado, formando una especie de cordones alineados que recordaban la apariencia morfológica y la distribución de los hepatocitos en el parénquima hepático (Figura 35A y B). Estos cambios coinciden con los observados por otros investigadores en la generación de células hepatocíticas a partir de las ESC y las iPS, y particularmente con los que presentan Miki y col. (67) (Figura 35C).



*Figuras 35 A y B. Muestran la apariencia morfológica en microscopio de contraste de fase de dos muestras de hAEC a las tres semanas de cultivo en un medio de diferenciación hepatocítica.*

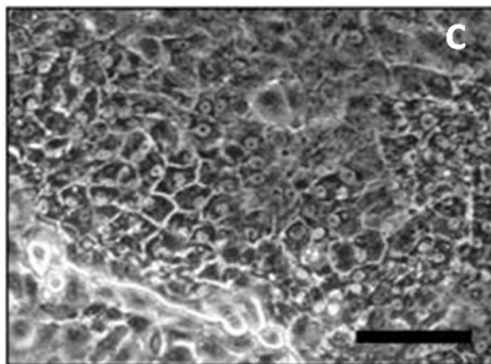


Figura 35 C. Muestra la apariencia morfológica en microscopio de contraste de fase de 1 muestra de hAEC a las 28 días de cultivo en un medio de diferenciación hepatocítica. Tomada de Miki y col (2005).

Los estudios por PCR evidenciaron la presencia de RNAm para albúmina y HNF-4 tanto en las células cultivadas en DMEM estándar (muestra N°20) como en las cultivadas en el medio de diferenciación (muestras N° 16, 17, 18 y 19). Aunque la PCR no es la técnica para evaluar el nivel de expresión, pareciera claro que en la muestra N° 20 no diferenciada, la expresión del RNAm para ambos transcritos fue más débil (Figura 36). Como se ha señalado HNF-4 es un factor de transcripción clave para la expresión de genes endodérmicos. Se asume que la expresión de este factor de transcripción contribuye a la adquisición de un fenotipo parecido a hepatocitos por parte de las hAEC (83).

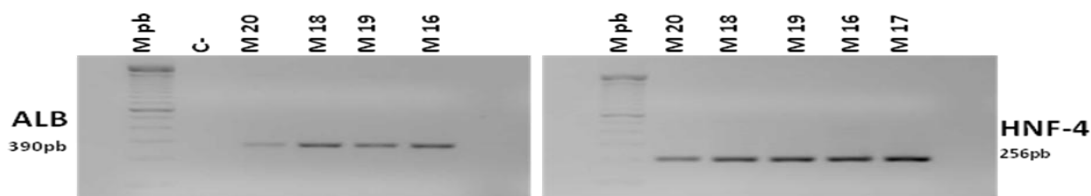


Figura 36. Evidencia la expresión de RNAm para genes específicos hepáticos (albúmina y Factor Nuclear Hepático-4) examinada por PCR en muestras de hAEC cultivadas en medios de diferenciación hepática (18, 19, 16 y 17) y en una muestra cultivada en DMEM estándar (20).

Los estudios por PCR array de la expresión de genes en hAEC en las células cultivadas en medio de diferenciación hepático en comparación con las células control,

evidenciaron cambios significativos ( $p < 0.05$ ) en la expresión de 11 genes. (Figura 37), 10 de ellos con disminución de su expresión. Antes de analizar el posible significado de estos cambios, es importante señalar que en el desarrollo evolutivo se ha descrito un estado intermedio entre el mesodermo y el endodermo llamado mesoendodermo que es un tejido bipotencial que da origen tanto al mesodermo como en endodermo (87). La diferenciación de las células mesoendodérmicas se acompaña de una disminución en la expresión de los genes marcadores de células madre y un incremento en la expresión de genes mesoendodérmicos. Es llamativo que de los 10 genes que disminuyeron su expresión, tres corresponden a genes de pluripotencialidad (*DNMT3B*, *PODXL* y *POU5F1*). El único gen que mostró un aumento significativo en su expresión (3.5 veces) en las células cultivadas en el medio de diferenciación en relación a las células control fue el gen *DCN*, involucrado en el desarrollo de la capa germinal mesodérmica a través de la codificación de la proteína decorina que es un componente importante de la matriz extracelular, que además ayuda a regular el crecimiento y la división celular. No sabemos si, a pesar de que el hígado se origina de la capa endodérmica, requiere inicialmente la participación de genes mesodérmicos. Algunos investigadores consideran que la diferenciación *in vitro* de las hAEC hacia células de linaje endodérmico, específicamente hígado se benefician de una diferenciación primara hacia meso-endodermo y por ello agregan de manera progresiva los factores de crecimiento utilizados en los medios de cultivo (87). Los genes *HAND1* y *RUNX1*, también son de capa germinal mesodérmica pero participan fundamentalmente en la cardiogénesis y la hematopoyesis respectivamente. El resto de genes, mayoritariamente de línea endodérmica diferenciada, disminuyó su expresión.

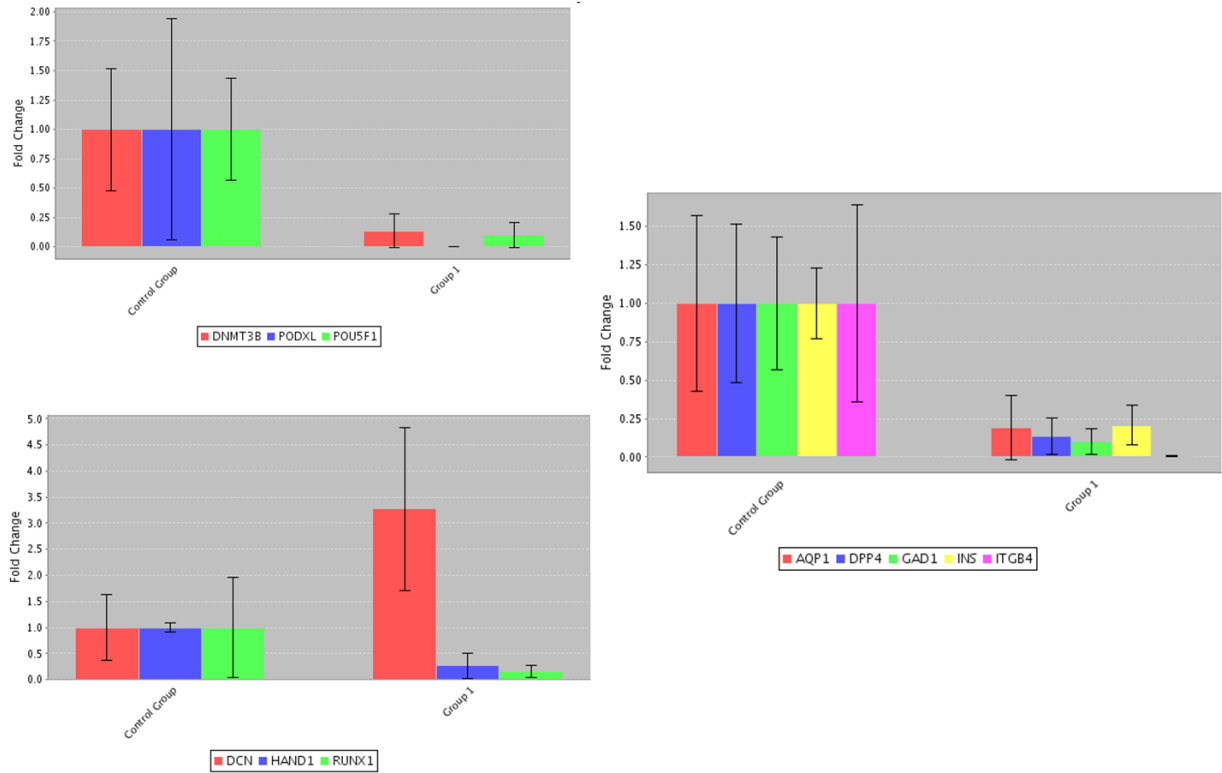


Figura 37. Representa los cambios observados en la expresión de genes por PCR array en tres muestras cultivadas en medio de diferenciación hepática en relación a tres muestras cultivadas en medio estándar

A diferencia de lo que ocurrió con el medio de diferenciación neural, donde los genes de control *B2M* y *ACTB* mantuvieron estabilidad durante el cultivo, evidenciada por una *M* cercana a la unidad, el medio de diferenciación hepática indujo cambios en la expresión de estos genes por lo que fueron excluidos como genes de referencia, quedando solo *HPRT1*, *RPL13A* y *GAPDH*.

La investigación por inmunofluorescencia de los cambios inducidos por el medio de diferenciación hepática a nivel protéico reveló positividad para dos de los tres marcadores investigados: albúmina y CK 8/18, en ningún caso se observó inmunoreactividad para la  $\alpha$ FTP. La albúmina pudo visualizarse en el citoplasma de la mayoría de las células con heterogeneidad en el patrón de reactividad, en algunas la positividad parecía remarcar la

membrana celular destacando la apariencia poligonal de las células, en otras, parecía localizarse alrededor del núcleo, esto es muy parecido a lo que comunican Takashima y col. (83) (Figura 38 y 39). La positividad para la CK 8/18 se observó prácticamente en todas las células. (Figura 40). Ninguna de las células cultivadas en medio basal resultó positiva para las inmunotinciones señaladas.

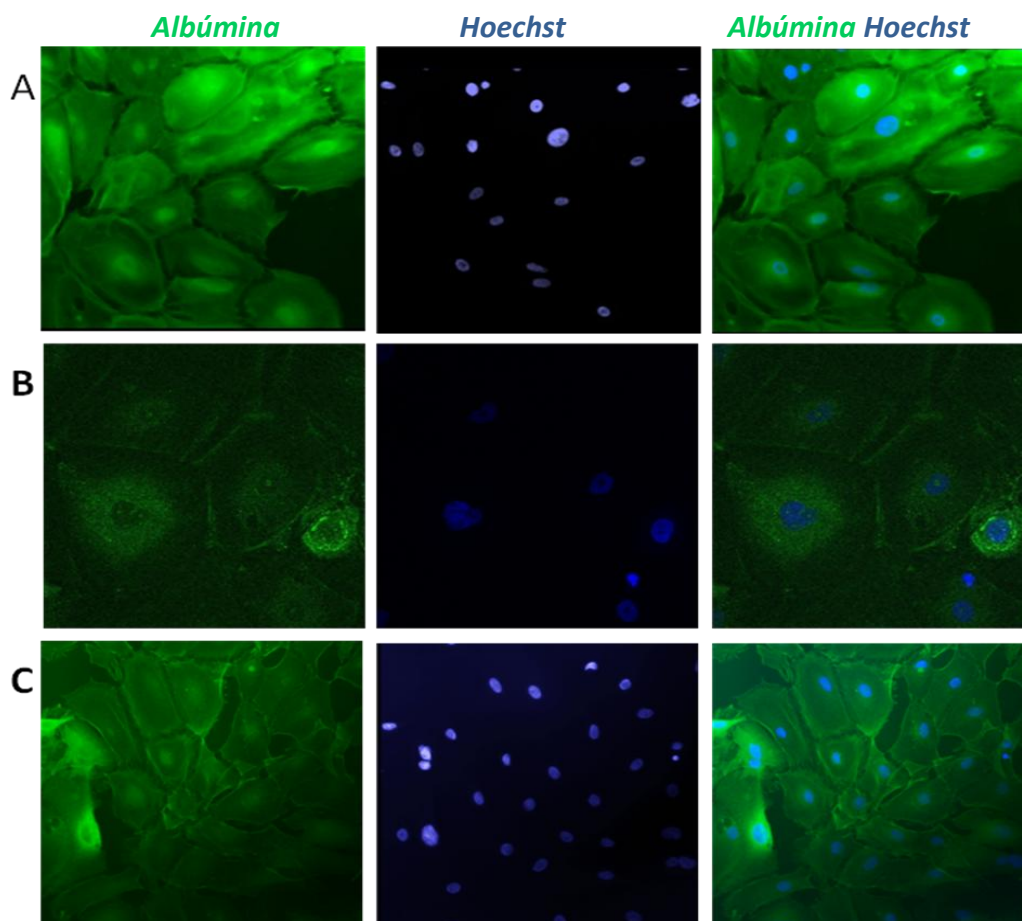


Figura 38. Diferenciación hepatocítica *in vitro* de las hAEC evidenciada por inmunotinción con anti-albúmina humana e IgG anti-albúmina conjugada a FITC. Núcleos coloreados con Hoechst 40X.

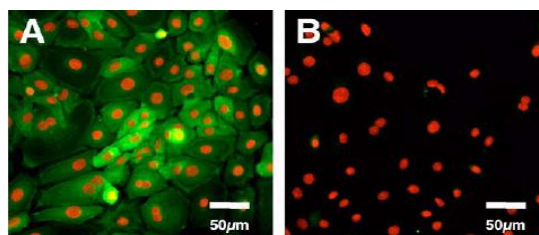


Figura 39. Diferenciación hepatocítica *in vitro* de hAEC detectada por anti-albúmina y secundario conjugado a FITC. Núcleos coloreados con yoduro de propidio. Tomado de Takashima y col (2004).

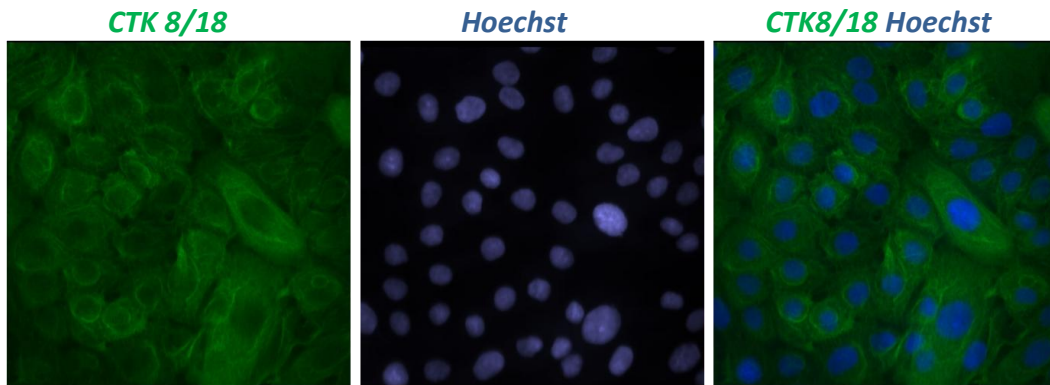


Figura 40. Diferenciación hepatocítica de las hAEC evaluada a través de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti Anti CTK8/18.

**2.10.3 Diferenciación cardio-miocítica:** En los cultivos celulares evaluados por contraste de fase entre las 2 y 3 semanas, no se observaron cambios morfológicos sugestivos de diferenciación cardiomiocítica, solo algunas células alargadas que parecían establecer contactos entre ellas a través de filamentos.

Los estudios por PCR evidenciaron la expresión de RNAm para los genes de las cadenas ligeras de miosina atriales y ventriculares (MLC2A y MLC2V) (ambos marcadores de cardiomiocitos tempranos), tanto en las células cultivadas en DMEM estándar (Muestra N°12), como en las células cultivadas en el medio de diferenciación (Muestras N° 14 y 15).

Figura 41.

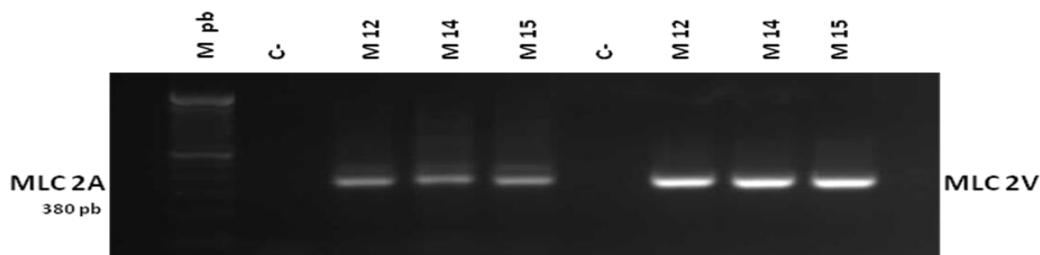


Figura 41. Muestra la expresión por PCR de genes específicos de cardiomiocíticos (MLC2A y MLC2V) en 3 muestras de hAEC: 2 cultivadas en el medio inductor (14 y 15) y 1 (12) en DMEM estándar.



La investigación por PCR array de los cambios en el nivel de expresión de los genes de las células cultivadas en el medio de diferenciación cardíaca en relación a las células control evidenció un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la expresión del gen *HAND2* (3 veces superior al control), y una disminución igualmente significativa en la expresión del gen *INS*. (Figura 42).

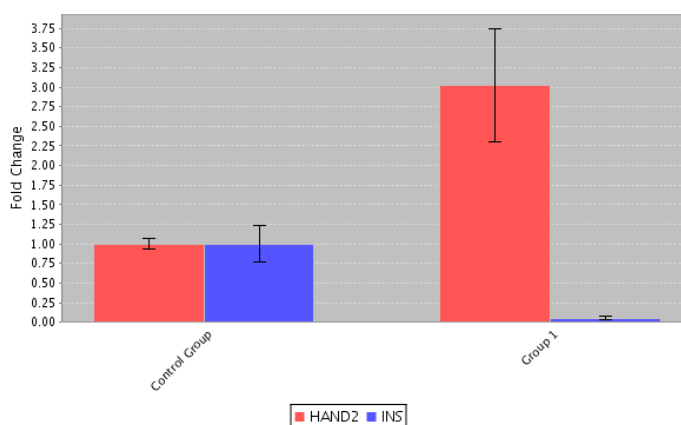


Figura 42. Representa los cambios observados en la expresión de genes por PCR array en tres muestras cultivadas en medio de diferenciación cardíaca en relación a tres muestras cultivadas en medio estándar

*HAND2* es un gen que se expresa en los progenitores mesodérmicos comisionados hacia cardiomiocitos justo antes de que se expresen los cardiomiocitos tempranos. Es posible que su mayor expresión en las células cultivadas en relación al grupo control, sea debido al efecto inductor de diferenciación cardiomiocítica del medio utilizado. No sabemos si la regulación negativa del gen *INS* forma parte de este proceso de diferenciación.

El aumento en la expresión del *ACTB*, conjuntamente con los genes de referencia *RPL13A* y *GAPDH* determinó que no pudieran utilizarse como genes controles. Solo se utilizaron los genes *B2M* y *HPRT1* que mostraron la menor medida M (0.61).

Los análisis por inmunofluorescencia detectaron la expresión de  $\alpha$  actinina tanto en la periferia como en el cuerpo celular. (Figura 43). En ninguna de las células se observó la coloración sarcomérica de la actinina que ha sido observada por otros investigadores en la diferenciación cardiomiocítica de células de MO, pulpa dental y membranas fetales (101).

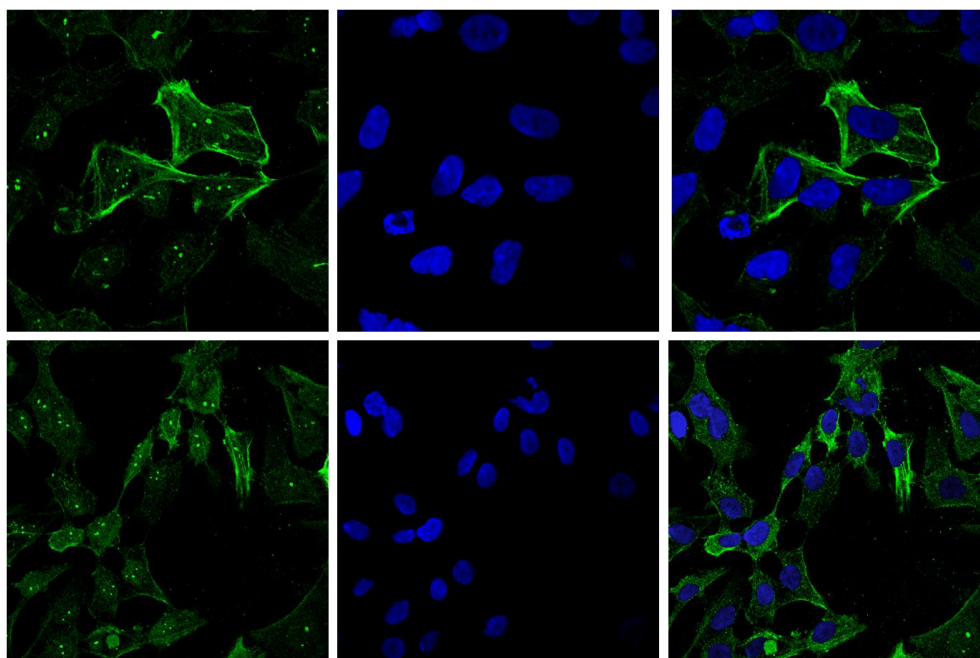


Figura 43. Diferenciación cardiomiocítica *in vitro* de las hAEC cultivadas en medio inductor. Imagen inmunofluorescente con un anticuerpo anti- $\alpha$  actinina (FITC) 20X. Núcleos coloreados con Hoechst.

**2.10.4 Diferenciación osteogénica:** Se evaluó en las hAEC tras 3 semanas en cultivo en el medio de inducción OsteoDiff®, por la medición colorimétrica de la actividad de la fosfatasa alcalina y por la coloración de los depósitos de calcio con el Alizarin red. Ocho de las 20 muestras investigadas (40%) revelaron una tinción positiva para la fosfatasa alcalina y de estas solo 5 (5/20: 25%) mostraron algunos depósitos óseos mineralizados detectados por el colorante Alizarin Red. (Figura 44A y C). Los controles negativos de las hAEC cultivadas en DMEM estándar se observan en la Figura 44B y D.

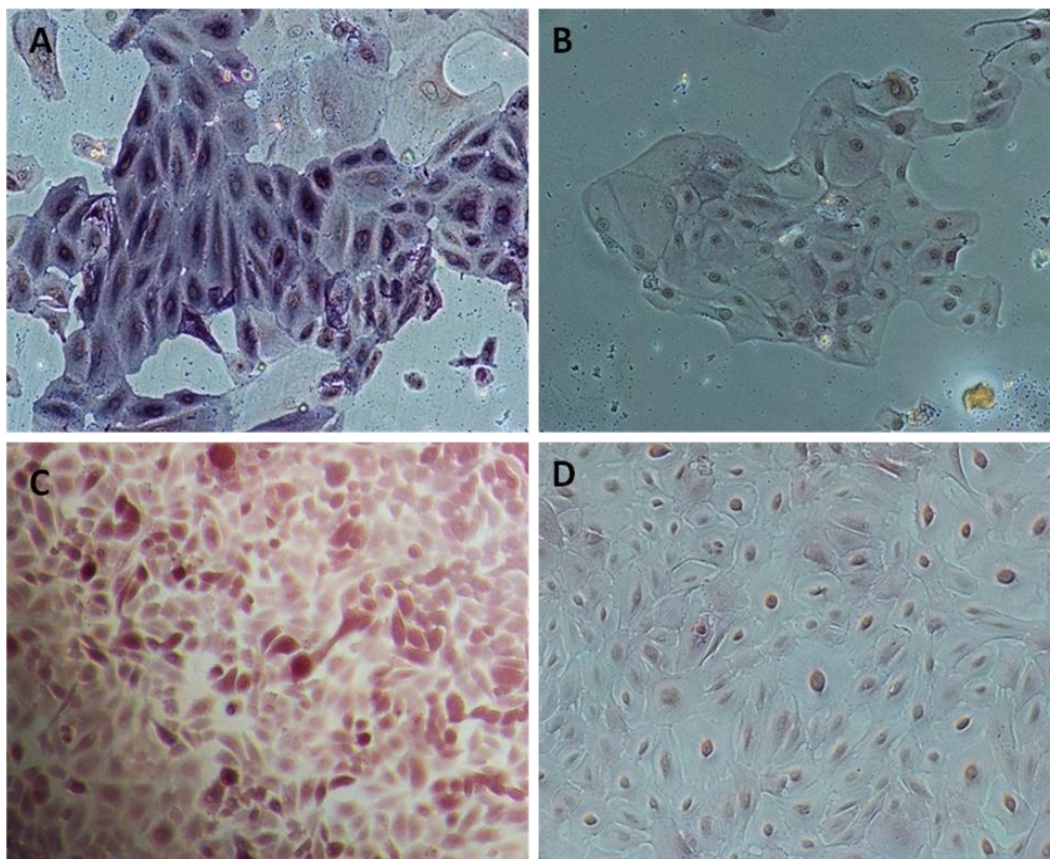


Figura 44. Diferenciación osteogénica evaluada por tinción de Fosfatasa alcalina: (A) Reacción positiva: la coloración púrpura que se observa tras añadir el sustrato de Nitro Blue Tetrazolium indica la actividad de la fosfatasa alcalina, y por tinción de Alizarín Red: (C) Reacción positiva. (B) y (D) Controles Negativos para ambas tinciones, hAEC cultivadas en DMEM estándar.

**2.10.5 La diferenciación adipogénica de las hAEC** utilizando el medio de inducción adipocítica AdipoDiff®, al igual que lo observado en la diferenciación osteogénica fue negativa en la mayoría de las muestras investigadas. Sólo en 6 de 20 muestras (30%), pudo observarse, al cabo de 4 semanas de cultivo, escasas células con grandes vacuolas cargadas de lípidos en su citoplasma que se colorearon de rojo o naranja oscuro con el colorante Oil Red (Figura 45A). Las células cultivadas en DMEM estándar conservaron su morfología y no demostraron acumulación de lípidos en el citoplasma (Figura 45B).

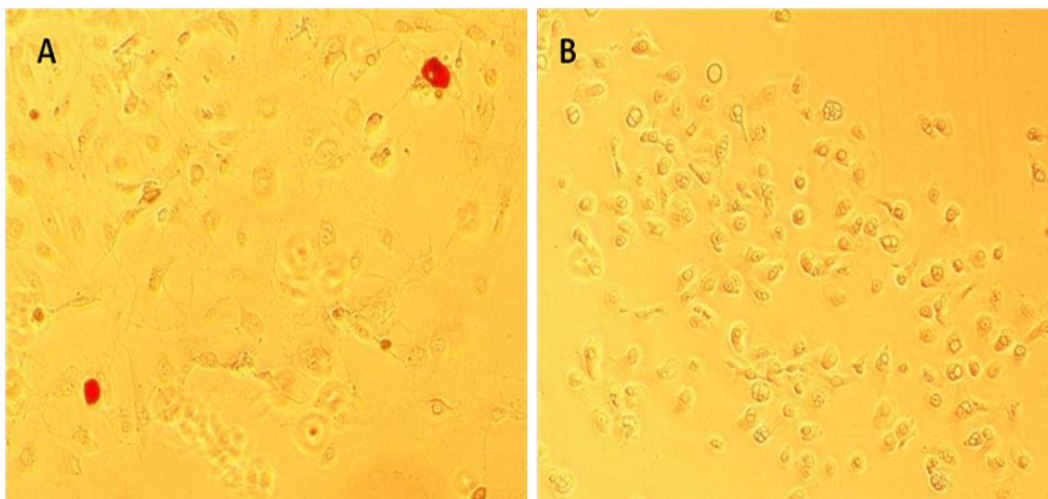


Figura 45. Diferenciación adipocítica evaluada por tinción de Oil red: (A) Reacción positiva débil. (B) Control Negativo: células cultivadas en medio basal.

**2.10.6 La diferenciación condrogénica de las hAEC** utilizando el medio de inducción condrocítico ChondroDiff Miltengy® fue negativa en todas las muestras investigadas, tanto por el método de coloración de proteoglicanos con el azul de alciano como por el método de detección del calágeno II por inmunofluorescencia (Figura 46A y C). Los controles positivos procedentes de MSC obtenidas de MO diferenciadas a condrocitos se presentan en las Figura 46B y D).

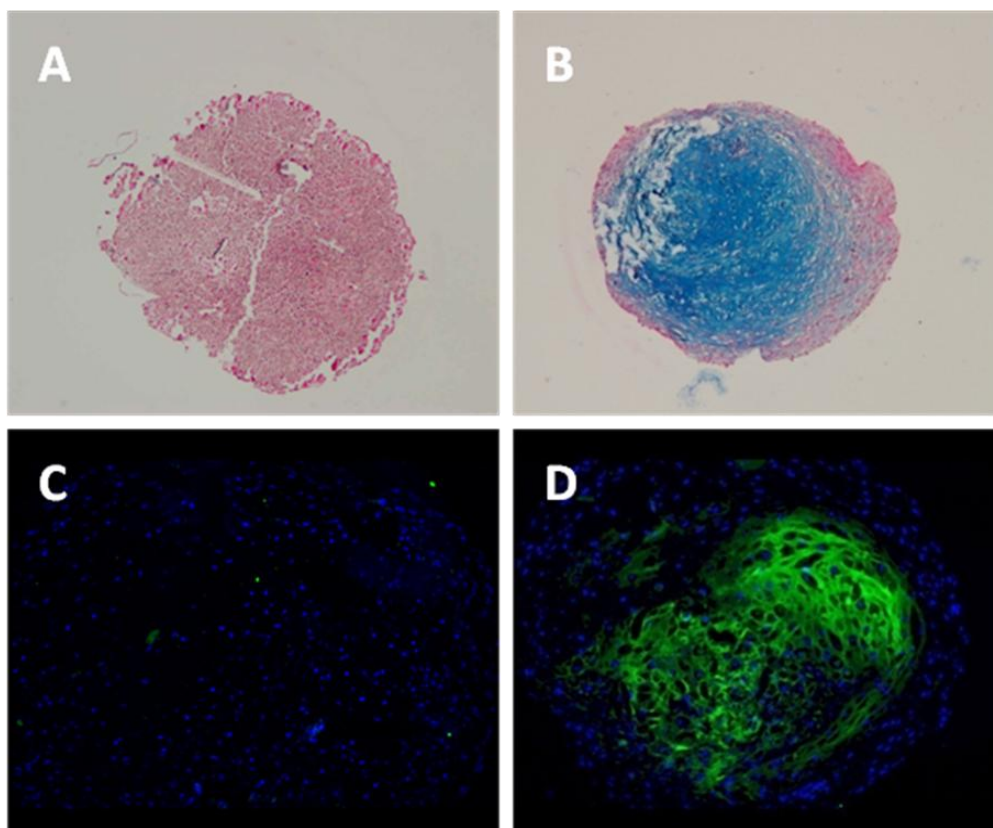


Figura 46. La diferenciación condrogénica de las hAEC evaluada por la tinción de Alcian bue (A) y por inmunofluorescencia con anti-colágeno II (C) fue negativa en ambos casos. (B y D) representan controles positivos obtenidos tras la diferenciación condrogénica de MSC

### 3. CÉLULAS MESENQUIMALES DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA (hAMSC).

**3.1 Recuento, viabilidad y cultivo de las células aisladas del mesodermo amniótico:** Tras la des-epitelización de la MA y subsecuente tratamiento con collagenasa y DNasa, siguiendo el protocolo de aislamiento celular señalado en la metodología, de las 12 membranas procesadas en su totalidad se obtuvo un promedio de  $5.3 \times 10^6$  células/membrana, con un rango de  $4.82 \times 10^6$ - $7.2 \times 10^6$  y una viabilidad de 76% (rango 66% - 87%). Tabla 21

Tabla 21. Células aisladas del Mesodermo Amniótico

M.A (n 12)	Promedio	Rango
Exposición Colagenasa	90 min	-
Nº Cél obtenidas	$5.3 \times 10^6$	$4.82 \times 10^6$ - $7.20 \times 10^6$
Viabilidad MA	76%	66% a 87%

Esta células se cultivaron a una densidad de  $1.0 \times 10^5$  células /cm<sup>2</sup> en F de 25 cm<sup>2</sup> en DMEM suplementado con 20% de SBF, 5 ml 200 mM de L-glutamina, 5 ml de solución de antibióticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml estreptomina), observándose alrededor de los 8 días una población incipiente de células adherentes, predominantemente de apariencia fibroblastoide, morfológicamente muy parecidas a las células fibroblastoides que se obtienen cuando se siembra la capa de células mononucleadas separadas por ficoll de los aspirados de médula ósea (MO). Entre las células fibroblastoides también podían observarse unas células muy escasas, planas, redondeadas de apariencia epitelial que ya se visualizaban desde los días previos y que correspondían a las pocas células epiteliales residuales presentes en las preparaciones de células estromales, con lo cual los cultivos primarios tenían una apariencia algo heterógena. Inicialmente las células fibroblastoides se observaron como células aisladas o formando pequeñas colonias de 3 a 6 células, y en los días siguientes aumentaron en número y tamaño, adquiriendo una apariencia aplanada, alargada o poligonal con un número variable de extensiones citoplasmáticas, núcleos ovales y nucléolos en número de 2 a 4. Esta morfología se mantuvo igual durante

el tiempo del cultivo primario y como veremos más adelante, también durante los subcultivos. La Figura 47 muestra la apariencia de estas células en los cultivos antes de adquirir confluencia (A) e iniciando confluencia (B).

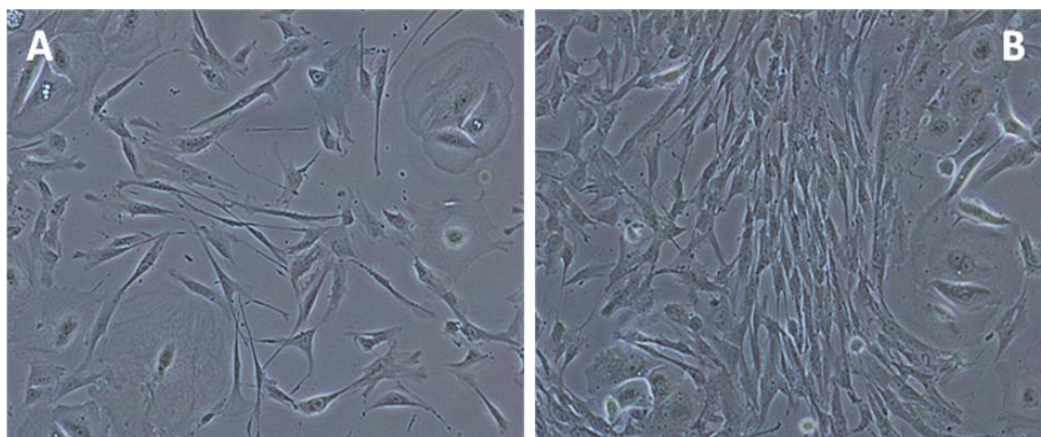


Figura 47. Células adherentes obtenidas del cultivo en DMEM de las células aisladas del mesodermo amniótico (A) Cultivo sub-confluyente y (B) Cultivo con confluencia 60% aproximadamente.

En 15 de las 20 membranas procesadas (75%), las células obtenidas alcanzaron confluencia en un promedio de 29.6 días con un rango de 23 a 36 días. En 3/20 MA (15%) el proceso se inició en algunas células pero se detuvo irreversiblemente y en 2/20 MA (10%) las células adherentes nunca aparecieron. Esto representa una eficiencia en la obtención de células adherentes a partir del estroma de la MA de 75%. Al momento de alcanzar confluencia, el promedio de células adherentes obtenidas por frasco de cultivo fue de  $225.6 \times 10^3$  con un rango de  $187.0 - 294.0 \times 10^3$ . La viabilidad estimada por el método de exclusión del azul de tripán fue siempre mayor de 80% (Tabla 22). A partir de estas células adherentes se realizaron dos sub-cultivos, utilizando como medio DMEM con SBF al 10% y el resto de suplementos, obteniéndose una población de células mesenquimales homogénea, libre de las escasas células epiteliales observadas en el cultivo primario.

**Tabla 22. Células adherentes obtenidas por cultivo de las células aisladas del Mesodermo Amniótico**

Nº	Céls sembradas /cm <sup>2</sup> F 25	Confluencia días	Obtención Céls adherentes X10 <sup>3</sup>	Viabilidad %
1	1x10 <sup>5</sup>	32	219	87
2	1x10 <sup>5</sup>	29	191	89
3	1x10 <sup>5</sup>	23	246	90
5	1x10 <sup>5</sup>	35	187	89
5	1x10 <sup>5</sup>	36	216	91
6	1x10 <sup>5</sup>	21	248	86
7	1x10 <sup>5</sup>	28	292	89
8	1x10 <sup>5</sup>	29	190	92
9	1x10 <sup>5</sup>	33	221	86
10	1x10 <sup>5</sup>	31	202	91
11	1x10 <sup>5</sup>	34	294	85
12	1x10 <sup>5</sup>	29	192	84
13	1x10 <sup>5</sup>	25	298	87
14	1x10 <sup>5</sup>	27	199	83
15	1x10 <sup>5</sup>	28	190	82
media (rango)	1x10 <sup>5</sup>	29.3 (23-36)	225.6 (187-294)	87.4 (82-92)

### 3.2 Capacidad de Expansión *in vitro* de las hAMSC.

La población de células mesenquimales se sembró a una densidad de 1.0x10<sup>3</sup> cél en F 75 bajo las mismas condiciones de cultivo e incubación previamente señaladas y se



realizaron pases sucesivos para evaluar la capacidad de expansión. El número promedio de hAMSC obtenidas tras cada pase y el tiempo en que se realizó se presenta en la Tabla 23.

**Tabla 23. Expansión *in vitro* de las hAMSC**

Nº	Células despegadas X10 <sup>3</sup> . Valores medios											
	P1 días		P2 días		P3 días		P4 días		P5 días		P6 días	
1	1180	9	1330	8	1259	7	1135	11	1048	7	1225	9
2	959	10	1250	9	1228	8	1196	9	1338	8	1231	9
3	840	10	1194	10	1248	9	1332	9	1237	10	1614	8
4	1200	8	1326	7	1165	9	1254	10	1429	9	1241	9
5	1056	11	1234	9	1322	7	1283	8	1406	7	1302	8
6	972	10	1027	7	1137	8	1289	11	1334	8	1400	9
7	1014	9	1002	10	997	9	1144	8	1421	7	1245	8
8	1150	8	1359	7	1264	8	1300	6	1196	8	1073	9
9	1090	8	1120	7	1270	7	1380	9	1295	7	1462	10
10	988	9	1480	8	1422	8	1084	10	1343	9	1298	8
11	1290	9	1166	8	1232	6	1462	8	1354	8	1300	7
12	956	9	1197	11	1202	8	1316	8	1259	8	1471	6
13	1113	9	1014	8	1002	8	1150	10	1344	7	1679	8
14	1028	8	990	9	1266	10	1180	8	1312	6	1275	7
15	1244	9	1142	8	1348	7	1243	8	1390	8	1477	7
<b>Media</b>	<b>1072.0 ±32.0</b>		<b>1188.7 ±37.6</b>		<b>1224.1 ±29.5</b>		<b>1249.8 ±26.5</b>		<b>1313.7 ±25.5</b>		<b>1352.8±41.7</b>	
	<b>9.0</b>		<b>8.4</b>		<b>7.9</b>		<b>8.8</b>		<b>7.8</b>		<b>8.1</b>	

Siembra 1.0x10<sup>3</sup>. F75

Es evidente que la cantidad de células despegadas tras cada pase no muestra diferencias significativas, y que el tiempo en que se obtuvo la confluencia necesaria para realizar cada pase tampoco evidenció mayores variaciones, esto revela que las hAMSC mantienen su capacidad de expansión a través de los pases y que cuando se realizan subcultivos en proporciones subconfluentes con ratios de 1:2, 1:3, 1:4, etc., se logra amplificar la población celular y obtener un número acumulado de células elevado. Por razones operativas en todas las células se realizaron subcultivos hasta el P6, pero en 3 de las 15 muestras estudiadas se continuaron hasta el P15 para evaluar las características de las células. El número de células obtenido en cada subcultivo fue similar al obtenido en los pases iniciales. Sin embargo, a partir de los P13 y 14 se observó disminución de la proliferación celular y las células mostraron una apariencia grande y aplanada, con bordes irregulares, algo desflecados y un citoplasma de aspecto fibroso (Figura 48A y B), similar a la morfología que ha sido descrita como típica de células envejecidas o senescentes por algunos investigadores (93). Además en el cultivo se apreciaron células flotantes que no se adherieron al frasco de cultivo.

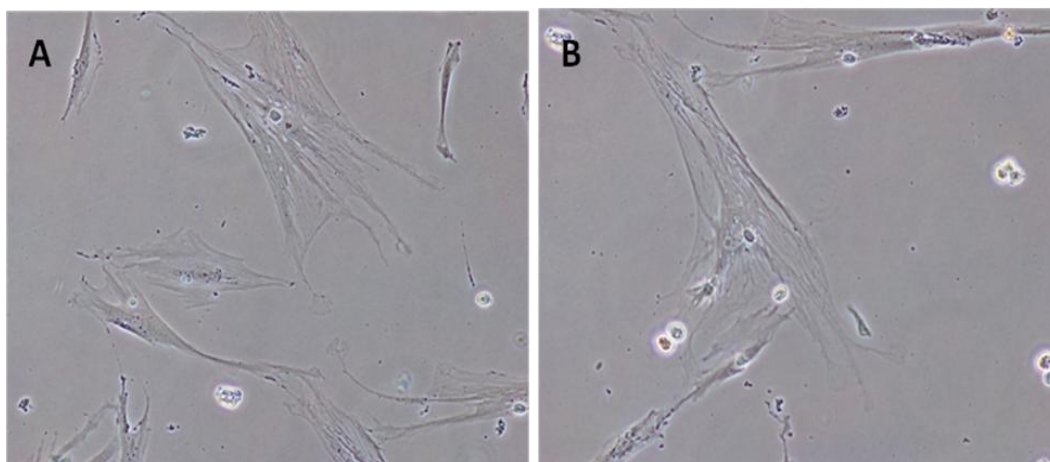


Figura 48. (A y B) hAMSC en P14. Apariencia senescente

### 3.3: Proliferación de las hAMSC.

La capacidad de proliferación de las hAMSC en P0 se estudió a través de dos métodos diferentes: uno, en el cual las células se sembraron a una densidad de  $1.0 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en DMEM estándar en 12 frascos de 25 cm<sup>2</sup> durante 21 días y se realizaron recuentos celulares en cámara de Neubauer por duplicado los días 4, 7, 11, 14, 17 y 21; y otro, en el cual la capacidad de proliferación se evaluó por el método del MTT. La Tabla 24 recoge la data de la proliferación celular evaluada por recuento celular y la Figura 49 representa gráficamente dichos valores.

**Tabla 24. Proliferación celular de las hAMSC evaluada por recuento celular.**

Nº MA	Cél despegadas x 10 <sup>3</sup>					
	4 días	7 días	11 días	14 días	17 días	21 días
1	125	210	710	920	1188	1028
2	110	360	620	1070	1100	950
3	120	302	701	1050	1280	1300
4	108	196	532	726	881	947
5	113	225	640	906	1230	1300
6	128	263	761	814	1212	1034
7	124	235	668	926	1132	1130
8	116	302	787	961	1018	1174
9	137	285	544	890	1345	1018
10	136	301	735	1044	1086	1002
11	129	307	654	919	1068	1098
12	123	299	699	1049	1179	1254
13	119	307	802	798	1123	1188
14	118	286	691	1054	1257	1117
15	109	277	599	958	1488	1290
Media	121.0±2.3	277.0±11.3	676.2±20.7	939.0±26.9	1172.4±37.1	1122.0±32.2

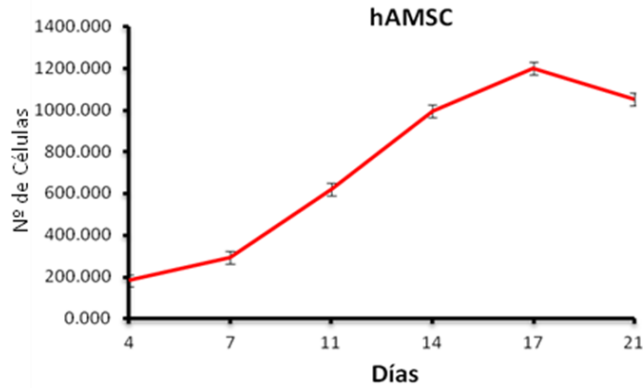


Figura 49. Curva de proliferación de las hAMSC en PO evaluada por recuento celular. Resultados expresados como valores medios $\pm$ ESM.

En ambas se evidencia que las hAMSC mostraron el mayor incremento de su población entre los días 7 y 17, y que a partir de allí hasta el último día de evaluación comenzaron a disminuir probablemente por un freno en la proliferación determinado por el contacto célula- célula.

En la curva de proliferación celular evaluada por el método de MTT se aprecia igualmente que las células muestran una actividad proliferativa baja en los primeros 4 días, seguida de un incremento exponencial detectado espectrofotométricamente por el aumento en la conversión del MTT a formazán por las células proliferantes; entre los días 17 y 21 la curva muestra una fase de plateau, expresión de baja proliferación celular. Figura 50.

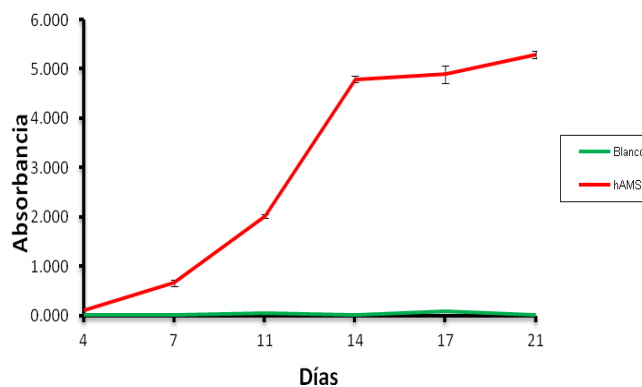


Figura 50. Curva de proliferación de las hAMSC en PO evaluada por el método MTT. Resultados expresados como valores medios $\pm$ ESM.

### 3.4 Análisis del Ciclo celular:

Las hAMSC en P0 y P4 mostraron resultados similares. En el P0 en promedio 70.52% de las células se encontraba en fase G0/G1 (de reposo o pre-síntesis), 19.22% en fase G2/M (post-síntesis o de mitosis) y 11.26% en fase de síntesis. En el P4, tras varias duplicaciones de la población celular y conservación de un contenido diploide de ADN, el 64.99% se encontraba en fase G0/G1, 21.54% en fase G2/M y 13.47% en fase de síntesis (Figura 51A y B). Esto es una ratificación de que las hAMSC mantienen su capacidad de proliferación y expansión a través de los pases y de que es posible acumular un gran número de ellas tras los sub-cultivos.

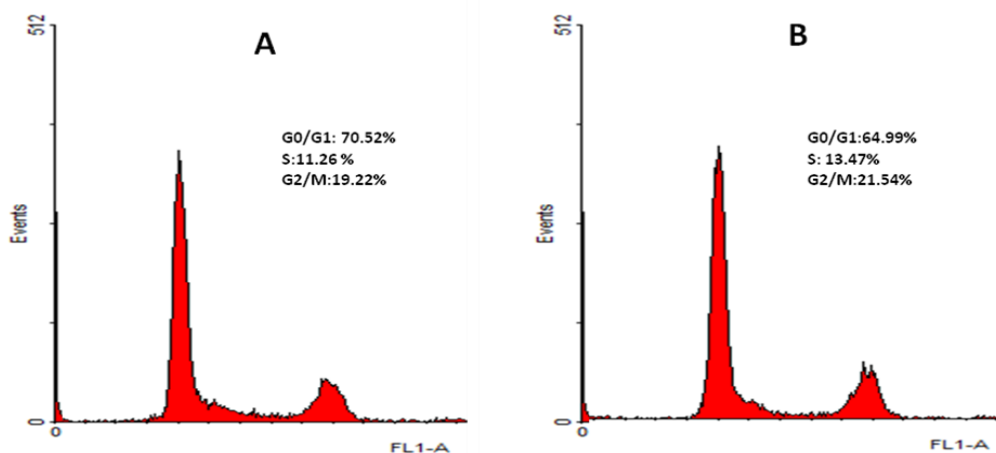


Figura 51. Histograma del Ciclo Celular de hAMSC en Pase 0 (A) y en Pase 4 (B).

### 3.5 Clonogenicidad:

Las hAMSC sembradas a una densidad  $1 \times 10^2$  céls/cm<sup>2</sup> en placas de 28 cm<sup>2</sup> mostraron una eficiencia clonogénica superior a las hAEC sembradas a una densidad diez veces mayor. En total se produjo un promedio de 233.9 UFC-F (con 50 ó más células) por placa, y la eficiencia clonogénica fue de 8.1 (rango: 3.6-10.7). Tabla 25

Tabla 25. Capacidad Proliferativa de las hAMSC medida por el Nº de CFU-F

Nº	Total CFU-F / placa	(Total CFU-F / Cels sembradas) X100	Nº	Total CFU-F / placa	(Total CFU-F / Cels sembradas) X100
1	188	6.7	9	302	10.7
2	296	10.5	10	288	10.2
3	215	7.6	11	178	6.3
4	248	8.8	12	246	8.7
5	162	5.7	13	265	9.4
6	280	10	14	276	9.8
7	103	3.6	15	266	9.5
8	196	7.0			
Media (rango)	233.9 ±14 (103-302)		8.3±0.53 (3.6-10.7)		

En todas las muestras se observó al microscopio de luz, un patrón morfológico similar caracterizado por acúmulos de células fibroblastoides, de diferentes tamaños, irregularmente distribuidos en las placas. Figuras 52A, B, C y D.

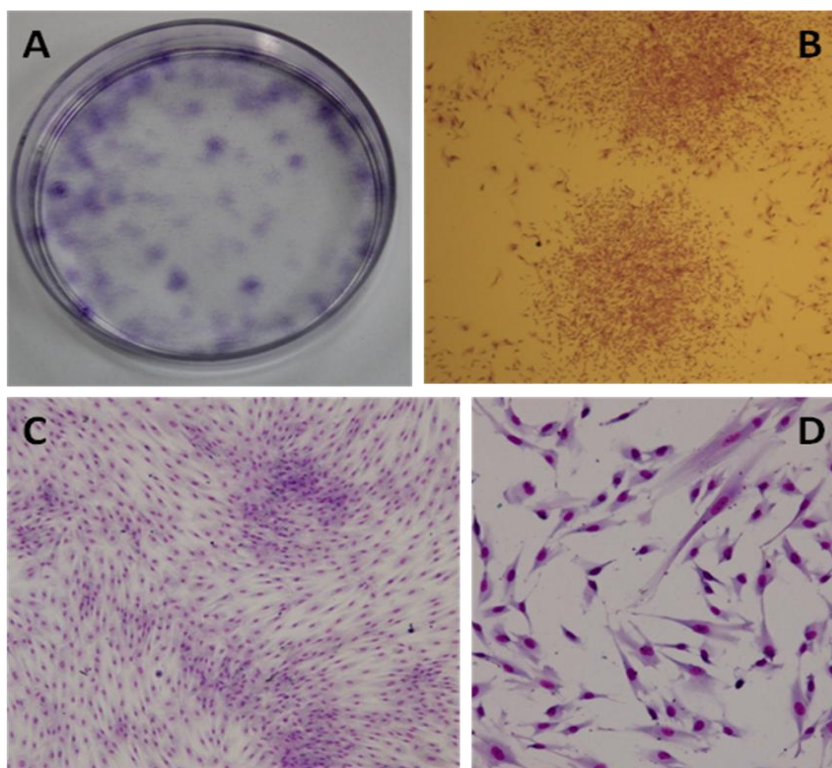


Figura 52. Microfotografías representativas de las UFC-F evaluadas a ojo desnudo (A), 4X (B), 10X (C), 40X (D).

### 3.6 Caracterización inmunofenotípica de las hMSC:

Las hMSC expresaron positividad para los antígenos de membrana celular CD105, CD90, CD73 y negatividad para los antígenos CD45, CD34, CD14, CD19 y HLA-DR, todos incluidos en en las recomendaciones de la Sociedad de Terapia Celular Internacional (*International Society of Cellular Therapy*) (97,98) para la tipificación de estas células (Figura 53). Estos resultados aunados a su carácter de células adherentes constituyen dos de los 3 criterios exigidos para su definición como células MSC.

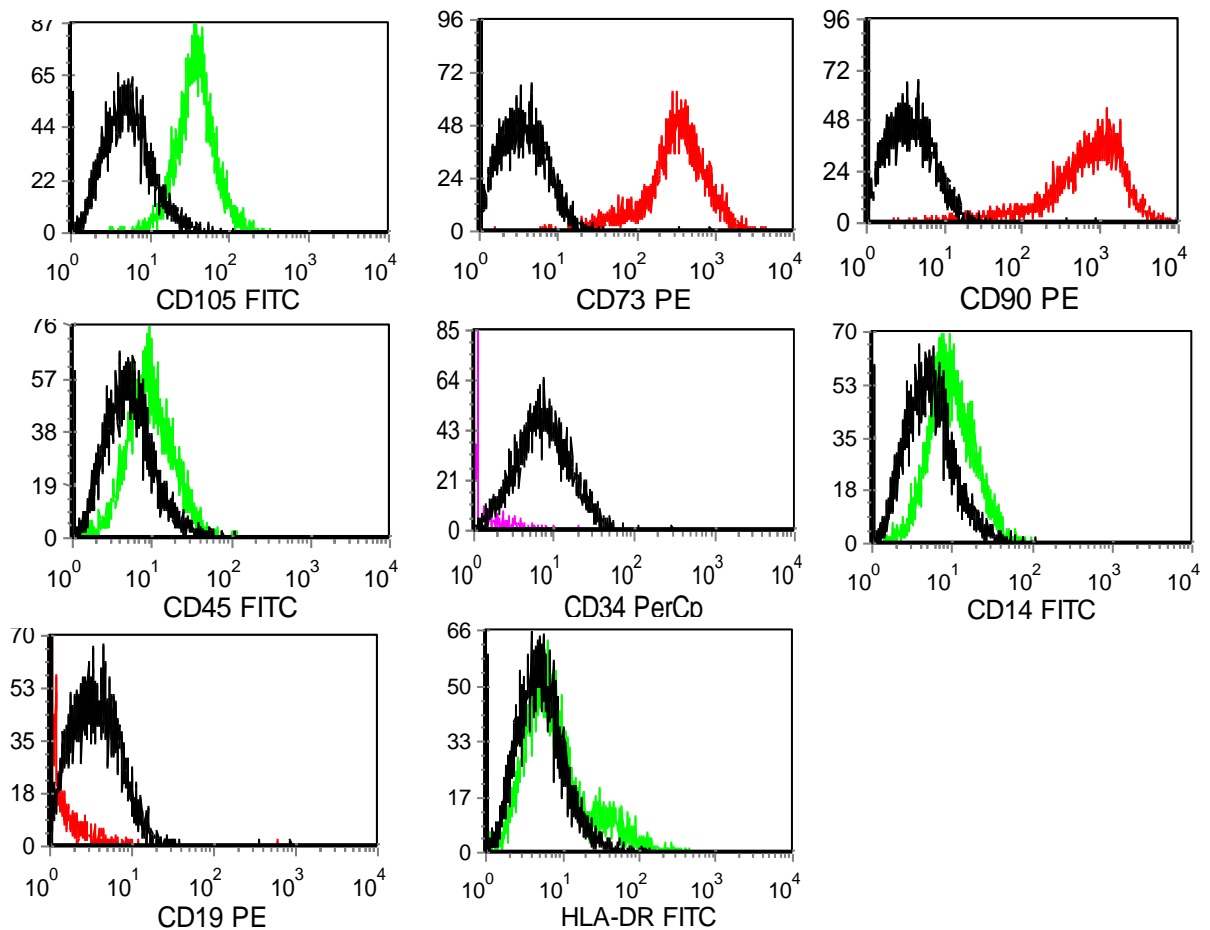


Figura 53. Histograma de la expresión de marcadores de membrana de las hMSC en P0

**3.7 Expresión de Marcadores de pluripotencialidad:** Las hAMSC en P3 comparativamente con las células en P0 mostraron un comportamiento errático en la expresión de los genes de pluripotencialidad. En las muestras analizadas no se observó diferencia en la expresión de Nanog entre ambos pases, Oct-4 evidenció disminución en la expresión en el P3 con relación al P0 y Sox 2 evidenció aumento de expresión en P3 con relación a P0.

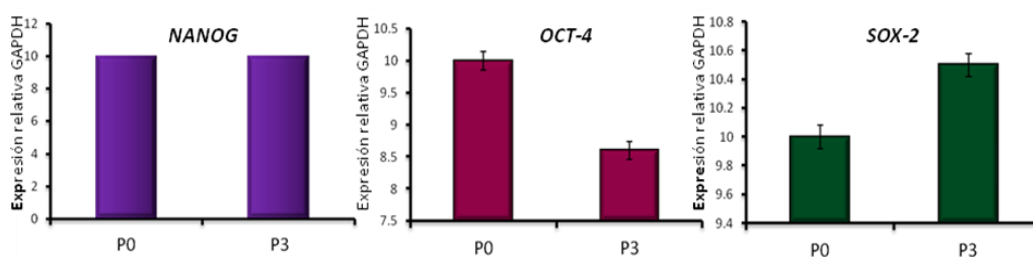


Figura 54. Expresión relativa de genes investigados por q-PCR en muestras de hAMSC en P0 y P3

### 3.8 Diferenciación *in vitro* de las hAMSC:

Las hAMSC en P0 cultivadas en los medios de inducción adecuados mostraron diferenciación hacia las tres líneas mesodérmicas investigadas (osteocitos, adipocitos y condrocitos).

**3.8.1 Diferenciación osteogénica:** se evaluó tras 3 semanas de cultivo en el medio Osteodiff® estandarizado para la diferenciación de MSC. Las hAMSC obtenidas de las 15 membranas procesadas evidenciaron una matriz mineralizada rica en calcio que adquirió un color rojo al teñir la preparación con Alizarin red (Figura 55A). Las mismas células cultivadas en DMEM estándar no mostraron diferenciación osteogénica (Figura 55B).



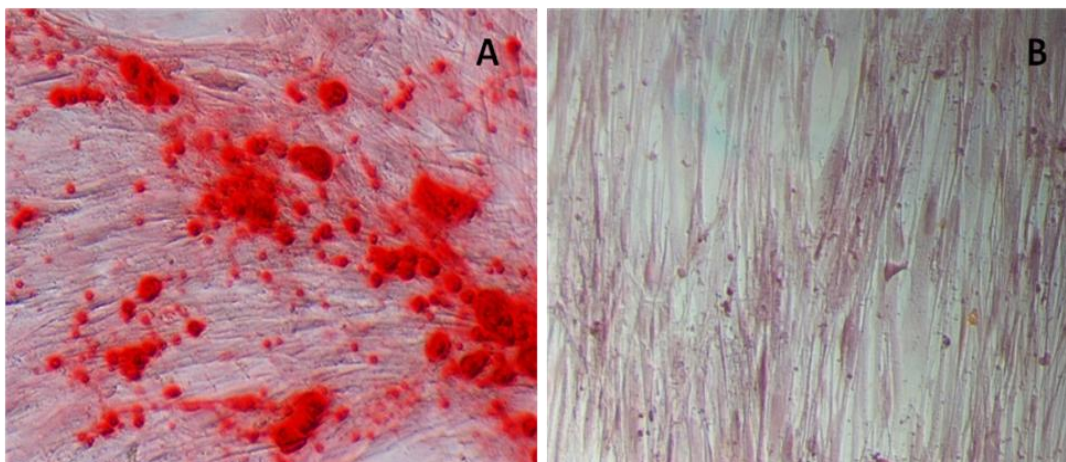


Figura 55. Diferenciación osteogénica de las hAMSC evaluada por tinción de Alizarín red. (A) reacción positiva. (B) Reacción negativa. Células cultivadas en DMEM estándar

**3.8.2 Diferenciación adipogénica:** se demostró en las hAMSC obtenidas de las 15 membranas procesadas a las 3 semanas del cultivo en medio de Adipodiff®. A partir de la segunda semana de cultivo las hAMSC comenzaron a mostrar pequeñas vacuolas intracitoplasmáticas visibles al microscopio de contraste de fase, sin necesidad de realizar la tinción con el Oil Red. Estas vacuolas se hicieron más numerosas y más confluentes en las semanas siguientes (Figuras 56A y B) y adquirieron un tinte anaranjado violáceo al ser teñidas con el Oil Red y contra-teñidas con Giemsa (Figura 56C). Las mismas células cultivadas en DMEM estándar resultaron negativas (Figura 56D).

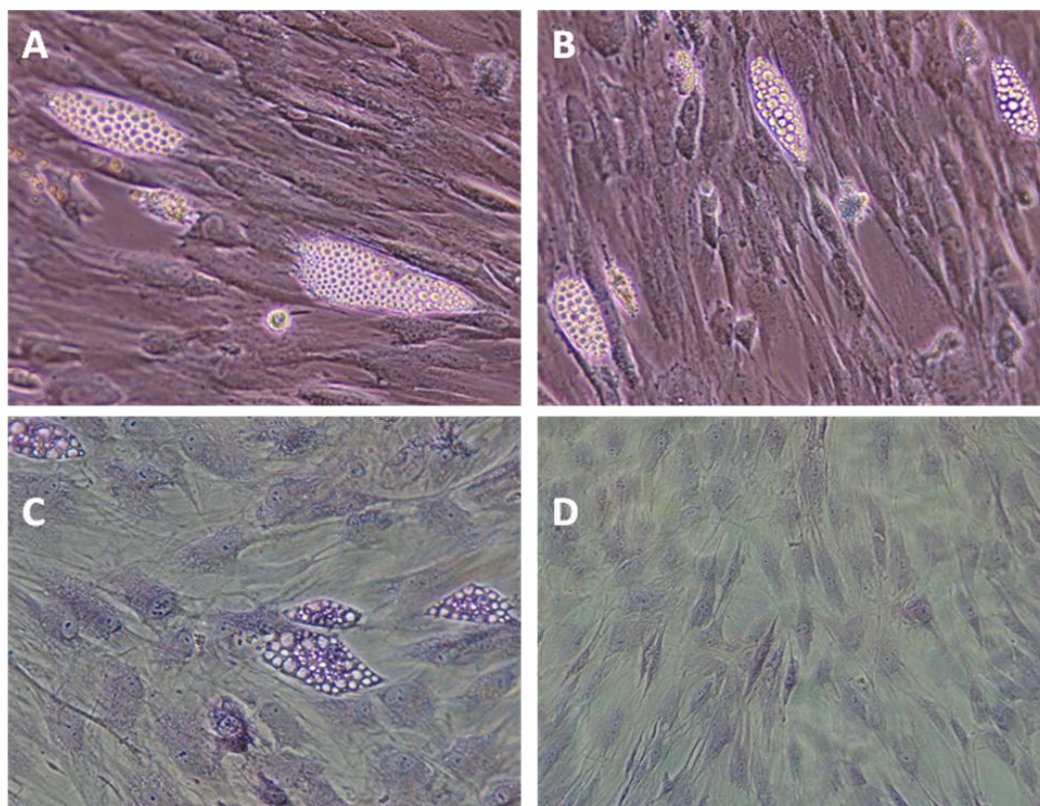


Figura 56. Diferenciación adipogénica de las hAMSC observada al microscopio de contraste antes de la tinción con el Oil Red O (A) y (B). Después de la tinción con el Oil Red O contracolorada con Giemsa (C). En todas se observa la presencia de vacuolas citoplásmicas con lípidos en su interior. 20X (D) Control Negativo. Células cultivadas en medio basal. 20X

**3.8.3 Diferenciación condrogénica:** Se indujo en micro-nódulos de hAMSC cultivados durante 3 semanas en el medio Chondrodif®. Tras ese tiempo de inducción, la diferenciación se evidenció en cortes de parafina de los nódulos de hAMSC por la demostración de abundante matriz extracelular con un alto contenido en proteoglicanos que se tiñó de azul con la coloración de Azul Alciano (Figura 57A), así como por la positividad para el colágeno tipo II demostrada a través de inmunofluorescencia con el anticuerpo primario anti-colágeno II y un anticuerpo secundario conjugado con FITC (Figura 57C). Las mismas células cultivadas en medio basal resultaron negativas por ambos métodos (Figura 57B y D).

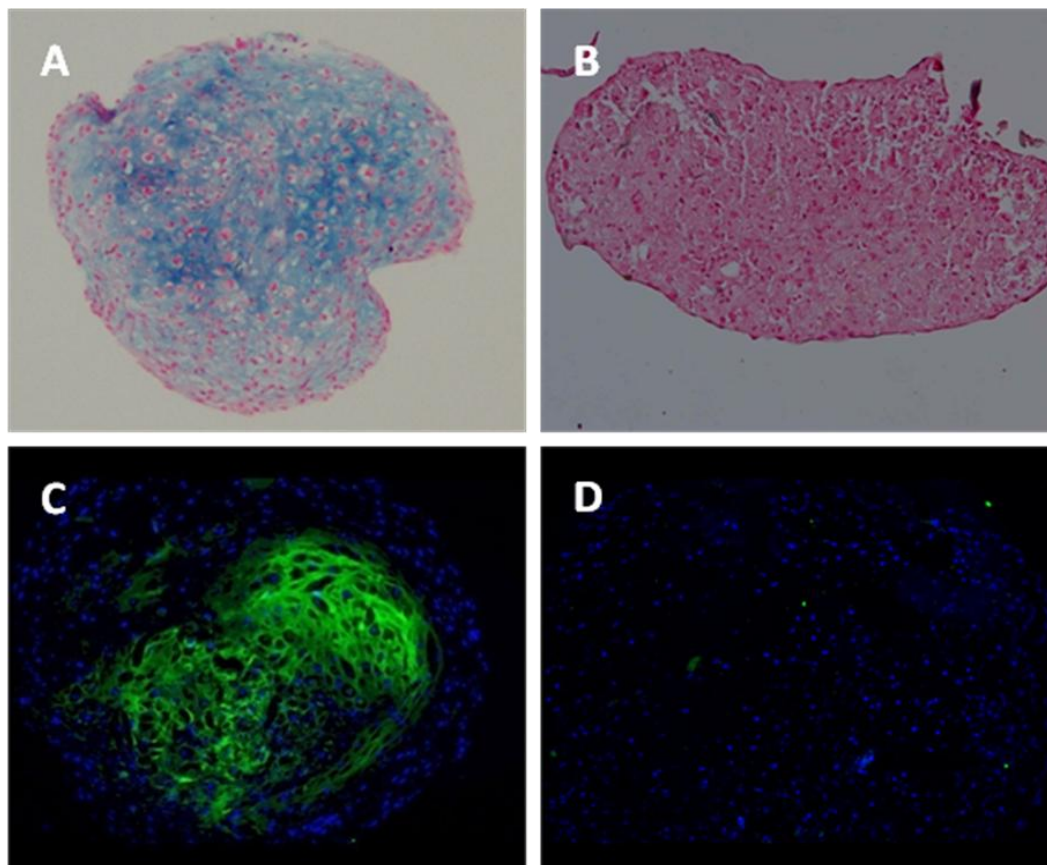


Figura 57. Diferenciación condrogénica de las hAMSC evaluada por tinción de Azul alciano, (A) Reacción positiva, (B) Control Negativo. Evaluación de la diferenciación condrogénica por detección de colágeno tipo II a través de inmunofluorescencia (C) Reacción positiva y (D) Control negativo.

## ***DISCUSIÓN***

Desde el inicio de la terapia celular la MO se ha considerado la fuente más importante de células madre adultas. De este tejido es posible obtener al menos dos poblaciones de células madre: células madre hematopoyéticas (HSC) y células madre mesenquimales (MSC), las cuales representan los tipos de células mejor caracterizadas y más utilizadas en los ensayos pre-clínicos y clínicos. Las HSC y sus progenitores son capaces de regenerar todas las líneas celulares hematopoyéticas y representan un recurso insustituible en medicina clínica para el tratamiento de diferentes enfermedades hematológicas y no hematológicas (6, 21, 23). Las MSC pueden diferenciarse no solo en las líneas celulares mesodérmicas clásicamente señaladas, (osteoblastos, condrocitos y adipocitos) (46, 47, 205, 206), sino también en cardiomiocitos (151), células endoteliales (207), líneas celulares ectodérmicas, como neuronas (7, 8, 208) y líneas celulares endodérmicas, como hepatocitos (209). No obstante, a pesar de estas características tan atractivas para los estudios de regeneración tisular y terapia celular, su utilidad ha resultado limitada para una amplia aplicación clínica debido a la dificultad de expansión, a su bajo rendimiento y al aparente compromiso de su potencial proliferativo relacionado con la edad avanzada y el estado de enfermedad del donante. Existen evidencias de que estos factores pueden producir una disminución de la vida media y una senescencia acelerada (14) y que ello limita la obtención de suficiente número de MSC de la MO en un período de tiempo clínicamente permitido. Por estas razones desde hace varios años se ha orientado la búsqueda de células madre adultas a partir de otros tejidos con la esperanza

de obtener células pluripotentes que pudieran ser implantadas sin manipulación, sin expansión y sin rechazo en un receptor alogénico.

En el presente estudio dirigimos nuestra atención hacia la MA, una fuente alternativa de células madre que ha estado en el escenario científico desde principios de la década pasada, una fuente fácilmente accesible, éticamente aceptable y con un alto rendimiento en la obtención de células madre según publicaciones recientes (15-19).

Nos planteamos como objetivos el estudio y caracterización de sus células a diferentes niveles, y para ello diseñamos un protocolo de estudio, manipulación y procesamiento de la MA que nos permitió obtener, a través de diversos ensayos, células madre de sus dos estratos celulares básicos, a saber: el epitelio amniótico y el mesodermo amniótico. Del primero obtuvimos las células epiteliales o hAEC y del segundo las células mesenquimales o hAMSC. Ambas fueron caracterizadas en sus propiedades básicas y en su potencialidad de diferenciación.

#### **Caracterización celular:**

Las hAEC se aislaron por digestión enzimática, obteniéndose tras 3 tripsinizaciones un promedio de  $123 \pm 12 \times 10^6$  células de cada MA procesada en su totalidad. Esto coincide con lo publicado por otros investigadores que utilizaron un método de aislamiento similar, aunque el rango de variación fue amplio. Algunos señalan obtenciones de 50-60 células  $\times 10^6$  (64), otros, resultados alrededor de  $200.0 \times 10^6$  (85), de  $8-12 \times 10^6$  células/g de tejido amniótico (72), ó de  $6.3 \pm 1.4 \times 10^6$  células vivas/g de tejido húmedo (69) utilizando métodos que combinan tripsinización, tratamiento con dispasa y remoción mecánica de las células con rascadores (69). La mayoría de los estudios no plantea el tema de la viabilidad

celular, que en nuestros ensayos osciló entre 77% y 92%, en concordancia con lo señalado en una publicación (162).

Las hAEC recién separadas de la MA mostraron una apariencia morfológica homogénea, un estado de quiescencia y un patrón de expresión de antígenos de superficie similar al señalado por diferentes investigadores (16, 67, 68). Este consistió en negatividad de los antígenos HLA-DR y positividad de los antígenos SSEA-3, SSEA-4, TRA 1-60 y TRA 1-81, todos ellos observados también, según diversas publicaciones, en las células embrionarias indiferenciadas, en células de carcinoma embrionario y en células germinales embrionarias (10, 36). Nuestros resultados solo discreparon en la positividad del SSEA-1, un antígeno carbohidrato, derivado fucosilado de tipo 2 polilactosamina, que según se ha señalado se expresa durante la diferenciación de las hESC en el momento en que se regula negativamente la expresión de SSEA-3 y SSEA-4 (204). No tenemos explicación para la positividad del SSE A-1 en algunas de nuestras muestras, pero, si lo que ocurre en las hESC es aplicable también a las hAEC, probablemente entre nuestras muestras estemos detectando algunas células con grados de diferenciación variados.

Según se ha demostrado recientemente en dos estudios sucesivos con MA a términos y fetales provenientes de abortos, las células positivas para los antígenos embrionarios no residen en nichos específicos de células madre, ni parecen estar organizadas por señales regulatorias externas (210, 211). Sobre este particular no tenemos puntos de comparación porque solo inmunotificamos células aisladas de la MA.

Además de los marcadores de membrana propios de células madre embrionarias, las hAEC expresaron los factores de transcripción Oct-4, Nanog, Sox-2, coincidiendo con lo

descrito en la literatura, (15, 18, 67, 68). Ello les supone un poder de diferenciación pluripotencial parecido al de las hESC, pues como se ha publicado reiteradamente, estos marcadores son esenciales para el mantenimiento del estado de pluripotencialidad y de indiferenciación de las hESC y de las células germinales. Se ha señalado que la expresión de Nanog y Sox-2 es mayor en las MA fetales que en las MA a término y que la de Oct-4 es similar, debido probablemente a que algunas hAEC se diferencian espontáneamente durante el embarazo (210, 211). Esto no explica la persistencia inalterada de Oct-4.

En nuestras muestras los marcadores moleculares de pluripotencialidad señalados se detectaron por PCR y q-PCR en células en P0 y P3, y claramente la expresión fue menor en las células del P3 que en los pases anteriores, lo que podría deberse a una supresión de la expresión producida por la ocurrencia de diferenciación durante los sub-cultivos. Un resultado similar obtuvieron Bilic y col. (69) al estudiar la expresión del antígeno embrionario SSEA-4 a través de la expansión celular y evidenciar una disminución del epítipo de este antígeno en un 48% en las células en P4. Ellos también interpretaron el resultado como consecuencia de diferenciación celular.

De manera novedosa y un tanto preliminar incorporamos en nuestros ensayos la técnica de PCR arrays (*RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Arrays de Qiagen®*) que nos permitió evaluar un grupo amplio de genes y conocer el perfil genético de las células en estado basal y tras los ensayos de diferenciación. A través de ella pudimos evidenciar que las hAEC además de los marcadores de pluripotencialidad clásicamente investigados, expresan otros como: DNMT3B involucrado en la metilación del ADN durante el desarrollo embrionario, LEFTY1: involucrado en la determinación de la simetría derecha–izquierda embrionaria, PODXL: en



la regulación de la adhesión y morfología celular, y ZFP42 en la autorenovación de las células embrionarias; igualmente expresan una alta proporción de marcadores de las tres capas germinales y de células progenitoras, y algunos de células diferenciadas. Todo ello ratifica el estatus de pluripotencialidad asignado a las hAEC, explicado muy probablemente porque su origen precoz a partir del epiblasto antes del comienzo de la organogénesis, le permite retener algunas de sus características.

Al igual que lo señalado por otros investigadores (15, 67-69), las hAEC no expresaron el gen de la telomerasa transcriptasa reversa (TERT), una enzima que favorece la proliferación celular y también la tumorigénesis. La ausencia de actividad de telomerasa ha sido considerada una ventaja biológica de las hAEC frente a las células embrionarias, a pesar de que no se tiene claro que su ausencia sea el único mecanismo que previene la formación de tumores, y de que se hayan involucrado otros mecanismos moleculares como modificaciones epigenéticas y transcripcionales de genes anti-tumorales y genes que regulan el ciclo celular (77, 78). En el presente estudio no investigamos la formación de teratomas porque nos limitamos a ensayos *in vitro*.

Las hAEC se cultivaron en presencia y en ausencia del EGF para evaluar el efecto de este factor en la proliferación celular. El EGF humano es una cadena polipeptídica simple, de bajo PM (6045 Da), que en los cultivos se utiliza como preparación recombinante (rhEGF). Normalmente en los humanos el EGF se sintetiza como una gran proteína precursora glicosilada, anclada a la membrana, de 1168 aminoácidos y un PM de 140 kDa, conocida como forma precursora de EGF, esta es fraccionada por enzimas proteolíticas que liberan la forma soluble, el pro EGF, el cual es fraccionado para liberar la forma madura, el

mEGF. Este tiene un receptor específico, el EGF-R, con 3 dominios (citoplasmático, quinasas de tirosina, trans-membrana único, y extracelular) y 7 ligandos (el EGF maduro, el factor transformante  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), el factor de crecimiento parecido a EGF de unión a la heparina (HB-EGF), amfiredulinas (AR), betacelulinas (BTC), epiregulinas (ER) y Neuregulinas (NRG-1 ó epigenos) (84). La unión del EGF a su receptor resulta en la dimerización y autofosforilación del receptor y en la fosforilación de la tirosina de otras proteínas que producen efectos proliferativos señalizados a través de la activación de diferentes vías: la vía de las quinasas MAP (*Mitogen-activated protein kinase*: quinasas de proteínas activadas por mitógenos) que ocasiona la fosforilación de los factores de transcripción c-Fos para crear AP-1 y ELK-1; la vía de las quinasas JAK (*Janus kinase*: Kinasa Janus) que activa los factores de transcripción STAT-1 y STAT-3; y la vía de las quinasas PKC (*Protein kinase C*: kinasa de proteína C), a través del fosfatidilinositol y la liberación de calcio (84).

En términos generales los datos obtenidos de la comparación del cultivo primario de las hAEC en presencia o ausencia del EGF evidenciaron la influencia favorable de dicho factor en la proliferación celular, aunque la tasa de proliferación no fue elevada, como se demostró además en los ensayos de proliferación celular utilizando los métodos MTT y EZU4. Esto viene a confirmar los estudios de Bilic y col. (69), quienes utilizando métodos de inmunofluorescencia con el anticuerpo monoclonal Ki-67, igualmente observaron una tasa de proliferación baja. Ya Terada y col. (85) en estudios previos había tenido observaciones similares.

Tanto en los cultivos suplementados con EGF como en los carentes se obtuvo al momento del primer cambio de medio una población de células no adherentes que

representó el 17 a 39% de las células sembradas y una población de células adherentes que, en todos los cultivos suplementados con EGF (20/20) y en 18/20 de los no suplementados, adquirieron en períodos de tiempo variables (2 a 6 días y 2 a 11 días respectivamente), la típica apariencia de monocapa en mosaico que se observa durante el cultivo de células epiteliales (15, 19, 65, 67-69). En 2 de las 20 muestras (10%) cultivados sin EGF no se observó adherencia de las células, hecho que también fue observado por Bilic y col. (69) en 9 de 27 MA analizadas (30%), utilizando como medio de cultivo Ham's F-12/DMEM suplementado con 10% de SBF, antibióticos y no queda claro en la publicación si también EGF.

En relación a las células no adherentes, otros grupos han señalado proporciones similares (201). Además, algunos han señalado que estas células difieren de la población adherente por la expresión reducida de CD44 y aumentada de CD54 (201). El CD44 es una glicoproteína de la membrana celular que funciona como receptor de ligando del ácido hialurónico, osteopontina, colágenos y metaloproteinasas de la matriz extracelular. El CD54 es una glicoproteína que funciona como una molécula de adhesión intercelular (ICAM). Esto explicaría que se adhieran poco a los frascos de cultivo y mucho entre ellas (201). Otros investigadores han encontrado que en la capa de células no adherentes unida de forma laxa a las células adherentes, a la que han denominado capa intermedia, la expresión de los antígenos embrionarios: SSEA-4, TRA1-60 y TRA 1-81 y de los marcadores de pluri-potencialidad (Oct-4 y Nanog), así como la proporción de células madre, es más elevada que en la capa de células adherentes. Plantean que probablemente los genes de células madre se regulan negativamente al adherirse a los frascos de cultivo, y que estas

células adheridas actúan como una capa nutricia autóloga (*feeder layer*) proporcionando factores secretados que ayudan a inducir o a mantener a las hAEC en estado indiferenciado (67). Algunos basados en estos hallazgos las han utilizado en ensayos de diferenciación neural con buenos resultados (86). En nuestro estudio no observamos diferencias en la proporción de los antígenos embrionarios de las células no adherentes, aunque es cierto que realizamos la tipificación solo en 4 muestras, tampoco realizamos la investigación de los CD44 y CD54, ni de los marcadores de pluripotencialidad. Ambos son estudios pendientes. Lo que sí hicimos fue volver a sembrar las células no adherentes, según provinieran de cultivos que habían mostrado adherencia rápida o no, en frascos con EGF o sin EGF de acuerdo al cultivo original de donde habían sido obtenidas, y comprobar que hay hAEC que se adhieren y proliferan adecuadamente en los cultivos primarios, independientemente de la adición exógena del EGF. Es posible que en estas células la producción autocrina del factor sea más elevada, o influyan otros factores.

Koizumi y col. (115) fueron los primeros en demostrar que el gen del EGF se expresaba predominantemente en el epitelio amniótico y que la concentración del EGF era mucho más elevada en la MA completa que en la MA desnuda de epitelio, con lo cual ratificaron su origen epitelial. Más recientemente, Gicquel y col (212) señalaron en base a un estudio realizado en 15 MA, que hay una gran variabilidad en los niveles de EGF a nivel de las células epiteliales de las diferentes MA investigadas, es decir una gran variabilidad inter-donante, y que el nivel del EGF de las células epiteliales también es variable de acuerdo a la región de la MA estudiada, lo que significa variabilidad intra-donante. Comparando los niveles de EGF en células epiteliales de la región de la MA ubicada sobre

el disco placentario (PA: *placental amnion*), con los de la región más distal entre el disco placentario y el sitio de ruptura placentaria (AA: *apical amnion*), y los de la región media (MR; *mid-region*) del saco amniótico, los autores encontraron, niveles más elevados de EGF en las células epiteliales de la región apical y de la región media, que en la región placentaria. Igualmente encontraron niveles significativamente más bajos en las células estromales y en el corión. Según ellos, las diferencias en el contenido de EGF de la región placentaria con relación a las otras dos regiones podrían obedecer a diferencias en los caracteres anatómicos de la región, debido a que el amnios placentario tiene un estroma más grueso y proporcionalmente menos células epiteliales que la región media y la región apical. La región apical es considerablemente más delgada que la región placentaria, probablemente debido a su papel fisiológico en la ruptura de las membranas al momento de iniciarse el parto. Las diferencias inter-donantes en los niveles de EGF las atribuyen a variaciones relacionadas con la edad gestacional, la edad de la madre, la gravidez, paridad, raza, tamaño del bebé, que indirectamente podría determinar el tamaño y el área de la MA, así como el espesor del estroma que sustenta las células epiteliales. Consideran que la salud de la madre durante el embarazo y otros factores como el cigarrillo que afecta la calidad de la placenta y quizás de la MA podrían influir en la expresión del EGF (212).

En nuestros casos, no tenemos explicación para el comportamiento de adhesión y confluencia rápida observada en ausencia de la adición exógena de EGF, en varias muestras (Tabla 12: Muestras 9, 10, 16, 18 y 20), pues el protocolo de aislamiento celular y siembra, así como los medios y suplementos utilizados fueron los mismos. El único dato llamativo, sin que ello implique afirmar una posible asociación, es que 3 de las 4 muestras

de madres mayores de 40 años estaban ubicadas dentro del mencionado grupo. Pudiera ser que en ellas la producción autocrina de EGF por las células epiteliales, o de cualquiera de los otros factores que se sabe promueven la proliferación de las hAEC (HGF, bFGF, insulina, tranferrina, triyodotironina) (213) fuese más elevada. No lo sabemos.

En ninguno de los cultivos primarios de las hAEC observamos la formación de Cuerpos Esferoides, estos han sido definidos por Miki y col. (67) como los equivalentes a los Cuerpos Embriodes observados cuando se realiza el cultivo primario de las hESC. Según los mencionados autores los Cuerpos Esferoides, son esferas o “clusters” de células que se observan sobre la monocapa de células que tapiza los frascos de cultivo, que retienen sus características de células madre pluripotentes (expresión de Oct-4, Sox-2 y Nanog) en mayor proporción en la parte central de la estructura que en la periferia, y que se observan en cultivos de alta densidad mantenidos durante 12 a 15 días. A pesar de la evaluación exhaustiva bajo microscopio de contraste de fase de los frascos de cultivo primario de nuestras hAEC, en ninguno de ellos pudimos detectar estas formaciones. Probablemente el éxito de los citados autores se deba a que ellos utilizaron DMEM con EGF suplementado además con 1% de aminoácidos no esenciales, 55 $\mu$ M 2-mercaptoetanol, 1mM piruvato de sodio, mientras que nosotros utilizamos DMEM estándar con EGF. No obstante, en la literatura consultada, no encontramos otras publicaciones que señalen la observación de Cuerpos Esferoides en los cultivos primarios de hAEC.

En los estudios de expansión celular los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos en los cultivos primarios, pues en estos, al igual que en aquellos, las células cultivadas en presencia de EGF alcanzaron confluencia más precozmente y el número de

células despegadas en cada pase fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que el obtenido en ausencia de dicho factor. Algunos investigadores señalan que es posible realizar 6 a 10 pases antes de que las células alcancen un estado terminal de no división (16, 214). Otros, que solo es posible realizar 2-6 pases antes de que cese la proliferación (65, 69) y además que en cada pase las células requieren un tiempo progresivamente mayor para alcanzar confluencia (69). Esta fue nuestra experiencia. Es posible que hasta ahora no se haya logrado el medio de cultivo idóneo o las condiciones óptimas de cultivo para que las células se mantengan en un estado autoreplicativo. En este sentido podría ser oportuno citar el argumento de los que recuerdan que tomó varios años optimizar las condiciones de cultivo para el crecimiento clonal de las células embrionarias, y que posiblemente las investigaciones futuras puedan permitir el análisis clonal de las hAEC (67).

Un punto importante a resaltar es que en los sub-cultivos las hAEC gradualmente adoptaron una morfología mesenquimal. Entre el segundo y tercer pase (algunas veces desde el primer pase) se observó un cambio en la morfología celular de epitelial a fibroblastoide, tanto en los cultivos con EGF como sin él, que correspondió al proceso de TEM (202, 203), tal como pudimos confirmar a través de la realización de una serie de estudios que incluyeron: determinación de marcadores de membrana, proteínas del citoesqueleto, investigación de genes y mediadores responsables del proceso. Los resultados de este estudio están siendo revisados para su publicación en *Cell Transplantation*. Otros investigadores ya habían mencionado la ocurrencia de este proceso en los cultivos celulares, (69, 88, 102, 201), pero hasta donde sabemos más a nivel observacional que mecanístico. Se ha señalado que la vimentina juega un papel

predominante en los cambios de forma, adhesión y movilidad que ocurren durante la TEM (199). En nuestros ensayos la presencia de vimentina se observó en las células recién aisladas y aún antes de aislarlas del epitelio amniótico. Creemos que debido a que la TEM tiene una función muy importante en la embriogénesis y en el desarrollo de los órganos (202, 203), la habilidad de las hAEC para adoptar una apariencia mesenquimal podría estar de acuerdo con sus características de células madre. Recientemente se ha demostrado que este fenómeno genera importantes cambios en las propiedades inmunosupresoras y en la capacidad de diferenciación de las hAEC (214). De allí que se intente establecer recomendaciones particulares para el uso de estas células según se encuentren en P0 (antes del cambio de morfología) o en fases más avanzadas (214).

En nuestro estudio no fue posible demostrar clonalidad de las hAEC cuando se sembraron a baja densidad ( $1 \times 10^3/\text{cm}^2$  y  $1 \times 10^2/\text{cm}^2$ ). Esto se corresponde con lo observado por otros investigadores (65, 67, 69). Según algunos, cuando las células se siembran a muy baja densidad se acelera el proceso de senescencia, probablemente debido a que la proliferación celular depende de mecanismos moleculares complejos que involucran a las integrinas, al receptor del EGF y a la interacción célula-célula (67). En oposición a todos, Ilancheran y col. (68) señalan que tras sembrar las hAEC a una densidad de 50 células/ $\text{cm}^2$  en DMEM/F12 suplementado con 10 ng/ml de EGF, con factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), o con la combinación de ambos (10 ng/ml de cada uno), durante 14 días, observaron formación de colonias clonales con pequeños cúmulos de células en el día 7 y muy numerosas en el día 14, siendo la eficiencia clonogénica significativamente mayor en los medios suplementados con EGF y bFGF, que en los suplementados con cualquiera de



los factores por separado ( $p < 0.05$ ). En nuestro estudio solo pudieron observarse colonias con siembras de  $1.0 \times 10^3 / \text{cm}^2$ , y la eficiencia clonogénica fue muy baja (0.34% y 0.21% en presencia y ausencia de EGF respectivamente) en comparación a lo obtenido por los mencionados autores con una siembra 20 veces menor (68).

Al igual que otros investigadores (67, 68, 69, 87, 102), en este estudio investigamos si las hAEC podían responder a inductores presentes en los medios de diferenciación y diferenciarse *in vitro* hacia células de las tres capas germinales (células neurales, hepatocíticas y cardiomiocíticas). La diferenciación la evaluamos por técnicas moleculares (PCR y PCR arrays), y por inmunofluorescencia. Los estudios por PCR nos permitieron evidenciar que tanto las células cultivadas en medios basales sin suplementos específicos para la diferenciación, como las cultivadas en medios de diferenciación expresan marcadores de líneas celulares diferenciadas. Esto se corresponde con lo publicado en la literatura. Así, para la diferenciación neural, varios investigadores (67, 68, 73, 79, 81), señalan la presencia RNAm para genes marcadores de estos tejidos, e inclusive, la síntesis y liberación de neurotransmisores como acetilcolina, catecolaminas, factores neurotróficos, ativina, noggina etc., en células recién aisladas del epitelio, en células cultivadas en medios basales y en células cultivadas en los medios de diferenciación (79, 81, 215, 216). Para la diferenciación hepática la observación ha sido similar, algunos investigadores a través de estudios genómicos han demostrado que las hAEC expresan un grupo muy amplio de genes relacionados con el hepatocito, incluyendo genes involucrados en el metabolismo de las drogas. Otro tanto ha ocurrido con la evaluación de la diferenciación cardiomiocítica. La literatura señala que las hAEC células recién aisladas expresan factores de transcripción

cardiaca como el GATA-4, y genes específicos de corazón como el MLC- 2 A, MLC 2V, cTnTI, cTnT (TNNT), CACNAIC y KCND3, ANP, MYLY (67, 68, 100), y esa también ha sido nuestra experiencia. Estos resultados han llevado a algunos autores a considerar que la evaluación por PCR de genes relacionados con una determinada línea celular no refleja su diferenciación hacia ese tipo de células, porque aunque en la expresión génica el mecanismo de control más importante es el transcripcional, la presencia de un ARNm codificante no implica la presencia de una proteína funcional, existen muchos cambios postranscripcionales implicados, incluyendo cambios epigenéticos y dependientes de miRNAs (83). De allí, que si se realiza la evaluación de la diferenciación a nivel molecular sea recomendable utilizar técnicas de qPCR y/o qPCR arrays para cuantificar la amplificación o no de los genes tras el cultivo en los medios de diferenciación.

En nuestro estudio la posibilidad de realizar qPCR arrays en células cultivadas en medios basales y en células cultivadas en medios de diferenciación nos permitió evaluar de forma cuantitativa los cambios positivos y negativos observados en la expresión de genes. Lamentablemente lo costoso del procedimiento limitó el número de ensayos realizados. No obstante a pesar de ello y de ser resultados preliminares, pueden extraerse algunas conclusiones: En primer lugar, el estudio en células cultivadas en medio de diferenciación neural y hepatocítico evidenció disminución en la expresión de genes asociados a pluripotencialidad y a capas germinales, en relación a células cultivadas en medios basales. En segundo lugar, en las células cultivadas en medios inductores de las tres diferenciaciones se apreció aumento en la expresión con relación a las células control de algunos de los genes asociados al desarrollo de cada línea en particular (*GAD1* para tejido

neural, *DCN* para mesodermo hepático y *HAND2* para cardiomiocitos). *GAD1* es uno de los genes que codifica la descarboxilasa del ácido glutámico que sintetiza el GABA, de gran importancia en el desarrollo del cerebro humano (217). *DCN* forma parte de los genes que se inducen durante la diferenciación hepática y se mantienen a lo largo de todo el proceso de diferenciación (218). La familia de los genes *HAND* codifica factores de transcripción *bHLH* (*basic hélix-loop-helix*) que juegan un papel crucial en el desarrollo vascular y cardíaco de vertebrados (219). Lo que hemos señalado no pretende reducir el proceso de diferenciación celular a la expresión de uno o dos genes, sabemos que es un proceso mucho más complejo, que requiere la intervención de numerosos y complicados procesos y inter-relación de múltiples vías moleculares.

La detección de los marcadores por inmunofluorescencia, técnicas inmunocitoquímicas, inmunoblot o cualquier técnica que detecte las proteínas codificadas por los transcritos es mucho más importante al momento de asignar diferenciación. En nuestro protocolo de estudio escogimos la inmunofluorescencia y además prestamos atención a los cambios morfológicos observados en las células durante el cultivo celular. De esta forma, al igual que otros investigadores (67, 68, 82), cuando cultivamos las células en medio de diferenciación neural pudimos detectar positividad para varias proteínas de diferenciación involucradas en este proceso: Nestina y  $\beta$ -tubulina III, ambas marcadores de neuronas, y GFAP, marcador de células gliales. Cuando el cultivo fue en medio de diferenciación hepática se evidenció positividad para albúmina y CTK8/18, en concordancia con lo observado por otros investigadores (67, 68, 83); y cuando el cultivo fue en medio de diferenciación cardio-

miocítica, detectamos la presencia de  $\alpha$  actinina, una proteína integrante del aparato contráctil de la célula muscular. Igualmente pudimos observar en los cultivos algunos cambios celulares sugestivos de tales diferenciaciones. Algunos investigadores han complementado la observación de estos cambios con estudios ultraestructurales que les han permitido evaluar los caracteres de la diferenciación a nivel subcelular (68).

La diferenciación *in vitro* de las hAEC hacía células osteogénicas utilizando medios de diferenciación estandarizados para MSC de la MO, (OsteoDiff Miltenyi Biotec MACS® Media) y evaluación por la detección de la actividad de la fosfatasa alcalina y por la prueba de Alizarin red, fue confirmada en nuestros estudios en 40% y 25 % de las muestras respectivamente, con un patrón de coloración débil en ambas pruebas. Esto en franca oposición a lo señalado por Ilancheran y col. (68) quienes detectaron una matriz mineralizada al cabo de 4 semanas en todas las muestras, utilizando medios de cultivos no comerciales; y a lo publicado por Wolbank y col. (96) quienes relatan una experiencia positiva utilizando el medio de diferenciación osteogénica para MSC de MO (MesenCult Human Osteogenic Stimulatory Kit, Stem cell Technologies, Vancouver, Canadá). Nuestra experiencia es más parecida a la de Bilic y col. (69) y a la de Diaz-Prado y col. (220) quienes obtuvieron diferenciación osteogénica, con amplia variedad en la expresión de la actividad de la fosfatasa alcalina y en los depósitos de calcio, utilizando un medio de inducción osteogénica comercial estandarizado para MSC (Bullekit Osteogenic Differentiation Medium, Lonza, Walkersville, MD, USA®); así como a la experiencia de Stadler y col. (201), quienes utilizando un kit de estimulación osteogénica estandarizado para MSC (O-Kit, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá®) obtuvieron resultados positivos en el 75% de los

casos; y en el 50% y 25% de los casos utilizando medios recomendados en la literatura (88, 94, 205).

En cuanto a la diferenciación adipogénica, nuestros resultados confirmaron positividad en 30% de las muestras cultivadas en un medio de inducción adipogénica estandarizados para MSC de MO (AdipoDiff Miltenyi Biotec MACS®) y en todas la positividad fue débil. Esto se corresponde con lo publicado por otros investigadores (69, 96, 201) quienes han señalado dificultad para diferenciar las hAEC hacia células adipogénicas con los medios inductores recomendados en la literatura (88, 94, 205, 220). Aunque otros utilizando uno de estos medios señalan resultados positivos (68, 88).

Finalmente en relación a la diferenciación condrogénica, nuestros resultados fueron siempre negativos, y esto está en concordancia con lo obtenido por otros investigadores, pues hasta donde pudimos revisar solo dos publicaciones (88, 220) hacen referencia a la diferenciación condrogénica de las hAEC. En la primera publicación (88), los autores obtuvieron diferenciación condrogénica en las hAEC aisladas de MA del primer y tercer trimestre, evaluada por la coloración de proteoglicanos y por la detección de colágeno tipo II con inmunofluorescencia. En la segunda, (220) la diferenciación fue evaluada además a través de la expresión de los genes específicos de línea condrogénica: Col II, Sox9 y Agg, resultando positiva para los dos primeros y negativa para el tercero.

Pudiera ser que nuestros resultados en estas diferenciaciones mesodérmicas estuviesen relacionados con el uso de medios de diferenciación estandarizados para utilización en células mesenquimales y no epiteliales, aunque, varios de los investigadores citados señalan resultados positivos con estos medios. También es posible, que nuestros

resultados estuviesen relacionados con el uso exclusivo de células en P0. Algunos de los investigadores citados han utilizado células en países más avanzados (220). Podría ser que la diferenciación hacia líneas mesodérmicas ocurra en mayor grado en células que han iniciado el proceso de Transición Epitelio Mesénquima. Esto lo estamos investigando.

En lo que respecta a las hAMSC, siguiendo el protocolo diseñado, el aislamiento de las células estromales se realizó por procedimientos mecánicos y enzimáticos, obteniéndose un promedio de recuperación de  $5.3 \times 10^6$  células y un promedio de viabilidad de 76%, ambos proporcionalmente inferiores al promedio de recuperación ( $123 \pm 12 \times 10^6$ ) y de viabilidad (86%) que obtuvimos en el aislamiento de las células epiteliales. Este es un resultado esperado, porque estructuralmente en la MA intacta, la proporción de células estromales embebidas en el mesodermo amniótico es mucho menor que la de células del epitelio, y porque el proceso de aislamiento de las células estromales se realiza tras el aislamiento de las células epiteliales, lo que probablemente implica pérdida y un mayor trauma para las células. Otros investigadores han señalado rendimientos que van desde  $1 \times 10^6$  células estromales/g de tejido amniótico (69, 72, 100) hasta  $24 \times 10^6$  células estromales por amnios completo (91).

La eficiencia en la obtención de células adherentes a partir del cultivo de las células estromales de las 20 MA analizadas fue de 75%, con una densidad de siembra inicial de  $1.0 \times 10^5$  cel/cm<sup>2</sup> en DMEM suplementado con SBF al 20%. Esta eficiencia fue inferior al 100% (27/27) obtenido por otro investigador que utilizó una densidad de siembra inferior ( $4 \times 10^4$  cel/cm<sup>2</sup>) en Ham'sF-12/DMEM suplementado con SBF al 10% (69). Debido a que

otros autores no señalan estos datos, es difícil afirmar cuál medio o densidad de siembra podría ser superior.

Los caracteres definitorios fundamentales de la población predominante en los cultivos primarios de las células estromales fueron la capacidad de adherencia, su apariencia fibroblastoide y su patrón de crecimiento. A diferencia del crecimiento por islotes confluentes, observado en los cultivos de células epiteliales, las células fibroblastoides siempre mostraron un crecimiento expansivo desde las células individuales hacia las células vecinas a través de sus prolongaciones citoplasmáticas. Esta apariencia es similar a la observada en las células adherentes obtenidas tras la siembra de muestras de MO y de otras fuentes de células mesenquimales (15, 17, 18, 64, 65, 88, 90-93, 221, 222).

Las células adherentes alcanzaron una confluencia de 90% a los 29.6 días en promedio, tiempo similar al señalado por otros investigadores (90, 93). El número de células obtenido al momento de tal confluencia por frasco de cultivo ( $25 \text{ cm}^2$ ) en las 15 muestras varió entre  $187.0$  y  $294.0 \times 10^3$  células, con un promedio de  $225.6 \times 10^3$ . Valores que no podemos comparar con los obtenidos por otros autores, porque las publicaciones prácticamente no hacen referencia a esta fase de cultivo primario en la obtención de las mesenquimales. Unos pocos señalan que en los cultivos primarios la tasa de proliferación medida por técnica de inmunofluorescencia con el anticuerpo ki-67 fue baja, pero que luego se incrementó durante la expansión *in vitro* (69).

Algunos investigadores señalan que las hAMSC son fácilmente expandidas *in vitro*, por al menos 15 pases, sin desarrollar alteraciones morfológicas visibles y con un alto porcentaje de figuras mitóticas (90, 91, 93). Otros afirman que las hAMSC con cada pase

disminuyen su proliferación y sufren muerte celular después del cuarto o quinto pase (69, 88). Es posible que estas diferencias obedezcan a una separación inadecuada entre las células mesenquimales y epiteliales. En nuestra experiencia, los ensayos de expansión *in vitro* evidenciaron que las hAMSC, a diferencia de las hAEC, mantienen su capacidad de proliferación tras cada pase, lo que asegura la posibilidad de acumular un número importante de células mediante subcultivos a densidades subconfluentes. Los cambios relacionados con el envejecimiento celular los observamos entre los P13 y P14.

Existen muy pocas publicaciones que describan la cinética de proliferación de las hAMSC (90). En nuestro estudio utilizamos células en P0, sembradas a una densidad de  $1.0 \times 10^3 / \text{cm}^2$ , y la evaluamos por estimación de la cuenta celular y por MTT. Con ambos métodos, la curva de proliferación celular mostró un patrón similar: una fase de escasa proliferación (período inicial de latencia), seguida por una fase de crecimiento exponencial y una fase de freno proliferativo o pérdida de viabilidad. Cuantitativamente el rendimiento celular a los 21 días en F25 fue de  $1122.0 \pm 32.3 \times 10^3$ . Valor superior al obtenido por Alviano y col. (90) utilizando una metodología similar, pero con siembras de células en P3 en placas de 6 pocillos ( $1122.2 \times 10^3$  vs  $310.0 \times 10^3$ ). De acuerdo con lo que hemos señalado no es relevante que las hAMSC provengan de un P0 o P3.

La eficiencia clonogénica de las hAMSC fue de 8.1 % en promedio (rango: 3.6% – 10.7%), mucho más elevada que la de las hAEC en presencia (0.34%) o ausencia de EGF (0.21%), con una densidad de siembra 10 veces mayor ( $1 \times 10^3 / \text{cm}^2$ ). E igualmente fue superior a la obtenida por nuestro grupo en las MSC de la MO utilizando la misma densidad de siembra (promedio: 5.6%, rango 2.7%-8.0%) (222). No encontramos



publicaciones sobre la eficiencia clonogénica de las hAMSC que nos permitan comparar nuestros resultados, tampoco los relacionados con la cinética del ciclo celular. Esto porque la mayoría de los estudios realizados sobre la caracterización de estas células analizan fundamentalmente los aspectos exigidos para su definición como MSC por la Sociedad Internacional de Terapia Celular, es decir su capacidad de adherencia, su definición inmunofenotípica y su potencial de diferenciación. De lo primero ya hemos hablado.

Las hAMSC obtenidas de las 15 MA estudiadas, revelaron el patrón de expresión antigénica aceptado por la mencionada Sociedad para su definición como MSC (97, 98). Las hAMSC resultaron positivas para el CD73, CD90, CD105 y negativas para los marcadores hematopoyético (CD34, CD45, CD14, CD19) y para antígenos HLA DR, resultados que son consistentes con los obtenidos por otros investigadores en estudios de la MA (17-19, 90, 94, 96, 220) y en MSC derivadas de otras regiones de la placenta (223, 224).

En la literatura se registran algunas controversias acerca de la expresión de los antígenos del sistema HLA. Algunos, como Kubo y col. (225) realizando análisis inmunohistoquímicos sobre MA crio-preserveda, sin cultivo, han demostrado inmunoreactividad positiva para los antígenos HLA clase II. Otros, como Kim y col. (93), utilizando técnicas de PCR señalan que las hAMSC expresan HLA ABC y HLA DR en los pases tempranos y que no lo expresan en los pases tardíos. Bilic y col. (69) utilizando citometría de flujo señalan que las hAMSC en cultivo expresan altos niveles de HLA ABC y no expresan HLA-DR. Igualmente Portmann-Lanz y col. (88), y Wolbank y col. (96) utilizando la misma tecnología señalan que estas células expresan bajos niveles de HLA ABC y no expresan HLA-DR.

El mecanismo por el cual las hAMSC pudieran exhibir una expresión temporalmente regulada de los antígenos HLA ABC y HLA DR no se conoce. Según algunos investigadores, es posible que una vez aisladas las hAMSC de la MA, la pérdida de comunicación con los componentes de la matriz extracelular en la cual se encuentran embebidas haga que se altere el perfil de expresión de genes y con ello la expresión de los antígenos de la membrana. Otros consideran que durante el cultivo puede ocurrir diferenciación y/o senescencia, inducida o no por las condiciones de los medios de cultivo y que el cultivo y los sucesivos pases pueden disminuir la expresión de los antígenos HLA-DR (93). Alternativamente, las discrepancias señaladas por diferentes investigadores se han atribuido a la diferente sensibilidad de los métodos empleados: PCR versus inmunocitoquímica (225, 93) y citometría de flujo (88, 94). Aparentemente la citometría de flujo tiene mayor sensibilidad que la inmunocitoquímica (69).

Lo más aceptado actualmente es que la mayoría de los tipos de MSC no expresan HLA DR, independientemente de su origen: médula ósea (205-209, 226), sangre de cordón umbilical (227), líquido amniótico (95), MA a término (15-19, 67, 68, 69, 70, 72, 90, 93). La ausencia de estos antígenos ha hecho que se consideren como células inmuno-privilegiadas e ideales para los ensayos de terapia celular, incluyendo aquellos en los que pudieran utilizarse como transportadores de genes (82, 145). La duda que aún persiste es si estas propiedades de inmuno-privilegio permanecen después de la diferenciación hacia un tipo de célula particular. Ilancheran y col. (68) han demostrado que las hAEC diferenciadas a cardiomiocitos, páncreas e hígado no expresan antígenos HLA DR.

En cuanto a la expresión de los marcadores celulares embrionarios, los estudios iniciales habían dado a entender que a nivel del amnios solo las hAEC expresaban estos marcadores (67). Más recientemente, los datos publicados por diferentes investigadores (69, 91, 220) han señalado la detección por citometría de flujo de los antígenos embrionarios SSEA-3 y SSEA-4 en los pases primarios y secundarios de las hAMSC con disminución gradual en el número de células positivas para SSEA-4 a partir del P2 (69, 91). En algunos de estos estudios, las técnicas inmunocitoquímicas confirmaron la positividad del SSEA-4 en todas las hAECs, pero solo en 2 de 5 hAMSC. Kim y col. (93) han demostrado en las hAMSC en P7 positividad por inmunocitoquímica para los antígenos SSEA-3 y SSEA-4 y negatividad para los antígenos TRA-1-60.

De igual forma, la investigación por diferentes autores de los marcadores de pluripotencialidad, ha permitido detectar transcritos de Oct 3-4 en los cultivos primarios y secundarios de hAMSC por técnicas de PCR e inmunohistoquímica, siendo la primera la técnica más utilizada (90, 93, 100). En los estudios de Alviano y col. (90) la presencia del transcritto Oct-4, se reveló por qPCR en las hAMSC en pase 5 y su expresión fue mayor que en las BM-MSC. Esto los llevó a considerar estas células en una posición más elevada dentro de la jerarquía de las MSC en comparación con las derivadas de otros tejidos adultos.

En los estudios de Bilic y col. (69) todos los cultivos primarios y secundarios de hAEC y hAMSC fueron positivos para Oct-3/4 y SCF (*stem cell factor*) por PCR, pero la expresión nuclear de la proteína Oct 3/4 no se detectó en ninguna de las muestras de hAMSC, lo que les generó dudas sobre la expresión real de la proteína Oct 3-4 en los cultivos de hAMSC, y

los hizo recomendar tener cautela al momento de predecir troncalidad (*stemness*) solo por la presencia del transcripto de un gen, ya que es importante evidenciar la expresión de la proteína (69). Según ellos, de confirmarse que la proteína Oct-3/4, no se expresa en las hAMSC, la población epitelial debería considerarse menos diferenciada que la población mesenquimal. En nuestro estudio se detectó la expresión de RNAm para Oct-4, Nanog, Sox en las hAMSC, a niveles similares en células en P0 y en P3, esto en oposición a las hAEC las cuales mostraron regulación negativa de estos genes en los sub-cultivos.

Kim y col. (93) en un análisis del perfil de expresión de genes realizado por PCR durante la expansión *ex vivo* de las hAMSC encontraron un patrón de expresión repetitivo que les permitió categorizarlos en tres grupos. Uno, formado por genes expresados consistentemente en todos los pases examinados, estos fueron: Oct-4, Rex-1, SCF, Nestin, vimentina y CK18, NCAM (*Neural cell adhesion molecule*: Molécula de adhesión de células neurales), BMP-4, GATA-4, HNF-4 $\alpha$ . Otro, constituido por genes que nunca se expresaron en las hAMSC en ninguno de sus pases: Brachyury, FGF-5, PAX-6 y BMP-2; y otro, formado por genes que mostraron un patrón de expresión diferencial:  $\alpha$ FP, HLA ABC y HLA-DR expresados en algunas células solo en pases precoces. Según el autor, cambios similares en la expresión temporal de los genes se han observado en las BM-MSC durante la expansión *in vitro*, pero los observados en relación a la expresión de los antígenos HLA ABC y HLA DR, parecen ser propios de las hAMSC. Ya hemos comentado sobre esto previamente.

En cuanto a la diferenciación *in vitro* de las hAMSC hacia células de estirpe mesodérmica, nuestros ensayos utilizando células en P0 con medios inductores estandarizados para la diferenciación de MSC de la MO (Miltenyi Biotec) confirmaron el

potencial de diferenciación de estas células hacia líneas osteogénicas, adipogénicas y condrogénicas, señalado previamente por otros investigadores (88, 90, 91, 94, 93, 99, 210), con lo cual las células cumplen el tercer criterio exigido por la Sociedad Internacional de Terapia Celular para su definición como MSC (97, 98).

La diferenciación osteogénica utilizando el medio Osteodiff® se demostró en todas las muestras obtenidas de las 15 MA estudiadas. Esto coincide con lo señalado por Soncini y col. (91), quienes obtuvieron signos de diferenciación osteogénica hasta el P8, utilizando Osteodiff y otro medio comercial (Osteogenic Differentiation Medium, Cambrex®), e igualmente coincide con lo publicado por Diaz-Prado y col. (220), utilizando este último medio. No así, con lo publicado por Bilic y col. (69) quienes utilizando un medio comercial (Lonza, Walkersville, MD, USA®), obtuvieron una diferenciación osteogénica muy débil, prácticamente insignificante en 4 de las 4 muestras investigadas. Por su parte, Stadler y col. (201) evaluando comparativamente la diferenciación de las hAMSC en 4 medios de inducción osteogénica recomendados en la literatura (88, 94, 205) y un medio estandarizado comercial (O-kit, Stem Cell Technologies®, Vancouver, Canadá), obtuvieron diferenciación de las hAMSC solo en el 75% de las muestras cultivadas en el medio comercial.

La diferenciación adipogénica en el medio Adipodiff® igualmente quedó demostrada en todas las muestras estudiadas a través de la observación en el microscopio de contraste de fase de gotas de grasa intracitoplasmática aún antes de la coloración con el Oil red, observación que no es frecuente porque usualmente se requiere dicha coloración para visualizar las gotas de grasa. Sin embargo, a pesar de lo evidente de la

diferenciación adipogénica en nuestras muestras, ésta no alcanzó el patrón de crecimiento de colonias adipocíticas señalado por Alviano y col. (90), quienes utilizando un medio de inducción adipogénica no comercial observaron desde las dos primeras semanas de cultivo, la acumulación de gotas de lípidos y más tarde agregados compactos grandes secretando abundante cantidad de lípidos neutros. Soncini y col. (91), y Diaz-Prado y col. (220) utilizando un medio de diferenciación comercial (Bulletkit Osteogenic Differentiation Medium, Cambrex®) también lo lograron, pero no en la magnitud que hemos señalado. Otros grupos han obtenido resultados menos satisfactorios. Así, Stadler y col. utilizando tres medios de diferenciación adipogénica no comerciales recomendados en la literatura (88, 94, 205) obtuvieron diferenciación en 50% de las muestras de hAMSC en P2 solo en 2 de los medios (88, 94); y Bilic y col. (69) utilizando el mismo medio de inducción adipogénica utilizado por nosotros no obtuvieron diferenciación en ninguna de las 4 muestras investigadas. Los autores no plantean ninguna hipótesis para explicar sus resultados.

La diferenciación condrogénica realizada en cultivo de micro-masa en el medio Chondrodifff® estandarizado para su uso en MSC de MO y detectada por la coloración para proteoglicanos y colágeno tipo II, igualmente quedó demostrada en todas las muestras. Esta también fue la experiencia de Soncini y col. (91) y de Diaz-Prado y col. (220), así como del grupo de Alviano y col. (90) utilizando cultivos de monocapa en medios con varios factores inductores de diferenciación.

En resumen, nuestros resultados confirman la plasticidad *in vitro* de las hAMSC hacia las 3 líneas mesodérmicas clásicas, lo que las ubica cuando menos en una categoría

similar a las MSC obtenidas de la MO y quizás, superior a otras fuentes investigadas que muestran un potencial de diferenciación inferior, como las células mesenquimales de la pulpa dental, las cuales según algunos investigadores han fallado para diferenciarse hacia líneas condrogénicas (228).

Nosotros no exploramos otras diferenciaciones, pero otros investigadores han demostrado que las hAMSC además de diferenciarse hacia las líneas mesodérmicas señaladas, se diferencian hacia tipos celulares de las tres capas germinales: ectodermo (neural) (88, 102, 103), mesodermo (músculo esquelético, cardiomiocito y células endoteliales) (68, 90, 100, 101) y endodermo (72, 93, 104, 105). Lo que significa que las hAMSC podrían ser ubicadas en una categoría de mayor potencialidad que las MSC de la MO, pues aunque estas comparten muchas de las propiedades celulares que se han detectado en las hAMSC, según D'Ippolito y col. (226), solo un tipo de MSC de la MO, las células MIAMI, expresan los marcadores de pluri-potencialidad y la diferenciación *in vitro* evidenciada por las hAMSC.

#### **Perspectivas futuras:**

Creemos que existen suficientes evidencias que sustentan la utilidad potencial de las células de la MA en un amplio rango de aplicaciones experimentales y clínicas. Que en un futuro cercano, en la medida que se optimicen sus condiciones de cultivo y de expansión para aumentar su potencial proliferativo y prolongar su vida media, así como los métodos de preservación para asegurar una conservación efectiva a largo plazo, se podrá validar la eficacia de estas células en diferentes modelos de enfermedades en animales, y

con ello desarrollar las estrategias para su producción conforme a las exigencias GMP (*Good Manufacturing Practice*), lo que en definitiva permitiría la traslación de los resultados preliminares presentados en esta tesis hacia aproximaciones terapéuticas efectivas.

Igualmente creemos que las células de la MA tienen un futuro esperanzador en el campo de Farmacología y la Toxicología, donde podrían utilizarse las células diferenciadas para la evaluación *in vitro* de la seguridad y los efectos tóxicos de las drogas, y con ello contribuir al desarrollo de nuevas drogas más seguras y eficientes.



## ***CONCLUSIONES***

La interpretación de los resultados obtenidos a través de la utilización de nuestro protocolo de estudio de las células de la membrana amniótica nos permite concluir:

1. La membrana amniótica representa un reservorio de células con características de células madres inmunológicamente privilegiadas.
2. Las células del epitelio amniótico (hAEC) poseen características similares a las células madre embrionarias pluripotentes, y a diferencia de ellas no expresan actividad de la telomerasa transcriptasa reversa (TERT), lo que supone una ventaja para su uso en terapia celular.
3. Las hAEC se adhieren al plástico y se cultivan adecuadamente en medios de cultivos convencionales. No obstante, existe una población de células no adherentes que requieren investigación adicional.
4. El EGF ejerce una influencia favorable sobre la proliferación de las hAEC, aunque algunas proliferan independientemente del EGF.
5. Las hAEC muestran una capacidad clonogénica baja y hasta ahora no ha sido posible lograr su crecimiento a partir de clones de células individuales.
6. Durante los subcultivos las hAECs disminuyen su capacidad de proliferación y experimentan el proceso de Transición Epitelio-Mesénquima.
7. Las hAEC tienen capacidad de diferenciación *in vitro* hacia células de las tres capas germinales: ectodermo (células neurales), endodermo (células hepatocíticas) y mesodermo (células cardiomiocíticas, osteogénicas y adipogénicas).

8. A pesar de que no se ha logrado la auto-renovación a largo término de las hAEC, ni ha sido posible lograr su crecimiento a partir de clones de células individuales, su plasticidad hace que sean consideradas verdaderas células madre.
9. Las células estromales obtenidas a partir del mesodermo amniótico (hAMSC) cumplen todos los criterios exigidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular para su definición como células madre mesenquimales.
10. Las hAMSC forman colonias clonales (UFC-F) fáciles de expandir *in vitro* y su eficiencia clonogénica es superior a la de las hAEC en presencia de EGF.
11. Las hAMSC expresan marcadores asociados a pluripotencialidad.
12. Las hAMSC bajo condiciones adecuadas de cultivos *in vitro* muestran plasticidad hacia las 3 líneas mesodérmicas clásicas (osteogénicas, adipogénicas y condrogénicas), lo que las ubica cuando menos en una categoría similar a las MSC obtenidas de la MO.
13. La MA representa un recurso terapéutico potencial muy valioso para su utilización en ensayos de terapia celular.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

1. Mimeault M, Hauke R, Batra S.K. Stem cells: A revolution in therapeutics- Recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2007; 82 (3):252-264.
2. Moraleda JM, Ruiz F, Blanquer M, Arriba F. ¿Qué son las células madre? *Hematología Mol* 2004; 3:2-5.
3. Barrilleaux B, Phinney D.G, Prockop D.J, O'Connor K.C. Review: *ex vivo* engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Eng* 2006; 12:3007-3019.
4. Smith S, Neaves, W, Teitelbaum S. Adult stem cell treatment for disease. *Science* 2006; 313:439-445.
5. Gurtner GC, Callaghan MJ, Longaker MT. Progress and potential for regenerative Medicine. *Ann Rev Med* 2007; 58:29-312.
6. Bryder D, Rossi D.J, Weissman I.L. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* 2006; 169:338-346.
7. Moraleda JM, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Ruiz F, Bonilla S, Cabanes C, Tabares L, Martinez S. Adult stem cell therapy: Dream or reality? *Transplant Immunology* 2006, 17:74-77.
8. Moraleda JM, Blanquer M, Espuch JG, Pérez MA, Meseguer L, Iniesta F, García A, Férrez X, Insausti C, Martinez S. Terapia celular en enfermedades neurodegenerativas. XXI Congreso Nacional de la SETS. 2010. S7-2: 98-100.
9. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cell from adult human fibroblast by defined factors. *Cell* 2007; 131:861-872.
10. Thomson J, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S, Waknitz M, Swiergiel J, Marsall V, Jones J. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-1147.
11. Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocrine Review* 2006; 27:208-219.
12. Chung Y, Klimanskaya I, Becker s, Li T, Maserati M, Lu S, Zdravkovic T, Ilic D, Genbacev O, Fisher S, Krtolica A, , Lanza R. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell* 2008; 2:113-116.

13. Da Silva Mierelles I, Chgastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all postnatal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006; 119:2204-2213.
14. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cell. *Bone* 2003; 33:919-926.
15. Parolini O, Soncini M. Human Placenta: a source of progenitor/stem cells? *J Reproduktionsmed Endokrinol.* 2006; 3:117-126.
16. Miki T, Strom SC. Amnion derived pluripotent / multipotent stem cells. *Stem Cell Rev* 2006; 2:133-142.
17. Evangelista M, Soncini M, Parolini O. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? *Cytotechnology* 2008; 58:33-42.
18. Insausti CL, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Majado M, Castellanos G, Moraleda JM. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol* 2010; 25: 91-8.
19. Parolini O, Alviano F, Bergwerf I, Boraschi D, De Bar C, De Waele P, Dominici M, Evangelista M, Falk W, Hennerbichler S, Hess DC, Lanzoni g, Liu B, Marongiu F, McGuckin C, Mohr S, Nalli ML, Ofi R, Ponsaerts P, Romagnoli L, Solomon A, Soncini M, Strom S, Surbek D, Venkatachalam S, Wolbank S, Zeisberger S, Zeitlin A, Zisch A, Borlongan CV. Toward cell therapy using placenta-derived cells: Disease mechanisms, cell biology, preclinical studies, and regulatory aspects at the round table. *Stem cells and development* 2010; 19:143-154.
20. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "Stem Cell". *Cell Stem Cell* 2007; 1:35-38.
21. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961; 14:213-224.
22. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cell *Nature* 1963; 197:542-454.
23. Weissman IL. Stem cells: Units of development, unit of regeneration and units of evolution. *Cell* 2000; 100:157-168.
24. Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of stemness. *Experimental Hematology.* 2004; 32:585-598.

25. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: Stem cells and their niches. *Science* 2000; 287:1427-1430.
26. Zipori D. The Stem State: Plasticity Is Essential, Whereas Self-Renewal and Hierarchy Are optional. *Stem Cells* 2005; 23:719-726.
27. Cerny J, Quesenberry PJ. Chromatin remodelling and the stem cell theory of relativity. *J Cell Physiol* 2004; 201:1-16.
28. Smith A. A glossary for stem cell biology. *Nature* 2006; 44: 1060-1061.
29. Ratajczak M, kucia M, Majka M, Reza R, Ratajczak J, Heterogeneous population of bone marrow stem cell - are we spotting on the same cells from the different angles? *Folia Histochemica Et Cytobiologica*. 2004; 42:139-146
30. Evans M, Kaufman M. Establishment in culture from pluripotent stem cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292:154-156.
31. Martin G. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981; 78:7634-7638.
32. Rao M. Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells. *Dev Biol* 2004; 275: 269-286.
33. Klimanskaya I, Chung Y, Meisner L, Johnson J, West MD, Lanza R. Human embryonic stem cells derived without feeder layer. *Lancet* 2005; 365:1636-1641.
34. Fenno LE, Ptaszek LM, Cowan CA. Human embryonic stem cells: emerging technologies and practical application. *Current opinion in Genetics & Development* 2008; 18: 324-329.
35. Zwaka TP, Thomson JA. A germ cell origin of embryonic stem cell? *Development* 2005; 132:227-233.
36. Allegrucci C, Young LE. Differences between human embryonic stem cells lines. *Human Reproduction Update*. 2007; 13:103-120.
37. Przyborski SA, Christie VB, Hayman MW et al. Human embryonal carcinoma stem cells: Models of embryonic development in humans. *Stem Cells Dev* 2004; 13:400-408.

38. Gucciardo L, Lories R, Ochsenbein-Kölble N, Done E, Zwijsen A, Deprest J. Fetal Mesenchymal stem cell isolation properties and potencial use in perinatology and regenerative medicina. *BJOG* 2009; 116:166-172.
39. Mimeault M, Batra S. Concise Review: Recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem cells* 2006; 24: 2319-2345.
40. Fodor W L. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: The potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:102-107.
41. Annas GJ, Eliias S. The politics of transplantation of human fetal tissue. *N.Engl J. Med.* 1989; 20:1079-1082.
42. Zhang J, li L. Stem cell Niche: microenvironment and beyond. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283:9499-9503.
43. Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. A stem cell molecule signature. *Science* 2002; 298:601-604.
44. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cell: Characterization, differentiation and application in cell gene therapy. *J. Cell. Mol. Med* 2004; 8: 301-316.
45. Delorme B, Chateauvieux S, Charbord P. The concept of Mesenchymal stem cells. *Regen med* 2006; 1:497-509.
46. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortíz-González XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418:41-49
47. Herzog E, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow derived stem cells. *Blood* 2003, 102:3484-3493
48. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle and brain. *Exp Hematol* 2002; 30:896-904.
49. Tamagawa T, Ishiwata I, Saito S. Establishment and characterization of a pluripotent stem cell line derived from human amniotic membranes and initiation of germ layers *in vitro*. *Hum Cell* 2004; 17:125-130.



50. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodelling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007; 1:55-70.
51. Stadtfeld M, Maherali N, Breault D, Hochedlinger K: Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2008; 2:230-240.
52. Lohr WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R, Clark AT, Plath K. Generation of human induced stem cells from dermal fibroblasts. *PNAS* 2008; 105: 2883-2888.
53. Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner C, Wernig M, Suh H, Jaenisch R. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Stem Cell* 2008; 2: 151-159.
54. Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey B, Beard C, Wernig M, Creighton M, Steine E, Cassady J, Foreman R, Lengner CJ, Dausman JA, Jaenisch R. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 2008; 133: 250-264.
55. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Kazutoshi T, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochizuki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2007; 26: 101-106.
56. Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, Kim K, Miller JD, Kim K, Daley GQ. Generation of induced pluripotent stem cell from human blood. *Blood* 2009; 113: 5476-5479.
57. Haase A, Olmer R, Schwanke K, Wunderlich S, Merkert S, Hess C, Zweigerdt R, Gruh I, Meyer J, Wagner S, Maier LS, Wook D, Glage S, Miller K, Fischer P, Schöler HR, Martin U. Generation of induced pluripotent stem cell from human cord blood. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 434-441.
58. Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, González F, Rodríguez-Pizá I, Vassena R, Raya A, Boué S, Marreo M, Corbella B, Torradella M, Veiga A, Izpisua J. Generation of induced pluripotent stem cell from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell* 2009; 5:353-357.
59. Bourne G. The Foetal Membranes. A Review of the Anatomy of Normal Amnion and Chorion and Some Aspects of Their Function. *Postgrad Med J* 1962; 38: 193-201.

60. Benirschke K., Kaufman P. Anatomy and Pathology of the placental membranes. In: Pathology of the Human Placenta 4th ed New York: Springer; 2000, 281-334.
61. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian A. Properties of the Amniotic Membrane for potential use in tissue engineering. *European Cells and materials* 2008; 15:88-99.
62. Dobрева MP, Pereira PM, Deprest J, Zwijsen A. On the origin of amniotic stem cells: of mice and men. *Int.J. Dev. Biol.* 2010; 54: 761-777.
63. Han YM, Romero R, Kim JS, Tarca AL, Kim SK, Draghici S, Kusanovic JP, Gotsch F, Mittal P, Hassan SS. Region-specific gene expression profiling: novel evidence for biological heterogeneity of the human amnion. *Biol Reprod* 2008; 79: 954-961.
64. Ilancheran S, Moodley Y, Manuelpillai U. Human Fetal membranes: A source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta* 2009; 30: 2-10.
65. Parolini O, Alviano F, Bagnara G, Bilic G, Bühring H, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, Nikaido T, Portmann-lanz CB, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, Strom S. Concise Review: Isolation and characterization of cells from human term placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells.* 2008; 26: 300-311.
66. Matusbara S, Iwasaki R. Golgi Apparatus and Mitochondri of Human amniotic Epithelial Cells. *Acta Histochem Cytochem* 2004; 37:407-409.
67. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz D, Strom S. Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. *Stem Cells.* 2005; 23:1549-1559.
68. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem cell derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod* 2007; 77:577-588.
69. Bilic G, Zeisberger SM, Mallik AS, Zimmermann R, Zisch AH. Comparative Characterization of Cultured Human Term Amnion Epithelial and Mesenchymal Stromal Cells for Application in Cell Therapy. *Cell Transplantation* 2008; 17:955-968.
70. Miki T, Marongiu F, Ellis E, Strom S. Isolation of Amniotic Epithelial Stem Cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2007; 3:1E.3.1-1E.3.9.

71. Whittle WL, Gibb W, Challis JRG. Characterization of Human Amnion Epithelial and Mesenchymal Cells: The Cellular Expression, Activity and Glucocorticoid Regulation of Prostaglandin output. *Placenta* 2000; 21:394-401.
72. Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, Ota M, Akaike T, Kato T, Konishi I, Nikaido T. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant* 2003; 12:545-552.
73. Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M, Hirasawa M, Kamo I. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. *Neurosci. Lett* 1996; 209: 9-12.
74. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FABER J.* 2005; 19:681-693.
75. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation in volunteers. *Lancet* 1981; 2: 003-1005.
76. Adinolfi M, Akle CA, McColl I, Fenson AH, Tansley L, Connolly P, Hsi BL, Faulk WP, Travers P and Bodmer WF. Expression of HLA antigens, b2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature* 1982; 295: 325- 327.
77. Rodda DJ, Chew, JL, Lim LH, Ioh YH, Wang B, Ng HH, Robson P. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem* 2005; 280:24731-24737.
78. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996; 18: 173-179.
79. Sakuragawa N, Misawa H, Ohsugi K, Kakishita K, Ishii T, Thangavel R, Tohyama J, Elwan M, Yokoyama Y, Okuda O, Arai H, Ogino I, Sato K. Evidence for active acetylcholine metabolism in human amniotic epithelial cells: applicable to intracerebral allografting for neurologic disease. *Neurosci Lett* 1997; 232:53-54.
80. Ishii T, Ohsugi K, Nakamura S, Sato K, Hashimoto M, Mikoshiba K, sakuragawa N. Gene expression of oligodendrocyte markers in human amniotic epithelial cells using neural cell-type-specific expression system. *Neurosci. Lett* 1999; 268:131-134.
81. Elwan MA, Sakuragawa N. Evidence for synthesis and release of catecholamines by human amniotic epithelial cells. *NeuroReport* 1997; 8:3435-3438.
82. Sakuragawa N, Enosawa S, Ishii T, Thangavel R, Tashiro T, Okuyama T, Suzuki S. Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver. *J Hum Genet.* 2000; 45:171-176.
83. Takashima S, Ise H, Zhao P, Akaike T, Nikaido T. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell Struct Funct* 2004; 29:73-83.

84. Vachkova EG, Bivolarski BL. Origin, structure and physiological role of the epidermal growth factor: A review. *Bulg. J. Vet. Med* 2007; 10:223-233.
85. Terada S, Matsuura K, Enosawa S, Hoshika A, Suzuki S, Sakuragawa N. Inducing proliferation of human amniotic epithelial (HAE) cells for cell Therapy. *Cell transplant* 2000; 5: 701-704.
86. Niknejad H, Peirovi H, Ahmadiani A, Ghanavi J, Jorjani M. Differentiation factors that influence neuronal markers expression *in vitro* from human amniotic epithelial cells. *European Cells and Materials* 2010; 19:22-29.
87. Miki T, Marongiu F, Ellis EC, Dorko K, Mitamura K, Ranade A, Gramignoli R, Davila J, Strom SC. Production of hepatocyte-like cells from human amnion. *Methods Mol Biol* 2009; 481:1-14.
88. Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W, Surbek DV. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194:664-673.
89. Hou Y, Huang Q, Hou Y, Huan g Q, Liu T, Guo L. Human amnion epithelial cells can be induced to differentiate into functional insulin-producing cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008; 40: 830-839.
90. Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, Lanzoni G, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Tazzari PL, Pasquinelli G, Foroni L, Ventura C, Grossi A, Bagnara GP. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells *in vitro*. *BMC developmental Biology*. 2007; 7:1-14.
91. Soncini M, Vertua E, Gibelli L, Zorzi F, Denegri M, Albertini A, Wengler G S, Parolini O. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1:296-305.
92. Bailo M, Soncini M, Vertua E, Bonass P, Sanzone S, Lombardi G, Arienti D, Calamani F, Zatti D, Paul P, Albertini A, Zorzi F, Cavagnini A, Candotti F, Wengler GS, Parolini O. Engraftment Potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation* 2004; 78:1439-1448.
93. Kim J, Mi Kang H, Kim H, Ran Kim M, Chan Kwon H, Chan Gye M, Goo Kang S, Seung Yang H, You J. Ex Vivo characteristics of human amniotic membrane-derived stem cells. *Cloning and stem cells* 2007; 9: 581-594.
94. In't Anker P, Scherjon S, Kleijburg-van der Keur C, Groot-Swings G, Claas F, Fibb W, Kanhai H. Isolation of Mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 2004; 22:1338-1345.

95. Steigman SA, Fauza DO. Isolation of Mesenchymal Stem Cells from amniotic fluid and placenta. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2007; 1:1E.2.1-1E.2.12.
96. Wolbank S, Peterbauer A, Fahrner M, Hennerbichler S, van Griensven M, Stadler G, et al. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng* 2007; 13:1173-83.
97. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbanch I, Marini FC, Krause DS et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8:315-317.
98. Horwitz E, Le BK, Dominici M, Mueller. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7:393-395.
99. Wei JP, Nawata M, Wakitani S, Kametani K, Ota M, Toda A, Konishi I, Ebara S, Nikaido T. Human Amniotic Mesenchymal Cells Differentiate into Chondrocytes. *Cloning and Stem Cells* 2009; 11:19-25.
100. Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation* 2005; 79:528-535.
101. Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, Cavallini C, Scarlata I, Foroni L, Maioli M, Bonsi L, Alviano F, Fossati V, Bagnara GP, Pasquinelli G, Recchia FA, Perbellini A. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic acid drives cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *Journal of Biological chemistry* 2007; 282:14243-14252.
102. Sakuragawa N, Kakinuma K, Kikuchi A, Okano H, Ushida S, kamo I. Human Amnion mesenchymal cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. *J. Neurosci Res* 2004; 78:208-214.
103. Portmann-Lanz B, Schoeberlein A, Portmann R, Mohr S, Rollini P, Sager R, Surbek DV. Turning placenta into brain: Placenta mesenchymal stem cells differentiate into neurons and oligodendrocytes. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202:294.e1-294.211.
104. Tamagawa T, Oi S, Ishiwata I, Ishiwata H, Nakamura Y. Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro. *Hum Cell* 2007; 20:77-84.

105. Parviz F, Matullo C, Garrison WD, Savatski L, Adamson JW, Ning G, Kaestner KH, Rossi GM, Zaret KS, Duncan SA. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat Genet* 2003; 34:292-296.
106. Chan J, Kennea NL, Fisk NM. Placental mesenchymal stem cells. *Am J obstet Gynecol* 2007; 196: e18; author reply e18-19
107. Houlihan JM, Biro PA, Harper HM: The human amnion is a site of MHC class Ib expression: evidence for the expression of HLA-E y HLA-G. *J Immunol* 1995; 154:5665-5674.
108. Li H, Niederkorn J, Neelam S, Mayhew E, Word R, McCulley J, Alizadeh H. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:900-907.
109. Magatti M, de Munari S, Vertua E, Nassuato C, Albertini A, Wengel GS, Parolini O. Amniotic mesenchymal tissue cell inhibit dendritic cell differentiation of peripheral blood and amnion resident monocytes. *Cell Transplant* 2009; 18:899-914.
110. Jones S, Horwood N, Cope A, Dazzi F. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cell is a fundamental property shared by all stromal cells. *J Immunol* 2007; 179: 2824-2831.
111. Li C, Zhang W, Jiang X, Mao N. Human-placenta-derived mesenchymal stem cells inhibits proliferation and function of allogenic immune cell. *Cell Tissue Res* 2007; 330:437-446.
112. Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS, Eom Y, Lee JE, Kim YJ, Yang SK, Jung HL, Sung KW, Kim CW, Koo HH. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol* 2009; 259: 150-156.
113. Magatti M, De Munari S, Vertua E, Gibelli L, Wengler GS, Parolini O. Human Amnion mesenchyme harbors cells with allogenic T-cell suppression and stimulation capabilities. *Stem cells* 2008; 26:182-192.
114. Toda A, Okabe M, yoshida T, Nikaido T. The Potential of Amniotic Membrane/Amnion - derived cells for regeneration of Various Tissues. *J Pharmacol Sci* 2007; 105:215-228.
115. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000;20:173-177.

116. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and anti-inflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000; 19:348-352.
117. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SCG. Suppression of interleukin 1 (alpha) and interleukin 1 (beta) in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 2001; 85:444-449.
118. Kamiya K, Wang M, Uchida A, Amano S, Oshika T, Sakuragawa N, et al. Topical application of culture supernatant from human amniotic epithelial cells suppress inflammatory reaction in cornea. *Exp Eye Res* 2005; 80:671-679.
119. Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Hyaluronic aci-CD44 interaction mediated the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma. *Cornea* 2005; 24:206-212.
120. King AE, Paltoo A, Nelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR. Expression of natural antimicrobials by human placenta y foetal membranes. *Placenta* 2007; 28:161-169.
121. Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, Petkova AP, Weiner CP, Saed GM. The novel antimicrobial beta 3 defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:1678-1687.
122. Ni J, Abrahamson M, Zhang M. Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family 2 cystatins. *J Biol Chem* 1997; 272:10853-10858.
123. Kjaergaard N, Hein M, Hytte L. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 94:224-229.
124. Faulk WP, Matthews R, Stevens PJ, Bennett JP, Burgos H, His BL. Human amnion as an adjunct in wound healing. *Lancet* 1980; 1: 1156-1158.
125. Lee SH, Tseng SC. Amniotic Membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997; 123: 303-312.
126. Insausti CL, Alcaráz A, García-Vizcaíno EM, Mrowiec A, López-Martínez MC, Blanquer M, Piñero A, Majado MJ, Moraleda JM, Castellanos G, Nicolás FJ. Amniotic membrane induces epithelialization in massive posttraumatic wounds. *Wound Rep Reg* 2010; 18: 368-377.

127. Tseng SCG, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 1999; 179:325-335.
128. Longaker MT, Adzick NS. The biology of fetal wound healing: a review. *Plast reconstr surg* 1991; 87:788-798.
129. Sakuragawa N, Yoshikawa H, Sasaki M. Amniotic tissue transplantation: and biochemical evaluations for some lysosomal storage diseases. *Brain Dev* 1992; 14:7-11.
130. Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at the John Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J* 1910; 15:307-396.
131. Stern W. The grafting of preserved amniotic membrane to burned and ulcerated skin. *JAMA* 1913; 13:973-974.
132. Trefold JD, Treford-Sauer M. The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 134:833-845.
133. Ganatra MA. Amniotic membrane in surgery. *J Pak Med assoc* 2003; 53:29-32.
134. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan S. The Amniotic membrane in ophthalmology. *Survey of Ophthalmology* 2004; 49:51-77.
135. Gomes JA, Roman A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol* 2005; 16:233-240.
136. Baradaran-Raffi A, Aghayan HR, Arjmand B, Javadi MA. Amniotic Membrane Transplantation. *Iranian journal Of Ophthalmic Research* 2007; 2:58-73.
137. Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, Itakura T, Sakurawaga N. Human Amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a potential source of donor for transplantation therapy. *Exp Neurol* 2000; 165:27-34.
138. Kakishita K, Nakao N, Sakurawaga N, Itakura T. Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res* 2003; 980: 48-56.
139. Sankar V, Muthusamy R. Role of human amniotic epithelial cell transplantation in spinal cord injury repair research. *Neuroscience* 2003; 118, 1- 17.
140. Wu ZY, Hui GZ, Lu Y, Wu X, Guo LH. Transplantation of human amniotic epithelial cells improves hindlimb function in rats with spinal cord injury. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119:2101-2107.



141. Kong XY, Cai Z, Pan L, Zhang L, Shu J, Dong YL, Yan N, Li Q, Huan Xj, Zuo PP. Transplantation of human amniotic cells exerts neuroprotection in MPTP-induced Parkinson disease mice. *Brain Res* 2008; 1205:108-115.
142. Liu Y, Wu J, Huang Q, Hou J, Jiang Z, Zang S, Guo L. Human Amniotic epithelial cells ameliorate behavioral dysfunction and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Shock* 2008; 29:603-611.
143. Yu SJ, Soncini M, Kaneko Y, Hess DC, Parolini O, Borlongan CV. Amnion a potent graft source for cell therapy in stroke: *Cell Transplant* 2009; 18:111-118.
144. Yang Xin-xin, XUE Shou-ru, DONG Wan-li and Kong Yan Therapeutic effect of human amniotic epithelial cell transplantation into the lateral ventricle of hemiparkinsonian rats. *Chinese Medical Journal* 2009; 122:2449-2454.
145. Takahashi S, Ohsugi K, Yamamoto T, Shiomi M, Sakuragawa N. A novel approach to ex vivo gene therapy for familiar hypercholesterolemia using human amniotic epithelial cells as transgene carrier. *Tohoku J Exp med.* 2001; 193:279-292.
146. Takahashi N, Enosawa S, Mitani T, Lu H, Suzuki S, Amemiya H, et al. Transplantation of amniotic epithelial cells into fetal rat liver by in utero manipulation. *Cell Transplant* 2002; 11:443-449.
147. Manuelpillai I, Tchongue J, Lourensz D, Vaghjiani V, Samuel C, Liu A, Williams E, Sievert W. transplantation of human amniotic epithelial cells reduce hepatic fibrosis in immunocompetent CCl<sub>4</sub>-treated mice. *Cell Transplantation* 2010; 19:1157-1168.
148. Kehart I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. Human Embryonic stem cell can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001; 108: 407-414.
149. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103:697-705.
150. Cargnoni A, Di Marcello M, Campagnol M, Nassuato C, Albertini A, Parolini O. Amniotic Membrane Patching promotes Ischemic Rat Heart Repair. *Cell Transplant* 2009; 18: 1147-1159.
151. Cargnoni A, Gibelli L, Tosini A, Signoroni PB, Nassuato C, Arienti D, Lombardi G, Albertini A, Wengler GS, Parolini O. Transplantation of allogenic and xenogenic placenta derived cells reduces bleomycin-induced lung fibrosis. *Cell Transplant* 2009; 18:405-422.

152. Moodley Y, Ilancheran S, Samuel C, Vaghjiani V, Atienza D, Williams E, Jenkin G, Wallace E, Trounson A, Manuelpillai U. Human amniotic epithelial cell transplantation abrogates lung fibrosis and augment repair. *Am J Respi Crit Care Med* 2010; 182: 643-651.
153. Yuge I, Takumi Y, Koyabu K, Hashimoto S, Takashima S, Fukuyama T, et al. Transplanted human amniotic epithelial express connexin 26 y Na-K-ATPase in the inner ear. *Transplantation* 2004; 77:1452-1454.
154. Xing L, Franz MG, Marcelo CL, Smith CA, Marshall VS, Robson MC. Amnion-Derived Multipotent Progenitor Cells increase gain of incisional breaking strength and decrease incidence and severity of acute wound failure. *Journal of Burns and wounds* 2007; 7:39-52.
155. Prather WR, Toren A, Meiron M, Ofir R, Tschöpe C, Horwitz EM. The role of placental-derived adherent stromal cell (PLX-PAD) in the treatment of critical limb ischemia. *Cytotherapy* 2009; 11: 427-434.
156. McDonal C, Siatskas C, Bernard C. The emergence of amnion epithelial stem cells for the treatment of Multiple Sclerosis. *Inflammation and Regeneration* 2011; 31:256-271.
157. Lanzoni G, Roda G, Belluzzi A, Roda E, Bagnara GP. Inflammatory bowel disease: moving toward a stem cell-based therapy. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4616-4626.
158. Prather WR, Toren A, Meiron M. Placental-derived and expanded mesenchymal stromal cell (PLX-1) to enhance the engraftment of hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood. *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8:1241-1250.
159. Hiwase SD, Dyson PG, To LB, Lewis I. Co-transplantation of placental MSCs enhances single and double cord blood engraftment in NOD/SCID mice. *Stem Cells* 2009; 27:2293-2300.
160. Wilshaw SP, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Production of an acellular Amniotic membrane Matrix for use in Tissue Engineering. *Tissue Eng* 2006; 12:2117-2129.
161. Yang L, Shirakata Y, Shudou M, Dai X, Tokumaru S, Hirakawa S, Sayama K, Hamuro J, Hashimoto K. New skin-equivalent model from de-epithelialized amnion membrane. *Cell Tissue Res* 2006; 326:69-77.
162. Hopkinson A, Shanmuganathan VA, Gray T, Yeung AM, Lowe J, James DK, Dua HS. Optimization of Amniotic Membrane (AM) denuding for tissue engineering. *Tissue Eng: Part C Methods* 2008; 14: 371-381.

163. Hennerbichler S, Reichl B, Pleiner D, Gabriel C, Redl H. The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. *Cell Tissue Bank* 2007a; 8:1-8.
164. Hennerbichler S, Reichl B, Wolbank S, Eibl J, Gabriel C, Redl H. Cryopreserved amniotic membrane release angiogenic factors. *Wound Rep Reg* 2007b; 15:A15.
165. Short Aj, Secker GA, Lomas RJ, Wilshaw SP, Kearney JN, Tuft SJ, Daniels JT. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials* 2009; 30:1056-1065.
166. von Versen-Höynck F, Siring C, Bachmann S, Möler DE. The influence of different preservation and sterilisation steps on the histological properties of amnion allograft- light and scanning electron microscopic studies. *Cell Tissue Bank* 2004; 5:45-56.
167. Danielsen N, Muller H, Pettmann B, Williams LR, Davis GE, Engvall E, Manthorpe M and Varon S. Rat amnion membrane matrix as substratum for regenerating axons from peripheral and central neurons: effects in a silicon chamber model. *Brain res* 1988; 467:39-50.
168. Kim JC y Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995; 14: 473-484.
169. Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 2000; 19:65-71.
170. Mohamed J, Shenaq J, Rabinovsky E, Shenaq S. Modulation of peripheral nerve regeneration: a tissue engineering approach. The role of amnion tube nerve conduit across a 1 centimeter nerve gap. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105:660-666.
171. Mligiliche N, Endo K, Okamoto K, Fujimoto E, Ide C. Extracellular matrix of human amnion manufactured into tubes as conduits for peripheral nerve regeneration. *J Biomed mater res* 2002; 63:591-600.
172. Miyamoto K, Hayashi K, Suzuki T, Ichihara S, Yamada T, kano Y, Yamabe T, Ito Y. Human placenta feeder layer support undifferentiated growth of primate embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004; 22:433-440.
173. Ueno M, Matsumura M, Watanabe K, Nakamura T, Osakada F, Takahashi M, Kinoshita S, Sasai Y. Neural Conversion of ES cells by an inductive activity of human amniotic membrane matriix. *Proc Natl acad Sci USA* 2006; 103:9554-9559.

174. Schroeder A, Theiss C, Steuhi KP, Meller K, Meller D. Effects of the human amniotic membrane on axonal out-growth of dorsal root ganglia neurons in culture. *Curr Eye Res* 2007; 32:731-738.
175. Jin CZ, Park SR, Choj BH, Lee KY, Kang CK, Min BH. Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair. *Tissue Eng* 2007; 13:693-702.
176. Boo L, Sofiah S, Selvaratnam L, Tai CC, Pinguan-Murphy B, Kamarul T. A Preliminary Study of Human Amniotic Membrane as a Potential Chondrocyte Carrier. *Malaysian Orthopaedic Journal* 2009; 3:16-23.
177. Potzmann-Lanz CB, Ochsenbein-Kolbe N, Marquardt K, Luthi U, Zisch A, Zimmernann R. Manufacture of a cell-free amnion matrix scaffold that supports amnion cell outgrowth in vitro. *Placenta* 2007; 28: 6-13.
178. Tsai SH, Liu YW, Tang WC, Zhou ZW, Hwang CY, Hwang GY, Ou BR, Hu CP, Yang VC, Chen JK. Characterization of porcine arterial endothelial cells cultured on amniotic membrane, a potential matrix for vascular tissue engineering. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007; 357: 984–990.
179. Ma DH, Lai JY, Cheng HY, Tsai CC, Yeh LK. Carbodiimide cross-linked amniotic membranes for cultivation of limbal epithelial cells. *Biomaterials*. 2010; 31:6647-6658.
180. Brooke G, Rosetti T, Pelekanos R, Ilic N, Murray P, Hancock S, Antonenas V, Huang G, Gottlieb D, Bradstock K, Atkinson K. Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials. *British Journal of Haematology* 2009; 144:571-579.
181. De Roth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. *Arch Ophthalmol* 1940; 23:5 22-525.
182. Sorby A, Symons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of eye. *Br J Ophthalmol* 1946; 30:337-345.
183. Colucho G, Graham WP, Greene AE, Matheson DW, Lynch D. Human amniotic membrane as physiologic wound dressing. *Arc Surg* 1974; 109:370-373.
184. Mermet I, Potter N, Sainthillier JM, Malugani C, Cairey-Remonnay S, Maddens S, Riethmuller D, Tiberghien P, Humbert P, Aubin F. Use of Amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen* 2007; 15:459-464.

185. Singh R, Chouhan US, Purohit S, Gupta P, Kumar P, Kumar A, et al. Radiation processed amniotic membranes in the treatment of non-healing ulcers of different etiologies. *Cell Tissue bank* 2004; 5:129-134.
186. Hasegawa T, Mizoguchi M, Haruna K, Mizuno Y, Muramatsu S, Suga Y, et al. Amnia for intractable skin ulcers with recessive dystrophic epidermolysis bullosa: report of three cases. *J Dermatol* 2007; 34:328-332.
187. Tolhurst DE, Van der Helm TW. The treatment of vaginal atresia. *Surg Gynecol Obstet* 1991; 172:407-414.
188. Georgy MS, Aziz NL. Vaginoplasty using amnion graft: new surgical technique using the laparoscopic transillumination light. *J Obstet Gynaecol* 1996; 16: 262-264.
189. Morton KE, Dewhurst CJ. Human amnion in the treatment of vaginal malformations. *Br J Obstet Gynaecol* 1986; 93:50-54.
190. Fishman IJ, Flores FN, Scott FB, SpjutHJ, Morrow B. Use of fresh placental membranes for bladder reconstruction. *J Urol* 1987; 138:1291-1294.
191. Bandt FT, Albuquerque CD, Lorenzato FR. Female urethral reconstruction with amnion grafts. *Int J Sur Invest* 2001; 1:409-414.
192. Zohar Y, Talmi YP, Filkenstein Y, Shvili Y, Sadov R, Laurean N. Use of Amniotic membrane in otolaryngologic practice. *Laryngoscope* 1987; 97:978-980.
193. Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK, Fatima A, Ifthekar G, Singh S, Nutheti R, Rao GN. Clinical outcome of autologous cultivated limbal epithelium transplantation. *Indian J Ophthalmol* 2006; 54:29- 34.
194. Diaz-Prado S, Rendal-Vázquez M, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Rodríguez-Cabarcos M, Fuentes-Boquete I, de Toro F, Blanco F. Potential use of the human amniotic membrane as a scaffold in human articular cartilage repair. *Cell Tissue Bank* 2010; 11: 183-195.
195. Redondo P, Giménez de Azcarate A, Marqués L, García-Guzman M, Andreu E, Prósper F. Amniotic Membrane as a Scaffold for Melanocyte Transplantation in Patients with Stable Vitiligo. *Dermatology Research and Practice* 2011; Article ID 532139, 6 pages doi:10.1155/2011/532139
196. Yeager AM, Singer HS, Buck JR, Matalon R, Brennan S, O'Donnell S and Moser HG. A Therapeutic Trial of Amniotic Epithelial Cell Implantation in Patients with Lysosomal Storage Diseases. *Am J Med Gen* 1985; 22:347-355.
197. Akle C, Mccoll I, Dean M, Adinolfi M, Brown S, Fensom AH, Marsh J, Welsh K. Transplantation of amniotic epithelial membranes in patients with mucopolysaccharidoses. *Exp Clin Immunogenet* 1985; 2:43-48.

198. Chan RW, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stroma cells. *Biol Reprod* 2004; 70:1738-1750.
199. Mendez MG, Kojima SI, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J*. 2010; 24:1838-1851.
200. Schwartz PH, Bryant PJ, Fuja TJ, Su H, O'Dowd DK, Klassen H. Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *J Neurosci Res*. 2003; 74:838-851.
201. Stadler G, Hennerbichler, Lindenmair A, Peterbauer A, Hofer K, van Griensven M, Gabbriel C, Redl H, Wolbank S. Phenotypic shift of human amniotic epithelial cells in culture is associated with reduced osteogenic differentiation in vitro, *Cytotherapy* 2008; 10:741-752.
202. Kalluri R. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J. Clin. Invest*. 2009; 119: 1417-1419.
203. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest*. 2009; 119: 1421-1428.
204. Fenderson BA, Andrews PW, Nudelman E, Clausen H, Hakomori S. Glicolipid core structure switching from globo-to lacto-and ganglioseries during retinoic acid- induced differentiation of TERA-2-derived human embryonal carcinoma cells. *Dev Biol* 1987; 122: 21-34.
205. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-147.
206. Mareschi K, Ferrero I, Rustichelli D, Aschero S, Gammaitoni L, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J cell Biochem* 2006 97:744-754.
207. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 9: 2615-2625.
208. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000, 61:364-370.
209. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lundt T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302.

210. Miki T, Mitamura K, Ross MA, Stolz DB, Strom SC. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *Journal of Reproductive Immunology* 2007; 75:91-96.
211. Izumi M, Pazin BJ, Minervini CF, Gerlach J, Ross MA, Stolz DB, Turner ME, Thompson RL, Miki T. Quantitative comparison of stem cell marker-positive cells in fetal and term human amnion. *Journal of Reproductive Immunology* 2009; 81:39-43.
212. Gicquel JJ, Dua HS, Brodie A, Mohammed I, Suleman H, Lazutina E, James DK, Hopkinson A. Epidermal growth factor variations in amniotic membrane used for ex vivo tissue constructs. *Tissue Engineering. Part A.* 2009; 15: 1919-1927.
213. Ochsenbein-Kolbe N, Bilic G, Hall H, Huch R, Zimmermann R. Inducing proliferation of human amnion epithelial and mesenchymal cells for prospective engineering of membrane repair. *J Perinat med* 2003; 31:287-294.
214. Pratama G, Vaghjani V, Tee JY, Liu YH, Chan J, Tan C, Padma M, Gargett C, Manuepillai U. Changes in cultured expanded human amniotic epithelial cells: Implications for potential therapeutic applications. *PLoS One* 2011; 6: 1-11.
215. Koyano S, Fukui A, Uchida S, Yamada K, Asashima M, Sakuragawa N. Synthesis and release of activin and noggin by cultured human amniotic epithelial cells. *Dev Growth Diff.* 2002; 44:103-112.
216. Uchida S, Inanaga Y, Kobayashi M, Hurokawa S, Araie M, Sakuragawa N. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells. *J Neurosci Res* 2000; 62:585-590.
217. Hyde T, Lipska B, Sli T, Mathew S, Law A, Metitiri O, Straub R, Ye T, Colantuoni C, Herman M, Bigelow L, Weinberg D, Kleinman J. Expression of GABA Signaling Molecules KCC2, NKCC1, and GAD 1 in Cortical Development and Schizophrenia. *The Journal of neuroscience* 2011; 31: 11038-11095.
218. De La Forest A, Nagaoka M, Si-Tayeb K, Noto FK, Konopka G, Battle M, Duncan SA. HNF-4A is essential for specification of hepatic progenitors. *Development* 2011; 138: 4143-4153.
219. Han Z, Yi P, Li X, Olson E. Hand, an evolutionarily conserved bHLH transcription factor required for *Drosophila* cardiogenesis and hematopoiesis. *Development and Disease* 2006; 133: 1175-1182.
220. Diaz-Prado S, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Rendal-Vázquez M, Fuentes-Boquete I, de Toro F, Blanco F. Multilineage Differentiation Potential of cells isolated from human Amniotic Membrane. *J.Cell.Biochem* 2010; 111: 846-857.

221. Rodriguez FJ, Bueno C, Insausti C, Meseguer L, Ramírez MC, Blanquer M, Marín N, Martínez S, Moraleda JM. Mesenchymal stem cell derived from dental tissue. *International Endodontic journal*. Doi.10.1111/j.1365-2591.2011.01877.x
222. Insausti Carmen L, Miguel Blanquer Blanquer, Luis Meseguer Olmo, Maria C. Lopez-Martinez, Xavier Ferez Ruiz, Francisco J. Rodriguez Lozano, Valentin Cabañas Perianes, Consuelo Funes, Francisco J. Nicolas, Maria J. Majado, and Jose M. Moraleda Jimenez. Isolation and Characterization of Mesenchymal stem Cells from the fat layer on the density gradient separated bone marrow. *Stem cell and Development* 2011; 00:1
223. Zhang X, Mitsuri A, Igura K, Takahashi K, Ichinose s, Yamaguchi S, Takahashi TA. Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340: 944-952.
224. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 2004; 6:543-553.
225. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:1539-1546.
226. D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 2004; 15:2971-2981.
227. Lee OK, Kuo Tk, Chen WM, lee KD, Hsieh SL, Chen Th. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103:1669- 673.
228. Pierdomentico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinatti M, Chirumbolo G, Becchetti E, Marchionni C, Alviano F, Fossati V, Staffolani N, Franchina M, Grossi A, Bagnara GP. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* 2005; 80: 836-842.



## ***APORTACIONES***

### **1. Generación de otros proyectos:**

Para nuestro Grupo de Terapia Celular, cuyo objetivo común es la investigación traslacional, el estudio de MA y la caracterización de sus células ha inspirado la realización de tres ensayos en animales actualmente en curso: uno, relacionado con la inducción de factor VIII tras el trasplante de hAMSC o de AMSC obtenidas de MA de ratones sanos en un modelo murino de hemofilia A, en el cual se pretende evaluar si dichas células inducen en el hígado de los ratones enfermos la expresión de FVIII, aumentando sus niveles séricos lo suficiente para mejorar las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Otro, relacionado con el trasplante intracardiaco de MSC procedentes de MA de conejas sanas, en conejos con cardiomiopatía dilatada inducida por antraciclinas, cuyo objetivo es evaluar si la inyección intracardiaca de dichas células es capaz de mejorar la fracción de eyección y los otros parámetros propios de la miocardiopatía dilatada. Un tercero, en el que se busca evaluar en ratones con grandes heridas cutáneas el efecto promotor de la epitelización de la MA utilizada como apósito biológico. Adicionalmente, en el futuro inmediato se tiene previsto iniciar un estudio sobre el efecto inmunomodulador y anti-inflamatorio de las células de la MA en un modelo murino de Enfermedad Injerto contra Huésped crónica, convencidos de que el papel específico de estas células en mantener la tolerancia feto-materna durante el embarazo, sumado a sus otras características inmunomoduladoras, puede representar una ventaja sobre las otras fuentes.

Para todos estos ensayos la puesta a punto del protocolo de manipulación, procesamiento, aislamiento y caracterización de las células de la MA en humanos, la tecnología desarrollada y la experiencia adquirida durante la realización de esta tesis doctoral ha representado un apoyo insustituible para los investigadores que han iniciado tales ensayos porque les ha permitido validar protocolos de aislamiento y caracterización de las células de la MA en modelos animales (ratones y conejos), desarrollados a partir del protocolo original.

A nivel de experimentación básica, la observación del Proceso de Transición Epitelio Mesénquima (TEM) durante el cultivo de las hAEC ha generado una serie de estímulos para la investigación mecanística del proceso y sus posibles implicaciones en la ruptura prematura de las membranas fetales, e igualmente como modelo para el estudio de los mecanismos de adhesión e integración celular.

Se ha generado igualmente un gran interés en el estudio de las características ultraestructurales de la MA para evaluar los cambios que ocurren durante su criopreservación a  $-80^{\circ}\text{C}$  y durante el cultivo de las células en medios de diferenciación.

Paralelamente a estos ensayos experimentales, se ha diseñado también un ensayo clínico para evaluar el efecto de la MA sobre la regeneración del epitelio cutáneo en pacientes con úlceras extensas postraumáticas, y se han obtenido las pruebas de concepto y las primeras experiencias en pacientes.

Finalmente, de nuestros ensayos sobre la MA se han derivado temas para tesis de Licenciatura, Maestría y Doctorado.

## 2. *Publicaciones:*

**Insausti CL**, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Majado M, Castellanos G, Moraleda JM. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol* 2010; 25: 91-8.

**Insausti CL**, Alcaráz A, García-Vizcaíno EM, Mrowiec A, López-Martínez MC, Blanquer M, Piñero A, Majado MJ, Moraleda JM, Castellanos G, Nicolás FJ. Amniotic membrane induces epithelialization in massive posttraumatic wounds. *Wound Rep Reg* 2010; 18: 368-377.

**Insausti CL**, Blanquer M, Majado M, Insausti A, Moraleda JM. Utilidad terapéutica potencial de las células madre de la membrana amniótica. *Rev Mex Hematología*. 2011 N° 4.

Alcaraz A, Mrowiec A, **Insausti CL**, García-Vizcaíno E, López-Martínez C, Moraleda JM, Nicolás JF. Autocrine TGF $\beta$  production in human Amniotic Epithelial Cells (hAECs) induces Epithelial to Mesenchymal Transition. Aceptado en *Cell Transplantation*.

## 3. *Presentaciones en congresos:*

**Carmen L Insausti**. Ponencia Invitada: LA MEMBRANA AMNIOTICA COMO FUENTE DE CÉLULAS MADRE. Curso Terapia Celular y Medicina Regenerativa La nueva era del trasplante. Universidad Internacional del Mar de la Universidad de Murcia Julio 2008.

A Alcaraz, C López-Martínez, EM García-Vizcaíno **CL Insausti**, M Blanquer, A Piñero, JM Moraleda, G Castellanos y FJ Nicolás.

EFFECTO DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA SOBRE LA EXPRESIÓN GENÉTICA INDUCIDA POR TGF $\beta$  EN CÉLULAS HaCaT.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XXXI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Bilbao, España, septiembre, 2008.

**CL Insausti**, G. Castellanos, M. Blanquer, M. J. Majado, P. Bleda, F. Iniesta, F. J. Rodríguez Lozano, F. J. Nicolás, J. M. Moraleda.

USE OF AMNIOTIC MEMBRANE AS A REPARATIVE WOUND DRESSING IN PATIENTS WITH POST-TRAUMATIC WOUNDS. PRELIMINARY RESULTS.

Tipo de participación: Póster

Congreso: 35th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Göteborg, Sweden Abril 2009

Alcaraz Antonia, **Insausti Carmen L**, López-Martínez Concepción, García-Vizcaíno Eva M., Blanquer Miguel, Castellanos Gregorio, Moraleda José M., Nicolás Francisco J.

AM INDUCES REEPITHELIALIZATION IN LARGE SURFACE DEEP WOUNDS BY OPPOSING TGF $\beta$  SIGNALLING IN HUMAN PRIMARY KERATINOCYTES

Tipo de Participación: Póster

Congreso: TGF $\beta$  Signaling in Development and Disease. FASEB Summer Research Conference. Arizona, EEUU, Junio 2009

Alcaraz Antonia, **Insausti Carmen L**, López-Martínez Concepción, García-Vizcaíno Eva M, Blanquer Miguel, Castellanos Gregorio, Moraleda José M, Nicolás Francisco J.

EFFECT OF AMNIOTIC MEMBRANE ON TGF BETA CELL SIGNALLING IN KERATINOCYTES. CONSEQUENCES FOR AM INDUCED REEPITHELIALIZATION IN LARGE SURFACE DEEP WOUNDS.

Tipo de Participación: Póster Congreso: ISSCR 7th Annual Meeting

Barcelona, Julio 2009.

**Carmen L Insausti**. Ponencia Invitada: Estudio preliminar de Terapia celular con Membrana Amniótica en grandes heridas Reunión de la Red y Curso de Terapia Celular. Pamplona 26-27 de Noviembre de 2009.

**Carmen L Insausti**, Antonia Alcaraz García, Eva María García Vizcaíno, Anna Mrowiec, Concepción López Martínez, Miguel BlanquerBlanquer, Antonio Piñero Madrona, Maria Juliana Majado, José María Moraleda Jiménez, Gregorio Castellanos Escrig, Francisco José Nicolás Villaescusa.

AMNIOTIC MEMBRANE INDUCES EPITHELIALISATION IN MASSIVE POST-TRAUMATIC WOUNDS.

Tipo de Participación: Póster

XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba, Septiembre 2010.

Antonia Alcaraz García, Concepción López Martínez, Anna Mrowiec, Eva María García Vizcaíno, Asun Monfort, Ander Izeta Permisán, José M Moraleda Jiménez, **Carmen L Insausti**, Francisco José Nicolás Villaescusa.

AMNIOTIC MEMBRANE INDUCES RE-EPITHELIALISATION IN DEEP LARGE-SURFACE WOUNDS BY OPPOSING TGF $\beta$  SIGNALLING AND INDUCING c-Jun EXPRESSION. Tipo de Participación: Póster

XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba, Septiembre 2010.

Mrowiec, Anna; Alcaraz, Antonia; López-Martínez, Concepción; García-Vizcaíno, Eva M; Moraleda, José M.; **Insausti Carmen L.**; Nicolás, Francisco J. Cultured HUMAN AMNIOTIC EPITHELIAL CELLS UNDERGO EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION. XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba, Septiembre 2010.

Alcaraz Antonia, Mrowiec Anna, López-Martínez Concepción, García-Vizcaíno Eva M, Moraleda José M, **Insausti Carmen L**, Nicolás Francisco J. AUTOCRINE TGF $\beta$  PRODUCTION INDUCES EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION IN HUMAN AMNIOTIC EPITHELIAL CELLS. (34.P5). TERMIS EU 2011, Annual Meeting. Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society, 7-10 June 2011, Granada-Spain.

Talavera J, Fernández del Palacio MJ, Rodríguez NK, **Insausti CL**, Moraleda JM. Echo-guided percutaneous intramyocardial injections in normal rabbits and rabbits with experimental cardiomyopathy. 38 PT. Annual meeting of the European Chapter of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS). June 7th to 10th, 2011 Granada. Spain. HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY. Cellular and Molecular Biology. Volume 26 (supplement 1), 2011. Pag . 342-334.

Alcaraz A, Mrowiec A, López-Martínez C, García-Vizcaíno E, Moraleda JM, **Insausti C**, Nicolás FJ. Autocrine TGFSS production induces epithelial to mesenchymal transition in human amniotic epithelial cells. (34.P5). Annual meeting of the European Chapter of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS). June 7th to 10th, 2011 Granada. Spain. HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY. Cellular and Molecular Biology. Volume 26 (supplement 1), 2011. Pag. 322-323.

Alcaraz A, López-Martínez C, Mrowiec A, García-Vizcaíno E, Monfort A, Izeta A, Moraleda JM, **Insausti C**, Nicolás FJ. Amniotic membrane opposes TGF $\beta$  signalling and induces c-jun expression in Hacat cells. Molecular lessons from the reepithelialisation induced by AM in deep large surface wounds. 34.03. Annual meeting of the European Chapter of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS). June 7th to 10th, 2011 Granada. Spain. HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY. Cellular and Molecular Biology. Volume 26 (supplement 1), 2011. Pag. 318.

**Insausti C**, Alcaraz A, García-Vizcaíno E, Mrowiec A, López-Martínez C, Blanquer M, Piñero A, Majado M, Moraleda JM, Castellanos G, Nicolás FJ. Massive post-traumatic wounds induced epithelialisation by amniotic membrane (34.09). Annual meeting of the European Chapter of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS). June 7th to 10th, 2011

Granada. Spain.  
HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY. Cellular and Molecular Biology. Volume 26  
(supplement 1), 2011. Pag. 320-321.

## ***ANEXOS***



**MEMBRANA AMNIÓTICA.**  
**PROTOCOLO DE AISLAMIENTO, CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN CELULAR.**  
**REGOGIDA DE DATOS.**

Donante:

Nº M.A: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Hora recolección	Hora procesamiento	Volumen	Peso	Observaciones

Células aisladas	Vol. Suspen. celular	Recuento /ml (x2)	Recuento Total	Promedio	Viabilidad (x2)
Post- Tripsina					
Post-DNasa / Colagenasa					

**CULTIVO PRIMARIO CÉLULAS EPITELIALES (hAESC)**

Siembra  $1.0 \times 10^5 / \text{cm}^2$  Frasco  $75 \text{ cm}^2$  DMEM + antibióticos + Glutamina + SBF 10%. Vol. 7 ml

Frascos	EGF 10 ng/ml	Fecha Inicio Clusters	Fecha Conflu. 80-90%	Cel. Desp.	Cel. Desp.	promedio	% obtenidas / cel. sembradas	Viabilidad
1	(+)							
2	(+)							
3	(-)							
4	(-)							

Colección y siembra cel. Sobrenadante: Si: \_\_\_\_\_ Seguir todo el proceso con estas células y recoger datos en otro protocolo identificado como Sobrenadante MA: \_\_\_\_\_

**INMUNOCITOQUÍMICA**

Siembra  $1.0 \times 10^4$  Placas de 5cm de diámetro sobre cristales de 12 mm de diámetro

	Citokeratina	Vimentina	Otro			
Cel. R.A						
PO						
P1....P4						

Cel. RA: recién aisladas

**INMUNOFENOTIPO**

Suspensión  $1.5 \times 10^5$  hAEC en 100  $\mu\text{L}$  de DPBS por tubo

hAEC	SSEA-1	SSEA-3	SSEA-4	TRA 1-60	TRA 1-81	HLA DR
Cel. R.A						
PO						
Cel. No adh.						

Cel. RA: Células recién aisladas. Cel. No adh: Células no adherentes

**CICLO CELULAR**Suspensión  $0.5 \times 10^6$  células en 200  $\mu$ L de PBS

	G1 %	S %	G2 %	M %	Apoptosis %
<b>Cel. R.A</b>					
1					
2					
<b>Cel. P0</b>					
1 (EGF)					
2(EGF)					
3					
4					

Cel. RA: recién aisladas

**ENSAYOS DE EXPANSIÓN *IN VITRO* (hAESC) (A partir de P0)**Siembra:  $1.0 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup>. F: 75 cm<sup>2</sup>

Pases	Fecha siembra	Fecha Despeg.	Nº días para confluencia	Cant cel. Despeg.	Cant cel. Despeg.	Promedio	Viabilidad
P0 (1)EGF							
(2)EGF							
(3)							
(4)							
P1 (1)EGF							
(2)EGF							
(3)							
(4)							
P2 (1)EGF							
(2)EGF							
(3)							
(4)							
P3 (1)EGF							
(2)EGF							
(3)							
(4)							
P4 (1)EGF							
(2)EGF							
(3)							
(4)							
P5 (1)EGF							
(2)EGF							
(3)							
(4)							

De ser necesario crio-preservar el excedente de células de cada pase a -80°C máximo 3 meses

**ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR (hAESC) (P0)**

**MÉTODO MTT:** Siembra por cuadruplicado a  $3.0 \times 10^3$ / pocillo en placa de 96 pocillos en DMEM estándar y en DMEM suplementado con EGF. Seis placas en total para la lectura los días 4, 7, 10, 14, 17 y 21. Lector de ELISA de 492nm con 620nm como referencia.

**MÉTODO EZU4:** Siembra por cuadruplicado a  $3.0 \times 10^3$ / pocillo en placa de 96 pocillos en DMEM estándar y en DMEM suplementado con EGF. Seis placas en total para la lectura los días 4, 7, 10, 14, 17 y 21. Lector de ELISA de 492nm con 620nm como referencia.

**ENSAYOS CLONOGÉNICOS (hAEC)**

Siembra: Placas de Petri de 60 mm ( $28 \text{ cm}^2$ ). Coloración Giemsa o similar.

DMEM	Siembra $1 \times 10^3/\text{cm}^2$	Fecha Siembra	Lectura día 14 Nº de colonias > 50 células				Promedio	Fecha Lectura
1(EGF)								
2(EGF)								
3								
4								
	Siembra $1 \times 10^2/\text{cm}^2$	Fecha Siembra	Lectura día 14 Nº de colonias > 50 células					Fecha Lectura
1(EGF)								
2(EGF)								
3								
4								
	Siembra $1 \times 10^3/\text{cm}^2$	Fecha Siembra	Lectura día 14 Nº de colonias > 50 células					Fecha Lectura
1(EGF)								
2(EGF)								
3								
4								

**MARCADORES DE PLURIPOTENCIALIDAD**

Siembra  $1 \times 10^4/\text{cm}^2$  en DMEM suplementado con EGF, Placas de 5cm de diámetro hasta confluencia 90%.

Investigación por PCR

	Oct-4	Sox-2	Nanog	Otro
Cel. P0				
Otro P				

**DIFERENCIACIÓN hAESC**

Diferenciación	Investigación por PCR Células en PO. Siembra $1.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$ en placas de 5 cm de diámetro		Investigación por inmunofluorescencia Células en PO. Siembra $1.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$ en placas de 5 cm de diámetro sobre cristales de 12 mm de diámetro	
	Gen	Resultado	Proteína	Resultado
<b>Neuro-ectodérmica</b>				
<b>Cardiogénica</b>				
<b>Hepatocítica</b>				

**DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA**Siembra:  $1.0 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$  en placas de 35 mm ( $9.6 \text{ cm}^2$ ) Medio AdipoDiff (Miltenyi), Cambio/3er día

Siembra	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	Oil Red O
Pozo 1											
Pozo 2											
Control neg.*											
Control + (MO)											

**DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA**Siembra:  $1.0 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$  en placas de 35 mm ( $9.6 \text{ cm}^2$ ); Medio OsteoDiff (Miltenyi) Cambio/3er día

Siembra	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	Fosf. Alcalina	Alizarin Red
Pozo 1												
Pozo 2												
Control neg.*												
Control + (MO)												

**DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA**Suspensión de  $2.5 \times 10^5$  células/mL Cultivos de micro-masa. ChondroDiff de Miltenyi

Siembra	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	Azul de Alciano	Colágeno II
Tubo Cónico 1												
Tubo Cónico 2												
Control neg.*												
Control + (MO)												

\* Control Negativo: Las mismas células en DMEM estándar

**CÉLULAS AISLADAS DEL MESODERMO AMNIÓTICO**Siembra:  $1.0 \times 10^5$  /cm<sup>2</sup> Frascos 25 cm<sup>2</sup>; DMEM + antibióticos + Glutamina + SBF 20%; Vol/frasco: 5ml

Frascos	Total	Inicio cel. fibroblastoides	Fecha Confluencia	Cel. Desp	Cel. Desp	Promedio	Viabilidad
1							
2							

**CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS ADHERENTES (P0 hasta P4)**Siembra: F: 75 cm<sup>2</sup>;  $1 \times 10^3$  cel. /cm<sup>2</sup> DMEM + antibióticos + Glutamina + SBF 10%; Vol/frasco: 7ml

Pases	Fecha siembra	Fecha Despeg.	Nº días para confluencia	Cant cel. Despeg.	Cant cel. Despeg.	Promedio	Viabilidad
P0 (1)							
(2)							
P1 (1)							
(2)							
P2 (1)							
(2)							
P3 (1)							
(2)							
P4 (1)							
(2)							
Total Cel.							

**ENSAYOS DE EXPANSIÓN *IN VITRO* (hAMSC)**Siembra: F: 75 cm<sup>2</sup>;  $1.0 \times 10^3$  cel. /cm<sup>2</sup> DMEM + antibióticos + Glutamina + SBF 10%; Vol/frasco: 7ml

Pases	Fecha siembra	Fecha Despeg.	Nº días para confluencia	Cant cel. Despeg.	Cant cel. Despeg.	Promedio	Viabilidad
P0 (1)							
(2)							
P1 (1)							
(2)							
P2 (1)							
(2)							
P3 (1)							
(2)							
P4 (1)							
(2)							
P5 (1)							
(2)							
P6 a P15							
Total Cel							

**ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR (hAMSC P0)**

- MÉTODO MTT:** Siembra por duplicado a  $3.0 \times 10^3$ / pocillo en placa de 96 pocillos en DMEM estándar (10% SBF). Seis placas en total para la lectura los días 4, 7, 10, 14, 17 y 21. Lector de ELISA de 492nm con 620nm como referencia.
- MÉTODO DE RECuento CELULAR (Cámara de Neubauer)**

**MÉTODO DE RECuento CELULAR**Siembra: células P0, F:  $25 \text{ cm}^2$ ;  $1.0 \times 10^3 \text{ cel/cm}^2$ .

Fecha siembra	Cant. células Sembradas	Fecha células despegadas	Cant. células despegadas	Promedio	Viabilidad	Total
Día 1		D 4				
		Día 7				
		Día 11				
		Día 14				
		Día 17				
		Día 21				

**ENSAYOS CLONOGÉNICOS (hAMSC)  
FORMACIÓN DE COLONIAS FIBROBLÁSTICAS (UFC-F)**

Siembra: Placas de Petri de 60 mm ( $28 \text{ cm}^2$ ). DMEM SBF: 20%; Coloración Giemsa o similar.

Pase 0	Siembra $1 \times 10^2 / \text{cm}^2$	Fecha Siembra	Lectura día 14 Nº de colonias > 50 células				Promedio	Fecha Lectura
1								
2								

**CICLO CELULAR (hAMSC)**Suspensión  $0.5 \times 10^6$  células en 200  $\mu\text{L}$  de PBS

	G1 %	S %	G2 %	M %	Apoptosis %
<b>Cel. P0</b>					
1					
2					
<b>Otro P....</b>					
1					
2					

**INMUNOFENOTIPO (hAMSC)**Suspensión de  $1.5 \times 10^5$  hAEC en 100  $\mu$ L de DPBS por tubo

	CD73	CD90	CD105	CD14	CD45	CD34	CD19	HLA DR
Cel. P4								

**DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA**Siembra:  $1.0 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 35 mm (9.6 cm<sup>2</sup>); Medio OsteoDiff (Miltenyi) Cambio/3er día

Siembra	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	Alizarin Red
Pozo 1											
Pozo 2											
Control neg.*											
Control + (MO)											

\* Control Negativo: Las mismas células en DMEM estándar

**DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA**Siembra:  $1.0 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 35 mm (9.6 cm<sup>2</sup>) Medio AdipoDiff (Miltenyi), Cambio/3er día

Siembra	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	Oil Red 0
Pozo 1											
Pozo 2											
Control neg.*											
Control + (MO)											

\* Control Negativo: Las mismas células en DMEM estándar

**DIFERENCIACIÓN CONDRÓGÉNICA**Suspensión de  $2.5 \times 10^5$  células/mL Cultivos de micro-masa. ChondroDiff de Miltenyi

Siembra	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	Azul de Alciano	Colágeno II
Tubo Cónico 1												
Tubo Cónico 2												
Control neg.*												
Control + (MO)												

\* Control Negativo: Las mismas células en DMEM estándar